Erythropoietin kezelés hatékonyságát meghatározó faktorok vizsgálata hemodializált betegekben

Doktori értekezés

Dr. Kiss Zoltán

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Konzulens: Dr. Kiss István Ph.D., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Barna István Ph.D., habilitált egyetemi docens
Dr. Szelestei Tamás Ph.D., főorvos, orvos igazgató

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Rosivall László MTA Doktora, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Nagy Judit MTA Doktora, egyetemi tanár
Dr. Falus András MTA rendes tagja, egyetemi tanár

Budapest
2015

1. TARTALOMJEGYZÉK

1. Tartalomjegyzék.....1

2. Rövidítések jegyzéke.....3

3. Bevezetés (irodalmi háttér).....5

3.1. Erythropoiesis.....6

3.2. Erythropoietin (EPO).....7

3.3. Erythropoiesis-stimulating Agent (ESA).....9

3.4. Renális anémia.....14

3.5. Erythropoietin rezisztencia krónikus veseelégtelenségben.....17

3.6. A D-vitamin anyagcseréje.....21

3.7. A D-vitamin jelentősége krónikus veseelégtelenségben.....24

3.8. A D-vitamin szerepe a renális anémia kialakulásában.....30

3.9. A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer.....33

3.10. A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer és az erythropoiesis.....35

3.11. ACE gén I/D polimorfizmusa és hatása a vérképzésre.....39

4. Célkitűzések.....44

4.1. Az ESA molekulák bemutatása, valamint a farmakokinetikájuk és farmakodinamikájuk közti kapcsolatot bemutató modell tovább fejlesztése.....44

4.2. A D-vitamin hiány és az erythropoietin rezisztencia közötti kapcsolat bizonyítása…...……45

4.3. Az ACE gén I/D polimorfizmus, az ACE gátlás, illetve közös hatásuk vizsgálata a renális anémia kialakulásában…….....45

5. Módszerek.....47

5.1. Az EPO molekula és különböző ESA készítmények szerkezetének hatása a farmakodinamikai tulajdonságokra 47

5.2. A D-vitamin hiány, mint erythropoietin rezisztencia faktor 47

5.3. Az ACE gén I/D polimorfizmus, az ACE gátlás és közös hatásuk a renális anémia kialakulásában …….....49

6. Eredmények.....52
6.1. Az ESA készítmények és a továbbfejlesztett farmakodinamikai modell.....52
6.2. A D-vitamin hiány egy erythropoietin rezisztencia faktor.....55
6.3. Az ACE gén I/D polimorfizmus nem, míg az ACE gátlás erythropoiesist gátló hatású D alléllal rendelkező betegekben.....59

7. Megbeszélés......67
7.1. Az EPO molekula és különböző ESA készítmények szerkezetének hatása a farmakodinamikai tulajdonságokra……..68
7.2. A D-vitamin hiány, mint erythropoietin rezisztencia faktor…….71
7.3. Az ACE gén I/D polimorfizmus, az ACE gátlás és közös hatásuk a renális anémia mértékére…….76

8. Következtetések.....80

9. Összefoglalás.....83

10. Summary……...……84

11. Irodalomjegyzék.....85

12. Saját publikációk jegyzéke.....105
12.1. A disszertációhoz kapcsolódó közlemények.....105
12.2. A disszertáció témájához kapcsolódó, de abban nem szereplő közlemények……..105
12.3. A disszertációtól független közlemények.....106

13. Köszönetnyilvánítás.......109

2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACE: angiotenzin konvertáló enzim

Ac-SDKP: N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-prolin

AT_1: angiotensin-1 receptor

AT_2: angiotenzin-2 receptor

ATP: adenozin trifoszfát

BFU-E: burst-forming unit-erythroid

CRP: C-reaktív protein

CFU-E: colony-forming unit-erythroid

DNS: dezoxiribonukleinsav

DOPPS: Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study

D_3 vitamin: kolekalciferol

D_2 vitamin: ergokalciferol

EPO: erythropoietin

EPOR: erythropoietin receptor

ERA-EDTA: European Renal Association–European Dialysis & Transplant Association

ERI: erythropoietin rezisztencia index

ESA: Erythropoiesis-stimulating Agent

FLK: fetal liver kinase

FOB: Follow-on Biologics

FDA: Food and Drug Administration

FGF-23: fibroblast growth factor 23

FLT: fetal liver tyrosine kinase

FOXO3a: Forkhead box O3

GADD45: DNA damage-inducible 45

G-CSF: granulocyte-colony stimulating factor

GFR: Glomeruláris Filtrációs Ráta

Hb: hemoglobin

HIF: hypoxia-inducible factor

I/D: inszerció/deléció

IGF-BP3: insulin-like growth factor-binding protein 3

IGF-1: insulin-like growth factor-1

IL-1: interleukin-1

IL-6: interleukin-6

iPTH: intakt parathormon

JAK: Janus kinase

Jak2: Janus kinase 2

MEC: minimum effective concentration

mRNS: messenger ribonukleinsav

NHANES: National Health and Nutrition Examination Survey

PEG: béta lineáris metoxi-polietilénglikol

PRCA: pure red cell aplasia

PTE: poszttranszplantációs erythrocytosis

RAAS: renin-angiotensin-aldosteron system

rHuEPO: rekombináns humán erythropoietin

SCF: stem cell factor

TGF: transforming growth factor

TNF-alfa: tumor necrosis factor alfa

TPO: thrombopoietin

TRPC: Transient Receptor Potential Channel

Tyk2: tyrosine kinase 2

VDR: vitamin D receptor

1,25(OH)D3: kalcitriol

25(OH)D_3: kalcidiol

3. BEVEZETÉS

Az utóbbi évtizedekben Európában a krónikus veseelégtelenség miatt dialízis kezelésre kerülő betegek számának gyors növekedése lelassult, és az életminőség, valamint az életkilátás növelése vált elsődleges feladattá. Magyarországon is minden rászoruló vesebeteg gondozásba kerülhet, és amennyiben szükségessé válik a művesekezelés, az minden állampolgár számára elérhető. Ezzel együtt a végstádiumú veseelégtelenség és a hozzá kapcsolódó társbetegségek kezelése komoly kihívást jelentenek a klinikai gyakorlatban (Kramer A és mtsai 2009). Ezt mutatja az a tény is, hogy az azonos életkori csoportban a dializáltak halálozása magasabb az általános lakosságban megszokott mortalitási mutatókhoz képest. A vezető halálokot ebben a betegcsoportban is a szív- és érrendszeri megbetegedések adják (Foley RN és mtsai 1998, Goodkin DA és mtsai 2003). A vesebetegség progressziójával a vérszegénység gyakorisága és foka is emelkedik. Ennek a kórképnek a kezelése szintén alapvető fontosságú, mert az anémia mértéke is kapcsolatban van az életminőséggel és az életkilátással is. Sőt az anémia korrekció keretei között alkalmazott erythropoietin pótlásra megjelenő válasz, illetve az erythropoietin igény is jelezheti a szervezetben lezajló kórfolyamatokat.

Ennek az értekezésnek a témája az erythropoietin kezelés hatékonyságát meghatározó, általam vizsgált faktorok bemutatása dializált krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegekben. Elsőként az erythropoietin tartalmú gyógyszerek farmakokinetikája és farmakodinamikája közötti összefüggést részletezem. Ezt követően két másik ide tartozó kutatási eredményt mutatok be. Időrendi sorrendben először a D-vitamin vérképzésben betöltött szerepének vizsgálata jelent meg, ezért ebben a dolgozatban is elsőként ez szerepel. Ezt követi az angiotenzin konvertáló enzim egyik polimorfizmusának, és a farmakológiai gátlásának a szerepe az anémia korrekciójában. Az említett témákat az eredeti közleményekben megjelent vizsgálati eredményeknek és következtetéseknek megfelelően mutatom be. Ezen túl a témákat bemutató bevezetésben az érintett területhez tartozó kórfolyamatokat, ezek klinikai fontosságát, és a korábbi kutatásokat is összefoglalom. Végül törekedtem teljes képet adni a saját kutatásaim kiindulópontjául szolgáló hipotézisekről, illetve a vizsgálati

eredmények bemutatását követően részletezni, hogy a saját eredmények mennyire vitték előre az adott terület pontosabb megértését.

3.1. Erythropoiesis

A vérben keringő sejtek túlnyomó többsége a vörösvértestek, melyek a vér teljes térfogatának 40-45 százalékát adják. Egy felnőtt ember 5 liter körüli vérmennyiségében megközelítőleg összesen 2,5 x 10^{13}, mikroliterenként 5 x 10^{6} vörösvértest található. A keringésben lévő érett alakokban található a hemoglobin (Hb), amely a citoszol fehérjéinek 99 százalékát teszi ki. A hemoglobin szükséges az anyagcsere folyamatához elengedhetetlen oxigén szállításához. A Hb az oxigént a tüdőben veszi fel és juttatja el a keringés által a test összes szövetéhez, majd itt miután leadta az oxigént helyette, a képződött széndioxid kis részét szállítja el, hogy azt leadja a tüdőben. A vörösvértestek átlagos életideje 100 – 120 nap, ami folyamatos újratermelődésüket is szükségessé teszi. Az elöregedett vörösvértesteknek megváltoznak a fizikai jellegzetességeik, illetve a felszínükön expresszálódó antigének, mely változások elősegítik a vérpályából való eltávolításukat a retikuloendotheliális rendszerben található makrofágok által. Megközelítőleg a keringő vörösvértestek 1 százaléka pusztul el naponta, ami rendkívül jelentős óránként több mint 10^{10}, míg naponta megközelítőleg 2,5 x 10^{11} számú új érett alak megjelenését teszi szükségessé (Hebbel RP és Eaton JW 1989). Amennyiben az új alakok megjelenése nem tud lépést tartani az elöregedett és a keringésből eltűnő vörösvértestek számával, megjelenik a vérszegénység, az anémia és romlik az oxigénszállító kapacitás, ami számos kellemetlen klinikai tünetet okoz. Ezen túlmenően az oxigénszállító kapacitás mértékét a külső igények is meghatározzák, mint például a rendszeres fizikai aktivitásból adódó nagyobb oxigén igény, vérzés, betegségek, a vörösvértestek életidejének rövidülése, vagy a külső oxigén nyomás változása. Ez utóbbit például okozhatja a szokásostól eltérő tengerszint feletti magasságban való tartózkodás. A vörösvértestek képzésének folyamatát erythropoiesisnek nevezzük, mely során három jól meghatározott érési szakaszban történik a sejtek differenciálódása felnőtt emberek esetében a vörös csontvelőben. Elsőként a hematopoetikus őssejtekből az erythroid blasztok alakulnak ki, majd ezt követi az erythroid progenitor sejtek további differenciálódása, és végül a harmadik szakaszban a sejtmagot már nem

tartalmazó érett vörösvértestek kialakulásával zárul a folyamat. A vörösvértest pusztulás mértékével lépést tartó újratermelődést - a külső igények figyelembe vételével – az erythropoiesis folyamatát számos citokin szorosan kontrollálja (Elliott S és mtsai 2009). Az új sejtek differenciálódásában szerepet játszó citokinek közé tartozik a teljesség igénye nélkül számos interleukin, növekedési faktor (mint például a G-CSF = granulocyte-colony stimulating factor; SCF = stem cell factor; TGF = transforming growth factor), enzim (mint például a FLK = fetal liver kinase; FLT = fetal liver tyrosine kinase) és szabályzó fehérjék (mint például az EPO = erythropoietin; TPO = thrombopoietin) (Elliott S és mtsai 2008).

3.2. Erythropoietin (EPO)

Egy vérképzést serkentő anyag létezését már a múlt század elején felvetették a kutatók egy nyulakon végzett állatkísérlet során. Egyik nyúl jelentős vérvételét követően a belőle származó szérumot átoltották egy egészséges másik nyúlba, és ebben az állatban erős retikulocitózist észleltek. Ezt követően hetven évet kellett várni, míg sikerült először homogén tisztított formában emberből származó erythropoietin-t nyerni (Miyake T és mtsai 1977). A humán erythropoietin (EPO) egy 30-34 kDa nagyságú glikoprotein, mely a vörös csontvelőben található vörösvértest előalakok (BFU-E = burst-forming unit-erythroid; CFU-E = colony-forming unit-erythroid) felszínén lévő erythropoietin receptorokhoz (EPOR) kapcsolódva segíti az előalakok apoptózisa helyett, a tovább érés folyamatát. Ez utóbbihoz szükségesek még egyéb faktorok is, mint például a nélkülözhetetlen vas, folsav és B_{12} vitamin. Ennek eredményeképpen az érett és új vörösvértestek hamarosan megjelennek a keringésben, emelkedik a hemoglobin szint, és ezáltal válik folyamatosan megfelelő mértékűvé az oxigén transzport kapacitás (Elliott S és mtsai 2008, Egrie JC és Brown JK 2001, Kiss Z és mtsai 2010). A humán erythropoietin fehérje részét alkotó 165 aminosav pontos sorrendjét meghatározó, a hetedik kromoszómán található EPO gén-t 1985 évben sikerült izolálni (Lin FK és mtsai 1985), mely lehetővé tette a rekombináns humán erythropoietin (rHuEPO) élő sejtvonalon történő biotechnológiai úton való előállítását is. A fehérje részhez erősen kötődnek szénhidrátláncok, melyek az EPO tömegének megközelítőleg 40 százalékát adják. A szénhidrátláncok a fehérje jól meghatározott

pontjain transzlációt követően több helyen is kapcsolódnak aminosavakhoz: három helyen az aszparagin nitrogén atomjához (Asn24, 38 és 83) és egy helyen a 126. szerin aminosav oxigén atomjához (Davis JM és mtsai 1987). Ugyanakkor a szénhidrátláncok heterogénné teszik az EPO molekulát, mert az aszparaginhoz kötődő láncok végei két, három, vagy négy ágban végződnek, míg a szerinhez kapcsolódó rövidebb lánc vége elágazás nélküli, vagy egy elágazású, ami két végpontot jelent. Ez komoly gyakorlati jelentőséggel bír, hiszen a láncok végein negatív töltésű cukormolekula található a sziálsav, aminek fontos jelentőségét az adja, hogy ez utóbbi jelentősen meghatározza az EPO receptorához való kapcsolódás erősségét. Mivel a cukorláncok variábilisak, tehát változik a szerkezetük, ezért változik a sziálsav tartalmuk is, ami maga után vonja az EPO negatív töltésének változását is. Mivel maximálisan egy EPO molekula 14 sziálsavat tartalmazhat, de ez a cukorláncok variabilitása miatt nem mindig történik meg, számos EPO izoform jöhet létre (Egrie JC és Brown JK 2001).

A vérképzéshez az igényektől függően széles határok között termelődik az erythropoetin: egészséges emberben 10 mU/ml szérum koncentrációtól akár a 10 000 mU/ml értékig. Alapvetően a szérumban mérhető EPO mennyisége fordítottan arányos a szérum hemoglobin szintjével (Jelkmann W 1992). A felnőtt emlősökben az EPO termelődésének elsődleges helye a vesék intersticiális fibroblasztjai, de más szervek, a máj és az agy is képesek ezt a molekulát előállítani. Magát a termelődést a hypoxia mértéke határozza meg, illetve fokozza a HIF (hypoxia-inducible factor) transzkripciós faktor segítségével. Amikor a sejtek oxigén hiányos állapotba kerülnek, egy enzimekből álló oxigén szenzor mechanizmus segítségével aktiválják a HIF faktort, amely lehetővé teszi az erythropoietint meghatározó gén transzkripcióját. Ezt követően történhet meg a transzláció, melyet a termelő sejtre jellemző glikolizáció kísér (Elliott S és mtsai 2009, Fisher JW 2003). Az elkészült humán erythropoietin fehérje része diszulfid kötések segítségével globuláris alakban hajlik össze, és ezáltal négy alfa spirált alkot. Az aminosavlánc két szakaszon, egy alacsony és egy magas affinitású helyen tud kötődni a receptorához. Ez utóbbi egy sejtmembránba ágyazott fehérje, és két receptor szükséges az EPO bekötődéséhez, mely hatására a receptorban homodimerizáció következik be (Elliott S és mtsai 1997, Watowich SS 1999, Syed RS és mtsai 1998). Az erythroid sejtek felszínén lévő EPO receptor létezését először 1987-ben mutatták ki (Sawyer és mtsai 1987), majd néhány évvel később sikerült a receptor génjét is izolálni

(Jones SS és mtsai 1990). Az EPO – EPOR kapcsolódáskor a receptorban szerkezeti átalakulás jön létre, mely aktiválja a JAK (Janus kinase) jelátvitelt, transzkripciós aktivátorokat, foszfatidilinositol 3 kinázt és a mitogen-activated protein kinázt. Mindezek eredményeképpen az érintett erythroid sejtek elkerülik az apoptózist és helyette proliferáció, valamint terminális differenciáció zajlik le (Koury MJ és Bondurant MC 1988). Egyértelmű pozitív, bár nem lineáris kapcsolat van az EPO és az erythropoiesis folyamata között. Megközelítőleg négyszeres vörösvértestképzéshez százszoros nagyságú szérum erythropoietin koncentráció szükséges (Erslev AJ és mtsai 1987). Egy vörösvértest előalakon (CFU-E) megközelítőleg 1000 EPO receptor található, melynek 5-10 százalékának folyamatosan kapcsolódnia szükséges a ligandjával, hogy a sejt a túlélés és differenciálódás felé mozduljon el (Sawyer ST és mtsai 1987, Doshi S és mtsai 2013). Ebből jól érthető az a megfigyelés, hogy a hatékony vörösvértestképzéshez szükséges egy minimálisan hatékony EPO plazma koncentráció (MEC - minimum effective concentration), mely alatti érték esetén EPO jelenléte ellenére sem történik erythropoiesis. Felnőtt egészséges emberben a szükséges hemoglobin és hematokrit értékek fenntartását szélsőséges környezeti, illetve oxigénszállító kapacitástól eltekintve, megközelítőleg 20 mU/ml endogén EPO plazma koncentráció biztosítja (Elliott SG és mtsai 2009).

3.3. Erythropoiesis-stimulating Agent (ESA)

Az EPO gén izolálását követően (Lin FK és mtsai 1985) lehetővé vált biotechnológiai úton erythropoietin és analógjainak, az erythropoiesis stimuláló hatóanyagoknak (ESA) az előállítása. Ez nagy áttörés volt, hiszen azt megelőzően a krónikus veseelégtelenséghez társuló, erythropoietin hiány miatti vérszegénység kezelése transzfúziókkal történt, annak minden nem kívánatos hatásával és nehézségével együtt. Az első biotechnológiai úton és humán genetikai kód alapján előállított rekombináns erythropoietin (rHuEPO) fehérje szerkezete teljesen megegyezett az endogén erythropoietinben találttal. A gyógyszerek géntechnológiai úton való előállításához kezdetben kínai hörcsög petefészek sejttenyészetet használtak. A gyártás során alkalmazott sejtvonalon, az élő sejtek az emberben található endogén erythropoietinnel azonos helyekre kapcsolták a szénhidrátláncokat, de ez utóbbiak

szerkezete és a láncok végén található sziálsav tartalom nem teljesen azonos az emberből kivonttal. Míg a fehérjék aminosav sorrendje genetikailag pontosan meghatározott, addig a szénhidrát rész az előállító élő sejtekre, illetve a gyártás folyamatának apró részleteire jellemző. A biotechnológiai úton előállított EPO hatékonysága gyakorlatilag megegyezett az endogén molekuláéval (Imai N és mtsai 1990). Az első rekombináns készítmény az epoetin alfa volt, melynek intravénás beadást követően a szérumban mérhető felezési ideje 8 óra körül van. Azonban szubkután alkalmazás során a lassúbb felszívódás (keringésbe kerülés) következtében a felezési idő hosszabbra nyúlik (Macdougall IC és mtsai 1999).

