

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A nikkkel 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

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés	5
2. Irodalmi áttekintés	7
2.1. A homocisztein metabolizmusa és élettani szerepe	7
2.2. A homocisztein anyagcsere zavarai	10
2.3. A hyperhomocysteinaemia következményei	12
2.4. A homocisztein szint csökkentésének lehetőségei	14
2.5. A nikkel, a kobalt és a réz élettani hatásai	15
3. Célkitűzések	18
4. Betegek és Módszerek	19
4.1. A hemodializált betegek és az egészséges populáció vizsgálata	19
4.2. In vitro vizsgálatok	21
4.2.1. Perifériás mononukleáris sejtek szeparálása és kezelése	21
4.2.2. Az életképesség vizsgálata tiazolkékfestéssel (MTT-teszt)	22
4.2.3. IL-2, TRAIL és Fas ligand meghatározás	23
4.2.4. L-homocisztein előállítása	23
4.2.5. Homocisztein és glutation meghatározás	23
4.2.6. S-adenozil-homocisztein (SAH) és S-adenozil-metionin (SAM) meghatározás	24
4.2.7. Enzim aktivitások meghatározása	25
4.2.8. Fehérje meghatározás	26
4.2.9. A metilcsoport beépülésének mérése	27
4.2.10. Intracelluláris reaktív oxigén eredetű gyökök termelődésének vizsgálata	28
4.2.11. A cisztationin- β -szintáz expresszió vizsgálata	29
4.3. Statisztikai elemzés	30
5. Eredmények	31
5.1. A szérum nyomelem szintek, a plazma homocisztein szintek, a vasanyagcsere, a tápláltság és a gyulladás paramétereinek vizsgálata	31
5.2. In vitro vizsgálatok	34
5.2.1. A perifériás mononukleáris sejtek homocisztein metabolizmusa.....	34
5.2.2. A nyomelemek hatása a perifériás mononukleáris sejtek homocisztein metabolizmusára	42
6. Megbeszélés	51
7. Összefoglalás	57

8. Summary.....	59
9. Irodalomjegyzék	60
10. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	75
11. Függelék	79

Rövidítések jegyzéke

CBS	cisztationin- β -szintáz
ConA	Concanavalin A
CRP	C reaktív fehérje
DTNB	5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoészav
DTT	1,4-ditiotreitol
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
FasL	Fas ligand
FBS	borjúsérum
GAPDH	gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz
HIF-1 α	hypoxia-indukált faktor 1 α
HPLC	nagy nyomású folyadékkromatográfia
ICP-MS	induktív csatolású plazma tömegspektrometria
IL-2	interleukin-2
IL-6	interleukin-6
MTHFR	metilén-tetrahidrofolát reduktáz
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium bromid
NO	nitrogén-monoxid
PHA	Phytohemagglutinin
qPCR	kvantitatív polimeráz láncreakció
ROI	reaktív oxigén intermedierek
SAH	S-adenozil-homocisztein
SAM	S-adenozil-metionin
SBD-F	7-benzo-2-oxa-1,3-diazole-4-szulfonsav
TRAIL	tumor nekrosis faktorhoz hasonló apoptózist indukáló ligand

1. Bevezetés

A krónikus vesebetegség prevalenciája a fejlett országokban meghaladja a 10%-ot (Coresh és mtsai, 2003; Chadban és mtsai, 2003; Hallan és mtsai, 2006) és emelkedő tendenciát mutat (Global Burden of Disease Study 2013 Collaborators, 2015). A jelenség hátterében a krónikus vesebetegség kialakulásában rizikófaktorként szereplő cukorbetegség, hipertónia és elhízás gyakoriságának növekedése, valamint a lakosság kormegoszlásának eltolódása is szerepet játszik (Levey és Coresh, 2012). A krónikus vesebetegség jelentősen aluldiagnosztizált, mivel a betegek többsége a végstádium eléréséig tünetmentes marad, de valószínűsíthető, hogy a krónikus vesebetegek száma hazánkban is meghaladja az egymilliót (Nagy, 2013). Végstádiumú veseelégtelenség esetén a hemodialízis vagy a vesetranszplantáció jelenti a kezelési lehetőséget, de a betegek nagy része nem jut ebbe a fázisba a vesebetegséghez társuló jelentős kardiovaszkuláris mortalitás miatt (Nagy, 2013).

A krónikus vesebetegek kardiovaszkuláris rizikója a felgyorsult érlelmeszesedés következtében magas, és a betegség progressziójával fokozódik (Levey és Coresh, 2012). A kardiovaszkuláris betegségek hajlamosító tényezői gyakoriak vesebetegekben: a magas vérnyomás, a lipid eltérések, a gyulladás, az elektrolit- és a sav-bázis egyensúly zavarai, az anaemia, a fokozott oxidatív stressz (Levey és Coresh, 2012). Ide sorolják a vesebetegekre jellemző metabolikus eltérések közül a homocisztein anyagcsere zavarát, a hyperhomocystenaemiát is (Wu és mtsai, 2012). A vesebetegekben a beszűkülő vesefunkcióval párhuzamosan emelkedő homocisztein szint oka főként a homocisztein renális metabolizmusának a csökkenése, és csak kismértékben a vese kiválasztó funkciójának a csökkenése (Garibotto és mtsai, 2006). Számos *in vitro* vizsgálat igazolta a homocisztein proatherogén és protrombotikus hatását (Sharma és mtsai, 2006), és több tanulmány alátámasztotta, hogy a homocisztein szint emelkedése a kardiovaszkuláris megbetegedések

önálló rizikófaktor, ugyanakkor a homocisztein szint csökkentésének kedvező hatását nem sikerült igazolni (Joseph és mtsai, 2009). Egyes vizsgálatokban a hemodializált végstádiumú vesebetegek körében az alacsony homocisztein szint rosszabb prognózissal járt (Suliman és mtsai, 2000; Kalantar-Zadeh és mtsai, 2004). A hemodializált betegek túlélését kedvezően befolyásoló tápláltság pozitívan, míg a kedvezőtlen prognózissal összefüggő gyulladás markerei negatívan korrelálnak a homocisztein szinttel, tehát a homocisztein is része a hemodializált vesebetegek körében „reverz epidemiológia” néven ismert ellentmondásos megfigyeléseknek (Suliman és mtsai, 2005). Ezek a megfigyelések felvetik más faktorok szerepét, melyek hatnak mind a homocisztein metabolizmusra, mind a kardiovaszkuláris kockázatra és a túlélésre.

Egyes nyomelemek homocisztein metabolizmusra gyakorolt hatását állatkísérletekben megfigyelték. A nikkel és a kobalt bevitele csökkentette a homocisztein szintet, és a rézhiány homocisztein szint csökkentő hatásáról is beszámoltak (Stangl és mtsai, 2000; Uthus és mtsai, 2007). Az említett elemek átmeneti fémek, biológiai rendszerekben ismert oxidatív stressz generáló hatásuk, szerepük lehet az érlelmeszedés folyamatában, de emellett a kobalt (a B₁₂-vitamin részeként) és a réz az emberi szervezet számára esszenciális (Bleackley és MacGillivray, 2011). A hemodializált vesebetegek nyomelem eltérései gyakoriak (Prodanchuk és mtsai, 2014).

Vizsgálatainkban arra kerestük a választ, hogy a szérum nikkel, kobalt és réz szintek, valamint a plazma homocisztein koncentráció mutat-e összefüggést hemodializált vesebetegekben, és ha igen, befolyásolja-e a vizsgált elem a homocisztein anyagcserét.

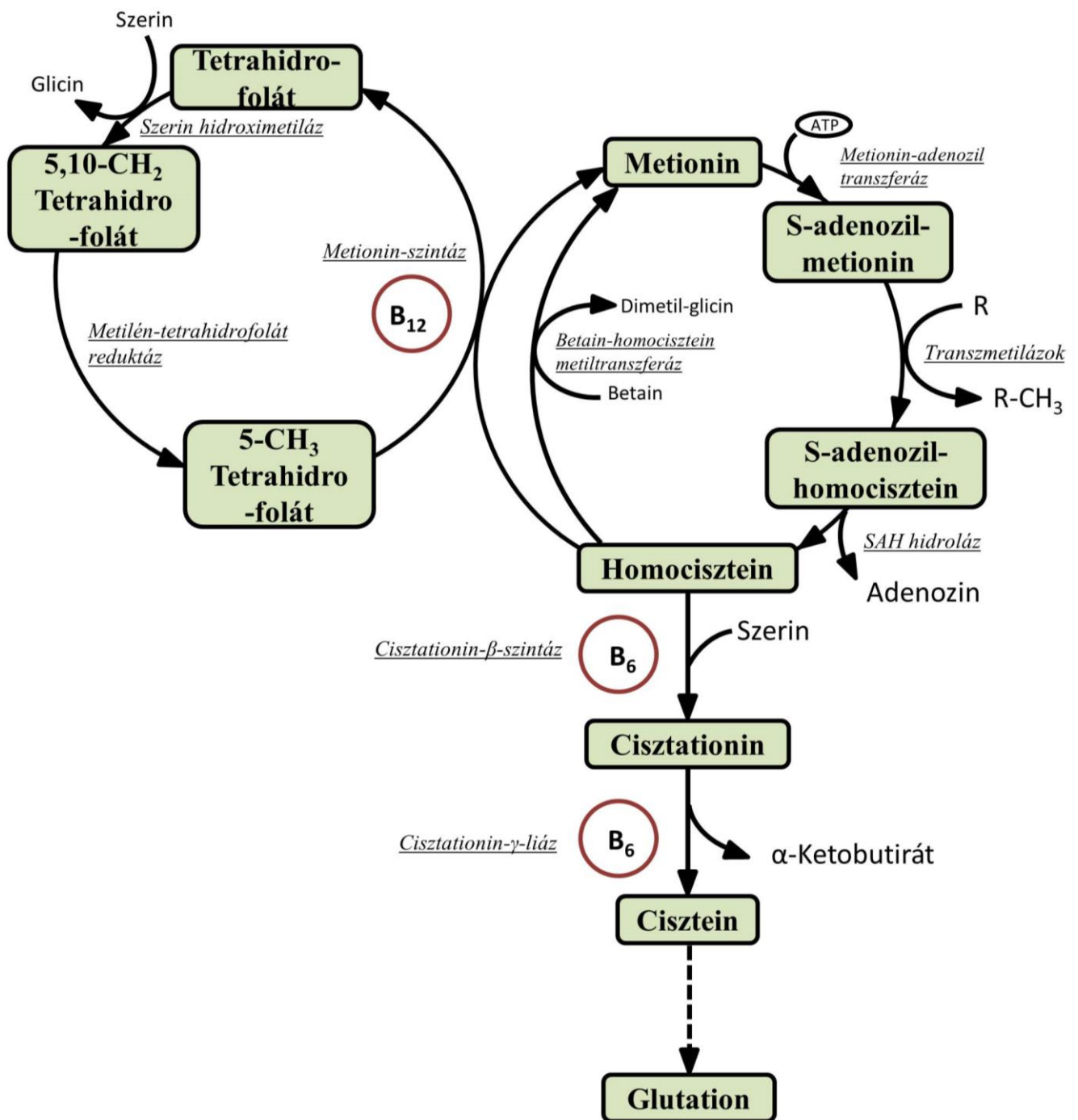
2. Irodalmi áttekintés

2.1. A homocisztein metabolizmusa és élettani szerepe

A homocisztein a metionin metabolizmusa során keletkező kén tartalmú aminosav. A homocisztein anyagcsere összefoglalása az 1. ábrán látható (Finkelstein 1998). Első lépésben a metioninból adenzin-trifoszfátot igénylő reakcióval S-adenozil-metionin (SAM) képződik a metionil-adenozil transzferáz enzim segítségével. Ily módon a kénatomhoz kapcsolódó metilcsoport kötése erőssége csökken, ami lehetővé teszi, hogy a SAM metilcsoport-donor szerepet töltsön be számos transzmetiláz által katalizált reakcióban. Az akceptor lehet például DNS, RNS, noradrenalin, foszfatidil-etanolamin és számos egyéb molekula. A metilcsoport átadása után a SAM-ból S-adenozil-homocisztein (SAH) keletkezik. A SAH a SAM-függő transzmetilázok kompetitív inhibitora, eliminációja döntő fontosságú a metilációs folyamatok egyensúlyának szempontjából. A SAH hidroláz által katalizált reakció a SAH hidrolízisének és egyben a homocisztein képződésének egyetlen módja. A reakció reverzibilis, de fiziológiai körülmények között a keletkező homocisztein és adenzin gyors eltávolításának köszönhetően az egyensúly a hidrolízis irányába tolódik. A homocisztein a sejt típusának és igényeinek megfelelően alakul tovább. Minden emlős sejt képes a metionint a leírtak szerint homociszteinné alakítani, majd a metionin szintáz segítségével remetilálni. Ez a reakció zárja a metionin-homocisztein ciklust, és kapcsolja a folsav-ciklushoz. A metionin szintáz kofaktora a B₁₂-vitamin (kobalamin). Első lépésben metilkobalamin keletkezik, a szükséges metil-csoportot az 5-metil-tetrahidrofolát szolgáltatja. Ezt követően a metilkobalaminról kerül a metil-csoport a homociszteinre és képződik a metionin, egyúttal a B₁₂-vitamin regenerációja is végbemegy (Banerjee and Matthews 1990). A tetrahidrofolát az egy szénatomos csoportok akceptora. A szerinből egy egy szénatomos csoport áthelyezésével glicin és 5,10-metilén-

tetrahidrofolát képződik. A folát ciklus az 5-metil-tetrahidrofolát szintézisével zárul, mely reakciót a metiléntetrahidrofolát reduktáz (MTHFR) enzim katalizálja. Emlősök májában és egyes fajok veséjében a metionin regenerálását egy másik enzim, a betain-homocisztein metiltranszferáz is ellátja, az általa katalizált reakcióban a metildonor szerepét a betain tölti be. A metionin-homocisztein ciklus tehát a folsav ciklussal kapcsolatosan az egy szénatomos csoportok transzfer reakcióiért felelős a szervezetben. A ciklus egyes reakcióinak enzimeire a szubsztrát és a termék koncentrációkon kívül, a cikluson belül távolabb szereplő molekulák is hatnak még allosztérikus aktivátorként vagy inhibítorként, így válik lehetővé a sejt igényeinek megfelelő mértékű metionin regeneráció.

A homociszteinért, mint szubsztrátért a remetilációt végző enzimek mellett a cisztationin- β -szintáz (CBS) is verseng. Működése megfelelő metionin és SAM ellátottság esetén dominál, amikor az emelkedő homocisztein szint meghaladja a remetilációban szereplő enzimek kapacitását. A CBS optimális működéséhez szükséges homocisztein koncentráció legalább egy nagyságrenddel nagyobb, mint a remetilációt végző enzimek esetén (Finkelstein 1998). A CBS egy B₆-vitamin (piridoxál-5-foszfát) függő enzim, a transzszulfurációs útként ismert folyamat első lépését katalizálja, melyben a homocisztein egy szerinnel kapcsolódva cisztationinná alakul. Ez egyben a homocisztein kilépését is jelenti a ciklusból. A CBS aktivitását a SAM és az oxidatív stressz fokozza. Az enzim egy homotetramer, monomerenként 3 doménnal. A középső domén tartalmazza a szubsztrát és a piridoxál-5-foszfát kötőhelyeket, vagyis az enzim aktív helyét. A C-terminális domén felelős a SAM allosztérikus szabályozásáért, míg az N-terminális egy hem-kötő domén, ami az enzim oxidatív stressz általi szabályozásában játszik szerepet. Szuperoxid gyökök hatására megfigyelték a C terminális domén célzott proteolízisét, melynek következtében az enzim aktivitása SAM koncentrációtól függetlenül fokozódik (Zou és Banerjee 2003).



1. ábra

A folsav ciklussal kapcsolt metionin-homocisztein ciklus és a transzszulfurációs útvonal

Forrás: Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr.* 1998; 157 Suppl 2:S40-4.

A reakció során keletkező cisztationin a működéséhez szintén B₆-vitamint igénylő cisztationin- γ -liáz enzim segítségével hasad α -ketobutirátra és ciszteinre. A szervezetben ez az egyedüli folyamat, ami *de novo* cisztein szintézishez vezet. A cisztein egyéb szerepe mellett a glutation alkotóeleme is, koncentrációja a glutation-szintézis sebességmeghatározó tényezője (Griffith 1999). A glutation jelentős szerepet tölt be a sejtek redox homeosztázisának fenntartásában. Intracelluláris mennyiségének nagy része redukált formában található a citoszolban, ami biztosítja a szükséges redukzív környezetet a sejtekben (Schafer és Buettner 2001). A teljes transzszulfurációs út megléte az intenzív glutation forgalmú szövetekre jellemző pl. a máj, a vese, a vékonybél és a hasnyálmirigy szövetre. A CBS-t vagy a cisztationin- γ -liázot nem expresszáló sejtek ciszteinigénye csak külső forrásból biztosítható (Finkelstein 1998).

A cisztein és a homocisztein a kén-hidrogén szintézis szubsztrátjai is a szervezetben, a reakciót katalizáló fő enzimek a CBS és a cisztationin- γ -liáz (Renga 2011). A kén-hidrogén számos élettani folyamat szabályozásában játszik szerepet, mint endogén gáztranszmitter (Wang 2012).

2.2. A homocisztein anyagcsere zavarai

A homocisztein anyagcserében bekövetkező kóros változások mutatója a keringésben (plazmában) felhalmozódó homocisztein. Ezt az állapotot nevezzük hyperhomocysteinaemiának. A homocisztein tiol csoportja révén diszulfid kötést képes létesíteni más homocisztein molekulákkal, a szabad ciszteinnel, vagy a plazmafehérjék tiol csoportjaival. A teljes plazma homocisztein több mint 98 %-a kötött formában található és alig 2 % csak a szabad, redukált szulfhidril (-SH) forma a keringésben. A kötött homocisztein kb. 70 %-a fehérje-diszulfid-kötött homocisztein, a maradék pedig kis molekulásúlyú

diszulfid formában - pl. homocisztin, homocisztein-cisztein vegyes diszulfid - van jelen a keringésben (Mudd és mtsai, 2000).

Egészséges egyének éhomi össz-homocisztein szintje a plazmában 5-12 $\mu\text{mol/l}$ között változhat. 12-30 $\mu\text{mol/l}$ között enyhe, 31-100 $\mu\text{mol/l}$ között közepesen súlyos, míg 100 $\mu\text{mol/l}$ -nél magasabb össz-homocisztein szint esetén súlyos hyperhomocysteinaemiáról beszélünk (Mudd és mtsai, 2000). A plazma össz-homocisztein szintjét a genetikai és a környezeti faktorok együtt alakítják (Malinowska 2009). Számos öröklődő enzim defektus okoz emelkedett homocisztein szintet (Kullo és mtsai, 2006). A homocisztein nagymértékű felszaporodásának leggyakoribb kiváltó oka a CBS gén valamely mutáns formájának homozigóta formában történő megjelenése (Kraus és mtsai, 1999). A két legelterjedtebb pontmutáció: a gén 833. pozíciójában lévő timin cseréje citozinra (T833C), ami aminosav cserében (izoleucin $\rightarrow$ treonin) is megnyilvánul, és az enzim tetramer szerkezetének stabilitását rontja (Kozich és Kraus, 1992), valamint a 919. pozícióban lévő guanin cseréje adeninre (G919A), ami szintén aminosavcserével jár (glicin $\rightarrow$ szerin) az enzim aktív centrumában, és az enzimaktivitás elvesztését okozza (Hu és mtsai, 1993). Az öröklődő hyperhomocysteinaemia enyhe formáiért általában a folsav ciklusban szereplő MTHFR egyik pontmutációja a felelős, a gén 677. pozíciójában citozin helyett timin található (C677T), ami a keletkező enzim aminosavsorrendjének változását okozza (alanin $\rightarrow$ valin) (Cortese és Motti, 2001). A csökkent aktivitású enzim kevesebb metildonort szolgáltat a homocisztein remetilációjához. Az enzim egyéb kevésbé gyakori mutációit is azonosították (Goyette és mtsai, 1995).

