

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Végstádiumú veseelégtelen betegek fokozott vaszkuláris rizikó faktorainak vizsgálata

dr. Becs Gergely

Témavezető: Prof. Dr. Balla György



DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2019.

Végstádiumú veseelégtelen betegek fokozott vaszkuláris rizikó faktorainak vizsgálata

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

Írta: dr. Becs Gergely

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán Doktori Iskolája
(Trombózis, hemosztázis és vaszkuláris biológia programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Balla György, akadémikus

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Muszbek László, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Szabó Attila, MTA doktora
Dr. Harangi Mariann, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Laboratóriumi Medicina Intézet,
Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszék könyvtára
2019. november 26, 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Nagy Judit, MTA doktora
Dr. Barta Judit

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Muszbek László, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Nagy Judit, MTA doktora
Prof. Dr. Szabó Attila, MTA doktora
Dr. Barta Judit, PhD
Dr. Harangi Mariann, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,

Belgyógyászati Intézet A épület tanterme
2019. november 26, 14:00 óra

1. Bevezető és irodalmi áttekintés

1.1. Krónikus vesebetegség, végstádiumú veseelégtelenség, vesepótló kezelések

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

A krónikus vesebetegség stádiumait a glomerulus filtrációs ráta (GFR) alapján lehetséges beosztani. A becsült GFR (estimated GFR, eGFR) számításánál nagy esetszámú tanulmányok alapján, olyan tapasztalati képletet igyekeztek megalkotni, mely a számításhoz szükséges tényleges vizsgálatokat (pl.: vérévétel, vizeletgyűjtés, stb.) minimalizálják és a laboratórium számára egyébként is hozzáférhető antropometria adatokat használják fel. 2009-ben kollaborációs vizsgálat kapcsán került megalkotásra a „Chronic Kidney Disease – Epidemiology” (CKD-EPI) formula, mely már 90 ml/perc/1,73 m²-ig képes megbecsülni a vesefunkciót jellemző eGFR értéket.

Az eGFR érték birtokában a stádium beosztást elvégezhetjük, a rendszeresen ellenőrzött vesefunkció meghatározással pedig pontosan nyomon követhetjük a változás dinamikáját. Az I. stádium esetén az eGFR érték a normál tartományban van, viszont a fennálló strukturális és a funkcionális eltérések alapján már használhatjuk ezt a besorolást. A III. stádium megbontása 2 alcsoportra a krónikus vesebetegség kimenetelében észlelhető progresszió alapján történt, mely szerint 45 ml/perc/1,73 m²-es értéket elérve a folyamat progressziója már nem állítható meg, egyetlen lehetőség a folyamat előrehaladásának lassítása. A progresszió során, vagy egyéb úton kialakult 15 ml/perc/1,73m² értéket elérő, vagy ennél is kisebb esetben a vesefunkciót már végstádiumú veseelégtelenségnek nevezzük.

A kiesett vesefunkció pótlására a vesetranszplantáció a legmegfelelőbb, azonban a krónikus vesebetegséggel küzdők számos társbetegséggel rendelkeznek, melyek relatív vagy abszolút módon kontraindikálják a beavatkozást. Amennyiben a vesetranszplantáció nem lehetséges, vagy a beültetett vese funkcióvesztésének következtében a vesefunkció ismételt 10 ml/perc alá csökken, akkor dialízis kezelés válik szükségessé. A dialízisnek két fő formája ismert, a hemodialízis és a

peritonealis dialízis. A hemodialízis során a beteg vérért félígáteresztő membránon átvezetve dializáló oldat segítségével megtisztul a kis molekulású salakanyagoktól diffúzió segítségével. A diffúzió és ellenáramlás elvén működő kezelési típust hemodialízis modalitásnak is nevezzük. Hemodialízis során a membrán kb. 10 kDa pórus méretét meghaladó molekulák esetén gyakorlatilag nincs lehetőségünk diffúzióval méregtelenítést végezni. Az elmúlt évtizedekben számos technikát dolgoztak ki a nagyobb molekulaméretű anyagok eltávolítására. A hemofiltráció során megnövelt hidrosztatikus nyomás alkalmazásával a konvektív transzportnak nevezett folyamat segítségével nyílik lehetőség a méreganyagokat a plazmával együtt eltávolítani. Kezelésként legalább 18 liter folyadékeltválítás során csökkent kardiovaszkuláris rizikót és jobb túlélési eredményeket írtak le. Az elvesztett folyadék mennyiséget steril infúziós oldattal szükséges pótolni. Fontos hátránya a hemodialízishez viszonyított rosszabb salakanyag eltávolítás az alacsonyabb molekulatömegű anyagok viszonylatában. Mondhatni kompromisszumként, de sokkal inkább mindkét modalitás előnyeit figyelembe véve alkották meg a hemodiafiltrációs kezelést. A járóbeteg ellátásként végzett, de mégis intézethez kötött, a betegek szállításával járó hemodialízissel szemben a peritonealis dialízis a betegek számára egy sokkal szabadabb életet, jobb életminőséget biztosít. A hasi dialízis alapja a hashártyának félígáteresztő membránként való alkalmazása. A vékony egyrétegű köbhámból és basalis membránból álló struktúra lehetővé teszi a salakanyagok diffúzióval történő dializáló oldatba jutását. A szervezet számára felesleges folyadékeltválítása a dializáló folyadékban lévő glükóz által fenntartott onkotikus nyomás hatására valósul meg.

1.2. A vesebetegség rizikófaktorai és a vesebetegség, mint rizikó faktor

A krónikus vesebetegség kialakulásának hátterében számos szisztémás betegség állhat, melyeket azonban a manifesztálódó vesebetegség is súlyosbíthat. Jól ismert a magasvérnyomás-betegség, az érlelmeszesedés és a cukorbetegség szerepe a vesebetegségek létrejöttében. Ugyanakkor a hipertónia és a diabetes képes többszörösére emelni az érlelmeszesedés kialakulásának és gyors progressziójának a kockázatát, ill. a fokozott érlelmeszesedés pedig a magasvérnyomás betegséget súlyosbíthatja. Mindhárom esetben azonban a vaszkuláris rendszerre kifejtett direkt és indirekt hatások folytán nagyságrendekkel képesek emelni a kardiovaszkuláris és cerebrovaszkuláris megbetegedések és halálozások kockázatát. A fejlett országokban a kardiovaszkuláris eredetű

halálozás a vezető halálokok között szerepel, annak ellenére is, hogy az utóbbi évtizedekben robbanásszerűen javult a kardiológiai intervenciós ellátás, sokkal szélesebb körű ismeretekkel rendelkezünk a betegségek kialakulásához vezető állapotokkal kapcsolatban, ezáltal a megelőzésre is sokkal komolyabb hangsúlyt lehetne fektetni.