Későbbiekben további kutatás indult meg egy nagyobb hatékonyságú és ritkábban alkalmazható készítmény előállítására. Így került a figyelem középpontjába a szénhidrát és a sziálsav tartalom kulcs szerepe a biológiai aktivitás kérdéskörénél (Egrie JC és Browne JK 2001, Elliott S és mtsai 2004). A glikoproteinek esetében a szénhidrátnak sokrétű szerepe van, melyek közé tartozik a bioszintetizálhatóság, a szekretálhatóság, immun-védelem, a molekula térbeli szerkezetének kialakítása és stabilizálása, oldhatóság és nem utolsó sorban a biológiai aktivitás. Különösen fontos a szénhidrátlánc végén elhelyezkedő sziálsav szerepe, illetve mennyisége, mely egy EPO molekula izoformjait hozza létre. Korábbi kutatások eredményeképpen kiderült, hogy az egyre magasabb számú izoformok (nagyobb sziálsav tartalom) egyre gyengébb kötődést eredményeznek az EPO receptorhoz, ugyanakkor annak felezési ideje és a biológiai hatékonysága növekszik. E kutatási eredmény volt a kiindulópontja a darbepoetin alfa kifejlesztésének, mely molekula az epoetin alfához képest a fehérje részben történt öt aminosav cseréjének köszönhetően, öt nitrogén atomhoz kapcsolódó szénhidrát lánccal rendelkezik. Így a maximális sziálsav szám a láncok végén elérte a huszonkettőt (Egrie JC és Browne JK 2001). Ennek eredményeképpen az új hatóanyag szérum felezési ideje intravénás alkalmazás esetén az epoetin alfához képest megközelítőleg háromszor hosszabb ($t_{1/2}$: 25.3 ± 2.2 versus 8.5 ± 2.4 óra) lett (Macdougall IC és mtsai 1999). A nitrogénhez kötődő cukorlánc jól meghatározott három egymást követő aminosav jelenlétekor, az úgynevezett konszenzus szekvencia (Asn-Xxx-Ser/Thr) esetén tud bekötődni, ahol az Xxx bármely aminosav lehet kivéve a prolint (Elliott S és mtsai 2004, Delorme E és mtsai 1992). A gyártás során in vitro mutagenezis segítségével a genetikai kód megváltoztatásával sikerült számos

glikolizáltságú EPO analógot létrehozni, amelyekben a cukorláncok a fehérje részhez az addicionálisan létrehozott konszenzus szekvenciához egy nitrogén atomhoz kötődve kapcsolódtak. Ennek eredményeképpen az EPO (epoetin alfa) molekulához képest egy addicionális cukorlánc rágcsálókban 1,6-szoros, míg 2 további cukorlánc hozzáadása több mint kétszeres relatív in vivo aktivitást eredményezett. Ugyanakkor egy nitrogénhez kötődő cukorlánc levétele az EPO molekuláról akár négyszeres, míg két cukorlánccal való csökkentés ötvenszeres in vivo aktivitás csökkenést eredményezett. Ezekben a vizsgálatokban is megfigyelhető volt, hogy a cukorláncok számának növelésével erőteljesen csökkent az EPO receptorhoz való affinitás. *Escherichia coli* által expresszált EPO nem tartalmaz szénhidrátot, mert a baktériumban nem történik meg a szénhidrátlánc elkészítése és a fehérjéhez való kapcsolása a transzlációt követően. Ennek a nem glikolizált EPO molekulának a receptorhoz való kötődési aktivitása hétszer nagyobb, mint a hagyományos EPO (epoetin alfa) molekuláé. Ugyanakkor az egy addicionális és nitrogénhez kötődő cukorlánc az EPO molekula receptorához való háromszoros csökkenést eredményez, míg további két cukorlánc hozzáadása (darbepoetin alfa) ötszörös és további három cukorlánc hozzáadása húszszoros csökkenést okoz (Elliott S és mtsai 1997, Elliott S és mtsai 2004). Ezek a korai vizsgálatok azonban arra is felhívták a figyelmet, hogy az EPO analógok hatásossága nem elsősorban a receptorához való erősebb kapcsolódásnak az eredménye.

Az idő múlásával különböző biológiailag hasonló (biosimilar) EPO analógok kerültek kifejlesztésre. Ezek a készítmények a különböző gyártási folyamat és a felhasznált eltérő sejtvonal eredményeképpen szerkezetükben nem azonosak, de farmakokinetikájuk hasonló értékeket mutat egymáshoz. Hosszabb felezési idő érdekében pegilált EPO molekulát is kifejlesztettek, valamint kutatások indultak meg egyéb EPO mimetikus fehérjék előállítására is. Klinikai gyakorlatba az epoetin béta lineáris metoxi-polietilénglikollal (PEG) való konjugált formája került, melynek felezési ideje több mint 130 óra (Macdougall IC és mtsai 2006). A pegiláció ugyanakkor még tovább csökkentette az EPO receptorhoz való affinitást. Amíg az epoetin alfa hiperglikolizációja (darbepoetin alfa) megközelítőleg ötszörösen gyengíti a kötődést, addig a pegilált forma kötődése 50 – 100 szoros csökkenést mutat (Elliott S és mtsai 2003, Jarsch M és mtsai 2008). A különböző készítmények közötti szerkezeti, farmakokinetikai és farmakodinamikai különbségek további részletezése

meghaladná ennek a munkának a kereteit. Azonban az fontos szempont, hogy in vitro körülmények között a receptorhoz való affinitás csökkenése egyben csökkenti a hatásosságot is. Tehát egyensúlyt szükséges találni a felezési idő és a receptorhoz való kötődés erőssége között az optimális hatásosság elérése érdekében. Ismerté vált, hogy az ESA molekula a receptorával együtt endocitózis segítségével lefűződik a vörösvértest előalakok sejtplazmájába. Minél erősebb az ESA kötődése az EPO receptorhoz, annál nagyobb valószínűséggel történik meg a lefűződés, aminek eredményeképpen a citoplazmában lévő enzimek degradálják az ESA – EPOR komplexet. A lefűződött komplex ugyanakkor arra is mutat hajlandóságot, hogy visszaépüljön a sejtfalba, ahol az ESA ismét leválhat a receptoráról, hogy esetleg egy másik receptorral kapcsolódjon össze (Gross AW és Lodish HF 2006). Ennek a mechanizmusnak az ismerté válása ugyanakkor felvetette annak a lehetőségét is, hogy az ESA készítmények lebontása elsősorban endocitózis révén valósul meg. Ez a feltételezés megfelelt volna annak az elképzelésnek is, hogy minél gyengébb egy ESA kötődése az EPO receptorhoz, annál kisebb a valószínűsége az ESA – EPOR komplex lefűződés révén való eltávolítására. Későbbi kutatások azonban ezt a hipotézist elvetették, és megállapították a pegilált és hiperglikolizált EPO formák elsődlegesen receptortól (EPOR) független kiürülését (Agoram B és mtsai 2009).

A hatásossághoz szükséges minimális EPO szérum koncentráció (MEC) elméletét már a korai EPO kutatások felvetették. Észrevették, hogy az epoetinek intravénás alkalmazása mellett csak lényegesen nagyobb dózisokkal lehet elérni egy előre meghatározott hematokrit szintet, mint szubkután adagolás esetén. Ugyanis ez utóbbi adagolás esetén elhúzódóbb a gyógyszer felszívódása és kiürülése, tehát szubkután adagolás esetén hosszabb ideig mérhető az epoetin jelenléte a szérumban. Ez a tapasztalat vezetett el arra a felismerésre, hogy nem kizárólagosan az alkalmazott dózis határozza meg az erythropoiesis erősségét, hanem az alkalmazott ESA szérumban mérhető jelenléte, azaz felezési ideje is (Besarab A és mtsai 1992). Így vált érthetővé az is, hogy az alacsonyabb receptor affinitású, de hosszabb felezési idejű darbepoetin alfa miért eredményez hasonló dózisban erősebb vérképzést. Ugyanis a darbepoetin alfa esetében a gyengébb EPO receptorhoz való kötődés egy magasabb erythropoietin szérum küszöbkoncentrációt (MEC) igényel, viszont az elnyújtottabb gyógyszer kiürülés lehetővé teszi ennek a küszöb-értéknek hosszabb ideig történő meghaladását.

Egereken végzett vizsgálatok megerősítették, hogy heti háromszori adagolás mellett az epoetin alfa alkalmazott dózisát háromszorosára kellett emelni a darbepoetin alfa fehérje tömegére számolt dózisához képest ahhoz, hogy közel azonos mértékű erythropoietikus választ adjon. Az adagolások ritkításával az értékek még inkább különböztek. A két ESA heti adagolásra váltásakor az epoetin alfa dózisát tizenháromszorosra, míg egyetlen injekció alkalmazásakor 30 - 40 szeresére kellett emelni ahhoz, hogy elérje a darbepoetin alfa által kiváltott hatást (Sasu BJ és mtsai 2005). Később az azonos adagolási frekvencia mellett tapasztalható farmakodinamikai különbségeket humán vizsgálat is megerősítette (Tolman C és mtsai 2005). Tehát az ESA gyógyszerek fejlesztése során fontos szempont, hogy az EPO receptorhoz való gyenge affinitás ne korlátozza túlságosan a hatásosságot, illetőleg a hosszú felezési időből adódóan az ESA szérumkoncentrációja hosszú ideig haladja meg a minimálisan hatékony koncentrációt a küszöb-értéket. E két paraméter, a felezési idő és a receptorhoz való affinitás ugyanakkor egymástól függetlenül változik, és az ESA készítményekre vonatkozóan nem lehet egy általános érvényű szabályt erre vonatkozóan felállítani. Például egy hosszú felezési idejű ESA nem feltétlenül vált ki egy erősebb bioaktivitást. A klinikai gyakorlat számára is fontos kérdés, hogy egy ESA készítményt mekkora dózisban, milyen úton (intravénásan vagy szubkután) és milyen gyakorisággal érdemes alkalmazni a legoptimálisabb hatás elérése érdekében. Ennek a három faktornak (dózis, felezési idő, EPO receptorhoz való affinitás erőssége) az egyidejű figyelembe vétele rendkívül fontos a hatásos és biztonságos ESA alkalmazás érdekében. Az itt részletezett szempontok felvetették egy elméleti modell szükségességét, mely segítségével jobban lehet értelmezni a különböző ESA készítmények erythropoietikus hatását (Kiss Z és mtsai 2010, Doshi S és mtsai 2013).

Jelenleg is folyik a kutatás és fejlesztés további, lehetőség szerint nagyobb hatékonyságú, vagy a klinikai alkalmazás céljából előnyösebb ESA hatóanyagok fejlesztése érdekében. Az utóbbi időben a figyelem a hiperglikolizáció és a pegiláció kérdéskörén túlra is kiterjed, melyhez tartozik az EPO mimetikus fehérjék keresése és fejlesztése. Ezek közül a peginastide hatóanyag 2012 évben az FDA (Food and Drug Administration) engedélyét követően a klinikai gyakorlatba is bekerült, azonban rövid időn belül a nemkívánatos események – melyek között súlyosak is jelentkeztek - miatt visszavonásra került. A jövőben érdekes eredmények születhetnek az EPOR elleni

antitestekkel folytatott vizsgálatokból. Történtek kísérletek két, vagy három EPO molekula fúziójára, vagy egy antitesthez való kötésére, illetve légúti adagolhatóságra is. Továbbá új terápiás célpontok meghatározására is történik erőfeszítés, azonban ezekről csak keveset lehet tudni (Sinclair AM 2013).

3.4. Renális anémia

A vérképzés folyamata a krónikus vesebetegekben alapvető károsodást szenved. Az urémia, vagy az ahhoz közeli állapot, akár 20 – 30 nappal megrövidíti, vagy akár felére csökkentheti a vörösvértestek életidejét. Másrészről az EPO termelődése a vese peritubuláris intersticiális fibroblaszt, illetve fibroblaszt szerű sejtjeiben zajlik. Így a veseszövet sérülésekor csökken, vagy éppen megszűnik a belső EPO képződés. Mindezek következményesen súlyos, akár életet veszélyeztető vérszegénységet eredményezhetnek, melyet ebben az esetben renális anémiának nevezünk. Igaz ugyan, hogy a vesén kívüli szervekben is igazoltak EPO termelést, azonban ez elenyésző mennyiségű. A veseelégtelenségben tapasztalható EPO hiány mellett egyéb tényezők is szerepet játszanak a vérszegénység kialakulásában, mint például a hemolízis és toxikus anyagok felszaporodása. A renális anémia klinikai képére, mely eredetét tekintve egy multifaktoriális kórkép, jellemző a fáradság, sápadtság, étvágytalanság és általános gyengeség (Rosivall L és Kiss I 2003). Krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegeknél az egyébként is javasolt rendszeres laboratóriumi vérvizsgálattal könnyen kimutatható az anémia. Vérszegénység diagnózisát lehet felállítani felnőtt férfiak esetében, amikor a hemoglobin érték 13 g/dl, míg nők esetében 12 g/dl érték alá süllyed. Amennyiben a Hb érték az előbb említett kritikus szint alá kerül, további laboratóriumi vérvizsgálatra van szükség, hogy biztosan kizárjuk az egyéb eredetű anémiákat, illetve megerősítésre kerüljön a renális eredetű vérszegénység. Az elvégzendő vizsgálat része a vérkép, mely közé a vörösvértest, fehérvérsejt, vérlemezkék és retikulocita szám tartozik. Fontos ismerni a transzferrin szaturációt, szérum ferritint, B_{12} és folsav szintet is. A krónikus veseelégtelenséghez társuló vérszegénységhez mindig hipoproliferatív és általában normokrom és normociter jellegű paraméterek tartoznak. A szérum erythropoietin koncentráció mérése nem terjedt el a klinikai gyakorlatban (KDIGO Guideline, Anemia in CKD 2012). Továbbiakban az anémiák differenciál diagnózisai és

a renális anémia kezelésének egyéb szempontjai nem kerülnek itt tárgyalásra, mert az túllépne ennek a dolgozatnak a keretein.

A renális anémia patomechanizmusa mögötti okokat nem teljesen pontosan ismerjük. Urémiás betegekben a hemoglobin szint fenntartására, vagy a szükséges emelése érdekében ötször annyi erythropoietinre van szükség, mint egy egészséges emberben. Az is igazolt, hogy az urémia súlyossága kapcsolatot mutat a vérszegénységgel és a szükséges ESA dózis igénnyel. A vörösvértestek rövidebb életideje mögött az oxidatív stressz, a megnövekedett ozmotikus fragilitás és a bennük lévő folyamatosan csökkenő adenozin trifoszfát (ATP) is szerepet játszhat. Az ATP mennyiségének csökkenése a kalciumnak az áramlását is rontja, ami gátolja a mitokondriumokban zajló oxidatív foszforilációt, mely tovább rontja az erythrocita életidejét. Nagyon fontos szempont, hogy a sejtek az őket ért külső behatásokra képesek reagálni, hiszen az intracelluláris jelátvivő rendszerek segítségével a transzkripciós faktorok megnyitják a védekezéshez szükséges gén szakaszt, és így lehetővé válik a genetikai kód átíródása. Nem ez a helyzet a vörösvértestek esetében, hiszen az érésük során, annak utolsó fázisában elveszítik a sejtmagjukat. Ez gyakorlatilag azt jelenti, hogy egész életük során a külső behatásokra, mint például az oxidatív stressz, csak azzal a védelmi rendszerrel, elsősorban enzimekkel tudnak védekezni, amit a vörösvértest még erythroid előalak korában előállított saját maga számára. Ebben a folyamatban a nemrég felismert Forkhead box O3 (FOXO3a) játszik szerepet még az előalakokban, mely transzkripciós faktor lehetővé teszi az antioxidatív fehérjék és enzimek előállításához szükséges gének átíródását. Ezek közé, a védekezésben szerepet játszó fontos fehérjékhez tartoznak a kataláz, a szuperoxid dizmutáz, glutation-peroxidáz és a DNA damage-inducible 45 (GADD45) fehérje (Hattangadi SM és Lodish HF 2007, Marinkovic D és mtsai 2007). Könnyű belátni, hogy mennyivel sérülékenyebb egy vörösvértest a külső behatásokra, összehasonlítva más sejtekkel, melyek maggal is rendelkeznek, és következményesen igényektől függően újra képesek termelni az oxidatív folyamatokban szerepet játszó enzimeket. A krónikus veseelégtelenségben fokozódik az oxidatív stressz mértéke, mely károsítja a szervezet szempontjából fontos anyagokat (fehérjék, nukleinsav, lipidek), és ezen keresztül a sejtek működését is. Ezért is nagy jelentőséggel bírnak az erythropoietin molekulával végzett vizsgálatok, melyeknek eredménye felvetette a plazmában mérhető oxidatív stresszre utaló markerek

csökkenését, és az EPO molekula antioxidatív hatását is dializált betegekben. Mindez jó magyarázatát adhatja az ESA készítmények adagolása során megfigyelt citoprotektív hatásnak is, mely mögött inkább indirekt mechanizmusok játszhatnak szerepet (Katavetin P és mtsai 2007). Ez utóbbi feltételezést erősítik azok a vizsgálatok is, melyek az erythroid sejteken kívül nem tudtak bizonyítani működőképes EPO receptort (Sinclair AM 2010, Patterson SD és mtsai 2015). Az oxidatív stressz csökkenti a HIF faktor termelését, mely hiányában nem termelődik erythropoietin, amennyiben arra még a vese képes. A veseelégtelenség ellenére a vese még elég sokáig elő tud állítani erythropoietint, bár ez a termelés egyre szűkebb a betegség progressziójával és a vesefunkciók beszűkülésével. Fertőzések, szepszis, és malnutríció is a gyulladással kapcsolatos citokinek IL-1, IL-6, TNF-alfa (interleukin-1, interleukin-6, tumor nekrózis faktor alfa) emelkedésével járnak, mely faktorok gyengítik az erythropoietinre adott választ (Bamgbola OF 2011).

