

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**A nikkell hatásának vizsgálata a homocisztein
metabolizmusra hemodializált vesebetegekben és
in vitro perifériás mononukleáris sejtekben**

Katkó Mónika

Témavezető:

Dr. Varga Zsuzsa

Prof. Dr. Paragh György



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2016

**A nikkkel hatásának vizsgálata a homocisztein metabolizmusra
hemodializált vesebetegekben és
in vitro perifériás mononukleáris sejtekben**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Katkó Mónika okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
(Membránbiofizikai kérdések és vizsgálómódszerek programja) keretében

Témavezető: Dr. Varga Zsuzsa†, PhD és Prof. Dr. Paragh György, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Pucsek József, az MTA doktora
Dr. Bacsó Zsolt, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet
2016. szeptember 20. 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Wittmann István, az MTA doktora
Dr. Szűcs Sándor, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Pucsek József, az MTA doktora
Prof. Dr. Wittmann István, az MTA doktora
Dr. Bacsó Zsolt, PhD
Dr. Szűcs Sándor, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2016. szeptember 20. 13:00 óra

Bevezetés

A homocisztein a metionin metabolizmusa során keletkező kéntartalmú aminosav. Első lépésben a metioninból S-adenozil-metionin (SAM) képződik. A SAM metilcsoport-donor szerepet tölt be számos transzmetiláz által katalizált reakcióban. A metilcsoport átadása után a SAM-ból S-adenozil-homocisztein (SAH) keletkezik. A SAH hidrolízise a homocisztein képződésének egyetlen módja. Minden emlős sejt képes a homociszteint a metionin szintáz segítségével remetilálni, ez a reakció zárja a metionin-homocisztein ciklust, és kapcsolja a folsav-ciklushoz. A ciklus egyes reakcióinak enzimeire a szubsztrát és a termék koncentrációkon kívül a cikluson belül távolabb szereplő molekulák is hatnak, így válik lehetővé a sejt igényeinek megfelelő mértékű metionin regeneráció. A homocisztein a transzszulfurációs útként ismert folyamat során lép ki a ciklusból, melynek első lépését a cisztationin- β -szintáz (CBS) katalizálja. Működése megfelelő metionin és SAM ellátottság esetén dominál. A CBS aktivitását a SAM és az oxidatív stressz fokozza. A reakció során keletkező cisztationin bontása az egyedüli folyamat a szervezetben, ami *de novo* cisztein szintézishez vezet. A cisztein koncentrációja a glutation szintézis sebességmeghatározó tényezője. A glutation jelentős szerepet tölt be a sejtek redox homeosztázisának fenntartásában.

A homocisztein anyagcserében bekövetkező kóros változások mutatója a plazmában felhalmozódó homocisztein. Ezt az állapotot nevezzük hyperhomocysteinaemiának. A plazma össz-homocisztein szintjét a genetikai és a környezeti faktorok együtt alakítják. Számos öröklődő enzim defektus okoz emelkedett homocisztein szintet. A homocisztein anyagcsere vitaminigényes folyamat, így az érintett vitaminok (folsav, B₆, B₁₂) nem megfelelő bevitele a homocisztein szint emelkedését okozza, amit a táplálék fehérjéinek metionin tartalma is befolyásol. Krónikus veseelégtelenségben már a kezdeti stádiumtól megfigyelhető a plazma homocisztein szint emelkedése, mely szoros összefüggést mutat a glomerulus filtrációs ráta csökkenésével. A homocisztein és a homocisztein metabolizmusban fontos szerepet játszó molekulák (pl. SAH, SAM)

kiválasztásának, valamint a homocisztein renális metabolizmusának csökkenése, az urémiás toxinok enzimekre gyakorolt kedvezőtlen hatása, és a vesebetegek elégtelen vitaminellátottsága mind hozzájárulhatnak a hyperhomocysteinaemia kialakulásához.