A homocisztein anyagcsere vitaminigényes folyamat, így az érintett vitaminok (folsav, B₆, B₁₂) nem megfelelő bevitele a homocisztein szint emelkedését okozza, amit a táplálék fehérjéinek metionintartalma is befolyásol (Verhoef és de Groot, 2005). A plazma

homocisztein szintje az életkor előrehaladtával is nő. Ennek egyik oka lehet az, hogy időskorban csökken a vitaminfogyasztás és felszívódás, ezen kívül a vesefunkció beszűkülése is szerepet játszik (Refsum és mtsai, 2006). Egyes hormonális eltérések pl. az ösztrogénszint csökkenése, és a hypothyreosis is emelkedett homocisztein szinttel jár (Smolders és mtsai, 2005; Bamashmoos és mtsai, 2013).

Krónikus veseelégtelenségben már a kezdeti stádiumtól megfigyelhető a plazma homocisztein szintjének emelkedése, mely szoros összefüggést mutat a glomerulus filtrációs ráta csökkenésével (Arnadottir és mtsai, 1996). 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 (Friedman és mtsai, 2001; Garibotto és mtsai, 2006). Hemodializált vesebetegek körében egyes vízoldékony vitaminok, így a homocisztein metabolizmusban szereplő B vitaminok hiánya gyakrabban fordul elő, ezért ajánlott a pótlásuk (Clase és mtsai, 2013).

2.3. A hyperhomocysteinaemia következményei

Az emelkedett plazma homocisztein koncentráció az atherosclerosis és a trombózis független kockázati tényezője (Clarke és mtsai, 1991; Selhub és mtsai, 1995; den Heijer és mtsai, 1996; Welch és Loscalzo, 1998). A homocisztein számos ponton gyakorol kedvezőtlen hatást az érrendszerre a lipid metabolizmus, az extracelluláris mátrix fehérjéinek szintézise, a gyulladásos reakciók és az oxidatív stressz befolyásolásával (Sharma és mtsai, 2006), elsődleges célpontjai az endotélsejtek (Eren és mtsai, 2014). A homocisztein csökkenti az endoteliális nitrogén-monoxid szintáz nitrogén-monoxid (NO) szintéziséhez szükséges

kofaktorának, a tetrahydrobioptreinek a szintjét, melynek következménye az L-arginin oxidációjának, így a NO szintézisének a csökkenése (He és mtsai, 2010). A homocisztein csökkenti egyes antioxidáns enzimek, a glutation peroxidáz és a szuperoxid dizmutáz expresszióját és aktivitását, ezzel is fokozza az oxidatív stresszt, így szerepe van az alacsony sűrűségű lipoproteinek oxidációjában (Handy és mtsai, 2005; Nonaka és mtsai, 2001). Mindezek következtében csökken a NO szintézis és a NO szabadgyökök általi inaktiválódása fokozódik, tehát a homocisztein károsítja az endotélfüggő vazodilatációt. A homocisztein az endotélsejtek prosztaciklin (Wang és mtsai, 1993) és endotelin-1 (Demuth és mtsai, 1999) termelését is befolyásolja hozzájárulva ezzel is a vazomotor funkció változásához. A homocisztein fokozza a leukocita migráció folyamatában fontos szereppel bíró monocita kemotaktikus fehérje-1 és receptora, valamint az interleukin-8 expresszióját (Wang és mtsai, 2000; Wang és mtsai, 2001; Zeng és mtsai, 2003). A homocisztein tehát endotél diszfunkciót okoz és elősegíti a fehérvérsejtek érfalba történő migrációját, a lipidek oxidációját, kedvező feltételeket teremtve ezzel az érlemezés kialakulásának és progressziójának. A homocisztein a hemosztázist a véralvadás irányába tolja el, mivel fokozza a szöveti faktor aktivitását (Fryer és mtsai, 1993), gátolja a trombomodulin expresszióját, a protein C aktivációját (Lentz és Sadler, 1991), valamint az Va faktor aktivált protein C általi inaktivációját (Undas és mtsai, 2001); tehát a homocisztein fokozza a trombózishajlamot.

A homociszteint, mint a metioninhoz szerkezetileg hasonló aminosavat a metionil-tRNS szintetáz felismeri és aktiválja. A homociszteint kötő tRNS viszont a fehérjeszintézisben már nem vesz részt, ami a metionil-tRNS szintetáz hibajavító funkciójának köszönhető. A homocisztein disszociál a komplexről és közben homociszteintiolaktonná alakul (Jakubowski, 2001). A homocisztein szint emelkedésével a homociszteintiolakton képződés is fokozódik (Chwatko és mtsai, 2007). Különböző sejtkultúrákon végzett

vizsgálatok bizonyították, hogy a homocisztein-tiolakton apoptózist indukál, és toxikusabb, mint maga a homocisztein (Mercié és tsai, 2000; Huang és mtsai, 2001; Kamudhamas és mtsai, 2004; Kerkeni és mtsai, 2006). 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 (Jakubowski, 1999), illetve autoimmun választ indukál (Jakubowski, 2005).

A homocisztein felhalmozódása gátolja a SAH hidroláz működését, növeli az SAH koncentrációt, csökkenti a SAM-függő transzmetilázok aktivitását, ami hipometilációhoz vezet (Fux és mtsai, 2005). A metilációs folyamatokban bekövetkező zavar elősegíti a daganatos megbetegedések kialakulását (Choi és mtsai, 2009). Az emelkedett homocisztein koncentráció növeli a velőcsőzáródási rendellenességek megjelenését (Imbard és mtsai, 2013), és szerepet játszik bizonyos neurodegeneratív kórképekben (Obeid és mtsai, 2007; Sharma és mtsai, 2015).

2.4. A homocisztein szint csökkentésének lehetőségei

A hyperhomocysteinaemia mérséklésére a fokozott vitaminbevitel (folsav, B₆, B₁₂) alkalmazható. A folsav különböző dózisainak vizsgálatával, fix dózisú B₁₂-vitamin és B₆-vitamin kiegészítéssel valamennyi folsav dózis mellett szignifikánsan csökkent a homocisztein koncentráció (Lobo és mtsai, 1999). A krónikus vesebetegek hyperhomocysteinaemiája is a legtöbb esetben csökkenthető a vitaminbevitel növelésével (Arnadottir és mtsai, 1993; Chauveau és mtsai, 1996; Janssen és mtsai, 1996). A homocisztein szint csökkentésére alkalmazott terápia hatékonysága függ a beteg nemétől, genotípusától és táplálkozási szokásaitól (Wu és mtsai, 2012). A súlyos hyperhomocysteinaemia mérséklése vitaminpótlással jelentősen csökkentette a betegek körében bekövetkező szív és érrendszeri megbetegedések számát (Yap és mtsai, 2001). Enyhe hyperhomocysteinaemia esetén a

vitaminpótlással csökkentett homocisztein szint kardiovaszkuláris rizikót csökkentő hatását viszont nem sikerült egyértelműen bizonyítani sem az általános populációban, sem a végstádiumú vesebetegek és a vesetranszplantáltak körében (Joseph és mtsai, 2009; Jardine és mtsai, 2012; Pan és mtsai, 2012; Kang és mtsai, 2015). A dialíziskezelés csökkenti a homocisztein szintet, de a hatás átmeneti, és hatásfokát korlátozza, hogy csak a szabad homocisztein dializálható, a fehérjékhez kötött nem (Heinz és mtsai, 2008). Egyes tiol-tartalmú antioxidánsok (N-acetil-cisztein, mesna) alkalmazásával a fehérjékhez kötött homocisztein felszabadítható, így a homocisztein dialízissel történő eltávolítása fokozható, emellett az endotél funkció javulása is megfigyelhető (Scholze és mtsai, 2004; Urquhart és mtsai, 2007; Nascimento és mtsai, 2010).

A homocisztein anyagcsere befolyásolásának további lehetőségeit állatkísérletekben vizsgálták és bizonyították. B₁₂-vitamin hiány esetén a nikkel és a kobalt csökkenti a homocisztein szintet (Stangl és mtsai, 2000). Patkányokban a nikkel B₁₂-vitamin és folsav hiányos állapotokat befolyásoló hatását igazolták (Nielsen és mtsai, 1993; Uthus és Poellot, 1996; Uthus és Poellot, 1997). Rézhiányos patkányokban a homociszteinszint csökkenését találták (Uthus és mtsai, 2007).

2.5. A nikkel, a kobalt és a réz élettani hatásai

A nikkel, a kobalt és a réz átmeneti fémek. Fiziológias körülmények között többféle vegyértékű formában fordulhatnak elő, így szerepük van elektronátadással járó reakciókban enzimek prosztetikus csoportjaként vagy kofaktoraként, illetve a Fenton reakcióban a reaktív oxigén intermedierek (ROI) képződésének folyamatában (Valko és mtsai, 2005; Bleackley és MacGillivray, 2011).

A nikkelt egyes alacsonyabb rendű élőlények számára esszenciális nyomelem: a növények, egyes baktériumok és gombák számos enzimének alkotórészeként azonosították (Boer és mtsai, 2014). Magasabb rendű állatok élettani folyamataiban a nikkelt nélkülözhetetlen szerepét nem igazolták, de állatkísérletekben a nikkelt megvonásnak többek között a növekedésre, szaporodásra és májműködésre gyakorolt kedvezőtlen hatását leírták (Nielsen, 2013). A szervezetbe a légutakon, emésztőrendszeren és bőrön keresztül egyaránt bejuthat (Takács, 2001). Az emésztőrendszerből közel 10%-a szívódik fel, egy része a vasszívás útvonalán. A keringésben nagy része albuminhoz kötődik, kisebb része aminosavakhoz és α_2 -makroglobulinhoz. Minden szervbe eljut, a sejtekbe a vas és/vagy a magnézium transzport mechanizmusát használva lép be. Kiválasztása főként a vizelettel történik, de a nyállal és a verejtékkel is kiválasztásra kerül (Takács, 2001).

A nikkelt elsősorban toxikus hatásai miatt képezi intenzív vizsgálat tárgyát, számos élettani folyamatot befolyásol (Cameron és mtsai, 2011). A heveny nikkelt mérgezés oka elsősorban a glutation szint csökkenése és a fehérjék szulfhidril csoportjainak lekötése (Valko és mtsai, 2005). A nikkelt kontakt dermatitis kiváltó hatását immunmoduláló és immuntoxikus tulajdonságai magyarázzák (Hostynek, 2006). Oxidatív stresszt generál, de más fémionokkal ellentétben a nikkelt által kiváltott szabadgyök termelésben a nikkelt(II)-tiol komplexek molekuláris oxigénnel és/vagy lipidhidroperoxidokkal történő reakciója játsza a fő szerepet (Cameron és mtsai, 2011). A Nemzetközi Rákkutató Intézet (International Agency for Research on Cancer) besorolása alapján a nikkelt fém emberben valószínűleg rákkeltő (2B kategória), míg a nikkeltvegyületek bizonyítottan rákkeltők (1 kategória) (IARC, 2012). Karcinogén hatását főleg munkahelyi expozíció kapcsán és a vízben nem oldódó formáinál figyelték meg, amiket a sejtek fagocitózissal vesznek fel, ezért jelentős intracelluláris nikkelt szintet eredményeznek (Costa és mtsai, 2005). A rákkeltő hatásért a nikkelt DNS-hez és

magfehérjékhez történő kötődése, a repair mechanizmusok gátlása és a génexpresszió módosítása a felelős (Beyersmann és Hartwig, 2008). A nikkel a sejtek vas homeosztázisát megzavarja, extracelluláris szinten a vas transzportjának akadályozásával, intracellulárisan pedig bizonyos vas-tartalmú enzimek aktív helyéről a vas leszorításával (Davidson és mtsai, 2005). A nikkel a hipoxia által indukált jelátviteli útvonalat is befolyásolja a hypoxia-indukált faktor 1α (HIF- 1α) lebomlásának akadályozásával, mivel kiszorítja a vasat a HIF- 1α lebontásában szereplő enzim aktív helyéről (Chen és Costa, 2009).

A kobalt az ember és az állatok számára a B₁₂-vitamin alkotórészeként esszenciális nyomelem, így számos izomeráz, metil-transzferáz és dehalogenáz enzim működéséhez elengedhetetlen (Bleackley és MacGillivray, 2011). A légutakon és az emésztőrendszeren át egyaránt felszívódik, kiválasztása főként a vizelettel történik (Takács, 2001). Vashiány esetén a felszívása fokozódik (Bleackley és MacGillivray, 2011). A keringésben az albuminhoz kötődik, a sejtekbe a kalcium transzport mechanizmusát felhasználva lép be (Simonsen és mtsai, 2012). A kobalt a HIF- 1α stabilizálásával hipoxiát imitál. Nagy mennyiségben citotoxikus, apoptózist indukál. A kobalt és vegyületei a Nemzetközi Rákkutató Intézet besorolása alapján valószínűleg rákkeltőek (2B kategória) (IARC, 1991). Genotoxikus hatását a DNS oxidatív károsítása, és a repair mechanizmusok gátlása révén fejt ki (Simonsen és mtsai, 2012).

A réz az ember, az állatok és a növények számára esszenciális. Szerepe van a vérképzésben, és számos rézdependens enzim ismert. A bélrendszerből szívódik fel, és a szervezetből főként a széklettel távozik. A plazmában nagy része specifikus réztranszporter fehérjéhez a ceruloplazminhoz, kisebb része albuminhoz kötődik (Takács, 2001). A réz nagyobb mennyiségben oxidatív stresszt okoz, májkárosító hatású és számos neurodegeneratív folyamatban játszik szerepet (Gaetke és mtsai, 2014).

3. Célkitűzések

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

4. Betegek és Módszerek

4.1. 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. A betegek a vesepótló kezelés megkezdésétől kaptak folsavat (3 mg/nap dózisban), igény szerint aktív D-vitamint (Rocaltrol, Roche: 0,5 µg), igény szerint intravénásan vasat (Ferrlecit, Aventis Pharma: 62,5 mg), és hemoglobin értéküktől függően rekombináns humán eritropoetint.

50 fő alkotta az egészségesek csoportját (31 nő és 19 férfi), akiknek lakóhelye a vesebetegekhez hasonlóan Debrecen és környéke volt, 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 testtömegindex (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.

Vérvétel és a vérminták feldolgozása

A vérvétel 12 óra éhezést követően, a hemodializált betegek esetében közvetlenül dialízis előtt történt. Az elemanalízisre szánt vérhez speciális vérvételi csövet (Vacutainer Trace Element tubes; Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) használtunk, majd a szérumot centrifugálással szeparáltuk (2000 g, 10 perc, 4°C) és -70°C-on tároltuk a nyomelemek meghatározásáig. A homocisztein mérése közvetlenül a vérvétel után megtörtént etilén-diamin-tetraecetsavval (EDTA) alvadásgátolt vérből nyert plazmából (2000

g, 10 perc, 4°C), míg egyéb paraméterek meghatározáshoz -70°C-on tárolt plazma illetve szérum mintákat használtunk.

A laborparaméterek és a nyomelemek meghatározása

Az összfehérjét Biuret próbával (Hatcher és Anderson, 1969), az albumin mennyiségét brómkrezol-zöld használatával, kolorimetriás módszerrel (Dumas és mtsai, 1971), a C reaktív fehérje (CRP) szintjét immunturbidimetriás módszerrel (Sánchez és mtsai, 2002), a vas koncentrációt ferrozine használatával, kolorimetriás módszerrel (Yee és Zin, 1971), a ferritin szintjét elektrokemilumineszcens immunoassay módszerrel (Blackburn és mtsai, 1991), a transferrin szaturációt az immunturbidimetriás módszerrel meghatározott transferrin és a mért vas koncentráció értékekből számítással $[(\text{vas}/25,1 * \text{transzferrin}) * 100]$ (Yamanishi és mtsai, 2003) Cobas automata analizátor (Roche Ltd, Mannheim, Németország) segítségével; a hemoglobin koncentrációt SLS-hemoglobin módszerrel (Oshiro és mtsai, 1982) Sysmex XE 2100D automata (Sysmex America Inc, Mundelein, IL, USA) segítségével; a B₁₂-vitamin szintjét mikropartikuláris enzim immunoassay módszerrel és a folsav szint mérését ionbefogás módszerrel (Steijns és mtsai, 1996) Abbott IMX analizátor (Abbott Laboratories Inc, Abbott Park, IL, USA) segítségével a Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetben végezték. A szérum interleukin-6 (IL-6) koncentrációját ELISA technikával (Human IL-6 Quantikine ELISA Kit, R&D Systems Inc, Minneapolis, MN, USA) határoztuk meg (Anderson és mtsai, 1991). A plazma össz-homocisztein koncentrációját nagy nyomású folyadék kromatográfiás (HPLC) kit (BioRad Laboratories GmbH, München, Németország) segítségével határoztuk meg (Mourvaki és mtsai, 2005).

A nyomelem meghatározások a Debreceni Egyetem Természettudományi Karának Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszékén, valamint Mezőgazdasági-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Karának Élelmiszertudományi, Minőségbiztosítási és

Mikrobiológiai Intézetében történtek. A kobalt, a réz és a nikkel koncentrációjának meghatározáshoz a minták feltárása savas közegben (0,5 ml szérumhoz 1 ml salétromsav, 0,5 ml hidrogén-peroxid, és 0,2 ml hidrogén-fluorid adásával) zártrendszerű teflonbombás mikrohullámú roncsoló készülékben (CEM MARS-5, CEM Microwave Technology Ltd, Buckingham, UK) történt. Az emésztés az alábbi paraméterek mellett zajlott: (1) 150 W 10 percig, (2) 0 W 2 percig, és (3) 300 W 10 percig. A savas mintaoldatot nagy tisztaságú vízzel hígítottuk 10 cm³ térfogatra. A belső standard ródiom volt 10 µg/l végkoncentrációban. A nyomelem meghatározások ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, induktív csatolású plazma tömegspektrometria) módszerrel ELAN 6000 készülékkel (Perkin Elmer SCIEX, Concord, Kanada), és Thermo Scientific XSeries 2 (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) készülékkel történtek (Dombovari és mtsai, 2001).

4.2. *In vitro* vizsgálatok

A vizsgálatokhoz használt anyagok, amennyiben nem jelöltünk meg másik gyártót, Sigma gyártmányúak (Sigma Aldrich, St. Luis, MO, USA) voltak.