Krónikus veseelégtelenségben az ESA adagolás hatására létrejövő oxidatív stressz mértékére utaló változásokat korábban saját kutatócsoportunk is vizsgálta. Feltételezésünk szerint, ha igaz az, hogy az EPO készítményeknek antioxidatív hatása van, akkor azok adagolásának beszüntetése esetén az oxidatív markereknek emelkednie kell. Egy vizsgálatunk során dializált vesebetegek epoetin béta adagolását 14 napon keresztül felfüggesztettük, melynek hatására az oxidatív stressz mértékének emelkedését figyeltük meg, melyet az oxidált és redukált glutation hányados szignifikáns ($P < 0,001$) megemelkedése is mutatott. Ez a hányados az újra indított ESA (epoetin béta versus darbepoetin alfa) adagolására visszatért a kiindulási értékre a kezelés 12. hetében. Bár a két ESA készítményt a különböző farmakokinetikai mutatók miatt eltérő adagolásban alkalmaztuk, hasonló Hb értékek mellett az oxidatív stressz mértékére utaló markerek nem különböztek (Monostori P és mtsai 2009). Munkacsoportunk később vizsgálta ezt a kérdést 5/6 nephrectomizált patkánymodellen is. Ugyanis klinikai jelentősége lehet annak, ha egy ESA készítmény eltérő adagolása során – az eltérő szérum ESA koncentrációk következtében – esetleg előnyösebb adagolást sikerül bizonyítani az oxidatív stressz szempontjából. Darbepoetin alfa készítményt adtunk a nephrectomizált állatok (hím Wistar patkány) egy csoportjának heti egyszeri (0,4 µg/kg/hét), és a másik csoportnak pedig kéthetenkénti (0,8 µg/kg/2 hét) adagolásban. Itt is azt tapasztaltuk, hogy a két csoportban a nyilvánvalóan eltérő

szérum darbepoetin alfa koncentrációk ellenére hasonló Hb értékek jelentkeztek, és hasonlóan alakultak az oxidatív stressz markerek is. Sőt a két kezelt csoportban a Hb, az oxidált és az oxidált/redukált glutation szintje az áloperált állatokéhoz volt hasonló, míg a kontroll ESA nélküli nephrectomizált csoportban szignifikánsan ($P < 0,01$) alacsonyabb Hb értéket és emelkedett ($P < 0,01$) oxidatív marker értékeket találtunk. A vizsgálat 10. hetében a darbepoetin alfa adagolását abbahagytuk, és ezt követően az oxidatív markerek emelkedését tapasztaltuk. Mindezek az eredmények jól mutatják a renális anémiában alkalmazott ESA antioxidatív hatását, és megfelelnek a korábbi vizsgálatokban találtakkal is (Monostori P és mtsai 2013). Mind a két vizsgálatunk azt a hipotézist erősíti, hogy az ESA készítmények antioxidatív hatása indirekt módon jöhet létre az anémia korrekcióján keresztül. Ezt a véleményünket erősítik a legutóbbi EPO receptorokra vonatkozó kutatások is, melyek a nem hematológiai sejtek felszínén nem találtak működőképes EPO receptort. Az ide vonatkozó első vizsgálatok pozitív eredményei valószínűleg az akkor használatos vizsgáló módszerek (Western immunoblotting, immunhisztokémia) nem elegendő specificitásával magyarázhatóak (Brown WM és mtsai 2007). A kérdés pontos tisztázása érdekében azonban még további kutatásokra van szükség.

3.5. Erythropoietin rezisztencia krónikus veseelégtelenségben

A vörösvértestek pusztulása és képződése közti egyensúly megteremtése érdekében renális anémiában, többek között külső EPO pótlást kell biztosítani. Azonban a dializáltak között az EPO korrekció ellenére akár a vesebetegek 10 százalékában ez a folyamat gátolt, azaz egyre nagyobb dózisú exogén EPO bevitelére van szükség a megfelelő Hb szint fenntartása érdekében, vagy súlyosabb esetben a növekvő EPO adagolás ellenére egyre alacsonyabb Hb szinteket lehet csak elérni (Macdougall IC és Cooper AC 2005). Ezt a klinikai képet erythropoietin rezisztenciának (magas erythropoietin dózis ellenére alacsony hemoglobin szint) nevezzük. Az erythropoietin rezisztencia mértékét a gyakorlatban legegyszerűbben a valamekkora időegység alatt alkalmazott ESA dózis és a hemoglobin érték hányadosával lehet jellemezni. Még pontosabb, ha az erythropoietin dózist testsúlykilogrammra számítjuk. A téma klinikai kutatása során korábban kidolgoztak az ESA adagolásra jelentkező

hematopoetikus válasz mértékére más kalkulációt is, de bonyolultsága miatt ez a klinikai gyakorlatban nem terjedt el (Kilpatrick RD és mtsai 208). Az erythropoietin hatására létrejövő vérképzésre vonatkozó hatásosságot számos faktor és tényező befolyásolja. Ezek közé tartozhatnak például a vérvesztés, az emelkedett életkor, urémia, oxidatív stressz, vashiány, nehézfémek, B_{12} vitamin deficiencia, folsavhiány, fertőzések, krónikus gyulladásos folyamatok, szekunder hyperparathyreiosis, angiotenzin konvertáló enzim (ACE) farmakológiai gátlása, nem kielégítő dialízis, malnutríció, pure red cell aplasia (PRCA) vagy malignus tumorok. Azonban a lista korántsem teljes, és a kérdést tovább nehezíti az is, hogy az ismert faktorok nem mindegyikét lehet eliminálni. Mindezek a gátló tényezők és/vagy az EPO hatásához szükséges egyéb faktorok hiánya EPO rezisztenciát eredményezhetnek akár minden tízedik krónikus veseelégtelen beteg renális anémiájának kezelése során (Locatelli F és mtsai 2006). A befolyásoló faktorok ismerete rendkívül fontos jelentőséggel bír, hiszen a renális anémia foka összefügg nemcsak az életminőséggel, de a balkamra hipertrófiával, miokardiális iszkémiával és a mortalitás növekedésével is (Regidor DI és mtsai 2006, Foley RN és mtsai 1996, Ishani A és mtsai 2008, Molnar MZ és mtsai 2007). Külső EPO pótlásra szoruló krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegekben azonban nemcsak az alacsony, de a magas Hb szint esetén is emelkedett a nemkívánatos események száma, és magasabb halálozást is megfigyeltek (Kaysen GA és mtsai 2006, Zhang Y és mtsai 2004). Egy klinikai vizsgálatban, ahol 651 ESA kezelésben részesülő dializált beteget követtek 40 hónapon keresztül, az erythropoietin rezisztencia fordítottan korrelált a hemoglobin szinttel, és erős prediktornak bizonyult a teljes halálozás és a kardiovaszkuláris események előfordulásában (Panichi V és mtsai 2011). Úgy tűnik az eddig elérhető klinikai adatokból, hogy a dializált krónikus vesebetegek között a halálozás rizikója fordítottan arányos az ESA készítmények hatására kialakuló jó hemopoietikus válasszal, azaz minél nagyobb az erythropoietin rezisztencia, annál magasabb a halálozás is (Bradbury BD és mtsai 2009). Az eddigi vizsgálatok tapasztalatai alapján a vesebetegek ESA kezelése során a magasabb hemoglobin szint (> 12 - 13 g/L) elérése mellett a stroke, a kardiovaszkuláris események és a halálozás rizikója is megemelkedik. Igaz ugyan, hogy ezen nemkívánatos események mögött nem teljesen tisztázottak a kiváltó okok. A kérdést tovább bonyolítják az egymásnak ellentmondó vizsgálati eredmények is. Míg a randomizált és kontrollált klinikai

vizsgálatokban az ESA kezelés hatására megjelenő magasabb hemoglobin értékeknél inkább a nemkívánatos események száma nő, addig az obszervációs vizsgálatok a jobb túlélést igazolják (Badve SV és mtsai 2011). Nem lehet biztosan tudni, hogy oki tényezőként inkább az ESA készítmény magasabb dózisai mellett észlelhető gyógyszer mellékhatás, a magasabb hemoglobin szint, a vér viszkozitásának változása, a gyógyszertől független és az anémia korrekciójával összefüggő indirekt hatások, esetleg egy ismeretlen faktor, vagy az itt felsoroltak valamilyen kombinációja játszik-e szerepet (Bamgbola OF 2011). Az epoetin alfa hatóanyaggal folytatott CHOIR klinikai vizsgálat magasabb Hb célértékű (135 g/l) karjában az adatok elemzése során azonban az is kiderült, hogy csak a magas EPO igényű és relatív alacsonyabb Hb szintű, pontosabban a célértéket a kezelés ellenére sem elérő (erythropoietin rezisztencia) betegek között volt gyakoribb a nemkívánatos események előfordulása. Figyelemfelkeltő, hogy a magasabb célértéket elérő betegek között az EPO kezelés a nemkívánatos eseményekre vonatkozóan nem jelentett emelkedett kockázatot (Szczech LA és mtsai 2008). Az alacsony hemoglobin értékek mellett megjelenő szövődmények viszonylag jól érthetőek, viszont a magasabb Hb szint mellett kialakuló emelkedett morbiditás és mortalitás nehezen magyarázható és kevéssé kutatott terület. Mindezek miatt komoly jelentőséggel bír az erythropoietin rezisztencia faktorok pontos ismerete és azok korrekciója, hiszen a krónikus veseelégtelen betegek életkilátása és életminősége úgy tűnik jelentősen függ ezen tényezők feltárásától, és amennyiben lehetséges, a kezelésétől. Az elmúlt évtizedben is folyamatosan jelentek meg jó minőségű klinikai vizsgálati eredmények, amelyek az erythropoietin rezisztenciát, vagy önmagában a magas erythropoietin dózis igényt a halálozás, illetve szív- és érrendszeri szövődmények független prediktorának találták krónikus veseelégtelen betegekben hemodialízis kezelés (Ogawa T és mtsai 2014, Ishigami J és mtsai 2013, Koulouridis I és mtsai 2013), vagy peritoneális dialízis kezelés (Suttorp MM és mtsai 2013) mellett is. Ugyanakkor számos nyitott kérdés még megválaszolatlan, mint például a gyulladáshoz kapcsolódó gyenge erythropoietin hatás kialakulásának pontos mechanizmusa, mely ismerethiány nehezíti az erythropoietin rezisztencia jobb megértését és kezelését is. Jelenleg is folynak kutatások ezen a területen, melyet az utóbbi években megjelent kiváló tanulmányok is bizonyítanak. Solomon SD és munkacsoportja (Solomon SD és mtsai 2010) utólagos elemzést végzett egy dialízis kezelésre még nem szoruló

veseelégtelenségben szenvedő betegek bevonásával folytatott, egyik legnagyobb placeboval kontrollált vizsgálat eredményéből. A TREAT (Pfeffer MA és mtsai 2009) vizsgálatban a darbepoetin alfa hatóanyaggal kezelt vesebetegeknél a placebo csoporthoz képest, bár nem találtak magasabb halálozást, végstádiumú veseelégtelenség eltérő progresszióját és összesített kardiovaszkuláris-rizikót sem, mégis közel kétszer gyakrabban fordult elő a stroke. Az utólagos elemzés során kiderült, hogy az első két ESA dózisra rosszul reagáló betegek között a kardiovaszkuláris és a mortalitási kockázat magasabb volt a kezelt csoport betegei között. A rosszul reagálókat az jelentette, ha a betegek hemoglobin értéke az első ESA kezelést követően egy hónap elteltével is csak két százaléknál kevesebb mértékben emelkedett. A dialízis kezelést megelőzően a vesebetegek gondozása rendkívül fontos, hiszen a végstádiumú veseelégtelenség elkerülése, vagy legalább a progresszió lassítása minden betegnek az egyik legfontosabb célja. Ezért is övezte nagy figyelem egy olasz munkacsoport munkáját (Minutolo R és mtsai 2012), akik még dialízisre nem szoruló 194 betegüket (átlag GFR: 24 ± 13 ml/min/1,73 m^2) követtek nyomon 6 hónapon keresztül. A megfigyelés végén 99 beteg esetében a vesebetegség progressziója miatt kialakult a végstádiumú veseelégtelenség. Több változós Cox's analízis modellben az erythropoietin kezelésre rosszul reagálás összefüggést mutatott (P = 0,007) a végstádium elérésével. Ausztráliában egy munkacsoport (McMahon LP és mtsai 2012) viszont megkérdőjelezte az erythropoietin rezisztencia mortalitásra vonatkozó független prediktor értékét. Dializált betegeket 2 éven keresztül követtek, és találtak ugyan egy tendenciát az erythropoietinre rosszul reagálók között a nagyobb mortalitásra, de a többváltozós Cox analízisben szignifikáns értéket csak az életkor, a dialízis időtartama, perifériás vaszkuláris betegség és a szérum CRP érték értek el. Ezért a szerzők véleménye szerint a nem kielégítő erythropoietin válasz inkább a rossz általános egészségi állapot markere. Mindezek miatt a legtöbb szerző egyetért abban, hogy további kutatásokat kell folytatni az erythropoietin rezisztencia kialakulásának pontos megértéséért és klinikai gyakorlatban betöltött szerepének tisztázása céljából. Különösen fontos szempont az is, hogy milyen egyéb faktorok határozzák meg egy magas erythropoietin dózis igényű beteg halálozási kockázatát. Ezeknek a kérdéseknek a megválaszolása még várat magára.

3.6. A D-vitamin anyagcseréje

A D-vitamin név hallatán érdemes a fogalmakat tisztázni. Először is csak történelmi okokból használjuk a vitamin elnevezést, hiszen az emberi szervezet képes az előállítására. Igaz ugyan, hogy ehhez napsütés szükséges, mert a napfény UV-B sugarai (290-315 nm) hatására a bőrben lévő 7-dehidrokoleszterolból kolekalciferol (D_3 vitamin, vagy más néven natív D-vitamin) keletkezik. További vitaminforrás lehet a táplálék, mint például az olajos halak, vagy a gomba, de abban csak nagyon kevés vitamin található, és így nem elégséges a megfelelő D-vitamin ellátottság biztosítására. Ráadásul a táplálékból származó vitamin az ergokalciferol (D_2 vitamin), amelynek nem annyira előnyös a felszívódása és a hatása, mint a D_3 formának. Ennek megfelelően a lakosság körében a D-vitamin-hiány különösen téli időszakban nagyon gyakori jelenség. A második fontos pont, hogy a D_3 vitamin a szervezetben azonnal több kémiai átalakuláson is átesik. A májba jutva több enzim is a szterán váz 25. szénatomját hidroxilálja. Ez a folyamat nem szabályozott, tulajdonképpen a máj minden D_3 vitamint átalakít $25(OH)D_3$ molekulává, ami egy D-vitamin-kötő fehérjéhez kapcsolódva jut ki a keringésbe. Amíg a keringésben a D_3 vitamin fél életideje mindössze két nap, addig a szervezetben 2 - 3 hónap. Hasonló a farmakokinetikája a D_3 vitamin egyszeresen hidroxilált metabolitjának is, hiszen a keringésben két, esetleg három hét, míg a szervezetben 2 – 3 hónap a fél életideje. A D-vitamin ellátottság mérésére a gyakorlatban ez utóbbi metabolitnak a szérumban történő meghatározása terjedt el. Egészséges emberekben D-vitamin hiányról beszélünk, ha a $25(OH)D_3$ szérum szintje 50 nmol/l koncentráció alá süllyed, de elégtelen még az 50 – 75 nmol/l közötti érték is, míg megfelelő D-vitamin ellátottságról 75 - 100 nmol/l szérum szint felett beszélünk. A toxikus hatások megjelenése csak nagyon ritkán fordul elő, és az is inkább csak a kalcitriol formával, mely intoxikációs tünetek elsősorban az intesztinális kalcium túlzott felszívódásából adódó hiperkalcémiával kapcsolatosak, és a $25(OH)D_3$ metabolit 250 nmol/l szérum koncentrációja felett jelentkezik. Ennek klinikai tünete a vesekőképződés felgyorsulása, és hosszútávon a vaszkuláris kalcifikáció megjelenése is. D-vitamin intoxikáció kizárólag a kívülről bevitt D-vitamin metabolitokkal lehetséges. Arra vonatkozóan, hogy valaki túlzott napozás következtében került volna intoxikált állapotba mindezidáig nincs adat. Ez nem is várható, hiszen fiziológiás körülmények

között a szervezetben egy idő után beindulnak a védekező mechanizmusok, és csökken a D-vitamin termelődése, illetve nő a lebontása. Azonban az epidemiológiai felmérések alapján különböző betegcsoportokban alacsonyabb normál értékek is megállapításra kerültek, mint például veseelégtelenség esetén az egészséges népességhez képest ezek az értékek jóval alacsonyabbak (Fournier A és mtsai 1999). Hazai kórházi kezelést igénylő 401 beteg körében történt felmérés alapján a vizsgáltak között csak 7 százalékban találtak megfelelő ($25(OH)D_3$ > 75 nmol/l) D-vitamin ellátottságot. A kontroll csoportban, azaz a 127 fős, életkorban illesztett lakosság körében, a megfelelő D-vitamin szint szintén alacsonynak, csak 34 százaléknak bizonyult. Különösen elgondolkodtatóak az adatok a kevésbé napsütéses időszakban (október – március), amikor a hazai kontroll lakosság 90 százalékában, és a hazai kórházi ellátásra szorulóknak pedig 96 százalékánál szuboptimális a D-vitamin ellátottság (Fata E és mtsai 2014). A $25(OH)D_3$ vitamin hosszú felezési ideje biztosítja azt, hogy a vesében az egyes szénatomon történő második hidroxiláció, a szükségleteknek megfelelően bármikor megtörténhessen. Az $1,25(OH)D_3$ vitamint szokás aktív vitaminnak, vagy kalcitriolnak is nevezni és elsődleges szerepe a csont- és ásványi anyagcsere fenntartásában van, az intesztinális kalcium felszívódásának serkentésén és a mellékpajzsmirigy által termelt parathormon termelés kontrollján keresztül. A vesében történő hidroxilálás nagyon erősen szabályozott mindig a szükségleteknek megfelelően. Azonban az egyes szénatom hidroxilációjára tulajdonképpen majd minden szervünk, pontosabban minden sejtünk képes. A nem vesében előállított $1,25(OH)D_3$ vitamin nem kerül ki a keringésbe, hanem a keletkezésének a helyén részben genomikus hatása van, a gének transzkripciójában játszik szerepet, illetve a sejtmembránon és a citoszolban található D-vitamin-receptorokhoz (VDR: vitamin D receptor) kötődik. A legtöbb gén átíródása csak aktív D-vitamin jelenlétében történik meg, tulajdonképpen egy „kulcs”, amelyik kinyitja, és elérhetővé teszi a transzkripciós faktorok számára a kívánt gén szakaszokat, hogy azok elindíthassák az átíródást. A D-vitaminnak tehát sokrétű és alapvető szerepe van az emberi szervezetben. Klinikai és epidemiológiai, valamint obszervációs vizsgálatok bizonyítják a D-vitamin szerepét a bőr-megbetegedésekben, a csontanyagcsere folyamatában, az immunrendszer, endokrin rendszer, idegrendszer, szív- és érrendszer működésében. Szerepe van a tumorok kialakulásának megakadályozásában is, és a felsorolás biztosan nem teljes, hiszen ez a téma még

napjainkban is intenzív kutatási terület, és egymást követően jelennek meg az új eredmények (Takács I és mtsai 2014, Zittermann A 2003, Holick MF 2005).