Az emelkedett plazma homocisztein koncentráció az atherosclerosis és a trombózis független kockázati tényezője. A homocisztein számos ponton gyakorol kedvezőtlen hatást az érrendszerre a lipid metabolizmus, az extracelluláris mátrix fehérjéinek szintézise, a gyulladásozó reakciók és az oxidatív stressz befolyásolásával. A homocisztein gátolja az endoteliális nitrogén-monoxid szintáz működését, csökkenti egyes antioxidáns enzimek expresszióját és aktivitását, ezzel fokozza az oxidatív stresszt. Mindezek következtében csökken a nitrogén-monoxid szintézis és a nitrogén-monoxid szabadgyökök általi inaktiválódása fokozódik, tehát a homocisztein károsítja az endotélfüggő vazodilatációt. A homocisztein fokozza a leukocita migráció folyamatában fontos szereppel bíró monocita kemotaktikus fehérje-1 és az interleukin-8 expresszióját, kedvező feltételeket teremtve ezzel az érlemezés kialakulásának és progressziójának. A homocisztein a hemosztázist a véralvadás irányába tolja el, mivel fokozza a szöveti faktor aktivitását, gátolja a trombosmodulin expresszióját, a proteín C aktivációját, valamint az Va faktor aktivált proteín C általi inaktivációját, tehát fokozza a trombózishajlamot. A homocisztein szint emelkedésével a homocisztein-tiolakton képződés is fokozódik. A homocisztein-tiolakton apoptózist indukál, és toxikusabb, mint maga a homocisztein; a fehérjék lizin oldalláncához kapcsolódva (N-homociszteiniláció) növeli azok oxidációra való hajlamát, az intramolekuláris diszulfidhíd képződés és a multimerek kialakulásának gyakoriságát, ami a fehérjék funkcióvesztését okozza, illetve autoimmun választ indukál. A homocisztein felhalmozódása gátolja a SAH hidrolízisét, növeli az SAH koncentrációt, csökkenti a SAM-függő transzmetilázok aktivitását, ami hypometilációhoz vezet. A metilációs folyamatokban bekövetkező zavar elősegíti a daganatos megbetegedések kialakulását. Az emelkedett homocisztein koncentráció növeli a

velőcsőzáródási rendellenességek megjelenését, és szerepet játszik bizonyos neurodegeneratív kórképekben.

A hyperhomocysteinaemia mérséklésére a fokozott vitaminbevitel (folsav, B₆, B₁₂) hatékonyságát számos tanulmány igazolta. A krónikus vesebetegek hyperhomocysteinaemiája is a legtöbb esetben csökkenthető a vitaminbevitel növelésével. A súlyos hyperhomocysteinaemia mérséklése vitaminpótlással jelentősen csökkentette a betegek körében bekövetkező szív és érrendszeri megbetegedések számát. Enyhe hyperhomocysteinaemia esetén a vitaminpótlással csökkentett homocisztein szint kardiiovaszkuláris rizikót csökkentő hatását viszont nem sikerült egyértelműen bizonyítani sem az általános populációban, sem a végstádiumú vesebetegek és a vesetranszplantáltak körében. Egyes vizsgálatokban a hemodializált végstádiumú vesebetegek körében az alacsony homocisztein szint rosszabb prognózissal járt. Ezek a megfigyelések felvetik más faktorok szerepét, melyek hatnak mind a homocisztein metabolizmusra, mind a kardiiovaszkuláris kockázatra és a túlélésre. A homocisztein anyagcsere befolyásolásának további lehetőségeit állatkísérletekben vizsgálták és bizonyították. B₁₂-vitamin hiány esetén a nikkel és a kobalt csökkenti a homocisztein szintet. Rézhiányos patkányokban a homocisztein szint csökkenését találták.

A nikkel, a kobalt és a réz átmeneti fémek. Fiziológias körülmények között többféle vegyértékű formában fordulhatnak elő, így szerepük van elektronátadással járó reakciókban enzimek alkotórészeként, illetve a reaktív oxigén eredetű intermedierek (ROI) képződésének folyamatában. Magasabb rendű állatok élettani folyamataiban a nikkel nélkülözhetetlen szerepét nem igazolták, de állatkísérletekben a nikkel megvonásnak többek között a növekedésre, szaporodásra és májműködésre gyakorolt kedvezőtlen hatását leírták. A kobalt a B₁₂-vitamin alkotórésze, így számos enzim működéséhez elengedhetetlen. A réznek szerepe van a vérképzésben, és számos rézdependens enzim ismert. Nagy mennyiségben a nikkel, a kobalt és a réz is toxikus hatású. Oxidatív stresszt generálnak. A nikkel által kiváltott ROI termelésben a nikkel(II)-tiol komplexek

molekuláris oxigénnel és/vagy lipidhidroperoxidokkal történő reakciója játssza a fő szerepet. A nikkellal kontakt dermatitis kiváltó hatását immunmoduláló és immuntoxikus tulajdonságai magyarázzák. A nikkellal és a kobalt karcinogén hatásáért a DNS-hez és magfehérjékhez történő kötődés és a repair mechanizmusok gátlása a felelős. A nikkellal a sejtek vas homeosztázisát megzavarja, extracelluláris szinten a vas transzportjának akadályozásával, intracellulárisan pedig bizonyos vas-tartalmú enzimek aktív helyéről a vas leszorításával.

Célkitűzések

- Vizsgálni kívántuk a nikkellal, a kobalt és a réz koncentrációjának alakulását hemodializált végstádiumú vesebetegekben és egészséges populációban, valamint ezek összefüggését a homociszteinnel, a folsavval és B₁₂-vitaminnal szinttel, a vas anyagcsere paramétereivel, a tápláltság és a gyulladás markereivel.
- A homociszteinnel metabolizmus *in vitro* tanulmányozására olyan sejtes modell-rendszer kialakítását tűztük ki célul, melyben mind a remetiláció, mind a transzszulfuráció enzimek igazoltan jelen vannak, és egyidejűleg alkalmas egyedi különbségek feltárására is, ugyanakkor a mintagyűjtés nem igényel invazív beavatkozást.
- Az így kialakított modell segítségével a homociszteinnel szinttel összefüggést mutató elemek homociszteinnel metabolizmusra gyakorolt hatásának vizsgálatát tűztük ki további célul a hemodializált betegek és egészségesek szérumban mért koncentrációtartományban.

