

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés

**A LIPID- ÉS HOMOCISZTEIN ANYAGCSERE,
VALAMINT AZ OXIDATÍV STRESSZ
VIZSGÁLATA
HEMODIALIZÁLT BETEGEKBEN**

Dr. Kárpáti István

DEOEC I. sz. Belgyógyászati Klinika

Debrecen, 2003.

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés

**A LIPID- ÉS HOMOCISZTEIN ANYAGCSERE,
VALAMINT AZ OXIDATÍV STRESSZ
VIZSGÁLATA
HEMODIALIZÁLT BETEGEKBEN**

Írta:

Dr. Kárpáti István

Témavezetők:

Prof. Dr. Paragh György

Dr. Varga Zsuzsa

DEOEC I. sz. Belgyógyászati Klinika

Debrecen, 2003.

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke

1. Bevezetés, célkitűzés	1
2. Irodalmi háttér	5
2.1. Lipid-anyagcsere, szérum lipidek, LDL receptor	6
2.2. Az oxidatív stressz és az antioxidánsok	9
2.2.1. A lipidek zsírsav összetétele	9
2.2.2. Reaktív oxigéngyökök képződése, lipidperoxidáció	10
2.2.3. Oxidatív stressz, lipideltérések és a neutrofilek	12
2.2.4. Az oxidatív stressz és az antioxidánsok	13
2.2.4.1. Nem-enzimatisz antioxidáns E-vitamin (α -tocopherol) szerepe	13
2.2.4.2. A paraoxonáz szerepe az antioxidáns védekezésben	15
2.3. A neutrofilek intracelluláris szabadkalcium-szintjét befolyásoló tényezők	16
2.4. Hyperhomocysteinaemia, mint az atherosclerosis rizikótényezője	19
2.4.1. Hyperhomocysteinaemia krónikus veseelégtelenségben	21
2.4.2. A hyperhomocysteinaemia és a nyomelemek (kobalt és nikkelt) közti kapcsolat	23
3. Betegek és módszerek	24
3.1. Betegek	24
3.2. Laboratóriumi vizsgálati módszerek	24
3.3. Statisztikai analízis	34
4. Eredmények	35
4.1. A lipidanyagcsere vizsgálata	35
4.1.1. Lipidparaméterek vizsgálata	35
4.1.2. A monociták specifikus és scavenger LDL-receptor funkciója	36
4.1.3. Atherogén és nem atherogén zsírsavak mennyiségi változása	41
4.2. Oxidatív stressz alakulása és befolyásoló tényezői	47
4.2.1. A plazmalipidek zsírsav összetételének potenciális szerepe a neutrofilek fokozott oxidációs robbanásában	47
4.2.2. A nem-enzimatisz antioxidáns E-vitamin-ellátottság és a lipidperoxidáció	51
4.2.3. A szérum paraoxonáz-aktivitásának vizsgálata	55
4.3. A neutrofilek intracelluláris szabadkalcium-tartalmát meghatározó tényezők vizsgálata	58
4.3.1. Az erythropoietin kezelés hatása	58
4.3.1.1. rHuEpo-kezelésben először részesülő betegek	58
4.3.1.2. A hosszú távú rHuEpo kezelés hatása	60
4.3.2. A dialízismembrán hatása a neutrofilek $[Ca^{2+}]_i$ -tartalmára	63
4.3.3. A kalcium-foszfát anyagcsere hatása a neutrofilek $[Ca^{2+}]_i$ -tartalmára	64
4.3.4. A betegek életkora és a dialízisprogramban eltöltött idő kapcsolata a neutrofilek $[Ca^{2+}]_i$ -tartalmával	65
4.4. A hyperhomocysteinaemia gyakorisága és a metilén-tetrahidrátfolát redukáz polimorfizmusa hosszú távú folsavpótlásban részesülő HD betegekben	66

4.4.1.	A plazma homociszteinszintje és kapcsolata a folsav- és B ₁₂ -vitamin-szintekkel	68
4.4.2.	A MTHFR polimorfizmusa és kapcsolata a homocisztein-, a folsav-, és B ₁₂ -vitamin plazmaszintekkel	70
4.4.3.	Kapcsolat a szérumban kobalt-, nikkel- és homociszteinkoncentrációk között	73
5.	Megbeszélés	78
5.1.	A lipidanyagcsere zavarai	78
5.1.1.	Lipid abnormalitások veseelégtelenségben	78
5.1.2.	Az LDL metabolizmusa, az LDL receptorok működésének zavarai	79
5.1.3.	A lipidparaméterek, a lipidek zsírsavösszetételének változása és a neutrofilek oxidációs robbanása	82
5.1.4.	Az antioxidáns rendszer veseelégtelenségben	90
5.2.	A neutrofilek intracelluláris szabadkalcium-szintjét meghatározó tényezők	93
5.3.	Hyperhomocysteinaemia veseelégtelenségben	95
6.	Összefoglalás és konklúziók	99
7.	Irodalomjegyzék	102
8.	Közlemények jegyzéke	120
9.	Köszönetnyilvánítás	125

Rövidítések jegyzéke:

AA	arachidonsav
ACAT	acetyl-koleszteril-aciltranszferáz
acLDL	acetylált LDL
apo	apolipoprotein
BMI	testtömeg index
$[Ca^{2+}]_i$	intracelluláris szabad kalcium
CAD	koszorúérbetegség
Chol	koleszterin
Cup	cuprophan
DAG	diacylglycerin
DHA	docosahexaénsav
DHF	dihydrofolát
EPA	eicosapentaénsav
ERK1/2	extracelluláris jel által regulált protein kináz
E vit	E-vitamin
HBSS	Hanks balanced salt solution
Hcy	homocisztein
HDL	high density lipoprotein
HD	hemodialízis
HDF	hemodiafiltráció
Hgb	hemoglobin
HHC	hyperhomocysteinaemia
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim-A
Htc	hematokrit
IL-1-béta	interleukin-1 béta
IL-2	interleukin-2
LCAT	lecitin koleszterol acil transzferáz
LDL	low density lipoprotein
Lp(a)	lipoprotein (a)
LPL	lipoprotein lipáz
L-NMMA	N-metil-arginin acetát
MAP-kináz	mitogén aktivált protein kináz
MG	monoglutamát

MTHF	metil-tetrahidrofolát
MTHFR	metilén-tetrahidrofolát reduktáz
MUFA	egyszeresen telítetlen zsírsav
NADPH	redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid foszfát oxidáz
NAGase	N-acetil-béta-D-glukozaminidáz
NEFA	nem-észterifikált (szabad) zsírsav
NO	nitrogén-monoxid
O ₂ ⁻	szuperoxid anion
OH [·]	hidroxil gyök
PBMC	perifériás mononukleáris sejtek
PHD	prédialízis stádiumú veseelégtelenség
PG	poliglutamát
PKC	protein kináz C
PMA	forbol-mirisztát-acetát
PMNL	polimorfonukleáris leukocita
PON	paraaxonáz
PS	polysulphone
PTH	parathormon
PUFA	többszörösen telítetlen zsírsav
rHuEpo	rekombinált humán erythropoietin
RNS	ribonukleinsav
ROS	reaktív oxigén eredetű gyök
SAM	S-adenozil metionin
SFA	telített zsírsav
SOD	szuperoxid dizmutáz
TBARS	tiobarbitursavval reakcióba lépő anyagok
THF	tetrahidrofolát
TG	triglicerid
TNF-alfa	tumor nekrosis faktor alfa
sTNF-alfa	szolubilis tumor nekrosis faktor alfa
URR	urea redukciós ráta
VLDL	very low density lipoprotein
VVE	végstádiumú veseelégtelenség

1. BEVEZETÉS, CÉLKITÚZÉS

A végstádiumú veseelégtelenségben (VVE) szenvedő betegekben az egyik vezető halálok a szív- és érrendszeri megbetegedés. A krónikus veseelégtelenségben kialakuló atherosclerosis egy komplex folyamat eredménye, amelyben a klasszikus atherogén tényezők mellett számos, az urémiás állapottal összefüggő tényező játszik szerepet. Jelen munkában az atherogén tényezők közül az alábbiak vizsgálatára fektettünk hangsúlyt.

A hyperlipidaemia és oxidatív stressz fontos szerepet játszik az atherogenesis folyamatában. A HD betegekben fokozott a lipidperoxidáció, amely érinti a LDL-t. Az oxidatív módon módosult LDL szerepe az érlemezés folyamatában egyre jobban ismert. A natív és módosult LDL metabolizmusa a sejtek specifikus és scavenger LDL receptorán át történik. A natív LDL specifikus receptorához való kötődése után három fontos választ ad a sejt: csökken az LDL receptorok szintézise, fokozódik az acetyl-koleszteril-aciltranszferáz (ACAT) enzim aktivitása és csökken a koleszterin endogén szintéziséért felelős 3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim-A (HMG-CoA) reduktáz aktivitása. Ezzel ellentétben a módosult LDL scavenger LDL receptorhoz való kötődése után nem következik be gátlás a specifikus LDL receptorok szintézisében és sejt felszínre való expressziójában és nem áll le a sejtek saját koleszterin szintézise sem. A módosult LDL scavenger LDL receptoron át történő felvételét követően az apoE termelés fokozódik. Az apoE a sejtekből direkt transzport folyamatok révén a feleslegben lévő koleszterin leadását segíti elő. Amennyiben változás következik be akár a specifikus, akár a scavenger LDL receptor működésében, akkor a sejtekben nagy mennyiségű koleszterin halmozódik fel, amely zsírban dús, ún. habos (foam) sejtek képződéséhez vezet. Ezen habos sejtek megjelenése fontos láncszeme az atherosclerotikus plakk kialakulásának.

A lipidanyagcsere-zavar további jellemzője, hogy a szérumban a lipidek, lipoproteinek zsírsavösszetétele megváltozik. Hyperlipidaemiákban megfigyelték, hogy csökken a többszörösen telítetlen zsírsavak aránya, amely relatív esszenciális zsírsavhiány kialakulásához vezethet. Az esszenciális zsírsavak (linoleinsav és linolénsav) szubsztrátjai az arachidonsav képződésének, amelyből prosztaglandinok, tromboxán és leukotriének képződnek. Hyperlipidaemiákban megfigyelték azt is, hogy az egyszélesen telítetlen zsírsavak közül az atherogén hatású palmitoleinsav mennyisége megnő. Szoros kapcsolatot találtak a szérumban a lipidek mennyisége (koleszterin, triglicerid, LDL-koleszterin és HDL-koleszterin), a nyugvó neutrofilek és monociták szuperoxid anion termelése valamint a szérumban a lipidek zsírsavösszetétele között. Keveset tudunk azonban arról, hogy VVE-ben megváltozik-e a zsírsavösszetétel, és ha igen, a zsírsavösszetétel-változás kapcsolatban áll-e a lipidabnormalitásokkal és a neutrofil funkciókkal.

Az oxidációs stressz kivédésében komplex enzimatis és nem-enzimatis antioxidáns rendszer vesz részt. A nem-enzimatis antioxidáns védőrendszer jól ismert tagjai az E-vitamin, C-vitamin, szabad SH csoportot tartalmazó és egyéb vegyületek. Az LDL-ben az oxidatív stressz lipidperoxidációt indukál, amely a többszörösen telítetlen zsírsavakat érinti. Ezeket a zsírsavakat védi az E-vitamin és a HDL-kötött paraoxonáz (PON-1), más egyéb mellett, az oxidatív károsodástól. A PON-1 enzimnek három, különböző aktivitású fenotípusa ismert. Nincsenek azonban adatok a VVE-ben szenvedő betegekben a PON-1 fenotípus megoszlására vonatkozóan. A HD betegekben a csökkent étvágy miatti kevesebb vitamin felvétel, és a dialízis kezelés hatására bekövetkező vitaminvesztés (vízben oldódó vitaminok távozása a dializáló membránon át) károsíthatja a nem-enzimatis antioxidáns rendszer működését.

A reaktív oxigéngyökök (szuperoxid anion, hidroxil) képződésének egyik forrását a keringő neutrofilek jelentik. Hyperlipidaemiákban és az öregedési folyamatok vizsgálata során ismertté vált, hogy a nyugvó neutrofilek intracelluláris szabadkalcium-szintje megemelkedik. Ez többnyire együtt jár a nyugvó neutrofilek fokozott szuperoxid anion termelésével és a kalcium-mobilizáló receptoron át történt stimulációt követő csökkent funkciókkal. Nem találtunk adatot arra, hogy a VVE-ben szenvedő betegekben ilyen vizsgálatokat végeztek-e, annak ellenére, hogy e sejtekkel kapcsolatban számos funkcionális károsodásról beszámoltak.

A hyperhomocysteinaemia (HHC), mint az érlemezésedés önálló rizikófaktora vált ismertté. A veseműködés romlásával párhuzamosan, már az idült veseelégtelenség kezdeti stádiumától a homocisztein (Hcy) plazmaszintek progresszíven növekednek. A krónikus veseelégtelenségben gyakori hyperhomocysteinaemia okai nem teljesen tisztázottak.

A Hcy metabolizmusában a folátkör optimális működéséhez B₁₂-vitamin szükséges, amelynek központi fémionja a kobalt (Co). A Co-on kívül, ugyancsak esszenciálisnak bizonyult a metionin metabolizmusban a nikkel is. Állatkísérletekben kobalt és nikkel adásával a B₁₂-vitamin-ellátottság javult és a HHC mértéke csökkent. Humán eredmények jelenleg nem ismertek. A folsavkörben a folsav és a B₁₂-vitamin olyan kofaktorok, amelyek adásával a hyperhomocysteinaemia mértéke csökkenthető. Nem egységes az irodalom abban, hogy VVE-ben milyen dózisu folsavkezelés ajánlható a homociszteinszint csökkentésére.

Célkitűzések

A fentiek figyelembevételével célkitűzéseink a következők voltak:

1. A hemodializált betegek monocitáiban a specifikus és a scavenger LDL receptorok expressziójának és működésének vizsgálata.
2. A lipid extraktum zsírsavösszetételének meghatározása, a zsírsavösszetétel, a nyugvó neutrofilek oxidációs robbanása, a lipidértékek (Chol, TG, LDL-Chol, HDL-Chol), és a lipidperoxidáció mértéke közötti kapcsolat vizsgálata.
3. Az antioxidánsok közül az E-vitamin-ellátottság és a paraoxonáz enzim (PON-1) aktivitásának és fenotípus megoszlásának meghatározása.
4. A neutrofilek intracelluláris szabadkalcium-szintjének meghatározása és néhány tényező hatásának tanulmányozása, amely befolyásolhatja azt (HD programban eltöltött idő, életkor, rHuEpo kezelés, anaemia mértéke, kalcium-foszfát anyagcsere, dializáló membránok biokompatibilitása).
5. A homocisztein koncentráció és a MTHFR enzim polimorfizmusának meghatározása és a folsav- és B₁₂-vitamin-ellátottság, valamint a szérum kobalt- és nikkellkoncentrációk közti kapcsolat vizsgálata.

2. IRODALMI HÁTTÉR

Végállapotú vesebetegség miatt 2001-ben a világ 120 országában összesen 1 479 000 beteg részesült vesepótló kezelésben. A vesepótló kezelésben részesültek között a hemodialízissel kezelték aránya 68,7%, a folyamatos ambuláns peritoneális dialízissel (CAPD) kezelték aránya 8,5% volt. Transzplantált vesével 338 000 ember (22,8%) élt a 2001. év végén (141).

A végstádiumú veseelégtelenségben szenvedő (VVE) betegek életkilátásait a különböző vesepótló kezelések (hemodialízis, peritoneális dialízis, vesetranszplantáció) bevezetése és széleskörű elterjedése alapvetően megváltoztatta. Mindezek ellenére a cardiovascularis megbetegedések továbbra is vezető halálteki tényezők (>45%) ebben a betegcsoportban. A cardiovascularis megbetegedésre vonatkozó kockázat kifejezetten nagy VVE-ben. A dializált betegekben 10–20-szor gyakoribb a cardiovascularis megbetegedések okozta halálozás, mint az átlag populációban (68).

Már több évtizeddel ezelőtt felismerték azt, hogy a VVE-ben szenvedő betegekben az atherosclerosis folyamata felgyorsul (82). A felgyorsult atherosclerosisral összefüggő cardiovascularis morbiditás döntően meghatározza a dializált betegek életkilátásait (216), annak ellenére, hogy a dialízis technikai módszerei jelentős fejlődésen mentek és ennek keresztül és a biokompatibilis dializáló membránok használata széleskörűen elterjedt.

A hemodializált betegekben az érlemezés általánosan ismert rizikófaktorai (dyslipidaemia, hypertonia, diabetes mellitus, dohányzás, mozgásszegény életmód) mellett a veseelégtelenséggel és a dialízissel kapcsolatos rizikótényezőknek is komoly jelentősége van, mint a hyperphosphataemia, hyperhomocysteinaemia, az oxidatív stressz (dializáló membrán) és az enzimatikus és nem-enzimatikus antioxidáns rendszer egyensúlyának felborulása (181). Az utóbbi években a dializált betegek felgyorsult atherosclerosisában a

dialízissel járó „mikroinflammációs” állapot jelentőségét hangsúlyozzák. Ennek oka nem tisztázott, azonban a dializáló oldat bakteriális és egyéb kontaminációjának, a dialízis bioinkompatibilitásának (dialízis technika, dializáló membránok) és az érösszeköttetéseknek komoly szerepe lehet ebben (181).

Jelen munkánkban a VVE-ben szenvedő betegek atherogenesisében szerepet játszó tényezők közül az alábbiakat vizsgálatuk:

2.1. Lipid-anyagcsere, szérum lipidek, LDL receptor

VVE-ben az egyik leggyakoribb eltérés a lipid profilban a triglicerid (TG) és a koleszterindús low-density lipoprotein (LDL) részecskék felszaporodása, amely többnyire együtt jár a high-density lipoprotein (HDL) mennyiségének csökkenésével (4, 9, 13). A TG szint emelkedésében, valamint a koleszterindús „habos-sejt” kialakulásában szerepe lehet az LDL metabolizmusának.

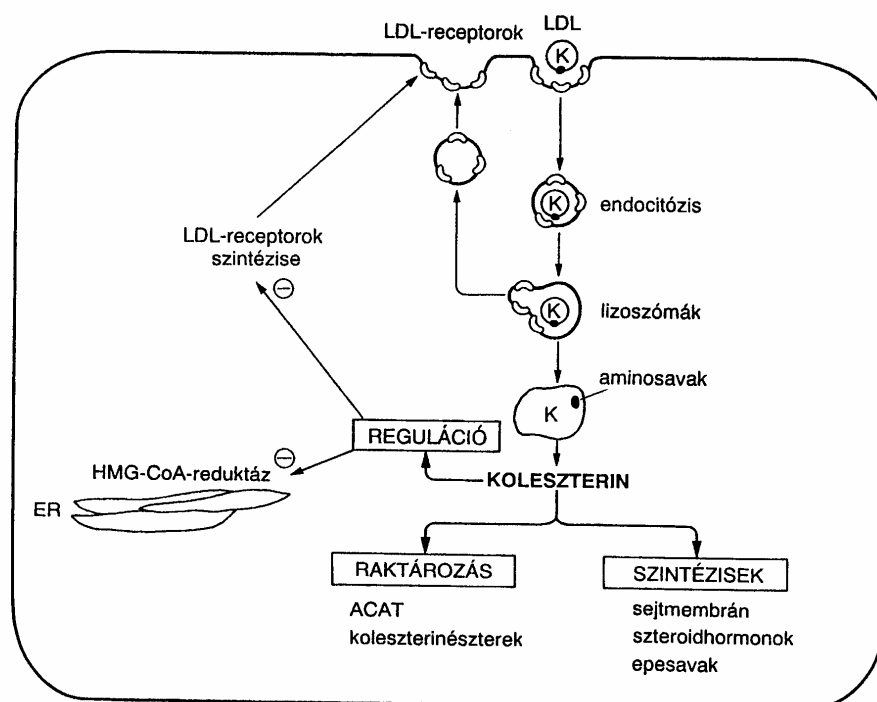
Ma már széleskörűen elfogadott az LDL atherogenezisben betöltött szerepe. Az LDL szérumszintjének emelkedését számos tényező kiválthatja, de a legáltalánosabban elfogadott ok az LDL receptorok számának és funkciójának károsodása. Goldstein és mtsai mutatták ki először familiáris hypercholesterinaemiás betegekben az LDL receptorok genetikai hiányát vagy funkcionális károsodását (79, 80). Az LDL receptor egy sejtfelszíni membrán-kötött glikoprotein, amely az LDL-koleszterin szabályozott felvételéért felelős (80). A specifikus LDL receptort először mellékvesekéregből izolálták (179). Sikerült ellene monoklonális antitestet előállítani (22), majd izolálni a szintéziséért felelős gént (172) és tisztázni a receptor fehérjeszakaszának szerkezetét (22). Az LDL molekula apoprotein B₁₀₀ részével képes kötődni a receptorokhoz, majd internalizálódás után fehérjekomponense lebomlik és a sejt koleszterintartalma megnő (79, 80).

Egészséges emberek monocitái specifikus LDL receptoruk segítségével képesek a LDL-t megkötni és így lehetővé válik a LDL-partikulumok internalizációja és degradációja (37, 38, 78). Az LDL receptorok aktivációjának, majd az LDL-partikulumok internalizációjának a legfőbb biológiai hatása az endogén koleszterin szintézis gátlása (1. ábra), amely a 3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim A (HMG-CoA) reduktáz aktivitásának gátlása révén valósul meg (38).

A specifikus LDL receptorok számos sejt felszínén (fibroblasztok, hepatociták, limfociták, monociták, stb.) jelen vannak, azonban az ún. scavenger receptorok, amelyek a szerkezetében módosított LDL-t képesek megkötni, a makrofágok és a makrofágszerű sejtek felszínén expresszálódnak (35). A módosult LDL oxidatív vagy más folyamatok hatására megváltozott szerkezetű LDL-t jelent. A monocita-makrofág típusú sejteket a perifériás vérből könnyű izolálni, így ezek a sejtek alkalmasak arra, hogy mind a specifikus, mind a scavenger LDL receptorok működését tanulmányozzuk.

A normál LDL specifikus receptorához való kötődése után három fontos választ ad a sejt (1. ábra):

1. Gátlódik az LDL receptorok de novo szintézise.
2. Fokozódik az acetil-koleszteril-aciltranszferáz (ACAT) enzim aktivitása, amely a felesleges koleszterinhez zsírsavakat kapcsol, és a sejtben tárolható koleszterin-észtereket képez.
3. Gátlódik a koleszterin endogén szintéziséért felelős 3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim-A (HMG-CoA) reduktáz aktivitása (36). Az LDL specifikus receptorához való kapcsolódása tehát fontos lépés a koleszterin-anyagcsere szabályozásában.



1. ábra. A specifikus LDL receptor aktiválódása után lejátszódó folyamatok.
 K: koleszterin-dús LDL; ACAT: acetil-koleszteril-aciltranszferáz; HMG-CoA reductáz: 3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim-A reductáz; ER: endoplazmatikus retikulum

A módosult LDL scavenger LDL receptorhoz való kötődése után a sejtekben az előbbiektől eltérő folyamatok indulnak be: A scavenger receptor aktiválódását nem követi a HMG-CoA reductáz aktivitásának gátlása, ennek megfelelően, az endogén koleszterinszintézis sem áll le. Nem következik be gátlás a specifikus LDL receptorok szintézisében és sejt felszínre való expressziójában. A módosított LDL scavenger receptoron át történő felvételét követően is beindul azonban egy olyan védőmechanizmus, amely normál működés esetén megvédi a sejteket a koleszterin felhalmozódásától. Ez a folyamat az apoE termelés fokozódása útján valósul meg. Az apoE feladata, hogy a sejtekből direkt transzport folyamatok révén a feleslegben lévő koleszterin leadását elősegítse (38). Amennyiben károsodik akár a specifikus, akár a scavenger LDL receptor működése, akkor a sejtekben nagy mennyiségű koleszterin halmozódik fel, amely zsírban dús, ún. habos sejtek képződéséhez vezet.

Az irodalomból ismert, hogy az LDL az urémiás betegek szérumában in vitro körülmények között képes oxidálódni (116). Ugyanakkor, viszonylag kevés adat áll rendelkezésünkre urémiás betegekben a specifikus LDL és scavenger LDL-receptorok működéséről, valamint a károsodott lipid metabolizmusban betöltött szerepéről. A dializált betegek keringésében a változatlan vagy enyhén emelkedett LDL-szint alacsony HDL-szinttel társul, amely az LDL/HDL hányados növekedését eredményezi (10, 217). Portman és mtsai urémiás betegek limfocitáin végzett vizsgálatukban azt találták, hogy mind az LDL receptor mRNS-ének szintézise, mind a fehérje funkciója csökken (160). Ando és mtsai megfigyelése szerint, pedig VVE-ben a monocita-makrofág sejteken a scavenger LDL receptorok expressziója fokozódik (1, 2). Mindkét receptortípus működését egyidejűleg azonban VVE betegekben korábban nem vizsgálták. Ezen megfontolás alapján tanulmányoztuk azt, hogy miképpen alakul a hemodializált betegekben az LDL specifikus és scavenger receptorának expressziója, a natív LDL-indukálta HMG-CoA reduktáz gátlása, valamint a módosított LDL (acLDL) által kiváltott apoE szekréció és „habos-sejt” képződés.

2.2. Az oxidatív stressz és az antioxidánsok

2.2.1. A lipidek zsírsav összetétele

A plazmalipidek és lipoproteinek zsírsavösszetétele megváltozik hyperlipidaemiákban, cardiovascularis megbetegedésekben. Közös változás ezekben az esetekben a többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFA) arányának csökkenése, az egyszeresen telítetlen zsírsavak (MUFA) közül a palmitoleinsav (C16:1) arányának a hyperlipidaemia fokozódásával való növekedése (144, 185). Szoros negatív korreláció áll fenn a hyperlipidaemiás betegekben a plazma koleszterin (Chol)-, HDL-koleszterin- és triglicerid

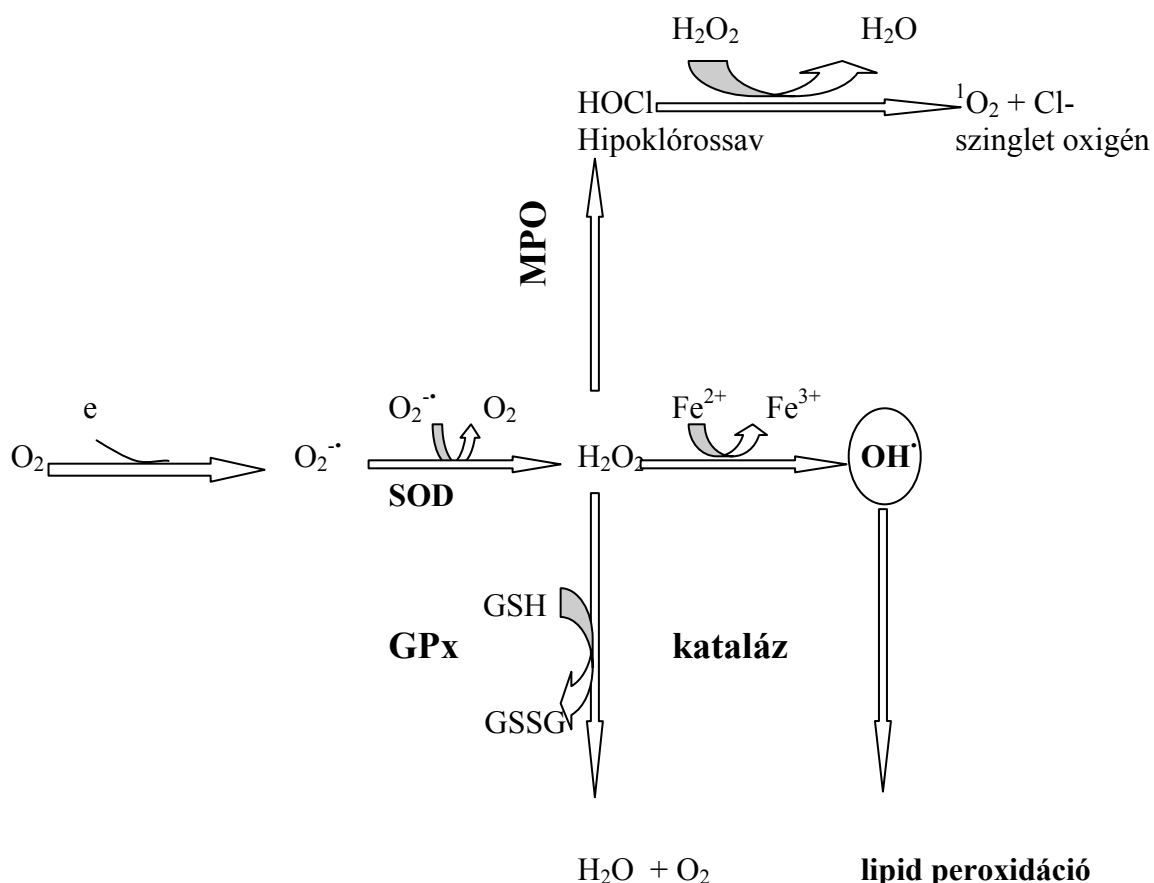
(TG)-szintje, valamint a plazmalipidek PUFA-tartalma között (5, 144). Megállapították, hogy hyperlipidaemiákban és cardiovascularis megbetegedésekben az esszenciális linoleinsav (C18:2) relatív hiánya fennáll (5, 185). A linoleinsav-hiánynak számos következménye lehet, hiszen ez a zsírsav a prekursora az arachidonsav ciklusnak, amelyben a prosztaglandinok és a leukotriének képződnek (25, 184, 192).

Krónikus veseelégtelenségben humán és állatkísérletes tanulmányok szerint PUFA [elsősorban halolaj, amely eicozahexaénsavban (EPA) és dokozahexaénsavban (DHA) gazdag], adásával a vesefunkciók romlását lassítani lehet (21, 43, 120, 184). Ugyanakkor igen keveset tudunk a betegek plazmalipidjeinek zsírsavösszetételéről, annak ellenére, hogy az étrend halolajjal való kiegészítésének kedvező hatása azt sugallja, hogy komoly eltérések lehetnek a szervezet zsírsavösszetételében, elsősorban a PUFA-tartalomban. Vizsgáltuk ezért a zsírsavösszetétel alakulását prédialízis állapotában lévő és hemodialízis programban (HD) kezelt vesebetegekben, valamint kapcsolatukat a szérumban lévő lipidekkel és a társult hyperlipidaemia, cardiovascularis megbetegedés (CAD) meglétével.

2.2.2. Reaktív oxigéngyökök képződése, lipidperoxidáció

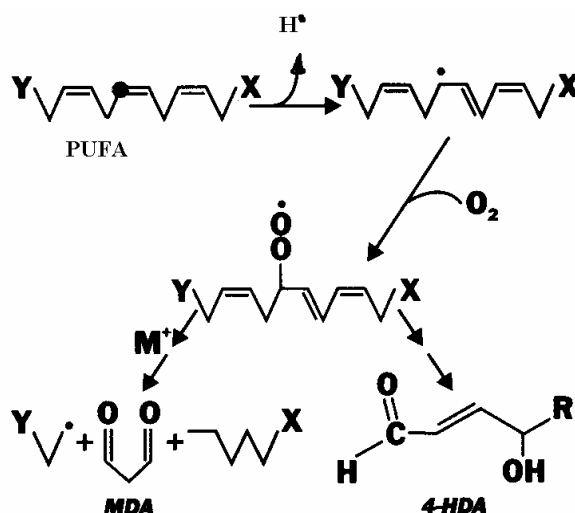
A szabadgyökök indukálta reakciók számos betegség, köztük az atherosclerosis kialakulásában fontos szerepet játszanak. A szabadgyökök és elsősorban a reaktív oxigéngyökök (ROS), melyek az oxigén redukciójával képződnek, igen nagy kémiai reaktivitással rendelkeznek. Az oxidatív stressz a reaktív oxigéngyökök túltermelését jelenti. Képződésüket a 2. ábra mutatja.

A folyamat első lépésében keletkezett szuperoxid anion ($O_2^{\cdot-}$) további reaktív speciesek képződésének forrása (2. ábra), mint pl. hidroxilgyök (OH^{\cdot}) és hidrogén peroxid (H_2O_2). Ezek a gyökök indítják be a lipidperoxidációt hozzájárulva ezzel az érfal károsodásához (59, 71, 161).



2. ábra. Az oxidatív stressz kialakulásában szerepet játszó reaktív oxigéngyökök képződése és eliminációja. MPO: mieloperoxidáz, GPx: glutation peroxidáz, SOD: szuperoxid dizmutáz, GSH: redukált glutation, GSSG: oxidált glutation, $\text{O}_2^{\cdot -}$: szuperoxid aniongyök, H_2O_2 : hidrogén-peroxid, OH^\bullet : hidroxilgyök.

A reaktív oxigéngyökök a sejtmembrán károsodását váltják ki, elsősorban a többszörösen telítetlen zsírsavak oxidatív degradációjának beindításával, amely folyamatban szénközpontú gyökök keletkeznek (3. ábra), azaz az első támadási pont a lipidekben, lipoproteinekben, foszfolipidekben található PUFA (85). A ROS indukálta lipidperoxidáció károsítja a sejtmembránt, inaktiválja a membránkötött enzimeket és receptorokat. A szénközpontú gyökök az extracelluláris térben újabb lánreakciót indítanak el, amelynek eredményeképpen depolimerizálódnak a poliszaccharidok, a fehérje-keresztkötések felszakadnak, vagy újak alakulnak ki, vagy fehérjedegradáció jön létre. A kialakult elváltozások következményeként megváltozik a sejtmembrán szerkezete, a sejtmembrán fluiditása és károsodnak a transzportfolyamatok (186).



3. ábra. A lipidperoxidáció folyamata és végtermékei. PUFA: többszörösen telítetlen zsírsav, MDA: malondialdehid, 4-HDA: 4-hidroxi-alkenal.

A hemodializált betegekben a fokozott lipidperoxidáció több tényezőre vezethető vissza. Kiváltásában szerepe van a dializáló membrán biokompatibilitásának. A dialízis membrán kémiai szerkezetétől és töltésétől függően számos hatást vált ki a szervezetben. Ezek közül legfontosabb a komplement rendszer és a neutrofilek aktiválódása, melynek következtében fokozódik a neutrofilek szuperoxid anion produkciója (54, 218).

2.2.3. Oxidatív stressz, lipideltérések és a neutrofilek

A neutrofilekben oxidációs robbanást kiválthatnak a szérum lipidek, elsősorban a triglicerid és a módosult LDL. Szoros pozitív korrelációt mutattak ki hyperlipidaemiás betegekben a neutrofil granulociták oxidációs robbanása és a szérum TG-szintje között (5), ami alátámasztja, hogy hyperlipidaemiában a fokozott oxidatív stresszben a TG indukálta szuperoxid anion termelésnek is szerepe van. Kísérleti eredmények bizonyítják, hogy a neutrofilek O₂⁻ termelését in vitro és in vivo egyaránt befolyásolják a zsírsavak, elsősorban a PUFA-k (12, 87, 123). A hosszú szénláncú többszörösen telítetlen zsírsavak

közül a linoleinsav és arachidonsav O_2^- -termelés fokozódását, míg az EPA és DHA az O_2^- termelés gátlását okozza humán neutrofilekben (50).

Figyelembe véve azt a tényt, hogy VVE-ben épp a TG-szint megemelkedés az egyik jellemző lipid abnormalitás és jellegzetes eltérés mutatható ki a szérum lipidek, lipoproteinek zsírsavösszetételében, vizsgáltuk az összefüggést a neutrofilek O_2^- termelése és a szérum lipidértékek, valamint a szérum zsírsavösszetétele között.

2.2.4. Az oxidatív stressz és az antioxidánsok

2.2.4.1. Nem-enzimatis antioxiidáns E-vitamin (α -tocopherol) szerepe

A fokozott oxidációs stressz kivédésében az antioxidáns rendszernek alapvető feladata van. Ez enzimatis és nem-enzimatis részből áll. Az enzimatis antioxiidáns védekezésben fontos szerep jut a szuperoxid dizmutáznak (SOD), amely a O_2^- dizmutációjával H_2O_2 -ot állít elő. Ez utóbbi több átalakuláson megy keresztül és a semlegesítésében a kataláz és a glutation reduktáz játszik szerepet. A H_2O_2 azonban a Fenton reakcióban a OH^\cdot képződésének is forrása, amikor is a gyökképződést a $Fe^{2+} \longrightarrow Fe^{3+}$ átalakulás váltja ki (2. ábra).

Az extracelluláris rendszer enzimatis védekező kapacitása gyenge, elsősorban a nem-enzimatis antioxiidánsok gyökkfogó- és eltakarító funkciójával számolhatunk. Ilyen, pl. a cöruoplazmin, a szérum albumin, szabad SH-csoportot tartalmazó vegyületek, a transzferrin, ferritin, amely az endotéliumba beépülve képes azt megvédeni az oxidatív károsodással szemben (16). A nem-enzimatis antioxiidánsok egy másik és igen fontos csoportját a természetben megtalálható antioxiidánsok alkotják. Ezek között a legfontosabb az E-vitamin (amely több, hasonló szerkezetű molekula keveréke, ezek közül az α -tocopherol a biológiailag aktív) és a C-vitamin (aszkorbinsav). Az E-vitamin képes a

lipidperoxidációt gyökbefogással leállítani, miközben ő maga alakul át gyökké. Az E-vitamin gyök redukcióját az aszkorbinsav végzi, ennek regenerálásához pedig a redukált glutation szükséges (91).

Az E-vitamin zsírban oldódó vitamin, a gyomorból felszívódása után, a kilomikronokba épül be. A táplálékkal felvett α , γ , δ , stb. tocopherol keverékből, a biológiailag aktív α -tocopherol a májban szelektíven a VLDL-be épül be. A VLDL-ből a keringésben LDL keletkezik, eközben az α -tocopherol-nak csak egy része marad az LDL-ben egy másik része a HDL-be kerül át. Az α -tocopherol LDL és HDL közötti megoszlása semmilyen transzport fehérjét nem igényel (91). A keringésben mérhető E-vitamin nagy többségben tehát a lipoproteinekhez kötődik, így az LDL oxidatív károsodásának kivédése szempontjából az egyik legfontosabb molekula (96). Az E-vitamin orális adásával az LDL oxidatív rezisztenciáját megnövelhetjük, miközben az LDL kiváltotta endotél károsodás jelentős mértékben lecsökken (18, 23).