A nem vese eredetű sejtek D-vitamin anyagcserében játszott szerepére egy nagyon korai közlemény is felhívta a figyelmet, melyben egy munkacsoport D-vitamin lebontására alkalmas 1-hidroxiláz enzimről számolt be bőrsejtekben (Bikle DD és mtsai 1986). A D-vitamin hatását receptorán keresztül fejti ki, mely receptor a nukleáris receptor családba tartozik. Tradicionálisan a bél-, vese-, mellékpajzsmirigy- és a csont-sejtekben található, hogy hozzájáruljon a csont- és ásványi anyagcsere helyes egyensúlyához. Azonban az utóbbi években sikerült kimutatni számos más sejtben is a jelenlétét, és ma legalább harminc szövetre vonatkozóan van bizonyíték a D-vitamin receptor jelenlétére. A D-vitamin receptor és ligandjának kötődését követően a transzkripció lehetővé válik, de a fehérje szintézis megjelenésére általában órákat vagy akár napokat is kell várni. Ezzel ellentétben megfigyeltek gyors változásokat is a szöveti működésekben a D-vitamin adagolását követően, mely felvetette egy nem nukleáris kötődési pont lehetőségét is. Ezt a hipotézist is sikerült bizonyítani, mert számos sejtvonalon megtalálták a sejt membránba ágyazott D-vitamin receptort is, melyhez a ligandjának kapcsolódását követően intracelluláris metabolikus folyamatok indulnak el rapid választ eredményezve. Ez utóbbiakhoz tartozhat például a D-vitaminnak az életfontosságú ionizált kalcium sejtek működésében betöltött alapvető szerepének kontrollja is az izmok összehúzódásakor, vagy az idegsejtek aktiválódásának folyamatában és egész biztosan még számos élettani folyamatban, amelyek a közeli jövőben ismerté válhatnak (Nemere I és Farach-Carson MC 1998). A vesebetegségekhez kapcsolódóan a figyelem különös hangsúlya a vitaminra természetesen nemcsak az egészséges szervezet élettani folyamataiban játszott szerepe miatt (Haussler MR és mtsai 1998, Heaney RP 2008) lett kiemelten fontos, hanem többek között a D-vitamin anyagcsere urémiában való megváltozása miatt is (Glorieux G és Vanholder R 2001). Ebben az állapotban a kalcitriol szintézise, és a D-vitamin receptorok száma csökken, valamint a hormon és receptor komplexének kötődése a megfelelő gén szakaszokhoz is változik. Mindezek a kalcitriol élettani hatásának zavarát okozzák urémiás szervezetben.

3.7. A D-vitamin jelentősége krónikus veseelégtelenségben

A krónikus veseelégtelenség különösen érinti a D-vitamin anyagcserét és az ezzel kapcsolatos funkciókat, hiszen a keringésbe jutó aktív D-vitamin a vesében termelődik. Ugyanakkor a vesebetegek, különösen az előrehaladottabb stádiumban lévő betegek általában nem tudnak aktív életet élni, és ennek következményeként viszonylag nagyon kevés ideig éri napfény a bőrüket. A helyzetet csak tovább rontja, hogy a dializált betegek szintén nagy többsége az idősebb korosztályból kerül ki, és ebben az életkorban a bőr D_3 vitaminszintetizáló képessége is alacsonyabb. A krónikus betegek gyakran nem megfelelően táplálkoznak, ami gyakori vitamin-hiánnyal is párosulhat. Vesebetegek esetében nem ritka a proteinuria, mely során a fehérjékhez kötött anyagok, vitaminok is távoznak a szervezetből. Manapság egyre gyakoribb peritoneális dialízis is elősegíti a D-vitamin távozását a dializáló oldaton keresztül. A vesében található megalin szükséges a tubulusokba került D-vitamin endocitózis útján történő visszavételére, mely folyamat szintén károsodik a vesefunkció beszűkülésével. A tubulussejtekbe felvett $25(OH)D_3$ aztán tovább hidroxilálódik a mitokondriumokban, vagy újra visszakerül a keringésbe. Ez a folyamat rendkívül fontos, mert a renális megalin expresszióját az aktív D-vitamin serkenti, és ez utóbbi hiányában a tubulusokba került D-vitamin visszavétele is károsodik, ami hozzájárul a vesebetegekben kialakuló D-vitamin-hiányhoz. A vesebetegség progressziójával emelkedik az FGF-23 (fibroblast growth factor 23) szintje is a szervezetben, ami az 1-hidroxiláz aktivitását csökkenti, a 24-hidroxiláz aktivitását növeli, és ezzel csökkenti az aktív D-vitamin szintet (Dusso A és mtsai 2011). Mindezek oda vezetnek, hogy az általános lakosság körében is tapasztalt D-vitamin-hiány (Scharla SH 1998) a vesebetegek között még gyakrabban fordul elő (Mucsi I és mtsai 2005, Fournier A és mtsai 1999). A korában említett hazai epidemiológiai vizsgálatban is a krónikus vesebetegségben szenvedők között a szérum $25(OH)D_3$ szint szignifikánsan ($P < 0,05$) alacsonyabb értéket mutatott a nem vesebetegekhez képest (Fata E és mtsai 2014). Saját vizsgálatunkban is a D-vitamin-hiány ($25(OH)D_3$ szérum koncentráció (< 40 nmol/l) érintette a dializált betegek közel két harmadát (Kiss Z és mtsai 2011). Egy amerikai, krónikus veseelégtelenségben szenvedők körében végzett felmérésben a betegek átlag $25(OH)D_3$ szintje mindösszesen 19,4 ± 13,6 ng/ml (48 ± 34 nmol/l) volt. Ezen túlmenően a

veseelégtelenség súlyosságával egyenesen arányosan egyre alacsonyabb szérum értékeket mértek (LaClair RE és mtsai 2005).

A D-vitamin-hiánynak komoly jelentősége lehet, mert krónikus veseelégtelenségben az alacsony 25(OH)D_3 vérszint több vizsgálat alapján összefüggést mutat a mortalitással is. Egy vizsgálatban 9,4 éven keresztül követtek 444, 3 - 5 stádiumú krónikus vesebetegeket, akiket 25(OH)D_3 vérszintjük alapján négy csoportba soroltak. Az eredmények azt mutatták, hogy a D-vitamin-hiány mértéke szignifikáns ($P < 0,001$) összefüggést mutat az összhalálozással és a kardiovaszkuláris okok miatti mortalitással is (Pilz S és mtsai 2011). Az aktív forma szükséges a megfelelő bélből történő kalcium felszívódáshoz és a mellékpajzsmirigyben termelődő parathormon szabályozásához is. Ugyanakkor azt is figyelembe kell venni, hogy a 25-hidroxilált forma is tud kötődni a D-vitamin-receptorhoz, de specifikus aktivitása csak százada az aktív formához viszonyítva. A vesebetegség progressziójával, részben a csökkenő aktív D-vitamintermelés következtében egyre gyakrabban borul fel a csont- és ásványi anyagcsere, mely sok kihívást jelent a nefrológusoknak. E mellett még gondot jelent a szérumban lévő kalcium és foszfát vesén keresztüli ürülésének képtelensége is, ami ördögi körként szintén hozzájárul az ásványi anyagcsere felborulásához és más hormonok, szabályzó anyagok emelkedéséhez is, melyek közé tartozik például az FGF-23 is. Bár több évtizeden keresztül a figyelem a kalcitriolra és a csont- és ásványi anyagcserére irányult, az utóbbi évtizedekben inkább az autokrin funkciókra és a gén expresszióra kifejtett hatása került előtérbe. Becslések szerint ez utóbbi folyamatokban használódik el a D-vitamin 80 százaléka. A legtöbb sejt képes 1,25(OH)D_3 előállítására, és rendelkezik a lebontásra alkalmas enzimekkel, azaz 24 és 25 hidroxilázzal is, melyek megakadályozzák, hogy a nem vese sejtekből kijusson az aktív D-vitamin a keringésbe (Heaney RP 2008). A vesebetegeket különösen érinti mind a natív, mind az aktív D-vitamin-hiánya, mely korábbi adatok alapján az ebben a betegcsoportban tapasztalt egyébként is magas mortalitást és kardiovaszkuláris morbiditást még tovább növelheti. Másik oldalról a hemodializáltak kalcitriol kezelése szükséges ugyan, azonban a túl magas szérum szintje megemeli a 24,25-hidroxiláz aktivitását, ami csökkenti a 25(OH)D_3 elérhetőségét a sejtek számára. Mindez tekintettel a D-vitamin szervezetben betöltött alapvető élettani szerepére feltételezhetően növelheti a morbiditást és ebből adódóan a halálozást is. Ezt a hipotézist és a megfigyeléses vizsgálatokból származó

eredményeket is randomizált prospektív klinikai vizsgálatban kell majd a jövőben megerősíteni. Sajnos a kezelés során alkalmazott aktív D-vitamin nem tudja teljesen kielégíteni az autokrin funkciók igényét, mert ahhoz folyamatosan nagyon magas aktív D-vitamin szintre lenne szükség a keringésben. Alapvetően a szérumban található aktív D-vitamin a csont és ásványi anyagcsere folyamatokhoz van igazítva és nem az autokrin funkciók kielégítésére. Az aktív D-vitamin kezelés hozzájárulva a kalcium és foszfát bélből való felszívódásához, megemelheti azok, legtöbb esetben egyébként is magas szintjét. Ezek a nem kívánatos folyamatok a magas szérum parathormon szinttel együtt komoly mértékben hozzájárulnak a csontok patológiás átépüléséhez és a vaszkuláris kalcifikációhoz, mely elváltozások nagyon gyakoriak veseelégtelenségben. Ráadásul a magas szérum parathormon, kalcium és foszfát szintek mellett a vesebetegek mortalitása is jelentősen megemelkedik (Kalantar-Zadeh K és mtsai 2006). Mindezek miatt is nagyon fontos lenne a veseelégtelenségben szenvedő betegek rendszeres natív D-vitamin ellátottságának ellenőrzése, és szükség esetén pótlása is (Takács I és mtsai 2014, Wolf M és mtsai 2007). A klinikai gyakorlatban vesebetegeknél a D-vitamin pótlás inkább a csont és ásványi anyagcsere vonatkozásában merül fel. Ennek oka talán abban is keresendő, hogy ezzel a témával régebb óta foglalkozik az orvostudomány, több az ide vonatkozó klinikai vizsgálat is, és nem utolsó sorban a vér laboratóriumi vizsgálata során a szérum kalcium, foszfát és parathormon meghatározások a mindennapi gyakorlat részei. Az aktív D-vitamin alkalmazását is elsősorban a szérum parathormon és kalcium koncentráció vezérli, és sajnos a natív D-vitamin pótlása a gyakorlatban nem kap akkora figyelmet (Kiss I és mtsai 2013). Ez a korábban itt már jelzett szempontból is fontos lenne, mert a natív D-vitamin is tud kötődni a receptorhoz, csak a kötődés erőssége, azaz a $25(OH)D_3$ affinitása a D-vitamin-receptorhoz sokkal alacsonyabb. Természetesen a receptor és ligandjának összekapcsolódását követően az eredményezett hatásban nincs különbség, de megközelítőleg azonos hatáshoz a $25(OH)D_3$ metabolitból lényegesen nagyobb (125 – 400:1) koncentrációra van szükség, mint a kalcitriol esetében. Tekintettel a két metabolit szérum koncentrációjára és a receptorhoz való affinitás különbségére, nagyon valószínűsíthető, hogy a szervezetben a D-vitaminnal kapcsolatos hatások jelentős része a $25(OH)D_3$ metabolitnak tudható be (Barger-Lux MJ és mtsai 1995), és jóval jelentősebb szerepét kell feltételezni, mint ahogyan az a köztudatban jelenleg van.

Krónikus veseelégtelenségben az alacsony D-vitamin ellátottság esetén számos megbetegedés kockázata megemelkedik. Ezek közé tartozik a csontanyagcsere zavara, melynek számos formája van és ezek ismertetése nem tartozik közvetlenül a jelen téma fókuszába. D-vitamin hiányban az izom sejtek intracelluláris kalcium anyagcseréje is megváltozik, mely biztosan hozzájárul a miopátia kialakulásához. Számos vizsgálat eredménye bizonyítja a D-vitamin hiány és a fertőzések, valamint egyéb gyulladásos folyamatok kapcsolatát. Ez utóbbiak közé tartozik a reumatoid artitisz, vagy a gyulladásos bélbetegségek. A vesebetegek esetében különösen fontos szempont a magas vérnyomás, szív- és érrendszeri betegségek kérdése, vagy a rosszindulatú daganatok és a D-vitamin ellátottság között kimutatható kapcsolat, hiszen ezek a betegségek adják a halálokok döntő többségét vesebetegekben is (Goodkin DA és mtsai 2003). A helyes D-vitamin kezelés azért is nagyon fontos a klinikai gyakorlatban, mert amikor a vesebeteg dialízis kezelésre kerül, komoly mértékben nő meg a mortalitás rizikója. Aktivált D-vitaminnal kezelt dializált betegek mortalitását több munkacsoport is vizsgálta, és azt találták, hogy a vitamin pótlása független összefüggést mutat a túlélés javulásával. Egyik munkacsoport több mint 51 000 a dialízis kezelés elkezdését követően legalább 90 napon keresztül életben lévő dializált krónikus vesebeteg kórlapját nézte végig retrospektív módon, és vizsgálták ezeknek a betegeknek a két éves túlélését. A vizsgált csoportból több mint 31 000 beteg részesült aktív D-vitamin kezelésben. A két éves után követés során a halálozás előfordulása a kezeltek között 13,8/100 életév volt, míg a D-vitamin pótlást nem kapók között 28,6/100 életév értéknek bizonyult, a különbség szignifikáns ($P < 0,001$) előnyt mutatott a kezeltek javára. Azonos szignifikáns ($P < 0,001$) előnyt jelentett a D-vitamin kezelés a szív- és érrendszeri halálozás előfordulására is (Teng M és mtsai 2005). A multicentrikus FARO-2 obszervációs vizsgálat is a D-vitamin pótlás (kalcitriol vagy parikalcitol) előnyét igazolta. 568 hemodializált beteget követtek három éven keresztül. Annak ellenére, hogy kiinduláskor a társbetegségek gyakorisága a D-vitamin pótlásban részesülő és nem részesülő csoport között nem különbözött, a pótlásban részesülő csoport két éves túlélése szignifikánsan (80,7 % vs 63,3 %; $P < 0,01$) előnyösebb volt. A Kaplan-Meier analízisben a két csoport túlélését reprezentáló görbék már a vizsgálat hatodik hónapjában különváltak. A leggyakoribb halálok a szívelégtelenség volt, mely az összes halál 25,9 százalékát adta (Messa P és mtsai 2015). Korábban egy retrospektív

adatgyűjtésből származó eredmény alapján az is felmerült, hogy esetleg a D-vitamin analógok között lenne különbség a túlélésre kifejtett jótékony hatásban. 29021 parikalcitollal kezelt és 38378 kalcitriollal kezelt beteg mortalitási adatait hasonlították össze egy három éves periódusban. Ez alapján a parikalcitollal kezeltek között szignifikánsan ($P < 0,001$) alacsonyabb volt a halálozás előfordulása (Teng M és mtsai 2003). Jelenleg azonban nincs arra meggyőző bizonyíték, hogy a D-vitamin analógok között a mortalitásra vonatkozó kedvező hatásukban lenne különbség. Tentori F és munkacsoportja (Tentori F és mtsai 2006) 7731 hemodializált beteget, akik különböző D-vitamin kezelést kaptak (kalcitriol, parikalcitol, doxercalciferol), követett nyomon 37 héten keresztül. A kezelt csoportok között a mortalitásban nem mutatkozott különbség korrigált statisztikai modellben. Ezzel ellentétesen a D-vitamin kezelésben nem részesülő vesebetegek ($n = 6855$) mortalitási rizikója szignifikánsan nagyobb volt, összehasonlítva a kezeltek halálozásával. Egy most megjelent összefoglaló közlemény szerint a parikalcitol kezelés mutatott előnyt néhány nem kemény végpontú összehasonlító vizsgálatban a szérum parathormon csökkentésében és a magas szérum kalcium és foszfát koncentrációk tekintetében (Bover J és mtsai 2015). Ugyanakkor arra is van példa, hogy a nagy dózisú aktivált D-vitamin (parikalcitol dózis ≥ 15 µg/hét) adagolás dializált vesebetegekben mutat egy emelkedő mortalitási trendet. A szerzők kiemelik, hogy ennek oka lehet az is, hogy ebben a csoportban magasabb volt a szérum parathormon szintje is. Ennek ellenére a nagy dózis mellett észlelt emelkedő mortalitási rizikó még mindig alatta maradt azon betegek halálozásának, akik nem kaptak D-vitamin pótlást (Kalantar-Zadeh K és mtsai 2006). Egy későbbi retrospektív tanulmányban is vizsgálták a magasabb dózisú parikalcitol (≥ 15 µg/hét) kezelés melletti mortalitást, de az eredmények megnyugtatóak voltak. Sőt az alacsonyabb alkalmazott dózis mellett a magas dózisú kezeléshez viszonyítva egy emelkedettebb mortalitási rizikót találtak (Miller JE és mtsai 2012). Az itt említett vizsgálatokon kívül még más tanulmányok is foglalkoztak, és megerősítették a D-vitamin kedvező hatását a túlélésre ebben a betegcsoportban (Wolf M és mtsai 2007, Shoji T és mtsai 2004). Bár az itt említett tanulmányok igen nagy számú beteg bevonásával történtek, mégis a vizsgálatok obszervációs, gyakran retrospektív tanulmányok voltak. E miatt szükség lenne prospektív randomizált és esetleg kontrollált vizsgálatokra is, hogy a D-vitamin

mortalitásra kifejtett kedvező hatását krónikus vesebetegeken egyértelműen tisztázni lehessen. Ezt az igényt különösen alátámasztja egy most megjelent metaanalízis eredménye. Az elemzésbe 13 randomizált, kontrollált vizsgálatot válogattak be, melyek a szájon át szedhető D-vitamin analógokat hasonlították össze placeboval krónikus veseelégtelenségben (GFR ≤ 90 ml/perc/1,73m^2) szenvedő betegekben. Az elemzések azt mutatták, hogy a halálozás, a kardiovaszkuláris okokból adódó mortalitás és a súlyos kardiovaszkuláris események nem különböztek egymástól szignifikánsan a két csoportban (Mann MC és mtsai 2015). Egy másik munkacsoport (Bjelakovic G és mtsai 2014) 2012 februárjáig bezárólag átnézte a tudományos irodalmat és az összes megjelent randomizált vizsgálat eredményét egy metaanalízisben elemezte. Az elemzésbe bekerült 56 vizsgálatban összesen 95286 egészséges, vagy beteg felnőttet vontak be, és átlagban 4,4 éven keresztül követték őket, és figyelték a bármely D-vitamin (kolekalciferol, ergokalciferol, alfacalcidol, kalcitriol) hatását a mortalitásra. Az elemzések alapján egyedül a 25(OH)D_3 esetében jelenthető ki, hogy idősebb emberek esetén csökkentheti a mortalitást. A szerzők kiemelik, hogy további placebo kontrollált és randomizált vizsgálatok szükségesek a kérdés megnyugtató megválaszolásához.