4.2.1. Perifériás mononukleáris sejtek szeparálása és kezelése

A perifériás mononukleáris sejteket egészséges egyének heparinnal alvadásgátolt véréből sűrűséggrádiens centrifugálással nyertük Boyum (1968) módszere szerint. A fiziológiás sóoldattal duplájára hígított vért Histopaque 1077 oldatra rétegeztük 2:1 arányban (v/v). Centrifugálás (400 g, 30 perc, szobahőmérséklet) után a Histopaque 1077 oldat és a plazmaréteg határán elhelyezkedő perifériás mononukleáris sejteket leszívtuk és RPMI 1640 tápfolyadékban történő többszöri mosás után hemocitóméterben megszámoltuk. A sejtuszuszenzió sűrűségét az adott módszerhez szükségesnek megfelelően RPMI tápfolyadék hozzáadásával állítottuk be.

A sejteket 1×10^6 sejt/ml sűrűségben 24 lyukú sejtenyésztő plate-be helyeztük RPMI tápfolyadékban. Egyes vizsgálatokban metionin- és cisztinmentes RPMI tápfolyadékot használtunk. 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. A nikkel-klorid, kobalt-klorid és réz-szulfát törzsoldat steril desztillált vízben, míg az aminosavak és a glutation törzsoldatai RPMI tápfolyadékban készültek. Minden anyag hígítása tápfolyadékkal történt. A sejteket 24, 48 vagy 72 óráig inkubáltuk termosztátban (37°C , 5 % CO_2 + 95 % levegő, 80 % páratartalom).

A sejtek stimulációjához 10 % hőinaktivált borjúsérumot (FBS) tartalmazó RPMI tápfolyadékban 10 $\mu\text{g/ml}$ Concanavalin A (ConA) vagy 5 $\mu\text{g/ml}$ Phytohemagglutinin (PHA) növényi lektineket használtunk (Sofuni és Yoshida, 1992).

4.2.2. Az életképesség vizsgálata tiazolkékfestéssel (MTT-teszt)

A sejt kultúrákat a korábban leírt módon összeállítottuk, és a tenyésztés utolsó 4 órájára RPMI-ben oldott 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium bromidot (MTT) 0,5 mg/ml végkoncentrációban adtuk a sejtekhez (Carmichael és mtsai, 1987). Az inkubáció végén eltávolítottuk a felülúszókat, és a sejtekben formazánná oxidálódott festéket 20 % (v/v) Triton X100 tartalmú sósavas (0,1 N) izopropil-alkoholban oldottuk fel. Ezt követően a minták abszorbanciáját mértük 550 nm hullámhosszon spektrofotométerrel (HP 8453, Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Németország). Az eredményeket három független mérésből (átlag $\pm$ szórás) származó abszorbancia/ 10^5 db sejt értékben adtuk meg. Minden esetben három-három párhuzamos meghatározás történt.

4.2.3. IL-2, TRAIL és Fas ligand meghatározás

Az interleukin-2 (IL-2) a T limfociták legfontosabb autokrin növekedési és differenciálódási faktora, melynek szekréciója az aktiváció-indukált apoptózishoz is elengedhetetlen. A tumor nekrosisz faktorhoz hasonló apoptózist indukáló ligand (TRAIL) és a Fas ligand (FasL) az apoptózis indukálásában játszanak szerepet. A perifériás mononukleáris sejtek által termelt IL-2, TRAIL és FasL mennyiségét R&D gyártmányú Quantikine ELISA kitékkel (R&D Systems Inc, Minneapolis, MN, USA) határoztuk meg a felülszókából (Zhang és mtsai, 2007; Chamoux és mtsai, 2008), a gyártó leírása szerint. Az eredményeket három független mérésből (átlag $\pm$ szórás) pg/ml értékben adtuk meg. Minden esetben három-három párhuzamos meghatározás történt.

4.2.4. L-homocisztein előállítása

Az L-homociszteint az L-homocisztein-tiolakton lúgos hidrolízisével állítottuk elő (Drummond és mtsai, 1995; Jarrett és mtsai, 1997). 50 mg L-homocisztein-tiolaktont 1,7 ml desztillált vízben feloldottunk, hozzáadtunk 0,83 ml 0,8 mol/l NaOH oldatot és 5 percig nitrogénárammal átbuborékolattuk. Ezt követően 45°C hőmérsékleten inkubáltuk 6 percig, majd 5 mol/l koncentrációjú ecetsavval az oldat pH értékét 5-re állítottuk, végül 3,3 ml végtérfogatra hígítottuk nitrogénárammal átbuborékolatott desztillált vízzel. Az így kapott 90-100 mmol/l koncentrációjú L-homocisztein oldatot -70°C-on tároltuk.

4.2.5. Homocisztein és glutation meghatározás

Az intracelluláris (feltárt sejtek) és extracelluláris (a sejtek felülszója) homocisztein és glutation tartalmát Ubbink által leírt módon határoztuk meg (Ubbink és mtsai, 1991). A sejteltáráshoz a desztillált vízben felvett sejteket többszöri fagyasztással (-20°C) és felolvasztással roncsoltuk. A mintákhoz dimetil-formamidban oldott 20 % (v/v) tri-n-butil

foszfint adtunk, hogy a szulfhidril-csoportokat felszabadítsuk kötéseikből. 30 perc 4°C-on történő inkubálás után 1 mmol/l EDTA tartalmú 20 %-os triklór-ecetsav oldatot adtunk a mintákhoz, a fehérjéket centrifugálással (5000 g, 10 perc, 4°C) eltávolítottuk. Az elegyek pH értékét 1,55 mol/l NaOH oldattal állítottuk be semleges közeli értékre. A derivatizáláshoz 4 mmol/l EDTA-t tartalmazó 0,125 mol/l borát pufferben (pH 9,5) oldott 7-benzo-2-oxa-1,3-diazole-4-szulfonsavat (SBD-F) adtunk 0,125 mg/ml végkoncentrációban, majd a mintákat 1 órára 60°C-os vízfürdőbe tettük. Az így előkészített mintákból 20 µl-t nagy nyomású folyadékkromatográfbá (HPLC) (Hitachi-Merck L 6200A, Merck, Darmstadt, Németország) injektáltunk. Az elválasztás C18 fordított fázisú oszlopon (LiChrospher® 100 RP-18, 5 µm, Merck, Darmstadt, Németország), izokratikus elúcióval történt. A mobilfázis 4 % acetonitril (Scharlau Chemie SA, Barcelona, Spanyolország) tartalmú 0,1 mol/l KH₂PO₄ puffer (pH=2,1 ortofoszforsavval beállítva) volt. Az áramlási sebesség 1,5 ml/perc volt. Az SBD-tiolok fluoreszcens detektálásához (detektor: Hitachi-Merck F-1050, Merck, Darmstadt, Németország) a gerjesztési hullámhossz 385 nm, az emissziós hullámhossz 515 nm volt. A kalibrációhoz desztillált vízben oldott és a mintákkal azonos módon előkészített L-homocisztein és glutation oldatokat használtunk. Az eredményeket a sejtek fehérjetartalmára vonatkoztatva nmol/mg fehérje egységekben, vagy a kezeletlen kontroll %-ában fejeztük ki.

4.2.6. S-adenozil-homocisztein (SAH) és S-adenozil-metionin (SAM)

meghatározás

A sejtek intracelluláris SAH és SAM koncentrációjának meghatározását Wise módszere alapján végeztük (Wise és mtsai, 1997). A sejteket 0,1 mol/l Na-acetát oldattal (pH=6) lizáltuk, majd perklórsavval (5 % végkoncentrációjú) kicsaptuk a fehérjéket, és centrifugáltuk (5000 g, 10 perc, 4°C). A felülúszókat a lipidek dietil-éterrel történő eltávolítását követően HPLC-be injektáltuk (20 µl). Az elválasztás C18 fordított fázisú

oszlopon (Nucleosil C18, 5 μm , 250 mm x 4,6 mm, Sigma Aldrich, St. Luis, MO, USA) történt izokratikus elúcióval. A mobilfázis 50 mmol/l NaH_2PO_4 puffer, amely 10 mmol/l heptánszulfonsavat tartalmazott (pH=4,4, ortofoszforsavval beállítva) és metanol (Merck, Darmstadt, Németország) 8:2 (v/v) elegye volt. Az áramlási sebesség 0,9 ml/perc volt. A detektálás 254 nm-en történt UV detektorral (Merck-Hitachi L-4250, Merck, Darmstadt, Németország). A kalibrációhoz 1 mmol/l sósavban oldott SAH és SAM törzsoldatból 0,1 mol/l Na-acetátban (pH=6) készített oldatokat használtunk 5 % perklórsavtartalommal. Az eredményeket fehérjetartalomra vonatkoztatva $\mu\text{mol/mg}$ fehérje egységekben, vagy a kezeletlen kontroll %-ában fejeztük ki.

4.2.7. Enzim aktivitások meghatározása

Metionin szintáz

A metionin szintáz aktivitásának meghatározását Drummond és mtsai (1995) illetve Jarrett és mtsai (1997) által kifejlesztett módszerrel végeztük. Az enzim aktivitását frissen izolált és inkubált sejtek lizátumában határoztuk meg. Az inkubálás a korábban leírt körülmények között történt. A sejteket sejthomogenizátor segítségével tártuk fel 2,5 mmol/l 1,4-ditiotreitol (DTT) tartalmú foszfát pufferben (pH=7,2), majd felhasználásig 4°C-on tartottuk. A reakcióelegy a következőket tartalmazta foszfát pufferben (pH=7,2): 100 μl sejthomogenizátum, 25 mmol/l DTT, 19 $\mu\text{mol/l}$ SAM, 500 $\mu\text{mol/l}$ L-homocisztein, 50 $\mu\text{mol/l}$ hidroxokobalamin, és a mérések egy részében meghatározott koncentrációban nyomelem oldatok. 5 perc 37°C-on történő elő-inkubálás után 210 $\mu\text{mol/l}$ végkoncentrációban metil-tetrahidrofolátot adtunk a reakcióelegyhez, és tovább inkubáltuk 30 percig 37°C-on. A reakciót 5 N sósav/60 % hangyasav eleggyel állítottuk le, majd 10 percig 80°C-on tartottuk, így az enzimreakció során keletkezett tetrahidrofolát 5,10-metenil-tetrahidrofoláttá alakul, melynek koncentrációját 350 nm hullámhosszon (extinkciós koefficiens: $26\,500\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$)

mértük spektrofotométerrel (HP 8453, Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Németország). Az eredményeket az egységnyi fehérjetartalomra eső enzimaktivitás (mU/mg fehérje) egységben fejeztük ki (1 U enzim 1 μ mol produktum képződését katalizálja 1 perc alatt).

Cisztationin- β -szintáz

A cisztationin- β -szintáz aktivitásának mérését Hamelet és mtsai (2007), valamint Zou és mtsai (2003) által leírt módszerek alapján végeztük a sejtizátumokban. A frissen izolált vagy tenyésztett sejteket 0,01 mol/l foszfát pufferben (pH=7.4) lizáltuk, és homogenizáltuk, majd centrifugáltuk (5000 g, 10 perc, 4°C). A felülúszókat a mérésig jégben tartottunk. 100 μ l felülúszót a cisztationin továbbalakulását gátló D,L-propargil-glicinnel (250 μ mol/l), és a cisztationin- β -szintáz kofaktorával, piridoxál-foszfáttal (40 μ mol/l) inkubáltuk 15 percig 37°C-on. Ezt követően adtuk hozzá a szubsztrátokat (L-szerin és L-homocisztein) 10 mmol/l végkoncentrációban. 30 percig inkubáltuk a mintákat 37°C-on, majd mértük a szabad szulfhidril-csoportok fogyását 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoésav (DTNB) segítségével 412 nm-en spektrofotométerrel (HP 8453, Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Németország). A DTNB munkaoldatot (Ellman's reagents) 50 mmol/l Na-acetát oldatban készült 5 mmol/l DTNB törzsoldat 100 mmol/l Tris.HCl pufferrel (pH=8.3) történő hígításával készítettük. Az eredményeket az egységnyi fehérjetartalomra eső enzimaktivitás (mU/mg fehérje) adtuk meg (1 U enzim 1 μ mol L-homocisztein fogyását katalizálja 1 perc alatt).

4.2.8. Fehérje meghatározás

A sejtek homocisztein, glutation, SAH és SAM tartalmát, valamint a sejtekben lévő enzimek aktivitását fehérjetartalomra vonatkoztatva adtuk meg. A fehérje meghatározás a

mintákban a Lowry és mtsai (1951) által leírt módon történt. A fehérjét 0,3 mol/l NaOH oldatban szolubilizáltuk, majd KNa-tartarát és réz-szulfát tartalmú lúgos közegben inkubáltuk 10 percig szobahőmérsékleten. A fehérjetartalommal arányos színreakció kialakulásához Folin-Ciocalteu reagenst adtunk az elegyekhez, és 30 perc elteltével mértük az abszorbanciát 546 nm-en spektrofotométerrel (HP 8453, Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Németország). Ismert koncentrációjú borjú szérum albumint használtunk standardként.

4.2.9. A metilcsoport beépülésének mérése

Izotóp alkalmazásával

A sejteket L-[metil- ^{14}C]-metionin (specifikus aktivitás: 54 mCi/mmol, Sigma Aldrich, St. Luis, MO, USA) jelenlétében tenyésztettük, majd meghatároztuk a beépült radioaktivitást a DNS és lipid frakciókban (Tekitek és mtsai, 1975). Az egyes frakciók elválasztása előtt a sejteket foszfát pufferben mostuk és vettük fel. A DNS kinyerését DNS izoláló kit (GenElute™ Blood Genomic DNA Kit, Sigma Aldrich, St. Luis, MO, USA) segítségével végeztük. A lipideket kloroform és metanol (Merck, Darmstadt, Németország) 2:1 (v/v) arányú keverékével extraháltuk, majd a szerves fázist 1 mol/l NaCl oldattal mostuk, végül a mintákat nitrogénáram alatt bepároltuk. Az így kapott mintákból a Nukleáris Medicina Intézet In Vitro Laboratóriumában mérték a radioaktivitás mértékét Packard Tri-Carb 2200CA (Packard Instrument International SA, Zürich, Svájc) típusú folyadékszintilációs spektrométerrel. Az eredményeket bomlás/perc (disintegrations per minute – dpm) egységben fejeztük ki.

DNS metiláltság meghatározása

A DNS metiláltsági fokának meghatározásához a sejtekből a DNS-t GenElute™ Blood Genomic DNA Kit (Sigma Aldrich, St. Luis, MO, USA) segítségével izoláltuk. Az így kapott DNS oldatok koncentrációját 260 nm hullámhosszon és tisztaságát 280 nm hullámhosszon ellenőriztük spektrofotométerrel (HP 8453, Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Németország). A mintákat megfelelő hígítás után Imprint® Methylated DNA Quantification Kit (Sigma Aldrich, St. Luis, MO, USA) segítségével dolgoztuk fel a gyártó utasításai szerint. Az eredményeket a kontrollként használt teljesen metilált DNS-hez viszonyítva százalékban adtuk meg (Liu és mtsai, 2008). A meghatározást négy alkalommal végeztük el. Minden alkalommal három-három párhuzamos mérés történt.

4.2.10. Intracelluláris reaktív oxigén eredetű gyökök termelődésének vizsgálata

A nikkel által indukált ROI termelés méréséhez fluoreszcens technikát használtunk (Lee és mtsai, 2004). A sejteket 96 lyukú plate-ben (10^5 sejt/200 μ l) inkubáltuk HBSS pufferben 1 μ mol/l koncentrációjú 2',7'-dichlorofluorescin diacetát jelenlétében 20 percig 37°C-on. A 2',7'-dichlorofluorescin diacetát bejut a sejtekbe és nem-fluoreszcens 2',7'-dichlorofluorescinné hidrolizál. A sejteket ezt követően centrifugáltuk (400 g, 5 perc szobahőmérsékleten), és a felülúszót leszívtuk. A sejteket HBSS pufferben szuszpendáltuk, majd a reakciót különböző koncentrációjú nikkel oldat (végkoncentráció: 0-25 μ g/l) hozzáadásával indítottuk. A keletkező ROI oxidálja a 2',7'-dichlorofluorescint egy fluoreszcens terméké, 2',7'-dichlorofluoresceinné. A fluoreszcencia intenzitásának változását Beckman Coulter DTX 880 készülék (Beckman Coulter Inc. Brea, CA, USA) segítségével követtük. A gerjesztési hullámhossz 485 nm, az emissziós hullámhossz 530 nm

volt. A meghatározást három alkalommal végeztük el, minden esetben három párhuzamos mérés történt.

4.2.11. A cisztationin- β -szintáz expresszió vizsgálata

mRNS expresszió meghatározása kvantitatív polimeráz láncreakció (qPCR)

technikával

A perifériás mononukleáris sejtekből RNS-t izoláltunk QIAamp RNA Blood Mini kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Németország) felhasználásával a gyártó leírása szerint. Az RNS koncentrációját és tisztaságát Nanodrop 2000 spektrofotométer (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA) használatával mértük. SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA) segítségével állítottuk elő a cDNS-t. A PCR-t iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) felhasználásával (primerek: CBS forward: 5'-AGG ATA AAG CCA AGG AG-3', reverse: 5'-TGT TGA TTC TGA CCA TAG GG-3') iCycler iQ Real Time PCR System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) készülékkel végeztük. Az eredményeket a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) mRNS mennyiségére vonatkoztatva adtuk meg (Kim és mtsai, 2009) átlag $\pm$ szórás formában tíz független mérésből.

Fehérje expresszió meghatározása Western blot technikával

A vizsgálatainkhoz pozitív kontrollként a HepG2 sejtek 10 % hőinaktivált FBS tartalmú DMEM tápfolyadékban tartott konfluens tenyészetét használtuk. A HepG2 sejtek feltárása tripszinnel történő kezelést követően történt, a perifériás mononukleáris sejtek feltárása közvetlenül izolálás után vagy 24, illetve 72 órás inkubálás (PHA-val vagy anélkül) után történt 0,1 % TritonX 100 tartalmú 0,1 mol/l foszfát pufferben proteáz inhibitorok (2

mmol/l AEBSF, 1 mmol/l EDTA, 130 μ mol/l bestain, 14 μ mol/l E64, 0.3 μ mol/l aprotinin, 1 μ mol/l leupeptin) jelenlétében (SigmafastTM Protease Inhibitor Tablets, Sigma Aldrich, St. Luis, MO, USA). A sejt lizátumot (25 μ g fehérjét tartalmazó mennyiséget) 5 perc alatt 100°C-on Laemmli pufferben denaturáltuk. A fehérjék elválasztása SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel történt (12,5 %), majd a fehérjéket nitrocellulóz membránra vittük át (AmershamTM HybondTM-ECL, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). A membránt 6 % nem-zsíros száraz tejport és 0,1 % Tween-20-t tartalmazó TBS pufferben inkubáltuk 1 óráig. Ezt követően 1 % nem-zsíros száraz tejpor tartalmú TBS-Tween 20 pufferben oldott poliklonális nyúl anti-CBS antitest (AV45746; 1,25 μ g/ml; Sigma Aldrich, St. Luis, MO, USA) jelenlétében inkubáltuk 16 órán át. A membránt ezután 1:15000 arányban hígított peroxidázzal kapcsolt számar anti-nyúl IgG-vel (AmershamTMECLTM NA934, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) inkubáltuk. Az antigén-antitest komplexeket torma peroxidáz kemilumineszcens rendszerrel (AmershamTMECLTM Western blotting detection reagents, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) vizualizáltuk, a membránra Amersham HyperfilmTM ECL röntgen-filmet (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) helyeztünk 10 percig. Tisztítás után a membránon a GAPDH fehérjét is detektáltuk. Az eredményeket denzitométer (AlphaDigiDoc RT, Alpha Innotech, Kasendorf, Németország) segítségével értékeltük ki.