Az E-vitamin, az antioxidáns hatás mellett, szerepet játszik a PUFA-k sejtmembránon belüli stabilizációjában, azaz a membrán fluiditás szabályozásában (151), befolyásolja a sejtproliferációt, gátolja a protein-kináz C-aktivitását (81, 194) és csökkenti a leukociták apoptózisát (69).

VVE-ben az oxidatív stressz következtében károsodnak a plazma lipidek (pl. oxidált-LDL) és a sejtmembránok, amelyek elősegítik az atherosclerosis progresszióját. Számos tanulmány jelent meg, amelyben a HD betegek antioxidáns védekező mechanizmusának károsodásáról számolnak be. A HD betegekben csökkent eritrocita SOD, kataláz és glutation peroxidáz aktivitásokat, valamint csökkent extracelluláris glutation peroxidáz aktivitást írtak le (48). A dialízis kezelés következtében a nem-enzimatis antioxiidánsok közül a vízoldható C-vitamin és a szabad -SH-csoportot

tartalmazó vegyületek egy része a szervezetből a dializáló membránon át távozik (102). A veseelégtelenségben szenvedő betegekben a diétás megkorlátásoknak és az étvágytalanságnak is szerepe lehet a zsírban oldódó vitaminok (E-vitamin) és az ubiqlinol csökkent bevitelében (136, 200). Így a HD betegekben a fokozott oxidatív stressz nem elégséges antioxidáns ellátással párosulhat.

2.2.4.2. A paraoxonáz szerepe az antioxidáns védekezésben

Az utóbbi évek kutatási eredményei rámutattak arra, hogy a HDL antioxidáns kapacitása, részben a HDL-hez kötött egyik enzim, a paraoxonáz-1 (PON-1) működésével kapcsolatos (125, 126). Ezen enzim egy májban termelődő, 43 kDa molekulatömegű glikoprotein, amely a HDL-ben annak apoA₁-et tartalmazó részéhez az N-terminális végével kapcsolódik. Génje a 7-es kromoszómán helyezkedik el. A szérumban három különböző aktivitású fenotípusa létezik (AA, AB, BB), az aminosav szekvenciájában a 192. helyen történő glutamin - arginin csere alapján (115, 170). Az AA kis aktivitású, az AB intermedier-, míg a BB nagy aktivitású forma. A PON-1 fiziológiásan reverzibilisen köti a szerves-foszfát észtereket, amelyeket hidrolízissel közömbösít. Kimutatták, hogy a PON-1 HDL-hez kötődve metabolizálja a lipidperoxidokat és megvédi az LDL-t a lipidperoxidok akkumulációjától. A feltételezett mechanizmus, amellyel a HDL a lipidperoxidok akkumulációját képes csökkenteni egy enzimatis hidrolízis, amely a fosfolipid hidropoxidokat érinti (125). Az LDL-ben a többszörösen telítetlen zsírsavakat tartalmazó fosfolipidek (pl. foszfatidil-kolin) PUFA részét (pl. linoleinsav) képesek a reaktív oxigénradikálok megtámadni, mégpedig a 9-es C-atomhoz kapcsolódó kettős kötésnél. A HDL-hez kötött PON-1 a PUFA 9-es C-atomján lévő peroxid hidrolízisét katalizálva képes leállítani a lipidperoxidációt (127).

In vitro kísérletekben kimutatták, hogy a PON-1 nemcsak az LDL oxidációját, hanem a makrofágok oxidált LDL felvételét is gátolja és így csökkenti a lipidperoxidok felvételét (125, 127). Bár az egészséges emberek többségében, a szérumban PON-1 aktivitás és koncentráció korrelációt mutat a HDL-Chol és apoA₁ koncentrációjával, a korreláció nem szoros, ami azt jelzi, hogy a PON-1-et tartalmazó HDL egy szubspecies az összes HDL-en belül. (124). A PON-1-et tartalmazó HDL mennyiségét feltehetően több tényező is befolyásolja (a fenotípuson kívül), mint pl. az étrend vagy gyulladásos megbetegedések (66, 94).

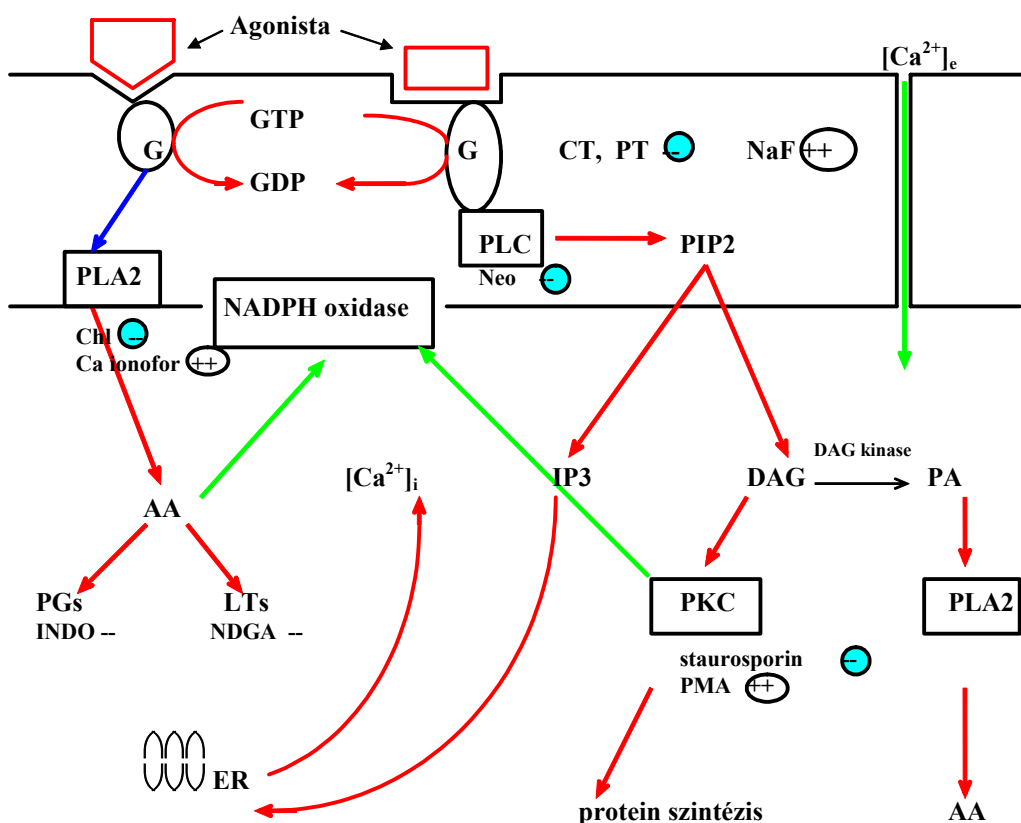
A PON-1 aktivitás csökkenését myocardium infarctusban (137), heterozigóta familiáris hypercholesterinaemiában továbbá insulindependens és nem-insulindependens diabetes mellitusban is leírták (128).

Elsőként Schiavon és mtsai számoltak be 1996-ban a szérumban PON-1 aktivitás csökkenéséről urémiás betegekben (177). Munkánkban a PON-1 aktivitás meghatározása mellett, a fenotípusmegoszlást is vizsgáltuk VVE-ben szenvedő betegeinkben.

2.3. A neutrofilek intracelluláris szabadkalcium-szintjét befolyásoló tényezők

A neutrofilek működési zavara, nemcsak az alapszinten megemelkedett O₂⁻ termelésben, hanem a károsodott kemotaxisban, fagocitózisban és gyengült ölő(killing)-mechanizmusokban is megnyilvánul (58, 61, 89, 206). Ezen effektor funkciók beindításában az intracelluláris szabadkalcium([Ca²⁺]_i)-szint változásának alapvető szerepe van. Az [Ca²⁺]_i -szint változása ismert másodlagos hírvivő az ún. kalciumfüggő jelátviteli mechanizmusokban (25, 65). Ahhoz, hogy az ilyen jelátviteli mechanizmus jól működjön alapvető fontosságú, hogy a nyugvó sejtek citoszoljában alacsony (50–100 nM) legyen a szabadkalcium-koncentráció. Amennyiben a sejteket olyan külső hatások érik,

amelyek a $[Ca^{2+}]_i$ -koncentrációt a „nyugvó” sejtekben megemelik, a sejtfunkciók romlása figyelhető meg (65, 118, 209, 212). Nyugvó neutrofilekben a $[Ca^{2+}]_i$ -emelkedés megfigyelhető hyperlipidaemiában (95, 122), atherosclerosisban (142) és az öregedés során (118, 209).



4. ábra. A kalcium mobilizáló receptorok jelátviteli rendszere, a NADPH oxidáz aktiválási útjai. G: GTP-kötő G protein; PLC: foszfolipáz C; PLA2: foszfolipáz A2; PKC: protein kináz C; ER: endoplazmatikus retikulum; PIP2: foszfátidil inozitol 4,5 difoszfát; IP3: inozitol trifoszfát; DAG: diacil glicerín; PA: foszfatidsav; AA: arachidonsav; PGs: prosztaglandinok; LTs: leukotriének; -- gátlószerek: Chl: Chloroquin (PLA2); CT: choleratoxin; PT: pertussis toxin (G protein); Neo: neomycin (PLC); INDO: indometacin; (PG), NDGA: nordihidroguarinsav (LT), Staurosporin (PKC); ++ direkt stimuláló ágensek: NaF:

nátriumfluorid (G protein); Ca-ionofor (PLA2); PMA: forbol-mirisztát. acetát (PKC).

Mint már említettük, a VVE-ben felgyorsult atherosclerosisban és korai öregedéssel kell számolni, azonban a neutrofilek $[Ca^{2+}]_i$ -szintjeit, valamint ezeket a $[Ca^{2+}]_i$ -szinteket befolyásoló tényezőket korábban nem vizsgálták. Leírták, hogy a HD betegek

trombocitáiban megemelkedett $[Ca^{2+}]_i$ -értéket rekombináns humán eritropoietin (rHuEpo) kezeléssel normalizálni lehetett (67). A rHuEpo kezelés hatására a HD betegek neutrofileiben a O_2^- termelés és a fagocitózis normalizálódását figyelték meg (49, 214) olyan esetekben, amikor a neutrofilek stimulálása kalcium mobilizáló receptoron (kemotaktikus receptor) keresztül valósult meg (4. ábra). Nem normalizálódott a O_2^- termelés a rHuEpo kezelt betegekben, ha a neutrofilekben az O_2^- termelésért felelős NADPH oxidázt közvetlenül aktiválták (49, 214), amikor is a kalciumkoncentráció változásnak a jelátviteli mechanizmusban nincs szerepe (pl. PMA-val közvetlenül a PKC-t aktiváljuk, 4. ábra). Ezen eredmények alapján feltételeztük, hogy a rHuEpo kezelés, sok egyéb az erythropoesisre kifejtett kedvező hatása mellett, befolyásolhatja a $[Ca^{2+}]_i$ koncentrációt is a nyugvó neutrofilekben.

A neutrofilek ún. előstimulált állapotát a HD kezelésben részesülő betegekben előidézheti maga a hemodialízis kezelés is. Ez különösen igaz a bioinkompatibilis dializáló membránok alkalmazásakor. Megfigyelték, hogy a dialízis kezelés megkezdése után lecsökken a fehérvérsejt szám (56), ami annak tulajdonítható, hogy a dializáló membrán szabadhidroxil-csoportjai aktiválják a komplement rendszer alternatív útját, amely neutrofil aktivációhoz vezet. A folyamat eredményeként a neutrofilek átmenetileg a pulmonális kapillárisokba szekvesztrálódnak (6), majd megközelítőleg 15 perc elteltével leválnak és visszakerülnek a vérkeringésbe (52). A jobb biokompatibilitású dializáló membránok alkalmazásakor ez a dialízis megkezdése utáni neutrofil kitapadás jelentősen csökken ugyan, de változatlanul megfigyelhető (90, 167). A dializáló membrán – fizikokémiai tulajdonságaitól függően – tehát képes aktiválni a neutrofileket és feltételezésünk szerint, hatást gyakorolni a sejtek $[Ca^{2+}]_i$ mennyiségére is.

A legtöbb kalciumfüggő jelátviteli mechanizmussal működő receptoron át történő stimulációt követően (4. ábra) az intracelluláris kalciumszint emelkedésekor a kalcium forrása egyrészt a citoszolikus kalciumraktár (pl. endoplazmatikus retikulum), másrészt az extracelluláris tér (25, 65). Ahhoz, hogy az extracelluláris térből direkt vagy az ún. feszültségfüggő kalciumcsatornákon át kellő mennyiségű kalcium juthasson be a sejtek citoszoljába, normális kalcium-foszfát homeosztázisnak kell fennállni. A VVE-ben szenvedő betegekben a kalcium-foszfát anyagcsere károsodása jól ismert, amely az esetek többségében secunder hyperparathyreosis kialakulásához vezet (98, 119).

Mindezek tükrében meghatároztuk HD betegek nyugvó neutrofiljeiben a $[Ca^{2+}]_i$ mennyiségét és vizsgáltuk azt, hogy milyen paraméterek (életkor, dialízis kezelésben eltöltött idő, rHuEpo kezelés, kalcium-foszfát metabolizmus stb.) befolyásolhatják értékét.

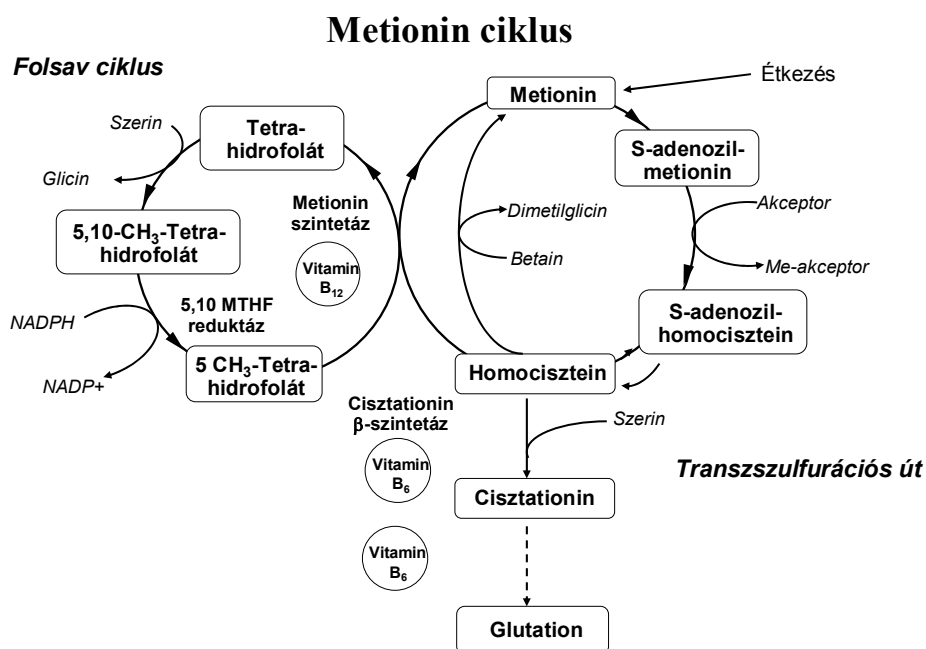
2.4. Hyperhomocysteinaemia, mint az atherosclerosis rizikótényezője

A klinikai gyakorlatban nem ritkán találkozunk olyan coronariabetegségben, myocardium infarctuson átesett, perifériás- vagy cerebrovascularis betegségben szenvedő betegekkel, akikben az atherosclerosis klasszikus kockázati tényezői részben vagy teljesen hiányoznak. Pathológiai és anatómiai tanulmányok alapján az atherosclerosis kialakulása csak az esetek felében-kétharmadában magyarázható az eddig megismert kockázati tényezőkkel (138, 188, 222). Ezen betegségek egy részében ma már egy új rizikótényezővel, a hyperhomocysteinaemiával (HHC) számolhatunk.

Az utóbbi évtizedben számos epidemiológiai tanulmány igazolta, hogy a HHC az atherosclerosis és az artériás thrombosis kialakulásának az eddig ismertektől független rizikótényezője.

A genetikai eredetű homocisztinuriát 1962-ben Carson és mtsai, valamint Gerritsen és mtsai írták le először (44, 75). McCully 1969-ben veleszületett hyperhomocysteinaemiás betegek boncolása során a betegek generalizált atherosclerosisáról számolt be (134). Ezek alapján felvetette a homocisztein (Hcy) pathogenetikai szerepét az atherosclerosis kialakulásában. Ez a megfigyelés vezetett el ahhoz, hogy 1975-ben McCully és Wilson megalkották az atherosclerosis Hcy-elméletét (135).

Az utóbbi évtizedben számos tanulmány igazolta a Hcy plazmaszintje és az atherosclerotikus eredetű perifériás-, agyi- és koszorúér-betegségek közötti kapcsolatot. Ebben az összefüggésben nem szorul magyarázatra annak jelentősége, hogy a koszorúérbetegek 30%-ában, míg a cerebrovascularis betegségben szenvedők 42%-ában mutatható ki HHC (53, 133, 173, 175, 183, 193).



5. ábra. A homocisztein metabolizmusa

A Hcy kizárólag metioninból képződik, amely egy olyan kéntartalmú esszenciális aminosav, amely a szervezet egyik legfontosabb metilforrása és amely az állati és a növényi eredetű fehérjékben egyaránt előfordul. A metioninnak a Hcy remetilációjával megvalósuló konvertálása folsavat és B₁₂-vitamint igényel, míg a Hcy transzszulfurációs lebomlásához B₆-vitaminra van szükség (5. ábra). Az a tény, hogy a Hcy-anyagcsere olyan egyszerű, olcsó és nem-toxikus szerekkel befolyásolható, mint az említett vitaminok, felveti a morbiditás és a mortalitás csökkentésének lehetőségét.

2.4.1. Hyperhomocysteinaemia krónikus veseelégtelenségben

A HHC idült veseelégtelenségben is nagy gyakorisággal fordul elő (7, 15, 28, 30, 46, 112, 168). Összefüggés mutatható ki a HHC és a myocardium infarctus kialakulásának rizikója között, prédialízis stádiumú, végstádiumú veseelégtelenségben szenvedő, valamint beszűkült vesefunkciójú vesetranszplantált betegekben egyaránt (28, 32, 108, 131).

Több tanulmány igazolta, hogy a veseműködés károsodásával párhuzamosan, már az idült veseelégtelenség kezdeti stádiumától a Hcy plazmaszintek progresszíven növekednek (46, 187, 196, 221). Mind a hemodialízis, mind a peritoneális dialízis kezelésben részesülő betegeknek magasabb az átlagos Hcy plazmaszintje, mintegy 2–4-szerese a normál populációban mérthez képest (31, 168, 196).

A krónikus veseelégtelenségben gyakori HHC okai nem teljesen tisztázottak. Normális veseműködés esetén a plazma Hcy kb. 20–30%-a filtrálódik a glomerulusokban. Kísérleti adatok szerint a filtrált Hcy a proximális tubulusokban reabszorbeálódik (27), majd remetilálódik. Mivel egészségesekben a filtrált Hcy-nek csak egy töredéke (< 1%) ürül a vizelettel (83, 103), a vese kiválasztó funkciójának fokozatos megszűnése önmagában nem magyarázza a VVE-ben észlelhető HHC-át. Viszont abból kiindulva,

hogyan az emberi vese mindkét remetilációban résztvevő enzimet tartalmazza, kézenfekvő a feltételezés, hogy veseelégtelenségben ezen enzimek működészavara (a Hcy metioninná való gátolt átalakulása) is hozzájárulhat a HHC kialakulásához (28, 103). Egy másik lehetőség az, hogy az urémiás toxinok gátolják a Hcy metabolizmusáért felelős enzimek működését, a metilációs-remetilációs folyamatokat. Ezt látszik alátámasztani az a tény, hogy a végstádiumú veseelégtelenségben szenvedő betegek plazmájában nemcsak a Hcy szint emelkedik meg, hanem a metionin - Hcy átalakulás közti termékeinek (5. ábra) az S-adenozil-metioninnak és az S-adenozil-homociszteinnak a mennyisége is (159). Az a lehetőség is felmerült, hogy a krónikus veseelégtelenségben gyakori HHC háttérben genetikai tényezők állnak. A vizsgált 5-MTHFR hőlabilis formájának allél frekvenciáját azonban az átlagpopulációéhoz hasonlóan találták (70).

Krónikus veseelégtelenségben a HHC gyakoriságának növekedéséhez a Hcy metabolizmusában kulcsfontosságú vitaminok hiánya is hozzájárulhat. Bizonyos vitaminok hiányának klinikai jelentősége már régen, a HHC felfedezése előtt ismert volt. Ennek oka a veseelégtelenséggel járó étvágytalanság miatt a vitaminok csökkent bevétele és a vízoldékony vitaminok „dializálhatósága”. Az említett okok miatt a dializált betegekben – HHC-től függetlenül – leggyakrabban éppen a folsav, a B₁₂-vitamin és a B₆-vitamin pótlása szükséges.

A HD-kezelés önmagában nem alkalmas a Hcy-szint tartós csökkentésére, mivel egy-egy dialíziskezelés csak kb. 30%-kal csökkenti (33, 99, 104, 196), de nem normalizálja a plazma Hcy koncentrációját (46, 204), továbbá a Hcy-szint a HD kezelés után 24 órán belül visszatér a dialíziskezelés előtti szintre (99).

A folsav alkalmazásával azonban – a remetilációs folyamat elősegítésével – a plazma Hcy-szintje hatásosan, mintegy 30–50%-al csökkenthető (7, 47, 104, 109, 158,

207, 208, 220) krónikus vesebetegekben is. A folsavpótlás optimális dózisára vonatkozóan nincs egységes állásfoglalás az irodalomban, mivel a Hcy-szint csökkentését célzó folsav-adagok 2,5–15 mg/nap közöttiek (7, 47, 104, 220). Az eddigi tanulmányok többségében a B₁₂-vitamint és a B₆-vitamint folsavval kombináltan alkalmazták, emiatt nem állapítható meg, hogy ezeket a vitaminokat külön-külön alkalmazva képesek-e a Hcy hatásos csökkentésére (7, 47).

Vizsgálatunkban arra kerestünk választ, hogy a kisdózisú és hosszú távú folsav-kezelés milyen mértékben képes csökkenteni a Hcy-szinteket és hogyan alakulnak a mért paraméterek a MTHFR különböző polimorfjait hordozó hemodializált betegekben.

2.4.2. A hyperhomocysteinaemia és a nyomelemek (kobalt és nikkelt) közti kapcsolat

Mint említettük, a Hcy metabolizmusában a folátciklus optimális működéséhez B₁₂-vitamin szükséges, amelynek központi fémionja a kobalt (Co). A B₁₂-vitamin a metil-tetrahidrofolátot tetrahydrofoláttá átalakító metionin szintetáz enzim kofaktora (130). Krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegekben számos nyomelem-koncentrációja eltér az optimálistól (48, 100, 113). Ezek az eltérések részben a hemodialízis kezelésnek, részben az étrendi megszorításoknak tulajdoníthatóak. A nyomelemek összetételében bekövetkező változás – különös tekintettel az esszenciális nyomelemekre –, hatással lehet számos biokémia folyamatra. A már említett Co-on kívül, amely esszenciális nyomelem a purinok és a folátok metabolizmusában, a metionin metabolizmusban résztvevő nikkelt is esszenciálisnak bizonyult (149, 150, 189, 191). Állatkísérletekben kobalt és nikkelt adásával a B₁₂-vitamin ellátottság javult és a HHC mérséklődött (189, 190, 191, 213). Ezzel kapcsolatos humán vizsgálati eredményeket nem találtunk az irodalomban. Ennek alapján azt vizsgáltuk, hogy a HD betegekben a kobalt- és nikkelt-koncentrációk mutatnak-e kapcsolatot a Hcy- és a vitamin-szintekkel.

3. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Betegek

A vizsgálatokban a Debreceni Egyetem OEC I. sz. Belgyógyászati Klinika Dialízis Osztályán rendszeres hemodialízis kezelésben részesülő betegek vettek részt. Az egyes kísérletbe bevont betegek demográfiai és laboratóriumi paramétereit az „Eredmények” című fejezetben tüntettük fel. A vizsgálatba bevont betegek a vizsgálatok céljáról szóló betegtájékoztatót megkapták, a DEOEC Kutatásetikai Bizottsága által jóváhagyott beleegyezési nyilatkozatot megkapták és aláírásukkal bizonyították, hogy a vizsgálatokba, a vérvételekbe beleegyeznek.

3.2. Laboratóriumi vizsgálati módszerek

Lipid paraméterek vizsgálata

A szérum koleszterin- és triglicerid-meghatározás Boehringer diagnosztikai enzim kittel, a HDL-meghatározás foszfor-wolframát-magnézium precipitációt követően történt. Az LDL-C meghatározása a Friedewald formula szerint történt (4,5 mmol/l alatti szérum triglicerid-szint esetén). Az apolipoprotein meghatározások immun-nefelometriás módszerrel, Orion Diagnosztika kit használatával történtek a Klinikai Biokémiai és Molekuláris Patológiai Intézetben.

Lipidek extrakciója és a zsírsavak meghatározása

Éhgyomri vérvételt követően a plazmából kloroform/metanol (2/1 v/v) eleggyel történt a lipidek extrakciója (26). A kloroformos fázist összegyűjtöttük és nitrogén alatt bepároltuk. A totál lipidextraktum egy részletéből a szabad zsírsavakat és a foszfolipideket vékonyréteg kromatográfiás módszerrel választottuk el, Silicagel 60 vékonyrétegen

(Merck) pertóleum éter: dietiléter: ecetsav (75:5:1 v/v) elegyben történő futtatás után. A szabad zsírsavak az oldószerfronttal haladnak, míg a foszfolipidek a startpontban maradnak (51). A szabad zsírsavakat és a foszfolipideket tartalmazó vékonyrétegrészt a hordozó lemezről eltávolítottuk, majd a lipideket kloroformmal kioldottuk. A szabad zsírsav frakcióban a zsírsav metilésztereket bórrifluoridban való melegítéssel állítottuk elő (100 °C, 20 perc). A teljes lipidextraktum és az elválasztott foszfolipid frakció hidrolízise és metilálása HCl/metanol elegyben történt (5% HCl metanolban, 100 °C, 1 óra). A zsírsav metilésztereket gázkromatográfiás módszerrel tömegszelektív detektor alkalmazása mellett (GC-MSD - Hewlett Packard, 5970) határoztuk meg. Kromatográfiás körülmények a következők voltak: injektálási hőmérséklet 250 °C volt, HP-1 kapilláris oszlop (25 m hosszú, 0,52 µm filmvastagságú), 150–280 °C hőmérséklet gradiensen, 10 °C/perc fűtési sebesség mellett történt a zsírsavak szétválasztása, a detektorhőmérséklet 280 °C volt (Va97). A zsírsavak azonosítása és mennyiségi meghatározása SIGMA gyártmányú kontrollok segítségével történt. A meghatározott zsírsavak a következők: mirisztinsav (C14:0), palmitinsav (C16:0), palmitoleinsav (C16:1), sztearinsav (C18:0), olajsav (C18:1), linoleinsav (C18:2), linolénsav (C18:3), eicozansav (C20:0), eicosatriénsav (C20:3), arachidonsav (C20:4, AA), eicosapentaénsav (C20:5, EPA), docozansav (C22:0), docosahexaénsav (C22:6, DHA).

Sejtszeparálások

Heparinnal alvadásgátolt vérből gradiens centrifugálással történtek Boyum módszer szerint (34). A fiziológiás sóoldattal kétszeresére hígított vért 1.077 g/cm³ sűrűségű Histopaque (SIGMA) oldatra rétegeztük, majd centrifugálás után (30 min, 1500 ford/min) a Histopaque/plazma fázisnál található mononukleáris sejteket (monocita és limfocita),

mosás után tenyésztő edénybe (Nunclon) tettük RPMI 1640 (SIGMA) pufferben, amely 10% FBS-t (fetal bovine serum), penicillint és streptomycint tartalmazott. 1 órás inkubálás után (37 °C) a limfocitákat lemostuk, míg a monociták a tenyésztőedény alján kitapadtak (114). Ezt a monocitatenyészetet használtuk az LDL-receptor vizsgálatokhoz. A hosszú idejű tenyésztés során a tápfolyadékot másodnaponként lecseréltük. A gradiens centrifugálás során a Histopaque alatt található a vörösvérsejtek és a neutrofilek. A neutrofileket 3%-os Dextránon való ülepítéssel választottuk el a vörös vérsejtektől (kb. 40 perc, szobahőmérséklet), mostuk majd 1×10^6 sejt/ml koncentrációban Hanks-oldatban [HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution), SIGMA, pH=7,4], vettük fel, amely 1 mM kalciumot és glükózt tartalmazott.

LDL izolálás

Az LDL-t egészséges, 20–30 év közötti férfi donoroktól nyertük kálium-bromid sűrűség gradiensen való ultracentrifugálással Cornwell és mtsai (55) módszere szerint. Az LDL koncentrációkat fehérjetartalmuk alapján fejeztük ki ($\mu\text{g/ml}$ egységben). A fehérjemeghatározásokat Lowry és mtsai (121) módszere szerint végeztük. Az izolálás sikerét és a nyert LDL tisztaságát lipid elektroforézissel igazoltuk minden esetben.

[¹²⁵J]LDL előállítása

Az LDL-t Sheperd és mtsai (182) által kidolgozott módon jelöltük ¹²⁵J izotóppal, a szabad ¹²⁵J izotópot géloszlopon választottuk el az LDL-től. A minták fehérjetartalmát Lowry módszerével határoztuk meg (121) és hígítottuk a kívánt koncentrációra. A felhasználásra került készítmény specifikus aktivitása 300–400 cpm/ng volt.

Specifikus és scavenger LDL receptoraktivitás meghatározása

Mindkét receptoraktivitás-meghatározás Goldstein és Brown módszere szerint történt (78), [^{125}J]LDL és acetilált- ^{125}J LDL felhasználásával a következőkben leírtak szerint.

[^{125}J]LDL kötődése és intracelluláris lebontása:

Tenyésztőtálca mélyedéseibe (16 lyukú tálca, Nunclon) 10^6 monocitát mértünk és $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on 60 percig kitapasztottuk a sejteket a sejtseparálás részben leírtak szerint. Mosás után RPMI 1640 puffert (Sigma) töltöttünk a sejtekre és a megfelelő mennyiségben hozzámértük a jelzett LDL-t ($50\text{ }\mu\text{g/ml}$ végkoncentrációban). A [^{125}J]LDL kötődésének meghatározására a tenyésztőtálcákat $4\text{ }^\circ\text{C}$ -on, 60 percig inkubáltuk, majd a be nem épült jelzett LDL-t lemostuk. A sejteket 0,2%-os Na-dodecil-szulfáttal feloldottuk és a minták radioaktivitását Gamma NK 350 szcintillációs számlálóban határoztuk meg. A specifikus kötődést $\text{ng}/10^6$ sejt mértékegységben fejeztük ki. A nem-specifikus kötődést $700\text{ }\mu\text{g/ml}$ jelzetlen LDL hozzáadásával határoztuk meg. Az intracelluláris LDL lebontás mérésekor lényegében ugyanígy jártunk el, csak a [^{125}J]LDL-el való inkubáció 4 óráig $37\text{ }^\circ\text{C}$ -n történt. A monocitákról a be nem épült jelzett LDL-t jéghideg foszfát pufferrel lemostuk, majd a triklórecetsavat (6% végkoncentrációban) adtuk a sejtekhez. A szabad jódot hidrogénperoxiddal való elbontás után kloroformmal extraháltuk, majd a triklórecetsavban oldódó frakció radioaktivitását meghatároztuk (78). A fentiekkel azonos módon jártunk el a scavenger LDL receptor vizsgálatánál, csak ekkor [^{125}J]- acLDL-t használtunk (14).

Endogén koleszterinszintézis

A meghatározást McNamara és mtsai (139) által leírt módszer szerint végeztük. A monocita szuszpenzióhoz (10^6 sejt) $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ LDL-t és $50\text{ }\mu\text{g}$ ($10\text{ }\mu\text{Ci}$) 2- ^{14}C]Na acetátot (Izinta, Budapest) adtuk $0,6\text{ ml}$ térfogatban. A mintákat enyhe rázás közben inkubáltuk

37 °C-n 4 órán át. A reakciót 0,5 ml 5 M-os kálium-hidroxiddal állítottuk le és [³H]koleszterint etanolban oldva (Amersham), mint belső standardot is ekkor adtuk a mintákhoz (3×10^4 cpm aktivitásnak megfelelő mennyiségben). A sejteket üvegsőbe átmostuk, 0,5 ml etanolt adtunk a mintákhoz, majd 90 percig 70 °C-n való inkubációval elszappanosítottuk a lipideket. A nem-szappanosítható lipideket 3x2,5 ml hexánnal extraháltuk, összegyűjtöttük és koncentráltuk nitrogén alatti bepárlással. A hexán-koncentrátumot alumínium-oxid oszlopokra vittük, és a szteroidfrakciót aceton/dietiléter 1:1 (v/v) arányú keverékével eluáltuk. Beszárítás után mértük a minták radioaktivitását és a belső standardra vonatkoztatva kiszámoltuk az endogén koleszterinszintézis mértékét, amit pmol[¹⁴C]Na acetát/óra/10⁶ monocita adtuk meg.

ApoE szekréción

A kitapasztott monocitákat 1 ml RPMI 1640 (SIGMA) tenyésztőpufferrel, amely 5% hő-inaktivált kevert humán szérumot és 50 µg/ml acLDL-t tartalmazott, 12 óráig 37 °C-on inkubáltuk. A 12 óra inkubációt követően a felülúszót eltávolítottuk. A felülúszók koncentrációja Amicon A25 filter segítségével történt. Az apoE mennyiségi meghatározását Hyland lézer nefelométerben végeztük, human apoE standard és anti-human-apoE-IgG (Immuno AG) segítségével. A koncentrált felülúszóból 100 µl adtunk az anti-human apoE IgG-t tartalmazó 3%-os polietilén-glikol oldathoz (1:100 hígításban), majd 1 órán át szobahőmérsékleten tartottuk, amely idő az immunkomplexek kialakulásához szükséges. Kalibrációs görbe a human apoE standard segítségével készült. Az apoE-termelés értékét µg apoE/12 óra/10⁶ sejtben adtuk meg (164).

Zsírban dús habos-sejt (foam-sejt) képződés

Az apoE szekréció méréséhez inkubált sejttenyészetben határoztuk meg a habos-sejt-képződés mértékét. Az apoE-t termelő monocitákat, miután a felülúszót az apoE-méréshez eltávolítottuk, HBSS pufferben mostuk, majd a sejteket szobahőmérsékleten fixáltuk és újramostuk. A fixált monocitákat Oil Red O (BDH Chemicals) lipidfestékkel 20 percig festettük. A nem-specifikusan kötődő Oil Red O festéket 50%-os etilalkohollal kioldottuk, majd a maradványokat desztillált vízzel történő mosással távolítottuk el. A koleszterinzárványokat fénymikroszkópban számoltuk meg, legalább 100–150 sejtől 40-szeres nagyítással. Az adatokat a koleszterinzárvány/monocita arányban adtuk meg (37).

Paraoxonáz aktivitás mérése

Paraoxon (O,O-dietil-O-p-nitrofenil-foszfát; Sigma Chemical Co.) szubsztráttal történt. Az enzim 4-nitrofenolt hasít le a molekulából, mely keletkezésének kinetikáját spektrofotometriásan követtük 412 nm-en, Hewlett-Packard 8453 UV-Visible Spektrofotométer segítségével. Az enzimaktivitás meghatározásakor a reakcióelegy 50 µl szérumot és 5,5 mmol/L paraoxont, 2 mmol/l CaCl₂-t tartalmazott 1 ml Tris.HCl pufferben (100 mmol/L Tris, pH=8,0). Az enzimaktivitás számítása a moláris extinkciós koefficiens 17100 M⁻¹cm⁻¹ alapján történt. Az enzimaktivitást U/ml egységben adtuk meg (1 U az enzimaktivitás, amikor 1 perc alatt 1 nmol 4-nitrofenol keletkezik). A paraoxonáz aktivitásokat megmértük 1 M NaCl jelenlétében is, amely stimulálja az enzim aktivitását.

Arilészteráz aktivitás mérése

Fenilacetát szubsztrát hidrolízisének mérésével spektrofotometriásan történt. Az enzimaktivitást U/ml egységben adtuk meg (1 U az arilészteráz aktivitás, amikor 1 perc alatt az enzim 1 mol fenilacetátot hidrolizál).

A paraoxonáz fenotípus megoszlás meghatározása

Kettősszubsztrát módszerrel történt, a két szubsztrát a paraoxon és fenilacetát volt (115). A paraoxonáz, az arilészteráz, valamint a NaCl stimulált enzimaktivitásokból számítottuk a fenotípus megoszlást a következő módon: ha a paraoxonáz/arilészteráz-aktivitások aránya 1–3 közötti, akkor: A (homozigóta alacsony aktivitású); ha a paraoxonáz/arilészteráz aktivitások aránya 3–6 közötti: AB (heterozigóta közepes aktivitású); ha a paraoxonáz/arilészteráz aktivitások aránya 6 fölötti: B (homozigóta magas aktivitású).

Lipidhidroperoxidok meghatározása

Plazmából extrahált lipideket tartalmazó kloroformos fázis 1 ml-es részletét nitrogén alatt bepároltuk, majd 0,6 ml ecetsav/kloroform elegyben (3:2, v/v) feloldottuk. A mintákhoz 40 µl kálium jodidot (1,2%-os) adtunk és 5 percig sötétben inkubáltuk. A reakciót kadmium acetáttal (1,8 ml, 20 mmol/L) állítottuk le. Centrifugálás után (2000 ford/perc, 10 perc), a lipidhidroperoxidok mennyiségét fotometriásan határoztuk meg (352 nm-en). A lipidhidroperoxid mennyiségét a mért extinkció értékek alapján, a képződött J₃ extinkciós koefficiense (21900 M⁻¹cm⁻¹) segítségével számoltuk ki (17).

Konjugált dién mennyiségének meghatározása

A zsírsav meghatározásnál leírt módszer szerint extrahált lipidek egy részletét (1 ml) nitrogénáramban bepároltuk, majd 1 ml spektráltiszta ciklohexánban (Merck) visszaoldottuk. A minták optikai denzitását fotometriásan, 234 nm-en mértük. Ez a fényelnyelés mértéke ekvivalens a mintában található konjugált kettőskötések mennyiségével (17).