Nagyon sok vizsgálat foglalkozik a veseelégtelenség során megjelenő D-vitaminnal kapcsolatos kórélettani folyamatokkal. A vizsgálatok azt erősítették meg, hogy urémiában a D-vitamin hatása gyengébb, mint az egészséges emberekben tapasztalt hatás. Más szóval a vesebetegekben van egyfajta rezisztencia a D-vitaminnal kapcsolatosan. Az idevonatkozó vizsgálatok alapvetően három okra vezették vissza ezt a jelenséget. Először is a vesebetegekben megváltozik a D-vitamin anyagcseréje, ami ebben a fejezetben is részletesen tárgyalásra került. Még annyit azonban meg kell említeni, hogy urémiában a felszaporodott toxinok következtében csökken az 1 alfa hidroxiláz aktivitása, ami szintén hozzájárul a csökkenő ép veseszövet miatt amúgy is csökkenő aktív D-vitamin szintézishez (Hsu CH és Patel S 1992). Igaz ugyan, hogy a kalcitriol eliminálásában szerepet játszó 24 hidroxiláz működése is csökkent urémiában, bár veseelégtelenségben a kalcitriol alacsony szérumszintje miatt elmarad az önszabályozó folyamat részeként a kalcitriol saját lebontó enzimének serkentése is (Hsu CH és Patel SR 1992). Összességében a két ellentétes irányba ható enzim működés változása a kalcitriol szérumszintjének csökkenését eredményezi. A második

ok, ami miatt másként reagálnak a vesebetegek a D-vitaminra, az az, hogy a D-vitamin-receptor expressziója lecsökken urémiában (Korkor AB 1987). Tehát az ezekben a betegekben egyébként is kevés D-vitaminnak csökkenő lehetősége van a receptorához való kapcsolódásra, mert nincs elég receptor. Végül a harmadik ok a D-vitamin–receptor komplexnek a DNS (dezoxiribonukleinsav) megfelelő szakaszához való kapcsolódásának kérdése. A nukleáris D-vitamin-receptornak két kötődésre alkalmas része van. Az egyikhez a D-vitamin kapcsolódik, így kialakul a D-vitamin–receptor komplex, a másik kötőhely pedig hozzá kapcsolja a komplexet a DNS megfelelő szakaszához. Vizsgálatok azt mutatták ki, hogy ez utóbbi kötődés affinitása a DNS szakaszhoz veseelégtelenségben lényegesen meggyengül. Esetenként a kötődési kapacitás felére, vagy akár kevesebb, mint a felére is csökken a nem urémiás állapothoz képest (Patel SR és mtsai 1995, Toell A és mtsai 1999). Mindezek a kórélettani folyamatok különösen aláhúzzák a D-vitamin pótlás fontosságát a krónikus veseelégtelenségben szenvedők esetében.

3.8. A D-vitamin szerepe a renális anémia kialakulásában

Vesebetegségben a korábban részletezettek miatt több okra visszavezethetően is romlik a vérképzés. Az erythropoiesis folyamata során az előalakoknak több citokinnel és hormonnal kell találkozniuk, hogy azok több jelátviteli intracelluláris folyamatot indítsanak el és végül a gének transzkripciójának segítségével az előalakok elkerüljék az apoptózist. Ebben a folyamatban a D-vitaminnak - az autokrin funkciókban betöltött szerepére gondolva - több helyen is lényeges szerepe lehet. Erre utal egy közelmúltban nemcsak beszűkült vesefunkcióval rendelkező vizsgálati alanyok bevonásával folytatott keresztmetszeti obszervációs tanulmány is, melynek eredménye a szérum 25(OH)D_3 szint és az anémia inverz összefüggését mutatta ki (Sim JJ és mtsai 2010). A NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey) adatbázisban a 60 évesnél magasabb életkorú egyének adatainak elemzése során a D-vitamin hiány szignifikáns ($P = 0,02$) és független összefüggést mutatott az anémia előfordulásával (Perlstein TS és mtsai 2011). Az összefüggésre az is ráirányította a figyelmet, hogy a csontvelői hematonban megközelítőleg ötszázszor magasabb koncentrációban található az aktív D-vitamin, és 25-ször magasabb koncentrációban a 25(OH)D_3 forma a csontvelői

plazmához képest. Mindezek felvetik a D-vitamin csontvelőben zajló folyamatokban betöltött alapvető szerepét (Blazsek I és mtsai 1996, Norman AW 2006). Krónikus veseelégtelenséget sok szempontból egy gyulladásos állapotnak is lehet tekinteni, melyet jól mutat a gyulladással kapcsolatban lévő markerek mennyiségének növekedése is. Ez utóbbi pedig szintén kapcsolatban van a vérszegénység gyakoriságával. Ennek következtében a gyulladás folyamata, az anémia és a D-vitamin közötti kapcsolatok kutatási eredményei is iránymutatóak és ösztönzők voltak további vizsgálatokra a témában (Icardi A és mtsai 2013).

Ismerté vált, hogy a D-vitamin-receptor polimorfizmusa szintén összefüggést mutat az anémia mértékével hemodializált betegekben. A receptor *Bsm*l (inszerció/deléció) polimorfizmusát (BB, Bb, bb) két munkacsoport is vizsgálta. Annak ellenére, hogy mind a két vizsgálat Törökországban zajlott, a vizsgáltak *Bms*l genotípusai eltértek egymástól a két egymástól független vizsgálatban. Talán ennek is tudható be, hogy mind a két kutató csoport szignifikáns kapcsolatot talált a B/B genotípus és a hemoglobin szint, valamint az erythropoietin igény között, de nem azonos előjellel. Az Ankarában folytatott vizsgálatban (Ertürk S és mtsai 2002) a BB genotípusú betegekben találtak alacsonyabb hemoglobin szintet ($P = 0,004$) és magasabb heti erythropoietin igényt ($P = 0,009$), addig a Baskentben történt kutatásban (Sezer S és mtsai 2007) a BB genotípusú csoportban csökkent erythropoietin igényt ($P < 0,03$) és magasabb hemoglobin szintet ($P < 0,005$) tártak fel. Mind a két vizsgálat további kérdéseket vetett fel, de ugyanakkor rá is irányította a figyelmet a D-vitamin anyagcsere és az erythropoiesis kapcsolatára. In vitro vizsgálatok is megerősítették ezt az összefüggést.

Humán erythroid előalakok tenyészetében aktív D-vitamin és erythropoietin hozzáadásával sikerült igazolni a két hormonnak a serkentő hatását az előalakok proliferációjára. E mellett a legerőteljesebb sejtszaporulatot a D-vitamin és az erythropoietin együttes adásakor kaptak, mely eredmény nagyobb volt bármelyik hormon egyedüli hatásánál (Alon DB és mtsai 2002). Egy másik vizsgálatban 33 krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegtől származó erythroid előalakot vizsgáltak. Sejttenyészetben a kalcitriolnak szignifikáns ($P < 0,02$) addicionális serkentető hatása volt az erythroid előalakok proliferációjára (Aucella F és mtsai 2003). A D-vitaminnak itt is bemutatott kedvező hatása a vérképzésre kapcsolatban lehet a

kezelés mellett gyakran tapasztalt szérum kalcium szint megemelkedésével is a klinikai gyakorlatban. Az ugyanis régebb óta ismert, hogy a kalciumnak fontos szerepe lehet az erythropoietin receptorához való kapcsolódáskor és az EPO kiváltotta intracelluláris folyamatokban is (Misiti J és Spivak JI 1979). A közelmúltban vált világossá, hogy az erythropoietin stimulálja a kalcium sejtbe történő beáramlását az erythroid sejtek membránjába ágyazott TRPC2 és TRPC6 (Transient Receptor Potential Channel) feszültség független kalcium ioncsatorna modulálásán keresztül. Az EPO hatására kialakuló kalcium influx az extracelluláris kalcium jelenlététől teljes mértékben függött (Chu X és mtsai 2004). Ezeknek a kutatási eredményeknek teljesen megfelel az egyik legnagyobb epidemiológiai felmérés, a DOPPS (Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study) vizsgálat eredménye is, mely 12089 hemodializált krónikus vesebeteg adatára épül. Az elemzések összefüggést mutattak a nagyobb szérum kalcium koncentráció és a jobb anémia kontroll között. Ráadásul a kapcsolat független volt a D-vitamin alkalmazástól, az ESA dózisától és a szérum parathormon koncentrációtól is (Kimata N és mtsai 2005).

Több vizsgálatban is igazolódott, hogy krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegek között is érvényes a más betegcsoportok (Zittermann A és mtsai 2011) és az általános lakosság (Perlstein TS és mtsai 2011) körében is feltárt összefüggés, hogy a D-vitamin ellátottság összefüggést mutat a szérum hemoglobin szinttel és az anémia mértékével (Kendrick J és mtsai 2009, Patel NM és mtsai 2010). Ezekben a vizsgálatokban a D-vitamin más paraméterektől független meghatározóként igazolódott a renális anémia kialakulásában. 2015 nyarán vált elérhető egy török munkacsoport (Afsar B és mtsai 2015) közleménye, melyben cinakalcet, parikalcitol, kalcitriol alkalmazása mellett vizsgálták az erythropoietin rezisztenciát. Az obszervációs és keresztmetszeti vizsgálatba klinikailag stabil, 196 hemodializált beteget vontak be. Az elemzések szerint az erythropoietin rezisztencia szignifikáns különbséget mutatott a parikalcitol és egyik hatóanyagot sem kapó csoport (P = 0,017) és a parikalcitol és kalcitriol csoportok között (P = 0,006). A lineáris regressziós modellben a parikalcitol szignifikáns (P = 0,046) meghatározóként szerepelt az ESA rezisztencia vonatkozásában. Még az erythropoietin pótlásban nem részesülő hemodializált betegeknél az enyhe emelkedett szérum parathormon csökkentés céljából alkalmazott alfacalcidol kezelés a hemoglobin értéket és az abszolút retikulocita számot is

(P < 0,005) szignifikánsan megemelte (Albitar S és mtsai 1997). Saját vizsgálatunkon kívül további kutatási eredmények is elérhetők, melyek bizonyítják a D-vitamin adagolás melletti hemoglobin szint emelkedését, és az alkalmazott erythropoietin szükséglet csökkenését is. Egy munkacsoport (Goicoechea M és mtsai 1998) emelkedett parathormon szintű, vérszegény (Hb: 10,7 ± 1,7 g/dl) 28 hemodializált vesebeteget kalcitriollal kezelt. Az után követés harmadik és tizenkettedik hónapjában szignifikánsan emelkedett a szérum hemoglobin szint a kezdetben erythropoietin kezelésben (P < 0,001) is részesülő és abban nem részesülő (P < 0,005) csoportban is. Egy retrospektív vizsgálatban 153 dialízis kezelésre még nem szoruló, de anémiás krónikus veseelégtelenségben szenvedő beteg adatait gyűjtötték össze. A D-vitamin hiányban szenvedő betegekben a vitamin pótlását követően az alkalmazott ESA dózist 24 százalékkal, szignifikánsan (P = 0,025) lehetett csökkenteni (Lac PT és mtsai 2010). A téma aktualitását bizonyítja, hogy ebben az évben megrendezett ERA-EDTA (European Renal Association – European Dialysis and Transplant Association) kongresszuson Londonban is bemutattak egy vizsgálati eredményt, mely szerint parikalcitol 3 hónapon keresztüli adagolása mellett szignifikáns ESA dózis csökkenést (P < 0,0003) és retikulocita szám emelkedést (P < 0,032) figyeltek meg 21 dializált krónikus vesebetegben (Paliouras C és mtsai 2015).

3.9. A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer

A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer, vagy az angol nyelvű irodalomban használatos rövidített nevén RAAS (renin-angiotensin-aldosteron system) rendszer alapvető szerepet tölt be elsősorban a vérkeringés és a folyadékháztartás szabályozásában. Az utóbbi évtizedekben azonban felismerésre került, hogy számos más szövetben is megtalálhatók a rendszer elemei, melyek a klasszikus hatások mellett egyéb lokális autokrin, illetve parakrin funkciókat is betöltenek (Kobori H és mtsai 2007, Paul M és mtsai 2006). Ennek az összetett szabályozó rendszernek az első katalizáló eleme egy glikoprotein enzim, a renin, mely a képződésének helyéről a veséről kapta a nevét. A vese juxtaglomeruláris sejtjei termelik a prorenint, mely további enzimatikus hasításon esik keresztül, és végül így alakul ki a renin. Termelődését több faktor is szabályozza, melyek közé tartozik a macula densa

által érzékelt NaCl koncentráció emelkedése, a szimpatikus idegrendszer (β-adrenerg inger) aktivitása. Hormonális tényezők, mint például az angiotenzin-II, noradrenalin, endotelin, antidiuretikus hormon is szerepet játszanak a renin termelődés és felszabadulás szabályozásában. Végül fontos szerepe van az intrarenális vérnyomásnak, mert az afferens arteriola disztális szakaszában a perfúziós nyomás esése fokozza a renin elválasztását. Ennek az enzimnek a szubsztrátja a májban termelődő 453 aminosavból álló angiotenzinogén glikoprotein, melyről a 10 aminosavból álló angiotenzin-I-et hasítja le. Ez utóbbi anyagról következő lépésként az angiotenzin-konvertáz enzim (ACE) további két aminosavat hasít le, és így keletkezik egy új oktapeptid az angiotenzin-II, melynek fél életideje nagyon rövid, mindösszesen egy-két perc. Ez utóbbi lépést azonban a szövetekben lévő kimáz nevű enzim is el tudja végezni, és az így keletkezett angiotenzin-II elsősorban a nem klasszikus folyamatokban tölt be szabályozó szerepet. Az angiotenzin-II a hét transzmembrán glikoprotein receptor családhoz tartozó angiotenzin receptorokhoz tud kapcsolódni, melyből többet is sikerült azonosítani. Jelenleg azonban elsősorban az angiotenzin-1 (AT_1) és angiotenzin-2 (AT_2) receptorok szerkezete és funkciója ismert pontosabban, és ezek a receptorok több szempontból is egymással ellentétes hatásokat hoznak létre, ami egymás hatásának kiegyensúlyozását is jelenti. A receptorok aktiválását követően több összetett intracelluláris jelátviteli kaszkád indul el, melyek más intracelluláris mechanizmusokkal is együttműködnek (Rosivall L és Kiss I 2003). Ezeknek az utaknak a részletes bemutatása nem célja ennek a munkának. Az angiotenzin-II klasszikus hatása a só és vízháztartás és a hemodinamika szabályozása. Az AT_1 receptoron keresztül valósulnak meg a vazokonstrukció, szomjúság érzés, vazopressszin és aldoszteron felszabadítás, fibrózis, valamint a sejtnövekedésre és migrációra kifejtett hatások. További hatások lehetnek a szabad gyökök segítségével serkentett gyulladásos folyamatok, melyek szerepet játszhatnak az érelmeszesedés és az erek öregedésének folyamatában is. Ezzel ellentétben az AT_2 receptoron keresztül valósul meg a vazodilatáció, a nitrogén-monoxid felszabadítás és a sejtnövekedésre kifejtett gátló hatás. Az itt felsorolt klasszikus hatások mellett új funkciókat is sikerült feltárni. Az angiotenzin-II az AT_1 receptoron hatva csökkenti a plazma adiponektin szintjét, mely szerepet játszhat a glukóz tolerancia romlásában. Más metabolikus hatások is kialakulnak a gyulladásos folyamatokban, növekszik az inzulin szekréció, β-sejt apoptózis jelentkezik, csökken a

glükoneogenezis és emelkedik a plazma triglicerid szintje. Az AT_2 receptoron kialakuló nem klasszikus hatások között kell megemlíteni a központi idegrendszerben a neuroprotektív hatást. Mindezek az új felfedezések jelentősen átalakították a RAAS rendszerrel kapcsolatos klasszikus szemléletet és ma egy meglehetősen összetett rendszerrel állunk szemben, amelyben endokrin, autokrin és intrakrin funkciókkal is számolnunk kell (Fyhrquist F és Saijonmaa O 2008).

3.10. A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer és az erythropoiesis

Az elmúlt évtizedekben a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer és az erythropoiesis kapcsolatát számos in vitro és in vivo tanulmányban vizsgálták, és több összefüggést sikerült leírni (Vlahakos DV és mtsai 2010). A két rendszer közötti kapcsolatra különösen ráirányította a figyelmet az a klinikai tapasztalat, hogy az ACE gátlók és az AT_1 receptor blokkolók használata során anémiát, vagy erythropoietin rezisztenciát figyeltek meg. Bár ezt az összefüggést nem minden klinikai vizsgálatban tudták megerősíteni, ami további kérdéseket vetett fel. Az ezen a területen történt további kutatások az élettani folyamatok több lépését is azonosították, ami magyarázatát adhatja a két rendszer kapcsolódásának. Tehát a RAAS rendszer és az erythropoiesis közötti kapcsolat hátterében nem egy jól meghatározott mechanizmusról lehet szó, hanem sokkal inkább több hatás együtteséből kialakuló összesített hatásról, ami esetleg magyarázatát adhatja az ezen a területen talált eltérő eredményeknek is (Macdougall IC 1999).

Az angiotenzin-II erythroid alakok differenciálódásában betöltött fontos szerepére már egy korai, nyulakon és patkányokon végzett vizsgálat is felhívta a figyelmet. Angiotenzin-II adására a kísérleti álatokban sikerült igazolni az erythropoiesis fokozódását, valamint egy vasizotóp (Fe^{59}) vörösvértestekbe történő beépülésének növekedését. E mellett megfigyelték, hogy az angiotenzin-II adása jelentősen csökkenti a vesében történő véráramlást, és következményesen az erythropoietin aktivitás emelkedéséről is beszámoltak (Nakao K és mtsai 1967). Később ezt az eredményt sikerült megerősíteni másik vizsgálatokban is. Az egyik munkacsoport rágcsálók csontvelőjéből és újszülöttek köldökvéréből származó hemopoetikus előalakokat izolált, és a kutatók in vitro angiotenzin-II hozzáadása után sejt proliferációt

és differenciációt észleltek, mely gátolható volt AT_1 receptor blokkolóval (Rodgers KE és mtsai 2000). Ezt az összefüggést további vizsgálat is megerősítette. Egy munkacsoport (Mrug M és mtsai 1997) humán erythroid előalakokat izolált, majd angiotenzin-II hozzáadásával serkenteni tudta az erythroid alakok proliferációját, amit losartan (AT_1 receptor blokkoló) hozzáadása teljes mértékben meggátolt. Ugyanakkor ebben a vizsgálatban sikerült kimutatni a korai erythroid előalakokon AT_1 receptort is, mely egyértelmű bizonyítékát és magyarázatát is adta a hatásmechanizmusnak.