4.3. Statisztikai elemzés

Az eredmények statisztikai értékeléséhez STATISTICA 7 (Statsoft, Inc. Tulsa, OK, USA) programot használtunk. Adataink eloszlását Kolmogorov-Smirnov teszt alkalmazásával elemeztük. A folytonos változók közötti összefüggéseket korrelációs 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 tesztel és párosított t próbát használtunk. A $p < 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

5. Eredmények

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

A vizsgálatban résztvevők demográfiai adatait és laboratóriumi paramétereit az 1. táblázatban foglaltuk össze. Az egészségesek szignifikánsan fiatalabbak voltak, mint a hemodializált betegek és magasabb volt a nők aránya közöttük. Az összfehérje, az albumin, a vas és a hemoglobin szintek szignifikánsan alacsonyabbak, míg a CRP, az IL-6, a ferritin, az össz-homocisztein, a nikkel, a kobalt és a réz koncentrációk szignifikánsan magasabbak voltak hemodializált betegekben, mint az egészséges csoportban. Ezek a különbségek jelzik az alultápláltságot, az anaemiát, a gyulladást és a nyomelemeltérések előfordulását, illetve rizikóját a hemodializált betegek körében. A transferrin telítettségében és a BMI értékben nem volt szignifikáns különbség. A hemodializált betegekben mért magas folsav és B₁₂-vitamin szintek annak tulajdoníthatóak, hogy a betegek a vesepótló kezelés megkezdésétől folyamatos vitaminpótlásban részesültek, körükben folsav vagy B₁₂-vitamin hiány nem fordult elő.

A korrelációs analízis eredményei szerint (2. táblázat) az össz-homocisztein szignifikáns negatív kapcsolatot mutat a folsav, a B₁₂-vitamin, a nikkel, illetve a CRP értékekkel hemodializált betegek esetében. Egészségesekben az IL-6 pozitív, a folsav pedig szignifikáns negatív összefüggést mutat az össz-homociszteinnel. Az össz-homocisztein mind hemodializált betegek, mind egészségesek körében szignifikáns pozitív kapcsolatot mutat a hemoglobin és a szérum albumin koncentrációval.

Paraméterek	Hemodializáltak	Egészségesek	p érték
Életkor (év)	60,1±12,3	37,2±10,1	0,0001
Férfi/Nő	65/57	19/31	0,04
BMI (kg/m ²)	24,5±4,9	22,4±4,8	n. s.
Összfehérje (g/l)	69 (66/73)	77 (74/80)	0,0001
Albumin (g/l)	38 (33/40)	48 (47/50)	0,0001
Hemoglobin (g/l)	115 (104/125)	135 (128/145)	0,0001
CRP (mg/l)	4,8 (3,1/14,4)	1,12 (0,61/3,10)	0,002
IL-6 (ng/ml)	7,69 (4,66/13,46)	2,17 (1,26/3,32)	0,001
Vas (μmol/l)	10,05 (7,78/13,70)	17,0 (12,9/20,5)	0,0001
Transzferrin telítettség (%)	23,4 (16,8/30,9)	22,7 (15,5/28,2)	n. s.
Ferritin (μg/l)	400 (286/621)	36,6 (21,2/77,9)	0,0001
Össz-homocisztein (μmol/l)	20,7 (15,5/24,6)	10,7 (8,9/13,8)	0,0001
Folsav (μg/l)	45,4 (15,3/45,4)	16,2 (12,6/18,1)	0,0001
B ₁₂ -vitamin (ng/l)	480 (306/674)	266 (204/307)	0,0001
Kobalt (μg/l)	0,30 (0,23/0,50)	0,15 (0,14/0,16)	0,0001
Nikkel (μg/l)	3,18 (2,53/4,95)	2,11 (0,92/2,16)	0,04
Réz (μg/l)	1214 (1030/1434)	990 (786/1180)	0,05

1. táblázat

A vizsgálatban résztvevő hemodializált vesebetegek és egészségesek demográfiai jellemzői és laboratóriumi paraméterei

Az eredményeket átlag±szórás és medián (alsó/felső kvartilis) formákban tüntettük fel.

Referencia tartományok:

összfehérje (60-80 g/l), albumin (35-52 g/l), hemoglobin (nő: 115-150; férfi: 130-165 g/l),
CRP (nő: <4,6; férfi <5,2 mg/l), vas (nő: 6,6-26; férfi: 10,6-28,3 μmol/l),
transzferrin telítettség (16-45 %), ferritin (nő: 6,9-283; férfi: 16,4-323 μg/l),
össz-homocisztein (<12 μmol/l), folsav (2,7-17 μg/l), B₁₂-vitamin (200-900 ng/l)

Paraméterek	Hemodializált betegek		Egészségesek	
	r	p érték	r	p érték
Folsav	-0,302	0,006	-0,457	0,001
B ₁₂ -vitamin	-0,347	0,0001	-0,101	n. s.
Nikkel	-0,289	0,006	-0,183	n. s.
Hgb	0,329	0,0001	0,330	0,001
Albumin	0,316	0,0004	0,249	0,03
CRP	-0,230	0,02	-0,169	n. s.
IL-6	-0,190	n. s.	0,329	0,001
Réz	-0,083	n. s.	-0,062	n. s.
Kobalt	0,048	n. s.	-0,034	n. s.
Vas	-0,081	n. s.	-0,032	n. s.
Trfsat	-0,135	n. s.	0,059	n. s.
Ferritin	-0,179	n. s.	0,200	n. s.
Összfehérje	0,094	n. s.	0,069	n. s.

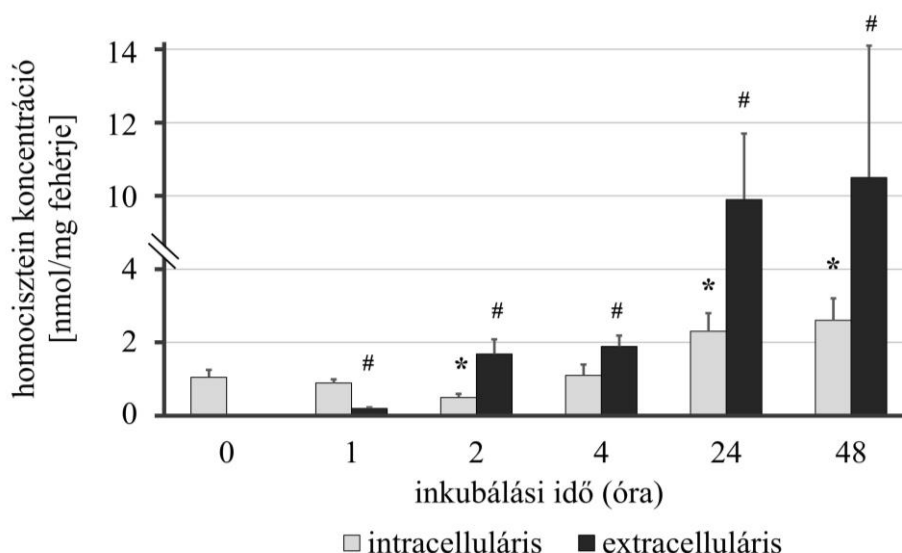
2. táblázat

**Az össz-homocisztein szint és a vizsgált laborparaméterek korrelációs analízisének
eredménye**

5.2. In vitro vizsgálatok

5.2.1. A perifériás mononukleáris sejtek homocisztein metabolizmusa

A nyugvó perifériás mononukleáris sejtek homocisztein metabolizmusának vizsgálatához első lépésként a sejteket közvetlenül izolálás után szérummentes, homociszteint nem tartalmazó RPMI tápfolyadékban inkubáltuk 48 óráig és követtük az intracelluláris, valamint a felülúszóban megjelenő homocisztein mennyiségét. Az intracelluláris homocisztein koncentráció egy kezdeti csökkenést követően emelkedett, mellyel párhuzamosan a felülúszó homocisztein szintje nőtt, majd 24 óra inkubálás után már nem változtak szignifikánsan (2. ábra).



2. ábra

Nyugvó perifériás mononukleáris sejtek intracelluláris és extracelluláris homocisztein szintjének változása az izolálásukat követő 48 órában szérummentes RPMI tápfolyadékban

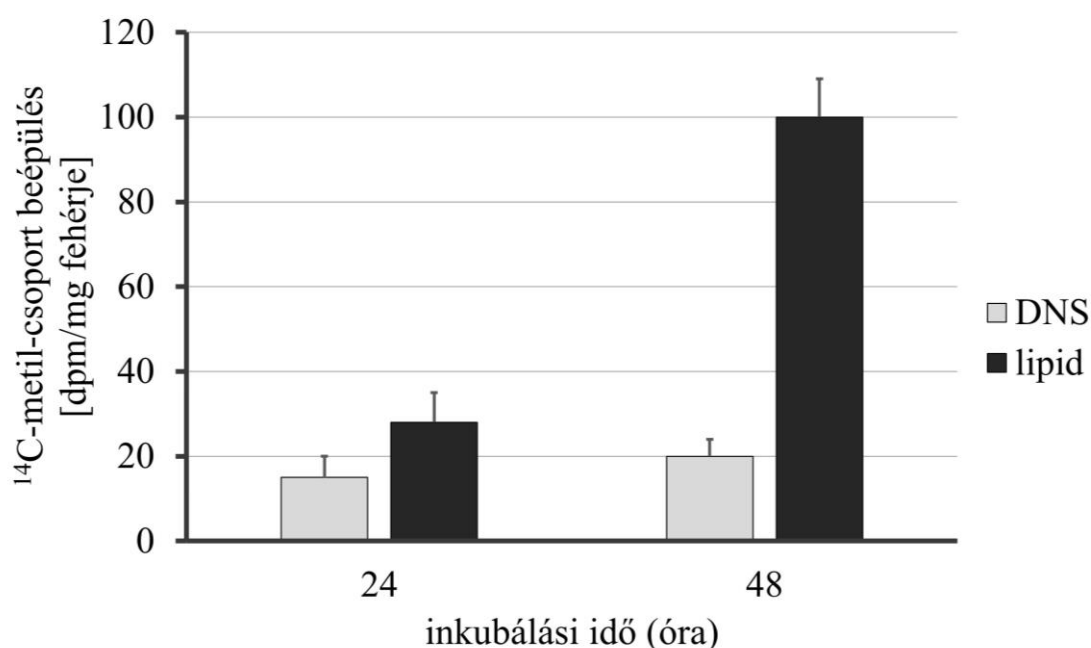
* szignifikáns eltérés a kiindulási intracelluláris értéktől; $p < 0,01$

szignifikáns eltérés a kiindulási extracelluláris értéktől; $p < 0,001$

nem különböztek szignifikánsan az intracelluláris szint esetén a 0-1-4 órás és a 24-48 órás, míg extracelluláris szint esetén a 2-4 és 24-48 órás értékek, minden más esetben $p < 0,01$

Ez a megfigyelés igazolja, hogy a nyugvó sejtek homociszteint termelnek. 48 óra alatt nem változott szignifikánsan a sejtszám, az összfehérje és az intracelluláris glutation koncentráció.

A metioninból történő *de novo* homocisztein szintézisét közvetett módon igazolja, hogy a radioaktívan jelölt ^{14}C -metilcsoportot tartalmazó metionint a sejtek aktívan használják, így az megjelent a DNS-ben és a lipidekben (3. ábra) a transzmetilázok működése nyomán.

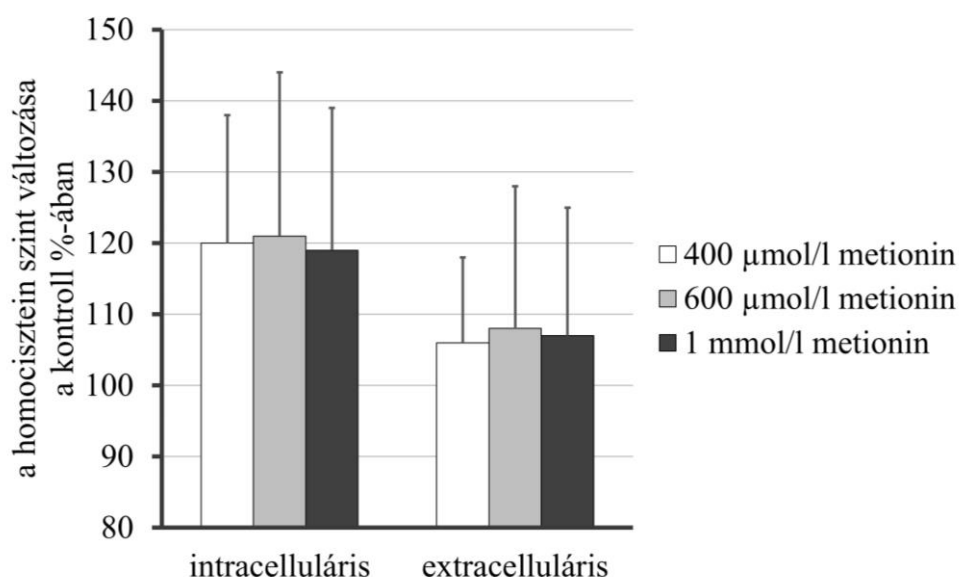


3. ábra

A radioaktívan jelölt metilcsoport beépülése nyugvó perifériás mononukleáris sejtek DNS-ébe és lipidjeibe az izolálásukat követő 24 és 48 órában szérumentes RPMI tápfolyadékban

Az RPMI tápfolyadék 100 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban tartalmaz L-metionint, melynek további emelése 400 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációig kismértékű szignifikáns ($p < 0,05$) emelkedést eredményezett a sejtek intracelluláris homocisztein szintjében 24 óra inkubálást követően, de a további metionin kiegészítés (1 mmol/l-ig) már nem járt ilyen hatással. A metionin

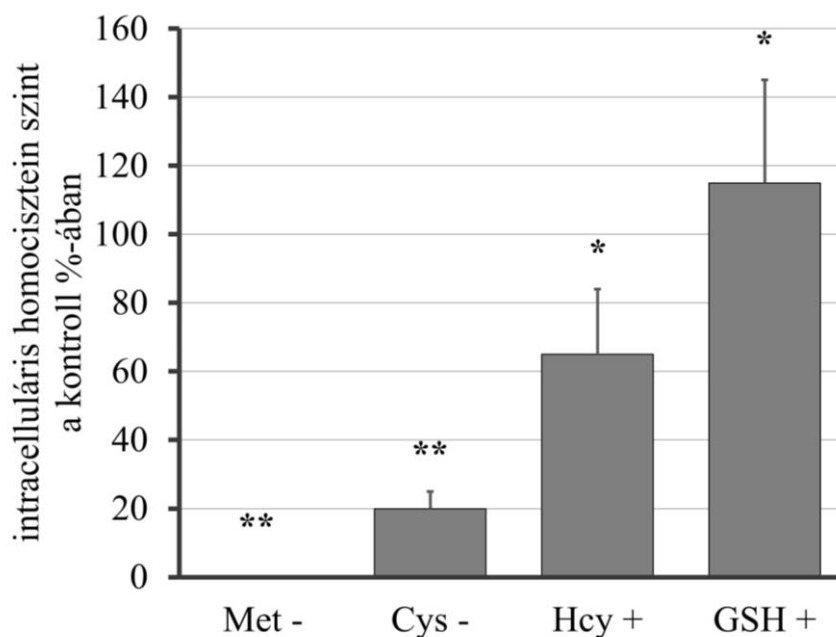
kiegészítés a tápfolyadékban megjelenő homocisztein mennyiségét nem emelte szignifikánsan (4. ábra).



4. ábra

Nyugvó perifériás mononukleáris sejtek intracelluláris és extracelluláris homocisztein szintjének változása szérummentes RPMI tápfolyadékban 24 óra alatt a tápfolyadék metionin koncentrációjának emelése mellett a kontroll (100 µmol/l metionin) %-ában

Metioninmentes RPMI tápfolyadékban 24 óra inkubálás után a sejtek nem tartalmaztak mérhető mennyiségű homociszteint. Ciszteinmentes, de metionint tartalmazó RPMI tápfolyadékban 24 óra inkubálást követően a sejtek intracelluláris homocisztein tartalma szignifikánsan alacsonyabb volt a kontrollhoz viszonyítva. A kontroll RPMI tápfolyadék L-homociszteinnel (100 µmol/l) történő kiegészítése szignifikánsan csökkentette, míg redukált glutationnal történő kiegészítése (100 µmol/l) szignifikánsan emelte a sejtek intracelluláris homocisztein szintjét (5. ábra). Ezek a megfigyelések közvetett bizonyítékai lehetnek a nyugvó sejtekben működő homocisztein remetilációnak és transzszulfurációnak.



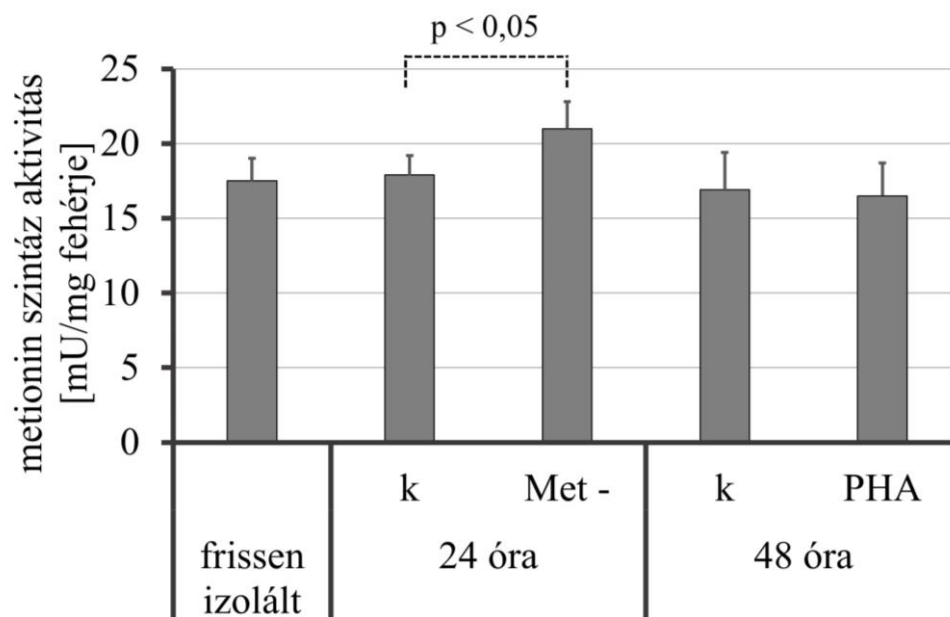
5. ábra

Nyugvó perifériás mononukleáris sejtek intracelluláris homocisztein szintjének alakulása a szérummentes RPMI-ben inkubált kontroll %-ában metionin megvonás (Met -), cisztein megvonás (Cys -), valamint 100 $\mu\text{mol/l}$ L-homocisztein (Hcy+) és 100 $\mu\text{mol/l}$ redukált glutation (GSH +) hozzáadás hatására 24 óra alatt

* szignifikáns eltérés a kontrolltól; $p < 0,05$

** szignifikáns eltérés a kontrolltól; $p < 0,001$

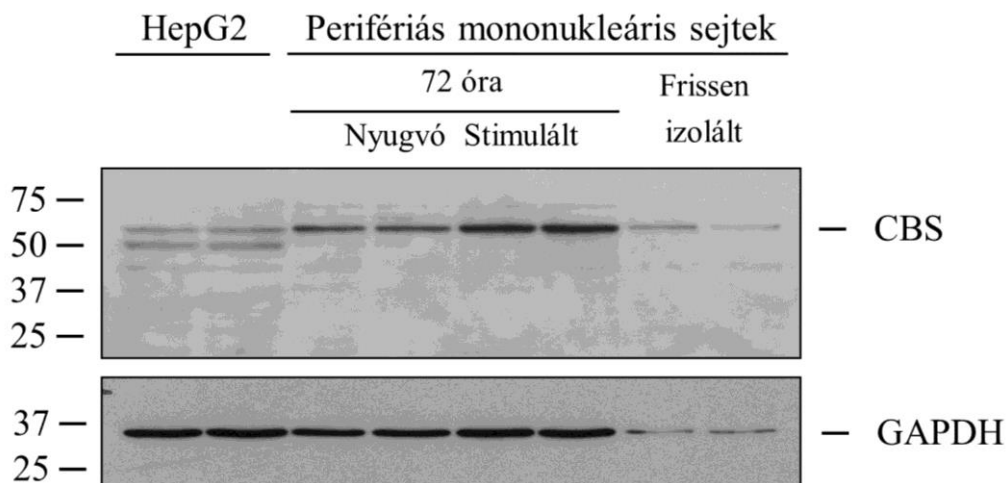
A homocisztein remetilációját végző metionin szintáz aktivitása nem változott szignifikánsan sem az inkubáció ideje alatt (a sejtek izolálásától a 48 óra inkubálás végéig), sem stimuláció hatására, viszont 24 óra metionin megvonás hatására feltételezhetően a metionin regeneráció megnövekedett igényének megfelelően kismértékű, szignifikáns emelkedést figyeltünk meg (6. ábra).