Betegek és módszerek

A hemodializált betegek és az egészséges populáció vizsgálata

122 végstádiumú, hemodialízis programban kezelt vesebeteget (57 nő és 65 férfi) vontunk be a vizsgálatba átlagéletkoruk $60,1 \pm 12,3$ év. Hemodialízis kezelésük a szakmai előírásoknak megfelelően történt. 50 fő (31 nő és 19 férfi) alkotta az egészségesek csoportját, átlagéletkoruk $37,2 \pm 10,1$ év; kizáró tényezők voltak a hypertonia, metabolikus eltérések, akut fertőzések, máj- és vesefunkció eltérések, valamint a 25 kg/m^2 -nél nagyobb testtömeg index (BMI). A vizsgálatot a Debreceni Egyetem Intézményi Kutatásetikai Bizottsága engedélyével végeztük. A betegek és az egészséges személyek írásos tájékoztatót kaptak és beleegyeztek a vizsgálatban való részvételbe. A vérvétel 12 óra éhezést követően, a hemodializált betegek esetében közvetlenül dialízis előtt történt.

Az összfehérje, az albumin, a hemoglobin, a C reaktív fehérje (CRP), a vas, a ferritin, a transzferrin szaturáció, a B₁₂-vitamin és a folsav szint mérése a Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetben történt standard laboratóriumi módszerekkel. A szérum interleukin-6 (IL-6) koncentrációját ELISA technikával határoztuk meg. A plazma össz-homocisztein koncentrációja nagy nyomású folyadékkromatográfia (HPLC), a nyomelem meghatározások induktív csatolású plazma tömegspektrometria (ICP-MS) módszerrel történtek.

In vitro vizsgálatok

A perifériás mononukleáris sejteket egészséges egyének heparinnal alvadásgátolt véréből sűrűséggrádiens centrifugálással nyertük. A sejtszámot 1×10^6 sejt/ml-re állítottuk RPMI tápfolyadékban; a tápfolyadékhoz adtuk megfelelő koncentrációban a nikkel-kloridot, a kobalt-kloridot és a réz-szulfátot, illetve egyes vizsgálatokban L-metionint, L-ciszteint, L-homociszteint és redukált glutationt. Az L-homociszteint a homocisztein-tiolakton lúgos hidrolízisével állítottuk elő. A sejteket 24 lyukú sejtenyésztő plate-ben 24, 48 vagy 72 óráig inkubáltuk (37°C,

5% CO₂ + 95% levegő, 80 % páratartalom). A sejtek stimulációjához 10 % hőinaktivált borjúsérumot (FBS) tartalmazó RPMI tápfolyadékban Concanavalin A vagy Phytohemagglutinin növényi lektineket használtunk.

A sejtek életképességét tiazolkékfestéssel (MTT-teszt) vizsgáltuk. Az apoptózis indukáló hatást a perifériás mononukleáris sejtek által termelt interleukin-2 (IL-2), tumor nekrosis faktorhoz hasonló apoptózist indukáló ligand (TRAIL) és a Fas ligand (FasL) ELISA módszerrel történő mérésével vizsgáltuk.

A sejtek intracelluláris homocisztein, glutation, SAH és SAM koncentrációját, valamint a felülúszóban megjelenő homocisztein mennyiségét HPLC segítségével határoztuk meg. A tiolok esetén fluoreszcens detektort, a SAH és SAM esetén UV detektort használtunk.

A metionin szintáz aktivitásának meghatározásához a sejtizátumot tartalmazó reakcióelegyhez adott metil-tetrahidrofolát egységnyi idő alatt történő tetrahidrofoláttá alakulását mértük spektrofotométerrel. A cisztationin- β -szintáz aktivitásának mérését a sejtizátumot tartalmazó reakcióelegy L-homocisztein tartalmának egységnyi idő alatti csökkenését mértük Ellman's reagens segítségével. A fehérje meghatározás a Lowry és mtsai (1951) által leírt módon történt.

A metilcsoport beépülésének méréséhez a sejteket L-[metil-¹⁴C]metionin jelenlétében inkubáltuk. A DNS és lipid frakciókban vizsgáltuk a beépült radioaktívan jelölt metil-csoport mennyiségét. A DNS metiláltsági fokának meghatározásához a sejtekből nyert DNS-t ELISA módszerrel dolgoztuk fel. A nikkel által indukált ROI termelés méréséhez a sejtek által felvett 2',7'-dichlorofluorescin diacetát hidrolizált formájának ROI hatására oxidálódott fluoreszcens termékének keletkezését mértük.