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

1.3. Vaszkuláris eltérések vesebetegségben

A krónikus vesebetegség romlásával egyenes arányban fokozódik a kardio- és cerebrovaszkuláris rizikó. A kardiovaszkuláris megbetegedések jelentik a legfőbb halálozási okot a KVB-ben szenvedő betegek számára. Ennek függvényében a vaszkuláris kalcifikáció és a szövődményei továbbra is komoly klinikai kihívást jelentenek, amit csak fokoz a tény, hogy a vesepótló kezelést igénylő végstádiumú veseelégtelenség kapcsán felgyorsul a progresszió. A vaszkuláris kalcifikáció kapcsán két különböző entitást kell megkülönböztetnünk, mely szövettani vizsgálatok kapcsán el is különíthető egymástól, de gyakran a társbetegségek miatt akár egyszerre is jelen lehet és együttesen ronthatják a betegek életminőségét és okozhatnak súlyos következményeket. Az intimaszklerózis ateroszklerotikus léziókban jelentkezik, míg a tunica media simaizomsejtjeit érintő kalcifikációt a Mönckeberg-féle szklerózisban látjuk. Az érrendszer egészét érintő kalcifikációban egy alaposan szabályozott folyamat során a simaizomsejtek csontsejtszerű sejtekké alakulnak át. A transzdzifferenciációs folyamat során a simaizomsejtre jellemző fehérjemintázatot (pl.: alfa-aktin, SM22alfa) elveszítik és oszteoblasztra jellemző fehérjék expressziója indukálódik. Emelkedik az oszteokalcin, az oszteopontin, az oszteoprotegerin, a mátrix Gla protein és az alkalikus foszfatáz szintje. Az alkalikus foszfatáz enzim szintjében bekövetkező változás jól mutatja a sejtek átalakulását. Számos faktort sikerült azonosítani, melyek a vaszkuláris kalcifikáció kialakulását és progresszióját

elősegítik, ill. gátolják. Az egyik legpotensebb induktor az emelkedett foszfát szint. A krónikus vesebetegek esetén a vaszkuláris kalcifikáció jelentős rizikó faktora a hiperfoszfatémia, és a szekunder hiperparatireózis terápiájában alkalmazott D-vitamin kezelés.

1.4. Hemoxigenáz-ferritin rendszer szerepe a vaszkuláris betegségekben

Korábban kutatócsoportunk már igazolta, hogy a hem-oxigenáz-1/ferritin rendszer aktiválása kedvezően befolyásolja a magas inorganikus foszfát indukálta in vitro kalcifikációt. Az eredmények alapján a vas függetlenül a redox állapotától kiszabadulva a hem csoportból képes gátolni a kalcium lerakódását dóziszfüggő módon simaizomsejteken magas inorganikus foszfát jelenlétében. (1.16) További vizsgálatok során sikerült azonosítani a gátló hatásért felelős, vas által indukált ferritin nehéz lánc expressziót. A rekombináns nehézlánc és speciális aktív centrumában gátolt mutáns variánsával történt kezelés során sikerült azonosítani a ferroxidáz aktivitás protektív hatását. Az előrehaladott krónikus vesebetegség és a vesepótló kezelést igénylő veseelégtelenség gyakran társul a hiperfoszfatémia mellett vashiánnyal. A vas hiány és a csökkent intracelluláris ferritin nehézlánc együttesen rontja a kalcifikációs folyamatot a vesebetegek esetében és valószínűleg a FtH túltermelése gátló hatású lehet az érrendszer mineralizációjában előrehaladott KVB-ben.

1.5. Véralvadási rendszert érintő változások vesebetegségben

Számos kutató vetette már fel kutatási témaként a koagulációs rendszer és vérlemezkéket érintő változások vizsgálatát hemodializált betegekben. Korábbi extracorporális keringést vizsgáló tanulmányunkban sikerült beazonosítani a fehérvérsejt aktivációt a véralvadási rendszer receptorok ismeretében. Tanulmányok során gyakran merült fel kérdésként a vérlemezkek számában és funkciójában, a vérlemezke, endotél sejt és koagulációs rendszer protrombotikus irányba bekövetkező változásainak vizsgálata. Azonban ezidáig csak egy alkalommal vizsgálták a vérlemezke aktivációt a HD és HDF összehasonlításában és a CONTRAST vizsgálat alvizsgálataként lett publikálva. A szerzők HDF betegek körében emelkedett vérlemezke asszociált aktivációs markert írtak le, de a szolubilis beta-thromboglobulin vizsgálatakor csökkent vérlemezke degranulációt észleltek, így a kapott eredmények alapján sejtes és szolubilis faktorok vonatkozásában nem lehetett egyértelműen állást foglalni.

2. Célkitűzések

A krónikus vesebetegség előrehaladtával a vaszkuláris kalcifikáció üteme egyre kifejezettebb, melynek köszönhetően folyamatosan növekszik a kardiovaszkuláris rizikó, ami a végstádiumú veseelégtelen betegek esetén a leggyakoribb ok a megbetegedések és halálokok között. Az irodalomban az inorganikus foszfát mellett számos vegyület vonatkozásában írtak le kalcifikációt fokozó hatást, többek között az organikusan kötött foszfát és az aktivált D-vitamin is ezek közé tartozott. A korábbi kísérleteink során a sejtkultúrákhoz adott hemmel az extracelluláris mineralizáció gátlható volt. A gátlás hátterében az intracelluláris ferritin szintézis indukálódását, azon belül is a ferroxidáz aktivitás kulcsfontosságú szerepét sikerült azonosítani.

Első vizsgálatunkban a célkitűzésünk tehát a vaszkuláris kalcifikáció in vitro modellezése volt organikus foszfát és aktivált D-vitamin alkalmazásával. További célunk volt a ferritin és a ferroxidáz aktivitás univerzális gátló hatásának bizonyítása, ill. olyan ferritin szintézist fokozó alternatívák kipróbálása, mellyel nem növeljük a szervezet vas terhelését.

A vesepótló kezelésre szoruló végstádiumú veseelégtelen betegek hemosztázis paramétereiben jelentős változások alakulnak ki, melyek részben a felhalmozódó salakanyagok, részben pedig a dialízis kezelések hatására jönnek létre. Tanulmányok már több alkalommal is foglalkoztak a vérlemezkék dialízis kezelés alatt bekövetkező funkció változásával, azonban a különböző kezelési modalitások összehasonlításában még eddig nem történtek vizsgálatok.