Lipidperoxidáció vizsgálata

200 μ l plazmához 200 μ l nátrium-dodecilszulfát oldatot (2%), majd 600 μ l savas tiobarbitursavat adtunk. A tiobarbitursav oldat 0,375 g tiobarbitursavat 2,08 ml 12 M HCl-t és 15 ml 50%-os triklórecetsavat tartalmazott 100 ml-ként. Az elegyet 100 °C-on 15 percig inkubáltuk. Szobahőmérsékletre való lehűtés után 3 ml n-hexánnal extraháltuk a képződött terméket. Centrifugálás után a tiszta szerves oldószeres frakció extinkcióját meghatároztuk 532 nm-en. A minták extinkció értékéből az extinkciós koefficiens segítségével ($156000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) számítottuk a tiobarbitursavval savas körülmények között reakcióba lépő anyagok (TBARS) mennyiségét (152).

Szuperoxid anion termelés

A neutrofileket (2×10^5 sejt/ml) HBSS-ben 30 percig inkubáltuk Cytochrome C (50 μ M) jelenlétében 37 °C-on. A Cytochrome C SOD szenzitív redukcióját határoztuk meg spektrofotometriás módszerrel 550 nm-en, 492 nm háttérkorrekció mellett Babior módszere alapján (Ba70) az általunk kidolgozott mikromódszer szerint (211). A szuperoxid-anion mennyiségét a Cytochrome C moláris abszorpciós koefficiense ($190000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) segítségével számoltuk ki és $\text{nmol}/10^6$ sejt egységben fejeztük ki.

Intracelluláris szabadkalcium-szint vizsgálata

Tsien és munkatársai (202) módszerével Quin 2/AM fluoreszcens festék segítségével spektrofluorimetriás módszerrel történt a korábban leírtak szerint (210). A neutrofileket (10^7 sejt/ml) RPMI 1640 pufferben szuszpendáltuk és a Quin 2/AM (50 μ M) festékkal 10 percig, 37 °C-on tartottuk, majd tízszeresére felhígítottuk és tovább inkubáltuk 30 percig. Az első inkubáció alatt a Quin2/AM festék beépül a sejtekbe, majd azt követően az

intracelluláris nem-specifikus észterázok lehasítják a festékről az acetoximetilészter csoportot, felszabadítva a szabadkalciummal fluoreszcens terméket adó szabadfestéket. A festékfelesleget (be nem épült Quin 2/AM) HBSS pufferrel kimostuk és 10^6 sejt/ml-es sejtszuszpenziót készítettünk. A méréseket Hitachi spektrofluoriméterben végeztük, 339 nm gerjesztési és 500 nm emissziós hullámhossz mellett. A maximális fluoreszcenciát 10 μ l tömény digitonin hozzáadásával (F_{\max}), a minimális fluoreszcenciát 20 μ l 2 mmol/L EGTA hozzáadásával (F_{\min}) határoztuk meg. A három mérési adatból Tsien képletével számoltuk a szabad intracelluláris kalciumértékeket: $[Ca^{2+}] = K_d (F - F_{\min}) / (F_{\max} - F)$, ahol a $K_d = 115$ nM.

E-vitamin-meghatározás

A szérum mintákból (200 μ l) a proteineket metanol/etanol 1:1 arányú keverékével (200 μ l) kicsaptuk, majd az elegyet 2x2 ml n-hexánnal extraháltuk (171). Minden extrakciós lépés után centrifugáltuk a mintákat (2000 ford/perc) és a szerves fázisból ismert mennyiséget kivettünk. Az összegyűjtött szerves fázist nitrogén alatt bepároltuk, majd metanolba való visszaoldás után HPLC-vel, γ -tokoferol belső standard alkalmazásával, fluoreszcenciás detektálással határoztuk meg az E-vitamint (gerjesztési hullámhossz: 292 nm emissziós hullámhossz: 325 nm volt). A mennyiségi meghatározáshoz tiszta E-vitamin standard (Sigma) segítségével kalibrációs görbét készítettünk.

Homocisztein meghatározása

A Hcy-szinteket éhgyomri vérvétel után, EDTA-val alvadástólított vérből HPLC-s módszerrel, fluoreszcens detektálással, Bio-Rad gyári kit segítségével határoztuk meg (195) és hasonlítottuk össze a kontroll értékekkel, melyekhez az önkéntesek Klinikánk dolgozói voltak. Az irodalmi normáltartomány 5–15 μ mol/L.

B₁₂-vitamin és folsav meghatározása

Folsavat és B₁₂-vitamint AxSYM készülékkel az Abbott cég reagenskészletével, a cég által megadott módszer szerint határoztuk meg. A folsav normál koncentrációtartománya: 3,1–12,4 µg/L, a B₁₂-vitamin normál tartománya: 223–1132 ng/L.

MTHFR C677T polimorfizmusa

A vizsgálatot a Klinikai Biokémiai és Molekuláris Patológiai Intézetben (KBMPI) az általuk korábban részletesen leírt módszer szerint végezték el (24). A vizsgálat eredményeit 401 kelet-magyarországi egészséges önkéntes személy ugyanebben a laboratóriumban elvégzett eredményével hasonlítottuk össze (homozigóta 12%, heterozigóta 42%, normál genotípus 46%).

Nyomelemek (kobalt és nikkelt) meghatározása

A szérumbelvételeket feldolgozásukig fagyaszttva tároltuk (–70 °C). A mintákat közvetlenül analízis előtt olvasztottuk ki, és szobahőmérsékleten mértük be a szükséges ~0,6 g-ot (0,6 cm³) analitikai mérlegen, kalibrált nagy tisztaságú kvarckémcsövekbe. A mintákhoz 1 cm³ 65%-os salétromsavat (MERCK Suprapur) és 0,1 cm³ 30%-os hasonló tisztaságú hidrogén-peroxidot adtunk. 12 óra szobahőmérsékleten végzett előroncsolás után a mintákat tartalmazó kvarckémcsöveket nagy nyomású teflonbombákban helyeztük el. A minták roncsolása MILESTONE MLS 1200 Mega típusú mikrohullámú roncsoló segítségével történt. Az előroncsolt mintákat szárazra pároltuk, majd 0,1 mólos salétromsavval azonos térfogatra töltöttük fel. A vizsgált nyomelemek koncentrációját ICP-OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry, induktív csatolású plazmaemissziós spektrometria) módszerrel határoztuk meg a mintákban (62).

3.3. Statisztikai analízis

A SAS Windows 6.11 programmal végeztük. Az adatokat leíró analízissel jellemeztük (esetszám, középérték, standard deviáció). A két csoport adatainak összehasonlítása kétmintás t-próbával, ANOVA teszttel történt. A paraméterek közti összefüggések vizsgálatára regressziós és korrelációs analízist végeztünk. Szignifikánsnak a $p < 0,05$ értékeket tekintettük.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A lipidanyagcsere vizsgálata

4.1.1. Lipidparaméterek vizsgálata

A krónikus hemodialízis (HD) programban kezelt betegek felgyorsult atherosclerosisában szerepet játszó tényezők vizsgálatát a lipidparaméterek meghatározásával kezdtük. Ötven krónikus HD programban kezelt beteget vizsgáltunk, 36 férfit és 14 nőt (átlagos életkoruk 48,6 év, a hemodialízis programban eltöltött átlagos idő: 34,7 hét). A betegeket négy csoportba osztottuk a krónikus veseelégtelenséghez vezető alapbetegségük alapján: glomerulonephritis chr. (GNC): 25 beteg, pyelonephritis chr. (PNC): 7 beteg, diabetes nephropathia (DN): 6 beteg, egyéb: 12 beteg. Az egészséges kontrollcsoportot 46 személy képezte (20 férfi, átlagos életkor: 40,5 év és 26 nő átlagos életkor: 52,8 év).

A vizsgált lipidparaméterek a következők voltak: szérum koleszterin (Chol), triglicerid (TG), HDL-C, apoA₁, apoB₁₀₀, és Lp(a). Meghatároztuk a betegek egyéb fő laboratóriumi paramétereit (szérum urea, kreatinin, húgysav, összfehérje, ionok, májenzimek).

Az 1. táblázat adatai szerint a HD programban kezelt betegekben a szérum trigliceridszint szignifikánsan emelkedett ($p < 0,01$), míg a HDL-C matematikailag nem szignifikánsan ugyan, de csökkent volt a kontrollcsoportéhoz képest. A szérum koleszterin, apoA₁, apoB₁₀₀-szintek nem mutattak szignifikáns különbséget az egészséges csoportéhoz képest. A négy betegcsoport főbb lipidparamétereit összehasonlítva szignifikáns különbséget a GNC betegekben találtunk; a szérum trigliceridszint magasabb volt, mint a másik három csoportban ($p < 0,01$).

1. táblázat. A szérum lipidparamétereit krónikus hemodialízis programban kezelt vesebetegekben (összes eset) és diagnózis szerint csoportosítva, egészséges kontrollok értékeivel összehasonlítva.

Paraméter	Kontroll 46	HD Összes	GNC 25	PNC 7	DN 6	Egyéb 12
Chol (mmol/L)	4,7±0,6	4,8±1,05	4,8±0,9	5,2±1,3	5,7±1,3	4,6±0,9
TG (mmol/L)	1,2±0,65	3,38±4,2*	5,2±4,3*#	3,2±1,8	3,65±1,6	2,05±0,6
HDL-C (mmol/L)	1,25±0,38	0,92±0,48	1,0±0,4	1,25±0,2	0,9±0,3	0,9±0,15
ApoA ₁ (g/L)	1,55±0,68	1,21±0,25	1,18±0,21	1,26±0,18	1,11±0,16	1,24±0,11
ApoB ₁₀₀ (g/L)	0,93±0,43	0,95±0,41	0,86±0,6	0,97±0,45	1,15±0,15	1,01±0,25
Lp(a) (U/L)	283±86	375±182	340±150	335±160	510±225*#	405±145

Szignifikáns eltérés a kontroll és HD között * $p < 0,01$; szignifikáns eltérés a HD csoporton belül # $p < 0,01$

Az apoproteinek közül a Lp(a) a diabeteses betegcsoportban szignifikánsan emelkedett a másik három betegcsoporthoz képest ($p < 0,01$). A lipidparaméterek közül a trigliceridszint pozitív korrelációt mutatott a HD programban eltöltött idővel ($r = 0,34$, $p < 0,015$), míg negatív korrelációt mutatott a szérum összfehérje mennyiségével ($r = -0,42$, $p < 0,002$). Nem találtunk korrelációt a szérum kreatinin, urea és a vizsgált lipidszintek között.

4.1.2. A monociták specifikus és scavenger LDL-receptor funkciója

Urémiás betegekben viszonylag kevés adat áll rendelkezésünkre a specifikus LDL és a scavenger LDL receptorok működésében bekövetkező változásokról és ezeknek a károsodott lipidmetabolizmusban betöltött szerepéről. Az irodalomból ismert, hogy az LDL az urémiás betegek szérumában in vitro körülmények között képes oxidálódni (116). Portman és mtsai urémiás betegek limfocitáin végzett vizsgálatukkal azt találták, hogy mind az LDL receptor funkciója mind az mRNS-szintézis csökken (160). Ando és mtsai

monocita-makrofág típusú sejteken a scavenger receptorok fokozott expresszióját figyelték meg (1).

Kísérleteket végeztünk annak eldöntésére, hogy miképpen alakul a hemodializált betegek monocitáin az LDL specifikus és scavenger receptorának expressziója és funkciója. Ennek eldöntésére meghatároztuk a natív és az acetilált LDL kötődését és degradációját, vizsgáltuk az LDL-indukálta HMG-CoA reduktáz gátlását a koleszterin szintézis gátlásának mérésével, valamint az acetilált LDL (acLDL) által kiváltott apoE szekréciót és „habos-sejt” képződést. Az eredményeket egészséges egyének monocitáin mért értékekkel hasonlítottuk össze. A specifikus LDL receptor működésének vizsgálatához egészséges egyénekből származó ^{125}I -al jelzett LDL-t, míg a scavenger LDL receptorok tanulmányozásához ^{125}I -al jelzett acLDL-t használtunk.

2. táblázat. A vizsgálatban résztvevő személyek demográfiai adatai

Paraméter	Kontroll	HD
A vizsgálatban résztvevők száma	15	11
BMI (kg/m ²)	23,4±2,8	23,7±3,4
Életkor (év)	53,8±5,5	54,2±6,4
Koleszterin (mmol/L)	4,5±0,51	5,68±1,2*
Triglicerid (mmol/L)	1,7±0,25	2,9±0,42*
LDL-C (mmol/L)	3,12±0,33	3,50±0,65
HDL-C (mmol/L)	1,32±0,10	1,05±0,12

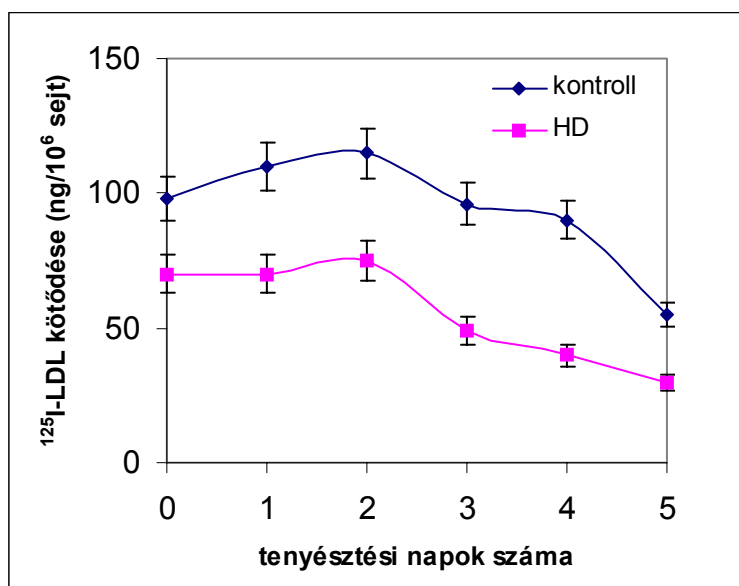
* szignifikáns eltérés a kontroll és HD között, $p < 0,04$

A vizsgálatban 11 HD programban kezelt beteg vett részt. A HD programban eltöltött idő 60 ± 12 hónap volt. A kontrollcsoportot 15 személy képezte (2. táblázat). Kizáró kritériumok az alábbiak voltak: májenzim-emelkedés, diabetes mellitus vagy más

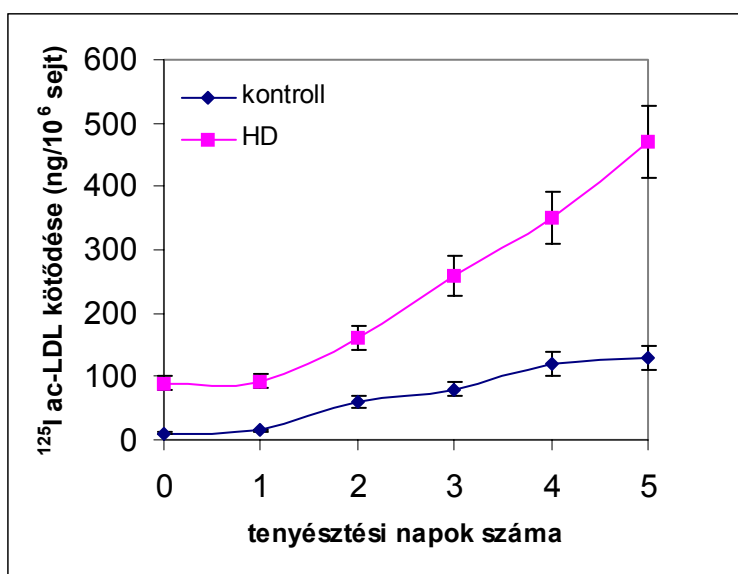
endokrin betegség, lipidcsökkentő, vagy a lipidmetabolizmust befolyásoló antihypertenzív gyógyszerek szedése.

A monociták makrofággá történő érése során megváltozik a felszíni receptorok expressziója. A monociták felszínén főleg natív LDL receptorok találhatóak és a scavenger LDL receptorok száma alacsony. A makrofágok felszínén viszont jelentősen megnő a scavenger LDL receptorok expressziója. Vizsgálatunk során azt találtuk, hogy a kontrollcsoportban a [125 I] LDL kötődése a monociták felszínén található specifikus LDL receptorhoz az inkubáció első 48 órájában fokozódik, majd ezt követően az 5. napig csökken. A hemodializált betegekben (HD) az LDL kötődése hasonló tendenciát mutat, de minden időpontban szignifikánsan alacsonyabb, mint a kontrollokban (6. ábra).

A scavenger LDL receptor expresszió a kontrollcsoportban nagyon alacsony volt és mérsékelt emelkedés csak a 3. naptól következett be (7. ábra). A [125 I]acLDL kötődés a HD betegek monocitáihoz a tenyésztési idő minden napján szignifikánsan nagyobb, mint a kontrollokban és további szignifikáns növekedés a tenyésztés 3. napjától következett be. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a HD betegek monocitái „makrofágszerű” sejtekként expresszálnak natív és scavenger LDL receptort.



6. ábra. ^{125}I LDL monocitákhoz való kötődése a tenyésztési idő függvényében a kontrollcsoportban és a hemodializált (HD) betegekben. A ^{125}I LDL kötődés szignifikánsan alacsonyabb ($p < 0,01$) a HD csoportban, mint az egészséges kontrollokban minden vizsgált időpontban.



7. ábra. Az acetilált és jelzett ^{125}I acLDL kötődése a monocitákhoz a tenyésztési idő függvényében. A ^{125}I acLDL kötődése szignifikánsan nagyobb ($p < 0,01$) a HD csoportban, mint a kontrollokban minden vizsgált időpontban.

A kontrollok és a HD betegek monocitáit ^{125}I LDL és ^{125}I acLDL jelenlétében 12 órán át inkubálva meghatároztuk a partikulumok kötődését, intracelluláris degradációját és

vizsgáltuk az azt követő funkcionális válaszokat (koleszterinszintézis-gátlás, apoE-szekréción, „habos-sejt”-képződés). Az eredményeket a 3. táblázatban tüntettük fel.

3. táblázat. Az LDL és az acLDL monocitákra kifejtett hatása hemodializált betegekben (HD) és a kontrollcsoportban 12 órás inkubációt követően.

Csoportok	Kontroll n =15	HD n = 11
[¹²⁵ I]LDL protein kötődés (ng/10 ⁶ sejt)	101,9±12,3	74,3±7,1*
[¹²⁵ I]LDL kötődés V _{max} (ng/10 ⁶ sejt)	209,7±53,5	107,8±13,6*
[¹²⁵ I]LDL kötődés K _d (µg/ml)	58,9±29,3	45,5±12,5
[¹²⁵ I]LDL protein degradáció (ng/10 ⁶ sejt)	145,2±16,8	98,7±12,1*
[¹²⁵ I]acLDL protein kötődés (ng/10 ⁶ sejt)	18,7±2,2	96,3±11,8*
[¹²⁵ I]ac LDL kötődés V _{max} (ng/10 ⁶ sejt)	41,9±5,5	1312,3±598,6*
[¹²⁵ I]acLDL kötődés K _d (µg/ml)	35,7±13,8	469,4±211,2*
[¹²⁵ I]acLDL protein degradáció (ng/10 ⁶ sejt)	51,6±6,7	187,7±22,3*
Inkorporált [¹⁴ C] acetát (pmol/h/10 ⁶) nyugvó monocitákban	11,8±2,1	12,5±2,4
Δ Inkorporált [¹⁴ C] acetát (pmol/h/10 ⁶ sejt)	5,8±0,47	3,1±0,38*
ApoE-szekréción (µg/12 h/10 ⁶ sejt)	9,4±1,2	2,8±0,4*
Koleszterinzárvány/sejt	2,8±0,30	11,2±2,3*

* eltérés a kontrolltól szignifikáns p<0.001

A jelzett natív LDL kötődése és intracelluláris degradációja a HD betegek monocitáiban szignifikánsan csökkent (p<0,001). A specifikus LDL receptorokra jellemző V_{max} érték a HD betegek monocitáiban a kontrollban mérthez képest csökkent, amíg a receptorhoz való kötődési állandó (K_d) nem változott. A HD betegek nyugvó monocitáiban a [¹⁴C]-acetát-beépülés azonos volt, mint a kontrollokban, azonban a natív LDL

jelenlétében a [^{14}C]-acetát-beépülés sebessége kisebb volt, mint a kontrollokban. Azaz, a HD betegek monocitáiban csökken a specifikus LDL-receptor-sűrűség és a receptorfunkció változásával is számolhatunk. Ugyanakkor a HD betegek monocitáiban az acLDL scavenger receptoron át történő kötődése és degradációja jelentősen emelkedett a kontrollcsoporthoz viszonyítva. HD betegek monocitáin a scavenger LDL receptor K_d és V_{\max} értékei sokszorosai a kontrollcsoportban mért értéknek.

A scavenger LDL receptor funkcionális paramétereiben a következő eltérést tapasztaltuk (3. táblázat): Az acLDL által kiváltott apoE-szekréciónak csökkent, ez is hozzájárulhat a HD betegek monocitáiban a koleszterinzárványok megnövekedéséhez („habos-sejt”-képződés).

Eredményeinket összegezve megállapíthatjuk, hogy a hemodializált betegek monocitáin a specifikus LDL receptor szám és a natív LDL kötődés sebessége csökkent és a natív LDL által indukált endogén koleszterinszintézis sebessége is csökkent. Ugyanakkor a scavengerreceptor-szám megemelkedett, nőtt a megkötött acLDL mennyisége, azonban a fokozott kötődés nem növelte az apoE-szekréciónak. Ezek eredményeként a kontrollcsoporthoz viszonyítva növekedett a koleszterinzárványok száma a dializált betegek monocitáiban. Eredményeink arra utalnak, hogy a károsodott LDL receptor funkció, a nagyobb scavenger receptor expresszió, a csökkent apoE-szekréciónak és a fokozott „habos-sejt”-képződés elősegítheti a dializált betegek felgyorsult atherosclerosisát.

4.1.3. Atherogén és nem atherogén zsírsavak mennyiségi változása

A plazmalipidek és lipoproteinek zsírsav összetétele bizonyos betegségekben (coronáriabetegség hyperlipidaemiák) megváltozik. Keveset tudunk azonban arról, hogy krónikus veseelégtelenségben megváltozik-e, és ha igen milyen módon a plazmalipidek zsírsavösszetétele. Vizsgálataink során meghatároztuk az atherogén és nem atherogén

zsírsavak arányát krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegek plazmájának teljes lipid-extraktumában és a szeparált szabad-zsírsav (NEFA) frakcióban, egészséges kontrollokhoz viszonyítva. Összefüggést kerestünk a különböző telítettségű zsírsavak mennyisége és a fő lipidparaméterek között.

A zsírsav-meghatározásokat *prédialízis stádiumú* (PHD) betegekben [összesen 7 fő (4 férfi, 3 nő, átlag életkoruk $53,4 \pm 5,3$ év)], *hemodialízis* (HD) programban kezelt betegekben [összesen 23 fő (14 férfi, 9 nő), átlag életkoruk $47,7 \pm 3,1$ év, a HD programban eltöltött átlag idő: $2,7 \pm 0,3$ év] és *egészséges* kontrollokban [összesen 14 fő (7 férfi, 7 nő), átlag életkoruk $45,2 \pm 2,7$ év] végeztük el.

A hemodializált betegeket 3 csoportba osztottuk:

1. dializált betegek cardiovascularis megbetegedés nélkül, közel normális lipidértékekkel (HD-norm, 9 beteg),
2. dializált betegek igazolt (nyugalmi és terheléses EKG, echocardiografia) cardiovascularis szövődménnyel, közel normális lipidértékekkel (HD-CAD, 7 beteg),
3. dializált betegek jelentős hyperlipidaemiával (HD-hyp, 7 beteg).

4. táblázat. A vizsgált betegek szérum koleszterin és triglicerid szintjeinek átlaga

	Kontroll	PHD	HD-norm	HD-CAD	HD-hyp
Chol (mmol/L)	4,8 (4,2–5,1)	5,43 (4,1–6,8)	5,5 (4,1–6,2)	5,4 (4,26–6,1)	8,6* (7,1–10,1)
TG (mmol/L)	0,83 (0,61–1,2)	1,48* (0,78–2)	1,6* (0,6–1,84)	2,35* (1,3–3)	5,7* (3,9–8,5)

Chol: szérum koleszterin, TG: szérum triglicerid, PHD: prédialízis, HD-norm: dializált betegek cardiovascularis megbetegedés nélkül, HD-CAD: dializált betegek cardiovascularis szövődménnyel, HD-hyp: dializált betegek jelentős hyperlipidaemiával.

* szignifikancia a kontroll csoporthoz képest $p < 0,01$

A vizsgált csoportok szérum koleszterin- és trigliceridszintjeinek átlagát a 4. táblázat tartalmazza. A szérum koleszterinszint a HD-hyp csoportban szignifikánsan

nagyobb volt a kontrollcsoporthoz képest, míg a szérum triglicerid értékei szignifikánsan magasabbak voltak minden betegcsoportban, beleértve a prédialízis stádiumában lévő betegeket is.

A plazma szabad-zsírsvak frakciójának (NEFA) zsírsvakösszetételét az 5. táblázatban mutatjuk be.

PHD csoport: A plazma NEFA zsírsvakösszetételében a kontrollcsoporthoz képest nem találtunk szignifikáns eltérést, a C18:3 (linolénsav) relatív koncentrációjának csökkenésén kívül. Összeadva a telített (SFA)-, az egyszeresen telítetlen (MUFA)- és a többszörösen telítetlen (PUFA) zsírsvak (ez utóbbihoz tartozik az említett linolénsav) mennyiségét megállapíthatjuk, hogy a plazma szabad-zsírsvak összetételében nincs szignifikáns különbség a kontrollcsoporthoz képest.

HD-norm csoport: Valamennyi telített zsírsvak relatív koncentrációja nagyobb volt, mint a kontrollcsoportban. Az összes SFA százalékos aránya szignifikánsan nagyobb, amíg a MUFA és PUFA kisebb volt, mint a kontrollokban. Linolénsav egyáltalán nem volt kimutatható ezekben a betegekben és jelentősen csökkent az arachidonsav (C20:4) mennyisége is.

HD-CAD csoport: Az előző csoporthoz hasonlóan ebben a csoportban is a SFA-ak aránya megemelkedett. Az összes SFA és PUFA százalékos aránya az előző csoporthoz hasonló tendenciát mutatott. A MUFA-k közül azonban a palmitoleinsav (C16:1) relatív koncentrációjának növekedését figyeltük meg. Az esszenciális linolénsav ebben a csoportban sem volt kimutatható és tovább csökkent az arachidonsav mennyisége, nemcsak a kontrollhoz, hanem a HD-norm csoporthoz képest is.

5. táblázat. A plazma szabad zsírsav frakciójának zsírsav összetétele. A zsírsavak mennyiségét az összes mért zsírsav%-ában kifejezve adtuk meg.

zsírsav %	kontroll átlag ± SD	PHD átlag ± SD	HD-norm átlag ± SD	HD-CAD átlag ± SD	HD-hyp átlag ± SD
C14:0	1,5 ± 0,5	3,8 ± 2,3	2,3 ± 0,3	2,3 ± 0,2	2,95 ± 0,3
C16:0	38,5 ± 3,5	38,5 ± 5,5	42,2 ± 5,6*	42,7 ± 8,9*	31,6 ± 9,2*
C18:0	22,6 ± 3,6	20,6 ± 4,2	28,8 ± 3,0*	25,0 ± 6,7	18,4 ± 3,5
C16:1	1,7 ± 0,7	2,7 ± 0,6	1,6 ± 0,8	3,2 ± 0,4*	8,2 ± 1,5*
C18:1	17,4 ± 2,4	20,0 ± 4,3	13,7 ± 5,2*	17,5 ± 4,7	17,0 ± 4,2
C20:1	1,4 ± 1,4	0,1 ± 0,08	1,6 ± 1,2	0,2 ± 0,1	9,5 ± 1,8*
C22:1	1,1 ± 1,0	n.d.	0,7 ± 0,5	0,08 ± 0,05	4,2 ± 0,6
C18:3	2,9 ± 2,1	0,7 ± 0,3*	n.d.	n.d.	n.d.
C18:2	12,9 ± 1,2	13,0 ± 2,5	8,8 ± 1,7*	9,0 ± 1,2*	8,2 ± 2,1*
C20:4	0,91 ± 0,03	0,6 ± 0,5	0,3 ± 0,2*	0,1 ± 0,1*	0,05 ± 0,02*
SFA	62,6	62,9	73,3*	70,0*	53,0*
MUFA	21,6	22,8	17,6*	21,0	38,9*
PUFA	15,8	14,3	9,1*	9,1*	8,3*

PHD: prédialízis, HD-norm: dializált vesebetegek cardiovascularis megbetegedés nélkül, HD-CAD: dializált betegek cardiovascularis szövődménnyel, HD-hyp: dializált betegek jelentős hyperlipidaemiával, SFA: telített zsírsav, MUFA: egyszeresen telítetlen zsírsav, PUFA: többszörösen telítetlen zsírsav

*p<0,01 a kontrollhoz viszonyítva, n.d.: nem detektálható

HD-hyp csoport: Az összes MUFA százalékos aránya szignifikánsan nagyobb, míg a SFA és a PUFA kisebb volt a kontrollhoz és a másik két HD csoporthoz képest. Ez az eltérés az egyszeresen telítetlen zsírsavak közül a C16:1, C20:1, és C22:1 százalékos arányának extrém növekedésére vezethető vissza. Az előző csoporthoz képest tovább csökken az arachidonsav mennyisége és linolénsav itt sem detektálható.

A plazma szabad-zsírsav frakciójának zsírsavösszetételéhez hasonló tendenciák figyelhetők meg a plazma teljes lipid-extraktumának zsírsavösszetételében is a HD-norm és a HD-CAD csoportban (6. táblázat).

6. táblázat. A plazma teljes lipid-extraktumának zsírsav összetétele. A zsírsavak mennyiségét az összes mért zsírsav%-ában kifejezve adjuk meg.

zsírsav %	kontroll átlag ± SD	HD-norm átlag ± SD	HD-CAD átlag ± SD
C12:0	2,1 ± 0,2	2,7 ± 0,3	2,2 ± 0,3
C14:0	6,2 ± 1,3	9,5 ± 1,2*	6,4 ± 0,9
C16:0	14,6 ± 3,2	15,3 ± 2,7	16,7 ± 4,5
C18:0	15,9 ± 1,1	20,6 ± 1,7*	17,9 ± 1,8
C20:0	1,0 ± 0,12	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,34
C16:1	2,8 ± 0,5	3,4 ± 0,7	3,9 ± 1,2*
C18:1	17,1 ± 2,2	12,8 ± 1,2*	19,6 ± 4,3*
C20:1	3,4 ± 0,3	2,8 ± 0,07	4,3 ± 0,26*
C22:1	1,2 ± 0,15	2,0 ± 0,15	1,4 ± 0,28
C18:2	26,5 ± 0,9	20,1 ± 2,8*	17,1 ± 2,8*
C20:4	5,7 ± 0,5	4,9 ± 0,9*	4,5 ± 0,8
C20:3	1,5 ± 0,04	2,2 ± 0,3	2,3 ± 0,07
C20:2	1,5 ± 0,05	1,8 ± 0,09	2,0 ± 0,11
C22:6	0,4 ± 0,05	0,9 ± 0,2	0,7 ± 0,06
SFA	39,8	49,1*	44,2
MUFA	24,5	21,0	29,2*
PUFA	35,6	29,9*	26,6*

HD-norm: dializált vesebetegek cardiovascularis megbetegedés nélkül, HD-CAD: dializált betegek cardiovascularis szövödménnyel, SFA: telített zsírsav, MUFA: egyszeresen telítetlen zsírsav, PUFA: többszörösen telítetlen zsírsav

* $p < 0,01$ a kontrollhoz viszonyítva.

Azaz az összes telített zsírsav százalékos aránya növekedett, míg a PUFA-ak aránya szignifikánsan csökkent. A HD-CAD csoportba tartozó betegek plazmájának teljes lipid extraktumában azonban a MUFA-k relatív koncentrációjának szignifikáns növekedése figyelhető meg, nemcsak a kontroll, hanem a HD-norm csoporthoz képest is.

A nem-atherogén tulajdonságú C18 zsírsavak és a szérum lipid paraméterek közti kapcsolatot a 7. táblázatban mutatjuk be: A HD betegek plazmájában mért sztearinsav (C18:0) mennyisége negatív korrelációt mutatott a Chol-el, a TG-el és az LDL-C-vel. Az olajsav (C18:1) ugyancsak negatív korrelációt mutat a Chol-vel és a HDL-C-vel. A

linoleinsav (C18:2) a Chol-el és a TG-el negatív-, míg a HDL-C-vel pozitív korrelációt mutat.

7. táblázat. Pearson-féle korrelációs koefficiensek értéke a fő lipidparaméterek és a zsírsavak relatív koncentrációja között hemodializált betegekben.

Zsírsav	Chol	TG	LDL-C	HDL-C
C18:0	-0,25	-0,59	-0,32	0,05
C18:1	-0,25	0,03	0,17	-0,33
C18:2	-0,4	-0,22	0,12	0,47

C18:0=sztearinsav, C18:1=olajsav, C18:2=linoleinsav

Eredményeinket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a veseelégtelenség mértékének fokozódásával a többszörösen telítetlen zsírsavak mennyiségének csökkenése figyelhető meg. A relatív esszenciális zsírsavhiány, minden betegcsoportban kimutatható volt. Az egyszeresen telítetlen zsírsavak arányát – különösen az egészséges kontrollokban egyébként, alacsony palmitoleinsav mennyiségét (C16:1) – a hyperlipidaemia súlyossága befolyásolta. Figyelemre méltó a nem-atherogén sztearinsav- és a szérumlipid értékek közti korreláció, amely megállapításnak terápiás jelentősége is lehet.

4.2. Oxidatív stressz alakulása és befolyásoló tényezői

4.2.1 A plazmalipidek zsírsav összetételének potenciális szerepe a neutrofilek fokozott oxidációs robbanásában

A lipid eltérések (a koleszterin-, a trigliceridszint emelkedése és zsírsavösszetétel változás) szerepet játszhatnak a nyugvó neutrofilek fokozott szuperoxid anion termelésében. Annak eldöntésére, hogy a HD betegekben van-e és milyen szerepe van a lipideltéréseknek, a meghatározott szuperoxid anion értékeket olyan nem-vesebeteg kontrollokkal hasonlítottuk össze, akikben a szérumban a lipidparaméterei a HD betegekéhez hasonlóak voltak. A vizsgálatba az 4.1.3. fejezetben ismertetett eredmények alapján, olyan HD programban kezelt betegeket (20 beteg, átlagos életkoruk $45,2 \pm 5,3$ év) vontunk be, akikben a szérumban Chol < 8 mmol/l és a TG < 3 mmol/l volt és a CAD klinikai tünetei nem voltak kimutathatóak. A kontrollként vizsgálatba bevont 17 személy (átlag életkoruk $42,3 \pm 4,2$ év) lipidcsökkentő terápiában nem részesült.

8. táblázat. A plazma koleszterin (Chol)-, triglicerid(TG)-szintje, a plazmalipidek többszörösen telítetlen zsírsav(PUFA)-tartalma, a tiobarbitursavval reakcióba lépő anyagok (TBARS) mennyisége és a nyugvó neutrofilek (O_2^-) termelése a krónikus vesebeteg (HD) és a kontroll nem-vesebeteg csoport esetében.

Mért paraméter	HD átlag \pm szórás	Kontroll átlag \pm szórás	p
Chol (mmol/l)	5,54 \pm 1,00	5,86 \pm 1,2	n.sz.
TG (mmol/l)	1,89 \pm 0,77	1,58 \pm 0,96	n.sz.
PUFA (%-ban)	8,74 \pm 2,09	12,02 \pm 3,94	0,02
C16:1 (%-ban)	4,33 \pm 2,5	4,38 \pm 2,5	n.sz.
O_2^- (nmol/10 ⁶ sejt. 30 min)	31,5 \pm 14,0	21,2 \pm 4,5	0,01
TBARS (μ mol/ml)	8,95 \pm 2,09	5,2 \pm 1,8	0,002

n.sz.: nem szignifikáns

A kontrollesoport kiválasztási kritériumának megfelelően a két csoport között nem volt szignifikáns különbség a szérum Chol- és a TG-szintek között (8. táblázat). A HD betegekben a plazma PUFA-tartalma szignifikánsan kisebb, míg a nyugvó neutrofilek szuperoxid-anion (O_2^-) termelése nagyobb volt, mint a kontrollesoportban. Nem találtunk különbséget a két csoport között a palmitoleinsav átlagos mennyiségében (8. táblázat).

9. táblázat. Korreláció a plazma koleszterin (Chol)-, triglicerid(TG)- és többszörösen telítetlen zsírsav (PUFA)-, valamint palmitoleinsav (C16:1) tartalma között a krónikus vesebetegek (HD) és a kontroll nem-vesebeteg csoport esetében.

Paraméter	HD r	HD P	Kontroll r	Kontroll p
PUFA/Chol	-0,79	0,001	-0,64	0,005
PUFA/TG	-0,55	0,015	-0,49	0,05
C16:1/Chol	0,37	n.sz.	0,88	0,001
C16:1/TG	0,01	n.sz.	0,51	0,038

n.sz.: nem szignifikáns

Összeadva a plazma lipidjeiben mért PUFA-k mennyiségét a 4.1.3. fejezetben leírtnál erősebb negatív korrelációt találtunk a szérum Chol- és TG-szintjével, ami a „homogénebb” HD csoportnak is tulajdonítható (9. táblázat). Érdekes módon a magasabb palmitoleinsav koncentráció csak enyhe pozitív korrelációt mutatott a szérum koleszterin szintjével és semmilyen kapcsolatban nem állt a dializált betegek TG értékeivel. A kontroll csoportban (mérsékelt hyperlipidaemiások) azonban a C16:1 szoros és pozitív korrelációt mutatott mind a szérum koleszterin-, mind a trigliceridszintekkel.