A cisztationin- β -szintáz mRNS expresszióját kvantitatív polimeráz láncreakció (qPCR), fehérje expresszióját Western blot technikával vizsgáltuk.

Statisztikai analízis

A statisztikai elemzéshez STATISTICA 7 (Statsoft, Inc.) programot használtunk. Adataink eloszlását Kolmogorov-Smirnov teszt alkalmazásával elemeztük. A folytonos változók közötti összefüggéseket korreláció analízissel vizsgáltuk. A paraméterek csoportok közötti összevetésére a Student's t próba vagy a Mann-Whitney U teszt szolgált. Az *in vitro* vizsgálatok eredményeinek kiértékeléséhez varianciaanalízist (ANOVA) Newman-Keuls post hoc teszttel és párosított t próbát használtunk. A $p < 0.05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. Az eredmények ismertetése során a labor paraméterek medián értékeit adtuk meg.

Eredmények és megbeszélés

A szérum nyomelem szintek, a plazma homocisztein szintek, a vasanyagcsere, a tápláltság és a gyulladás egyes paramétereinek vizsgálata

A vizsgált hemodializált vesebetegek körében a vitaminpótlásnak köszönhetően folsav és B₁₂-vitamin hiányt nem találtunk. A szérum folsav és B₁₂-vitamin szintek negatívan korreláltak az össz-homocisztein szinttel ($r = -0.30$, $p < 0.01$ a folsav esetén és $r = -0.35$, $p < 0.001$ a B₁₂-vitamin esetén), ami a vitaminpótlás homocisztein szint csökkentő hatását jelzi, ugyanakkor a magas vitaminszintek ellenére is enyhe hyperhomocysteinaemia volt jellemző a betegekre (20.7 $\mu\text{mol/l}$). A hemodializáltakban az egészséges csoporthoz képest a krónikus gyulladást jelző szignifikánsan emelkedett CRP (4.8 vs 1.1 mg/l, $p < 0.01$) és IL-6 (7.7 vs 2.2 ng/ml, $p = 0.001$), valamint szignifikánsan alacsonyabb albumin (38 vs 48 g/l, $p = 0.0001$) és összfehérje (69 vs 77 g/l, $p = 0.0001$) szinteket találtunk. A korábban a hemodializált betegek tápláltsági állapotának markereként használt szérum albuminszintet újabban az általános egészségi állapot jelzőjeként is említik,

csökkenésében többek között a krónikus gyulladásnak, a fertőzéseknek, a perifériás érbetegségeknek, az urémiának és az acidosisnak van szerepe. A szérumban az albumin és az összes fehérje szint csökkenése hemodializáltakban rosszabb prognózist jelent. Jelentősen emelkedett a ferritin szintet találtunk a hemodializált betegek körében (400 vs 37 µg/l), ami a gyulladás és a funkcionális vashiány markere, utóbbi következménye az egészségesekhez képest szignifikánsan alacsonyabb hemoglobinszint (115 vs 135 g/l, $p = 0.0001$) és szérumban a vas koncentráció (10 vs 17 µmol/l, $p = 0.0001$) a hemodializáltakban.

Végstádiumú vesebetegségben az alultápláltság mérsékli a hyperhomocysteinaemiát, így az össz-homocisztein szint csökkenése az alultápláltság és a gyulladás fokozódásának markere is lehet. Ezt támasztja alá az a megfigyelésünk, hogy a vizsgált betegekben a CRP negatívan ($r = -0.23$, $p = 0.02$), a hemoglobin ($r = 0.33$, $p = 0.0001$) és az albumin ($r = 0.32$, $p < 0.001$) szint pozitívan korrelált az össz-homocisztein szinttel. Ugyanakkor a vizsgált egészséges populációban, ahol az alultápláltság és a generalizált gyulladás nem jellemző, a homocisztein szint az IL-6 koncentrációval pozitívan korrelált ($r = 0.33$, $p = 0.01$). Ez alapján feltételezhető, hogy a homociszteinnek már a normál tartományon belüli emelkedése is kedvezőtlen hatású, és befolyásolja a gyulladást okozó folyamatokat.

Az általunk vizsgált elemek, a kobalt (0.3 vs 0.15 µg/l, $p = 0.0001$), a réz (1214 vs 990 µg/l, $p = 0.05$) és a nikkel (3.2 vs 2.1 µg/l, $p = 0.04$) szintjének szignifikáns emelkedését találtuk a hemodializált betegek szérumban az egészségesekhez képest. Mindhárom elem esetében találhatunk az irodalomban a megfigyeléseinket igazoló, vagy annak ellentmondó eredményeket. A kobalt, a réz és a nikkel felhalmozódás megléte vagy hiánya hemodializált betegekben egyes általunk nem vizsgált környezeti tényezőktől is függhet.