A dialízis kezelések alatt végbemenő vérlemezke aktiváció vizsgálatát tűztük ki második tanulmányunk céljául, mely során mind felszíni, mind szolubilis faktorok vizsgálatát és a sejtes konjugátumok szintjének meghatározását kívántuk elvégezni. Korábbi vizsgálatok kapcsán a monocita és neutrofil sejtek és vérlemezkék által alkotott heterotipikus aggregátumokat és a szolubilis markerek közül a P- és E-szelektin valamint a von Willebrand faktor változásait követnénk nyomon a dialízis kezeléseknél.

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

3. Anyagok és Módszerek

3.1. Sejtkultúra

A kísérleteinkhez használt humán aortából származó simaizomsejteket (HAoSMC) 3 különböző forrásból szereztük be: Cell Applications (San Diego, CA), Lonza (Allendale, NJ), Cambrex (Wokingham, United Kingdom). A sejtek összesen 5 különböző, egymástól független donorból származtak. A sejteket magas glükóz tartalmú DMEM oldatban tenyésztettük, melyet a sejtek fokozott anyagcseréjére utaló pH csökkenés esetén, de legkésőbb minden második nap cseréltünk. A kísérletek során a már konfluenssé váló sejtek esetén elegendő volt 2 naponta cserélni a tápoldatot.

3.2. Alkalikus foszfatáz aktivitás mérés

A sejteket 7 napon át kezeltük. A kezelés végén a sejtekből szolubilizáló oldattal (1% Triton-X 100, 0,5% Igepal CA-630, 1% Complete Mini proteáz inhibitor, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM Tris) szuszpenziót készítettünk. A mérés során az alkalikus foszfatáz a p-nitrofenil-foszfatból egy foszfát-csoportot lehasítva hozza létre a p-nitrofenolt, melyet fotométer segítségével tudunk detektálni. A kinetikus görbék maximális meredekségét alapul véve az eredményeket a minták fehérje tartalmára normalizálva adtuk meg.

3.3. Alkalikus foszfatáz enzimaktivitás

A kísérletekhez használt sejteket 7 napon keresztül a kezelési protokollnak megfelelő növekedési, illetve kezelési médium segítségével kezeltük. A festési eljáráshoz a Sigma 85L3R kit-jét használtuk fel.

3.4. Kalcium depozíció mérése

A sejtek kezelése 48-lyukú plate-eken történt 7 napon keresztül. PBS-el mosva a sejteket először 0,6 mol/L-es HCl oldattal 24 órán át 37°C-on inkubálva dekalcifikáltuk, majd 0,1 mol/L NaOH és 0,1% SDS tartalmú oldattal szolubilizáltuk. A dekalcifikáció során nyert felülúszó mintákból határoztuk meg a kalcium tartalmat. A szolubilizált minták fehérje koncentrációját fotométer segítségével határoztuk meg, majd a minták kalcium tartalmát a nyers adatokból a fehérjetartalomra normalizálva µg kalcium/mg fehérje formátumban adtuk meg.

A mineralizáció kimutatására Alizarin Red festést is alkalmaztunk, mely során a sejteket ugyancsak a szokásos 7 napos protokollal kezeltük majd festettük a

sejteket és fénymikroszkóp segítségével fényképesen dokumentáltuk az eredményeket.

3.5. Oszteokalcin meghatározás

Az oszteokalcin meghatározást a sejtek extracelluláris mátrixából végeztük el. A 7 napos kezelést követően először a sejtek extracelluláris mátrixát oldottuk fel, majd szolubilizáló-oldat segítségével készítettünk fehérje meghatározáshoz alkalmas mintákat. Az extracelluláris mátrixból származó minták oszteokalcin tartalmát szendvics ELISA módszer segítségével határoztuk meg. A kapott eredményeket a szolubilizált minták fehérje tartalmára normalizáltuk.

3.6. Fehérjetartalom meghatározás

A különböző mérési protokollok során használt szolubilizálástól függetlenül a minták fehérje tartalmának meghatározása minden esetben BCA reagens segítségével történt.

3.7. Western blot

A kísérletek során nyert minták fehérjetartalmának ismeretében minden esetben előre meghatározott mennyiségű fehérje tartalmat vittünk fel a gélekre. Az elektroforézishez 10%-os SDS-PAGE gél-t használva 100 V feszültséggel futtattuk a mintákat a standard létra megfelelő szétválásáig. A blotoláshoz 0,45 μ m pórus méretű nitrocellulóz membránt használtunk és 75 percen át 100 V feszültséggel végeztük. A membránokat a vizsgált fehérjékre specifikus elsődleges, majd peroxidázzal konjugált faj specifikus másodlagos antitestekkel inkubáltuk. A membránokhoz adott előhívószer segítségével sötétszobában röntgen film előhívásával tudtuk vizualizálni az eredményeket. A minták felvitt egységes fehérjetartalmának bizonyítására a membránokat gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenázra (GAPDH) is megvizsgáltuk. Az előhívott filmeket minden esetben denzitometráltuk és a kapott eredményeket a GAPDH denzitására normalizáltuk.

3.8. Kvantitatív RT-PCR

A 7 napos kezelés befejeztével a sejteket homogenizáltuk, majd a minták teljes RNS tartalmát izoláltuk. Reverz transzkripció során oligodT alkalmazásával állítottunk elő cDNS-t. A cDNS-ből az alkalikus foszfatáz mRNS expresszióját multiplex TaqMan Gene Expression Assay segítségével határoztuk meg és normalizáltuk a GAPDH mRNS szintjéhez.

3.9. Ferritin nehéz lánc siRNA transzfektálás

A sejteket passzálást követően kb. 60-70%-os konfluenciáig tenyésztettük, majd FtH és negatív kontroll siRNA-t használtunk szérum- és antibiotikummentes média jelenlétében, miközben Oligofectamine segítségével elvégeztük a transzfektálást. A sejteket a transzfektálást követően 4 napig kezeltük, mely idő alatt bizonyítottan jelen volt az siRNA gátló hatása.