6. ábra

Nyugvó perifériás mononukleáris sejtek metionin szintáz aktivitása közvetlenül izolálás után, 24 óra szérummentes normál vagy metionin-mentes (Met -) RPMI tápfolyadékban, valamint 48 óra szérummentes RPMI tápfolyadékban és PHA-val történő stimulációt követően

Nyugvó perifériás mononukleáris sejtekben a transzszulfurációs út első lépését katalizáló CBS enzimnek a kifejeződését és működését korábban még nem igazolták. Tíz egészséges önkéntestől származó nyugvó perifériás mononukleáris sejtek felhasználásával qPCR technikával igazoltuk a CBS mRNS expresszióját (CBS/GAPDH mRNS arány: $0,964 \pm 0,28$). A továbbiakban Western blot segítségével igazoltuk, hogy a nyugvó és stimulált perifériás mononukleáris sejtekben a 63 kDa méretű CBS fehérje is jelen van. Pozitív kontrollként a humán májkarcinóma eredetű HepG2 sejteket használtuk (7. ábra), ebben a sejtvonalban igazoltan expresszálódik a CBS enzim (Zou és Banerjee, 2003).

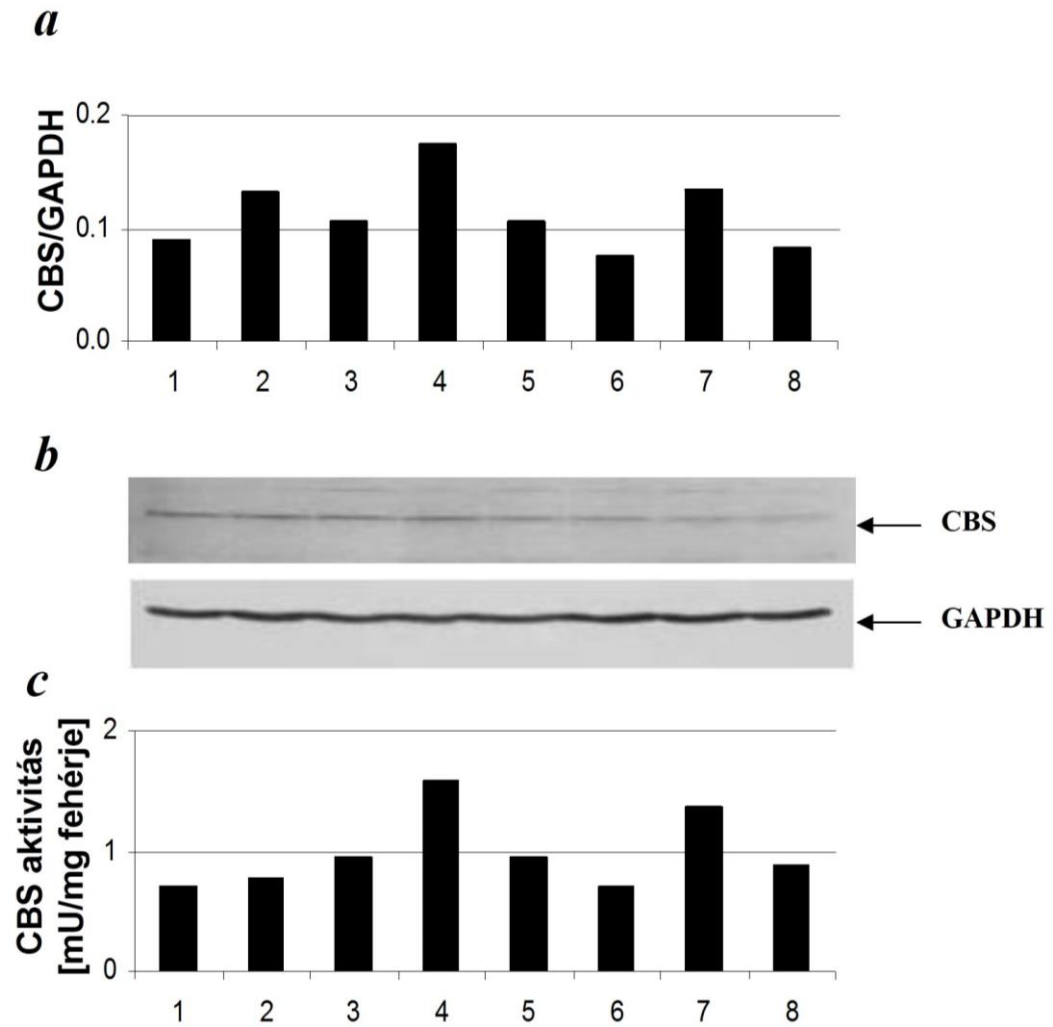


7. ábra

A CBS fehérje azonosítása Western blottal, frissen izolált, 72 óráig szérummentes RPMI tápfolyadékban inkubált vagy PHA-val stimulált perifériás mononukleáris sejtekben, pozitív kontrollként HepG2 sejteket használtunk

A HepG2 esetén a kisebb mérettartományban (~50 kDa) megjelenő sáv feltételezésünk szerint megegyezhet az oxidatív stressz általi célzott proteolízis következtében megjelenő C-terminális szakasz nélküli CBS enzimmal (Zou és Banerjee, 2003).

A CBS enzimatisz aktivitását is mértük, ami egészséges önkéntesektől (8 fő) származó perifériás mononukleáris sejtekben pozitívan korrelál a CBS fehérje GAPDH fehérjéhez viszonyított mennyiségével ($r=0,526$; $p=0,001$) (8. ábra). A CBS fehérje mennyisége és mért aktivitása nyugvó sejtekben növekszik az izolálástól eltelt idővel és stimuláció hatására (9. ábra).



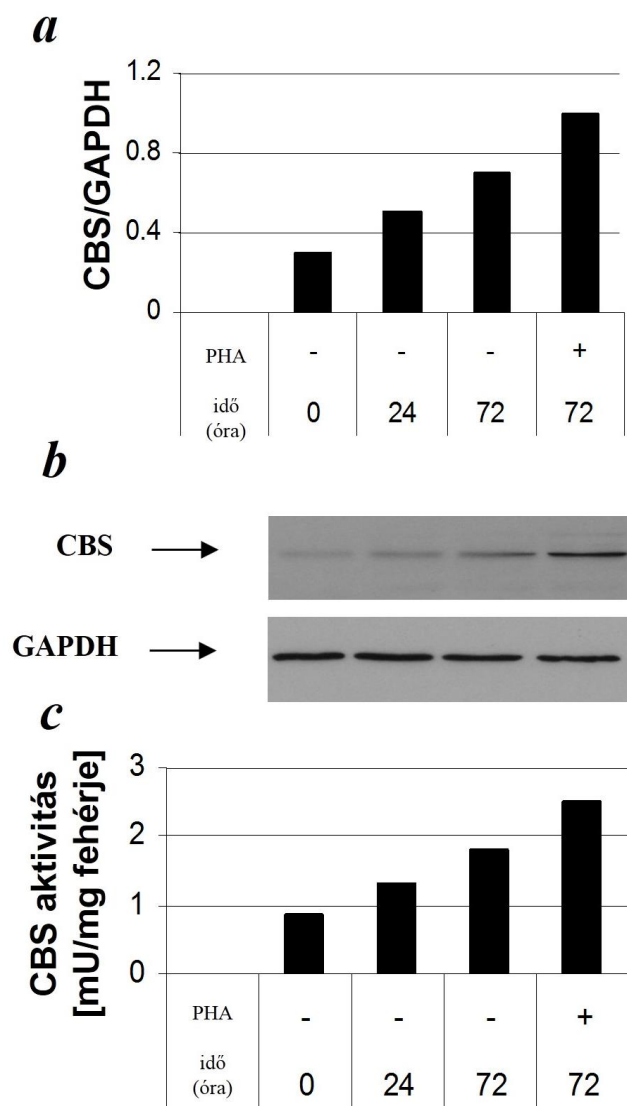
8. ábra

A CBS fehérje azonosítása és azzal párhuzamosan aktivitásának meghatározása egészséges önkéntesek (1-8) véréből izolált perifériás mononukleáris sejtekből

a – denzitometriás kiértékelés

b – a Western blot eredménye

c – közvetlenül izolálást követően a CBS enzim aktivitása



9. ábra

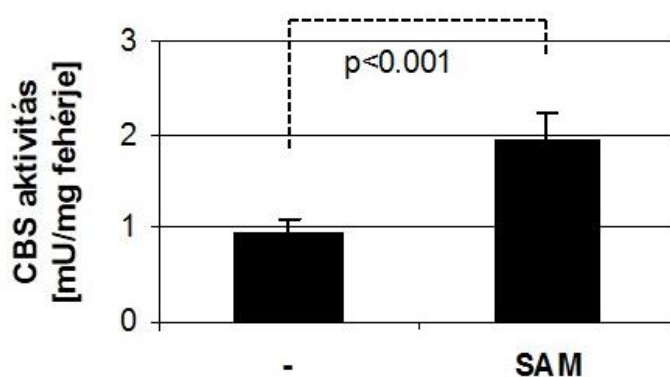
Az izolálástól eltelt idő (0, 24, 72 óra) és a PHA-val történő stimuláció hatásának vizsgálata a CBS enzim fehérje mennyiségére és aktivitására

a – denzitometriás kiértékelés

b – a Western blot eredménye

c – a feltárt sejtek CBS aktivitása

A CBS allosztérikus aktivátora a SAM, melyet az enzimaktivitás mérésekor a reakcióelegyhez adva, a CBS aktivitás szignifikáns fokozódását tapasztaltuk (10. ábra).



10. ábra

Az izolálás után közvetlenül feltárt perifériás mononukleáris sejtek CBS aktivitásának változása 400 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációjú SAM hatására

5.2.2. A nyomelemek hatása a perifériás mononukleáris sejtek homocisztein metabolizmusára

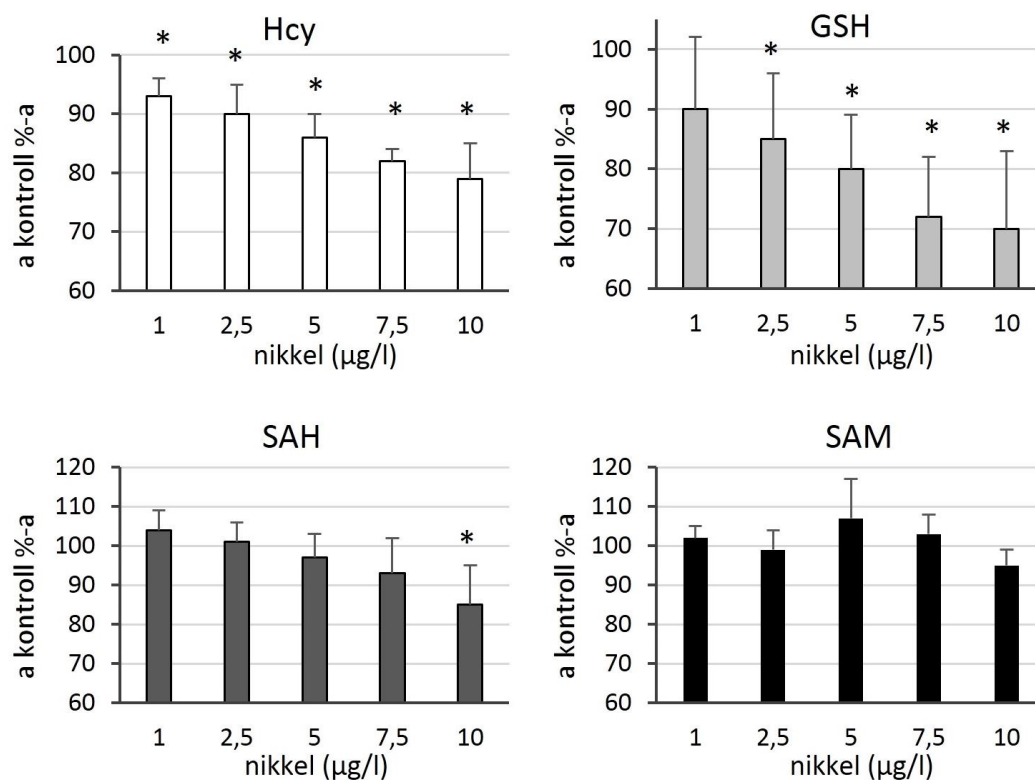
A vizsgált nyomelemek hatását (kobalt, réz, nikkel) a hemodializált betegek, illetve egészségesek szérumában általunk mért koncentrációtartományban vizsgáltuk a perifériás mononukleáris sejtek homocisztein metabolizmusára. A kobalt (0,1-0,5 $\mu\text{g/l}$) nem befolyásolta a sejtek intracelluláris homocisztein és glutation koncentrációját, sem a metionin szintáz és a CBS aktivitását. A réz (0,5-1,5 mg/l) szignifikánsan emelte a sejtek intracelluláris homocisztein és SAH szintjét, és csökkentette az intracelluláris glutation koncentrációt, melynek hátterében a réz SAH hidroláz és CBS aktivitás gátló hatása állhat (Li és mtsai,

2007; Bar-Or és mtsai, 2005). A réz nem befolyásolta a metionin szintáz aktivitását. A réz CBS aktivitásra gyakorolt hatását technikai okok miatt nem tudtuk vizsgálni, mivel a réz hozzáadásával a reakcióelegyben lévő szabad L-homocisztein és a DTNB között nem játszódott le a színreakció, ami a rézionok szabad szulfhidril csoportokkal történő reakciójával magyarázható (Smith és mtsai, 1994). A továbbiakban bővebben a nikkel alkalmazásával végzett vizsgálatok eredményeit ismertetem.

A nikkel hatása humán perifériás mononukleáris sejtek intracelluláris homocisztein, glutation, SAH és SAM szintjére

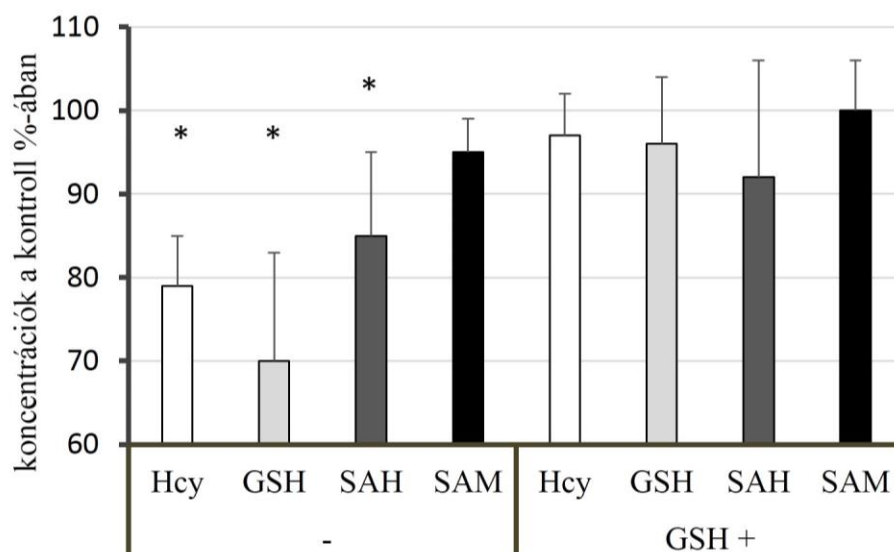
A nyugvó perifériás mononukleáris sejtek intracelluláris homocisztein, glutation, SAM és SAH koncentrációit mértük a tápfolyadékhoz adott különböző koncentrációjú nikkel jelenlétében. A nikkel koncentrációfüggő módon szignifikánsan csökkentette a homocisztein, glutation és a SAH intracelluláris mennyiségét 24 óra inkubálás során (11. ábra), miközben a SAM intracelluláris koncentrációja, valamint a felülúszóban mérhető homocisztein és glutation mennyisége nem változott szignifikánsan.

A nikkel ismert oxidatív stressz generáló és glutation depletáló hatása alapján megismételtük a vizsgálatot 100 $\mu\text{mol/l}$ redukált glutation tápfolyadékhoz adásával. A glutation szupplementáció kivédte a nikkel hatását (12. ábra).