Az össz-homocisztein szint a vizsgált hemodializált betegekben szignifikáns negatív összefüggést mutatott a szérumban a nikkel szinttel ($r = -0.29$, $p < 0.01$), viszont a szérumban a kobalt és a réz koncentrációjával nem korrelált. A

továbbiakban arra kerestük a választ, hogy a felismert összefüggés jelezheti-e a nikkel homocisztein metabolizmusban betöltött szerepét humán vonatkozásban.

A nyugvó perifériás mononukleáris sejtek homocisztein metabolizmusának vizsgálata

A perifériás mononukleáris sejtek (T-limfociták, B-limfociták, monociták és NK-sejtek) egyszerűen és gyorsan izolálhatóak vérből, bennük a többi emlős sejthez hasonlóan működik a metionin ciklus. Korábban már igazolták, hogy a perifériás mononukleáris sejtek aktivációt követő proliferációja a sejtek homocisztein szintézisének jelentős emelkedésével jár, ami hozzájárulhat az immunrendszer aktiválódásához társuló hyperhomocysteinaemia kialakulásához. Keveset tudunk azonban a nyugvó mononukleáris sejtek homocisztein metabolizmusáról, főleg a transzszulfurációs út működéséről. Vizsgálataink során igazoltuk, hogy a nyugvó perifériás mononukleáris sejtekben *in vitro* folyamatos homocisztein szintézis zajlik, és a képződött homocisztein egy része megjelenik a tápfolyadékban egészen az intra- és extracelluláris homocisztein szintekben kialakuló egyensúly eléréséig. A transzmetilázok aktivitását jelzi, hogy a radioaktívan jelölt metilcsoportot tartalmazó metioninról a jelzés a sejtek lipidjeibe és DNS-ébe került. Ismert, hogy stimulált mononukleáris sejtek homocisztein termelését a tápfolyadékhoz adott metionon szignifikánsan emeli. Nyugvó sejtek esetén is azt tapasztaltuk, hogy a homocisztein szintézisük metionin-függő. A feltárt sejtekből mért metionin szintáz aktivitás értékében csak metionin megvonás hatására találtunk szignifikáns emelkedést ($115 \pm 8\%$, $p < 0.05$) feltételezhetően a metionin regeneráció megnövekedett igényének megfelelően, ami a remetilációs potenciál állandóságát jelzi kielégítő metionin ellátottság mellett.

Az a megfigyelésünk, hogy a cisztein megvonás a kontroll $20 \pm 5\%$ -ára ($p < 0.001$) és a tápfolyadékhoz adott L-homocisztein ($100 \mu\text{mol/l}$) a kontroll $65 \pm 19\%$ -ára ($p <$

0.05) csökkentette, míg a glutation (100 $\mu\text{mol/l}$) a kontroll 115 \pm 30%-ára emelte ($p < 0.05$) az intracelluláris homocisztein koncentrációt, azaz a homocisztein szintjét a cisztein- és glutationigény, valamint a homociszteintöbblet is befolyásolta, a transzszulfurációs útvonal aktivitására utal nyugvó sejtekben. Tíz egészséges önkéntestől származó sejtek felhasználásával igazoltuk a CBS mRNS expresszióját nyugvó perifériás mononukleáris sejtekben (CBS/GAPDH mRNS arány: 0,964 \pm 0,28). A továbbiakban Western blot segítségével igazoltuk, hogy a nyugvó és stimulált perifériás mononukleáris sejtekben a CBS fehérje is jelen van. Pozitív kontrollként a humán májkarcinóma eredetű HepG2 sejteket használtuk, ebben a sejtvonalban igazoltan expresszálódik a CBS enzim. A CBS enzimaktivitását is mértük, ami egészséges önkéntesektől származó perifériás mononukleáris sejtekben pozitívan korrelál a CBS fehérje GAPDH fehérjéhez viszonyított mennyiségével ($r = 0.526$, $p = 0,001$). A CBS fehérje mennyisége és mért aktivitása nyugvó sejtekben növekszik az eltelt idővel és stimuláció hatására. A CBS allosztérikus aktivátora a SAM, melyet az enzimaktivitás mérésekor a reakcióelegyhez adva, a CBS aktivitás szignifikáns fokozódását tapasztaltuk (a kontroll 202 \pm 25%-a, $p < 0.001$).

A perifériás mononukleáris sejtek tehát nemcsak stimuláció hatására, hanem nyugvó állapotban is aktív részesei lehetnek a plazma homocisztein szint alakításának. Kóros állapotokban, pl. vesebetegség esetén a fokozott oxidatív stressz és a felhalmozódó urémiás toxinok jelentősen befolyásolhatják a keringő mononukleáris sejtek homocisztein metabolizmusát. A homocisztein katabolizmusában kulcsszerepet játszó CBS expresszálásával, a perifériás mononukleáris sejtek is részt vehetnek a homocisztein eliminálásában, detoxifikálásában hyperhomocysteinaemia esetén.