3.10. D-vitamin receptor agonisták in vivo vizsgálata

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

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

3.11. Beteg beválogatás és dialízis kezelése

A vérlemezkek aktivációját vizsgáló tanulmányunkba 28 végstádiumú veseelégtelen beteget válogattunk be. Az intervenciós vizsgálat longitudinális nem-randomizált önkontrollos paraméterekkel rendelkezett. A Debreceni Egyetem Kutatás Etikai Bizottsága és az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága is elfogadta és támogatta a vizsgálati protokollt. A részletes írásos és szóbeli tájékoztatást követően a résztvevők írásos beleegyezésüket adták a vizsgálatba. A résztvevők életkora 18 és 70 közötti,

átlagosan $53 \pm 13,8$ év. A 28 résztvevő között 13 férfi és 15 nő volt. Minden beteg a vizsgálatot megelőzően legalább 3 hónapja már dializált volt és átlagosan $89,5 \pm 74,5$ hónapot töltöttek el a krónikus dialízis programban. A betegek hetente 3 alkalommal vettek részt kezelésen. Állandó volt a résztvevők esetén a dializáló gépek vér pumpa sebessége, átlagosan $366,1 \pm 63,7$ mL/perc és a dializáló oldat áramlási sebessége ($439,3 \pm 76,5$ mL/perc). A túlhidráltság következtében a betegektől eltávolításra kerülő nettó ultrafiltráció hemodialízis esetén kezelésenként $2703,6 \pm 1118,0$ mL volt, míg hemodiafiltrációnál $2432,1 \pm 1014,4$ mL. A dialízis hatékonysága vizsgálatunk során hemodialízis alatt az átlagos OCM Kt/V érték $1,48 \pm 0,2$ volt és 3 beteg nem érte el a kívánt 1,3-es értéket, míg hemodiafiltráció esetén a Kt/V érték $1,67 \pm 0,21$ -nek adódott és csak 1 beteg nem érte el a szükséges hatékonyságot.

Dialízis központunkban a hemodiafiltrációs modalitás a standard kezelés, így a vizsgálatunk kezdetén a mintavételt ezen csoporthoz végeztük el. A modalitás váltás okozta zavaró tényezők kivédése miatt 2 hétig alkalmaztunk hemodialízis kezeléseket mielőtt a vérlemezke markerek vizsgálatához a mintákat ismételten levettük volna, immáron a hemodialízis csoporthoz. A kezelésekhöz használt dializáló folyadék mindkét modalitás esetén megegyezett. A végső oldat 138 mmol/L nátriumot, 1,25 mmol/L kalciumot, 0,5 mmol/L magnéziumot, 1 g/L glükózt és 2 vagy 3 mmol/L káliumot tartalmazott, ez utóbbi a betegek szérum kálium szintjének megfelelően került beállításra. Az oldat bikarbonát tartalmát a 28-38 mmol/L közötti intervalumon belül volt lehetőségünk változtatni, hogy a dialízis kezelések előtt meghatározott plazma bikarbonát szintet 20-22 mmol/L között tudjuk tartani. Hemodiafiltrációs kezeléseket esetén a filtrálásra került folyadék mennyiséget szubsztitúciós oldat formájában pótolja a dializáló gép, melynek összetétele megegyezik a dializáló oldattal. Kezelésenként a szubsztitúciós oldat térfogata $23,4 \pm 3,8$ liter volt.

3.12. Vértétel és sejtszámlálás

A vérvétel a dialízis szerelék megfelelő szakaszából történt előre meghatározott időben alvadásgátolt csöveket használva. A sejtszámok meghatározása minden esetben automata készülékkel történt a vérvételtől számított 2 órán belül. A kezeléseket alatt bekövetkező hemokoncentráció miatt a sejt számokat a vörösvértest számokra normalizáltuk.

3.13. Vérlemezke szegény plazma készítés és a szolubilis markerek mérése

A teljes vérből ugyancsak a hemokoncentráció miatt albumin meghatározás történt. A szolubilis P- és E-szelektin szintek meghatározása ELISA módszerrel történt a gyártó előírásainak megfelelően. A von Willebrand faktor szintek vizsgálata turbidimetriás méréssel történt. A szolubilis markerek nyers adatait minden esetben a hemokoncentráció nyomkövetésére végzett albumin koncentráció méréshez normalizáltunk.

3.14. Áramlási citometriás vizsgálatok

A vérlemezke felszíni P-szelektin expressziója és a fehérvérsejt-vérlemezke heterotipikus aggregátum mérése áramlási citométer segítségével történt. A felszíni P-szelektin meghatározáshoz CD42a-FITC és CD62-PE antitesteket, a fehérvérsejt-vérlemezke heterotipikus aggregátumok kimutatásához CD14-PE és CD42a-FITC antitesteket alkalmaztunk, majd áramlási citométeren történt meg az analízis.

3.14. Statisztikai analízisek

A vérlemezkek aktiválódását vizsgálva az eredmények normál eloszlásának kimutatásához Kolmogorov-Smirnov tesztet használtunk. Mivel a legtöbb paraméter nem-normális eloszlást követett, ezért egyváltozós analíziseket végeztünk Mann-Whitney U-próba vagy független mintás t-próba segítségével. Ahol lehetséges volt párosított mintás vizsgálatokat végeztünk, melyhez Wilcoxon-féle előjeles rangszám próbát vagy párosított mintás t-próbát alkalmaztunk. Spearman-féle ρ értéket határoztunk meg a korrelációs analízisekhez.

A simaizomsejteken végzett kísérletek során szerzett eredményeink statisztikai elemzéséhez GraphPad Prism 5 szotvert használtuk és egyszempontú ANOVA próbát végeztünk post hoc Bonferroni-féle többszörös összehasonlítási próbával.

4. Eredmények

4.1. A magas foszfát és aktivált D-vitamin okozta vaszkuláris kalcifikáció gátolható a ferritin molekula ferroxidáz aktivitásával és ez a hatás elérhető a ferritin gyógyszeres indukciójával is

Elsődleges célunk a csontsejt irányú átalakulás kimutatása volt humán aortából származó vaszkuláris simaizomsejteken (HAoSMC) béta-glicerolfoszfát (BGP) és az aktivált D3 vitamin (kalcitriol) kezelés hatására. Mindkét induktor képes volt emelni az alkalikus foszfatáz enzim (Alp) aktivitását dóziszfüggően, és az indukció a kezdeti gyors emelkedést követően a 7. napon érte el a maximumát, majd lassú csökkenés volt észlelhető. A megnövekedett enzim aktivitás háttérében Western blot segítségével sikerült igazolni az Alp enzim fehérje szinten is jelentkező fokozott expresszióját. A fehérje expresszió növekedés a BGP és a kalcitriol esetében is dóziszfüggő volt, míg együttes alkalmazásuk esetén additív hatást észleltünk.