Az Ac-SDKP (N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-prolin) tetrapeptid egy természetes gátlója a pluripotens hematopoietkus őssejteknek. Azizi M és munkatársai által közölt vizsgálatukban (Azizi M és mtsai 1996) kimutatták, hogy ezt a tetrapeptidet hidrolízis során az ACE enzim lebontja. Egészséges emberekben az ACE gátló (50 mg kaptopril) alkalmazása lényegesen, akár négy-ötszörös mértékben megemelte a plazmában mérhető Ac-SDKP szintet a gyógyszer nélküli állapothoz képest. In vitro körülmények között a kaptopril szinte majdnem teljes mértékben, 90 - 99 százalékban képes volt megakadályozni az Ac-SDKP hidrolízisét. Ezt az összefüggést néhány évvel később krónikus veseelégtelenségben szenvedőkön is sikerült kimutatni. Azokban a betegekben, akik ACE gátló kezelésben részesültek, a szérumban mérhető Ac-SDKP szint szignifikánsan magasabb volt. Az emelkedés mértékét a korábbi vizsgálatban találthoz hasonlónak, négyszeres mértékűnek találták. Ráadásul a kontroll csoporthoz képest a hemodializált betegekben az Ac-SDKP fél életideje szignifikánsan csökkent, míg ezt a szignifikáns mértékű csökkenést nem lehetett kimutatni a dialízis kezelésre még nem szoruló vesebetegekben. Végül a hemodializált és ACE gátló kezelésben részesülő betegekben az Ac-SDKP szint és a betegek rHuEPO heti dózis igénye között összefüggést mutattak ki. Mindezek az eredmények alapján a kutatási eredményt megíró szerzők megállapították, hogy az Ac-SDKP egy erythropoietin rezisztencia faktornak tekinthető, hiszen a szerepe fontos lehet az erythropoiesis folyamatában (Le Meur Y és mtsai 2001).

Az erythropoietin termelés és az angiotenzin-II közötti lényeges kapcsolatra más kutatócsoportok által végzett munkák is rámutattak. Kutyákon és egereken végzett vizsgálat során azt találták, hogy angiotenzin-II infúzió hatására nemcsak az artériás vérnyomás emelkedett meg, hanem csökkent a vese vérátáramlása, és következményesen nőtt az erythropoietin plazmában mérhető koncentrációja

(Fisher JW és mtsai 1967). Az észlelt eredmények jól érthetőek, hiszen az erythropoietin termelést a vesében elsősorban az oxigén hiánya indítja be, ami minden bizonnyal jelentkezik a vese vérátáramlásának romlásakor. Ezeket az eredményeket későbbi vizsgálatok emberben is megerősítették. Egészséges önkénteseknek adtak 28 napon keresztül ACE gátló hatóanyagokat (enalapril és kaptopril) és a vizsgáltakban mérték többek között a plazma erythropoietin koncentrációt, hemoglobin szintet és a vörösvértest számot is. Mind a két gyógyszer szignifikáns mértékű erythropoietin szérum koncentráció csökkenést eredményezett, ami a gyógyszerek elhagyását követően visszatért a kiindulási értékre (Pratt MC és mtsai 1992). Néhány évvel később egy másik munkacsoport már egy nagyobb számú (n = 72) egészséges önkéntes részvételével végezett el egy hasonló vizsgálatot. A vizsgálati alanyok angiotenzin-II hatóanyagot kaptak intravénásan, és emellett placebo, ACE gátlót (kaptopril) és AT_1 receptor blokkolót (losartan). Az eredmények alapján ebben a vizsgálatban is megállapításra került, hogy az angiotenzin-II képes növelni emberben az erythropoietin szintet. Ugyanakkor csak az AT_1 receptor blokkoló volt képes ezt a növekedést meggátolni, míg az ACE gátlás nem. A szerzők közleményükben megállapítják, hogy az angiotenzin-II molekula hatása az erythropoietin termelésre nagy valószínűséggel a saját receptorán keresztül kifejtett élettani folyamatokon keresztül valósul meg (Freudenthaler SM és mtsai 1999). Gyakorlatilag ezeket az eredményeket erősítette meg pár évvel később Gossmann J és munkacsoportja (Gossmann J és mtsai 2001) is szintén egészséges önkénteseken. Angiotenzin-II infúzió hatására azonnal emelkedni kezdett a vérnyomás, ami a placebo csoporthoz képest a 3. és 6. órában elérte a szignifikáns ($P < 0,01$) különbséget. Ezzel párhuzamosan emelkedett a szérum erythropoietin szint is, mely elérte a szignifikáns értéket ($P = 0,01$) az infúzió kezdetétől számított 6. és a 12. órában, majd a szérumszint 24 óra eltelte után normalizálódott. Amikor a vizsgálati alanyokat AT_1 receptor blokkolóval (valsartan) előkezelték, az angiotenzin-II infúzióra nem következett be a vérnyomás emelkedése és a szérum erythropoietin szintjének növekedése sem.

A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer és az erythropoiesis közötti kapcsolatot bizonyítja a poszttranszplantációs erythrocytosis (PTE) jelensége is. Transzplantált betegekben egészséges emberekhez képest az erythroid előalakok (BFU-E) felszínén megnövekedett AT_1 receptor denzitást lehet mérni. Ezt az

emelkedést azonban az erythrocitózist nem mutató veseátültetésen átesett betegekben nem észlelték (Gupta M és mtsai 2000). Ugyanakkor a PTE tüneteit mutató transzplantált betegek ACE gátló kezelésével csökkenthető a hematokrit, mellyel párhuzamosan az erythroid előalakok apoptózisának növekedését is megfigyelték. Az ACE gátlás vérképzésre kifejtett hatásmechanizmusában felvetették az IGF-1 (insulin-like growth factor-1), vagy az IGF-BP3 (IGF-binding protein 3) fehérjék szerepét is, hiszen a PTE jeleit mutató vesebetegekben az ACE gátlás hatására csökkent az IGF-1 szint is (Glicklich D és mtsai 2001). Ezt az elképzelést vetette fel a kérdést kutató korábbi vizsgálat is, melyet egy másik munkacsoport végzett (Morrore LF és mtsai 1997). ACE gátló kezelésre a vizsgáltakban jelentős erythropoietin és IGF-1 csökkenést tapasztaltak, mely utóbbi direkt kapcsolatot mutatott a hematokrit szinttel. Ezt a direkt kapcsolatot ugyanakkor nem találták meg az erythropoietin koncentrációval kapcsolatosan. Az itt bemutatott vizsgálati eredmények megfelelnek a klinikai megfigyelésekből származó tapasztalattal is, és ennek megfelelően a RAAS gátlás széles körben elfogadott kezeléssé vált a PTE tüneteit mutató transzplantált betegek kezelésében (Julian BA és mtsai 1998; Usulan C és mtsai 1998). Egy munkacsoport az angiotenzin-II receptor aktiváció után elindított jelátviteli rendszereket kutatta (Marrero MB és mtsai 1995). Eredményeik szerint az AT_1 receptor aktivációja a tirozin gyors foszforilációját indítja el az intracelluláris Jak2 (Janus kinase 2) és Tyk2 (tyrosine kinase 2) kinázokban patkány aorta simaizom sejtjeiben. Ennek eredményeként a Jak2 aktivitása megnő, ami esetleg más citokinek által kiváltott jelátviteleket is elindíthat. Az erythropoietin saját receptorához való kapcsolódáskor szintén a Jak2 foszforilálódik (Elliott S és mtsai 2008), így elképzelhető az AT_1 és EPO receptorok aktivációja által kiváltott intracelluláris jelátvivő rendszerek összetalálkozása, vagy szinergizmusa is (Mrug M és mtsai 2004). Ezt az elképzelést azonban még nem sikerült bizonyítani, és további kutatásokra van szükség a kérdés megválaszolása érdekében.

Számos klinikai vizsgálati eredményt közöltek, melyekben a RAAS gátlás és az erythropoiesis közötti kapcsolatot vizsgálták. A vizsgálatok nagyobbik részében a gátlás hatására krónikus vesebetegekben fokozódott az anémia, vagy nagyobb erythropoietin pótlást igényeltek a betegek, és nőtt az erythropoietin rezisztencia (Albitar S és mtsai 1998, Ertürk S és mtsai 1999, Mora C és Navaro JF 2000, Odabas

AR és mtsai 2003, Nakamoto H és mtsai 2004). Másik oldalról viszont néhány közlemény arról adott hírt, hogy a kutatók nem találtak összefüggést a dializált krónikus veseelégtelenségben szenvedők vizsgálata során a RAAS gátlás és az erythropoiesis között (Cruz D és mtsai 1996, Charytan C és mtsai 1998). A klinikai vizsgálati eredmények további csoportja viszont az ACE gátlás és az AT_1 receptor blokkolás hatására eltérő eredményt talált a vérképzésre vonatkozóan. Míg Inoue A és munkatársai (Inoue A és mtsai 2008) diabeteses vesebetegek körében végzett vizsgálatukban az AT_1 receptor gátlás mellett talált szignifikáns hemoglobin csökkenést, addig az ACE gátlás mellett nem észleltek szignifikáns csökkenést. Egy másik obszervációs vizsgálatban (Ajmal A és mtsai 2013), amelybe diabeteses, szívelégtelenségben, vagy magasvérnyomásban szenvedő 701 betegeket vontak be, az előbbi vizsgálattal ellentétes eredményt találtak. Azok a betegek, akik ACE gátlásban részesültek alacsonyabb hemoglobin értéket mutattak, mint az AT_1 receptor blokkolóval kezeltek. Gyakorlatilag az AT_1 blokkoló kezelés indítását követően a betegek hemoglobin értéke változatlan maradt. Vesebetegségben szenvedőknél egyik kezelési mód sem mutatott szignifikáns összefüggést a hemoglobin csökkenésével, mely eredményt a szerzők a viszonylagos jó vesefunkció megtartottsággal magyaráztak. Ezt megelőzően hasonló eredményt talált végstádiumú veseelégtelenségben szenvedő betegek vizsgálatakor egy német kutatócsoport (Schiffl H és Lang SM 1999) is.

Tehát az élettani folyamatok több pontján jól érthető mechanizmusok révén a RAAS rendszer befolyásolja a vérképzést, amelyre támogató klinikai adatok is rendelkezésre állnak. Ugyanakkor nem mindegyik klinikai vizsgálat tudta igazolni az itt bemutatott feltételezéseket. Az egymásnak ellentmondó vizsgálati eredmények és nyitott kérdések megválaszolásra várnak, melyhez további klinikai és experimentális vizsgálatokra van szükség.

3.11. Az ACE gén I/D polimorfizmusa és hatása a vérképzésre

A RAAS rendszer egyik meghatározó eleme az angiotenzin konvertáló enzim, mely az előanyagból az angiotenzin-II molekula átalakítását végzi. Ez az egyébként élettani szabályozás alatt nem álló fehérje, mint a RAAS rendszerben lezajlódó kaszkád utolsó katalizáló eleme, felelős a RAAS rendszerhez kapcsolható

számos élettani funkcióért. Az enzim megtalálható endothel és számos epithel sejt membránjához kötve különböző szövetekben, de szabadon a keringésben is előfordul, melynek aktivitása jól mérhető. Azért is fontos az ACE enzim koncentrációja, vagy aktivitása, hiszen nagymértékben meghatározza az angiotenzin-II jelenlétét a szervezetben. Egy egyeden belül az enzim szérumban mérhető aktivitása meglehetősen állandó, viszont igen erős az emberek közötti eltérés, mely felvetette az enzimet meghatározó gén polimorfizmusának lehetőségét. A vizsgálatok az ACE enzimet meghatározó genetikai szakaszban több polimorfizmust is leírtak, de ezek közül az egyik legjobban vizsgált és az egyik legnagyobb klinikai jelentőségű az I/D (inszerció/deléció) polimorfizmus, melyet Rigat és munkacsoportja közölt először egy közleményükben (Rigat B és mtsai 1990). Az I/D polimorfizmus jelentősége abban is van, hogy a D/D genotípusú egyedekben az ACE aktivitás megközelítőleg kétszer nagyobb az I/I genotípusú emberekben mérhetőnél, míg az I/D genotípusú heterozigóták ACE aktivitása arányosan a másik két genotípus közé esik. Az inszerció, illetőleg deléció azt jelenti, hogy az enzimet meghatározó gén szakaszban a 16-os intronban 287 bázis pár jelen van, vagy hiányzik. Egy munkacsoport (Aucella F és mtsai 2000) által közölt vizsgálat szerint a genotípusok gyakoriságát a végstádiumú veseelégtelenségben szenvedő kaukázusi típusú betegek között nem találta eltérőnek az egészséges kontrollokhoz képest. A legritkábban az I/I genotípus fordult elő, mely megegyezik a saját munkacsoportunk (Kiss I és mtsai 2014) egyik korábbi vizsgálatában feltártakkal, és más európai munkacsoportok (van Der Sman-de Beer F és mtsai 2005) eredményével is. A polimorfizmus élettani és kórélettani folyamatokban játszott szerepét több kutatócsoport is vizsgálta, de az eredmények nem egymást támogatóak voltak. Ezért ma a legelfogadottabb nézet szerint az ACE gén I/D polimorfizmusának van hatása a szervezet működésében, de ezeket egyéb meghatározó faktorok jelentősen befolyásolhatják (Judith A és Scholey JW 2004). Ezt a véleményt támasztja alá saját munkacsoportunk (Kiss I és mtsai 2014) vizsgálati eredménye is. 10 éves prospektív után követés során dializált krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegek között nem találtunk a halálozásban különbséget a különböző I/D genotípusú betegek között. Azonban az ACE gátlót nem kapók csoportját elemezve, ahol a genetikai hatást nem zavarta a farmakológiai ACE gátlás, a D/D genotípusúak halálozása szignifikánsan (P = 0,04) magasabb volt az I/I genotípusúakhoz képest. A D/D genotípusúak

alcsoportjában az ACE gátló kezelés szignifikánsan (P = 0,03) jobb életkilátással párosult.

A polimorfizmus és a vérképzés hatását is több munkacsoport vizsgálta. A téma kutatása érthető, hiszen az ACE gén polimorfizmusa befolyásolja az angiotenzin-II jelenlétét a szervezetben, és ez utóbbi anyag szerepe a vérképzésben többszörösen is bizonyítást nyert. A D/D genotípushoz tartozó erőteljesebb ACE aktivitás alapján jól érthető a korábbi kutatók feltételezései, hogy ebben a betegcsoportban egy erythropoiesist serkentő hatást találnak az I/I genotípusú csoporthoz képest. Két munkacsoport is vizsgálatokat folytatott peritoneálisan dializált vesebetegek bevonásával. Sharples EJ és munkacsoportja (Sharples EJ és mtsai 2006) 112 vesebeteget vizsgált, és azt találta, hogy az I/I és I/D genotípusú csoportban a megfelelő hemoglobin fenntartása érdekében szignifikánsan magasabb rHuEPO dózist kellett alkalmazniuk. A dózis és a genotípus közti összefüggés szignifikáns (P < 0,05) mértékű volt a többváltozós elemzésben is. Egy másik munkacsoport (Varagunam M és mtsai 2003) 46 transzplantációs várólistán lévő peritoneálisan dializált krónikus vesebeteget vizsgált. Eredményeik alapján kijelentették, hogy az I/I és I/D genotípusú betegcsoportban egy kevésbé jó erythropoietin választ kaptak. A D/D genotípusú csoportban szignifikánsan (P < 0,05) kevesebb ESA adagolás vált szükségessé a megfelelő hemoglobin elérése érdekében. 167 hemodializált beteg bevonásával végzett vizsgálatban (Jeong KH és mtsai 2008) a D/D genotípus a többváltozós regressziós modellben szignifikáns (P = 0,004) meghatározója volt az erythropoietin rezisztencia indexnek. A szerzők felhívják a figyelmet az ACE gén I/D polimorfizmusára, mely az a faktor lehet, ami előre jelezheti a szükséges erythropoietin mennyiséget. Érdekes összefüggést tárt fel egy vizsgálat (Jimeno L és mtsai 2005), amelybe 21 PTE tüneteit mutató transzplantáltat vontak be, majd követték 1 éven keresztül. Az ACE gátlás (enalapril) a hematokrit értékének folyamatos és szignifikáns csökkenését eredményezte, melynek legmélyebb pontját a vizsgálat végén találták, és a legerősebb hematokrit csökkenést a magasabb IGF-1 szintű betegekben mutatták ki. Bár az IGF-1 szint nem változott az enalapril kezelés megkezdését követően, mégis a kiinduló érték szignifikáns (P < 0,025) összefüggést mutatott a hematokrit csökkenéssel. Ez az eredmény is alátámasztja a korábbi vizsgálatok által felvetett hipotézist, hogy az ACE gátló erythropoiesisre kifejtett hatása esetleg az IGF-1 fehérjére kifejtett gátló

hatásán keresztül is létrejöhet. E mellett még azt találták, hogy az I/I genotípusú betegekben a PTE tünetei hamarabb alakulnak ki. Genotipizálást 18 betegnél végeztek el, és nem találtak különbséget a csoportok között az enalaprilra adott válaszban. Ezért a szerzők feltételezik, hogy az ACE gátlásra kialakuló esetleges anémia megjelenése mögött inkább az IGF-1 gátlása állhat. A több egybecsengő eredmény ellenére egy kutatócsoport (Hatano M és mtsai 2000) az itt felsorolt összefüggéseket nem találta. Bár vizsgálatukban az ACE gátló kezelés mellett magasabb volt a szükséges rHuEpo igény és alacsonyabb a hematokrit érték, az ACE I/D polimorfizmus és a vérképzés között nem találtak összefüggést.

Az Értekezés bevezető részében elhangzottak kellőképpen alátámasztják az erythropoietin rezisztencia fontosságát krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegekben. Továbbá az ismertetett kutatási eredmények egyértelműen bizonyítják, hogy a rezisztencia mögött számos, ma még részben ismeretlen okok húzódnak meg. Ezek közül az ebben a munkában egymással erősen összefüggésben lévő, és a saját kutatásokhoz kapcsolódó három téma került részletezésre.

Először is nyilvánvaló, hogy a vérképzés egyik alapköve az erythropoietin, melynek bemutatása fontos a téma megértése szempontjából. Különösen fontos klinikai jelentősége van annak, hogy ma már számos ESA készítmény létezik, melyeknek molekuláris szerkezete, még ha csak kismértékben is, de eltér egymástól. Ebből adódóan eltérőek a különböző analógok farmakológiai paraméterei, melyek maguk után vonják az eltérő alkalmazást is. Bár az erythropoietin pótlás alapelvei krónikus veseelégtelenségben azonosak, mégis a kezelés egyedi megközelítése jelentősen javíthatja a terápiás sikert.

A másik két téma a D-vitamin anyagcsere és a RAAS rendszer, melyek között szoros kapcsolat található és ezen kívül jelentősen befolyásolják az erythropoietin hatását, illetve hatással bírnak a vérképzésre. Létezik egy inverz összefüggés a szérum D-vitamin koncentráció és a plazma renin szint között, melynek következtében számos élettani folyamat függ a két paraméter kapcsolatától a szervezetben. A molekuláris mechanizmusa a kapcsolatnak a D-vitamin genetikai hatásában rejlik, mely során a D-vitamin és D-vitamin-receptor komplex meggátolja a cAMP-response element-biding protein komplex kialakulását a renint meghatározó gén promoter régiójában, és ennek

következtében a renint meghatározó gén expressziója nem történik meg. Következményesen változik a szérum renin szintje és ennek eredményeként az angiotenzin-II koncentrációja. Ez utóbbi fehérjének a bevezetőben részletezett számos élettani szerepe van, beleértve a vérképzésben betöltött fontos funkcióját is. Ezen túlmenően léteznek vizsgálati eredmények arra vonatkozólag is, hogy a D-vitamin a renin expresszión kívül csökkenteni tudja az angiotenzinogén, renin receptor, AT_1 receptor és a vaszkuláris endotéliális növekedési faktor expresszióját is. További kutatások vetik fel a RAAS rendszer részét képező aldoszteronnak és a D-vitaminnak a kapcsolatát is (Santoro D és mtsai 2015).