11. ábra

A nikkel koncentráció-függő (1-10 µg/l) hatása nyugvó perifériás mononukleáris sejtek intracelluláris homocisztein (Hcy), glutation (GSH), SAH és SAM szintjeire, 24 óra inkubálás alatt szérumbesó RPMI tápfolyadékban; * $p < 0,01$

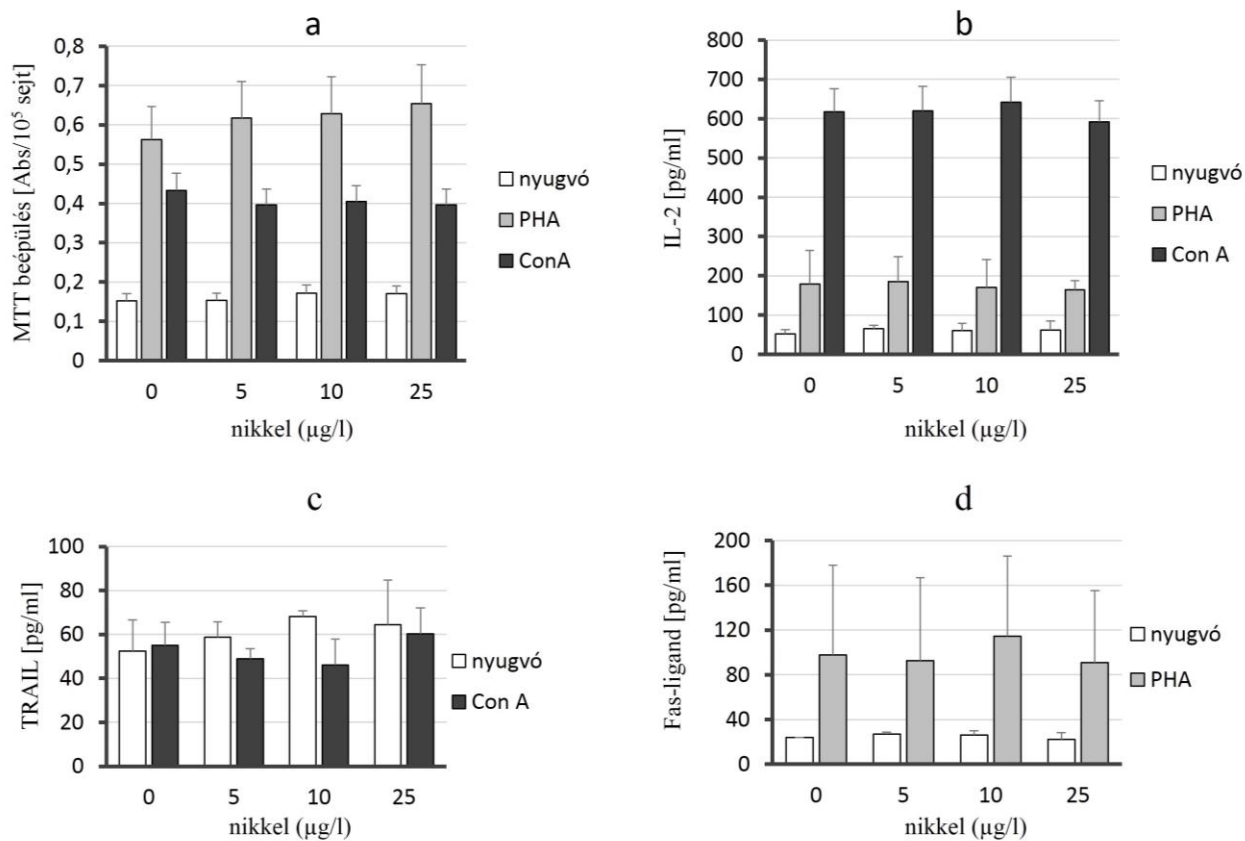


12. ábra

A nikkel (10 µg/l) hatása nyugvó perifériás mononukleáris sejtek intracelluláris homocisztein (Hcy), glutation (GSH), SAH és SAM szintjeire, 24 óra inkubálás alatt szérummentes RPMI tápfolyadékban kiegészítés nélkül (-), és glutationnal kiegészítve (GSH +); * $p < 0,01$ a kezeletlen kontrollhoz képest

A nikkel citotoxicitásának vizsgálata

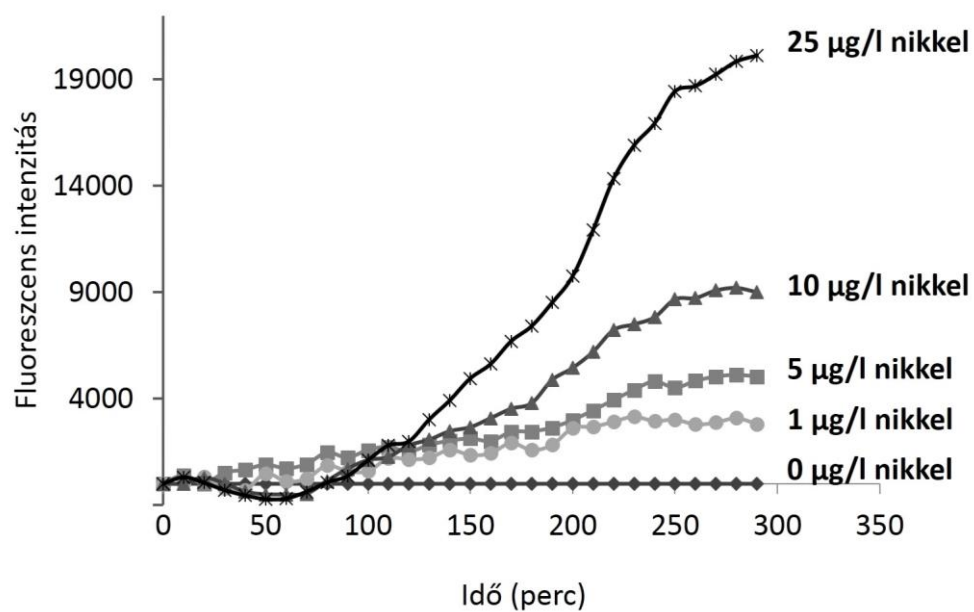
Megállapítottuk, hogy a nikkel az általunk használt kis koncentrációtartományban (5-25 µg/l), nem befolyásolja sem a nyugvó, sem a stimulált perifériás mononukleáris sejtek életképességét (MTT-teszt), az IL-2 termelését, nem befolyásolja a TRAIL és FasL kiáramlást. Az eredményeket a 13. ábrán mutatjuk be.



13. ábra

A nikkel (5-25 µg/l) hatása perifériás mononukleáris sejtek életképességére (a), IL-2 termelésére (b), TRAIL (c), és FasL termelésére (d)

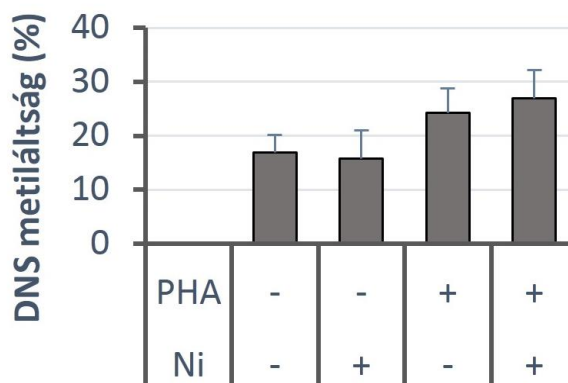
A nikkel koncentráció függő módon intracelluláris ROI termelést indukál nyugvó perifériás mononukleáris sejtekben (14. ábra).



14. ábra

A nikkel koncentráció-függő intracelluláris ROI generáló hatása nyugvó perifériás mononukleáris sejtekben

A SAM/SAH arány növekedése ellenére a nikkel nem befolyásolta nyugvó perifériás mononukleáris sejtek DNS-ének metiláltsági fokát (15. ábra).

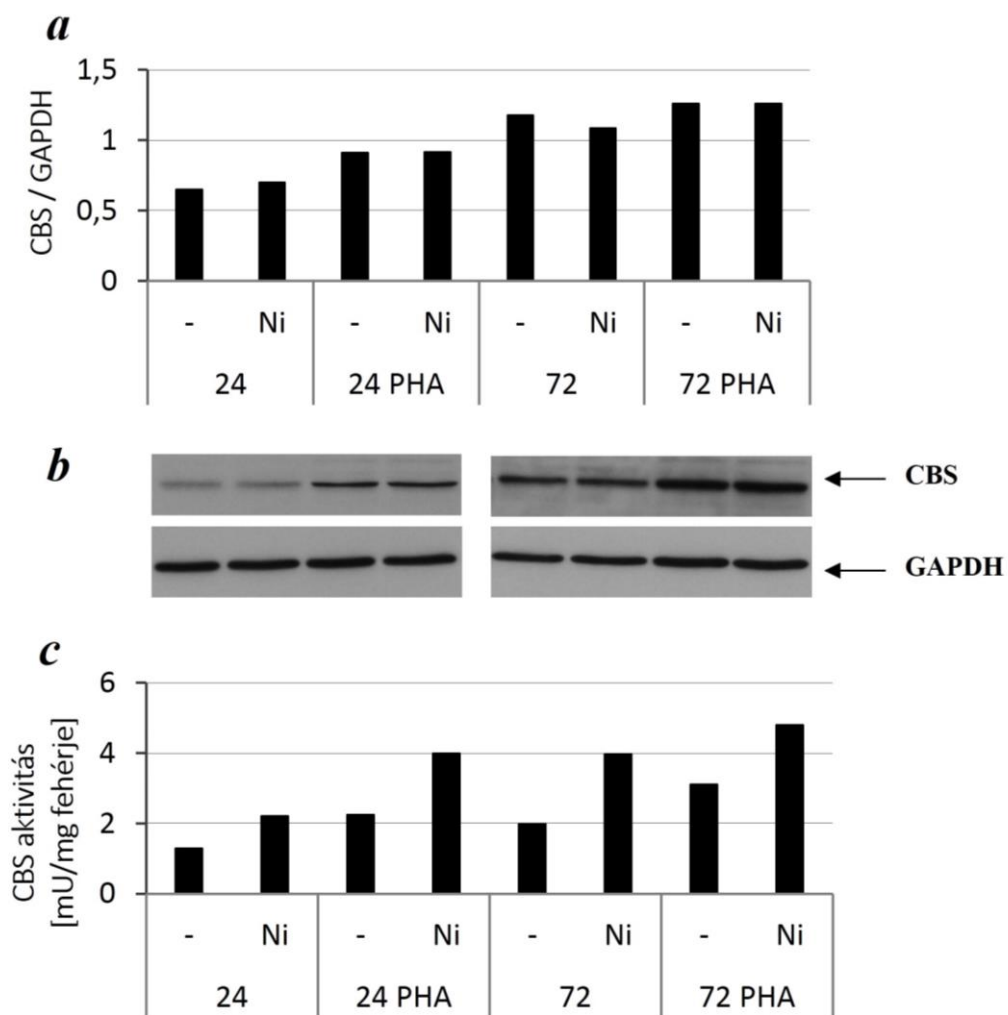


15. ábra

A nikkel (10 µg/l) hatása nyugvó és stimulált perifériás mononukleáris sejtek DNS-ének metiláltságára

A nikkel hatása a cisztationin-β-szintáz aktivitására

A homocisztein metabolizmusában a CBS enzim aktivitásának szabályozásában tölt be fontos szerepet a ROI mennyisége. Nikkel jelenlétében 24 és 72 óráig inkubált, majd feltárt nyugvó, valamint PHA kezeléssel stimulált perifériás mononukleáris sejtekből mérhető CBS aktivitás szignifikánsan magasabb volt. Az ezzel párhuzamosan elvégzett Western blot eredménye sem a CBS fehérje mennyiségének növekedését, sem a szabadgyök-mediált célzott proteolízis bekövetkezését nem igazolta nikkel hatására (16. ábra).



16. ábra

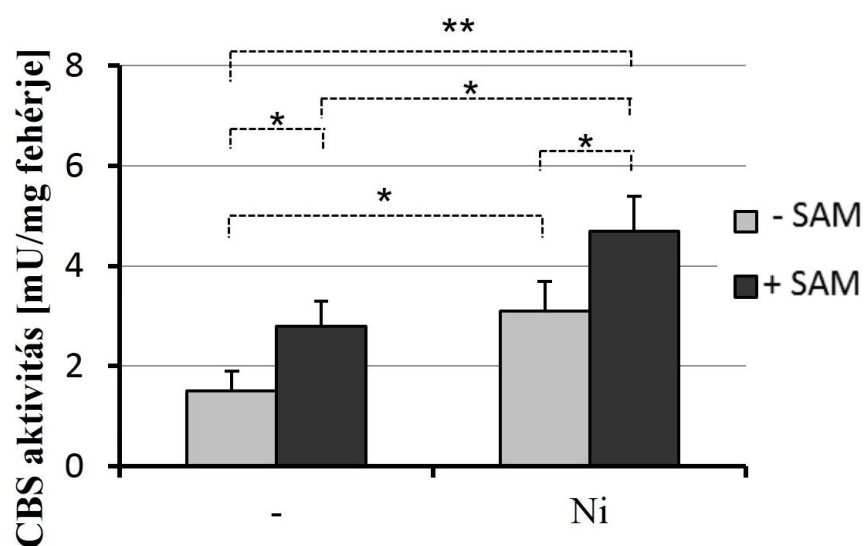
A nikkel (10 µg/l) hatása a 24 és 72 óráig inkubált nyugvó és stimulált perifériás mononukleáris sejtek CBS enzimének mennyiségére és aktivitására

a – denzitometriás kiértékelés

b – a Western blot eredménye

c – a feltárt sejtek CBS aktivitása

A CBS aktivitásának meghatározását elvégeztük közvetlenül izolálás után feltárt perifériás mononukleáris sejtekből is, és azt tapasztaltuk, hogy a nikkel közvetlenül a reakcióelegyhez adva is kifejti aktivitásfokozó hatását, és ez a hatás a SAM általi indukcióval összeadódik (17. ábra).



17. ábra

A nikkel (10 µg/l) és a SAM (400 µmol/l) hatásának vizsgálata a CBS aktivitására frissen izolált perifériás mononukleáris sejtekben; * p<0,01; ** p<0,001

6. Megbeszélés

A hemodializált vesebetegek körében a dialízis technikák fejlődése ellenére is magas a kardiovaszkuláris megbetegedések kockázata (Sarnak és mtsai, 2003; Ortiz és mtsai, 2014). Jelentős szerepe van ebben az ún. nem-tradicionalis rizikófaktoroknak pl. a krónikus gyulladásnak és a hyperhomocysteinaemiának (Zoccali és mtsai, 2004). 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 (Friedman és Fadem, 2010). A szérum albumin és összfehérje szint csökkenése hemodializáltakban az alultápláltság és a gyulladás tüneteinek részeként rosszabb prognózist jelent. Az általunk vizsgált hemodializált betegekre is jellemző volt a magas össz-homocisztein szint (a magas folsav és B₁₂-vitamin szintek ellenére) és a gyulladást jelző emelkedett szérum CRP és IL-6 koncentráció, valamint a csökkent szérum albumin és összfehérje szint. A jelentősen megemelkedett ferritin szint a gyulladás és a funkcionális vashiány markere, a csökkent hemoglobin és vaskoncentráció az anaemia jelzője.

A hemodializált betegekben nagyobb arányban találták egyes nyomelemek hiányát (cink, szelén), illetve felhalmozódását (arzén, ólom), ami függ a táplálkozástól, az adott elem dialízisének hatékonyságától, a dialízishez használt vízforrástól, és jelentős hatást gyakorolhat a vesebetegek élettani folyamataira (Tonelli és mtsai, 2009). Az általunk vizsgált elemek, a kobalt, a réz és a nikkel szintjének szignifikáns emelkedését találtuk a hemodializált betegek szérumában az egészségesekhez képest. Mindhárom elem esetében találhatunk a megfigyeléseinket igazoló, vagy annak ellentmondó eredményeket (Tonelli és mtsai, 2009; Prodanchuk és mtsai, 2014). A kobalt, a réz és a nikkel felhalmozódás megléte hemodializált betegekben egyes általunk nem vizsgált környezeti tényezőktől is függhet.

Hemodializált betegekben a szérumból folv és B₁₂-vitamin szintek negatívan korreláltak az össz-homocisztein szinttel, ami a vitaminpótlás homocisztein szint csökkentő hatását jelzi, ugyanakkor a magas vitaminszintek ellenére is enyhe hyperhomocysteinaemia volt jellemző a betegekre. Végstádiumú vesebetegségben az alultápláltság mérsékli a hyperhomocysteinaemiát, így az össz-homocisztein szint csökkenése az alultápláltság és a gyulladás fokozódásának markere is lehet (Garibotto és mtsai, 2006). Ezt támasztja alá az a megfigyelésünk, hogy a vizsgált betegekben a CRP negatívan, a hemoglobin és az albumin szintek pozitívan korreláltak az össz-homocisztein szinttel. Holven és munkatársai (2006) emelkedett IL-6 szinteket találtak kardiovaszkuláris betegségben, vagy hypercholesterinaemiában nem szenvedő, de emelkedett homocisztein szinttel rendelkezők csoportjában. A vizsgált egészséges populációban a homocisztein szint az IL-6 koncentrációval pozitívan korrelált. Ez alapján feltételezhető, hogy a homociszteinnek már a normál tartományon belüli emelkedése is kedvezőtlen hatású, és befolyásolja a gyulladásos folyamatokat. Hemodializált betegekre a kismértékű generalizált gyulladás jellemző, melynek kiváltásában és fenntartásában több faktor szerepel pl. a pro-inflammatorikus citokinek csökkent eltávolítása, az acidosis, a fertőzések és a fokozott oxidatív stressz (Akchurin és Kaskel, 2015). Ez és a már említett összefüggés a tápláltság és az össz-homocisztein szint között magyarázhatja, hogy a hemodializált betegek IL-6 és össz-homocisztein szintje között összefüggést nem találtunk.

Állatkísérletekben a hyperhomocysteinaemia nikkel- és kobaltsók etetésével mérsékelhetőnek bizonyult (Stangl és mtsai, 2000), rézhiány esetén pedig alacsonyabb homocisztein szintet találtak (Uthus és mtsai, 2007). Az össz-homocisztein szint a vizsgált hemodializált betegekben szignifikáns negatív összefüggést mutatott a szérumból nikkel szinttel, viszont a szérumból kobalt és réz koncentrációjával nem korrelált. A továbbiakban arra kerestük

a választ, hogy a felismert összefüggés jelezheti-e a nikkell homocisztein metabolizmusban betöltött szerepét humán vonatkozásban is.