A nikkell hatása a perifériás mononukleáris sejtek homocisztein metabolizmusára

A nikkell hatását a hemodializált betegek, illetve egészségesek szérumában

általunk mért koncentrációtartományban vizsgáltuk a perifériás mononukleáris sejtek homocisztein metabolizmusára. Az általunk végzett vizsgálatokban a vízdékony nikkell(II)-t használtuk az egészséges kontrollokban, illetve a vesebetegekben meghatározott koncentráció tartományban (1-10 $\mu\text{g/l}$). A nyugvó perifériás mononukleáris sejtekben a nikkell koncentrációfüggő módon csökkentette a homocisztein, glutation és a SAH intracelluláris mennyiségét 79 ± 6 , 70 ± 13 és 85 ± 10 %-ra 24 óra inkubálás során, miközben a SAM intracelluláris koncentrációja, valamint a felülúszóban mérhető homocisztein és glutation mennyisége nem változott szignifikánsan. A nikkell ismert ROI generáló és glutation depletáló hatása alapján megismételtük a vizsgálatot $100 \mu\text{mol/l}$ redukált glutation tápfolyadékhoz adásával. A glutation szupplementáció kivédte a nikkell hatását. Megállapítottuk, hogy a nikkell az általunk használt kis koncentrációtartományban ($\leq 25 \mu\text{g/l}$), nem befolyásolja sem a nyugvó, sem a stimulált perifériás mononukleáris sejtek életképességét, nem befolyásolja a TRAIL és FasL kiáramlást és az IL-2 termelést. A SAM/SAH arány növekedése ellenére a nikkell nem befolyásolta a nyugvó perifériás mononukleáris sejtek DNS-ének metiláltsági fokát. A nikkell koncentrációfüggő módon (1-25 $\mu\text{g/l}$) intracelluláris ROI termelést indukál nyugvó perifériás mononukleáris sejtekben. A homocisztein metabolizmusában a CBS enzimnek fontos szerepe van a glutationfüggő redox homeosztázis fenntartásában, aktivitásának szabályozásában fontos szerepet tölt be a ROI mennyisége egy hem kofaktoron keresztül. Nikkell jelenlétében inkubált, majd feltárt nyugvó, valamint stimulált perifériás mononukleáris sejtekből mérhető CBS aktivitás magasabb volt. Az ezzel párhuzamosan elvégzett Western blot eredménye sem a CBS fehérje mennyiségének növekedését, sem a szabadgyök-mediált célzott proteolízis bekövetkezését nem igazolta nikkell hatására. A CBS aktivitásának meghatározását elvégeztük közvetlenül izolálás után feltárt perifériás mononukleáris sejtekből is, és azt tapasztaltuk, hogy a nikkell közvetlenül a reakcióelegyhez adva is kifejti aktivitásfokozó hatását (a kontroll $207\pm 60\%$ -a, $p < 0.01$), és ez a hatás a SAM

általi indukcióval összeadódik. A nikkelt tehát úgy fokozza a CBS aktivitását, hogy az megőrzi SAM kötő képességét. Ezek alapján feltételezzük, hogy a nikkelt hatására keletkező kis mennyiségű ROI a hem vas oxidálásával játszhat szerepet a CBS aktivitás fokozódásában.

Összefoglalás

A veseműködés beszűkülésével a szervezet homocisztein metabolizmusa zavart szenved, és sem a hemodialízis kezeléssel, sem a homocisztein eliminálásában szerepet játszó vitaminok pótlásával nem szüntethető meg a hyperhomocysteinaemia. A vizsgálatunkban szereplő hemodializált betegek körében is jellemző volt ez a kardiovaszkuláris rizikót fokozó anyagcserezavar. A betegek laboreredményei között talált összefüggések arra utalnak, hogy végstádiumú vesebetegségben a hyperhomocysteinaemia mérséklődése gyakran együtt jár az alultápláltság és a gyulladás mértékének fokozódásával, így az alacsonyabb homocisztein szint kedvezőbb hatása nem érvényesül.

A hemodializált betegek körében nagyobb eséllyel alakul ki az esszenciális nyomelemek hiánya és a toxikus elemek felhalmozódása. Munkánk során a nikkelt, a kobalt és a réz felhalmozódását találtuk hemodializált betegekben. Elsőként vizsgáltuk, hogy ebben a betegcsoportban ezek az elemek összefüggést mutatnak-e a homocisztein metabolizmusának rendellenességével, vagy a túlélésüket jelentősen befolyásoló gyulladás és alultápláltság paramétereivel. Statisztikailag szignifikáns negatív összefüggést találtunk a szérumban a nikkelt és a plazma össz-homocisztein szintek között.

A nyomelemek hatásának tanulmányozásához a perifériás vérből izolálható nyugvó mononukleáris sejteket használtuk, ehhez első lépésben vizsgáltuk a sejtek homocisztein metabolizmusát. Igazoltuk, hogy a nyugvó perifériás mononukleáris sejtek is rendelkeznek a homocisztein katabolizmusáért felelős transzszulfurációs útvonal első lépéséhez szükséges aktív CBS enzimmel.