Szignifikáns negatív kapcsolatot találtunk a plazma PUFA-tartalma és a nyugvó neutrofilek szuperoxid-anion (O_2^-) termelése között a HD betegekben és a kontrollesoportban egyaránt. Mindkét csoportban pozitív korrelációt kaptunk a plazma Chol-szintje és a neutrofilek O_2^- termelése között. A plazma TG-szintje és a neutrofilek

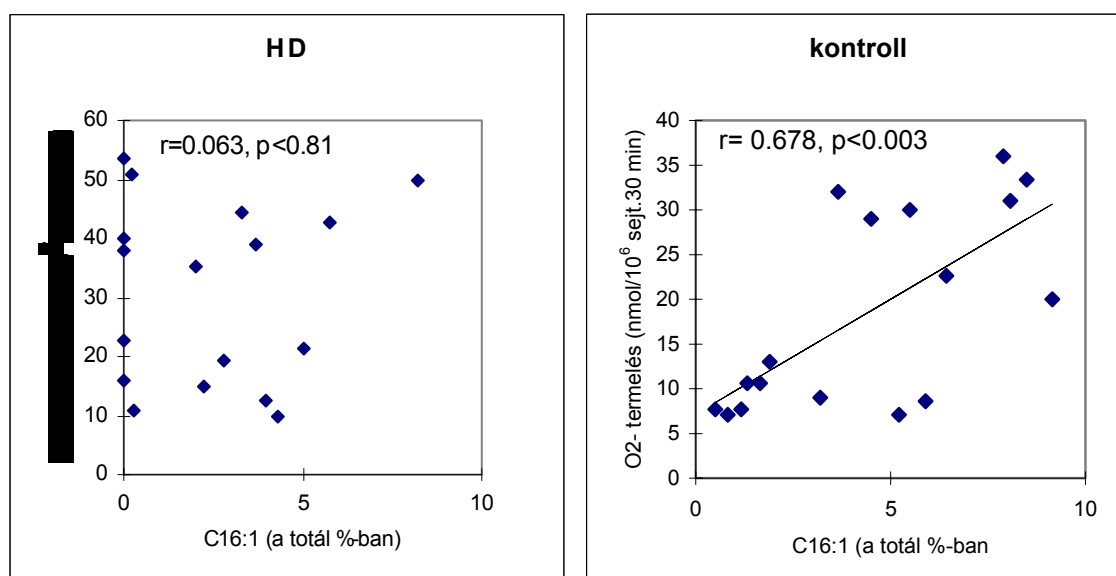
(O_2^-)-termelése között azonban csak a HD csoportban találtunk szignifikáns és pozitív korrelációt. A plazma TBARS-szintje és a O_2^- termelés között csak a kontrollcsoportban kaptunk szignifikáns és pozitív korrelációt (10. táblázat).

10. táblázat. A nyugvó neutrofilek (O_2^-)-termelése, a plazma koleszterin (Chol)-, triglicerid(TG)-szintje és a lipidperoxidáció közti kapcsolat.

Mért paraméter	HD R	HD P	Kontroll r	Kontroll p
O_2^- /PUFA	-0,66	0,001	-0,66	0,003
O_2^- /Chol	0,50	0,025	0,84	0,0001
O_2^- /TG	0,50	0,020	0,28	n.sz.
O_2^- /TBARS	0,38	n.sz.	0,58	0,014

n.sz.: nem szignifikáns

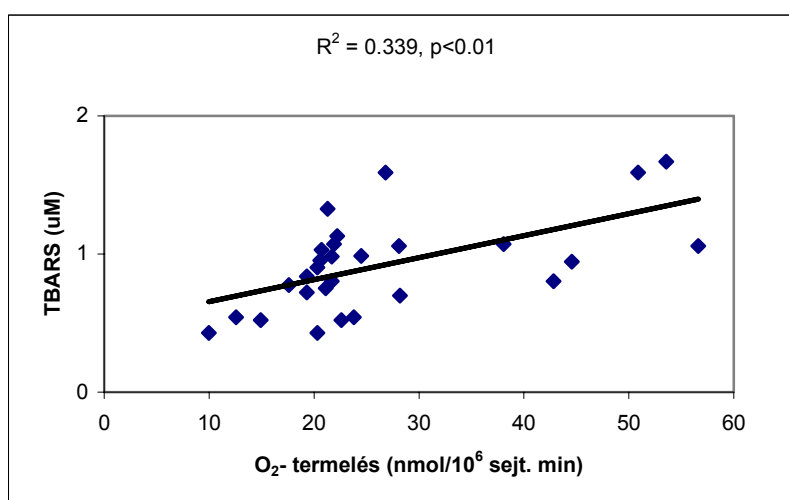
A neutrophilek szuperoxid-anion (O_2^-)-termelése és a plazma palmitoleinsav-tartalma között (8. ábra) csak a kontrollcsoportban kaptunk pozitív korrelációt ($r=0,678$, $p<0,003$).



8. ábra. Korreláció a plazmalipidek palmitoleinsav (C16:1)-tartalma és a neutrofilek szuperoxid-anion

(O_2^-)-termelése között a hemodializált (HD) betegekben és a hasonló lipidparaméterű kontrollcsoportban.

A HD betegekben talált lipidperoxidáció fokozódásban a neutrofilek alapszinten megemelkedett O_2^- termelése szerepet játszhat, amit alátámaszt az a pozitív korreláció, amit a HD betegektől, dialízis előtt és dialízis után vett vérből szeparált nem-stimulált neutrofilek O_2^- termelése és a plazmájukban mért TBARS-koncentráció között kaptunk (9. ábra).



9. ábra. Kapcsolat a hemodializált betegek neutrofiljei alapszinten mért szuperoxid-anion-termelése és a plazmában mért tiobarbitursavval reakcióba lépő anyagok (TBARS) mennyisége között.

Eredményeinket összegezve megállapíthatjuk, hogy hemodializált betegekben és a hasonló lipidparaméterekkel rendelkező nem-vesebeteg kontrollcsoportban egyaránt pozitív korreláció van a szérum koleszterin-, trigliceridszintje és a neutrofilek szuperoxid-anion-termelése között. A szuperoxid-anion-termelés pozitív korrelációt mutat a plazma lipidek oxidatív károsodását mutató TBARS mennyiségével, jelezve, hogy a neutrofilek alapszinten fokozott oxidatív robbanása ennek egyik kiváltó oka lehet. Negatív korrelációt találtunk a többszörösen telítetlen zsírsavtartalom, a szérum koleszterin-, triglicerid-szintje, valamint a nyugvó neutrofilek szuperoxid-anion-termelése között. A palmitoleinsav relatív koncentrációjának átlaga megegyezett ugyan a két csoportban, mégis korrelációt a nyugvó

neutrofilek O_2^- termelése és a palmitoleinsav tartalom között csak a mérsékelten hyperlipidaemiás kontroll csoportban találtunk.

4.2.2. A nem-enzimikus antioxidáns E-vitamin-ellátottság és a lipidperoxidáció

A fokozott oxidatív stressz a HD betegeknél jól ismert fenomenon, melyben többek között a reaktív oxigénradikálok (ROS) fokozott termelése, valamint a nem megfelelő antioxidáns-ellátottság szerepet játszik.

Az előző fejezetben bemutatott adatok szerint a HD betegek plazmájában a többszörösen telítetlen zsírsavak hiánya közös vonás. Ezen PUFA-hiány a fokozott lipidperoxidációra visszavezethető, amelyben a nem elégséges antioxidáns-ellátottságnak szerepe lehet. Vizsgálataink során kapcsolatot kerestünk a lipidperoxidáció mértéke és a természetes eredetű, nem-enzimikus antioxidáns, E-vitaminnal való ellátottság között a HD betegeknél, egészséges kontrollokban mért értékekkel való összehasonlítás után.

Betegek: 20 hemodializált vesebeteget (átlagéletkoruk: $45,2 \pm 5,3$ év, a dialízisprogramban eltöltött átlagidő: $3,7 \pm 1,7$ év) vontunk be a vizsgálatba. A betegek hetente 3x4 órás dialíziskezelésben részesültek. A dialízishez bikarbonát dializáló oldatot és szintetikus – jó biokompatibilitással rendelkező – polysulfon dializáló membránt alkalmaztunk.

Kontrollcsoport: 17 önkéntes személy szolgált kontrollként, akiknél a szokásos éves felülvizsgálat miatt történt vérvétel. A kiválasztott egyének életkora (átlag: $42,3 \pm 4,2$ év), szérumszintjük koleszterin- és trigliceridértéke hasonló tartományba esett, mint a HD betegeké ($chol < 8$ mmol/L, $TG < 3$ mmol/L) és gyógyszeres kezelésben nem részesültek.

A lipidperoxidáció mértékét a konjugált dién, a lipidhidroperoxid és a tiobarbitursavval reakcióba lépő (TBARS) anyagok mennyiségének, a plazma teljes lipid-frakciójában és az ebből izolált foszfolipid-frakcióban való meghatározásával követtük.

11. táblázat. A szérum lipidek (totál és izolált foszfolipidek) oxidációs károsodását mutató paraméterek (konjugált dién, lipidhidroperoxid) alakulása hemodializált betegekben (HD) és kontrollokban.

Mért paraméter	HD átlag \pm szórás	Kontroll átlag \pm szórás	p
<i>konjugált dién</i> ($\mu\text{mol/ml}$)			
totál lipid	0,342 \pm 0,04	0,225 \pm 0,04	0,05
foszfolipid	0,190 \pm 0,06	0,150 \pm 0,02	n.sz.
<i>lipid hidroperoxid</i> ($\mu\text{mol/ml}$)			
totál lipid	0,412 \pm 0,08	0,328 \pm 0,02	0,05
foszfolipid	0,130 \pm 0,05	0,090 \pm 0,02	0,05

n.sz: nem szignifikáns

Megállapítottuk, hogy a HD betegek plazmájából extrahált lipidekben és az ebből izolált foszfolipidekben szignifikánsan nagyobb a konjugált dién és a lipidhidroperoxid mennyisége, mint a kontrollcsoportban mért érték (kivétel a HD foszfolipid-frakció, ahol a különbség az emelkedettség ellenére matematikailag nem volt szignifikáns (11. táblázat).

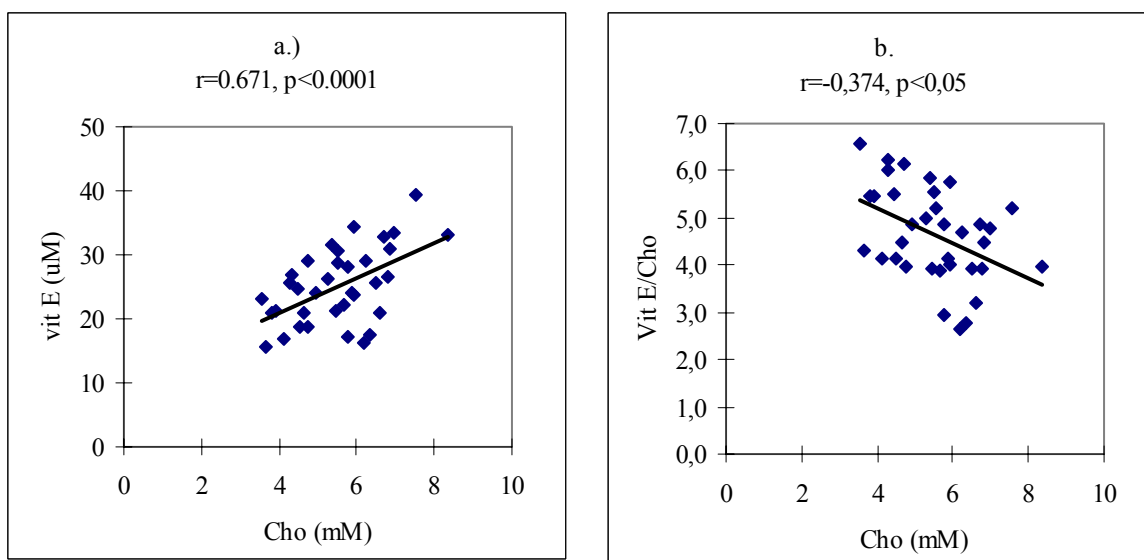
A lipidperoxidáció végtermékének tekintett TBARS mennyisége ugyancsak szignifikánsan nagyobb volt a HD betegek plazma lipidjeiben. Ugyanakkor, a HD csoportban a plazma E-vitamin-szintje nem különbözött a kontrollokétól (12. táblázat). A lipidoldható E-vitaminnal való ellátottság szempontjából azonban nem az abszolút E-vitamin mennyisége, hanem a szérum össz-koleszterin és/vagy trigliceridre vonatkoztatott hányadosa a megfelelő mutató. Elvégezve ezt a normalizációt, szignifikáns eltérést találtunk a HD betegek és a kontrollok között (12. táblázat). Különösen nagy eltérést találtunk a trigliceridre vonatkoztatott értékek alapján, ami egyúttal jelzi, hogy a HD betegek E-vitamin-ellátottsága nem megfelelő.

12. táblázat. A lipidperoxidáció végterméke (tiobarbitursavval reakcióba lépő anyagok, TBARS) és az antioxidáns E-vitamin-szintjének alakulása hemodializált betegekben és egészséges kontrollszemélyek plazmájában és az E-vitamin lipidértékekre való normalizálása előtt és után.

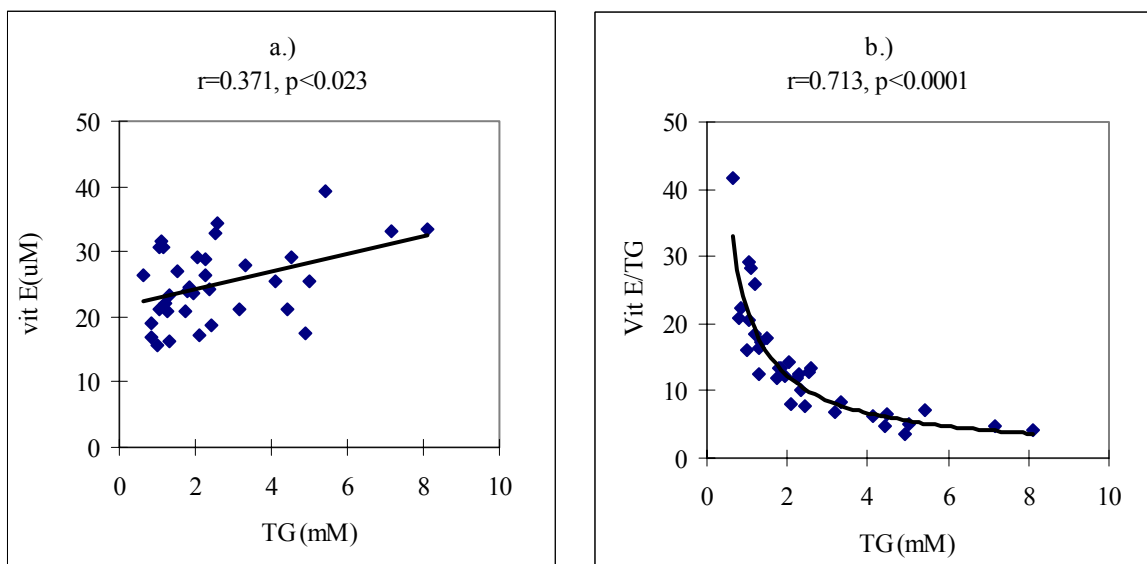
Mért paraméter	HD átlag ± szórás	Kontroll átlag ± szórás	p
TBARS ($\mu\text{mol/L}$)	0,477 ± 0,29	0,21 ± 0,02	0,004
Plazma E-vitamin ($\mu\text{mol/L}$)	26,6 ± 6,1	28,3 ± 3,3	n.sz.
E-vit./Chol ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$)	4,74 ± 0,86	5,72 ± 0,94	0,001
E-vit./TG ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$)	14,0 ± 5,98	35,3 ± 8,0	0,0001

TBARS: tiobarbitursavval reakcióba lépő anyag, HD: hemodializált betegek
n.sz.: nem szignifikáns

Igen jól szemlélteti a szérum össz-koleszterin és/vagy triglicerid mennyiségének szerepét az E-vitamin-ellátottság megítélésében a következő két ábrapár. Míg a plazma E-vitamin-koncentrációját a szérum koleszterin (10. ábra a.)-, illetve a triglicerid (11. ábra a.)-koncentráció függvényében ábrázolva pozitív a korrelációs együttható, addig a szérum koleszterin (10. ábra b.)-, illetve a szérum triglicerid-koncentrációra (11. ábra b.) normalizált E-vitamin mennyisége ugyanezen paraméterek függvényében negatív korrelációs együtthatóval írható le. Ez a fordított arány egyértelműen mutatja, hogy a szérum lipidszintjeinek emelkedésével az antioxidáns hatású E-vitamin-ellátottság, amely a lipideket és a lipoproteinek védi az oxidációs károsodástól, csökken.



10. ábra. Az E-vitamin- (a) és a koleszterinszintre normalizált E-vitamin mennyisége (b) a koleszterinszintek függvényében hemodializált betegekben.



11. ábra. Az E-vitamin- (a) és a trigliceridszintekre normalizált E-vitamin mennyisége (b) a trigliceridszintek függvényében a hemodializált betegekben.

Összefoglalva eredményeinket, megállapíthatjuk, hogy a hemodialízis programban kezelt vesebetegekben az oxidatív stressz következtében a plazmalipidekben és a foszfolipidekben megnő a TBARS, a konjugált dién és lipidhidroperoxid mennyisége, ugyanakkor a betegek E-vitamin-ellátottsága nem kielégítő.

4.2.3. A szérumban paraoxonáz-aktivitásának vizsgálata

Az E-vitamin mellett, az LDL oxidatív károsodásának kivédésében az utóbbi évek vizsgálatai eredményei szerint, a HDL-hez kötött paraoxonáz enzim is fontos szerepet játszik. Ennek tükrében, vizsgáltuk, hogy ezen enzim aktivitása hogyan alakul krónikus veseelégtelenségben. A vizsgálatba bevont betegek és kontrollok adatai a 13. táblázatban láthatók.

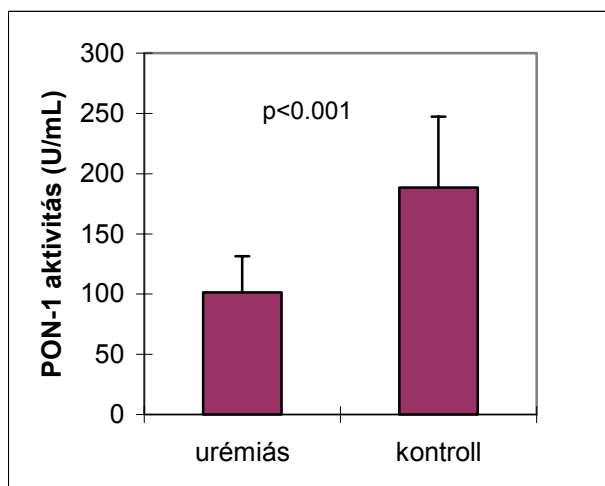
13. táblázat. Lipidparaméterek az egészséges kontroll- és az urémiás betegcsoportban

	Kontroll	Urémiás
Betegszám	110	119
Férfi	63	67
Nő	47	52
Kor (év)	53,24±9,35	57,38±14,07
BMI (kg/m ²)	22,5±2,54	23±4,09
Cho (mmol/L)	4,71±0,89	5,54±1,53*
TG (mmol/L)	1,06±0,52	2,34±1,48*
HDL-C (mmol/L)	1,43±0,31	1,08±0,31*
LDL-C (mmol/L)	2,6±0,6	3,42±1,14
ApoA ₁ (g/L)	1,85±0,27	1,16±0,28*
ApoB ₁₀₀ (g/L)	1,11±0,31	1,38±0,65
Átlagos dialízis idő (év)		2,7±0,3

* szignifikáns eltérés a kontrollok és HD betegek között, p<0,01

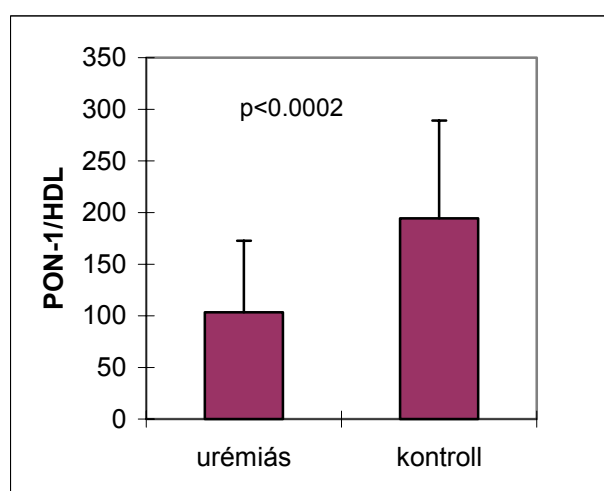
A vizsgálatba bevont dializált betegek koleszterin-, triglicerid- és LDL-C-szintjei szignifikánsan magasabbak, míg a HDL-C- és apoA₁- szintjei viszont szignifikánsan alacsonyabbak voltak a kontrollokétól (13. táblázat).

A szérumban paraoxonáz (PON-1) aktivitás a betegcsoportban szignifikánsan alacsonyabb volt a kontrollhoz képest (101,36 ± 30,2 vs. 188,05 ± 58,96 U/ml; p < 0,001) (12. ábra).

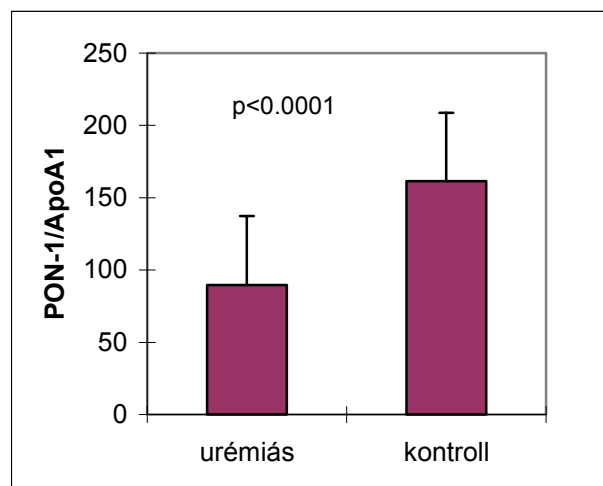


12. ábra. Egészséges önkéntesek és dializált urémiás betegek szérumában mért paraoxonáz aktivitás.

A szérumban mérhető paraoxonáz enzim 90%-a HDL-hez kötött állapotban fordul elő, ezért megvizsgáltuk azt, hogy a PON-1-aktivitás csökkenése nem a HDL-C csökkenésével magyarázható-e. Ennek eldöntésére a HDL- és az apoA₁-koncentrációkra standardizáltuk az enzimaktivitásokat (PON/HDL és PON/ApoA₁ hányados). Azt találtuk, hogy mind a HDL-C-re (13. ábra) mind az apoA₁-re (14. ábra) korrigált PON-1-aktivitás szignifikánsan alacsonyabb a dializált betegekben, mint a kontrollokban (PON-1/HDL: $103,3 \pm 69,5$ vs. $194,45 \pm 94,45$; PON/apoA₁: $89,64 \pm 47,8$ vs. $161,4 \pm 47,35$).

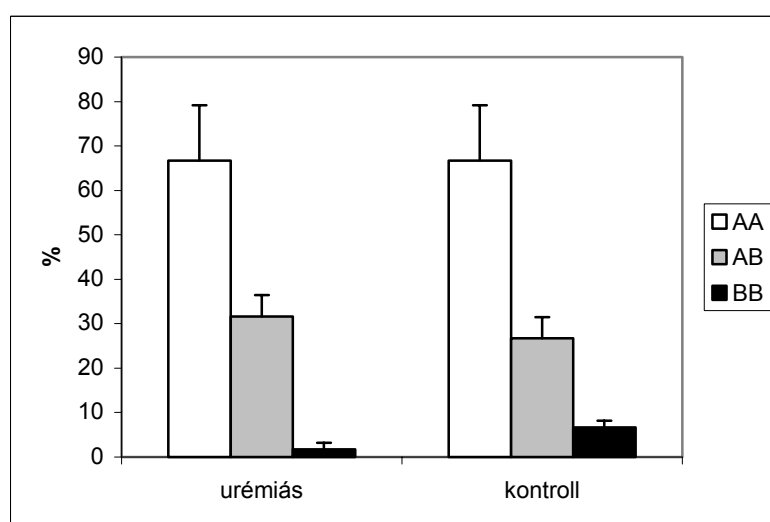


13. ábra. A HDL koncentrációra normalizált paraoxonáz-aktivitás az urémiás betegekben és a kontrollokban.



14. ábra. Apo A₁-re standardizált paraoxonáz-aktivitás az urémias betegekben és a kontrollokban.

A genetikailag meghatározott fenotípusok eltérő PON-1 enzimaktivitást jelenthetnek, ezért meghatároztuk a PON-1 fenotípus megoszlását is. (AA= kis aktivitású, AB= intermedier aktivitású, BB= nagy aktivitású forma). A PON-1 fenotípus szerinti megoszlása a dializált betegekben (AA: 66,67%; AB: 31,62%; BB: 1,71%) nem különbözött szignifikánsan a kontrollcsoportéhoz képest (AA: 66,67%; AB: 26,67%; BB: 6,67%) (15. ábra).



15. ábra. A paraoxonáz enzim fenotípus szerinti megoszlása a hemodializált betegekben (HD) és kontrollokban (AA: alacsony aktivitású, homozigóta; AB: közepes aktivitású, heterozigóta; BB: magas aktivitású, homozigóta)

Eredményeinket összegezve megállapíthatjuk, hogy a hemodializált betegekben csökken a szérum paraoxonáz aktivitása és ez nem magyarázható sem a HDL-C és az ApoA₁ csökkenésével, sem a PON fenotípus-megoszlás változásával.

4.3. A neutrofilek intracelluláris szabadkalcium-tartalmát meghatározó tényezők vizsgálata

A krónikus vesebetegekben a neutrofilek alapszinten megemelkedett ROS termelését számos tényező befolyásolja, amely okai között az előző fejezetben ismertetett eredmények szerint, a szérum lipidértékei és a lipidek zsírsaveltérései is szerepet játszhatnak. Ezek a tényezők együtt a neutrofilek mintegy „előstimulált” állapotát eredményezik. Az alapszinten megemelkedett O₂⁻termelés más esetekben is együtt jár a neutrofilek intracelluláris szabadkalcium ([Ca²⁺]_i)-szintjének megemelkedésével. A következő fejezetben bemutatjuk, hogy ez a [Ca²⁺]_i-emelkedés a nyugvó neutrofilekben a HD betegekben is fennáll és több tényezővel is kapcsolatba hozható.

4.3.1. Az erythropoietin kezelés hatása

Az erythropoietin az erythropoiesis legfőbb szabályozója. Hazánkban először számoltunk be a rekombináns humán erythropoietin (rHuEpo) renális anaemiára gyakorolt kedvező hatásáról krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegekben.

4.3.1.1. rHuEpo-kezelésben először részesülő betegek

A vizsgálatban hemodialízis programban kezelt öt, kifejezetten anaemiás beteg vett részt (átlagos életkoruk 30,4±4,6 év), akik korábban még nem részesültek rHuEpo-kezelésben. Az rHuEpo-t (Eprex, Janssen Cilag) a gyógyszergyári előírásnak megfelelő adagban kezdtük el, amelynek dózisát a betegek hemostatusától függően hetente

módosítottuk a kezelés 12. hetéig, ekkor felfüggesztettük adását. A neutrofilek $[Ca^{2+}]_i$ -tartalmát a rutin vizsgálatokkal együtt a kezelés előtt, annak 8. és 12. hetében, majd további 8 héttel később, az rHuEpo felfüggesztését követően (20. hét) határoztuk meg.

14. táblázat. Fő laboratóriumi paraméterek az rHuEpo-kezelés előtt, annak 8. és 12. hetében, valamint a kezelés felfüggesztése után 8 héttel (20. hét).

rHuEpo-kezelés ideje (hét)				
Paraméter	Előtte	8	12	20
Hgb (g/l)	69±7	117±10*	113±6*	68±6
htk (%)	0.22±0.02	0.37±0.05*	0.35±0.03*	0.24±0.04
vvt ($10^6/mm^3$)	2.0±0.3	3.08±0.2*	3.3±0.2***	2.4±0.3
fvs ($10^3/mm^3$)	5.2±1.5	4.84±1.0	5.8±1.2	5.3±1.6
Thrb ($10^3/mm^3$)	162±66	152±64	170±58	165±68
ret ($10^3/mm^3$)	21±5	58±14*	49±33**	30±20

hgb=hemoglobin, htk=hematokrit vvt=vörösvérsejt, fvs=fehérvérsejt, thrb=trombocita, ret=retikulocita

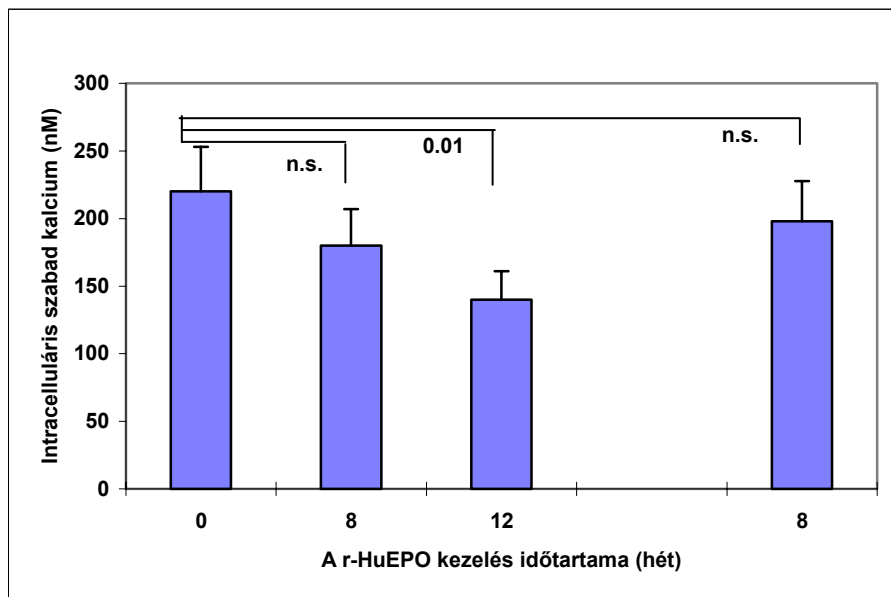
Az eredmények kifejezése: átlag±SD. Különbségek az rHuEPO-kezelés előtti értékekhez viszonyítva:

* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

A kezelés hatásosságának megfelelően a betegek hemoglobin-koncentrációja és hematokritértéke, továbbá eritrocita- és retikulocitaszáma a kezelés 8. hetére szignifikánsan nagyobb volt a kezelés előttiékhöz képest, majd ezen paraméterek a kezelés felfüggesztését követő 8 hét múlva visszaálltak a kezelés előtti szintre (14. táblázat). Az rHuEpo-kezelés nem befolyásolta szignifikáns mértékben a fehérvérsejtek és trombociták számát a kezelés teljes időtartama alatt.

Az rHuEpo-kezelés hatására az erythropoesis normalizálódásával párhuzamosan a neutrofilek rHuEpo-kezelés előtti igen magas intracelluláris szabadkalcium-tartalma csökkent, a csökkenés mértéke a kezelés 12. hetében szignifikáns volt. A neutrofilek

$[Ca^{2+}]_i$ -tartalma a kezelés felfüggesztését követően 8 hét múlva ismét emelkedett (16. ábra).



16. ábra Az rHuEpo-kezelés hatása a neutrofilek intracelluláris szabadkalcium-tartalmára, az rHuEpo-kezelés előtt, annak 8. és 12. hetében, majd a kezelés felfüggesztését követően 8 hét múlva.

4.3.1.2. A hosszú távú rHuEpo kezelés hatása

A fenti eredmények alapján azt kívántuk tisztázni, hogy az erythropoietinnek a nyugvó neutrofilek intracelluláris szabadkalcium-szintjére kifejtett kedvező hatása igazolható-e a tartós rHuEpo-kezelés esetén is. Így a későbbiekben meghatároztuk a neutrofilek $[Ca^{2+}]_i$ -tartalmát olyan dializált betegeknél, akik már legalább 1 év óta részesültek rHuEpo-kezelésben.

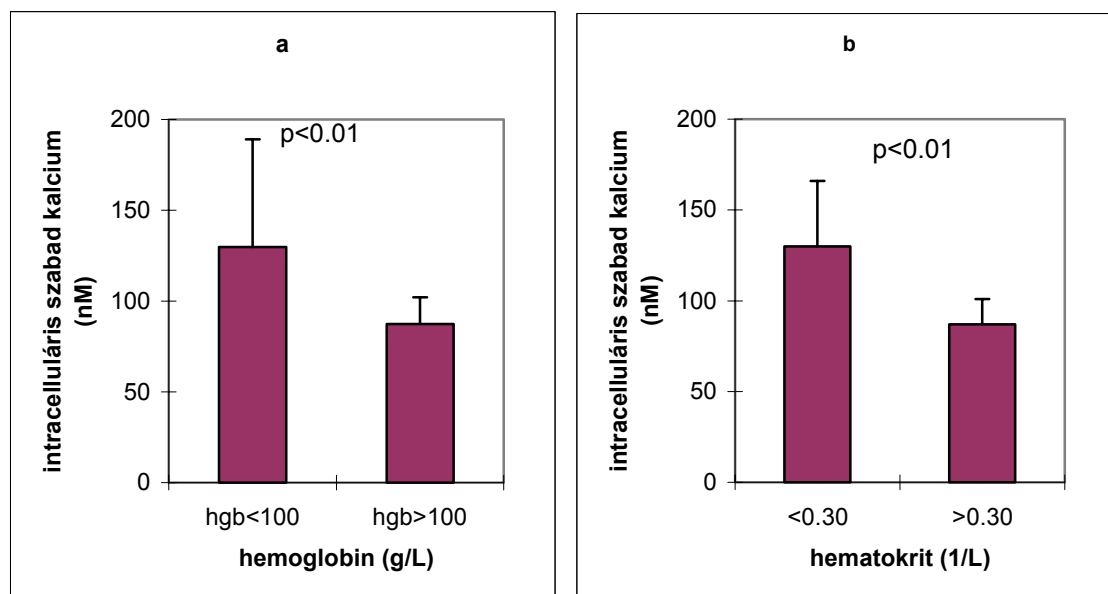
15. táblázat. A 20 krónikus HD programban kezelt beteg fő laboratóriumi adatai

paraméter	átlag±SD	Mért értéktartomány
Ca (mmol/l)	2,36±0,18	1,64–2,88
P (mmol/l)	2,03±0,55	1,26–3,98
glükóz (mmol/l)	5,43±0,78	4,10–6,5
Hgb (g/l)	105±8,1	89–118
Htk	0,32±0,03	0,26–0,38
Vas (µmol/l)	11,6±2,1	6,6–14,1
TVK (µmol/l)	28,7±5,2	19,8–38
ferritin (g/l)	3,81±1,8	109–767
urea (mmol/l)	28,3±4,5	15,9–31,9
Kreatinin (µmol/l)	960±157	548–1164
Húgysav (µmol/l)	395±56	251–528
Bilirubin (µmol/l)	6,55±0,95	5–8
összfehérje (g/l)	67,3±4,1	59–79
Albumin (g/l)	32,1±2,31	26–40

TVK= teljes vaskötő kapacitás

A vizsgálatban 20 hemodialízis programban kezelt beteg vett részt. A betegek átlag-életkora 56±12 év volt. Kizáró kritériumok voltak: aktuális infekció, májbetegség, pajzsmirigybetegség. A betegek aktív D-vitamin-kezelésben (calcitriol, Rocaltrol Roche, másodnaponta 0,5 µg) és iv. vaspótlásban részesültek (ferrisorbit gluconát, Ferrlecit, Aventis Pharma, minden második héten 1 ampulla). A betegeket heti 3x4 órán át dializáltuk szintetikus dializáló membránnal (polysulphone kapilláris dializátor, Hemoflow F60(S), High Flux Fresenius), bikarbonát dializáló oldatot alkalmazása mellett, amely 1,5 mmol/L kalciumot tartalmazott. A betegek általános laboratóriumi adatait a 15. táblázatban mutatjuk be.

Megállapítottuk, hogy a hosszú távú rHuEpo-kezelésben részesülő hemodializált betegekben a nyugvó neutrofilek átlag $[Ca^{2+}]_i$ -tartalma nem különbözött szignifikánsan a kontrollcsoportban mérttől (HD: 102 ± 32 nmol/l vs. K: 105 ± 15 nmol/l). A HD betegekben azonban a neutrofilek $[Ca^{2+}]_i$ -tartalma széles határok között változott (51–244 nmol/l), ami azt mutatja, hogy az rHuEpo-kezelés nem minden betegben képes normalizálni azt.



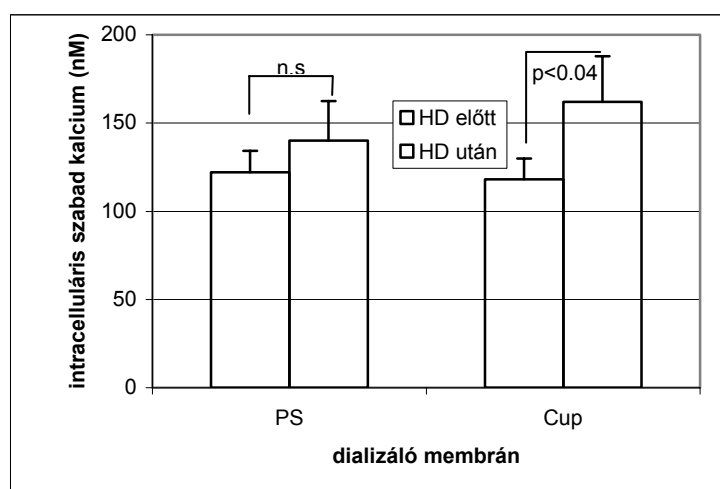
17. ábra. rHuEpo-kezelésben részesülő betegek neutrofiljei intracelluláris szabadkalcium tartalma. A betegeket két csoportra osztva a) ábra: a hemoglobin koncentrációk szerint (hgb < 100 g/l, hgb > 100 g/l); b) ábra: a hematokrit szerint (htk < 0,30 htk > 0,30).

Azonban az erythropoiesis normalizálódásának a nyugvó neutrofilek $[Ca^{2+}]_i$ -tartalmára kifejtett hatását mutatja, hogy amikor az anaemia mértéke szerint csoportosítottuk a betegeket, jelentős eltéréseket találtunk. A kevésbé anaemiás betegekben (hgb > 100 g/l, htk > 0,30) a neutrofilek $[Ca^{2+}]_i$ -tartalma szignifikánsan kisebb volt, mint a kifejezettebben anaemiásokban (hgb < 100 g/l, htk < 0,30 (17. a), b) ábra).