A nikkell hatásának *in vitro* vizsgálatához a humán perifériás mononukleáris sejteket választottuk. A perifériás mononukleáris sejtek egyszerűen és gyorsan izolálhatóak vérből az egyes sejtféleségek fajsúlyának különbségén alapuló eljárással. Az emberi vérből nyert mononukleáris sejtekben (T-limfociták, B-limfociták, monociták és NK-sejtek) a többi emlős sejthez hasonlóan működik a metionin ciklus (a máj- és vesesejtekre jellemző betain-függő remetilációt kivéve) (Finkelstein 1990). A perifériás mononukleáris sejtek aktivációt követő proliferációja a sejtek homocisztein szintézisének jelentős emelkedésével jár, ami hozzájárulhat az immunrendszer aktiválódásához társuló hyperhomocysteinaemia kialakulásához (Schroecksnadel és mtsai, 2003a; Schroecksnadel és mtsai, 2003b). Keveset tudunk azonban a nyugvó mononukleáris sejtek homocisztein metabolizmusáról, főleg a transzszulfurációs út működéséről, ami főként annak köszönhető, hogy Goldstein és mtsai (1972) nem tudtak CBS aktivitást mérni nyugvó mononukleáris sejtekben radioaktívan jelölt szubsztrát segítségével. 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. A homocisztein kizárólag metioninból keletkezik, és a metionin ellátottság az intracelluláris SAM szintet befolyásolva határozza meg a homocisztein intracelluláris koncentrációját. ConA vagy PHA hozzáadásával stimulált mononukleáris sejtek homocisztein termelését a metionin kiegészítés szignifikánsan emeli (Schroecksnadel és mtsai, 2003a). Nyugvó sejtek esetén is azt tapasztaltuk, hogy a homocisztein szintézisük metionin-függő, de

csak 400 $\mu\text{mol/l}$ metionin koncentrációig, a további metionin kiegészítés már nem volt hatással a nyugvó sejtek homocisztein szintjére. A feltárt sejtekből mért metionin szintáz aktivitás értékében csak metionin megvonás hatására találtunk szignifikáns emelkedést, ami a remetilációs potenciál állandóságát jelzi kielégítő metionin ellátottság mellett. Az a megfigyelésünk, hogy a cisztein megvonás és a tápfolyadékhoz adott L-homocisztein csökkentette, míg a glutation emelte az intracelluláris homocisztein koncentrációt, azaz a homocisztein szintjét a cisztein- és glutationigény, valamint a homociszteintöbblet is befolyásolta, a transzszulfurációs útvonal aktivitására utal nyugvó sejtekben. Elsőként igazoltuk a transzszulfurációs út első lépését végző CBS expresszióját és aktivitását nyugvó perifériás mononukleáris sejtekben. A sejtekben jelen van a CBS mRNS és a SAM jelenlétére is reagáló aktív enzimfehérje. Egy párhuzamos vizsgálatban az aktív cisztationin- γ -liáz jelenlétét is igazoltuk nyugvó perifériás mononukleáris sejtekben (Zavaczki és mtsai, 2011), ezzel bizonyítottuk, hogy ezekben a sejtekben a teljes transzszulfurációs útvonal működik. A perifériás mononukleáris sejtek tehát nemcsak stimuláció hatására az immunválasz kialakulásakor, hanem nyugvó állapotban is aktív részesei lehetnek a plazma homocisztein szintjének alakításában. Kóros állapotokban pl. vesebetegekben a fokozott oxidatív stressz és a felhalmozódó urémiás toxinok jelentősen befolyásolhatják a keringő, nyugvó mononukleáris sejtek homocisztein metabolizmusát. A homocisztein katabolizmusában kulcsszerepet játszó CBS expresszálasával, melynek működése magas homocisztein szint esetén dominál a remetilációt végző enzimekkel szemben (Finkelstein, 1998), a nyugvó perifériás mononukleáris sejtek is részt vehetnek a homocisztein eliminálásában, detoxifikálásában hyperhomocysteinaemia esetén. A perifériás mononukleáris sejtekben működő cisztationin- γ -liáz jelentős szerepet tölt be a kén-hidrogén képződésben, mely vesebetegekben a foszfát-indukált kalcifikáció inhibitora (Zavaczki és mtsai, 2011), és védi a lipoproteineket az oxidációval szemben (Jeney és mtsai, 2009), így csökkenti a kardiovaszkuláris rizikót.

A nikkelt *in vitro* sejtes rendszerekben főként toxicitásának vizsgálatára használják a humán szérumban fiziológiásan előforduló koncentráció többszörösének alkalmazásával. Az általunk végzett vizsgálatokban a vízdékony nikkell(II)-t használtuk az egészséges populációban, illetve a vesebetegekben általunk mért fiziológiás koncentrációtartományban (1-10 µg/l). A nikkell ebben a mennyiségben nem volt toxikus hatású a nyugvó és stimulált perifériás mononukleáris sejtekre, viszont intracelluláris ROI termelést indukált. A nikkell(II) apoptózist indukáló hatását is ROI generáló képességének tulajdonítják (Kim és mtsai, 2002). Fiziológiás koncentrációban a nikkell csökkentette a perifériás mononukleáris sejtek intracelluláris homocisztein és glutation szintjét, valamint növelte a metilációs potenciált (a SAH csökkentésével a SAM/SAH arányt) de az extracelluláris glutationkoncentráció növelésével ez a hatás kivédhető volt. A növekvő SAM/SAH arány ellenére nyugvó perifériás mononukleáris sejtekben nem tudtunk kimutatni emelkedést a DNS metiláltsági fokában nikkell hatására. A CBS enzimnek fontos szerepe van a glutation-függő redox homeosztázis fenntartásában, aktivitását a redox potenciál változása is befolyásolja egy hem kofaktoron keresztül. Az enzim aktivitása kétszeresére nő, amikor a hem Fe(II) ionja Fe(III) ionná oxidálódik (Banerjee és Zou, 2005). HepG2 sejtekben megfigyelték, hogy tumor nekrosis faktor α kezelést követően generálódó szuperoxid anion gyökök hatására a CBS egy célzott proteolitikus folyamat következtében elveszíti a SAM általi aktiválásért felelős C-terminális doménjét (Zou és Banerjee, 2003). Ez a regulátor domén SAM-hiányában gátolja az enzim aktivitását, viszont a SAM kötődése feloldja a gátlást, így a domén elvesztése az enzim maximális aktivitását teszi lehetővé SAM-koncentrációtól függetlenül (Banerjee és mtsai, 2003). A nikkell az enzim mennyiségének növelése nélkül fokozta annak aktivitását. A CBS proteolízise nem következett be nikkell hatására, ez érthető annak tükrében, hogy a nikkell kezelés főként hidroxil gyökök képződéséhez vezet (Chen és mtsai, 2003), a CBS proteolízisét pedig csak szuperoxid anion gyökök hatására figyelték meg (Zou és Banerjee,

2003). Kery és munkatársai (1998) azt találták, hogy proteázokkal történő emésztéssel is lehasítható a C-terminális domén, vagy egy része. A Western blot során kontrollként alkalmazott HepG2 sejtekből származó CBS esetén megfigyeltük a proteolízis jelenségét, ezt feltételezésünk szerint a nem kielégítő proteáz inhibitor koncentráció okozhatta. A nikkel tehát úgy fokozza a CBS aktivitását, hogy az megőrzi SAM kötő képességét, ezt igazolja, hogy a rendszerünkben a nikkel és a SAM hatása összeadódott. Ezek alapján feltételezzük, hogy a nikkel hatására keletkező kis mennyiségű ROI a hem vas oxidálásával játszhat szerepet a CBS aktivitás fokozódásában.

7. 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 számára a szérum nyomelem szintekben bekövetkező változások gyakran újabb rizikófaktorokként jelentkeznek, az esszenciális nyomelemek hiánya és a toxikus elemek felhalmozódása miatt. Munkánk során a nikkel, 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 szérum nikkel és a plazma össz-homocisztein szintek között.

A nikkel hatásmechanizmusának tanulmányozásához első lépésben vizsgáltuk a perifériás vérből izolálható nyugvó mononukleáris sejtek homocisztein metabolizmusát. Elsőként igazoltuk, hogy a nyugvó perifériás mononukleáris sejtek is rendelkeznek a teljes 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 heme 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.

8. Summary

Hyperhomocysteinemia is an independent cardiovascular risk factor. We confirmed that decreasing renal function impaired homocysteine metabolism, and haemodialysis and vitamin supplementation failed to normalize hyperhomocysteinemia. Our data point to the fact that amelioration of hyperhomocysteinemia in end-stage renal patients is often the result of increasing malnutrition and inflammation, which counteract the benefits of the reduction of homocysteine levels.

Haemodialysis patients are at risk for both deficiency of essential trace elements and excess of toxic trace elements. We found nickel, cobalt and copper accumulation in haemodialysis patients. We were the first to demonstrate that significant inverse correlation exists between serum nickel and plasma total homocysteine levels.

To study the effects of trace elements, quiescent peripheral blood mononuclear cells were used. We demonstrated that these cells expressed the active CBS enzyme essential for the first step of the homocysteine catabolizing transsulfuration pathway. Thus, peripheral blood mononuclear cells in quiescent state can contribute significantly to the homocysteine homeostasis. Our cell system is a useful model for the study of homocysteine metabolism including interindividual differences.

We proved that homocysteine metabolism of quiescent peripheral mononuclear cells can be affected by nickel in the physiological concentration range. We found that the mechanism of nickel-induced CBS activity increase was mediated by increased ROI formation, most probably via the heme-binding domain of the enzyme. Increase of nickel concentration in haemodialysis patients may stimulate the elimination of homocysteine. However, putative other mechanisms of nickel action may contribute to the increase of oxidative stress, and may lead to unfavourable changes in iron profile.

9. Irodalomjegyzék

Akchurin OM, Kaskel F. Update on inflammation in chronic kidney disease. *Blood Purif.* 2015;39(1-3):84-92.

Anderson J, Briefel G, Jones JM, Ryu JH, McGuire M, Yun YP. Effects of acetate dialysate on transforming growth factor beta 1, interleukin, and beta 2-microglobulin plasma levels. *Kidney Int.* 1991 Dec;40(6):1110-1117.

Arnadottir M, Brattström L, Simonsen O, Thysell H, Hultberg B, Andersson A, Nilsson-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(4): 236-240.

Arnadottir M, Hultberg B, Nilsson-Ehle P, Thysell H. The effect of reduced glomerular filtration rate on plasma total homocysteine concentration. *Scand J Clin Lab Invest.* 1996; 56(1): 41-46.

Bamashmoos SA, Al-Nuzaily MA, Al-Meer AM, Ali FH. Relationship between total homocysteine, total cholesterol and creatinine levels in overt hypothyroid patients. *Springerplus.* 2013 Aug 30;2:423.

Banerjee R, Evande R, Kabil O, Ojha S, Taoka S. Reaction mechanism and regulation of cystathionine beta-synthase. *Biochim Biophys Acta.* 2003 Apr 11;1647(1-2):30-35.

Banerjee R, Zou CG. Redox regulation and reaction mechanism of human cystathionine-beta-synthase: a PLP-dependent hemesensor protein. *Arch Biochem Biophys.* 2005 Jan 1;433(1):144-156.

Banerjee RV, Matthews BG. Cobalamin-dependent methionine synthase *FASB J* 1990; 4:1450-1459.

Bar-Or D, Rael LT, Thomas GW, Kraus JP. Inhibitory effect of copper on cystathionine beta-synthase activity: protective effect of an analog of the human albumin N-terminus. *Protein Pept Lett.* 2005 Apr;12(3):271-273.

Beyersmann D, Hartwig A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch Toxicol.* 2008 Aug;82(8):493-512.

Blackburn GF, Shah HP, Kenten JH, Leland J, Kamin RA, Link J, Peterman J, Powell MJ, Shah A, Talley DB, et al. Electrochemiluminescence detection for development of immunoassays and DNA probe assays for clinical diagnostics. *Clin Chem*. 1991 Sep;37(9):1534-1539.

Bleackley MR, Macgillivray RT. Transition metal homeostasis: from yeast to human disease. *Biometals*. 2011 Oct;24(5):785-809.

Boer JL, Mulrooney SB, Hausinger RP. Nickel-dependent metalloenzymes. *Arch Biochem Biophys*. 2014 Feb 15;544:142-152.

Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 1968; 21: 77-89.

Cameron KS, Buchner V, Tchounwou PB. Exploring the molecular mechanisms of nickel-induced genotoxicity and carcinogenicity: a literature review. *Rev Environ Health*. 2011;26(2):81-92.

Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF et al. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. *Cancer Res* 1987; 47: 943-946.

Chadban SJ, Briganti EM, Kerr PG, Dunstan DW, Welborn TA, Zimmet PZ, Atkins RC. Prevalence of kidney damage in Australian adults: The AusDiab kidney study. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Jul;14(7 Suppl 2):S131-138.

Chamoux E, Houde N, L'Eriger K, Roux S. Osteoprotegerin decreases human osteoclast apoptosis by inhibiting the TRAIL pathway. *J Cell Physiol*. 2008 Aug;216(2):536-542.

Chauveau P, Chadeaux 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(1-3): 106-109.

Chen CY, Wang YF, Lin YH, Yen SF. Nickel-induced oxidative stress and effect of antioxidants in human lymphocytes. *Arch Toxicol*. 2003; 77(3): 123-130.

Chen H, Costa M. Iron- and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases: an emerging group of molecular targets for nickel toxicity and carcinogenicity. *Biomaterials*. 2009 Feb;22(1):191-196.

Choi JY, James SR, Link PA, McCann SE, Hong CC, Davis W, Nesline MK, Ambrosone CB, Karpf AR. Association between global DNA hypomethylation in leukocytes and risk of breast cancer. *Carcinogenesis*. 2009; 30(11): 1889-1897.

Chwatko G, Boers GH, Strauss KA, Shih DM, Jakubowski H. Mutations in methylenetetrahydrofolate reductase or cystathionine beta-synthase gene, or a high-methionine diet, increase homocysteine thiolactone levels in humans and mice. *FASEB J*. 2007 Jun;21(8):1707-1713.

Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B, Graham I. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med*. 1991 Apr 25;324(17):1149-1155.

Clase CM, Ki V, Holden RM. Water-soluble vitamins in people with low glomerular filtration rate or on dialysis: a review. *Semin Dial*. 2013 Sep-Oct;26(5):546-567.

Coresh J, Astor BC, Greene T, Eknoyan G, Levey AS. Prevalence of chronic kidney disease and decreased kidney function in the adult US population: Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Kidney Dis*. 2003 Jan;41(1):1-12.

Cortese C, Motti C. MTHFR gene polymorphism, homocysteine and cardiovascular disease. *Public Health Nutr* 2001; 4: 493-497.

Costa M, Davidson TL, Chen H, Ke Q, Zhang P, Yan Y, Huang C, Kluz T. Nickel carcinogenesis: epigenetics and hypoxia signaling. *Mutat Res*. 2005 Dec 30;592(1-2):79-88.

Davidson T, Chen H, Garrick MD, D'Angelo G, Costa M. Soluble nickel interferes with cellular iron homeostasis. *Mol Cell Biochem*. 2005 Nov;279(1-2):157-162.

Demuth K, Atger V, Borderie D, Benoit MO, Sauvaget D, Lotersztajn S, Moatti N. Homocysteine decreases endothelin-1 production by cultured human endothelial cells. *Eur J Biochem* 1999; 263: 367–376.

den Heijer M, Koster T, Blom HJ, Bos GM, Briet E, Reitsma PH, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis. *N Engl J Med*. 1996 Mar 21;334(12):759-762.

Dombovári J, Varga Z, 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. *Atom Spectrosc* 2001; 22: 331-335.

Doumas BT, Watson WA, Biggs HG. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta*. 1971 Jan;31(1):87-96.

Drummond JT, Jarrett J, González JC, Huang S, Matthews RG. Characterization of nonradioactive assays for cobalamin-dependent and cobalamin-independent methionine synthase enzymes. *Anal Biochem*. 1995; 228(2): 323-329.

Eren E, Ellidag HY, Aydin O, Yılmaz N. Homocysteine, Paraoxonase-1 and Vascular Endothelial Dysfunction: Omnibus viis Romam Pervenitur. *J Clin Diagn Res*. 2014 Sep;8(9):CE01-4.

Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* 1990;1:228–237.

Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr*. 1998 Apr;157 Suppl 2:S40-44.

Friedman AN, Bostom AG, Selhub J, Levey AS, Rosenberg IH. The kidney and homocysteine metabolism. *J Am Soc Nephrol*. 2001 Oct;12(10):2181-2189.

Friedman AN, Fadem SZ. Reassessment of albumin as a nutritional marker in kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2010 Feb;21(2):223-230.

Fryer RH, Wilson BD, Gubler DB, Fitzgerald LA, Rodgers GM. Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue factor activity in endothelial cells. *Arterioscler Thromb*. 1993 Sep;13(9):1327-1333.

Fux R, Kloor D, Hermes M, Röck T, Proksch B, Grenz A, Delabar U, Bücheler R, Igel S, Mörike K, Gleiter CH, Osswald H. Effect of acute hyperhomocysteinemia on methylation

potential of erythrocytes and on DNA methylation of lymphocytes in healthy male volunteers. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005; 289(4): F786-792.

Gaetke LM, Chow-Johnson HS, Chow CK. Copper: toxicological relevance and mechanisms. *Arch Toxicol.* 2014 Nov;88(11):1929-1938.

Garibotto G, Sofia A, Valli A, Tarroni A, Di Martino M, Cappelli V, Aloisi F, Procopio V. Causes of hyperhomocysteinemia in patients with chronic kidney diseases. *Semin Nephrol.* 2006 Jan;26(1):3-7.

Global Burden of Disease Study 2013 Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet.* 2015 Aug 22;386(9995):743-800.

Goldstein JL, Campbell BK, Gartler SM. Cystathionine synthase activity in human lymphocytes: induction by phytohemagglutinin. *J Clin Invest.* 1972 Apr;51(4):1034-1037.

Goyette P, Frosst P, Rosenblatt DS, Rozen R. Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 1052-1059.

Griffith OW. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med.* 1999 Nov;27(9-10):922-935.

Hallan SI, Coresh J, Astor BC, Asberg A, Powe NR, Romundstad S, Hallan HA, Lydersen S, Holmen J. International comparison of the relationship of chronic kidney disease prevalence and ESRD risk. *J Am Soc Nephrol.* 2006 Aug;17(8):2275-2284.

Handy DE, Zhang Y, Loscalzo J. Homocysteine down-regulates cellular glutathione peroxidase (GPx1) by decreasing translation. *J Biol Chem* 2005; 280: 15518–15525.

Hatcher DW, Anderson NG. GeMSAEC: a new analytic tool for clinical chemistry total serum protein with the biuret reaction. *Am J Clin Pathol.* 1969 Dec;52(6):645-651.

He L, Zeng H, Li F, Feng J, Liu S, Liu J, Yu J, Mao J, Hong T, Chen AF, Wang X, Wang G. Homocysteine impairs coronary artery endothelial function by inhibiting tetrahydrobiopterin

in patients with hyperhomocysteinemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010 Dec;299(6):E1061-1065.

Heinz J, Domröse U, Westphal S, Luley C, Neumann KH, Dierkes J. Washout of water-soluble vitamins and of homocysteine during haemodialysis: effect of high-flux and low-flux dialyser membranes. *Nephrology (Carlton).* 2008 Oct;13(5):384-389.

Holven KB, Aukrust P, Retterstol K, Hagve TA, Mørkrid L, Ose L, Nenseter MS. Increased levels of C-reactive protein and interleukin-6 in hyperhomocysteinemic subjects. *Scand J Clin Lab Invest.* 2006;66(1):45-54.

Hostynek JJ. Sensitization to nickel: etiology, epidemiology, immune reactions, prevention, and therapy. *Rev Environ Health.* 2006 Oct-Dec;21(4):253-280.

Hu FL, Gu Z, Kozich V, Kraus JP, Ramesh V, Shih VE. Molecular basis of cystathionine beta-synthase deficiency in pyridoxine responsive and nonresponsive homocystinuria. *Hum Mol Genet.* 1993 Nov;2(11):1857-1860.

Huang RF, Huang SM, Lin BS, Wei JS, Liu TZ. Homocysteine thiolactone induces apoptotic DNA damage mediated by increased intracellular hydrogen peroxide and caspase 3 activation in HL-60 cells. *Life Sci* 2001; 68: 2799-2811.

IARC Monographs, Volume 52 1991; 363-472.

IARC Monographs, Volume 100C 2012; 169-218.

Imbard A, Benoist JF, Blom HJ. Neural tube defects, folic acid and methylation. *Int J Environ Res Public Health.* 2013 Sep 17;10(9):4352-4389.

Jakubowski H. Anti-N-homocysteinylation protein autoantibodies and cardiovascular disease. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43: 1011–1014.

Jakubowski H. Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels. *Faseb J* 1999; 13: 2277–2283.

Jakubowski H. Translational accuracy of aminoacyl-tRNA synthetases: implications for atherosclerosis. *J Nutr.* 2001 Nov;131(11):2983S-7S.

Janssen MJ, van Guldener C, de Jong GM, van den Berg M, Stehouwer CD, Donker AJ. Folic acid treatment of hyperhomocysteinemia in dialysis patients. *Miner Electrolyte Metab.* 1996; 22(1-3): 110-114.