Megvizsgáltuk az apo- és holoferritin hatását az Alp indukciójára BGP-el és kalcitriollal önmagában vagy együtt kezelt HAoSMC esetén. A kísérleteink eredményei alapján mindkét ferritin forma képes volt csökkenteni az Alp aktivitását és nem sikerült szignifikáns különbséget kimutatni közöttük. Mivel a ferritin molekula H és L láncból tevődik össze, így könnyen adódott a kérdés, hogy rekombináns ferritin H (FtH) és L (FtL) fehérje használatával vizsgáljuk az esetleges Alp indukciót befolyásoló hatásukat. Továbbá vizsgálni kívántuk a FtH mutáns H222 jelzésre hallgató formáját, mely az aktív centrumban található mutáció miatt ferroxidáz aktivitással nem rendelkezik, egyebekben viszont megegyezik a vad típussal. Az alkalikus foszfatáz aktivitás mérés megmutatta, hogy transzformáció gátlás csak a FtH esetén jelentkezett, vagyis a ferroxidáz aktivitással nem rendelkező L és H222 lánc esetén nem észleltünk változást az indukció gátlásában.

Az exogén ferritin direkt szerepének bizonyítását követően az endogén úton szintetizálódó ferritint vizsgáltuk a HAoSMC sejtek átalakulását mediáló folyamatok esetén. Az endogén ferritin szintjét vas(III)-ammónium citrát hozzáadásával indukáltuk. A sejteken növekvő dózisú vas kezelés mellett vizsgáltuk a BGP és kalcitriol által indukált Alp aktivitást, melyet dóziszfüggően sikerült is gátolni. A ferritin specifikus szerepét megerősíteni az Alp indukció gátlásában leginkább siRNA alkalmazásával tűnt célszerűnek. A sejteket tehát ismételten vas(III)-ammónium citrát kezelésnek vetettük alá, de ebben az esetben

egy részüket anti-FtH siRNA kezelés mellett. A FtH indukció gátlása miatt a hozzáadott vas nem tudta csökkenteni az Alp indukcióját a BGP és kalcitriol kezelt sejtekben. Tehát elmondható, hogy az FtH szint emelése, mely függetlenül, hogy külső forrásból származik, vagy exogén vas hatására endogénen szintetizálódik, direkt módon képes csökkenteni a kalcifikációt előidéző folyamatok során jelentkező Alp aktivitás növekedését. A kísérletek során a 4 napos kezelés során körülbelül 80%-os fehérjeszintű expresszió csökkenést sikerült elérni a FtH lánc esetében.

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

Következő lépésként a ferritin gátló mechanizmusára koncentráltunk, hogy kimutathassuk az Alp enzim gátlásában, ezáltal a simaizomsejtek csontsejt irányú átalakulásában a pontos támadáspontját. A sejteket 7 napon keresztül BGP és kalcitriol jelenlétében kezeltük, majd a sejteket szolubilizáltuk és a lecentrifugált minta felülúszóját felhasználva mértünk enzimaktivitást, melyet a hozzáadott ferritin molekulákkal direkt módon próbáltunk gátolni. Kontrollként az ismert Alp aktivitást gátló levamizolt használtuk. Az eredmények alapján sem az apo-, sem a holo-ferritin nem képes direkt módon gátolni az enzim aktivitását, szemben például a levamizollal. Mivel az aktivitás mértékét a fehérje mennyisége is meghatározza, így ezt követően Western blot technika segítségével vizsgáltuk meg az Alp fehérje szintű változásait. A kalcifikáló kezelés hatására jelentkező megnövekedett Alp expressziót mind az apo-, mind a holo-ferritin képes volt meggátolni. transzkripció szintjén jelentkező gátlás kimutatása miatt RT-PCR vizsgálatot végeztünk. A minták Alp mRNS indukciójában jelentkező változásokat a GAPDH mRNS

szintjéhez normalizáltuk és a növekedési médiával kezelt minták arányában vizsgáltuk. A kalcifikációs kezelés hatására transzkripciós szinten jelentkező Alp indukciót is sikerült gátolni a apo- és holoferritin hozzáadásával, ezáltal bizonyítani, hogy a ferritin hatása transzkripciós szinten jelentkezik.

A cöruoplazmin a szervezet legfőbb rézkötő és -szállító fehérjeje, melyet döntően a májsejtek termelnek. Mindamellett a kísérleteinkben, mint a H-ferritinhez hasonló, ferroxidáz aktivitással rendelkező fehérje jutott nagyon fontos szerephez. A cöruoplazmin a ferroxidáz aktivitásának köszönhetően dóziszfüggő módon képes csökkenteni a megnövekedett Alp aktivitást. Az alacsony aktivitás hátterében a gátolt fehérje expresszió áll, melyet Western blottal is alá lehetett támasztani.

Habár az Alp, mint a mineralizáció korai markerének expressziója fokozódott BGP és kalcitriol kezelés hatására, azonban még az 5 különböző donortól származó sejtekkel sem sikerült magát a mineralizációt kiváltani 3 hétig folytatott kísérletek mellett sem. Az irodalmi adatokat figyelembe véve is leginkább szarvasmarha simaizomsejteket használnak a kalcifikációs vizsgálatokban, mivel ezek a sejtek sokkal könnyebben mineralizálódnak, mint a humán simaizomsejtek. A sejteket a kísérleteinkben további 1,2 mmol/L inorganikus foszfát és 0,9 mmol/L kalcium hozzáadásával, kalcifikációs médiumban kezeltük és így a D3T és vas által indukált ferritin kalcifikációs folyamatokat gátló hatását már nemcsak az Alp vonatkozásában, hanem a mineralizációs folyamatában is lehetőségünk nyílt vizsgálni. Kalcifikációs médium hatására granuláris depozitumok jelentek meg a sejt kultúrákban, melyek azonban teljesen hiányoztak a növekedési médiumban kezelt kontroll esetekben. Sikerült kimutatni a vas és a D3T esetében is a granuláris depozitumok alacsonyabb számát a kalcifikációs médiummal kezelt sejtekhez képest. Az extracelluláris kalcium depozíció mértéke is dóziszfüggően csökkent mind vas, mind D3T alkalmazása során és mindkét esetben jelentős gátlás volt észlelhető 25, ill. 50 $\mu\text{mol/L}$ koncentráció esetén. Nemcsak a vas, mint potens ferritin induktor, hanem a D3T is képes kifejezett intracelluláris ferritin szint emelésre, ezért megvizsgáltuk, hogy a megfigyelhető jelentős gátló hatást a kalcium depozícióra képes-e az apoferritin leutánozni. A kísérletek során a vasmentes ferritin forma 2 mg/mL koncentrációban alkalmazva képes volt teljesen meggátolni a kalcium akkumulálódását az extracelluláris térben. A vas és D3T gátló hatásának hátterében a FtH szerepét feltételezve siRNA technikával specifikusan csendesítettük el az

adott gén működését, mellyel kb. 70%-os hatékonyságot tudtunk elérni. A sejteket ismételten vassal és D3T segítségével kezelve már a kalcifikációs média jelenlétében sem sikerült a mineralizációt gátló hatást kimutatni. Ezen eredmények alapján egyértelműnek látszik, hogy a vas és D3T extracelluláris mineralizációt gátló hatásának letéteményese és mediátora a megnövekedett intracelluláris FtH.