4.3.2. A dialízismembrán hatása a neutrofilek $[Ca^{2+}]_i$ -tartalmára

Ismert, hogy a dializáló membrán kémiai tulajdonságai is hatást gyakorolnak a neutrofilek funkcióira, ezért a továbbiakban vizsgáltuk azt, hogy befolyásolja-e a neutrofilek $[Ca^{2+}]_i$ -koncentrációját a dializáló membrán (típusa) biokompatibilitása. A vizsgálatban a biokompatibilis polysulphone (PS) és bioinkompatibilis cupropane (Cup) dializáló membrán hatását hasonlítottuk össze.

Az önkontrollos vizsgálatokhoz, az előző betegcsoportból véletlenszerűen választottunk ki 10 beteget, akiket 1 hétig (heti 3x4 óra) polysulphone-alapú, majd a következő 1 hét során (heti 3x4 óra) cupropane-alapú (Hemoflow E3, Fresenius) dializátorral kezeltük. A vérvételek az azonos membránnal végzett harmadik HD kezelés előtt és után történtek. A dialízis technika megegyezett az előzőekben leírtakkal.



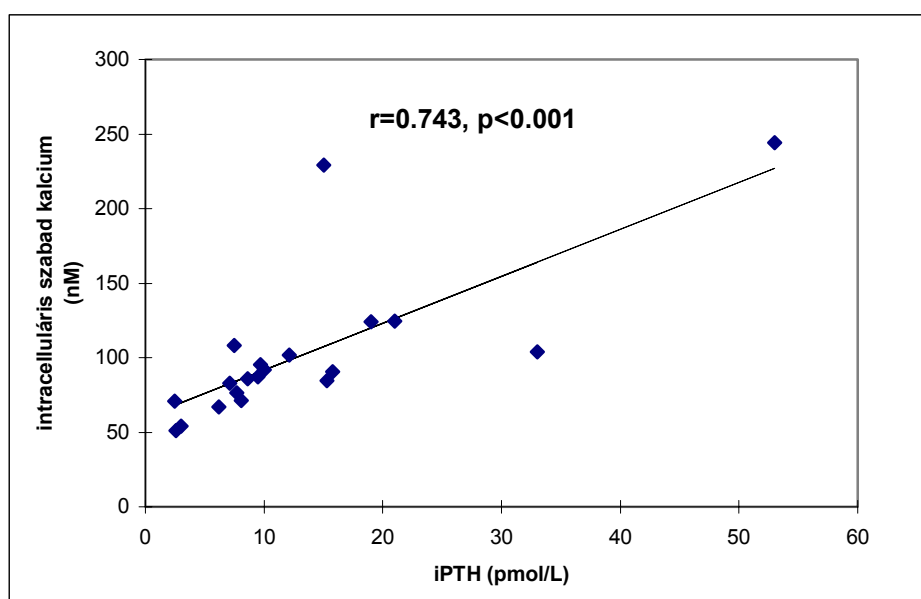
18. ábra. A neutrofilek intracelluláris szabadkalcium-koncentrációjának változása polysulphone (PS) és cuprophan (Cup) dializáló membránnal végzett dialízis során. A vizsgálatokat dialízis (HD) előtt és után végeztük el.

A különböző membránokkal dializált betegekben a HD előtt vett vérből szeparált neutrofilek $[Ca^{2+}]_i$ -koncentrációja közel normális volt és nem függött a dializáló membrán

típusától (PS: 112 ± 35 nmol/L vs. Cup: 108 ± 42 nmol/L). A dialízis végére mindkét membrán esetén növekedett a $[Ca^{2+}]_i$ -koncentráció a neutrofilekben és a kevésbé biokompatibilis Cup membrán alkalmazásakor ez a növekedés szignifikáns volt a HD előtti értékekhez képest (18. ábra).

4.3.3. A kalcium-foszfát anyagcsere hatása a neutrofilek $[Ca^{2+}]_i$ -tartalmára

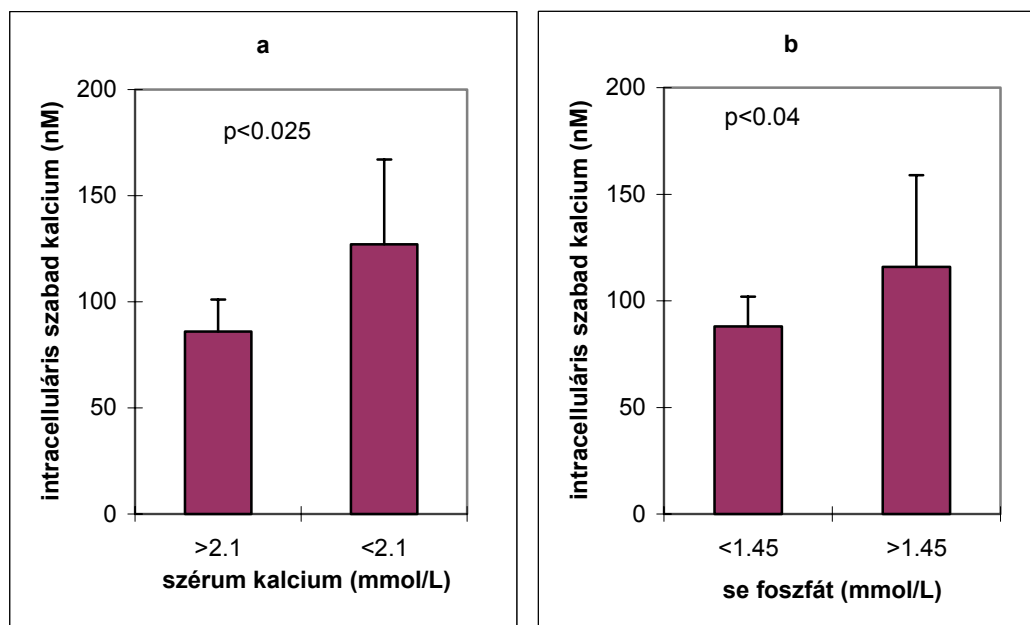
Közismert, hogy a parathormon (PTH) a kalcium-foszfát anyagcsere egyik fő regulátora. Az is ismert, hogy a dializált betegekben a hyperphosphataemiának és az ezzel összefüggő szekunder hyperparathyreosisnak komoly klinikai és terápiás konzekvenciái vannak. A kalcium-foszfát anyagcsere a keringésben található sejtek, így a neutrofilek funkcióját és a $[Ca^{2+}]_i$ -t is befolyásolhatja. Ezt figyelembe véve kerestünk összefüggést a kalcium-foszfát anyagcsere egyes paramétereit (szérum kalcium, foszfát, PTH) és a neutrofilek $[Ca^{2+}]_i$ tartalma között. A szérum PTH és a neutrofilek $[Ca^{2+}]_i$ -tartalma között pozitív korrelációt találtunk ($r=0,743$, $p<0,001$), amely a 19. ábrán látható.



19. ábra. Korreláció a hemodializált betegek neutrofiljeinek intracelluláris szabadkalcium-tartalma és a szérum parathormon (iPTH) között.

A PTH hatását a neutrofilek $[Ca^{2+}]_i$ -re megerősíti, hogy amikor egy terápia rezisztens, súlyos hyperparathyreosisos betegünkön (iPTH: 50 pmol/l) parathyreoidectomiára kényszerültünk, a beteg neutrofiljeiben a műtét előtti magas $[Ca^{2+}]_i$ -szint a műtét után 1 héttel drámaian csökkent (264 nmol/l vs. 112 nmol/l).

Vizsgáltuk a HD betegeknél a plazmakalcium és foszfátszintjei és a neutrofilek $[Ca^{2+}]_i$ -tartalma közti kapcsolatot. Szignifikánsan nagyobb volt a sejtek $[Ca^{2+}]_i$ -tartalma azokban az esetekben, amikor a plazma kalcium alacsony ($Ca < 2,1$ mmol/l), illetve a plazma foszfát magas volt ($P > 1,45$ mmol/l) (20. a, b) ábra)



20. ábra. A szérumszám- és foszfátszint kapcsolata a neutrofilek intracelluláris szabadkalcium-tartalmával. A betegeket két csoportba osztottuk: a) ábra: a szérumszám alapján ($Ca > 2,1$; $Ca < 2,1$ mmol/l) és b) ábra: a szérumszám alapján ($P < 1,45$; $P > 1,45$ mmol/l).

4.3.4. A betegek életkora és a dialízisprogramban eltöltött idő kapcsolata a neutrofilek $[Ca^{2+}]_i$ -tartalmával

A neutrofilek intracelluláris szabadkalcium-koncentrációja az életkor növekedésével emelkedik. A HD betegeknél azonban nem találtunk korrelációt a betegek életkora

és a $[Ca^{2+}]_i$ között ($r=0,12$), ezzel szemben a HD programban eltöltött idő az utóbbival pozitívan korrelált ($r=0,671$ $p<0,001$).

Eredményeinket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a dializált betegek neutrofileiben az rHuEpo-kezelés nélkül magas $[Ca^{2+}]_i$, az rHuEpo-kezelés hatására csökken. Megállapítottuk továbbá, hogy a hyperphosphataemia és a hyperparathyreosis növeli a neutrofilek $[Ca^{2+}]_i$ -tartalmát. Kimutattuk továbbá, hogy a dialíziskezelés során átmenetileg emelkedik a neutrofilekben a $[Ca^{2+}]_i$ (különösen a kevésbé biokompatibilis dializáló membrán esetén) és a dialíziskezelésben eltöltött idő is befolyásolja azt.

4.4. A hyperhomocysteinaemia gyakorisága és a metilén-tetrahidrátfolát reduktáz polimorfizmusa hosszú távú folsavpótlásban részesülő HD betegekben

A hyperhomocysteinaemia (HHC) ma már elismerten a szív- és érrendszeri megbetegedések önálló rizikófaktora, melynek gyakorisága igen magas a HD betegek között. Vizsgáltuk a HHC előfordulási gyakoriságát, valamint a metilén-tetrahidrátfolát reduktáz (MTHFR) enzim polimorfizmusát. A betegek évek óta folyamatosan folsavkezelésben részesültek (3 mg/nap) a krónikus veseelégtelenség, valamint a dialízissel együtt járó folsavvesztés pótlása miatt (Folsav, ICN Magyarország). (Megjegyzés: a jelenleg ismertető plazma folsav eredmények birtokában, a későbbiekben módosítottuk a heti folsavdózisokat).

Betegek: A vizsgálatban 125 (átlagos életkor: 59 ± 18 év) rendszeres dialíziskezelésben részesülő beteg vett részt. Nemek szerinti megoszlás: férfi $n=63$, nő $n=62$. Renális alapbetegségek: glomerulonephritis chronica: $n=53$, pyelonephritis chronica: $n=15$, nephropathia diabetica: $n=11$, tubulointerstitialis nephritis: $n=13$, ren polycysticum: $n=10$,

vascularis nephropathia: n=12, ismeretlen eredetű: n=11. A vesepótló kezelésben eltöltött átlagos idő $59,9 \pm 44,2$ hónap volt.

Vesepótló kezelési eljárások: A betegeket heti 3x4 órában, 250–300 ml/min. vérátfolyási sebességgel, bikarbonát dializáló oldattal dializáltuk. Minden esetben szintetikus dializáló membránt (polysulfon) alkalmaztunk. A vizsgált betegek közül 106-an konvencionális hemodialízis (HD) (dializátor: Fresenius F6 1,3 m², F7 1,6 m², F8 1,8 m²) kezelésben, míg 19-en on-line hemodialfiltrációs (HDF) (dializátor: Fresenius F60 1,3 m², F70 1,6 m²) kezelésben részesültek.

Vizsgált paraméterek: A Hcy-, a folsav-, és a B₁₂-vitamin-szinteket 125, míg a MTHFR C677 polimorfizmusát – technikai okok miatt ennél kevesebb – 107 végstádiumú veseelégtelenségben szenvedő betegben határoztuk meg. A betegek általános laboratóriumi adatait az 16. táblázatban tüntettük fel.

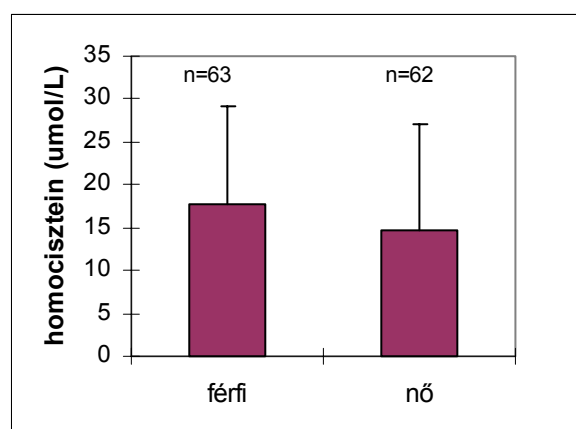
16. táblázat. A vizsgált betegek klinikai kémiai adatai

Paraméter	átlag	szórás	normál tartomány
Kreatinin (μmol/L)	923	201	45–116
urea (mmol/L)	27,7	2,3	3,6–7,2
Hgb (g/L)	111	10	135–170
Na (mmol/L)	142	2,4	137–150
K (mmol/L)	5,4	0,7	3,5–5,3
Ca (mmol/L)	2,22	0,17	2,1–2,6
Cl (mmol/L)	103	2,8	99–111
P (mmol/L)	2,12	0,45	0,8–1,45
Albumin (g/L)	27,9	3,05	30–60
Összfehérje (g/L)	69	4,4	60–80
GOT (U/L)	20,8	11,1	< 40
gamma-GT (U/L)	47,8	75,1	7–50
alkalikus foszfatáz (U/L)	217	83	100–280
parathormon (pmol/L)	20,9	16,5	1,2–6,8
Koleszterin (mmol/L)	5,75	1,15	< 5,2
Triglicerid (mmol/L)	2,06	1,18	< 1,7

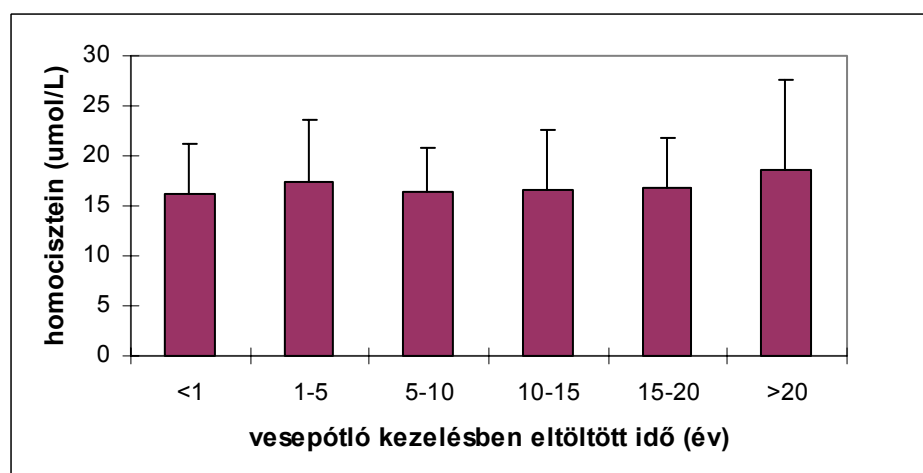
4.4.1. A plazma homociszteinszintje és kapcsolata a folsav- és B₁₂-vitamin-szintekkel

A vizsgálatban résztvevő végállapotú veseelégtelenségben szenvedő betegeink Hcy-szintjeinek átlaga $16,8 \pm 7,2$ $\mu\text{mol/L}$ volt, ami szignifikánsan nagyobb, mint a környékünkön élő kontrollpopuláció Hcy-szintje ($6,6 \pm 1,2$ $\mu\text{mol/L}$, $p < 0,001$).

A HD betegekben nemek szerinti elkülönítés után nem találtunk szignifikáns eltérést a Hcy-szintekben (21. ábra).



21. ábra: A homocisztein szintek alakulása nemek szerinti megoszlásban
Nem befolyásolta a plazma Hcy-szintjét a veseótló kezelésben eltöltött idő sem, bár a 20 évnél hosszabb ideig dializált betegekben a Hcy-koncentráció enyhe emelkedettsége volt megfigyelhető (22. ábra).



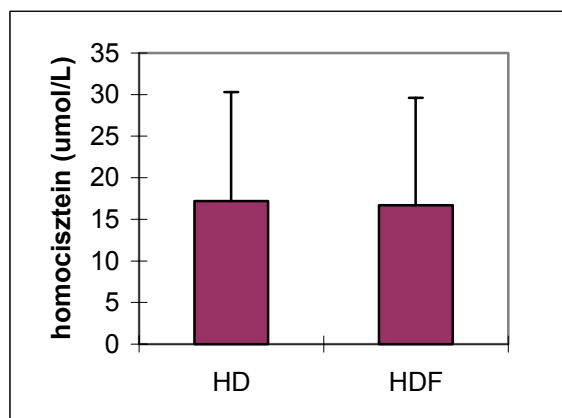
22. ábra: A homociszteinszintek alakulása a veseótló kezelésben eltöltött idő függvényében.

A Hcy-szintek és a végstádiumú veseelégtelenség kialakulásának okai (diagnózisai) között ugyancsak nem volt szignifikáns különbség, bár a diabetes nephropathiás betegek Hcy-értékei kis mértékben emelkedettebbek, mint az egyéb ok miatt dialíziskezelésre szoruló betegeké (17. táblázat).

17. táblázat. A homociszteinszintek átlaga a krónikus veseelégtelenség kialakulásához vezető egyes renális alapbetegségek szerint

Diagnózis	homocisztein ($\mu\text{mol/L}$)		betegszám (n)
	átlag	szórás	
GNC	15,8	10,6	53
PNC	16,2	5,3	15
ND	24,6	24,9	11
TIN	18,8	14,6	13
RP	15,8	7,8	10
VN	13,8	0,7	12
IE	16,1	12,7	11

GNC = glomerulonephritis chronica, PNC = pyelonephritis chronica, ND = nephropathia diabetica, TIN = tubulointerstitialis nephritis, RP = ren polycysticum, VN = vascularis nephropathia, IE = ismeretlen eredetű

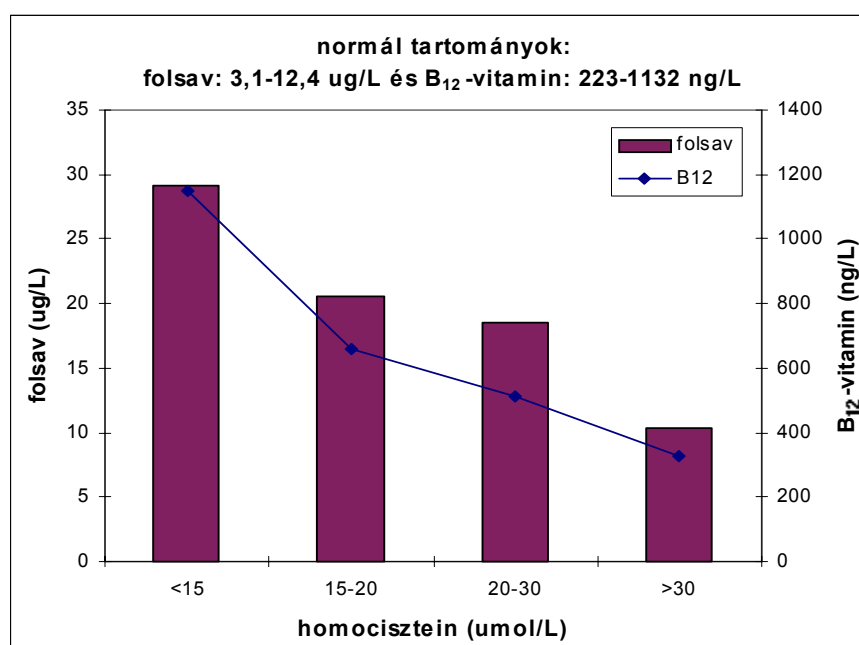


23. ábra: A homocisztein szintek és a dialízis típusa közti kapcsolat (HD: hemodialízis, HDF: hemodiafiltráció).

A dialízis határfoka szerint csoportosítva a betegeket nem találtunk szignifikáns különbséget a Hcy-koncentrációk átlagában (URR<0,65 esetén: Hcy $15,4 \pm 10,2$ vs. URR>0,65 esetén $15,8 \pm 11,8 \mu\text{mol/L}$).

Nem találtunk szignifikáns különbséget a HD-sel és a HDF-vsl kezelt betegek Hcy-értékei között sem (23. ábra).

A plazma folsav, B₁₂-vitamin és a Hcy mennyisége közötti összefüggést vizsgálva azt találtuk, hogy a plazma Hcy-szintjének növekedésével, a folsavpótlás ellenére, egyre alacsonyabb folsav- és B₁₂-vitamin-szint mérhető (24. ábra). Meg kell azonban jegyeznünk, hogy mind a folsav, mind a B₁₂-vitamin plazmában mért mennyisége a legmagasabb Hcy-szintekkel (>30 µmol/L) rendelkező csoportnál is a normál tartományba esett.

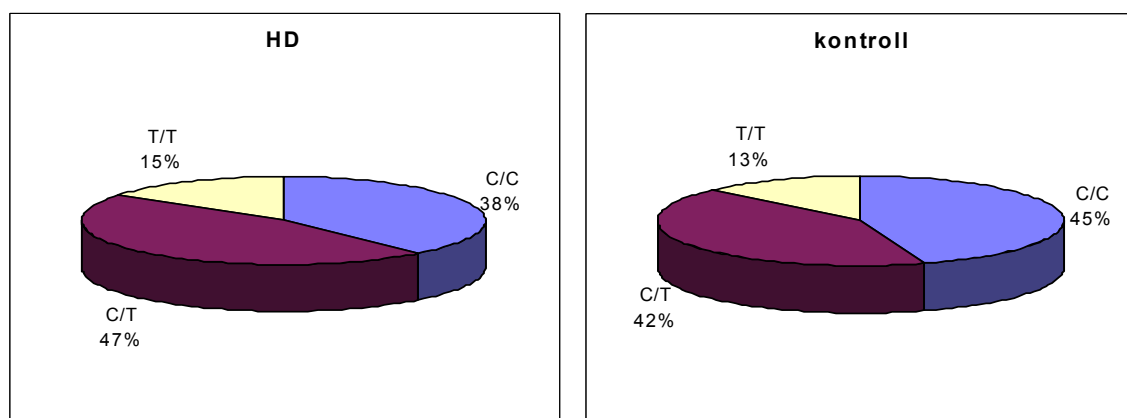


24. ábra: A plazma folsav és B₁₂-vitamin koncentrációja a homocisztein értékek függvényében.

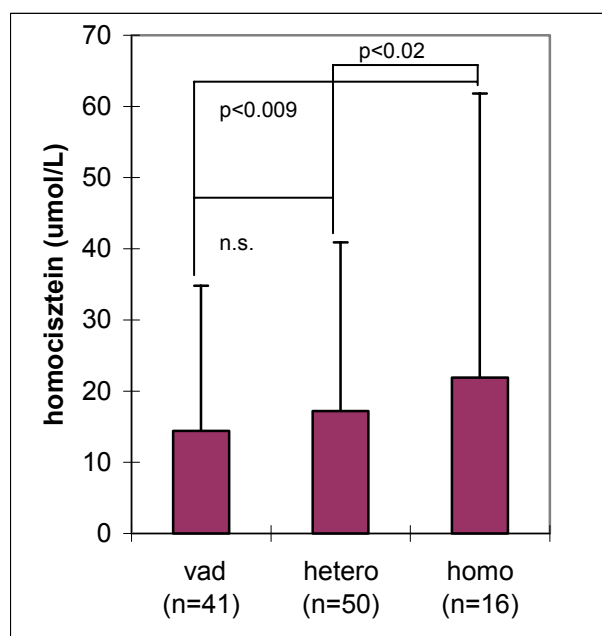
4.4.2. A MTHFR polimorfizmusa és kapcsolata a homocisztein-, a folsav-, és B₁₂-vitamin plazmaszintekkel

A továbbiakban meghatároztuk a betegekben az MTHFR C677 alléljait, melynek megoszlása, a területünkön élő kontrollszemélyekben mért eloszlással összevetve, nem

mutat szignifikáns eltérést [vad (C/C): 38% vs. 45%; heterozigóta (C/T): 47% vs. 42%; homozigóta (T/T): 15% vs. 13%] (25. ábra).



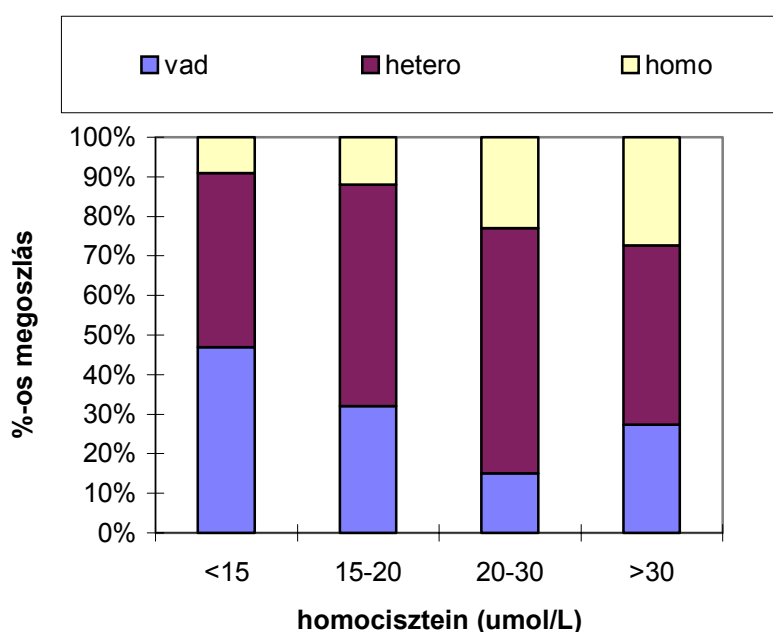
25. ábra: A metilén-tetrahidrofolát reduktáz (MTHFR) C677 termolabilis alléljének polimorfizmusa. (HD=dializált betegek, C/C=vad típus, C/T=heterozigóta típus, T/T=homozigóta típus)



26. ábra: A plazma homociszteinszintje a MTHFR C677 polimorfizmus függvényében (C/C: vad típus, C/T: heterozigóta típus, T/T: homozigóta típus).

Szoros összefüggés van azonban a Hcy-szintek és az MTHFR polimorfizmusa között: a legalacsonyabb Hcy-szintek a vad típust hordozó betegekben, míg a legmagasabb Hcy-szintek a homozigóta típust hordozó betegekben fordult elő (26. ábra).

Megállapítottuk, hogy az emelkedett Hcyszintekkel (>20 $\mu\text{mol/L}$) rendelkező betegekben a MTHFR homozigóta allélje 20–30%-os gyakorisággal fordul elő a normál Hcy-tartományban talált <10 %-os gyakorisággal szemben, azonban ebben a csoportban is a betegek többsége a vad és heterozigóta típusba tartozik (27. ábra).



27. ábra: A metilén-tetrahidrofolát reduktáz (MTHFR) C677 vad-, hetero- és homozigóta típusainak előfordulási gyakorisága a plazma homociszteinszintek függvényében.

Eredményeinket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a hosszú idejű, kisdózisú (3 mg/nap) folsavkezelés, hatásosan csökkenti a Hcy-értékeket a betegek egy részében. A folsavrezisztens betegeknek mintegy 70–80% tartozik a MTHFR hetero- vagy homozigóta polimorfját hordozók közé. Ezekben a betegekben a folsavpótlás ellenére, szignifikánsan alacsonyabb folsav- és B₁₂-vitamin-szinteket mértünk.

4.4.3. Kapcsolat a szérumban kobalt-, nikkel- és homocisztein-koncentrációk között

Ismert, hogy a veseelégtelenségben szenvedő betegek nyomelemösszetétele eltér az egészségesektől. Keveset tudunk azonban a VVE-ben szenvedő betegek kobalt- és nikkel-ellátottságáról. A homocisztein lebontásának egyik útja annak metioninná való visszaalakulása, amely folyamatban a kobalt (mint a B₁₂-vitamin központi fémionja) és a nikkel szerepet játszik.

Vizsgálatunkban meghatároztuk a szérumban kobalt- és nikkelkoncentrációkat és összevetettük a homocisztein-, a B₁₂-vitamin- és a folsav-koncentrációkkal. Külön megvizsgáltuk, hogy a MTHFR polimorfizmusa és a fémion-koncentrációk között van-e kapcsolat.

Az előző fejezetben ismertetett betegek közül véletlenszerűen választottunk ki 33 főt, akikben meghatároztuk a szérumban kobalt- és nikkelkoncentrációt. Az eredményeket 20 egészséges kontrollban mért értékekkel hasonlítottuk össze.

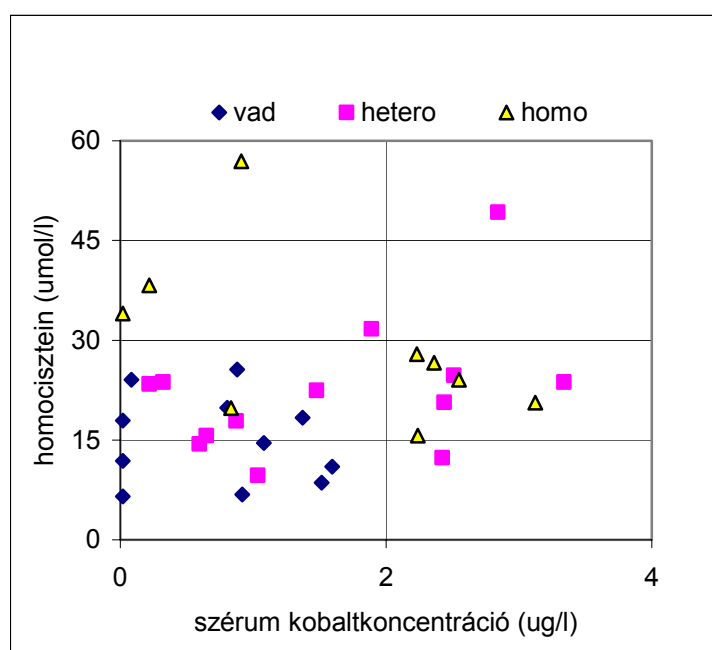
18. táblázat. A homocisztein (Hcy)-, B₁₂-vitamin (vit B₁₂)-, folsav (FA)-, kobalt (Co)- és nikkel (Ni)-koncentrációk átlag értékei a hemodializált betegekben egészséges kontrollokéval összehasonlítva.

Paraméter	kontroll (20) átlag ± SD	HD (33) átlag ± SD	p kontroll/HD
Hcy (μM)	8,9 ± 3,2	19,3 ± 11,5	0,01
Vit B ₁₂ (ng/L)	780 ± 322	696 ± 516	n.sz.
FA (μg/L)	7,3 ± 2,5	20,3 ± 26,7	0,01
Co (μg/L)	0,57 ± 0,32	1,15 ± 0,92	0,02
Ni (μg/L)	2,35 ± 2,61	11,14 ± 15,9	0,05

A 18. táblázatban bemutatott eredményekből látható, hogy a homocisztein-, a folsav-, a kobalt- és a nikkelkoncentrációk egyaránt szignifikánsan nagyobbak voltak a hemodializált betegekben, mint az egészséges kontrollokban. A B₁₂-vitamin mennyisége

alacsonyabb volt ugyan a HD betegekben, mint a kontrollokban, azonban ez a különbség matematikailag nem volt szignifikáns és minden betegben elérte a normál tartomány alsó határát. Az átlag folsav-koncentrációk a HD betegekben szignifikánsan magasabbak voltak, mint a kontrollokban.

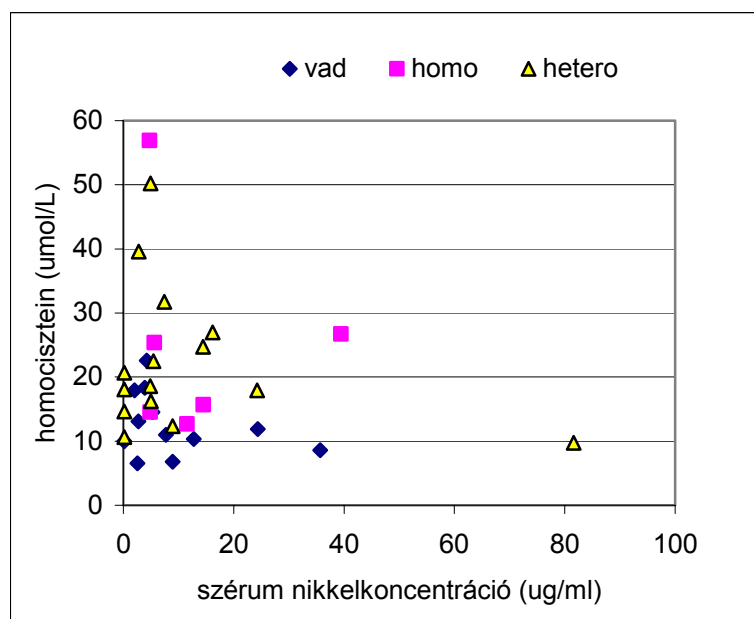
A szérumban lévő kobaltkoncentrációk függvényében ábrázolva a homocisztein-értékeket és figyelembe véve a MTHFR alléljeit a következő összefüggést tapasztaltuk (28. ábra). A MTHFR vad típusát hordozó betegek között nem találtunk olyan esetet, amikor a szérumban lévő kobaltkoncentráció értéke meghaladta volna a $2 \mu\text{g/L}$ -t, amely egyes irodalmi adatok szerint a normál tartomány felső határa. E fölötti értéket csak a MTHFR hetero- és homozigóta alléljét hordozó betegek esetében találtunk. Nem volt azonban korreláció a szérumban lévő kobaltkoncentrációk és a homocisztein-értékek között.



28. ábra. A homocisztein-koncentrációk a kobaltkoncentrációk függvényében a metilén-tetrahidrofolát reductáz alléljei szerint hemodializált betegekben.

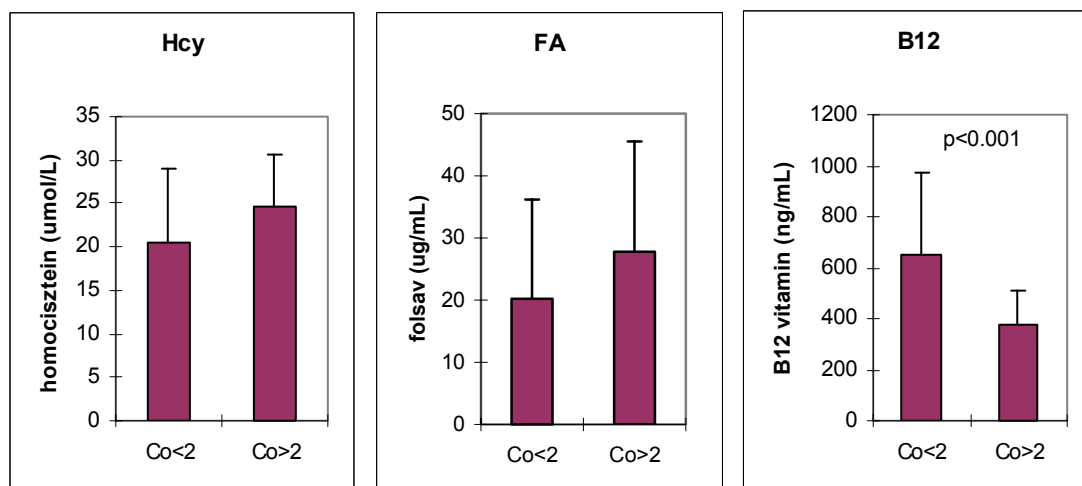
A szérumban lévő nikkel koncentrációk függvényében is ábrázoltuk a homocisztein-értékeket, azonban nem találtunk az előzőhöz hasonló kapcsolatot a szérumban lévő

koncentrációk és a MTHFR polimorfizmusa között (29. ábra). Az azonban látható, hogy a betegek több mint 50%-ában a szérumban a nikkel koncentrációk meghaladják a normál tartomány felső határának tekintett $5 \mu\text{g/L}$ értéket.



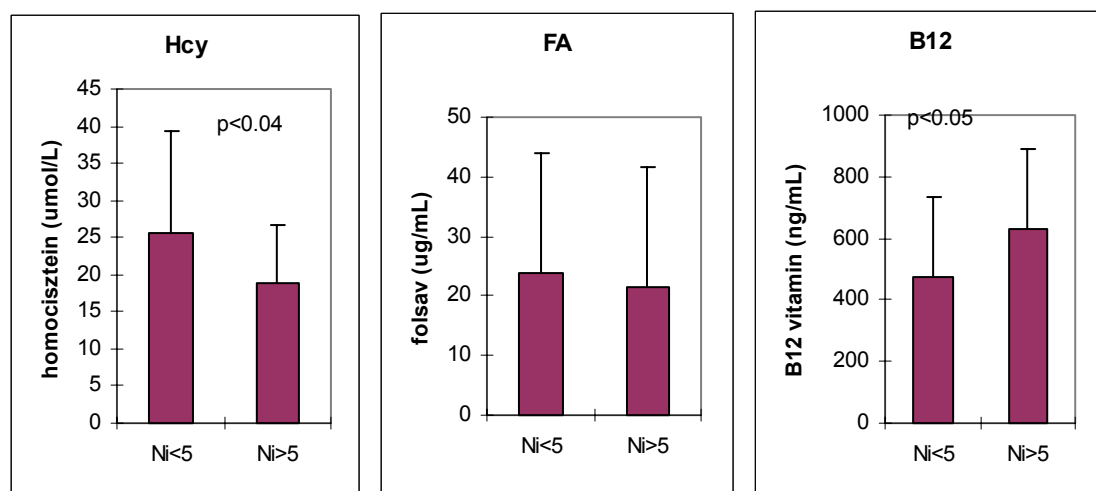
29. ábra. A homocisztein-koncentrációk a nikkelkoncentrációk függvényében a metilén-tetrahidrofolát redukáz alléljei szerint hemodializált betegekben.

A továbbiakban vizsgáltuk, hogy van-e különbség a mért paraméterekben a kobalt, illetve a nikkel normál tartományai szerint csoportosítva a betegeket. Azt találtuk, hogy a szérumban a kobalt (normál tartomány felső határa $2 \mu\text{g/L}$) függvényében sem a Hcy-, sem a folsavértékek nem különböznek egymástól a két csoportban. Ezzel szemben a B_{12} -vitamin szignifikánsan kisebb, a nikkel pedig szignifikánsan nagyobb volt azokban a betegekben, akikben a szérumban a kobaltkoncentráció nagyobb volt $2 \mu\text{g/L}$ értéknél (30. ábra).