Jardine MJ, Kang A, Zoungas S, Navaneethan SD, Ninomiya T, Nigwekar SU, Gallagher MP, Cass A, Strippoli G, Perkovic V. The effect of folic acid based homocysteine lowering on cardiovascular events in people with kidney disease: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2012 Jun 13;344:e3533.

Jarrett JT, Goulding CW, Fluhr K, Huang S, Matthews RG. Purification and assay of cobalamin-dependent methionine synthase from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 1997; 281: 196-213.

Jeney V, Komódi E, Nagy E, Zarjou A, Vercellotti GM, Eaton JW, Balla G, Balla J. Suppression of hemin-mediated oxidation of low-density lipoprotein and subsequent endothelial reactions by hydrogen sulfide (H₂S). *Free Radic Biol Med.* 2009 Mar 1;46(5):616-623.

Joseph J, Handy DE, Loscalzo J. Quo vadis: whither homocysteine research? *Cardiovasc Toxicol.* 2009 Jun;9(2):53-63.

Kalantar-Zadeh K, Block G, Humphreys MH, McAllister CJ, Kopple JD. A low, rather than a high, total plasma homocysteine is an indicator of poor outcome in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol.* 2004 Feb;15(2):442-453.

Kamudhamas A, Pang L, Smith SD, Sadovsky Y, Nelson DM. Homocysteine thiolactone induces apoptosis in cultured human trophoblasts: a mechanism for homocysteine-mediated placental dysfunction? *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191: 563-571.

Kang A, Nigwekar SU, Perkovic V, Kulshrestha S, Zoungas S, Navaneethan SD, Cass A, Gallagher MP, Ninomiya T, Strippoli GF, Jardine MJ. Interventions for lowering plasma homocysteine levels in kidney transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015 May 4;5:CD007910.

Kerkeni M, Tnani M, Chuniaud L, Miled A, Maaroufi K, Trivin F. Comparative study on in vitro effects of homocysteine thiolactone and homocysteine on HUVEC cells: evidence for a

stronger proapoptotic and proinflammatory homocysteine thiolactone. *Mol Cell Biochem* 2006; 291: 119-126.

Kery V, Poneleit L, Kraus JP. Trypsin cleavage of human cystathionine beta-synthase into an evolutionarily conserved active core: structural and functional consequences. *Arch Biochem Biophys*. 1998 Jul 15;355(2):222-232.

Kim K, Lee SH, Seo YR, Perkins SN, Kasprzak KS. Nickel(II)-induced apoptosis in murine T cell hybridoma cells is associated with increased fas ligand expression. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2002; 185(1): 41-47.

Kim J, Hong SJ, Park JH, Park SY, Kim SW, Cho EY, Do IG, Joh JW, Kim DS. Expression of cystathionine beta-synthase is downregulated in hepatocellular carcinoma and associated with poor prognosis. *Oncol Rep*. 2009 Jun;21(6):1449-1454.

Kozich V, Kraus JP. Screening for mutations by expressing patient cDNA segments in *E. coli*: homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Hum Mutat*. 1992;1(2):113-123.

Kraus JP, Janosík M, Kozich V, Mandell R, Shih V, Sperandeo MP, Sebastio G, de Franchis R, Andria G, Kluijtmans LA, Blom H, Boers GH, Gordon RB, Kamoun P, Tsai MY, Kruger WD, Koch HG, Ohura T, Gaustadnes M. Cystathionine beta-synthase mutations in homocystinuria. *Hum Mutat*. 1999;13(5):362-375.

Kullo IJ, Ding K, Boerwinkle E, Turner ST, Mosley TH Jr, Kardia SL, Andrade M. Novel genomic loci influencing plasma homocysteine levels. *Stroke* 2006; 37: 1703–1709.

Lee YS, Kang YS, Lee JS, Nicolova S, Kim JA. Involvement of NADPH oxidase-mediated generation of reactive oxygen species in the apoptotic cell death by capsaicin in HepG2 human hepatoma cells. *Free Radic Res*. 2004 Apr;38(4):405-412.

Lentz SR, Sadler JE. Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombogenic agent homocysteine. *J Clin Invest* 1991; 88: 1906–1914.

Levey AS, Coresh J. Chronic kidney disease. *Lancet*. 2012 Jan 14;379(9811):165-180.

Li M, Li Y, Chen J, Wei W, Pan X, Liu J, Liu Q, Leu W, Zhang L, Yang X, Lu J, Wang K. Copper ions inhibit S-adenosylhomocysteine hydrolase by causing dissociation of NAD⁺ cofactor. *Biochemistry*. 2007 Oct 16;46(41):11451-11458.

Liu C, Wang Q, Guo H, Xia M, Yuan Q, Hu Y, Zhu H, Hou M, Ma J, Tang Z, Ling W. Plasma S-adenosylhomocysteine is a better biomarker of atherosclerosis than homocysteine in apolipoprotein E-deficient mice fed high dietary methionine. *J Nutr*. 2008 Feb;138(2):311-315.

Lobo A, Naro A, Arheart K, Kruger WD, Abou-Ghazala T, Alsous F, Nahlawi M, Gupta A, Moustapha A, van Lente F, Jacobsen DW, Robinson K. Reduction of homocysteine levels in coronary artery disease by low-dose folic acid combined with vitamins B6 and B12. *Am J Cardiol*. 1999; 83(6): 821-825.

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr A. Protein measurement with folin reagent. *J Biol Chem* 1951; 125: 265-273.

Malinowska A, Chmurzynska A. Polymorphism of genes encoding homocysteine metabolism-related enzymes and risk for cardiovascular disease. *Nutr Res*. 2009 Oct;29(10):685-695.

Mercié P, Garnier O, Lascoste L, Renard M, Closse C, Durrien F, Marit G, Boisseau RM, Belloc F. Homocysteine-thiolactone induces caspase-independent vascular endothelial cell death with apoptotic features. *Apoptosis* 2000; 5: 403-411.

Mourvaki E, Ferrante F, Ghirarduzzi A, Brini M, Depunzio I, Iorio A. Performance comparison of three assay methods used in fasting and postmethionine load plasma homocysteine determinations from patients with vascular disease. *Am J Clin Pathol*. 2005 Nov;124(5):675-681.

Mudd SH, Finkelstein JD, Refsum H, Ueland PM, Malinow MR, Lentz SR, Jacobsen DW, Brattström L, Wilcken B, Wilcken DE, Blom HJ, Stabler SP, Allen RH, Selhub J, Rosenberg IH. Homocysteine and its disulfide derivatives: a suggested consensus terminology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20(7): 1704-1706.

Nagy J. Krónikus vesebetegségek „epidémiája”. *Orv Hetil*. 2013 Jan 13;154(2):43-51.

Nascimento MM, Suliman ME, Silva M, Chinaglia T, Marchioro J, Hayashi SY, Riella MC, Lindholm B, Anderstam B. Effect of oral N-acetylcysteine treatment on plasma inflammatory and oxidative stress markers in peritoneal dialysis patients: a placebo-controlled study. *Perit Dial Int.* 2010 May-Jun;30(3):336-342.

Nielsen FH, Uthus EO, Poellot RA, Shuler TR. Dietary vitamin B12, sulfur amino acids, and odd-chain fatty acids affect the responses of rats to nickel deprivation. *Biol Trace Elem Res.* 1993 Apr;37(1):1-15.

Nielsen FH. Nickel. In: *Trace elements in human and animal nutrition – 5.kiadás.* Szerk: Walter Mertz, Academic Press, 2013.

Nonaka H, Tsujino T, Watari Y, Emoto N, Yokoyama M. Taurine prevents the decrease in expression and secretion of extracellular superoxide dismutase induced by homocysteine: amelioration of homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress by taurine. *Circulation.* 2001 Sep 4;104(10):1165-1170.

Obeid R, McCaddon A, Herrmann W. The role of hyperhomocysteinemia and B-vitamin deficiency in neurological and psychiatric diseases. *Clin Chem Lab Med.* 2007;45(12):1590-1606.

Ortiz A, Covic A, Fliser D, Fouque D, Goldsmith D, Kanbay M, Mallamaci F, Massy ZA, Rossignol P, Vanholder R, Wiecek A, Zoccali C, London GM; Board of the EURECA-m Working Group of ERA-EDTA. Epidemiology, contributors to, and clinical trials of mortality risk in chronic kidney failure. *Lancet.* 2014 May 24;383(9931):1831-1843.

Oshiro I, Takenaka T, Maeda J. New method for hemoglobin determination by using sodium lauryl sulfate (SLS). *Clin Biochem.* 1982 Apr;15(2):83-88.

Pan Y, Guo LL, Cai LL, Zhu XJ, Shu JL, Liu XL, Jin HM. Homocysteine-lowering therapy does not lead to reduction in cardiovascular outcomes in chronic kidney disease patients: a meta-analysis of randomised, controlled trials. *Br J Nutr.* 2012 Aug;108(3):400-407.

Prodanchuk M, Makarov O, Pisarev E, Sheiman B, Kulyzkiy M. Disturbances of trace element metabolism in ESRD patients receiving hemodialysis and hemodiafiltration. *Cent European J Urol.* 2014;66(4):472-476.

Refsum H, Nurk E, Smith AD, Ueland PM, Gjesdal CG, Bjelland I, Tverdal A, Tell GS, Nygård O, Vollset SE. The Hordaland Homocysteine Study: a community-based study of homocysteine, its determinants, and associations with disease. *J Nutr.* 2006 Jun;136(6 Suppl):1731S-1740S.

Renga B. Hydrogen sulfide generation in mammals: the molecular biology of cystathionine- β -synthase (CBS) and cystathionine- γ -lyase (CSE). *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2011 Apr;10(2):85-91.

Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culleton B, Hamm LL, McCullough PA, Kasiske BL, Kelepouris E, Klag MJ, Parfrey P, Pfeffer M, Raij L, Spinosa DJ, Wilson PW; American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Circulation.* 2003 Oct 28;108(17):2154-2169.

Sánchez A, Mirabel JL, Barrenechea E, Eugui J, Puelles A, Castañeda A. Evaluation of an improved immunoturbidimetric assay for serum C-reactive protein on a COBAS INTEGRA 400 Analyzer. *Clin Lab.* 2002;48(5-6):313-317.

Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med.* 2001 Jun 1;30(11):1191-1212.

Scholze A, Rinder C, Beige J, Riezler R, Zidek W, Tepel M. Acetylcysteine reduces plasma homocysteine concentration and improves pulse pressure and endothelial function in patients with end-stage renal failure. *Circulation.* 2004 Jan 27;109(3):369-374.

Schroecksnadel K, Frick B, Winkler C, Leblhuber F, Wirleitner B, Fuchs D. Hyperhomocysteinemia and immune activation. *Clin Chem Lab Med.* 2003 Nov;41(11):1438-1443.

Schroecksnadel K, Frick B, Wirleitner B, Schennach H, Fuchs D. Homocysteine accumulates in supernatants of stimulated human peripheral blood mononuclear cells. *Clin Exp Immunol*. 2003 Oct;134(1):53-56.

Selhub J, Jacques PF, Bostom AG, D'Agostino RB, Wilson PW, Belanger AJ, O'Leary DH, Wolf PA, Schaefer EJ, Rosenberg IH. Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis. *N Engl J Med*. 1995 Feb 2;332(5):286-291.

Sharma M, Tiwari M, Tiwari RK. Hyperhomocysteinemia: Impact on Neurodegenerative Diseases. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2015 Nov;117(5):287-296.

Sharma P, Senthilkumar RD, Brahmachari V, Sundaramoorthy E, Mahajan A, Sharma A, Sengupta S. Mining literature for a comprehensive pathway analysis: a case study for retrieval of homocysteine related genes for genetic and epigenetic studies. *Lipids Health Dis*. 2006 Jan 23;5:1.

Simonsen LO, Harbak H, Bennekou P. Cobalt metabolism and toxicology--a brief update. *Sci Total Environ*. 2012 Aug 15;432:210-205.

Smith RC, Reed VD, Hill WE. Oxidation of thiols by copper (II). Phosphorus, Sulfur and Silicone, and the related Elements. 1994; 90(1-4): 147-154.

Smolders RG, de Meer K, Kenemans P, Jakobs C, Kulik W, van der Mooren MJ. Oral estradiol decreases plasma homocysteine, vitamin B6, and albumin in postmenopausal women but does not change the whole-body homocysteine remethylation and transmethylation flux. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90(4): 2218-2224.

Sofuni T, Yoshida MC. Combined use of several mitogens for mitotic stimulation to human lymphocytes. *J Radiat Res*. 1992 Mar;33 Suppl:222-230.

Stangl GI, Roth-Maier DA, Kirchgessner M. Vitamin B-12 deficiency and hyperhomocysteinemia are partly ameliorated by cobalt and nickel supplementation in pigs. *J Nutr*. 2000; 130(12): 3038-3044.

Steijns LS, Braams-Wiatrowska JK, Luiting HJ, van der Weide J. Evaluation of nonisotopic binding assays for measuring vitamin B12 and folate in serum. *Clin Chim Acta*. 1996 Apr 30;248(2):135-141.

Suliman ME, Qureshi AR, Bárány P, Stenvinkel P, Filho JC, Anderstam B, Heimbürger O, Lindholm B, Bergström J. Hyperhomocysteinemia, nutritional status, and cardiovascular disease in hemodialysis patients. *Kidney Int*. 2000 Apr;57(4):1727-1735.

Suliman ME, Bárány P, Kalantar-Zadeh K, Lindholm B, Stenvinkel P. Homocysteine in uraemia--a puzzling and conflicting story. *Nephrol Dial Transplant*. 2005 Jan;20(1):16-21.

Takács Sándor. A nyomelemek nyomában 2001, Medicina Könyvkiadó Rt. ISBN 963 242 690 8

Tekitek A, Kerr SJ, Barbier M, Lederer E. Transfer of the methyl group of methionine to choline and to tRNA in the honeybee *Apis mellifica* L. *Biochimie*. 1975;57(10):1185-1188.

Tonelli M, Wiebe N, Hemmelgarn B, Klarenbach S, Field C, Manns B, Thadhani R, Gill J; Alberta Kidney Disease Network. Trace elements in hemodialysis patients: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med*. 2009 May 19;7:25.

Ubbink JB, Hayward Vermaak WJ et al. Rapid high-performance liquid chromatographic assay for total homocysteine levels in human serum. *J Chromatogr* 1991; 565: 441-446.

Undas A, Williams EB, Butenas S, Orfeo T, Mann KG. Homocysteine inhibits inactivation of factor Va by activated protein C. *J Biol Chem* 2001; 276: 4389–4397.

Urquhart BL, Freeman DJ, Spence JD, House AA. The effect of mesna on plasma total homocysteine concentration in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*. 2007 Jan;49(1):109-117.

Uthus EO, Poellot RA. Dietary folate affects the response of rats to nickel deprivation. *Biol Trace Elem Res*. 1996 Apr;52(1):23-35.

Uthus EO, Poellot RA. Dietary nickel and folic acid interact to affect folate and methionine metabolism in the rat. *Biol Trace Elem Res*. 1997 Jul-Aug;58(1-2):25-33.

Uthus EO, Reeves PG, Saari JT. Copper deficiency decreases plasma homocysteine in rats. *J Nutr*. 2007 Jun;137(6):1370-1374.

Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*. 2005;12(10):1161-1208.

Verhoef P, de Groot LC. Dietary determinants of plasma homocysteine concentrations. *Semin Vasc Med*. 2005 May;5(2):110-123.

Wang G, O K. Homocysteine stimulates the expression of monocyte chemoattractant protein-1 receptor (CCR2) in human monocytes: possible involvement of oxygen free radicals. *Biochem J*. 2001 Jul 1;357(Pt 1):233-240.

Wang G, Siow YL, O K. Homocysteine stimulates nuclear factor kappaB activity and monocyte chemoattractant protein-1 expression in vascular smooth-muscle cells: a possible role for protein kinase C. *Biochem J*. 2000 Dec 15;352 Pt 3:817-826.

Wang J, Dudman NP, Wilcken DE. Effects of homocysteine and related compounds on prostacyclin production by cultured human vascular endothelial cells. *Thromb Haemost* 1993; 70: 1047–1052.

Wang R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiol Rev*. 2012 Apr;92(2):791-896.

Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med*. 1998; 338(15): 1042-1050.

Wise CK, Cooney CA, Ali SF, Poirier LA. Measuring S-adenosylmethionine in whole blood, red blood cells and cultured cells using fast preparation method and high performance liquid chromatography. *J Chromatography* 1997; 696: 145-152.

Wu CC, Zheng CM, Lin YF, Lo L, Liao MT, Lu KC. Role of homocysteine in end-stage renal disease. *Clin Biochem*. 2012 Nov;45(16-17):1286-1294.

Yap S, Boers GH, Wilcken B, Wilcken DE, Brenton DP, Lee PJ, Walter JH, Howard PM, Naughten ER. Vascular outcome in patients with homocystinuria due to cystathionine beta-

synthase deficiency treated chronically: a multicenter observational study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001 Dec;21(12):2080-2085.

Yee HY, Zin A. An autoanalyzer procedure for serum iron and total iron-binding capacity, with use of ferrozine. *Clin Chem.* 1971 Sep;17(9):950-953.

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.* 2011 Oct;80(7):731-739.

Zeng X, Dai J, Remick DG, Wang X. Homocysteine mediated expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human monocytes. *Circ Res.* 2003 Aug 22;93(4):311-320.

Zhang B, Sun T, Xue L, Han X, Zhang B, Lu N, Shi Y, Tan W, Zhou Y, Zhao D, Zhang X, Guo Y, Lin D. Functional polymorphisms in FAS and FASL contribute to increased apoptosis of tumor infiltration lymphocytes and risk of breast cancer. *Carcinogenesis.* 2007 May;28(5):1067-1073.

Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G. Novel cardiovascular risk factors in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2004 Jan;15 Suppl 1:S77-80.

Zou CG, Banerjee R. Tumor necrosis factor-alpha-induced targeted proteolysis of cystathionine beta-synthase modulates redox homeostasis. *J Biol Chem.* 2003 May 9;278(19):16802-16808.

10. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



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. Zsíros, 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. Galgóczy, E., Jeney, F., Gazdag, A., Erdei, A., **Katkó, M.**, M. Nagy, D., Ujhelyi, B., Steiber, Z., Győry, 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., Győry 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/nan.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., András D., Kovács B., Mocsáry P., Nagy V. E.: A jóellátottságot 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: *Phytopharmacology 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.: Pragnolosi 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 alapján szolgáló közleményekre): 4,927

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

Debrecen, 2016.05.02.



11. Függelék

Kulcsszavak:

homocisztein, nikkel, hemodialízis, perifériás mononukleáris sejtek, cisztationin- β szintáz

Keywords:

homocysteine, nickel, haemodialysis, peripheral mononuclear cells, cystathionine- β synthase

Köszönetnyilvánítás:

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek: Dr. Varga Zsuzsának, aki sajnos az elmúlt évben súlyos betegség következtében elhunyt, a laboratóriumi munkám irányításáért, a kísérletek megtervezésében nyújtott segítségéért 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 Mezőgazdasági-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar Élelmiszertudományi, Minőségbiztosítási és Mikrobiológiai Intézetének 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 segítségéért, 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 Ferencnek, 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 „A” épület dolgozóinak a segítőkészségét.