A csontspecifikus oszteokalcin jelenléte az extracelluláris mátrixban jól korrelál a simaizomsejtek átalakulási folyamatával. A sejteket 7 napon át kalcifikációs médiával kezelve szignifikáns emelkedést észleltünk az oszteokalcin szintjében. A vas és D3T is képes volt csökkenteni az oszteokalcin fokozott szintjét és mindezt dózisfüggő módon. Az apoferritin hatására ugyancsak eltűnt az oszteokalcin indukció. A FtH elcsendesítésével a simaizomsejteket a kalcifikáló miliőben vassal és D3T-vel kezelve nem észleltük a oszteokalcin akkumulációt gátló hatást. A fentieket összegezve megállapítható, hogy a ferritin, és azon belül is a H ferritin indukciója a simaizomsejtek kalcifikációs és transzdifferentiációs folyamatainak legfőbb mediátora.

A D-vitamin analóg paricalcitol képes volt emelni az Alp aktivitását simaizomsejtekben és az indukáló hatás az alkalmazott dózis nagyságától függően emelkedett. A kezelés során alkalmazott apo- és holoferritin ferroxidáz aktivitása képes volt a paricalcitol által indukált Alp aktivitás emelkedést is legátolni. Kalcitriol vagy paricalcitol terápiában részesülő, szekunder hiperparatireózisban szenvedő végstádiumú veseelégtelen betegek plazma mintájával kezelve a simaizomsejteken 5 nap után vizsgáltuk az Alp aktivitásban bekövetkező változásokat. A kalcitriol és a paricalcitol is képes volt szignifikánsan emelni az Alp aktivitását, de a paricalcitol esetén kisebb mértékű emelkedést tudtunk csak detektálni. Apoferritin in vitro hozzáadása mellett az induktortól függetlenül mindkét esetben észlelhető volt az aktivitást gátló hatás.

4.2. A hemodiafiltrációs kezelés során kisebb mértékű a thrombocyta aktiváció, mint hemodialízis modalitás mellett

A vérlemezkék felszíni P-szelektin értékek már a dialízis kezelések elejétől kezdve jóval a korábban leírt 3% alatti referencia tartomány felettiek voltak. Ki kell hangsúlyozni, hogy az első minták levétele előtt megvártuk, amíg a szerelék teljesen feltöltődik vérrel, mely 4-5 perces folyamatot feltételez a dializáló gépek esetén. Így valójában már pár perc eltelt a kezelésekből mikor a kezdeti minta (0. óra) levételre került. HD kezelés mellett magasabb felszíni P-szelektin szinteket észleltünk, mint HDF esetén, mely különbség a kezelések idejének

előrehaladtával egyre kifejezettebbé vált. Habár a plazma mintákban a szolubilis P-szelektin értékek mediánja a kezelések végén a referencia tartományban maradt mindkét esetben, meg kell említeni, hogy jó néhány esetben észleltünk a referencia felső határánál magasabb értékeket. Bár a szolubilis P-szelektin értékek a kezelés alatt emelkedést mutattak, de csak az 1 órás minták esetén volt szignifikáns a különbség az adatok között, és abban az esetben is a HDF kezelés során volt magasabb.

A vérlemezke aktiváció nyomon követésére indirekt aktivációs tesztet is alkalmaztunk, mely során a heterotipikus aggregátumokat vizsgáltuk. A monocyta-vérlemezke aggregátumok vizsgálata során kifejezett emelkedést észleltünk, mely a korábban az irodalomban is leírt 38%-os kontroll csoport értékhez képest meglepően magasnak bizonyult. Az aggregátumok aránya folyamatos emelkedést mutatott a vesepótló kezelések alatt, és minden esetben magasabb volt HD kezelés esetén és a különbségek szignifikánsnak is adódtak statisztikailag. Az előzővel megegyező tendenciát sikerült megfigyelni a neutrofil-vérlemezke aggregátumok arányának változásában a kezelések alatt. Ugyancsak szignifikánsan magasabb értékeket kaptunk HD kezelés kapcsán a monocyta-vérlemezke aggregátumok vonatkozásában minden vizsgált időpontban HDF kezeléssel összehasonlítva.

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

5. Megbeszélés

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

A kardiovaszkuláris betegségek sajnos továbbra is a vezető halálokok között szerepelnek az előrehaladott krónikus vesebetegség és a végstádiumú veseelégtelenség vonatkozásában. Az illesztett kardiovaszkuláris eredetű halálozás bizonyítottan 10-20-szor gyakoribb a krónikus vesebetegekben az átlag populációhoz viszonyítva. Az emelkedett prevalencia hátterében, legalább részben a fokozott vaszkuláris kalcifikáció áll. A vaszkuláris kalcifikáció felgyorsulásában egyértelműen az urémiás miliónek van fontos szerepe, amit alátámaszt a már fiatal korukban is veseépítő kezelést igénylő betegek esetén a szív és érrendszeri betegségek kifejezetten emelkedett kockázata. Az emelkedett inorganikus foszfát szint önmagában is szignifikáns rizikó faktor és a kalcifikációban betöltött szerepét már több tanulmányban is elsődlegesnek írták le. A mineralizációs folyamatok hátterében egyéb induktorokat is sikerült azonosítani. A D-vitamin receptor agonistákkal kapcsolatban is jelentek meg közlemények, melyekben az érrendszer fokozott meszesedéséről számoltak be. Azonban a

különböző vegyületek alkalmazása során jelentős eltérések tapasztalhatóak. A végstádiumú veseelégtelenséghez gyakran társuló szekunder hiperparatireózis terápiájában széles körben alkalmazzák a kalcitriolt és analóg vegyületeit.