30. ábra. A mért paraméterek alakulása a kobalt koncentráció függvényében a hemodializált betegekben. A 2 $\mu\text{g/L}$ alatti szérumbakont koncentrációt tekintettük a normál tartomány felső határának.

A nikkelt koncentrációk szerint (5 $\mu\text{g/L}$ értéket tekintve a normál tartomány felső határának) a következő eredményeket kaptuk (31. ábra). Szignifikánsan kisebb volt a homocisztein és szignifikánsan nagyobb a B₁₂-vitamin azokban a betegekben, akikben a szérumbakont koncentráció magasabb volt a normál tartomány felső határánál.



31. ábra. A mért paraméterek alakulása a nikkelt koncentráció függvényében hemodializált betegekben. Az 5 $\mu\text{g/L}$ alatti szérumbakont koncentrációt tekintettük a normál tartomány felső határának.

Eredményeinket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a kobalt és nikkel szérumbeli koncentrációja összefüggést mutat a homocisztein-értékekkel. Úgy tűnik, hogy a nikkel-hiány kedvezőtlenül hat a metionin-homocisztein metabolizmusra. Ezen összefüggés tisztázására további vizsgálatokat tervezünk.

5. MEGBESZÉLÉS

A krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegek életkilátásait a renális alapbetegség és a társult szövődmények határozzák meg. Az utóbbi évtizedekben az egyre korszerűbb hemodialízis kezelés alkalmazása sokat javított a betegek életkilátásain, de a VVE-ben továbbra is a cardiovascularis szövődmények képezik a vezető halálokokat. A dializált betegek felgyorsult atherosclerosisában a klasszikus rizikótényezők mellett, a veseelégtelenségnek, sőt a dialízissel összefüggő tényezőknek is szerepe van. Munkánkban e komplex folyamatban szerepet betöltő néhány tényezőt és folyamatot vizsgáltuk.

5.1. A lipid anyagcsere zavarai

5.1.1. Lipid abnormalitások veseelégtelenségben

A végstádiumú vesebetegekben tapasztalható lipid anyagcserezavar a veseelégtelenséget kiváltó betegségtől nagyrészt független. Általános megfigyelés, amelyet saját vizsgálati eredményeink is megerősítenek, hogy a HD betegekben elsősorban a szérum TG-értékei emelkednek meg, míg a koleszterinszintek közel a normál tartományba esnek (39, 45, 154). Urémiában a magas TG-koncentrációk kialakulásában a lipoprotein lipáz (LPL) enzim aktivitásának csökkenése (pl. az urémiás toxinok hatására) állhat (57, 143). A LPL aktivitását az apoCII fokozza, míg az apoCIII gátolja (64, 176), így az apoCII/apoCIII arány csökkenése a LPL aktivitásának csökkenését eredményezi. Urémiában az apoCIII felszaporodását írták le (8, 215), amelynek szerepe lehet a magas TG-szint fenntartásában. Urémiás betegekben leírták a LCAT enzim aktivitásának csökkenését is (76, 77, 88). Egészségesekben a VLDL és a TG magas szintjei fokozzák a LCAT aktivitását, azonban ez urémiában nem következik be, mivel a VLDL csökkenti a saját clearance-ét. A LCAT

aktivitásának csökkenése a perifériás sejtekből a plazmába és a májba irányuló reverz koleszterintranszport gátlásához vezet (88). Külön figyelmet érdemel az, hogy a glomerulonephritises betegcsoportunkban igen magas TG-szinteket mértünk, annak ellenére, hogy betegeink nem részesültek immunszuppresszív kezelésben, amelyről ismert, hogy fokozza a lipid abnormalitást.

Az irodalmi adatokkal egyezően mi is az antiatherogén HDL koncentrációjának csökkenését észleltük. Krónikus veseelégtelenségben azonban, nemcsak a HDL mennyisége csökken, hanem az összetétele is megváltozik. A HDL-en belül csökken az apoA₁ és apoA₂ és nő az apoCIII koncentrációja. Ezek a szerkezeti változások lassítják a VLDL-LDL átalakulás folyamatát (147)

5.1.2. Az LDL metabolizmusa, az LDL receptorok működésének zavarai

Az LDL mennyiségének növekedése, illetve a HDL/LDL arány csökkenése az atherogenezisben központi szerepet játszik. Egészséges emberek monocita-makrofág típusú sejtjei sejtfelszínükön specifikus és scavenger LDL receptorokat egyaránt tartalmaznak (35, 38). A specifikus receptorok a natív LDL-t, míg a scavenger receptorok az oxidatív-módosított LDL részecskéket képesek megkötni. A natív LDL specifikus receptorhoz való kapcsolódást követően az LDL részecske internalizálódik és degradálódik, amely folyamat az endogén koleszterinszintézis gátlását eredményezi a HMG-CoA reductáz enzim gátlásán keresztül (38). A scavenger receptorok a monocita-makrofág típusú sejteken fejlődnek ki (35), a módosított LDL részecske internalizációját azonban nem követi a HMG-CoA reductáz gátlása és az endogén koleszterinszintézis leállítása. Ez a zsírban dús ún. „habos-sejtek” (foam-cell) képződéséhez vezet.

Az LDL mennyiségének növekedése, a HDL/LDL arány csökkenése az atherogenezisben központi szerepet játszik. Egészséges emberek monocita-makrofág típusú sejtjei sejtfelszínükön specifikus és scavenger LDL receptorokat egyaránt tartalmaznak (35, 38). A specifikus receptorok a natív LDL-t, míg a scavenger receptorok a módosított LDL részecskéket képesek megkötni.

Vizsgálati rendszerünkben a sejteket HD betegek véréből izoláltuk és egészséges kontrollok LDL-jének jelenlétében vizsgáltuk a specifikus és a scavenger LDL receptor expressziót, a natív és acetilált LDL megkötését és lebontását. Megállapítottuk, hogy a HD betegek sejtjeiben az LDL receptorok működése megváltozik. Legfontosabb különbség, hogy a HD betegekben a specifikus LDL receptor expresszió kisebb, míg a scavenger LDL receptor expresszió nagyobb, mint a kontrollsejtek felszínén. Lecsökken a natív LDL kötődési sebessége (V_{max} : $107,8 \pm 13,6$ vs. $209,7 \pm 53,5$ ng/ 10^6 sejt), a degradáció sebessége, azonban a kötési állandó (K_d) változatlan marad. Eredményeink összhangban állnak a korábban HD betegek véréből izolált PBMC sejteken kimutatott csökkent specifikus LDL receptor mRNS szintézissel (160). Ugyanakkor az acLDL scavenger receptorhoz való kötődési sebessége extrém mértékben megnő (V_{max} : 1312 ± 598 vs. $42 \pm 5,5$ ng/ 10^6 sejt), megnő a kötési állandó és a degradáció sebessége is. Fokozott scavenger LDL receptor mRNS szintézist írtak le Ando és mtsai HD betegek véréből izolált monocita/makrofág sejtekben (1). Ugyanez a munkacsoport bizonyította, hogy a HD betegek plazmája tartalmaz olyan molekulát (urémiás toxint), amely a scavenger LDL receptor szintézisének fokozódásához vezet (2). Az urémiás állapot szerepét a megváltozott LDL metabolizmusban alátámasztja, hogy vese-transzplantációt követően a specifikus LDL receptor expresszió normalizálódik (160).

A specifikus és scavenger receptorok funkcionális vizsgálata során további eltéréseket találtunk a betegek és kontrollok között. A HD betegek és kontrollok nyugvó sejtjeiben a C¹⁴-koleszterin beépülés sebességében (azaz a koleszterin szintézisében) nem találtunk lényeges különbséget, azonban LDL hozzáadását követően a betegek monocitáiban nem következett be a koleszterin szintézisének gátlása. Továbbá, az apoE kiáramlás, amelyet a módosított LDL scavenger receptorhoz való kötődése indukál, szignifikánsan alacsonyabb a HD betegekben, mint a kontrollokban. Az apoE felelős a koleszterin makrofágokból való leadásáért, így csökkent termelődése a sejtek koleszterinben való feldúsulását, azaz a foam-sejt-képződés fokozódását elősegíti. Ezekben a károsodásokban mind a specifikus és scavenger LDL receptor működésében bekövetkező zavarok, amit jelen munkánk is igazolt, mind a HD betegek keringésében található LDL partikulumok megváltozása szerepet játszik. Kimutatták ugyanis, hogy a HD betegek véréből izolált LDL metabolizmusa eltér a kontrollokétól, függetlenül attól, hogy a metabolizmus a specifikus vagy a scavenger LDL receptoron keresztül megy végbe (163).

Összefoglalva, a scavenger LDL receptor expresszió fokozódása, az apoE-kiáramlás csökkenése, a „habos-sejt” képződés fokozódása figyelhető meg a HD betegek monocitáiban. A csökkent apoE-termelés és -kiáramlás azt jelzi, hogy a scavenger receptor működésében is károsodás van, nemcsak a specifikus receptorokéban. E folyamatok tisztázására további vizsgálatok szükségesek. Mindezen eltérések, a lipid abnormalitásokkal együtt hozzájárulhatnak a HD betegekben az atherosclerosist előidéző folyamatok felgyorsulásához.

5.1.3. A lipidparaméterek, a lipidek zsírsavösszetételének változása és a neutrofilek oxidációs robbanása

A plazmalipidek és lipoproteinek zsírsavösszetétele megváltozik hyperlipidaemiákban és cardiovascularis megbetegedésekben. Közös változás ezekben az esetekben a többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFA) arányának csökkenése és az egyszeresen telítetlen zsírsavak (MUFA), többek között a palmitoleinsav (C16:1) arányának, a hyperlipidaemia fokozódásával való növekedése (86, 144, 184, 185).

HD betegekben és a még prädialízis stádiumú vesebetegekben meghatároztuk a plazma szabadzsírsav, és totál lipid extraktumának zsírsavösszetételét. Az eredményeket egészséges kontrollokéval hasonlítottuk össze, azzal a céllal, hogy megállapítsuk van-e olyan eltérés a zsírsavak összetételében, amely magyarázhatja az atherosclerosisra való fokozott hajlamot. Megállapítottuk, hogy a veseelégtelenség súlyosbodása befolyásolja a plazma szabad és totál lipid extraktumának zsírsavösszetételét. Míg a predialízis stádiumban lévő betegekben nem találtunk szignifikáns eltérést a kontrollokéhoz képest, addig a végstádiumú veseelégtelenségben szenvedő, hemodialízis programban kezelt betegekben általános tendencia a többszörösen telítetlen zsírsavak relatív mennyiségének csökkenése volt. A telített és az egyszeresen telítetlen zsírsavak arányának alakulása összefüggést mutatott a hyperlipidaemia mértékével és a koszorúérbetegség fennállásával. A többszörösen telítetlen zsírsavak közül az esszenciális linoleinsav és linolénsav csökkent mennyisége azonban minden betegben fennállt. Az esszenciális zsírsavak hiánya magyarázhatja a belőlük képződött arachidonsav csökkent mennyiségét. Hasonló eltérést írtak le IgA nephropathiás betegekben is (97).

Az esszenciális linoleinsav csökkent mennyisége részben magyarázhatja a csökkent arachidonsav mennyiségét. Az arachidonsav-hiány okai között, azonban, az esszenciális prekursorok hiánya mellett, számolni lehet azon enzimek aktivitásának változásával (pl.

urémiás toxinok hatására), amelyek az esszenciális zsírsavakból elongációval és deszaturációval az arachidonsavat előállítják. E feltételezés magyarázatára további kísérletek elvégzése szükséges.

Az említett zsírsav eltérésekre nem ad magyarázatot az urémiás betegek étrendi megszorítása, hiszen az elsősorban a prédialízis stádiumú betegekre vonatkozik, akikben nem találtunk szignifikáns eltérést a kontrollcsoportéhoz viszonyítva.

Mindenesetre, a szabadzsírsav-frakcióban talált eltéréseknek következménye lehet a sejtfunkciók megváltozása. Ismeretes ugyanis, hogy a zsírsavak önmagukban (szabad zsírsavak) vagy trigliceridbe beépülve, a szénláncuk hosszától és telítettségük mértékétől függően, számos közvetlen hatást fejtenek ki a vérkeringésben található sejtekre. A humán neutrofilekben pl. képesek oxidációs robbanást kiváltani. Ez a folyamat lehet kalciumfüggő [pl. a rövid szénláncú telített laurinsav, mirisztinsav által kiváltott O_2^- termelés neutrofilekben a kalcium koncentráció növelésével kivédhető (197)] vagy attól független [pl. cisz-telítetlen zsírsavak, oleinsav, AA által kiváltott O_2^- termelést kalcium hiánya vagy jelenléte alig befolyásolta (50, 197, 223)]. Az AA stimulálja az O_2^- termelést, míg az EPA és DHA gátló hatású a humán neutrofilekben. Az EPA és DHA okozta gátlás indometacinnal kivédhető volt, de a NO inhibitor L-NMMA nem volt hatással, ami alapján az feltételezhető, hogy az EPA és DHA a ciklooxygenáz úton át fejt ki hatását (50).

Humán adherens monocitákon PMA és DAG stimulációt követően AA-t adva azt találták, hogy hatása függ az alkalmazott koncentrációtól (110). Kis koncentrációban (3 nM) stimuláló, nagy koncentrációban (30 μ M) gátló hatású volt. Mindkét koncentrációnál a zsírsav a PKC foszforilációját és a sejtmembránba történő transzlokációját módosította, amely befolyásolta a NADPH oxidáz citoszolikus komponensének transzlokációját és ezen keresztül a O_2^- termelődését (110).

A zsírsavak megváltoztatják a T-limfociták proliferációs képességét is. A tímusz limfociták citokin (IL-1) kiváltotta proliferációját in vitro a PUFA telítetlensége mértékétől és koncentrációjától függő módon gátolja (169). A gátlás sorrendje: palmitinsav<linoleinsav<linolénsav<EPA<AA. (169). Az EPA és DHA (n-3 PUFA) immunszuppresszív hatással rendelkezik, gátolja a limfociták proliferációját, citokin termelését stb. (162, 199). Ezzel függ össze az a megfigyelés, hogy a halolaj kedvező hatású, pl. rheumatoid arthritisben (41, 146). Az n-3 PUFA-k limfocitákra kifejtett hatásának mechanizmusa nem teljesen ismert. Lehetséges, hogy hatásukat a jelátviteli kaszkád egyes tagjaira való hatásával vagy kölcsönhatásával fejtik ki. Erre utal az a megfigyelés, hogy az EPA és DHA gátolja Jurkat T-sejtekben az anti-CD3 és PMA stimulálta ERK1/2 foszforilációját (60). Yang és mtsai megállapították, hogy az EPA és DHA a carotis artéria endothel sejteiben gátolja a MAP kináz aktiválását (224).

A táplálékban található zsírsavak trigliceridek formájában kerülnek a szervezetbe. Calder és mtsai ebből kiindulva vizsgálták a trigliceridek hatását a limfocitákra (42). Megállapították, hogy a limfocitatenyészet jelentős lipoprotein lipáz aktivitást mutat, amely valószínű, hogy a kontaminációként jelen levő monocita-típusú sejteknek tulajdonítható. A sejtek azokat a triglicerideket hidrolizálták leggyorsabban, amelyek PUFA-t tartalmaztak, szemben az SFA-val vagy MUFA-val. Jelzett triolein és trilinolein-glicerint használva megállapították, hogy mindkét triglicerid hidrolízise bekövetkezik, a sejtek mind a zsírsavakat, mint a glicerint felhasználják, beépítik. A TG-ek, amelyek PUFA-t tartalmaznak, koncentráció- és időfüggő módon gátolták a limfociták Con A stimulálta proliferációját, ezzel szemben az SFA-t és MUFA-t tartalmazó TG-ek nem befolyásolták számottevően azt (42).

A vizsgálatainkban tapasztalt PUFA-hiány egyik lehetséges magyarázata a fokozott lipidperoxidációval kapcsolatba hozható. A VVE-ben ugyanis jól ismert a lipidperoxidáció fokozódása, amely a PUFA-k oxidatív módosulásának következménye. A fokozott lipidperoxidációt jól bizonyítja a saját vizsgálatainkban is tapasztalt lipid hidroperoxidok felszaporodása. A fokozott lipidperoxidáció lehetséges szerepét a PUFA-hiány kialakulásában alátámasztja az a megállapításunk, hogy a neutrofilek O_2^- termelése és a plazma szabadzsírsav-frakciójában található PUFA mennyisége között negatív kapcsolat áll fenn. Az alapszinten megemelkedett O_2^- termelés a neutrofilek funkcionális károsodásához vezet (72, 142), amelynek további következményei vannak a vesebetegek esetében is.

Ismert, hogy a krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegek fokozottan érzékenyek a fertőzésekkel szemben. A hemodializált betegekben ezen komplikációk kialakulásában a lipid metabolizmus károsodása (82, 184) és a fokozott oxidációs stressz alapvető szerepet játszanak (218). Ez utóbbiban, pedig a neutrofil granulociták alapszinten megemelkedett oxidációs folyamatai is szerepet játszhatnak (95, 206, 218).

Felmerült a kérdés, hogy VVE-ben van-e kapcsolat a neutrofilek fokozott O_2^- termelése és a lipid paraméterek között. Az ép veseműködéssel rendelkező dyslipidaemiás betegekben végzett korábbi vizsgálatok arra utalnak, hogy a szérum Chol- és/vagy TG-szintjének növekedésével az oxidatív stressz fokozódik (95, 122, 145). A hyperlipidaemiás betegekben pozitív korrelációt találtak a plazma TG-szintje a totál Chol-szint és a neutrofilek O_2^- termelése között (5), ami azt jelzi, hogy a neutrofilek oxidációs robbanásának fokozódásában mind az emelkedett Chol-, mind a TG-szintnek szerepe lehet.

Mérési eredményeink szerint ez az összefüggés VVE-ben szenvedő betegekben is fennáll, mivel a neutrofilek O_2^- termelése, a plazma Chol- és TG-szintje között pozitív korrelációt kaptunk. Ez alátámasztja, hogy a VVE-ben szenvedő betegek neutrofiljeinek

alapszinten fokozott O_2^- termeléséért, legalábbis részben, a lipidértékekben bekövetkező változásoknak is szerepe lehet.

Nem ismeretes ugyan az a mechanizmus, amely a neutrofilek O_2^- termelésének fokozódásához vezet a Chol/TG-szint emelkedése következtében, feltételezik azonban, hogy a lipidekben található zsírsavaknak, ezeken belül a többszörösen telítetlen zsírsavaknak, e folyamatban iniciáló szerepe van. Leírták, hogy az n-6 PUFA-k közül néhány, in vitro, fokozza (arachidonsav > linoleinsav > linolénsav > olajsav) a neutrofilek O_2^- termelését (12, 50, 87). Ezzel szemben a halolajban található n-3 PUFA-k, EPA és DHA, in vitro és in vivo, gátolja azt (50, 123).

Függetlenül attól, hogy a PUFA-k milyen mechanizmus szerint hatnak a neutrofilek oxidációs robbanására, a két paraméter között egy másik összefüggés is van: a reaktív oxigéngyökök termelődése következtében létrejövő lipidperoxidációban a PUFA a fő célpont. A kimutatott negatív korreláció a plazma PUFA mennyisége és a neutrofilek O_2^- termelése között mind a HD, mind a hyperlipidaemiás beteg csoportban arra utal, hogy a PUFA-hiány lehet a fokozott lipidperoxidáció következménye is.

A hyperlipidaemia fokozódásával a plazmazsírsav-összetételében a PUFA-csökkenés mellett bekövetkező másik jellegzetes változás, az egyszerűen telítetlen zsírsavak, ezen belül a palmitoleinsav mennyiségének megnövekedése (97, 185). Ugyanezt a változást megfigyelhettük a HD betegekben is.

A két vizsgált csoport összehasonlítása során azonban több különbséget találtunk: pl. a HD betegeknél a palmitoleinsav mennyisége nem korrelál sem a Chol-, sem a TG-szinttel, sem a neutrofilek O_2^- termelésével, ellentétben a mérsékelt hyperlipidaemiás kontrollcsoporttal. E különbség alapján feltételezhetjük, hogy a HD betegekben más tényezőknek is szerepe lehet a palmitoleinsav mennyiségének változásában, mint amivel önmagában a

szérum lipid értékeinek növekedése mellett számolni lehet. Másik lényeges eltérés, hogy a HD betegekben a neutrofilek O_2^- termelése és a plazma TBARS-szintje nagyobb, mint a mérsékelt hyperlipidaemiás kontrollcsoporté. Ez összefüggésben lehet azzal, hogy a HD betegekben, a nem enzimatis antioxiáns védekező mechanizmusban szerepet játszó E-vitamin mennyisége szignifikánsan kisebb, mint a kontrollcsoportban.

A HD betegek neutrofileinek, a hasonló lipid paraméterekkel rendelkező kontrollcsoporthoz képest fokozott O_2^- termelése, pedig azt jelzi, hogy ezeknél a betegeknél a neutrofilek aktiválásához a lipid szintek emelkedésén kívül más a plazmában jelenlevő anyagok, pl. urémiás toxinok, is hozzájárulhatnak.

Kevés figyelmet fordítunk napjainkban is a HD betegek étrendjének zsírsavakkal való kiegészítésére, annak ellenére, hogy az n-3-PUFA-k (EPA, DHA) kedvező hatásairól egyre több közlemény számol be (180, 184). A megjelent tanulmányok eredményei felvetik a többszörösen telítetlen zsírsavak (elsősorban a hosszú szénláncú EPA és DHA) előnyös hatását a veseelégtelenséghez társult dyslipidaemia alakulására és a veseelégtelenség progressziójának lassítására (3, 43, 63, 84, 111, 117, 129, 178).

Cappelli és mtsai egy éven át napi 3,4 g n-3 PUFA-t alkalmaztak konzervatív antiurémiás kezelésben részesülő betegeiknek (43). A kontrollcsoport a vizsgálat kezdetekor minden laboratóriumi paraméterben megegyezett a PUFA kiegészítésben részesülő csoport tagjaival. 12 hónap múlva a következő eredményeket kapták: a PUFA pótlásban részesülő betegekben csökkent a szérum TG, az apoB, a cTNF-alfa mennyisége (a vizsgálat indításakor mind a normál tartomány feletti érték volt). A spontán IL-1 béta, cIL-2 és sTNF-alfa szintek is csökkentek, bár ezek a vizsgálat elkezdésekor is a normál tartományban voltak. A vizsgálat során a PUFA-t nem kapó kontrollcsoportban tapasztalt progresszív vesefunkció romlás a PUFA-t nem kapó csoportban nem következett be. A

PUFA-k alkalmazása tehát kedvezően hatott a lipidanyagcserére és az immunrendszerre, és csökkentette a veseelégtelenség progresszióját. (43).

Lefkowitz és mtsai (117) az n-3 PUFA étrendhez kiegészítőként adott hatását az arachidonsav metabolizmusra vizsgálták. Az arachidonátok metabolizmusában egy upreguláció figyelhető meg krónikus veseelégtelenségben. Vizsgálataikban megerősítik a PUFA adás előnyeit, elsősorban IgA nephropathiában.

Manitius és munkatársai (129) a PUFA-k hatását primer glomerulopátiákban vizsgálta. Betegeik proteinuriások voltak, de még normális vesefunkciókkal rendelkeztek. 3 hónapon át napi 1650 mg PUFA-t (18% EPA, 22,5% DHA) adtak. A halolaj terápia végén, sem a proteinürítés, sem a kreatinin clearance nem változott. Megnőtt azonban a szérumban a HDL és arachidonsav koncentráció, csökkent az LDL koncentráció és csökkent a vizeletben tubulointerstitium károsodását jelző NAGase kiválasztás. Az eredmények arra utalnak, hogy a halolaj alkalmazása előnyös hatású a renális tubuláris sejtekre valamint a lipidek és az arachidonsav metabolizmusára.

Khajehdehi (111) randomizált, placebo-kontrollált klinikai vizsgálatban a halolaj, a kukoricaolaj és szezámolaj hatását hasonlította össze 60 HD programban kezelt betegben. A 2 hónapos zsírsavpótlás után a szérum HDL nőtt, az LDL csökkent a halolajat és kukoricaolajat kapók esetében. A TG-szint csak a halolajat kapókban csökkent. Kedvezően alakult az LDL/HDL, a Chol/HDL és a TG/HDL arány mind a két esetben. A szezámolajnak a fenti paraméterekre nem volt hatása. Ennek alapján azt a következtetést vonja le, hogy a HD programban kezelt betegekben az étrend halolajjal való kiegészítése kedvező hatású a lipid-paraméterek alakulására, és amely a lipidszintek csökkentésének egy biztonságos módszerét jelentheti.

Donadio (63) klinikai tanulmányok adatait összegezve megállapította, hogy az n-3 PUFA-k több előnyös hatást is kifejtenek veseelégtelenségben, sőt vesetranszplantációt követően is, amikor pl. csökkentik a cyclosporin A toxicitását.

Schmitz és mtsai (178) a halolaj hatását egy kettős-vak, randomizált prospektív tanulmányban vizsgálták a hemodialízis során vérnyerésre használatos műér (politetrafluoroetilén érgraft) által kiváltott thrombotikus elzáródásra vonatkozóan. 24 beteget két csoportra osztottak, a betegek fele napi 4000 mg halolajat (n-3 EPA és DHA, 80%), a betegek másik fele, pedig napi 4000 mg kontroll olajat kapott, amelyek mindegyike 2 mg/g E-vitamint is tartalmaztak. Eredményeik szerint a graft túlélés (a műér „nyitva maradása”) szignifikánsan nagyobb volt a halolaj-terápiában részesülőkben, mint a korábbi azonos időszakra vonatkoztatott átlagérték és az azonos időszakban egyéb olaj-készítményt kapó betegekben. Ezen túlmenően szignifikánsan csökkent a szisztolés és diasztolés vérnyomásérték a halolajkezelt csoportban, továbbá szignifikáns eltérés következett be a thrombocyták plazma membrán zsírsavösszetételében (AA< kontroll, EPA DPA DHA>kontroll). Kovariancia analízis elvégzése után megállapítható volt, hogy a különbségek a halolaj adásának tulajdoníthatók. A halolaj kedvezőnek bizonyult a műér thrombotikus elzáródása szempontjából is (178).

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a zsírsavak fontos biológiai hatásokkal rendelkeznek VVE-ben szenvedő betegekben is. Saját vizsgálatunk szerint a mérsékelt hyperlipidaemiás betegekhez hasonlóan a HD betegekben is csökken a PUFA-k relatív mennyisége a plazma szabadzsírsav-frakciójában és annak totál lipidextraktumában egyaránt. Az SFA/MUFA arány alakulását befolyásolja a hyperlipidaemia mértéke és a veseelégtelenséghez szövődményként társult cardiovascularis betegség fennállása. Korrelációt találtunk a neutrofilek alapoxidációja, a plazmalipidek PUFA-tartalma, a Chol-

és a TG-szint között. A zsírsav anyagcserében bekövetkező változások azonban más típusúak a HD betegeknél, mint a csupán hyperlipidaemiás betegeknél, amit a palmitoleinsav esetében talált eltérések is bizonyítanak. További eltérés, hogy szignifikánsan nagyobbak adódtak a HD betegeknél a lipidperoxidáció termékeinek mennyisége – ebben a csökkent antioxidáns kapacitásnak lehet szerepe – és a neutrofilek O_2^- termelése. Ez utóbbi azt jelzi, hogy a Chol- és TG-szint emelkedése mellett más, oxidatív stresszt kiváltó tényezők hatásával is számolni kell, mint pl. az urémiás toxinok és maga a hemodialízis folyamata.

5.1.4. Az antioxidáns rendszer veseelégtelenségben

A fokozott oxidatív stressz, amely a hemodialízis programban kezelt betegeknél sokoldalúan bizonyított, kivédése szempontjából az enzimatis és a nem-enzimatis antioxidáns rendszerek egyensúlya alapvető fontosságú.

Ezen rendszereknek – az oxidatív stressz elleni védekezésben – az egyik feladata a többszörösen telítetlen zsírsavak peroxidációtól való védelme, amelyhez a szervezet megfelelő E-vitamin-ellátása nélkülözhetetlen. Ahhoz, hogy az E-vitamin aktív formában álljon rendelkezésre, kellő mennyiségű C-vitaminra is szükség van. A C-vitamin képes az E-vitamin-gyököt redukálni. Bemutatott eredményeink egyértelműen arra utalnak, hogy a hemodialízis programban kezelt végstádiumú vesebetegekben sem az E-vitamin-ellátottság, sem az újonnan felfedezett HDL-hez kötött paraoxonáz aktivitás nem megfelelő.

A természetes eredetű E-vitamin az egyik legfontosabb ma ismert anyag, amely a telítetlen zsírsavakat képes megvédeni a peroxidációtól a sejtekben, az extracelluláris térben és az LDL-ben egyaránt (91, 106). Hatásmechanizmusa azon alapul, hogy az E-

vitamin a bármilyen forrásból (aktivált neutrofilek, monociták, vörösvérsejtek stb.) származó hidroxil- és perhidroxil gyökkel sokkal gyorsabban reagál, mint a telítetlen zsírsavak vagy a proteinek (91). A redox-láncban az E-vitamin az első, amelyet a C-vitamin – a C-vitamint, pedig a tioltartalmú vegyületek (pl. glutation) – képes a nem-gyökös, redukált állapotba visszaalakítani (91).

A HD betegekben a lipidekre normalizált szignifikánsan alacsony E-vitamin-szint, melyet jelen munkánk is illusztrál, alacsony szabad SH-tartalommal együtt járva (74, 200) minden bizonnyal hozzájárul ezen betegekben a fokozott oxidatív stresszhez és ezen keresztül pedig a felgyorsult atherosclerosisishoz.

Az E-vitamin szupplementáció kedvező hatásait krónikus vesebetegekben több tanulmány is bemutatja. Islam és mtsai (101) az E-vitamin hatását vizsgálták az LDL oxidatív károsodással szembeni érzékenységére HD és PD kezelt betegekben. A betegek 12 hétig, napi 800 IU egységben kaptak E-vitamint. Megállapították, hogy az E-vitamin-kezelés nem befolyásolta a szérum lipidértékeit és a lipidprofil alakulását. Szignifikáns változás következett be azonban a szérum lipidértékekre normalizált E-vitamin-koncentrációkban a HD és PD betegekben egyaránt. Szignifikáns és pozitív korrelációt mutattak ki a plazma lipidre korrigált E-vitamin és az LDL lag time értéke között, azaz az E-vitamin-adás, előnyösnek bizonyult mind a HD-, mind a PD-kezelt vesebetegek esetében (101).

Hasonlóan kedvező hatásokról számolt be több munkacsoport E-vitaminnal fedett dializáló membránok alkalmazása során (40, 73, 74, 153, 203).

Az E-vitaminnak az antioxidáns hatása mellett membránstabilizáló hatása is van. Az E-vitamin, pl. részt vesz a neutrofil-endotélsejt adherencia szabályozásában, ugyanis up-regulálja a CD11b/CD18 sejt felszíni markereket, a protein kináz C aktivitásának

gátlásán keresztül (225). Az E-vitamin adásával az LDL lipidperoxidációja in vitro és in vivo egyaránt csökkenthető (18), valamint a szérum lipidek többszörösen telítetlen zsírsav-tartalma is stabilizálható, a lipidperoxidáció egyidejű csökkentése mellett (74).

Mindezek tükrében az E-vitamin-pótlás szükségessége a HD betegeknél egyre inkább bizonyítottnak tűnik.

Az antioxidáns rendszer egy másik általunk vizsgált tagja a paraoxonáz enzim, amely ugyancsak az LDL-t védi a lipidperoxidációtól. Megállapítottuk, hogy a paraoxonáz aktivitása is csökkent a HD betegeknél. Ez a csökkent aktivitás nem az alacsony HDL-koncentráció következménye, hiszen a HDL-re, és az apoA₁-re normalizált PON-aktivitás is szignifikánsan alacsony a betegeknél. Ez azt a lehetőséget veti fel, hogy az urémiás toxinok, sok más enzimhez hasonlóan, a PON-1 aktivitását is csökkentik. Ezt a feltételezést látszik igazolni az is, hogy a vesetranszplantációt követően a normalizálódó vesefunkciókkal együtt a HDL-kötött paraoxonáz aktivitás emelkedése is megfigyelhető, bár az továbbra is a kontrollokban mért érték alatt marad.

A PON-1-aktivitás csökkenése megfigyelhető myocardium infarctus után (137), hyperlipidaemiás betegeknél (157), II. típusú diabetes mellitusban (20), Alzheimer-kórban és vasculáris demenciákban is (155, 156). Megállapítható volt, hogy a hyperlipidaemiás betegeknél Gemfibrozil kezeléssel szignifikánsan növelhető a PON-1 aktivitás (20, 157), míg Simvastatin rövid idejű adását követően semmilyen pozitív irányú változás a PON-1-aktivitásban nem következett be (19). Megjegyezzük, hogy mindkét kezelés, kedvezően hatott a szérum lipidparamétereire.

A PON-1 általános antioxidáns tulajdonságát támasztja alá, hogy a hyperlipidaemiás betegek izolált sejtjeiben negatív kapcsolat figyelhető meg a limfociták

oxidatív stressz indukálta DNS-károsodásának mértéke és a szérum PON-1-aktivitása között (92, 93).

Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a hemodialízis programban kezelt betegekben az általunk vizsgált két antioxidáns rendszer (a nem-enzimatis E-vitamin ellátottság és a HDL-kötött paraoxonáz enzim aktivitás) működése nem megfelelő.

5.2. A neutrofilek intracelluláris szabadkalcium-szintjét meghatározó tényezők

Az intracelluláris szabadkalcium-szint $[Ca^{2+}]_i$ változása fontos másodlagos hírvivő a sejtekben. A kalciumfüggő jelátviteli mechanizmusok normális működéséhez alapvetően fontos, hogy a nyugvó sejtekben a $[Ca^{2+}]_i$ alacsony szinten (<100 uM) legyen. Minden olyan paraméter, amely a $[Ca^{2+}]_i$ emelkedését váltja ki a nyugvó sejtekben, csökkenti azok stimulációt követő reaktivitását (65, 118, 209).

Az erythropoietinről, amely az erythropoesis egyik fontos szabályozója, kimutatták, hogy bizonyos sejtekben befolyásolja a $[Ca^{2+}]_i$ -szinteket (140, 148, 198). Urémiás betegekben három hónapos kezelés után, pl. normalizálta a trombocitákban az eredetileg magas $[Ca^{2+}]_i$ -szinteket (67).

Kísérleti eredményeink szerint az erythropoietin kezelés nemcsak a trombociták $[Ca^{2+}]_i$ -szintjére, hanem a neutrofilekére is hat. A HD betegek egy részében, a mért magas $[Ca^{2+}]_i$ -szinteket 8 hetes erythropoietin kezeléssel normalizálni lehetett. Azt, hogy az erythropoesis és a neutrofilek $[Ca^{2+}]_i$ -tartalma között kapcsolat van alátámasztja az a tény is, hogy azokban az rHuEpo-kezelésben részesülő HD betegekben, akikben a hemoglobin >100 g/L, szignifikánsan alacsonyabb $[Ca^{2+}]_i$ -értékeket mértünk, mint akikben a hemoglobin < 100 g/L volt. Ennek alapján magyarázható az az irodalmi eredmény is, mely szerint a rHuEpo kezelés javította a neutrofilek O_2^- termelését, fagocitózis képességét,

amikor specifikus receptoron keresztül történt a sejtek stimulálása (pl. kemotaktikus peptiddel), azonban nem volt változás a NADPH oxidáz közvetlen aktiválhatóságában (Che97, 214). Ugyanis a $[Ca^{2+}]_i$ csak a kemotaktikus peptiddel történő stimulációt követő jelátviteli mechanizmusban tölt be másodlagos hírvivő szerepet, míg koncentrációja nem változik a NADPH oxidáz pl. PMA-val történő stimulációját követően. A HD betegekhez hasonlóan emelkedett $[Ca^{2+}]_i$ -szintek fordulnak elő az idős egyéneknél is (118, 209, 212).

Eredményeink azonban arra is utalnak, hogy a rHuEpo-kezelés önmagában nem elégséges minden betegben a $[Ca^{2+}]_i$ normalizálásához. Ettől a kép sokkal bonyolultabb, hiszen a dialízis során, amikor is a betegek vérének extracorporálisan egy „testidegen” rendszeren áramoltatjuk át, a sejteket számos stimulus éri (6, 52, 90, 167). Ennek csökkentésére komoly kutatások folynak (biokompatibilitás). Saját vizsgálati eredményeink szerint a HD-kezelés végére a neutrofilekben megemelkedik a $[Ca^{2+}]_i$, amely hatás kifejezettebb a kevésbé biokompatibilis cuprophane dializáló membrán alkalmazásakor, mint a jobb biokompatibilitással rendelkező szintetikus, polysulphone-alapú membrán használata esetén.

További tényezők, amely hozzájárulhatnak a HD betegek neutrofilek diszfunkciójához – a saját vizsgálatainkkal is megerősített – veseelégtelenséggel összefüggő, károsodott kalcium-foszfát anyagcsere és a VVE-hez társult hyperparathyreosis (98). Ez utóbbi ilyen irányú lehetséges szerepét alátámasztja az az eredményünk, amely szerint a parathyreoidectomia után a betegnek nemcsak a parathormon szintje normalizálódott, hanem a neutrofilek $[Ca^{2+}]_i$ -tartalma is.

Összefoglalva, megállapíthatjuk, hogy a HD betegekben a nyugvó neutrofilek magas $[Ca^{2+}]_i$ -tartalma a sejtek mintegy előstimulált állapotára utalnak. Ennek létre jötté több tényezővel is összefügghet, mint pl. a HD-kezelés procedúrája, a károsodott kalcium-

foszfát anyagcsere és a szekunder hyperparathyreosis. rHuEpo-kezeléssel a betegek jelentős hányadában nemcsak a vörösvérsejt-képzés, hanem a neutrofilek intracelluláris szabadkalcium-szintje is normalizálható.