Megállapítottuk, hogy ezek a sejtek nyugvó állapotban is jelentősen hozzájárulhatnak a szervezet homocisztein homeosztázisához. Vizsgálatainkkal a homocisztein metabolizmus vizsgálatához szükséges modellt alakítottunk ki, mely alkalmas lehet az individuális különbségek feltárására is.

Igazoltuk, hogy a nyugvó perifériás mononukleáris sejtek homocisztein metabolizmusa befolyásolható fiziológias koncentrációjú nikkellel. Igazoltuk, hogy a nikkel hatásmechanizmusában a CBS enzim szabadgyök-mediált aktivitás fokozódása játszik szerepet. Ezt a hatást az enzim hemet tartalmazó doménjére hatva fejtheti ki. A nikkel koncentrációjának emelkedése hemodializált betegekben ugyan fokozhatja a homocisztein eliminálását, de a feltételezett hatásmechanizmus a vesebetegekre jellemző fokozott oxidatív stressz további növekedését jelenti, és mivel a nikkel interferál a vasanyagcserével az egyébként is kedvezőtlen vas anyagcsere profilt tovább ronthatja.



Nyilvántartási szám: DEENK/118/2016.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Katkó Mónika
Neptun kód: DB3V83
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10027768

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

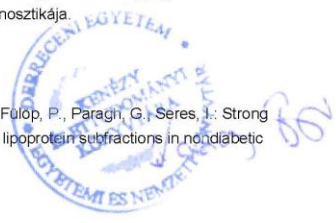
1. **Katkó, M.**, Zavaczky, E., Jeney, V., Paragh, G., Balla, J., Varga, Z.: Homocysteine metabolism in peripheral blood mononuclear cells: Evidence for cystathionine beta-synthase activity in resting state.
Amino Acids. 43 (1), 317-326, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-011-1080-2>
IF:3.914
2. **Katkó, M.**, Kiss, I., Kárpáti, I., Kádár, A., Mátyus, J., Csongrádi, É., Posta, J., Paragh, G., Balla, J., Kovács, B., Varga, Z.: Relationship between serum nickel and homocysteine concentration in hemodialysis patients.
Biol. Trace Elem. Res. 124 (3), 195-205, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12011-008-8139-2>
IF:1.013





További Közlemények

3. Zsiros, N., Koncsos, P., Lőrincz, H., Seres, I., **Katkó, M.**, Szentpéteri, A., Varga, V.E., Fülöp, P., Paragh, G., Harangi, M.: Paraoxonase1 arylesterase activity is an independent predictor of myeloperoxidase levels in overweight patients with or without cardiovascular complications. *Clin. Biochem.* "Accepted by Publisher" (2016)
IF:2.275 (2014)
4. Galgóczi, E., Jeney, F., Gazdag, A., Erdei, A., **Katkó, M.**, M. Nagy, D., Ujhelyi, B., Steiber, Z., Gyóry, F., Berta, E., Nagy V., E.: Cell density dependent stimulation of PAI-1 and hyaluronan synthesis by TGF- β in orbital fibroblasts. *J. Endocrinol.* "Accepted by Publisher" (2016)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1530/JOE-15-0524>
IF:3.718 (2014)
5. Erdei A., Gazdag A., Bodor M., Berta E., **Katkó M.**, Ujhelyi B., Steiber Z., Gyóry F., Urbancsek H., Barna S., Galuska L., Nagy V. E.: Új lehetőségek az endokrin orbitopathia kezelésében. *Orvosi Hetilap.* 155 (33), 1295-1300, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2014.29963>
6. Kapás, I., **Katkó, M.**, Harangi, M., Paragh, G., Balogh, I., Kóczi, Z., Regelsberger, G., Molnár, M. J., Kovács, G. G.: Cerebrotendinous xanthomatosis with the c.379C>T (p.R127W) mutation in the CYP27A1 gene associated with premature age-associated limbic tauopathy. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 40 (3), 345-350, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/han.12058>
IF:3.927
7. Varga V.E., **Katkó M.**, Harangi J., Balogh I., Kapás I., Madar L., Seres I., Molnár M.J., Paragh G., Kovács G.G., Harangi M.: Egy ritka, veleszületett neurodegeneratív betegség: A cerebrotendinosus xanthomatosis laboratóriumi diagnosztikája. *Orv. Hetil.* 155 (21), 811-816, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2014.29887>
8. Lőrincz, H., **Katkó, M.**, Harangi, M., Somodi, S., Gaál, K., Fülöp, P., Paragh, G., Seres, I.: Strong correlations between circulating chemerin levels and lipoprotein subfractions in nondiabetic obese and nonobese subjects. *Clin. Endocrinol.* 81 (3), 370-377, 2014.
IF:3.457