A ferritin egy ősi szférikus relatíve igen nagy fehérje, mely igen konzervatív három-dimenziós szerkezettel rendelkezik és a legfontosabb intracelluláris vastároló molekula. A ferritinek a szférikus fehérjeburokban egymásra igencsak hasonlító családot alkotnak, kifejezetten a vas megkötésére és hatalmas mennyiségben történő tárolására tervezve biztonságos, szolubilis és mégis könnyen hozzáférhető formában. A ferritin molekula 24 alegységből épül fel, melyek a nehéz (heavy, H) és könnyű (light, L) láncok változatos kombinációjából rakódik össze, melyben szerepe van az adott sejt vasháztartásának, szövet- és szervspecifitásának. A két ferritin polipeptid igen hasonló szerkezetű, de csak a nehézlánc rendelkezik ferroxidáz aktivitással, mely képes a vas redox állapotai közötti átalakulást katalizálni, ezáltal biztonságosan a ferritin molekula belsejében létrehozni egy vas magot. A Fe^{2+} ionból Fe^{3+} ion keletkezése során felszabaduló elektron a vas mag körül delokalizált formában passzívan követi a raktározási folyamatot. Maximálisan egy ferritin molekula esetén 4500 vas atom épül be ionizált formában a belső magba. A sejt a számára pillanatnyilag felesleges vastól szabadulva a ferritin molekula segítségével képes tárolni a veszélyes kationt, melyet azonnal képes mozgósítani amennyiben szükséges a sejt élettani folyamataihoz. Jelen tudásunk a ferritinnel és a biológiai funkciójával kapcsolatban az utóbbi évtizedben lett sokkal szélesebb körű, köszönhetően annak, hogy már nemcsak a vas metabolizmusának és homeosztázisának fenntartásáért felelős funkcióját, hanem egyéb élettani és kórélettani folyamatokban betöltött szerepét is megismertük. Korábban már sikerült bizonyítanunk, hogy a hem és vas által mediált FtH indukció képes gátolni a magas inorganikus foszfát indukálta kalcifikációt és csontsejt irányú differenciációt. A ferritin hatása összetett, transzkripciós szinten jelentkező folyamatot feltételez. A megfigyelt gátló hatás hátterében pedig sikerült a ferritin nehéz lánc ferroxidáz aktivitásának szerepét igazolni. Ugyancsak meg kell említeni, hogy a FtH nemcsak aktívan képes a csontsejt irányú átalakulást gátolni, hanem képes a csontsejtek aktivitását csökkenteni a Cbfa-1 szintjének csökkentése révén. A Cbfa-1 jelen tudásunk alapján az oszteogenezist mediáló legfontosabb transzkripciós faktor, mely felelős a csontsejt specifikus gének expressziójának szabályozásáért. Elsőként sikerült igazolni, hogy a kapcsolatot a krónikus

vesebetegség kapcsán oly gyakran jelentkező megváltozott vas háztartás és a vaszkuláris kalcifikáció között. A ferritin expressziójának fokozása terápiás konzekvenciával rendelkezhet, emiatt döntöttünk úgy, hogy potenciális farmakológiai induktorokat próbálunk ki kalcifikációs modellünkben. Kíváncsiak voltunk, hogy a gyógyszeres stimulálást követően képesek vagyunk-e hasonló gátló hatást észlelni, mint a vas indukció következtében képződő ferritin esetében. A voksunkat a D3T mellett tettük le, melyet daganatos betegségek megelőzésében és terápiájában a mellékhatások csökkentésére már klinikai vizsgálatokban használnak és bizonyítottan anti-oxidáns hatással rendelkezik. Sikertől igazoltunk a D3T hatására indukálódott ferritin gátló hatását simaizomsejteken az inorganikus foszfát és kalcitriol által kiváltott csontsejt irányú átalakulásban. A D3T a keresztesvirágúak rendjébe tartozó növényekben természetes módon is előforduló vegyület, azonban humán alkalmazásra eddig még nem törzskönyvezett, de számos tanulmányban igazolták már jótékony hatását.

Összefoglalva vizsgálatunk eredményeit kijelenthetjük, hogy a H-ferritin indukcióján keresztül a simaizomsejtek transzformációs folyamata a csontsejtek irányába jelentős mértékben gátolható. Az eredmények a korábbi közléseknek és kutatócsoportunk eredményeinek is további bizonyítékaul szolgáltak. A parenteralisan adott vas nagy mennyiségben reaktív oxigén gyökök kialakulását idézheti elő így hatalmas az igény, olyan alternatív lehetőségek iránt, melyek a ferritin szintézis fokozásán keresztül képesek a vaszkuláris kalcifikációt gátolni. Állatkísérletek és további vizsgálatok szükségesek annak eldöntésére, hogy a D3T megállja-e helyét és idővel preventív és/vagy terápiás lehetőségként számolhatunk-e majd vele.

A vérlemezke aktiváció vizsgálata kapcsán összességében sikerült jelentős változásokat detektálnunk az aktivációs markerek szintjében a két különböző kezelés típus között. A vérlemezke szám és a szolubilis P-szelektin értékeiben a kezelések alatt észlelt folyamatos emelkedés ellenére csak néhány esetben sikerült szignifikáns különbséget igazolni a kezelési modalitások egymással történő összehasonlítása során. A heterotipikus aggregátumok kialakulása a korábbi vizsgálataink során nyert adatokhoz képest is fokozott mértékben volt megfigyelhető, mely a kezelések során tovább emelkedett, különösen igaz volt ez a hemodialízis esetében. A monocita-vérlemezke aggregátumok esetében szignifikánsan magasabb szinteket találtunk HD esetén, mint HDF kezelések során. A neutrofil-vérlemezke aggregátumok szintjének változása is folyamatos

emelkedést mutatott az idő függvényében, de sokkal kisebb szignifikancia szint mellett. Az endotél sejtek aktivációs markereinek, mint az E-szelektin és von Willebrand faktor, emelkedését csak a HD csoportban sikerült kimutatni és ott is csak a vWF esetén sikerült szignifikáns különbséget találni. Korábbi vizsgálatainkból származó és az irodalmi adatok felhasználásával sokkal komplexebb folyamatként tekinthetünk a krónikus vesebetegségben jelentkező hemosztázis eltérésekre, melyben egyszerre jelentkezhetnek vérzéses és trombotikus epizódok. E kettős eltéréseket épp a vérlemezék speciális funkcióival tudjuk magyarázni. A krónikus vesebetegek vérlemezke funkcióit vizsgálva gyakran észlelhetünk eltéréseket, melynek hátterében az urémiás toxinok, a nitrogén oxidok megnövekedett termelése és az anaemia állhat, ugyanakkor a dializált betegek vérlemezkéi a kezelések alatt folyamatosan aktivált állapotban vannak és a kezelések ismétlődése során alakul ki az úgynevezett kimerült „vérlemezke szindróma”. Még a legkorábbi vizsgálatok is leírták a vérlemezke-leukocita aggregátumok megjelenését a dialízis kezelések alatt, de inkább csak a primer vérlemezke aktivációhoz kötötték. Már abban az időben is fontos biokompatibilitási markerként tekintettek az aggregációra. Későbbi vizsgálatok igazolták a vérlemezék becsapdázódását és részleges kötődését különösen a nagyobb vérlemezék esetén az extrakorporális keringésben, és felmerült a szolubilis markerek, mint például a béta-thromboglobulin szerepe a vérlemezék degranulációjának kimutatásában. Schoorl és munkatársai által leköszölt metodikai megközelítés során a vérlemezék degranulációját és ezáltal az aktivációs folyamatokat fény és elektronmikroszkóp alkalmazásával vizsgálták. A dializáló membránok biokompatibilitása többek között a vérlemezék számának monitorozásával egyszerűen vizsgálható és az utóbbi időben használatos nagy biokompatibilitású membránok esetén, mint a polisulfon is már csak elenyésző mértékben észlelhető vérlemezke szám csökkenés. A vizsgálatunk során a kiváló biokompatibilitás ellenére szignifikáns különbséget találtunk a vérlemezke szám csökkenésében mindkét kezelési mód kapcsán, bár drámaian nagy változást azért nem észleltünk.