5.3. Hyperhomocysteinaemia veseelégtelenségben

A HHC az atherothrombosis új, az eddig ismertektől független metabolikus rizikótényezője. Kialakulhat genetikai enzimdefektus és a Hcy-ciklusban résztvevő vitaminok hiánya következtében. Többféle gyógyszer alkalmazásával kapcsolatban és számos betegséggel összefüggésben írták le gyakoribb előfordulását. A HHC veseelégtelenségben nagy gyakorisággal fordul elő és ez a tény részben magyarázhatja – több egyéb tényezővel együtt – ezen betegek nagy cardiovascularis morbiditását és mortalitását. Mind a hemodialízis, mind a peritoneális dialízis kezelésben részesülő betegeknek magasabb az átlagos Hcy plazmaszintje, mint a normál populációé (31, 196). A HD betegekben a HHC előfordulásának gyakoriságát saját itt bemutatott vizsgálati eredményeink is megerősítik. Betegeink Hcy-értékeinek átlaga szignifikánsan nagyobb a normál tartomány felső értékénél, azonban alacsonyabbak az irodalomban a HD betegekben leírt értékeknél (28, 46), amit a hosszú távú folsavpótlásnak tulajdonítunk. A folsavpótlás optimális dózisára az irodalomban nincs egységes állásfoglalás. Az alkalmazott dózisek 2,5 mg/nap és 15 mg/nap közöttiek (7, 47, 104, 220). Saját vizsgálatunkban a folsavat kis dózisban (3mg/nap) alkalmaztuk. Mivel betegeink már a vizsgálat előtt is folyamatos folsavkezelésben részesültek, folsavkezelés előtti eredmények nem álltak rendelkezésre. Az irodalmi adatokkal összevetve betegeink átlag Hcy-szintjeit ($16,8 \pm 7,3$ vs. $35\text{--}50$ $\mu\text{mol/L}$), megállapíthatjuk, hogy a vizsgálatunkban résztvevők többségében – feltehetően a hosszú távú folsavpótlás következtében – súlyos HHC-ra utaló

magas Hcy-értékek nem voltak jellemzőek. Mérsékelten súlyos HHC ($\text{Hcy} > 20 \mu\text{mol/L}$) a betegek mintegy 30%-ban fordult elő. E betegek között a MTHFR T677 homozigóta típusa nagyobb gyakorisággal fordult elő, mint az átlag populációban, ami részben magyarázza a HHC folsav-rezisztenciáját.

Nem kellően hatásos, vagy hatástalan folsavkezelés estén MTHF adásával lehetne próbálkozni, amelynek megalapozottsága az alábbiakban foglalható össze: Mint ismert, a folsav hatásosan képes csökkenteni a HHC-t, azonban csak a betegek kb. egyharmadában képes normalizálni Hcy-szintet. (29, 109, 207). Ennek okát a folsav-metabolizmus – veseelégtelenséggel kapcsolatos – zavarában kell keresni. A folsav-metabolizmus krónikus veseelégtelenségben bekövetkező zavarára vonatkozó ismereteink több új adattal gyarapodtak. Ezek egy része magyarázatot adhat a HHC kialakulására és kezelésének egy új lehetőségét jelent(het)ik. Ezek megértéséhez ki kell térni a folsav-metabolizmus folyamatára (132): A folsav a bélfal sejtjeiben dekonjugálódik (a táplálékkal bejutott poliglutamátokat a folát-konjugáz hasítja) és annak monoglutamát formájává alakulva a bélben gyorsan abszorbeálódik, majd a portális keringésbe jut. A májban dihidrofoláttá, majd tetrahydrofoláttá (THF) redukálódik. Ezt követően a THF remetilációs ciklusban vesz részt, azaz 5,10 metiléntetrahydrofoláttá (5,10-MTHF) konvertálódik, majd redukció révén képződik a metabolikusan aktív alakja, az 5-metiltetrahydrofolát (5-MTHF). Ez a májban képződött 5-MTHF, az epével kiválasztódva a vékonybélből felszívódik. A keringésből a sejtek aktív transzport útján veszik fel. A sejtekben az 5-MTHF metil-csoportja segítségével a Hcy remetilálódik és visszaalakul metioninná, miközben az 5-MTHF-ből THF képződik. Ez utóbbi THF-poliglutamátokká konvertálódik, majd hidrolízis révén folát-monoglutamátokká alakul, amely fontos folsavforrás.

Veseelégtelenségben a folsav-metabolizmus több pontjának a károsodásáról számoltak be. Hemodializált betegekben, plazma-inhibitorok jelenlétében – a plazma folát-konjugáz aktivitás csökkenése miatt – gátolt a folát-poliglutamát monoglutamáttá való átalakulása (132). Állatkísérletekben és urémiás betegekben végzett vizsgálatokkal pedig a MTHF csökkent intesztinális abszorpciójáról (165, 174), valamint a transzmembrán folsav-transzport károsodásáról számoltak be. Ez utóbbit a veseelégtelenségben kumulálódó anionok hatásával hozzák összefüggésbe (107).

Ezen ismeretek alapján feltételezhető, hogy a sejtekben csökken a funkcionálisan aktív MTHF koncentráció, amely magyarázatul szolgálhat a HHC – a krónikus vesebetegek egy részében tapasztalható – folsav-rezisztenciájára. Ezt klinikailag az is alátámasztja, hogy újabban a folsav metilált formáinak (MTHF és annak prekursora a folinsav) alkalmazásával, amely nem érinti a károsodott metilációs ciklust, a plazma Hcy-t hatásosan sikerült csökkenteni (132, 158, 201, 226).

Felmerült, hogy a krónikus veseelégtelenségben gyakori HHC háttérében genetikai tényezőknek is lehet szerepe. Saját eredményeinkkel megegyezően más vizsgálók sem találtak a MTHFR C667T polimorfizmusában a HD betegekben az átlagpopulációhoz viszonyított eltérést (70).

A Hcy-anyagcserében fontos nyomelemek szerepének tisztázása is segítheti HHC okainak feltárását és bővítheti a kezelési lehetőségeket. Állatkísérleti adatok szerint, ugyanis a táplálékkal a szervezetbe juttatott kobalt (Co) és nikkell (Ni) befolyásolhatja a Hcy-szinteket. E vizsgálatokban azt találták, hogyha a kísérleti állatok táplálékát kobalttal és nikkellel egészítették ki javulást lehetett elérni a Hcy-, a B₁₂-vitamin- és a folsav-koncentrációkban (189, 190, 191, 213). A Co központi fémionja a B₁₂-vitaminnak,

amelyből a folsavciklusban metilkobalamin keletkezik. A Ni pontos szerepe nem ismert, de bizonyított, hogy hatása van a metionin metabolizmusára (149, 150, 205).

Saját vizsgálatunkkal a HD betegekben a nyomelemek mennyiségében szignifikáns eltéréseket találtunk a kontrollcsoporthoz viszonyítva. A szérumban a kobaltszintek kismértékben, míg a nikkellkoncentrációk közel hatszor voltak nagyobbak, mint a kontrollokban, és az irodalomban megadott normál tartomány [Co<0,3-1 µg/L; Ni<5 µg/L] felső határa felettiek voltak (219). A MTHFR polimorfizmusáról már a korábbiakban részletesen írtunk. Azt figyelembe véve, hogy ez az enzim a Co és Ni fémionokkal együtt a folsav körben játszik szerepet, megvizsgáltuk, hogy van-e eltérés a különböző allélt hordozó HD betegekben a Co és Ni szérumban koncentrációiban. Megállapítottuk, hogy a MTHFR hetero- és homozigóta alléljét hordozó betegekben szignifikánsan magasabb volt mind a Co-, mind a Ni-koncentráció. Nincs azonban matematikailag szignifikáns korreláció a szérumban Co-, Hcy-, B₁₂-vitamin- és folsav-koncentráció között. Ezzel szemben a szérumban a nikkellkoncentrációk negatív korrelációt mutattak a Hcy-koncentrációkkal a MTHFR allél típusától függetlenül és minden allél típusú csoportban szignifikánsan kisebb Hcy-koncentrációk tartoztak a magas Ni-koncentrációkhoz. A hatásmechanizmus ismeretlen, azonban két feltételezésünk van a Ni hatását tekintve: A metionin szintetáz, amely a metionin szintézisét katalizálja (Hcy-ből és metiltetrahidrofoláttól) két konformációs állapotban fordul elő, amelyek közül csak az egyik aktív (105). Az urémiás toxinok az inaktív konformációt stabilizálhatják, és a Co vagy még inkább a nikkell egy eddig ismeretlen mechanizmussal visszaállíthatja az aktív konformációt. A másik lehetőség, hogy a Ni a metionin-homocisztein kör valamelyik enzimjének (pl. SAM-transzferáz) aktivitását gátolja, és ezzel megakadályozza a Hcy akkumulációját. E feltételezés bizonyítására további kísérletek elvégzését tervezzük.

6. ÖSSZEFOGLALÁS ÉS KONKLÚZIÓK

Krónikus veseelégtelenségben a felgyorsult atherosclerosis a hemodializált betegek morbiditásának és mortalitásának legfőbb tényezője. Ma már számos új ismeret áll rendelkezésünkre ezen komplex folyamat megismerésére. Saját vizsgálataink elvégzését is ez az élő, a mindennapi gyakorlatban jelenlévő és ma még javarészt megoldatlan klinikai probléma indította el. A krónikus veseelégtelenségben fellépő akcelerált atherosclerosis egy olyan összetett folyamat eredménye, amelyben a klasszikus rizikótényezőkön kívül a veseelégtelenség és az annak kezelésére bevezetett hemodialízis kezelésnek is szerepe van. Az általunk elvégzett néhány vizsgálat eredménye az alábbiakban összegezhető:

- Kimutattuk, hogy a VVE-ben szenvedő betegek monocitáiban megváltozott specifikus és scavenger LDL receptor expresszióval, degradációval és funkciókkal számolhatunk. Az eltérések együttesen a koleszterindús „habos-sejt”-képződés fokozódását eredményezhetik.
- Kimutattuk, hogy a VVE-ben szenvedő betegekben a szérumban nemcsak a lipidek mennyisége, hanem zsírsavösszetétele is megváltozik. Általános tendencia a többszörösen telítetlen zsírsavak, ezen belül az esszenciális linolénsav és linolénsav, mennyiségének csökkenése.
- Kimutattuk, hogy VVE-ben a fokozott oxidációs stresszben a lipideltéréseknek, a neutrofilek alapszinten megemelkedett oxidációs robbanásának és a nem elégséges antioxidáns védekezésnek egyaránt szerepe lehet. Ez utóbbit a szérumban TG-re vagy Chol-re normalizált nagyfokú E-vitamin-hiány igazolja.
- Kimutattuk, hogy VVE-ben csökkent a PON-1-aktivitás, miközben nincs eltérés a fenotípus eloszlásban.

- Kimutattuk, hogy VVE-ben a nyugvó neutrofilekben az intracelluláris szabadkalcium-tartalom megemelkedik, amely kapcsolatban áll a hemodialízis kezelés során alkalmazott dializáló membránnal, a károsodott kalcium-foszfát anyagcserével, és a hyperparathyreosis mértékével. Megállapítottuk, hogy a renális anaemia kezelésében alkalmazott rHuEpo kedvezően hat a neutrofilek intracelluláris szabadkalcium-tartalmára is.
- Kimutattuk, hogy a VVE-ben szenvedő betegekben a hosszú távú, kisdózisú folsav-kezelés, hatásosan képes csökkenteni a szérum homociszteinszinteket, bár nem képes normalizálni azt.
- Kimutattuk, hogy a VVE-ben szenvedő betegekben kismértékű kobalt, és nagyobb mértékű nikkellakkumuláció tapasztalható. A szérum nikkellkoncentráció negatív korrelációt mutat a homociszteinszintekkel, a MTHFR polimorfizmusától függetlenül.

Az eredmények hasznosítása

A VVE-ben szenvedő betegekben kimutatható az esszenciális zsírsavak hiánya, azonban pótlásukat csak az antioxidáns E-vitamin megfelelő mennyiségének bevitele mellett lehet ajánlani. Elképzelhető, hogy az E-vitamin-hiány pótlása már önmagában is kedvezően hat a HD betegek plazmájának zsírsavösszetételére, amennyiben nőhet az intakt esszenciális többszörösen telítetlen zsírsav mennyisége a csökkent lipidperoxidáció következtében. Eredményeink alapján felvetődik, hogy a VVE-ben szenvedő betegekben az étrendi sztearinsav mennyiségének fokozása is kedvező hatású lehet a szérum lipidösszetételre (csökkent TG, LDL-Chol, stb.), anélkül hogy a lipidperoxidáció fokozódásától tartani kellene.

A HD betegek fokozottan érzékenyek a fertőzésekkel szemben, ebben a csökkent neutrofil funkcióknak is szerepe lehet, ez pedig függhet az alapszinten megemelkedett $[Ca^{2+}]_i$ -szinttől.

Eredményeink rámutatnak arra, hogy az rHuEpo-kezeléssel nemcsak az erythropoiesis javul, hanem az a vérképzés javulása mellett a neutrofilek $[Ca^{2+}]_i$ -szintje is kedvezően hat. Ez arra hívja fel a figyelmet, hogy a renális anaemia korrekciója az egyéb kedvező hatások miatt is kívánatos.

Krónikus veseelégtelenségben a kalcium-foszfát anyagcsere és a társult hyperparathyreosis adekvát kezelése is elősegítheti a neutrofilek $[Ca^{2+}]_i$ -szintjének csökkenését.

A hyperhomocysteinaemia kezelése hozzájárulhat a dializált betegek vascularis komplikációinak csökkenéséhez. Végül, a nyomelemek és a homociszteinszintek közti kapcsolat a hyperhomocysteinaemia kezelésének (és okainak) egy új lehetőségét vetik fel.

7. IRODALOMJEGYZÉK

1. Ando M, Lundkvist I, Bergstrom J, Lindholm B: Enhanced scavenger receptor expression in monocyte-macrophages in dialysis patients. *Kidney Int* 1996; 49:773-780.
2. Ando M, Gafvels M, Bergstrom J, Lindholm B, Lundkvist I: Uremic serum enhances scavenger receptor expression and activity in the human monocytic cell line U937. *Kidney Int* 1997; 51:785-792.
3. Ando M, Sanaka T, Niohei H: Eicosapentaenoic acid reduces plasma levels of remnant lipoproteins and prevents in vivo peroxidation of LDL in dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10:2177-2184.
4. Appel GB, Valeri A, Appel AS, Blum C: The hyperlipidaemia of the nephrotic syndrome. *Am J Med* 1989; 87:45N-51N.
5. Araujo FB, Barbosa DS, Hsin CY, Maranhao RC, Abdalla DSP: Evaluation of oxidative stress in patients with hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 1995, 117:61-71.
6. Arnout MA, Hakim RM, Todd RF, Dana N, Colten HR: Increased expression of an adhesion promoting surface glycoprotein in the granulocytopenia of hemodialysis. *N Eng J Med* 1985; 312:457-462.
7. Arnadottir M, Bratiström L, Simonsen O, Thysell H, Hultberg B, Andersson A, Nillson-Ehle P: The effect of high-dose pyridoxine and folic acid supplementation on serum lipid and plasma homocysteine concentrations in dialysis patients. *Clin Nephrol.* 1993; 40:236-240.
8. Attman PO, Alaupovic P, Gustafson A: Serum apolipoprotein profile of patients with chronic renal failure. *Kidney Int* 1987; 32:368-375.
9. Attman PO, Gustafson A: Lipid and carbohydrate metabolism in uraemia. *Eur J Clin Invest* 1979; 9: 285-291.
10. Attman PO, Knight-Gibson C, Tavella M, Samuelsson O, Alaupovic P: Increased concentrations of ApoB-containing triglyceride-rich lipoprotein particles in patients with chronic renal failure. *Miner Electrolyte Metab* 1992; 18:199-202.
11. Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JJ.: Biological defense mechanism. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericid agent. *J Clin Invest* 52:791-794, 1970
12. Badway JA, Curnutte JT, Karkowsky ML: Cis-polyunsaturated fatty acids induce high levels of superoxide production by human neutrophils. *J Biol Chem* 1981; 256:12640.

13. Bagdade JK, Porte D, Bierman EL: Hypertriglyceridemia: A metabolic consequence of chronic renal failure. *N Eng J Med* 1968; 279:181-185.
14. Basu SK, Glodstein JL, Anderson RGW, Brown MS: Degradation of cationized low density lipoprotein and regulation of cholesterol metabolism in homozygous familial hypercholesterolemia fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1976; 73:3278-3289.
15. Bachmann J, Tepel M, Raidt H, Riezler R, Graefe U, Langer K, Zidek W: Hyperhomocysteinemia and the risk factor for vascular disease in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 1995; 6:121-125.
16. Balla G, Jacob HS, Balla J, Rosenberg M, Nath K, Apple F, Eaton JW, Vercelotti GM: Ferritin: a cytoprotective antioxidants stratagem of endothelium. *J Biol Chem* 1992; 267:18148-18153.
17. Balla G, Jacob HS, Eaton JW, Belcher JD, Vercelotti GM: Hemin: a possible physiologic mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial injury. *Arteriosclerosis Thrombosis* 1991; 11:1700-1711.
18. Balla J, Belcher JD, Balla G, Jacob HS, Vercelotti GM: Oxidized low-density lipoproteins and endothelium: oral Vitamin E supplementation prevents oxidized low-density lipoprotein mediated vascular injury. *Trans Assoc Amer Physicians* 1993; 106:128-133.
19. Balogh Z, Fülöp P, Seres I, Harangi M, Katona E, Kovács P, Kosztáczky B, Paragh Gy: Effects of Simvastatin on serum paraoxonase activity. *Clin Drug Invest* 2001; 21:506-510.
20. Balogh Z, Seres I, Harangi M, Kovács P, Kakuk Gy, Paragh Gy: Gemfibrozil increases paraoxonase activity in Type 2 diabetic patients. A new hypothesis of the beneficial action of fibrates. *Diabetes Metab* 2001; 27: 604-610.
21. Barcelli UO: Effect of dietary prostaglandin precursors on the progression of renal disease in animals. *Kidney Int* 1991; 39 (Suppl):57-64.
22. Beisiegel U, Schneider WL, Goldstein JL, Anderson RG, Brown MS: Monoclonal antibodies to the low density lipoprotein receptor as probes for study of receptor mediated endocytosis and the genetics of familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem* 1981; 256:11923-11938.
23. Belcher JD, Balla J, Balla G, Jacobs DR Jr, Gross M, Jacob HS, Vercelotti GM: Vitamin E, and endothelium. Brief oral vitamin supplementation prevents oxidized LDL-mediated vascular injury in vitro. *Arterioscler Thromb* 1993; 13:1779-1789.
24. Bereczky Zs, Balogh I, Szőke G, Muszbek L: Homocisztein anyagcsere laboratóriumi vizsgálata és klinikai jelentősége a thrombosis hajlam megítélése szempontjából. II. Öröklött és szerzett hyperhomocysteinaemiák. *Klin Kísér Lab Med* 1999; 26: 54-63.

25. Berridge MJ. Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messenger. *Biochem J* 1984; 220:345-360.
26. Bligh EG, Dyer WJ: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Biophys* 1959; 37:911-917.
27. Bostom AG, Brosnan JT, Hall B, Nadeau MR, Selhub J: Net uptake of plasma homocysteine by the rat kidney in vivo. *Atherosclerosis* 1995; 116:59-62.
28. Bostom AG, Lathrop L: Hyperhomocysteinemia and end-stage renal disease: Prevalence, etiology, and potential relationship to atherosclerotic outcomes. *Kidney Int* 1997; 52:10-20.
29. Bostom AG, Shemin D, Lapane KL, Hume HL, Yoburn D, Nadeau MR, Bendich A, Selhub J, Rosenberg IH: High dose B-vitamin treatment of hyperhomocysteinemia in dialysis patients. *Kidney Int* 1996; 49:147-152.
30. Bostom AG, Shemin D, Lapane KL, Miller JW, Sutherland P, Nadeau M, Seyoum E, Hartman W, Prior R, Wilson PWF, Selhub J: Hyperhomocysteinemia and traditional cardiovascular disease risk factors in end-stage renal disease patients on dialysis: A case control study. *Atherosclerosis* 1995; 114:93-103.
31. Bostom AG, Shemin D, Nadeau MR, Shih V, Stabler SP, Allen RH, Selhub J: Short term betaine therapy fails to lower elevated fasting total plasma homocysteine concentrations in hemodialysis patients maintained on chronic folic acid supplementation. *Atherosclerosis* 1995; 113:129-132.
32. Bostom AG, Shemin D, Verhoef P, Nadeau MR, Jacques PF, Selhub J, Dworkin L, Rosenberg IH: Elevated fasting total plasma homocysteine level and cardiovascular disease outcomes in maintenance dialysis patients: a prospective study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:2554-2558.
33. Bostom AG, Shemin D, Yoburn D, Fisher DH, Nadeau MR, Selhub J: Brief report: Lack of effect of oral N-acetylcysteine on the acute dialysis-related lowering of total plasma homocysteine in hemodialysis patients. *Atherosclerosis* 1996; 120:241-244.
34. Boyum A: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 1968; 21 (Suppl 97): 77-89.
35. Brown MS, Busu SK, Falck SK, Ho YR, Goldstein JL: The scavenger cell pathway for lipoprotein degradation: specific binding sites mediate the uptake of negatively charged LDL by macrophages. *J Supramol Struct* 1980; 13:67-68.
36. Brown MS, Dana SE, Goldstein JL: Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in cultured human fibroblasts. *J Biol Chem* 1974; 249:789-796.

37. Brown MS, Goldstein JL: Lipoprotein metabolism in the macrophage: implication for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Ann Rev Biochem* 1983; 52:223-261.
38. Brown MS, Goldstein JL: Progress in understanding the LDL receptor and HMG-CoA reductase, two membrane proteins that regulate the plasma cholesterol. *J Lipid Res* 1984; 25:1450-1461.
39. Brunzell JD, Albers JJ, Hass LB, Goldberg AP, Agadon L, Sherrard DJ: Prevalence of serum lipid abnormalities in chronic hemodialysis. *Metabolism* 1977; 26:903-910.
40. Buoncristiani U, Galli F, Rovidati S, Albertine MC, Campus G, Canestrari F: Oxidative damage during hemodialysis using a E vitamin-modified dialysis membrane. *Nephron* 1997; 77:57-61.
41. Calder PC: Dietary modification of inflammation with lipids. *Proc Nutr Soc* 2002; 61:345-358.
42. Calder PC, Yacoob P, Newsholme EA: Triacylglycerol metabolism by lymphocytes and the effect of triacylglycerols on lymphocyte proliferation. *Biochem J* 1994; 298:605-611.
43. Cappelli P, Di Liberato L, Stuard S, Ballone E, Albertazzi A: N-3 polyunsaturated fatty acid supplementation in chronic progressive renal disease. *J Nephrol* 1997; 10:157-162.
44. Carson NA, Neil DW: Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. *Arch Dis Child* 1962; 37:505-13.
45. Cattran DC, Fenton SA, Wilson DR, Steiner G: Defective triglyceride removal in lipemia associated with peritoneal and hemodialysis. *Ann Intern Med* 1976; 85:29-33.
46. Chauveau P, Chadefaux B, Coudé M, Aupetit J, Hannedouche T, Kamoun P, Jungers P: Hyperhomocysteinemia a risk factor for atherosclerosis in chronic uremic patients. *Kidney Int* 1993; 41 (Suppl):S72-S77.
47. Chauveau P, Chadefaux B, Coudé M, Aupetit J, Kamoun P, Jungers P: Long term folic acid (but not pyridoxine) supplementation lowers elevated plasma homocysteine level in chronic renal failure. *Miner Electrolyte Metab* 1996; 22:106-109.
48. Chen CK, Liaw JM, Juand JG, Lin TH: Antioxidant enzymes and trace elements in hemodialysed patients. *Biol Trace Elem Res* 1997; 58:149-157.
49. Chen HC, Tsai JC, Tsai JH, Lai YH: Recombinant human erythropoietin enhances superoxide production by FMLP-stimulated polymorphonuclear leukocytes in hemodialysis patients. *Kidney Int* 1997; 52:1390-1394.

50. Chen LY, Lawson DL, Mehta JL: Reduction in human neutrophil superoxide anion generation by n-3 polyunsaturated fatty acids: role of cyclooxygenase products and endothelium-derived relaxing factor. *Trombosis Res* 1994; 76:317-332.
51. Chenery RJ, McLean AE: The effects of fatty acids and antioxidants in the culture medium on membrane composition and properties of the microsomal enzymes aryl hydrocarbon hydroxylase and cytochrome c reductase of cultured liver cells. *Biochim Biophys Acta* 1979; 572:P9-P18.
52. Chenoweth DE, Cheung AK, Henderson LW: Anaphylatoxin formation during hemodialysis: Effects of different dialyzer membranes. *Kidney Int* 1983; 25:764-769.
53. Clarke R, Daly L, Robinson K, et al. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* 1991; 324:1149-1155.
54. Colton CK: Quantitation of membrane bioincompatibility. *Contrib Nephrol* 1987; 59:110-125.
55. Cornwell DG, Kruger FA, Hamvi GJ, Brown JB: Studies of characterisation of human lipoproteins separated by ultracentrifugation in density gradient. *Am J Chem Nutr* 1961; 9:24-53.
56. Craddock PR, Fehr J, Dalmaso AP, Brigham KL, Jacob HS: Hemodialysis leukopenia. *J Clin Invest* 1997; 59:879-888.
57. Crawford GA, Mohony JF, Stewart JH: Impaired lipoprotein lipase activation by uraemic and post-transplant sera. *Clin Chem* 1981; 60:73-80.
58. Curnutte JT.(ed): *Phagocytic Defects I and II, Hematology/Oncology Clinics of North America* W.B. Saunders Co., Philadelphia, USA. 1988.
59. Del Maestro RF: An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol. Scand* 1980; 492: 153-168.
60. Denys A, Hichami A, Khan NA.: Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid modulate MAP kinase (ERK1/ERK2) signaling in human T cells. *J Lipid Res* 2001; 42:2015-2020.
61. Descamps-Latscha B, Herbelin A, Nguyen AT, Urena P: Respective influence of uremia and hemodialysis on whole blood phagocyte oxidative metabolism, and circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor. *Adv Exp Med Biol* 1991; 297:183-192.
62. Dombóvári J, Varga Zs, Becker JS, Mátyus J, Kakuk Gy, Papp L: ICP-MS determination of trace elements in serum samples of healthy subjects using different sample preparation methods. *Atomic Spectroscopy* 2001; 22:331-335.
63. Donadio JV: n-3 fatty acids and their role in nephrologic practice. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001; 10:639-642.

64. Eckel RH: Lipoprotein lipase. A multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. *N Eng J Med* 1989; 320:1060-1068.
65. Exton JH: Calcium signaling in cells - molecular mechanism. *Kidney Int Suppl* 1987; 32:S68-S81.
66. Feingold KR, Memon RA, Moser AH, Grunfeld C: Paraoxonase activity in the serum and hepatic mRNA levels decrease during acute phase response. *Atherosclerosis* 1998; 139:307-315.
67. Fluck RJ, Roger SD, McMahon AC, Raine AE: Modulation of platelet cytosolic calcium during erythropoietin therapy in uremia. *Nephrol Dial Transplant* 1994; 9:1109-1114.
68. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 1998; 32 (Suppl 3): S112-119.
69. Forrest VJ, Kang YH, McClain DE, Robinson DH, Ramakrishnan N: Oxidative stress-induced apoptosis prevented by Trolox. *Free Radic Biol Med* 1994; 16:657-684.
70. Födinger M, Mannhalter C, Pabinger-Fasching I, Hörl WH, Sunder-Plassmann G: Is hyperhomocysteinemia in hemodialysis (HD) patients associated with a mutation of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene? *J Am Soc Nephrol* 1996; 7:1612A.
71. Freeman BA, Crapo JD: Biology of diseases. Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47: 412-426.
72. Fülöp T, Varga Zs, Csongor J, Foris G, Leövey A: Age related impairment of phosphatidylinositol breakdown of polymorphonuclear granulocytes. *FEBS Letts* 1989; 245:249-252.
73. Galli F, Canestrari F, Bellomo G: Physiopathology of the oxidative stress and its implication in uremia and hemodialysis in Vitamin E-bonded membrane. A further step in dialysis Optimization (vol 127). Ed: Ronco C, La Geca G. *Contrib Nephrol*. Basel. 1999. pp 1-31.
74. Galli F, Varga Zs, Balla J, Ferraro B, Canestrari F, Floridi A, Kakuk G, Buoncristiani U: Vitamin E, lipid profile, and peroxidation in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2001; 59 (Suppl 78): 148-154.
75. Gerritsen T, Vaughan JG, Waisman HA: The identification of homocysteine in the urine. *Biochem Biophys Res Commun* 1962; 9:493-6.
76. Gillett MP, Obineche EN, El-Rokhaimi M, Lakhani MS, Abdulle A, Sulaiman M: Lecithin: cholesterol acyltransfer, dyslipoproteinaemia and membrane lipids in uraemia. *J Nephrol* 2001; 14:472-80.

77. Gillett MP, Teixeira V, Dimenstein R. Decreased plasma lecithin:cholesterol acyltransferase and associated changes in plasma and red cell lipids in uraemia. *Nephrol Dial Transplant* 1993; 8:407-411.
78. Goldstein JL, Brown MS: Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured fibroblasts. *J Biol Chem* 1974; 249:5153-5156.
79. Goldstein JL, Brown MS: LDL receptor defect in familial hypercholesterolemia. *Med Clin North Am* 1982; 66:335-351.
80. Goldstein JL, Brown MS: The low density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Ann Rev Biochem* 1977; 46:897-923.
81. Gopalakrishna R, Jaken S: Protein kinase C signaling and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2000; 28:1349-61.
82. Green D, Stone NJ, Krumlowsky A: Putative atherogenic factors in patients with chronic renal failure. *Prog Cardiovasc Dis* 1983; 26:133-144.
83. Green R, Jacobsen DW: Clinical implications of hyperhomocysteinemia, in *Folate in Health and Disease*, Szerk.: Bailey LB. Marcel Dekker, New York. 1995, pp.75-122.
84. Gregorio SM, Lemos CC, Caldas ML, Bregman R: Effect of dietary linoleic acid on the progression of chronic renal failure in rats. *Braz J Med Biol Res* 2002; 35:573-579.
85. Grisham MB, McCord JM: Chemistry and cytotoxicity of reactive oxygen metabolites, in *Physiology of Oxygen Radicals*. Baltimore, MD, American Physiological Society, 1986. pp. 1-18.
86. Grundy SM: Influence of stearic acid on cholesterol metabolism relative to other long chain fatty acids *Am J Clin Nutr* 1994; 60:986S-990S.
87. Guarini P, Bellavite P, Biasi D, Carletto A, Galvani S, Caramaschi P, Bambara LM, Corrocher R.: Effects of fish oil and soy phosphatidylcholine on neutrophil fatty acid composition, superoxide release, and adhesion. *Inflammation* 1998; 22:381-391.
88. Guarnieri GF, Moracchiello M, Campanacci L, Ursini F, Ferri L, Valente M, Gregolin C: Lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) activity in chronic uremia. *Kidney Int Suppl* 1978; 8:S26-30.
89. Haag-Weber M, Horl WH: Dysfunction of polymorphonuclear leukocytes in uremia. *Semin Nephrol* 1996; 16: 192-201.
90. Hakim RM: Recent advances in the biocompatibility of haemodialysis membranes. *Nephrol Dial Trnsplant* 1995; 10 (Suppl): 7-11.

91. Halliwell B, Gutteridge JM: *Free Radicals in Biology and Medicine* (Third Edition), Oxford University Press, New York, 1999; pp 206-219.
92. Harangi M, Remenyik É, Seres I, Varga Zs, Balogh Z, Kakuk Gy, Paragh Gy: Oxidatív stressz hatására kialakuló DNS-károsodás meghatározása Commet assay-vel hyperlipidaemiás betegekben. *Magyar Belorv Arch* 2000; 53:391-396.
93. Harangi M, Remenyik É, Seres I, Varga Zs, Katona E, Paragh Gy: Determination of DNA damage induced by oxidative stress in hyperlipidemic patients. *Mut Res Gen Tox* 2002; 513:17-25.
94. Hedrick CC, Hassan K, Hough GP, Yoo J, Simzar S, Quinto CR: Short term feeding of atherogenic diet to mice results in reduction of HDL and paraoxonase that may be mediated by an immun mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:1946-1952.
95. Hiramatsu K, Arimori S: Increased superoxide production by mononuclear cells of patients with hypertriglyceridemia and diabetes. *Diabetes* 1988; 37:832-837.
96. Hogg N, Darley-Usmar VM, Wilson MT, Moncada S: The oxidation of α -tocopherol in human low density lipoprotein by the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *FEBS Lett* 1993; 326:199-203.
97. Holman RT, Johnson SB, Bibus D, Spencer DC, Donadio JV Jr: Essential fatty acid deficiency profiles in idiopathic immunoglobulin A nephropathy. *Am J Kidney Dis* 1994; 5:648-654.
98. Howard RJ, Pfaff WW: Parathyroidectomy in patients with chronic renal failure. *Am J Surg* 1998; 175:302-304.
99. Hultberg B, Andersson A, Sterner G: Plasma homocysteine in renal failure. *Clin Nephrol* 1993; 40:230-234.
100. Hung KY, Ho CY, Kuo YM, Lee SH, Hseis SJ, Yang CS, Peng CJ, Wu DJ, Hung JT, Chen PY, Chen JS, Chen WY: Trace elements burden in geriatric hemodialysis patients: a prospective multicenter collaborative study. *Int J Artif Organs* 1997; 20:553-556.
101. Islam KN, O'Byrne D, Devaraj S, Palmer B, Grundy SM, Jialal I: Alpha-tocopherol supplementation decreases the oxidative susceptibility of LDL in renal failure patients on dialysis therapy. *Atherosclerosis* 2000; 150:217-224.
102. Ivitko-Sarsat CP, Merad-Boudia M, Nguyen AT, Thevenin M, Jaudon MC, Zingraff J, Verger C, Jungers P, Descamp-LatschaB: Glutathion antioxidant system as a marker of oxidative stress in chronic renal failure. *Free Radic Biol Med* 1996; 21:845-853.

103. Janssen MJFM, van der Berg M, Stehouwer CDA, Boers GHJ: Hyperhomocysteinemia: A role in the accelerated atherogenesis of chronic renal failure? *Neth J Med* 1995;46: 244-251.
104. Janssen MJFM, van Guldener C, de Jong GMT, van den Berg M, Stehouwer CDA, Donker AJM: Folic acid treatment of hyperhomocysteinemia in dialysis patients. *Miner Electrol Metab* 1996; 22:110-114.
105. Jarrett JT, Huang S, Matthews RG: Methionine synthase exist in two distinct conformations that differ in reactivity toward methyltetrahydrofolate, adenosylmethionine, and flavodoxin. *Biochemistry* 1998; 37:5372-5382.
106. Jeney V, Balla J, Yachie A, Varga Z, Vercellotti GM, Balla G.: Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood* 2002; 100:879-887.
107. Jennette JC, Goldman D: Inhibition of the membrane transport of folates by anion retained in uremia. *J Lab Clin Med* 1975; 86:834-843.
108. Jungers P, Chauveau P, Blandin O, Chadeaux B, Aupetit J, Labrunie M, Descamps-Latscha B, Kamoun P: Hyperhomocysteinemia is associated with atherosclerotic occlusive arterial accidents in predialysis chronic renal failure patients. *Miner Electrolyte Metab* 1997; 23:170-173.
109. Jungers P, Joly D, Massy ZA, Chauveau P, Nguyen AT, Aupetit J, Chadeaux B: Sustained reduction of hyperhomocysteinemia with folic acid supplementation in predialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14:2903-2906.
110. Kadri-Hassani N, Leger CL, Descomps B: The fatty acid bimodal action on superoxide anion production by human adherent monocytes under phorbol 12-myristate 13-acetate or diacylglycerol activation can be explained by the modulation of protein kinase C and p47phox translocation. *J Biol Chem* 1995; 270:15111-15118.
111. Khajehdehi P: Lipid-lowering effect of polyunsaturated fatty acids in hemodialysis patients. *J Ren Nutr* 2000; 10:191-195.
112. Kim SS, Hirose S, Tamura H, Nagasawa R, Tokushima H, Mitarai T, Isoda K: Hyperhomocysteinemia a possible role for atherosclerosis in CAPD patients. *Adv Perit Dial* 1994; 10:282-285.
113. Krachler M, Winsberger G, Irgolic KJ: Trace element status of hemodialysed patients. *Biol Trace Elem Res* 1997; 58:209-211.
114. Kumagai K, Itoh K, Hinuma S, Tada M: Pre-treatment of plastic dishes with fetal calf serum. A simple method for macrophage isolation. *J Immunol Methods* 1979; 29:17-25.

115. La Du BN, Eckerson HW: The polymorphism of paraoxonase/arylesterase isozymes of human serum. *Fed Proc* 1984; 43:2338-2341.
116. Laughrey CM, Young IS, McDowell IF, McMaster C, McNamee PT, Trimble ER: Oxidation of low density lipoprotein in patients on regular hemodialysis. *Atherosclerosis* 1994; 110:185-193.
117. Lefkovich JB, Klahr S: Polyunsaturated fatty acids and renal disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996; 213:13-23.
118. Lipschitz AD, Udupa KB, Indelicato SR, Das M: Effect of age on second messenger generation in neutrophils. *Blood* 1991; 78:1347-1354.
119. Llach F, Yudd M: The importance of hyperphosphataemia in the severity of hyperparathyroidism and its treatment in patients with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 1998; 13 Suppl 3:57-61.
120. Logan JL, Michael UF, Benson B: Dietary fish oil interferes with renal arachidonic acid metabolism in rat: Correlation with renal physiology. *Metabolism* 1992; 41:382-389.
121. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr A, Randall RJ: Protein measurement with folin reagent. *J Biol Chem* 1951; 125:265-273.
122. Ludwig PW, Hunninghake DB, Hoidal JR.: Increased leukocyte oxidative metabolism in hyperlipoproteinaemia. *Lancet* 1982; 2:348-350.
123. Luostarinen R, Saldeen T.: Dietary fish oil decreases superoxide generation by human neutrophils: relation to cyclooxygenase pathway and lysosomal enzyme release. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1996; 55:167-172.
124. Mackness B, Mackness MI, Durrington PN, Arrol S, Evans AE, McMaster D, Ferrières J, Ruidavets J-B, Williams NR, Howard AN: Paraoxonase activity in two healthy populations with differing rates of coronary heart disease. *Eur J Clin Invest* 2000; 30:4-10.
125. Mackness MI, Abbott CA, Arrol S, Durrington PN: The role of high density lipoprotein and lipid-soluble antioxidant vitamins in inhibiting low-density lipoprotein oxidation. *Biochem J* 1993; 294:829-835.
126. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN: Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxidase in low density lipoprotein. *FEBS Lett* 1991; 286:152-154.
127. Mackness MI, Durrington PN: High density lipoproteins, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis* 1995; 115:243-253.