9. Sámson L., Varga Z., Posta J., Bodor M., Balogh E., Gazsó A.A., Karányi Z., **Katkó M.**, M. Nagy D., Andrási D., Kovács B., Mocsáry P., Nagy V. E.: A jódeállottságot befolyásoló tényezők terhesség és szoptatás alatt.
Magyar Belorv. Arch. 66 (5), 256-262, 2013.
10. Zavaczki, E., Jeney, V., Agarwal, A., Zarjou, A., Oros, M., **Katkó, M.**, Varga, Z., Balla, G., Balla, J.: Hydrogen sulfide inhibits the calcification and osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells.
Kidney Int. 80 (7), 731-739, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.2011.212>
IF:6.606
11. Kosaras E., **Katkó M.**, Paragh G., Balla J., Galli F., Varga Z.: A tokoferol homológok biológiai hatásossága: A gamma-tokoferol kiemelt szerepe a forbol-észter stimulálta humán neutrofilek ROS termelésének.
Metabolizmus. 8 (1), 52-58, 2010.
12. **Katkó M.**, Kádár A., Kosaras E., Kárpáti I., Mátyus J., Csongrádi É., Kiss I., Posta J., Kovács B., Paragh G., Balla J., Varga Z.: A nikkell szerepe a homociszteinszint alakításában, in vivo és in vitro eredmények.
Metabolizmus. 7 (4), 244-249, 2009.
13. Kosaras, E., **Katkó, M.**, Balla, J., Paragh, G., Antus, S., Varga, Z.: Regulation of oxidative burst in neutrophils by silybin and its derivatives after phorbol-ester stimulation.
In: *Phytomedicine and therapeutic values III : Recent Progress in Medicinal Plants.* Ed.: Singh, V. K., Govil, J. N., Studium Press LLC, Houston, Tex., 499-515, 2008.
14. Varga, Z., Kosaras, E., Komódi, E., **Katkó, M.**, Kárpáti, I., Balla, J., Paragh, G., Aisa, M.C., Galli, F.: Effects of tocopherols and 2,2'-carboxyethyl hydroxychromans on phorbol-ester-stimulated neutrophils.
J. Nutr. Biochem. 19 (5), 320-327, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2007.05.002>
IF:4.352





15. Varga, Z., Nagy, E., **Katkó, M.**, Jeney, V., Seres, I., Paragh, G., Balla, J., Antus, S.: Relationship of structure and antioxidant activity of synthetic silybin- and isosilybin derived molecules: identification of molecular structure responsible for antioxidant activity employing various models for inducing oxidative stress.
In: New Developments in Antioxidants Research (Chapter 6). Szerk.: Phaglossi Harold V, Nova Science Publishers, Inc, Hauppauge NY, 113-151, 2006.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 29,262

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 4,927

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

Debrecen, 2016.05.02.



Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek: Dr. Varga Zsuzsának[†] a laboratóriumi munkám irányításáért, a kísérletek megtervezésében nyújtott segítségével és a szakmai tapasztalatainak megosztásáért, Dr. Paragh György Professzor Úrnak a munka klinikai hátterének és a kutatás feltételeinek biztosításáért, valamint a szellemi iránymutatásáért.

Köszönöm a Debreceni Egyetem Belgyógyászati Intézet Nephrológia Tanszékének a betegbevonásban, a Természettudományi Kar Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszékének, valamint Dr. Kovács Béla Professzor Úrnak és Dr. Kiss Ildikónak az elem meghatározásokban nyújtott segítségét. Köszönettel tartozom Dr. Balla József Professzor Úr támogatásáért, a Western blot és a qPCR mérések laboratóriumi hátterének biztosításáért, valamint Zavaczki Erzsébetnek a mérések kivitelezésében nyújtott segítségével, és köszönöm Dr. Jeney Viktóriának ezen eredmények értékelésében és a közlemény írásában nyújtott segítségét. Köszönöm Tóth Vincénének az izotópos mérések elvégzésében nyújtott segítségét. Köszönettel tartozom Mozga Mária Gyöngyikének, Lénárt Ferencnének, Pap Magdolnának és Guba Erikának az alapvető laboratóriumi módszerekben nyújtott segítségükért, a vérvételek kivitelezéséért, és a támogató munkahelyi környezet megteremtéséért.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Seres Ildikónak és Dr. Nagy Endre Professzor Úrnak támogatásukért, segítségükért és bizalmukért. Köszönöm a Belgyógyászati Intézet Kutató Laboratóriumában dolgozó munkatársaim támogatását. Köszönöm a Belgyógyászati Intézet „A” épület dolgozóinak a segítőkészségét.

Készült a GINOP-2.3.2-15-2016-00005 „A magyar gazdaság versenyképességének növelése a lakosság egészségi állapotát javító népegészségügyi intervenciók célcsoportjainak és tartalmának azonosítása révén” című projekt támogatásával.