A hemodialízis kezelés kapcsán nemcsak a vérlemezke aktiváció, hanem a leukociták aktivációja is megfigyelhető létrehozva ezzel a heterotipikus aggregátumokat. A krónikus vesebetegek esetén mindig számolnunk kell a szervezetükben folyamatosan jelen lévő kisfokú gyulladással. A gyulladással járó markerek szintjét többek között befolyásolják a fertőzések, számos kísérőbetegség

és a dialízis kezelések, mint intermittáló stimulusok. Az egyik legalapvetőbb gyulladási marker a C-reaktív protein esetében már régóta ismert, hogy képes a prokoaguláns faktorként viselkedni a monociták szöveti faktor expressziójának fokozásán keresztül. Az aktiválódott vérlemezkék kötődése a monocitákhoz és neutrofilekhez a P-szelektin fehérjén keresztül valósul meg, de a kötés létrejöttéhez szükséges a P-szelektin glikoprotein ligand 1 (PSGL-1), mely citokinek hatására jelenik meg a sejtek felszínén. Saját megfigyelésünk alapján az áramlási citométerrel végzett vizsgálatok a legérzékenyebbek a vérlemezke és/vagy leukocita aktiváció kimutatásában, ha a két kezelési modalitást kell egymással összehasonlítani. A jelentős emelkedés az arany-standardnak számító vérlemezke P-szelektin szintjében arra enged következtetni, hogy a nagyon magas heterotipikus aggregátumok aránya a mieloid vonal sejtjei és a vérlemezkék között leginkább elsődlegesen a vérlemezkék aktivációjából indul ki, ahogy ezt a korábbiakban is feltételezték. Ezt a jelenséget gyakorlatilag a kezelés legelején, még a dializáló szerelék vérrel történő feltöltése alatt is észleltük és a fistula szűrőskor levett indulási adatokhoz képest is szignifikáns emelkedést mutatott az eltelt néhány perc alatt is. Mivel ilyen rövid idő alatt a visszaáramlás érdemben elhanyagolható, így a megfigyelt eredmények hátterében leginkább a fokozott turbulens áramlás állhat. Korábbi klinikai vizsgálataink alkalmával már sikerült igazolni emelkedett vérlemezke P-szelektin szinteket és monocita-vérlemezke aggregátum arányt obesez és diabeteses betegekben, továbbá koronária sztent implantáció során kontroll egyénekhez képest. Mindemellett meg kell jegyeznünk, hogy ilyen mértékű emelkedést az aggregációban nem sikerült igazolni korábban még egyetlen beteg csoport kapcsán sem, mint a jelen tanulmányunkban HD és HDF kezelés esetén. Habár korábbi vizsgálatok már utaltak az aggregátumok lehetséges szerepére a kóros vaszkuláris folyamatok patofiziológiájában, mint például a fokozódó artériás merevség, melynek pontos kórfolyamata még mindig magyarázatra vár. Mindazonáltal a szolubilis faktorok szerepe feltételezhető a vérlemezke/leukocita aktiváció hátterében, mivel a kóros folyamatok propagálásában a vér áramlása folytán az egész szervezetre kifejthetik hatásukat valószínűleg a komplement rendszer aktiválásán keresztül. Korábban már sikerült igazolni a HDF kezelés kíméletesebb hatását a bal kamra diasztolés funkcióját vizsgáló szív ultrahangos paraméterek esetén HD kezeléssel szemben. A vérlemezke aktiváció markereiben bekövetkező változások megfigyelését tűztük ki célul összehasonlítva a különböző dialízis kezelési típusokat.

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

Szemben a vérlemezke aktivációs markerekkel a szolubilis endotél aktivációs marker E-szelektin esetében nem sikerült változást kimutatnunk a kezelések alatt. Az E-szelektin szintézise de novo az endotél sejteket irt stimulusok hatására tud emelkedni és ennek megfelelően mind az expresszió kialakulásához, mind a véráramba kerüléshez tekintélyes időre van szükség. Ellentétben az E-szelektinnel a von Willebrand faktor az endotél sejtek Weibel-Palade testecskéiben raktározódik és képes azonnal mobilizálódni, amint az endotél sejt aktivációja bekövetkezik. Valószínűleg ezzel magyarázható a dialízis kezelések alatt észlelt különbség a két fehérje szintjében és ez lehet az oka, hogy például a HD kezelés során miért emelkedhetett meg szignifikánsan a kezelés végére.

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

6. Összefoglalás

A krónikus vesebetegség súlyosbodásával párhuzamosan fokozódik a kardiovaszkuláris rizikó. A megnövekedett rizikó háttérben már vannak jól ismert, kutatócsoportunk által is azonosított faktorok (pl.: inorganikus foszfát, vashiány, stb.), ill. irodalmi adatok alapján számos olyan tényező (pl.: D-vitamin és analóg vegyületei, kumarin származékok, stb.), melyek elősegítik a vaszkuláris kalcifikáció kialakulását, progresszióját. Sikerült az aktivált D-vitamin és a szerves foszfát donor béta-glicerolfoszfát segítségével in vitro modellezni a Mönckeberg-féle mediasclerosis során észlelhető simaizom kalcifikációt. A ferritin nehéz láncon keresztül a ferroxidáz aktivitás indukálásával sikerült gátló hatást igazolnunk és ez a gátló hatás jelentkezett nemcsak a vas, hanem alternatív úton végbemenő indukció esetén is.

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

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

7. Saját közlemények jegyzéke:



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikacio@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/287/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

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

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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





További közlemények

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

A közlő folyóiratok összesített implakt faktora: 13,21

A közlő folyóiratok összesített implakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre): 6,788

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

Debrecen, 2018.08.28.



8. Köszönetnyilvánítás:

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

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

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

Köszönöm a segítségét Dr. Jeney Viktóriának és Balogh Enikőnek.

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

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

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