128. Mackness MI, Harty D, Bhatnagar D, Winocur PH, Arrol S, Ishola M, Durrington PM: Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 1991; 86:193-199.
129. Manitius J, Sulikowska B, Fox J, Jakubowski Z, Ludwiczak E, Lysiak-Szydłowska W, Rutkowski B: The effect of dietary enrichment with fish-oil on urinary excretion of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase and renal function in proteinuric patients with primarily glomerulopathies. *Int Urol Nephrol* 1997; 29:489-495.
130. Marsh EN: Coenzyme B12 (cobalamine)-dependent enzymes. *Assays Biochem* 1999; 34:139-154.
131. Massy ZA, Chadeaux-Vekemans B, Chevalier A, Bader CA, Drüeke TB, Legendre C, Lacour B, Kamoun P, Kreis H: Hyperhomocysteinemia: a significant risk factor for cardiovascular disease in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 1994; 9:1103-1108.
132. Massy ZA: Reversal of hyperhomocyst(e)inemia in chronic renal failure - is folic or folinic acid the answer? *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14:2810-2812.
133. Mayer L, Jacobsen DW, Robinson K: Homocysteine and coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27:517-527.
134. McCully KS: Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969; 56:111-128.
135. McCully KS, Wilson RB: Homocysteine theory of arteriosclerosis. *Arteriosclerosis* 1975; 22:215-227.
136. McDonnell MG, Archbold GP: Plasma ubiquinol/cholesterol ratios in patients with hyperlipidemia, those with diabetes mellitus and in patients requiring dialysis. *Clin Chim Acta* 1996; 253:117-126.
137. McElveen J, Mackness MI, Colley CM, Peard T, Warner S, Walker CH: Distribution of paraoxon hydrolytic activity in the serum of patients after myocardial infarction. *Clin Chem* 1986; 32:671-673.
138. McGill HC Jr, McMahan CA, Malcom GT, Oalmann MC, Strong JP: Effects of serum lipoproteins and smoking on atherosclerosis in young men and women. The PDAY Research Group. Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:95-106.
139. McNamara DJ, Bloch CA, Botha A, Mendelsohn D: Sterol synthesis in vitro freshly isolated blood mononuclear leukocytes from familial hypercholesterolemic patients treated with perbucol. *Biochim Biophys Acta* 1985; 833:412-416.
140. Miller BA, Cheung JY: Mechanism of erythropoietin signal transduction: involvement of calcium channels. *Proc Soc Exp Biol Med* 1994; 206:263-267.

141. Moeller S, Gioberge S, Brown G. ESRD patients in 2001: global overview of patients, treatment modalities, and development trends. *Nephrol Dial Transplant.* 2001; 17:2071-2076.
142. Mohácsi A, Fülöp T, Kozlovsky B, Seres I, Leövey A: Superoxide anion production and intracellular free calcium levels in resting and stimulated polymorphonuclear leukocytes obtained from healthy and arteriosclerotic subjects of various ages. *Clin Biochem* 1992; 25:285-288.
143. Murase T, Cattran DC, Rubenstein B, Steiner G: Inhibitory of lipoprotein lipase by uremic plasma, a possible cause of hypertriglyceridaemia. *Metabolism* 1975; 24:1279-1286.
144. Nagaya T, Nakaya K, Takahashi H, Yishida I, Okamoto Y: Relationship between serum saturated fatty acids and serum total cholesterol and HDL-cholesterol in humans. *Ann Clin Biochem* 1994; 3:240-244.
145. Natoli S, Violi F: Oxidative stress and hypercholesterolemia: increase of radical hydroxyl in patients with hypercholesterolemia. *Cardiologia* 1999; 44:187-190.
146. Navarro E, Esteve M, Olive A, Klaassen J, Cabre E, Tena X, Fernandez-Banares F, Pastor C, Gassull MA: Abnormal fatty acid pattern in rheumatoid arthritis. A rationale for treatment with marine and botanical lipids. *J Rheumatol* 2000; 27:298-303.
147. Nestel PJ, Fidge NH, Tan MH: Increased lipoprotein-remnant formation in chronic renal failure. *N Engl J Med* 1982; 307:329-333.
148. Neusser M, Tepel M, Zidek W: Erythropoietin increases cytosolic free calcium concentration in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 1993; 27:1233-1236.
149. Nielsen FH, Myron DR, Givand SHM, Zimmerman TJ, Ollerich DA: Nickel deficiency in rats. *J Nutr* 1975; 105:1620-1630.
150. Nielsen FH, Zimmerman TJ, Shuler TR, Brossart B, Uthus EO: Evidence for a cooperative metabolic relationship between nickel and vitamin B12 in rats. *J Trace Elem Exp Med* 1989; 2:21-29.
151. Niki E in *Clinical and Nutritional Aspects of Vitamin E* (szerk: Hayahashi O, Mino M). Elsevier, Amsterdam. 1986. pp. 3-14.
152. Okhava H, Ohishi N, Yagi M: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction *Anal Biochem* 1979; 95:351-358.
153. Omata M, Higuchi C, Demura R, Sanaka T, Nihei H. Reduction of neutrophil activation by vitamin E modified dialyzer membranes. *Nephron* 2000; 85:221-231.

154. Papadopoulos NX, Sorer WZ, Elin RJ, Diamond LH: An abnormal lipoprotein in the serum of uremic patients maintained on chronic hemodialysis. *Ann Intern Med* 1980; 92:634-635.
155. Paragh Gy, Balla P, Katona E, Seres I, Derdág Z, Degrell I: A paraoxonáz-aktivitás változása Alzheimer-betegségben és vasculáris dementiában. *Clin Neurosci/Idegy Szle* 2001; 54:33-37.
156. Paragh Gy, Balla P, Katona E, Seres I, Égerházi A, Degrell I: Serum paraoxonase activity changes in patients with Alzheimer-disease and vascular dementia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2002; 252:63-67.
157. Paragh Gy, Balogh Z, Seres I, Harangi M, Boda J: Gemfibrozil hatása a HDL-hez kötött paraoxonáz aktivitásra és a lipoprotein szintek alakulására. *Háziorvosi Továbbképző Szemle* 1999; 4:260-264.
158. Perna AF, Ingrosso D, De Santo NG, Galletti P, Brunone M, Zappia V: Metabolic consequences of folate induced reduction of hyperhomocysteinemia in uremia. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8:1899-1905.
159. Perna AF, Castaldo P, Ingrosso D és mtsa: Homocystein, a new cardiovascular risk factor, is also a powerful uremic toxin. *J Nephrol.*1999; 12:230-240.
160. Portman RJ, Scott RC, Rogers DD, Loose-Mitchell DS, Lemire JM, Weinberg RB: Decreased low density lipoprotein receptor function and mRNA levels in lymphocytes from uremic patients. *Kidney Int* 1992; 42:1238-1246.
161. Pryor WA: Free radical reactions and their importance in biochemical systems. *Fed. Proc.* 1973; 32: 1862-1869.
162. Purasiri P, Mckechnie A, Heys SD, Eremin O: Modulation in vitro of human natural cytotoxicity, lymphocyte proliferative response to mitogens and cytokine production by essential fatty acids. *Immunology* 1997; 92:166-172.
163. Quaschnig T, Schömig M, Keller M, Thiery J, Nauck M, Schollmeyer P, Wanner C, Kramer-Guth A: Non-insulin-dependent diabetes mellitus and hypertriglyceridaemia impair lipoprotein metabolism in chronic renal failure patients. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10:332-341.
164. Remenyik É, Horkai I, Paragh Gy, Kovács É, Balogh Z, Fóris G: Effect of retinoids on LDL metabolism by macrophages. *Eur J Dermatol* 1997; 7:99-102.
165. Reteif FP, Heyens AP, Oosthuizen M, van Reenen OR: Aspects of folate metabolism in renal failure. *Br J Hematol* 1977; 36:405-415.
166. Richard MJ, Sirajeddine MK, Cordonnier D: Relationship of omega-3 fatty acid supplementation to plasma lipid peroxidation in predialysis patients with hypertriglyceridemia. *J Health Inter Des* 1993; 2:115-181.

167. Ritz E, Deppisch R, Stier E, Hansch G: Atherogenesis and cardiac death: are they related to dialysis procedure and biocompatibility? *Nephrol Dial Transplant* 1994;9 Suppl 2:165-72.
168. Robinson K, Gupta A, Dennis VW, Arheart K, Chaudhary D, Green R, Vigo P, Mayer L, Selhub J, Kutner M, Jacobsen DW: Hyperhomocysteinemia confers an independent increased risk of atherosclerosis in end-stage renal disease and is closely linked to plasma folate and pyridoxine concentrations. *Circulation* 1996; 94:2743-2748.
169. Rotondo D, Earl CRA, Laing KJ, Kaimakamis D: Inhibition of cytokine-stimulated thymic lymphocyte proliferation by fatty acids: the role of eicosanoids. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1223:185-194.
170. Ruis J, Blanche H, James RW, Blatter Garin MC, Vaisse C, Charpentier G, Cohen N, Morabia A, Passa P, Froguel P: Gln-Arg 192 polymorphism of paraoxonase and coronary heart disease in type 2 diabetes. *Lancet* 1995; 346:869-872.
171. Ruperez FJ, Barbas C, Castro M, Martiney S, Herrera E: Simplified method for Vitamin E determination in rat adipose tissue and mammary glands by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1998; 823:483-487.
172. Russel DW, Yamamoto T, Schneider WJ, Slaughter CJ, Brown MS, Goldstein JL: cDNA cloning of the bovine low density lipoprotein receptor: Feedback regulation of a receptor mRNA. *Proc Natl Acad Sci* 1983; 80:7501-7508.
173. Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Roulean JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JM, Wun CC, Davis BR, Braunwald E: The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. For the Cholesterol and Recurrent Events Trial Investigators. *N Engl J Med.* 1996; 335:1001-1009.
174. Said HM, Vaziri ND, Kariger RK, Hollander D: Intestinal absorption of 5-methyltetrahydrofolate in experimental uremia. *Acta Vitaminol Enzymol* 1984; 6:339-346.
175. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised Trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994; 344:1383-1389.
176. Scanu AM: Physiopathology of plasma lipoprotein metabolism. *Kidney Int* 1991; 39:3-7.

177. Schiavon R, De Fanti E, Giavarina D, Biasioli S, Cavalcanti G, Guidi G: Serum paraoxonase activity is decreased in uremic patients. *Clin Chim Acta* 1996; 247:71-80.
178. Schmitz PG, McCloud LK, Reikes ST, Leonard CL, Gellens ME: Prophylaxis of hemodialysis graft thrombosis with fish oil: double-blind, randomized, prospective trial. *J Am Soc Nephrol* 2002, 13:184-190.
179. Schneider WJ, Beisiegel U, Goldstein JL, Brown MS: Purification of the low density lipoprotein receptor, an acidic glycoprotein of 164000 molecular weight. *J Biol Chem* 1982; 257:2664-2673.
180. Schreirer GF: Dietary treatment of immunologically mediated renal disease. *Kidney Int* 1991; 39 (Suppl): 49-56.
181. Section VII. Vascular disease and risk factors. *Nephrol Dial Transpl* 2002; 17(Suppl 7):88-109.
182. Sheperd J, Bradford DK, Morgan HG: Radioiodination of human low density lipoprotein: a comparison of four methods. *Clin Chim Acta* 1976; 66:97-109.
183. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillop JH, Packard CJ: Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. For the West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med* 1995; 333:1301-1307.
184. Shohat J, Boner G.: Role of lipids in the progression of renal disease in chronic renal failure: evidence from animal studies and pathogenesis. *Isr J Med Sci* 1993; 29:228-239.
185. Siguel EN, Lerman RH: Altered fatty acid metabolism in patients with angiographically documented coronary artery disease. *Metabolism* 1994; 43:982-993.
186. Slater TF: Free radical mechanism in tissue injury. *Biochem J* 1984; 222:1-15.
187. Soria C, Chadeaux B, Coude M, Gaillard O, Kamoun P: Concentrations of total homocysteine in plasma in chronic renal failure. *Clin Chem* 1990; 36:2137-2138.
188. Stamler J, Wentworth D, Neaton JD: Is there a relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356,222 primary screenees of Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA* 1986; 256:2823-2828.
189. Stangl GI, Roth-Maier DA, Kirchgesner M: Vitamin B12 deficiency and hyperhomocysteinemia are partly ameliorated by cobalt and nickel supplementation in pigs. *J Nutr* 2000; 130:3038-3044.

190. Stangl GI, Schwarz FJ, Jahn B, Kirchgessner M: Cobalt-deficiency-induced hyperhomocysteinemia and oxidative status of cattle. *Br J Nutr* 2000; 83:3-6.
191. Stangl GI, Schwarz FJ, Muller H, Kirchgessner M: Evaluation of the cobalt requirement of beef cattle based on vitamin B12, folate, homocysteine and methylmalonic acid. *Br J Nutr* 2000; 84:645-653.
192. Stenson WF, Parker CW: Metabolism of arachidonic acid in ionophore-stimulated neutrophils. Esterification of a hydroxylated metabolite into phospholipids. *J Clin Invest* 1979; 64:1457-1465.
193. Superko HR: Beyond LDL cholesterol reduction. *Circulation* 1996; 94:2351-2354.
194. Sylvester PW, McInyre BS, Gapor A, Brinsky KP: Vitamin E inhibition of normal mammary epithelial cell growth is associated with a reduction in protein kinase C(alpha) activation. *Cell Prolif* 2001; 34:347-357.
195. Szőke G, Bereczky Zs, Balogh I, Muszbek L: Homocisztein anyagcsere laboratóriumi vizsgálata és klinikai jelentősége a thrombosis hajlam megítélése szempontjából. (I.) Homocisztein metabolizmus és a plazma homociszteinszintjének a meghatározása. *Klin Kísérl Lab Med* 1999; 26:8-14.
196. Tamura T, Johnston KE, Bergman SM: Homocysteine and folate concentrations in blood from patients treated with hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7:2414-2418.
197. Tanaka T, Kanegasaki S, Makino R, Iizuka T, Ishimura Y: Saturated and trans-unsaturated fatty acids elicit high levels of superoxide generation in intact and cell-free preparation of neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 144:606-612.
198. Tepel M, Wischniowski H, Zidek W: Erythropoietin increases cytosolic free calcium concentration and thrombin induced changes in cytosolic free calcium in platelets from spontaneously hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 177:991-997.
199. Terada S, Takizawa M, Yamamoto S, Ezaki O, Itakura H, Akagawa KS: Suppressive mechanisms of EPA on human T cell proliferation. *Microbiol Immunol* 2001; 45:473-481.
200. Tetta C, Biasioli S, Schiavon R, Inguaggiato P, David S, Panichi V, Wratten ML: An overview of hemodialysis and oxidative stress. *Blood Purif* 1999; 17:118-126.
201. Touam M, Zingraff J, Jungers P, Chadefaux-Vekemans B, Drüeke T, Massy ZA: Effective correction of hyperhomocyst(e)inemia in hemodialysis patients by i.v. folinic acid and pyridoxine therapy. *Kidney Int* 1999; 56:2292-2296.

202. Tsien RY, Pozzan T, Rink TJ: Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new intracellularly trapped fluorescent indicator. *J Cell Biol* 1982; 94:325-330.
203. Tsuruoka S, Kawaguchi A, Nishiki K, Hayasaka T, Fukushima C, Sugimoto K, Saito T, Fujimura A: Vitamin E-bonded hemodialyzer improves neutrophil function and oxidative stress in patients with end-stage renal failure. *Am J Kidney Dis* 2002; 39:127-133.
204. Ueland PM, Refsum H, Brattström L: Plasma homocysteine and cardiovascular disease. In: Francis RB Jr, ed. *Atherosclerotic cardiovascular disease, hemostasis, and endothelial function*. New York: Marcel Dekker Inc, 1992; pp 183-236.
205. Uthus EO, Poellot RA: Dietary folate affects the response of rats to nickel deprivation. *Biol Trace Elem Res* 1996; 52: 23-35.
206. Vanholder R, Ringoir S: Polymorphonuclear cell function and infection in dialysis. *Kidney Int Suppl* 1992; 38:S91-S95.
207. van Guldener C, Janssen MJFM, Lambert J, Ter Wee PM, Donker AJM, Stehouwer CDA: Folic acid treatment of hyperhomocysteinemia in peritoneal dialysis patients: no change in impaired endothelial function after long-term therapy. *Perit Dial Int* 1998; 18:282-289.
208. van Guldener C, Janssen MJFM, Lambert J, Ter Wee PM, Jakobs C, Donker AJM, Stehouwer CDA: No change in impaired endothelial function after long-term folic acid therapy of hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13:106-112.
209. Varga Zs, Jacob MP, Csongor J, Robert L, Leovey A, Fülöp T: Altered phosphatidylinositol breakdown after k-elastic stimulation in PMNLs of elderly. *Mech Ageing Dev* 1990; 52:61-70.
210. Varga Zs, Jacob MP, Robert L., Fülöp T: Identification and signal transduction mechanism of elastin peptide receptor in human leukocytes. *FEBS Lett* 1989; 258: 5-8.
211. Varga Zs, Czompa A, Kakuk G, Antus S: Inhibition of superoxide anion release and hydrogen peroxide formation in PMNLs by flavonolignans. *Phytother Research* 2001; 15:608-612.
212. Varga Zs, Kovacs E, Paragh G, Jacob MP, Robert L, Fülöp T: Effect of elastin peptides and n-formyl-methionyl-leucyl phenylalanine on cytosolic free calcium in polymorphonuclear leukocytes of healthy middle-aged and elderly subjects. *Clin Biochem* 1988; 21:127-130.

213. Vellema P, van den Ingh TS, Wouda W: Pathological changes in cobalt-supplemented and non-supplemented twin lambs in relation to blood concentrations of methylmalonic acid and homocysteine. *Vet Q* 1999; 21:93-98.
214. Veys N, Vanholder R, Ringoir S: Correction of deficient phagocytosis during erythropoietin treatment in maintenance hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1992; 19:358-363.
215. Wakabayashi Y, Okubo M, Shimada H, Sato N, Koide A, Marumo F, Nakamura H: Decreased VLDL apoprotein C-II/apoprotein C-III ratio may be seen in both normotriglyceridemic and hypertriglyceridemic patients on chronic hemodialysis treatment. *Metabolism* 1987; 36:815-820.
216. Walter R, Mischak H, Haller H.: Haemodialysis, atherosclerosis and inflammation—identifying molecular mechanisms of chronic vascular disease in ESDR patients *Nephrol. Dial. Transplant* 2002; 17 (Suppl 3): 24-29.
217. Wanner C, Frommherz K, Horl WH: Hypelipoproteinemia in chronic renal failure: pathophysiological and therapeutic aspects. *Cardiology* 1991; 43:202-217.
218. Ward RA, McLeisch KR: Polymorphonuclear leukocyte oxidative burst is enhanced in patients with chronic renal insufficiency. *J Am Soc Nephrol* 1995; 5: 1697-1702.
219. Trace elements in human nutrition and health WHO, Geneva, 1996.
220. Wilcken Del, Dudman NPB, Tyrrell PA, Robertson MR: Folic acid lowers elevated plasma homocysteine in chronic renal insufficiency: possible implications for prevention of vascular disease. *Metabolism* 1988; 37:697-701.
221. Wilcken Del, Gupta VJ: Sulfur containing amino acids in chronic renal failure with particular reference to homocysteine and cysteine-homocysteine mixed disulphide *Eur J Clin Invest* 1979; 9:301-307.
222. Wilson PW, D' Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB: Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* 1998; 97:1837-1847.
223. Yamaguchi T, Kaneda M, Kakinuma K: Effect of saturated and unsaturated fatty acids on the oxidative metabolism of human neutrophils. The role of calcium ion in the extracellular medium. *Biochim Biophys Acta* 1986; 861:440-446.
224. Yang SP, Morita I, Murota SI: Eicosapentaenoic acid attenuates vascular endothelial growth factor-induced proliferation via inhibiting Flk-1 receptor expression in bovine carotid artery endothelial cells. *J Cell Physiol* 1998; 176:342-349.
225. Yoshida N, Yoshikawa T, Manabe H, Terasawa Y, Kondo M, Noguchi N, Niki E: Vitamin E protects against polymorphonuclear leukocyte-dependent adhesion to endothelial cells. *J Leukoc Biol* 1999; 65:757-763.

226. Zittoun J, Tonelli AP, Marquet J, De Gialluly E, Hanock C, Yacobi A, Johnson JB: Pharmacokinetic comparison of leucovorin and levoleucovorin. *Eur J Clin Pharmacol* 1993; 44:569-573.

8. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Az értekezés témakörében megjelent saját közlemények jegyzéke

1. Hársfalvi J, Boda Z, Mikita J, **Kárpáti I**, Kakuk Gy, Rák K: Effect of recombinant human erythropoietin on plasma von Willebrand factor in chronic hemodialysis patients. *Am J Hematol* 1994; 47:144-145. **IF: 1,436**
2. Kakuk Gy, Kárpáti I, Mátyus J: Haemodializált betegek anaemiájának kezelése rekombináns human erythropoietinnel. *Orv Hetilap* 1990; 43:2365-2370.
3. **Kárpáti I**, Paragh G, Kovács É, Balogh Z, Szabolcs M, Szabó J, Kakuk G, Fóris G: Disturbed LDL and scavenger receptor functions in monocytes from chronic haemodialysed patients. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14:2664-2668. **IF: 1,752**
4. **Kárpáti I**: Hyperhomocysteinaemia, mint az atherosclerosis rizikótényezője és jelentősége krónikus veseelégtelenségben. In *Nephrologia* 2000. Szerk: Kakuk Gy, Kárpáti I. Debrecen Airp. Tr. Kft. Debrecen. 2000:69-81.
5. **Kárpáti I**, Seres I, Mátyus J, Ben T, Paragh G, Varga Zs, Kakuk G: Which parameters affect cytosolic free calcium in polymorphonuclear leukocytes of haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16:1409-1415. **IF: 2,432**
6. **Kárpáti I**, Balla J, Szőke G, Bereczky Zs, Páll D, Ben T, Toma K, Katona E, Mohácsi A, Paragh Gy, Varga Zs, Kakuk Gy, Muszbek L: A hyperhomocysteinaemia gyakorisága, folsavpótlásban részesülő hemodializált betegekben. *Orv Hetilap* 2002; 143:1635-1640.
7. Paragh Gy, Asztalos L, Seres I, Balogh Z, Lőcsey L, Kárpáti I, Mátyus J, Katona E, Harangi M, Kakuk Gy: Serum paraoxonase activity changes in uremic and kidney-transplanted patients. *Nephron* 1999; 83:126-131. **IF: 1,696**
8. Paragh Gy, Balogh Z, Mátyus J, **Kárpáti I**, Ujhelyi L, Kakuk Gy, Leövey A: Lipid abnormalities in ureamic patients on chronic haemodialysis. *Acta Med Hung* 1992/93; 49:207-217.
9. Paragh Gy, Seres I, Balogh Z, Katona E, Fülöp P, **Kárpáti I**, Mátyus J, Kakuk Gy: Serum paraoxonáz-aktivitás vizsgálata haemodialyzált, chronicus uraemiában szenvedő betegekben. *Hypertonia és Nephrologia*. 1999; 3(2):106-109.
10. Paragh Gy, Seres I, Balogh Z, Varga Zs, **Kárpáti I**, Mátyus J, Ujhelyi L, Kakuk Gy: The serum paraoxonase activity in patients with chronic renal failure and hyperlipidemia. *Nephron* 1998; 80:166-170. **IF: 1,561**

11. Varga Zs, **Kárpáti I**, Mátyus J, Balla J, Paragh Gy, Seres I, Kakuk Gy: A plazmalipidek, zsírsavak potenciális szerepe a neutrofilek fokozott oxidációs robbanásában krónikus vesebetegek esetében. *Magy Belorv Arch* 1999; 52:249-253.
12. Varga Zs, **Kárpáti I**, Paragh Gy, Buris L, Kakuk Gy: Relative abundance of some free fatty acids in plasma of uremic patients: relationship between fatty acids, lipid parameters, and diseases. *Nephron* 1997; 77:417-421. **IF:1,405**

Egyéb közlemények jegyzéke

1. Kakuk Gy, **Kárpáti I**, Mátyus J, Boján M, Leövey A.: A cefoperazone (Cefobid) alkalmazása veseelégtelenségben szenvedő betegek bakteriális infekcióinak a kezelésében. *Magy Belorv Arch*. 1987; 40:5-12.
2. Kakuk Gy, Kurta Gy, **Kárpáti I**, Mátyus J: Tensiomin (Captopril) alkalmazása hemodialízis programban kezelt hypertoniás betegekben. *Gyógyszereink*. 1988; 38: 268-272.
3. Kakuk Gy, Kurta Gy, **Kárpáti I**, Mátyus J: Estulic (guanfacine) alkalmazása idült veseelégtelenségben szenvedő konzervatív és hemodialízissel kezelt hypertoniás betegekben. *Sand. Rev.* 1989; 89:15-21.
4. Kakuk Gy, Kurta Gy, Mátyus J, **Kárpáti I**: Nitrendipin (Baypress 20) alkalmazása idült veseelégtelenségben szenvedő konzervatív és hemodialízissel kezelt hypertoniás betegekben. *Gyógyszereink* 1990; 40:106-112.
5. Kakuk Gy, Kurta Gy, Mátyus J, **Kárpáti I**: Baypress 20 (nitrendipin) alkalmazása idült veseelégtelenségben szenvedő konzervatív és hemodialízissel kezelt hypertoniás betegekben. *Med. Univ. ter. mell.* 1990;XXIII/4: 5-8.
6. Kakuk Gy, Kurta Gy, **Kárpáti I**, Mátyus J: Use of tensiomin (captopril) in the antihypertensive treatment of haemodialysis patients. *Ther Hung.* 1990; 38(2):71-76.
7. Kakuk Gy, **Kárpáti I**, Mátyus J, Ujhelyi L: Behandlung der renalen Anaemia mit humanem rekombinantem Erythropoietin. Symposium on Nephrology Debrecen 1989. *Ed. Cilag Ag.* 1990:7-12.
8. Kakuk Gy, Balla J, **Kárpáti I**, Mátyus J, Ujhelyi L, Varga Zs, Ben T, Seres I: A karbamilált hemoglobin vizsgálata a krónikus veseelégtelenség predialízis és dialízis stádiumában. *Hypertonia és Nephrologia* 1999; 3:41-44.
9. **Kárpáti I**, Kakuk Gy, Mátyus J, Kurta Gy, Gomba Sz.: A rhabdomyolysis és az akut veseelégtelenség. *Az Orvostud. Akt. Probl.* 1989; 62:127-146.

10. **Kárpáti I**, Kurta Gy, Mátyus J, Ujhelyi L, Kakuk Gy: A heveny veseelégtelenség megelőzése alkohol - és gyógyszerintoxicatio indukálta rhabdomyolysisben. Orv Hetil. 1990; 131:1147-1150.
11. **Kárpáti I**, Kakuk Gy, Mátyus J, Fóris G, Seres I, Kurta Gy: Beneficial effects of erythropoietin on the impaired neutrophil functions of hemodialysed patients. Symposium on Nephrology Debrecen 1989. Ed. Cilag Ag. 1990:13-18.
12. **Kárpáti I**, Lenkey Á, Mátyus J, Ujhelyi L, Balla J, Varga Zs, Paragh Gy, Kakuk Gy: A béta-2-microglobulin hemodialízissal történő eliminációja és a dializáló membrán biokompatibilitása. Magyar Belorv Arch. 1999; 52:231-235.
13. Kovács T, Páll D, Abafalvi Zs, Karányi Zs, Wórum F, Mátyus J, **Kárpáti I**, Balla J, Ujhelyi L, Kakuk Gy: Akut toxikológiai eseteink klinikánk tízéves beteganyagában. Orv Hetil 2002; 143:71-76.
14. Kurta Gy, Kakuk Gy, **Kárpáti I**: Tensiomin (kaptopril) - kezeléssel szerzett tapasztalatok esszenciális hypertoniában. Gyógyszereink. 1989; 39:19-22.
15. Kurta Gy, Kakuk Gy, Juhász I, **Kárpáti I**: Baypress 20 (nitrendipin) - kezeléssel szerzett tapasztalatok esszenciális hypertoniában. Gyógyszereink. 1990; 40:2-10.
16. Kurta Gy, Kakuk Gy, Juhász A, **Kárpáti I**: Baypress-20 (nitrendipin) kezeléssel szerzett tapasztalatok esszenciális hypertoniában. Med.Univ. ter. mell. 1990; XXIII/4: 11-12
17. Mátyus J, **Kárpáti I**, Ujhelyi L, Kakuk Gy: Hemosiderosis - harmful complication of longterm dialysed patients receiving multiple transfusions. Symposium on Nephrology Debrecen 1989. Ed. Cilag Ag. 1990:19-21.
18. Mátyus J, **Kárpáti I**, Ádány R, Kakuk Gy: Cefalosporin antibiotikumok okozta vérzések uraemiás betegekben. Orv Hetil. 1987; 128:2141-2143.
19. Mátyus J, Darida S, Lőcsey L, **Kárpáti I**, Kakuk Gy, Leövey A: Többszörös vesecysták kialakulása és klinikai jelentősége végstádiumú veseelégtelenségben. Orv Hetil. 1988; 129:63-66.
20. Mátyus J, Kakuk Gy, **Kárpáti I**, Ujhelyi L: Renalis anaemia kezelése rekombinans human erythropoietinnel. Gyógyszereink.1993; 43:139-143.
21. Mátyus J, Ujhelyi L, **Kárpáti I**, Tóth Z, Kakuk Gy: Usefulness and risk of erythropoietin therapy in pregnancies of patients with chronic renal insufficiency. Nephrol Dial Transplant. 1996; 11:1670-1671. **IF: 1,693**
22. Mátyus J, Kovács J, Ujhelyi L, **Kárpáti I**, Dalmi L, Kakuk Gy: Interferon kezelés hepatitis C vírus fertőzéshez társult cryoglobulinaemiás membranoproliferatív glomerulonephritisben. Orv Hetil. 1996; 137:2527-2530.

23. Mátyus J, Ujhelyi L, **Kárpáti I**, Kakuk Gy: Increase in the incidence of analgesic nephropathy in Hungary. *Nephrol Dial Transplant*. 1997; 12: 1774-1775. **IF: 1,682**
24. Mátyus J, Kakuk Gy, Tóth Z, Ujhelyi L, **Kárpáti I**, Aranyosi J, Bacskó Gy, Szentkúti A: Erythropoietin alkalmazása terhességben: irodalmi áttekintés két eset kapcsán. *Orv. Hetil*. 1997; 138:1787-1790.
25. Mátyus J, **Kárpáti I**, Ujhelyi L, Balla J, Ben T, Karányi Zs, Kakuk Gy: A hemodialízis-program fejlődése és eredményei Debrecenben 1971-1996 között. *Magy Belorv Arch*. 1999; 52:237-242.
26. Mátyus J, Király T, **Kárpáti I**, Ujhelyi L, Balla J, Paragh Gy, Kakuk Gy: Fibrát okozta súlyos rhabdomyolysis idült veseelégtelen betegekben. *Magy Belorv Arch*. 2001; 54:31-34.
27. Paragh Gy, Balogh Z, Boda J, Kovács P, **Kárpáti I**, Szabó J, Leövey A: Treatment possibility of hypercholesterolaemia associated with hypertriglyceridaemia. *Acta Biol Hung*. 1997; 48:359-367. **IF: 0,239**
28. Paragh Gy, Seres I, Balogh Z, Lócsey L, Asztalos L, Harangi M, **Kárpáti I**, Mátyus J, Kakuk Gy: A szérum paraoxonáz aktivitás változása vesetranszplantáció után. *Hypertonia és Nephrologia* 2000; 4(1):31-36.
29. Paragh Gy, Szabó J, Kovács É, Keresztes T, **Kárpáti I**, Balogh Z, Páll D, Fóris G: Altered signal pathway in angiotensin II-stimulated neutrophils of patients with hypercholesterolaemia. *Cell Sign* 2002; 14:787-792. **IF: 3,398**
30. Szabó Z, Kakuk Gy, Fülöp T, Mátyus J, Balla J, **Kárpáti I**, Juhász A, Kun Cs, Karányi Zs, Lőrincz I: Effects of haemodialysis on maximum P wave duration and P wave dispersion. *Nephrol Dial Transplant*. 2002; 17:1634-1638. **IF: 2,432**
31. Varga Zs, Paragh Gy, **Kárpáti I**, Seres I, Buris L, Kakuk Gy: Granulocytá funkciók és a lipidperoxidáció alakulása kezelésben nem részesült hyperlipoproteinaemias betegekben. *Orv Hetil*. 1997; 138. (Suppl.) II:2301-2304.

Könyvrészletek

1. **Kárpáti I**: A rhabdomyolysis klinikuma és kezelése. *Nephrologiai ismeretek* 1998, Szerk.: Kakuk Gy, Kárpáti I. Ed. Nyomdaipari Szolgáltató KKT, Debrecen 1998:197-207.
2. **Kárpáti I**: Biocompatibilitás és dialysis. *Nephrologiai ismeretek* 1998, Szerk.: Kakuk Gy, Kárpáti I. Ed. Nyomdaipari Szolgáltató KKT, Debrecen 1998:267-276.
3. **Kárpáti I**: Metilalkohol-mérgezés. *Nephrologia* 1999. Szerk.: Kakuk Gy, Kárpáti I. Ed. Debrecen Airport Travel Kft. 1999:215-221.

4. **Kárpáti I:** Autosomalis domináns polycystás vesebetegség. Nephrologia 1999, Szerk.: Kakuk Gy, Kárpáti I. Ed. Debrecen Airport Travel Kft. 1999:263-272.
5. **Kárpáti I:** A cholesterinkristály-embolizáció klinikai spektruma. Nephrologia 2000. Szerk: Kakuk Gy, Kárpáti I. Ed. Debrecen Airport Travel Kft. 2000:329-342.
6. **Kárpáti I:** Cholesterinkristály-embolizáció percután transluminális angioplastica után. Nephrologia 2000. Szerk.: Kakuk Gy, Kárpáti I. Ed. Debrecen Airport Travel Kft. 2000:349-355.
7. Kakuk Gy, **Kárpáti I:** Belgyógyászati vesebajok. In: Klinikai alapismeretek fogorvos- és gyógyszerészhallgatóknak Szerk: Boda Z, Bakó Gy. Medicina Könyvkiadó Rt. Budapest, 2001; 245-269
8. **Kárpáti I:** A veseerek occlusív betegségei. In: Klinikai nephrologia. Szerk: Kakuk Gy. Medicina Könyvkiadó Rt. (VII. fejezet 1-19 o., megjelenése folyamatban).
9. **Kárpáti I: Akut veseelégtelenség.** In: Klinikai nephrologia. Szerk: Kakuk Gy. Medicina Könyvkiadó Rt. (XII. fejezet 1-47 o., megjelenése folyamatban).

Módszertani ajánlások

1. Glomerulonephritisek vizsgálata és kezelése. Módszertani ajánlás. Szerk: Mátyus János Hypertonia és Nephrologia 2000; 4(4):171-186.
2. A dialíziskezelés útmutatója (MNT-ADU'98). Magyar Nephrologiai Társaság – Szakmai irányelvek. Hypertonia és Nephrologia 1998; S2 (4): 113-220.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki *Prof. Dr. Kakuk Györgynek*, az I. sz. Belgyógyászati Klinika intézetvezetőjének, aki 1982-ben a munkacsoportjába fogadott, megtanított a belgyógyászati és nephrologiai szakmára, irányította és segítette a tudományos munkámat és szüntelenül buzdított e munka elkészítésére. Hálával gondolok minden klinikai, tudományos, oktatási és emberi segítségére.

Köszönettel tartozom *Prof. Dr. Leövey Andrásnak*, az I. sz. Belgyógyászati Klinika előző intézetvezetőjének, aki 1981-ben felvett a Klinikára és segítette a klinikai és tudományos munkámat.

Köszönöm *Prof. Dr. Nagy Juditnak* a Pécsi Tudományegyetem II. sz. Belklinika és Nephrologiai Centrum vezetőjének, hogy tudományos és klinikai munkámat figyelemmel kísérte és kitartóan lelkesített e munka elkészítésére.

Köszönetemet fejezem ki *Prof. Dr. Fóris Gabriellának*, akinek fontos szerepe volt a tudományos munkám elindításában.

A legtöbb hálával és köszönettel *Dr. Varga Zsuzsának* – az I. sz. Belgyógyászati Klinika tudományos főmunkatársának – tartozom, akinek mindenre kiterjedő lelkes segítése, tanácsa, útmutatása és ösztönzése nélkülözhetetlen volt e munka elkészítésében.

Köszönöm *Prof. Dr. Paragh Györgynek* a tudományos segítségét és együttműködését.

Köszönöm *Dr. Balla József docens úrnak* tudományos tanácsait és baráti segítségét.

Köszönettel tartozom *Prof. Dr. Muszbek Lászlónak* és *Prof. Dr. Sipka Sándornak* a kollaborációs lehetőségeikért.

Köszönöm *Dr. Seres Ildikónak* a kísérletekben nyújtott nélkülözhetetlen segítségét.

Hálával és köszönettel tartozom az I. sz. Belgyógyászati Klinika Kutató laboratóriuma minden munkatársának.

Köszönöm közvetlen munkatársaim – *Dr. Mátyus János, Dr. Páll Dénes, Dr. Jenei Zoltán, Dr. Trinn Csilla* és *Dr. Ujhelyi László* – klinikai és tudományos együttműködését és baráti segítségét.

Értékes munkáját ezúton is köszönöm a Dialízis Osztály minden dolgozójának, különösen *Szladek Árpádné* főnővérnek.

Köszönetet mondok *Csiki Attilánénak* technikai segítségéért.

Szavakban ki nem fejezhető hálával és szeretettel gondolok *szüleimre, feleségemre, kislányomra* és *testvéreimre*, akiknek féltő szeretete és gondoskodása nélkülözhetetlen volt ebben a munkámban is.