Összességében a három kutatási terület azért is került kiválasztásra ebben a munkában, mert ezek mindegyike külön-külön is hatással van a vérképzés folyamatára, és egymás hatásának meghatározóiként közösen is befolyásolják azt. Végül, bár nem utolsó sorban, mind a három tudományos téma kapcsolatban van a saját, az Értekezés témáját szolgáló kutatásokkal.

4. CÉLKITŰZÉS

Az itt bemutatásra kerülő munkáknak a célja az volt, hogy a klinikai gyakorlatból származó adatok elemzésével további részletekkel járuljak hozzá a D-vitamin és az angiotenzin konvertáló enzim (ACE) gátlás és ACE gén I/D (inszerciós/deléciós) polimorfizmusának, valamint a két utóbbi faktor együttes hatásának a dializált krónikus vesebetegek vérképzésében, illetve az erythropoietin rezisztenciájának létrejöttében betöltött szerepéhez. További cél volt, hogy bemutassam a rekombináns géntechnológiával előállított erythropoietin molekulák (ESA) fejlesztésének történetét és ezen túlmenően azok különböző szerkezetéből adódó eltérő farmakokinetikai és farmakodinamikai különbségeit, és tovább fejlesszek egy elméleti modellt, mely egyszerűen szemlélteti a különböző faktorok együttes hatását a hatásosságra. Ezeknek a céloknak a fontossága abban is kereshető, hogy a megfelelőképpen alkalmazott ESA és az erythropoiesisben szerepet játszó faktorok pontosabb ismerete feltételezhetően hozzájárul a hatékonyabb vérképzéshez és csökkentheti az esetleges erythropoietin rezisztencia mértékét. A saját kutatási eredmények bemutatása ebben a munkában, azok megjelenésének sorrendjében történik.

4.1. Az ESA molekulák bemutatása, valamint a farmakokinetikájuk és farmakodinamikájuk közti kapcsolatot bemutató modell tovább fejlesztése

A munka elsődleges célja volt, hogy bemutatásra kerüljön a biotechnológiai úton előállított rekombináns human erythropoietin (rHuEpo), a különböző erythropoietin hatóanyagok (ESA) fejlesztései, a szénhidrát és sziálsav tartalom jelentősége, és az ESA hatóanyagok sajátos strukturális különbözőségei, valamint a különböző szerkezetből adódó eltérő farmakokinetika és farmakodinamika. Továbbá rá kívántam irányítani a klinikusok figyelmét elsősorban az ESA molekula felezési ideje és a receptorához való kötődésének erőssége közötti kapcsolatra, mely együttes hatásnak farmakodinamikát meghatározó szerepe van. Az adagolt ESA dózisa mellett a molekulákra jellemző két említett paraméter (felezési idő és receptorhoz való affinitás) együttes hatásának szemléltetését a hatásosságra, következményesen az esetleges erythropoietin

rezisztenciára egy elméleti matematikai grafikus modell megalkotásával kíséreltem meg szemléletessé tenni munkatársaim segítségével. A modell alapjául egy korábbi felvetés szolgált, melyet a minimális hatékony koncentráció ESA hatóanyagonként való változásával egészítettem ki. Mindezzel az is célom volt, hogy a korábban javasolt minimális hatékony EPO koncentráció elméletét tovább szélesítsem és magyarázó ábrával érthetőbbé tegyem a gyógyítás területén és a kutatásban dolgozó kollégák számára.

4.2. A D-vitamin hiány és az erythropoietin rezisztencia közötti kapcsolat bizonyítása

Ennek a vizsgálatnak az elsődleges célja az volt, hogy további bizonyító erejű klinikai tényeket tárjak fel a D-vitamin alapvető szerepével kapcsolatosan a vörösvértest előalakok érési folyamata során szerepet játszó gének transzkripciójában. A hipotézisre az vezetett, hogy az egymástól jelentősen eltérő megbetegedésekben a D-vitamin hiány rizikófaktorként szerepelhet. A korábban más munkacsoportok által végzett idevonatkozó néhány in vitro és in vivo vizsgálat eredménye alapján felvetettem, hogy lényeges szerepe lehet a D-vitamin ellátottságnak a vörösvértest előalakok gének által szabályozott differenciálódási folyamatában is. Bizonyítani kívántam, hogy a renális anémia ESA kezelése során a D-vitamin-hiány erythropoietin rezisztencia faktorként szerepel. Feltételezésem bizonyítására dializált krónikus vesebetegek adatbázisát használtam, hogy a meglévő adatok elemzéséből megerősítsem a D-vitamin ellátottság, a Hb szint és az erythropoietin rezisztencia mértékének lényeges kapcsolatát.

4.3. Az ACE gén I/D polimorfizmus, az ACE gátlás, illetve közös hatásuk vizsgálata a renális anémia kialakulásában

A vizsgálat célja volt, hogy megkíséreljem a korábbi ACE gátlás és ACE gén I/D polimorfizmus, valamint erythropoiesis összefüggéseivel kapcsolatos vizsgálatok egymásnak ellentmondó eredményei mögötti okokat jobban feltárni és ezekre magyarázatot találni. Ennek érdekében vizsgáltam dializált krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegekben azt a kérdést, hogy az ESA kezelés

hatásossága függ-e az ACE genetikai I/D polimorfizmusától, és az ACE farmakológiai gátlásától, valamint e két hatás együttesen is hogyan befolyásolja az erythropoietin rezisztenciát. Tisztázni kívántam azt a feltételezést, hogy a különböző ACE aktivitás eltérően befolyásolja-e a vérképzést és az ACE gén I/D polimorfizmus által kifejtett genetikai hatást módosíthatja-e az ACE farmakológiai gátlása. Ezeknek a kérdéseknek a megválaszolása céljából indítottam egy meglévő adatbázisnak a statisztikai elemzését, mely munka eredményével azt is bizonyítani kívántam, hogy az itt említett paraméterek vérképzésre kifejtett hatását csak ezek együttes ismeretének figyelembevételével lehet teljes mélységében értékelni.

5. MÓDSZEREK

5.1. Az EPO molekula és különböző ESA készítmények szerkezetének hatása a farmakodinamikai tulajdonságokra

Az ESA molekulák szerkezetbeli, farmakokinetikai és farmakodinámiás különbségeinek bemutatásához korábbi, nemzetközi kutatások eredményeit használtam fel. A PubMed portálon irodalomkutatást végeztem a vese eredetű vérszegénységgel kapcsolatosan a következő kereső szavakkal: „Red blood cell (RBC), Biological activity, Erythropoietin (EPO), Erythropoiesis-stimulating agent (ESA), Recombinant human erythropoietin (rHuEpo), Carbohydrate, Sialic acid, Darbepoetin alfa, Glycoengineering, Biosimilar, Follow-on Biologics (FOB), erythropoiesis". Irodalomkutatás során fontos szempont volt a legtöbbet idézett és a témákban az először megjelent, vagy legmeghatározóbb munkák figyelembe vétele. Ezt követően a talált közleményekre támaszkodva rövid és lényegre törő, a klinikai orvosok számára is érthetően kívántam összefoglalni a vérképzés folyamatát, és abban az erythropoietin szerepét. A különböző ESA készítmények kutatásának történetét, és azok szerkezetére, hatására vonatkozó állításokat is a nemzetközi irodalomban megjelent közlemények alapján állítottam össze egy összefoglaló jellegű közleményben. Ugyanitt egy grafikus elméleti modellt alakítottam ki munkatársaimmal, melynek segítségével világítottuk meg az EPO felezési ideje és a receptorhoz való affinitásának kapcsolatát a gyógyszerhatásosságára vonatkozóan. Az elkészült modell a korábban javasolt minimális küszöbkoncentráció elvére épült, melyet először Besarab A és mtsai (Besarab A és mtsai 1992) 1992 évben közöltek.

5.2. A D-vitamin hiány, mint erythropoietin rezisztencia faktor

A D-vitamin vérképzésre és az erythropoietin rezisztenciára kifejtett hatását, illetve kapcsolatát 142 hemodializált végstádiumú vesebeteg adatbázisának elemzése tette lehetővé. Az adatbázis egy beavatkozás nélküli, retrospektív, egy vizsgálati centrumból (Semmelweis Egyetem I. sz. Belgyógyászati Klinika, Budapest) származó

megfigyeléses vizsgálatból származik, amelybe 1999 és 2004 év között, legalább 3 hónapon keresztül krónikusan dializált betegeket vontak be. Első körben kiválasztásra került összesen 227 potenciális beteg, akik közül 85 beteget ki kellett zárni, mert nem állt rendelkezésre az egyszeri keresztmetszeti adatgyűjtéskor az összes elemzésre szánt adat. A demográfiai adatokon túl beválasztási kritérium volt, hogy rendelkezésre álljanak a következő adatok: vas háztartással kapcsolatos laboratóriumi mutatók, szérum intakt parathormon (iPTH) értéke, 25-hidroxi-kolekalciferol ($25(OH)D_3$) szérum értéke, ESA dózisa, hemoglobin szint, szérum albumin koncentráció, valamint a dialízis minőségi mutatója, az eKt/V érték. Ezek a klinikai információk és a diabetes mellitus esetleges megléte korábban a dialízis során használt kórlapokból származnak. Kizárásra kerültek azok a betegek is, akik aktív hepatitisben szenvedtek és azok is, akik kevesebb, mint három hónapja részesültek dialízis kezelésben. Amennyiben egy betegnek több időpontban is rendelkezésre állt a teljes vizsgált paraméterek sora, egységesen minden esetben az adatbázisban lévő első alkalomnál található adatok kerültek elemzésre. Végül az itt leírt szempontoknak 142 beteg felelt meg, akiknek az adatai bekerültek a végső, és közlésre kerülő analízisbe.

Az adott hét középső dialízis napján, a kezelés megkezdése előtt történtek a vérvételek, melyekből származnak a laboratóriumi eredmények. A szérum kalcium koncentrációja korrigálva volt a szérum albumin koncentrációjára. A dialízis minőségi mutatója, az eKt/V érték a második generációs Daugirdas képlettel kerültek meghatározásra. A szérum intakt parathormon koncentráció pg/ml egységben került megadásra, és laboratóriumi meghatározása a második generációs „electrochemiluminescence assay" (iPTH Elecsys System; Roche, Mannheim, Germany) (referencia határszakasz: 18–74 pg/ml egészséges felnőttekben) segítségével történtek. A D-vitamin ellátottságot a szérum $25(OH)D_3$ szint meghatározásával adtuk meg a magas nyomású folyadék kromatográfia (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Calif., USA) (referencia határok: 75–160 nmol/l) segítségével. A hemoglobin és ESA dózis igény közötti összefüggés további elemzésének céljából erythropoietin rezisztencia mértékére utaló ESA dózis/Hb hányadost alakítottunk ki, ahol a szükséges ESA havi dózist vettük alapul.

Az analízisbe bevont betegek heti háromszor részesültek dialízis kezelésben, melyhez „high-flux synthetic" dializátorokat (Fresenius F series class dialyzers;

Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Germany) használtak. Az átlagos dialízis idő alkalmanként 230 ± 25 perc volt. A vizsgálat ideje alatt minden beteg kizárólag epoetin béta hatóanyagú ESA készítményt kapott szubkután a Hb ≥ 10 g/l szint elérése érdekében. Ugyanakkor a betegek intravénás vas (ferrous gluconate) pótlásban is részesültek annak érdekében, hogy a transzferrin szaturációt 20 százalék érték felett lehessen tartani.

A Hb, EPO dózis, valamint D-vitamin ellátottság közötti kapcsolat elemzése és a bemutatott összesített adatok számítása SPSS 15.0 programcsomaggal történt. Az összesített adatokat megoszlás, átlag (±szórás), vagy medián és interquartilis távolság (IQR) értékkel mutattuk be. A betegeket a D-vitamin ellátottságuk szerint csoportosítottuk és 3 csoportot hoztunk létre (< 20 nmol/L; 20 - 40 nmol/l; > 40 nmol/l). A csoportok közötti különbségek kimutatására Pearson's X^2 tesztet használtunk a kategorikus (kvalitatív) változók esetében, míg t-tesztet alkalmaztunk a folyamatos normál változók esetében, és Mann-Whitney tesztet alkalmaztunk a folyamatos és aszimmetrikus változók esetében. A várhatóan fontos összefüggéseket folyamatos változók esetében Pearson's korrelációs koefficienssel, vagy Spearman's p módon adtuk meg, majd később többváltozós regressziós modellben teszteltük a változókat. Az összes P értéket kétoldalas tesztnek vetettük alá és az eredményeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a P < 0,05 értéket mutatott. Többváltozós lineáris regressziós modellt használtunk, hogy megállapítsuk a Hb és az ESA dózis/Hb hányados független prediktorait. A kétváltozós analízisben szignifikánsnak és majdnem szignifikánsnak (P < 0, 1) mutatkozó prediktorokat többváltozós modellben tovább vizsgáltuk, ahol még további paraméterek (életkor, nem, és cukorbetegség) jelenlétét is bevontunk az analízisbe, hogy erősítsük a modellt. A többváltozós modellben a „variancia influence" faktor használatával is vizsgáltuk a független változók közötti kolinearitást.

5.3. Az ACE gén I/D polimorfizmus, ACE gátlás és közös hatásuk a renális anémia kialakulásában

A vizsgálat elrendezése multicentrikus (11 hazai B.Braun Avitum Hungary Zrt. dialízis hálózathoz tartozó centrum), egyszeri, keresztmetszeti adatgyűjtés, mely a B.Braun Avitum Hungary Zrt Dialízis Hálózatának ACEGENE-BB_HU elnevezésű

kutatása volt. Az adatbázis egyszeri, keresztmetszeti adatgyűjtésből származik, mely 1997 évben történt. Összesen 716 kaukázusi típusú beteg került bevonásra, akik legalább 3 hónapja krónikus dialízis kezelésben részesültek, és beleegyezésüket adták a genetikai vizsgálat elvégzéséhez. Az elemzésekből 56 beteget kizártunk különböző hematológiai státuszt érintő betegségek (súlyos májbetegség, adatgyűjtés pillanatában rosszindulatú daganat, vérzés, vagy hematológiai megbetegedés) miatt, hogy ne befolyásolják a vérképzéssel kapcsolatos eredményeket. Így 660 beteget csoportosítottunk a genotípusa (I/I, I/D, és D/D) alapján, majd a csoportok összesített adata került statisztikai elemzésre. Az összefüggések pontosabb feltárása érdekében további másodlagos elemzéseket végeztünk. Ehhez illesztett párokat alkottunk az I/I és a D/D genotípusú betegekből. Ebből az elemzésből a heterozigóta I/D genotípusú betegeket kihagytuk. Az illesztett párokat a következő paraméterek egyezése, illetve hasonlósága alapján készítettük el: nem, életkor, diabetes, ACE gátló kezelés megléte, és a dialízis idő hasonlósága (kevesebb, mint 12 hónap; 12 - 35 hónap; 36 - 59 hónap; több mint 60 hónap). E paraméterek mentén sikerült 127 párt alkotni, mely két csoport (I/I vs. D/D) adatait összehasonlítottuk, és összefüggéseket kerestünk. Nem törekedtünk arra, hogy az életkor teljesen megegyezzen az illesztett párok esetében, mert a statisztikai elemzések az életkort a hemoglobin meghatározójaként nem találta szignifikánsnak. Ugyanakkor törekedtünk az életkori hasonlóságokra is, bár az azonosságot nem tudtuk biztosítani. Ennek eredményeként az esetek 90 százalékában a párok életkora hasonlónak ítélhető (± 15 év), míg 10 pár esetében az életkori különbségek nagyobbak voltak (16 - 39 év).

A dializált betegek kórlapjából a következő adatok kerültek gyűjtésre: életkor, nem, az első dialízis óta eltelt idő, a végstádiumú veseelégtelenség oka, diabetes jelenléte, ACE gátló kezelés alkalmazása, és a rHuEPO havi dózisa.

A demográfiai és laboratóriumi adatokon kívül az ACE gén I/D polimorfizmus meghatározásához EDTA csőbe, dialízis kezelés megkezdése előtt vett perifériás vérből, és fehérvérsejtekből származó DNS izolátum készült, mely standard és nem enzimatikus genotipizálásra került. Az erythropoietin kezelések kizárólag epoetin alfa hatóanyaggal történtek. Az adatok elemzésekor figyelembe vettük az ACE gátló kezelés meglétét is. Az erythropoietin rezisztencia index (ERI) számításához a havi alkalmazott rHuEPO készítmény dózisa és a hemoglobin érték hányadosát vettük alapul.

A normál eloszlású paramétereket átlag (±szórás) értékekben adtuk meg. A nem normál eloszlású adatok jellemzésére, mint például az alkalmazott rHuEpo dózisa, a dialízis kezelés időtartama, és az ERI érték esetén medián (Q1 – Q3: alsó és felső kvartilisek) értékekben kerültek közlésre. A kialakított két egymástól független csoportok közti különbségek tesztelésére a következő módszerek kerültek alkalmazásra: Student's t-test, Mann-Whitney test. A különböző genotípusok (I/I, I/D, és D/D) összehasonlítására ANOVA (analysis of variance) (a post hoc elemzésre Tukey's tesztet alkalmaztunk) vagy Kruskal-Wallis tesztet a folyamatos változók esetében és z-tesztet a kategorikus változók esetében alkalmaztunk. A hemoglobint, mint függő változót többváltozós és egyváltozós lineáris regressziós modellben, és kovariáns modellként, a GLM (General Linear Model) elemzésével teszteltük. Az illesztett párok összehasonlítására (I/I versus D/D) függő mintás t-tesztet, vagy Wilcoxon illesztett pár tesztet használtunk, ahogyan azt az adatok elemzése megkövetelte. Az itt leírtaknak megfelelően kialakított genotípus szerinti csoportok adatait statisztikailag a STATISTICA (verzió 10, Tulsa, Oklahoma, USA) programmal elemeztük.

A statisztikai elemzésbe bevont összes beteg írásban beleegyezését adta a genetikai teszteléshez és egészségügyi adatainak gyűjtéséhez. A vizsgálatot a helyi és a központi etikai bizottság is engedélyezte. A vizsgálatot az Országos Tudományos Kutatási Alapprogram (OTKA, TO23927) és a B.Braun Avitum Hungary Zrt Dialízis Hálózata támogatta. A vizsgálat lefolytatása a Helsinki deklaráció szellemében zajlott.

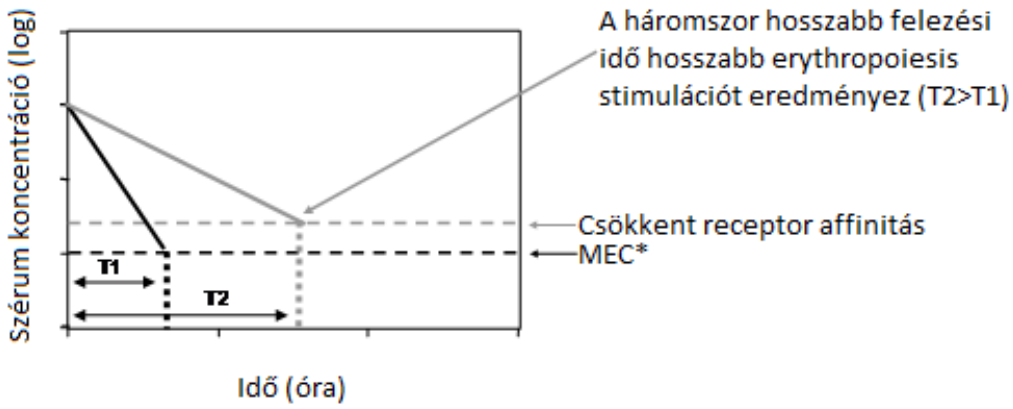
6. EREDMÉNYEK

6.1. Az ESA készítmények és a továbbfejlesztett farmakodinamikai modell

Összefoglaló munkánkban bemutattuk az erythropoiesis folyamatát és ebben külön hangsúlyoztuk az EPO alapvető szerepét a vérképzésben, valamint a farmakokinetikát meghatározó faktorok közül külön részleteztük a glikolizáltságnak, a sziálsav mennyiségének és a pegilációnak a szerepét. E mellett részleteztük az EPO nem vörösvértest érésére kifejtett, és feltételezett egyéb hatásait, valamint a biotechnológiai úton előállított EPO készítmények fejlesztésének történetét. Munkánk során külön kiemeltük, hogy az exogén EPO kiváltotta vérképzés erőssége függ a gyógyszer mennyisége mellett a kiürülés sebességétől, mely utóbbi, hasonlóan más gyógyszerekhez, jelentősen befolyásolja az adagolás gyakoriságának szükségességét. Összefoglaló közleményünkben felhívtuk a figyelmet arra, hogy a hatásosság, illetve a klinikai alkalmazás szempontjából egy konkrét EPO készítménynél egy további tényezőt is figyelembe kell vennünk, a receptorhoz való affinitás mértékét. Ugyanis a különböző ESA készítményeknek különböző az EPO receptorhoz való affinitása, következményesen más szérum erythropoietin koncentrációnál található a minimális hatékony küszöbkoncentráció, ami szintén alapvetően határozza meg a készítmény hatásosságát és az alkalmazás részleteit.

Az erythropoietin által serkentett vérképzés erősségét meghatározó 3 alapvető tényező (dózis, felezési idő és minimális hatékony küszöbkoncentráció) együttes hatását grafikonok segítségével szemléletessé is tettünk. Ezeken az ábrákon az újdonságot az jelenti, hogy a különböző ESA készítmények változó EPO receptorhoz való affinitása miatt a minimális hatékony ESA szérum koncentráció szintje is változik. Azaz minél kisebb egy ESA készítmény EPO receptorhoz való kötődése, annál magasabb a küszöbkoncentráció. Az első ábrán (1. ábra) látható, hogy a darbepoetin alfa esetében a lényegesen alacsonyabb receptor affinitás miatt a minimálisan hatékony küszöbkoncentráció magasabb az epoetin esetéhez képest. Azt is szemlélteti az ábra, hogy a hosszabb felezési idő miatt a darbepoetin alfa szérum koncentrációja hosszabb ideig található az emelkedett minimálisan hatékony koncentráció felett, mint az történik

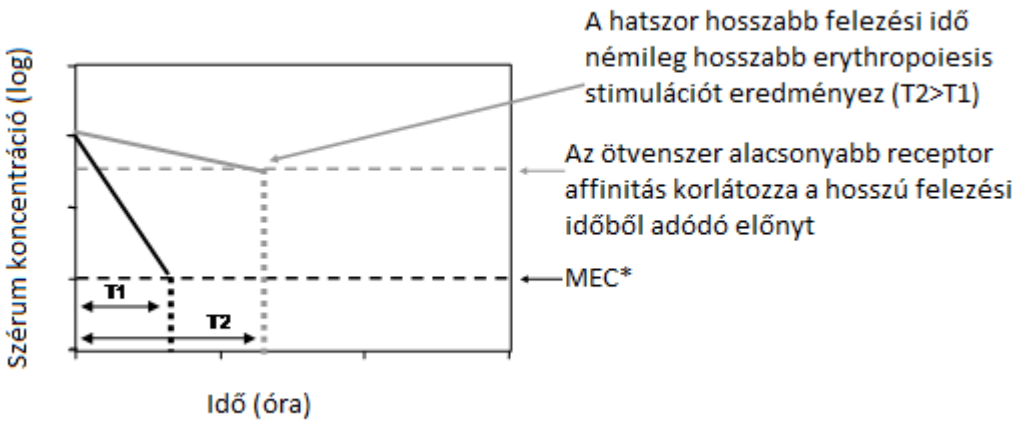
az epoetin adagolásakor. E koncentráció még biztosít annyi szabadon és megfelelő számban elérhető darbepoetin alfa molekulát, ami minimálisan elégséges egy erythroid előalakon található megfelelő számú EPO receptorhoz való kötődésre. Tehát az ábrán jól látható, hogy az emelkedett küszöbkoncentrációból adódó hátrány bőven kompenzálódik a hosszabb felezési idő által. A preklinikai és a klinikai vizsgálatok során tapasztalt darbepoetin alfa nagyobb bioaktivitás mögött rejlő farmakokinetikai okok jól érthetővé válnak a bemutatott ábra segítségével. Ugyanakkor az is jól látható, hogy a darbepoetin alfa a klinikum számára egy kényelmesebb kezelési lehetőséget nyújt, hiszen egy adott dózist követően hosszabb ideig történhet meg az erythropoiesis. Ez a tény tette lehetővé azt is, hogy az epoetin tartalmú ESA készítményekhez képest a darbepoetin alfa hatóanyagot ritkábban lehet adagolni.



1. ábra A darbepoetin alfa hatóanyag esetére alkalmazott modell, mely mutatja a csökkent receptor affinitást és a hosszabb felezési időt az epoetin molekulához képest. A hosszabb felezési idő több mint kompenzálja a receptor affinitás csökkenéséből adódó hatás veszteséget. (*MEC: Minimal Effective Concentration; T: felezési idő)

Bemutattunk egy másik modellt is, amely egy feltételezett hosszú hatású ESA készítmény esetén demonstrálja a gyógyszerre jellemző farmakokinetikai tulajdonságoknak az egyidejű hatását. A második ábra (2. ábra) segítségével bemutatott

modell létrehozását a pegilált epoetin béta farmakológiai tulajdonságai ihlették. A lassúbb kiürülés ebben az esetben előnyös, hiszen tovább elérhető az ESA a szérumban. A felezési idő megközelítőleg kétszer olyan hosszú, mint darbepoetin alfa esetében, viszont az EPO receptor affinitás 50 – 100 szorosan gyengébb mit az epoetinek esetében. Ez utóbbi következtében a még hatékony gyógyszer szérum koncentráció viszonylagosan magasra kerül, ami erőteljesen korlátozza a lassú gyógyszerkiürülésből adódó erythropoietikus hatást. Tehát ebben az esetben is e két tényező összesített eredőjét kell figyelembe venni a gyógyszer alkalmazása során. Amennyiben itt valaki csak a hosszú felezési időre fókuszál, és nem veszi figyelembe a magas küszöb értéket, az a klinikai gyakorlatban az erythropoietikus hatás lényeges gyengülésével is járhat.



2. ábra. Egy ESA készítmény jelentősen csökkent receptor affinitása korlátozza a hosszú felezési időből adódó biológiai aktivitásnövekedést. (*MEC: Minimal Effective Concentration; T: felezési idő)

Az ábrából az is jól érthető, hogy a túl hosszú felezési idejű ESA, az esetlegesen magasra kerülő szérum hemoglobin szint esetén nem ad lehetőséget a gyors korrekcióra, hiszen elhúzódó ideig található a készítmény a szervezetben. Ennek elkerülése céljából

esetleg alacsonyabb dózissal indulhat a kezelés, amely viszont hosszabb idő alatt teszi csak lehetővé a cél hemoglobin elérését.

A klinikai gyakorlatban az ESA készítmények hatásának megítélésekor és a helyes alkalmazásuknak érdekében érdemes a három faktoroknak az együttesen jelentkező összesített hatásával számolni. Végső soron az ESA készítmények helyes alkalmazásából adódó előnyösebb hatás hozzájárulhat az erythropoietin rezisztencia csökkentéséhez is.

6.2. A D-vitamin-hiány egy erythropoietin rezisztencia faktor

1. táblázat A vizsgáltak kiinduló összesített értékei (n=142)

	átlag/medián/%	szórás/IQR
Életkor (év)	58	15
Nem (férfi/nő)	54/46	
Diabetes	30 %	
Dialízis „vintage” (hó)	31	36
Hb (g/L)	104	14
Szérum albumin (g/L)	40	5
eKt/V	1.23	0.28
Szérum iPTH (pg/ml)	143	261
Transzferrin szaturáció (%)	40	20
EPO dózis (egység/hó)	18000	18000
ESA dózis/Hb index	179	192
25(OH)D_3 (nmol/l)	31.6	31.9

142 dializált krónikus veseelégtelenségben szenvedő beteg adata került elemzésre. A kiindulási összesített demográfiai és klinikai adatok az első táblázatban (1. táblázat) láthatóak.

A betegek átlag életkora 58±15 év, akik többsége, 54 százaléka férfi volt, és 30 százalékuk cukorbetegségben is szenvedett. A vizsgáltak átlag eKt/V értéke 1,23 ± 0,28,

a medián intakt parathormon (iPTH) értéke 143 (IQR 261) pg/ml, és a medián szérum 25(OH)D_3 értéke 31,6 nmol/l (IQR 31,9). A betegek átlag Hb szintje 104 ± 14 g/l, medián ESA dózisa 18000 (IQR 18000) egység/hó, míg a medián ESA dózis/Hb hányados értéke 179 (IQR 192) volt.

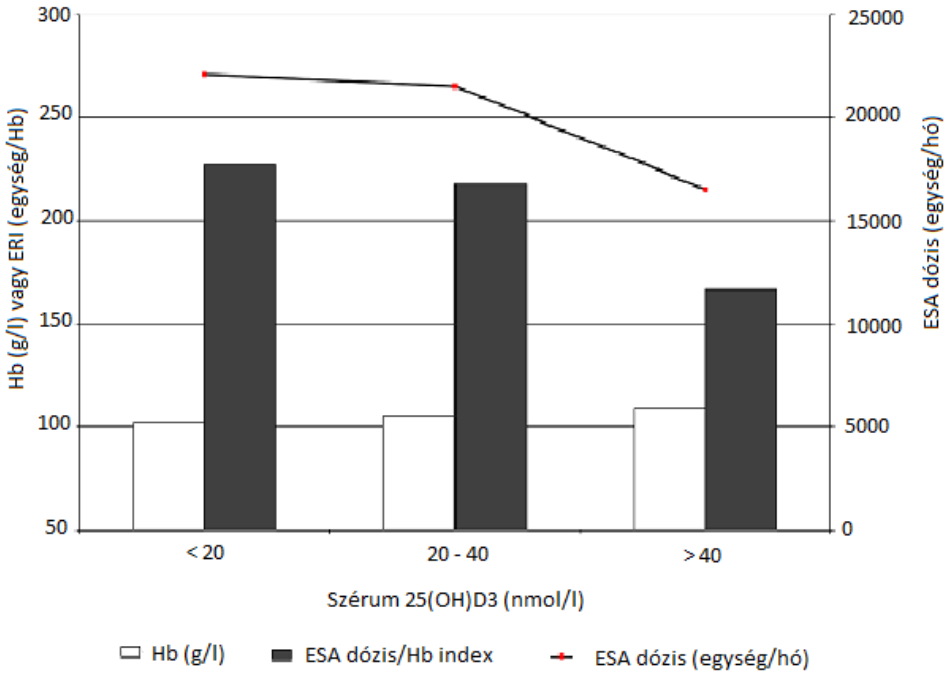
2. táblázat A szérum hemoglobin, havi ESA dózis és az ESA dózis/Hb hányados értékeinek összefüggése számos vizsgált paraméterrel

	Hb	P	EPO dózis/hó	P	ESA dózis/Hb index	P
Életkor	0.045	NS	-0.06	NS	-0.067	NS
Kt/V	-0.253	<0.01	0.014	NS	0.008	NS
Fehérvérsejt szám	0.002	NS	0.029	NS	0.038	NS
Szérum albumin	0.240	<0.01	-0.148	0.082	-0.164	0.053
Szérum iPTH	-0.127	NS	0.191	<0.05	0.084	<0.05
Transzferrin szaturáció	-0.193	0.014	-0.087	NS	-0.103	NS
Szérum ferritin	-0.121	NS	-0.050	NS	-0.028	NS
Szérum 25(OH)D_3	0.186	<0.05	-0.233	<0.01	-0.230	<0.01

A korrelációs elemzésekkel sikerült kimutatni egy szignifikáns összefüggést a szérum D-vitamin ellátottság és a szérum Hb szint ($P < 0,05$), az ESA havi dózisa ($P < 0,01$), és az ESA dózis/Hb hányados ($P < 0,01$) között. Mindezeket az összefüggéseket a második táblázat (2. táblázat) is részletesen mutatja.

További összefüggésekre is fény derült az elemzések során. A szérum hemoglobin szint ugyancsak szignifikáns összefüggést mutatott a dialízis kezelés

minőségi mutatójával az eKt/V értékkel (P < 0,01), a szérum albumin koncentrációjával (P < 0,01), valamint a transzferrin szaturációval (P = 0,014) is. Az ESA havi dózisa és az ESA dózis/Hb hányados értéke szintén szignifikáns összefüggést mutatott a szérum iPTH szinttel (P < 0,05 mindkét esetben) a D-vitamin ellátottság (P < 0,01 mindkét esetben) mellett, míg majdnem szignifikáns összefüggés látható a szérum albumin szinttel. Ugyanebben a modellben az esetlegesen fennálló fertőzés és gyulladásra utaló fehérvérsejt szám egyik vizsgált függő változóval sem mutatott összefüggést (2. táblázat).



3. ábra A szérum D-vitamin ellátottság kapcsolata a hemoglobin (fehér színű oszlopok) szinttel, az ESA havi dózisával (vonal) és az ESA dózis/Hb (fekete színű oszlopok) hányados értékével (P ≤ 0.05 mind a három összefüggésre).

A második táblázatban bemutatott összefüggések közül a szérum hemoglobin szint pozitív és szignifikáns (P < 0,05) összefüggést mutatott a D-vitamin ellátottsággal, azonban ez utóbbi fordított kapcsolatban volt az ESA havi dózisával és az ESA dózis/Hb hányados értékével (3 ábra).

A D-vitamin ellátottságot mutató 25(OH)D_3 szérum szint alapján a hiányos állapot (< 20 nmol/l) aránya a betegek között 31 százalékos gyakoriságot mutatott, míg azonos gyakoriságban fordult elő az inszufficiencia (20 – 40 nmol/l) is. A 40 nmol/l feletti 25(OH)D_3 szintű betegek idősebbek voltak és alacsonyabb volt a szérum albumin szintjük, valamint a szérum ferritin értékük, míg magasabbnak mutatkozott a szérum iPTH szintjük, és gyakrabban fordult elő a cukorbetegség. Ugyanakkor ezeknek a betegeknek alacsonyabb is volt a szérum hemoglobin szintjük, melyet egy magasabb havi ESA dózissal lehetett csak biztosítani, amit a magasabb ESA havi dózis/Hb hányados is mutat.

A szérum 25(OH)D_3 szintje független pozitív kapcsolatot mutatott a szérum Hb szinttel (p=0,000) (3. táblázat), és szintén független, de inverz kapcsolatot mutatott az ESA dózis/Hb hányadossal (p=0,036) (4. táblázat) a többváltozós lineáris regressziós modellben, ahol a 25(OH)D_3 mellett még a következő paraméterek is szerepeltek: életkor, nem, diabetes jelenléte, szérum iPTH szint, eKt/V, szérum albumin, valamint transzferrin szaturáció.

3. táblázat Többváltozós lineáris regressziós modell, ahol a hemoglobin a függő változó

	β	P érték
Életkor	0,128	0,152
Nem	-0,150	0,170
Diabetes (igen/nem)	-0,168	0,069
Szérum iPTH	-0,014	0,881
Szérum 25(OH)D_3	0,351	0,000
eKt/V	0,091	0,380
Szérum albumin	0,155	0,099
Transzferrin szaturáció	-0,275	0,005

4. táblázat Többváltozós lineáris regressziós modell, ahol az ESA havi dózis/Hb hányados a függő változó

	β	P érték
Szérum 25(OH)D_3	-0,188	0,036
Nem	0,097	0,263
Szérum albumin	-0,137	0,122
Életkor	-0,171	0,064
Diabetes (igen/nem)	0,041	0,637
Szérum iPTH	0,194	0,025
eKt/V	-0,068	0,427
Transzferrin szaturáció	-0,094	0,313

6.3. Az ACE gén I/D polimorfizmus nem, míg az ACE gátlás erythropoiesist gátló hatású D alléllal rendelkező betegekben

A betegek vizsgált értékei az 5. táblázatban láthatóak (5. táblázat). A genotípus szerinti (I/I, I/D, D/D) megoszlás 20, 41,5 és 38,5 százalékosnak bizonyult. Az átlag életkor 54.5 ± 16.5 év volt, és a férfiak (51,7 %) valamivel többségben voltak. A medián előzetes dialízis idő 23,8 hónap (11,2 – 46,6), 48,3 százalékukat kezeltek ACE gátlóval, és 80,6 százalékuk szorult ESA kezelésre. Ez utóbbi terápia havi medián értéke 16 000 egység (13000 – 22000). A diabetes mellitus előfordulásának aránya 19,5 százalék a vizsgált csoportban, és az átlag hemoglobin érték 96,3 ± 12,8 g/l volt. A vizsgáltak között a leggyakoribb oka a végstádiumú veseelégtelenségnek a glomerulonephritis, melyet követett gyakoriságban a tubulointerstitiális nephritis, majd a diabetes mellitus, policisztás vesebetegség és hipertónia. A három, különböző genotípusú csoport között nem mutatkozott demográfiai, ESA dózis igény, vagy laboratóriumi érték különbség. A hemoglobin értékek hasonlóak voltak, és közel azonos arányban kaptak ESA kezelést, valamint hasonló volt a dózis igényük is a betegeknek a különböző csoportokban. A különböző genotípusú csoportok között hasonló arányban fordult elő az ACE gátló kezelés is.

5. táblázat A betegek különböző paramétereinek összesített értékei ACE genotípus szerint (ACEi th.: ACE gátló kezelés)

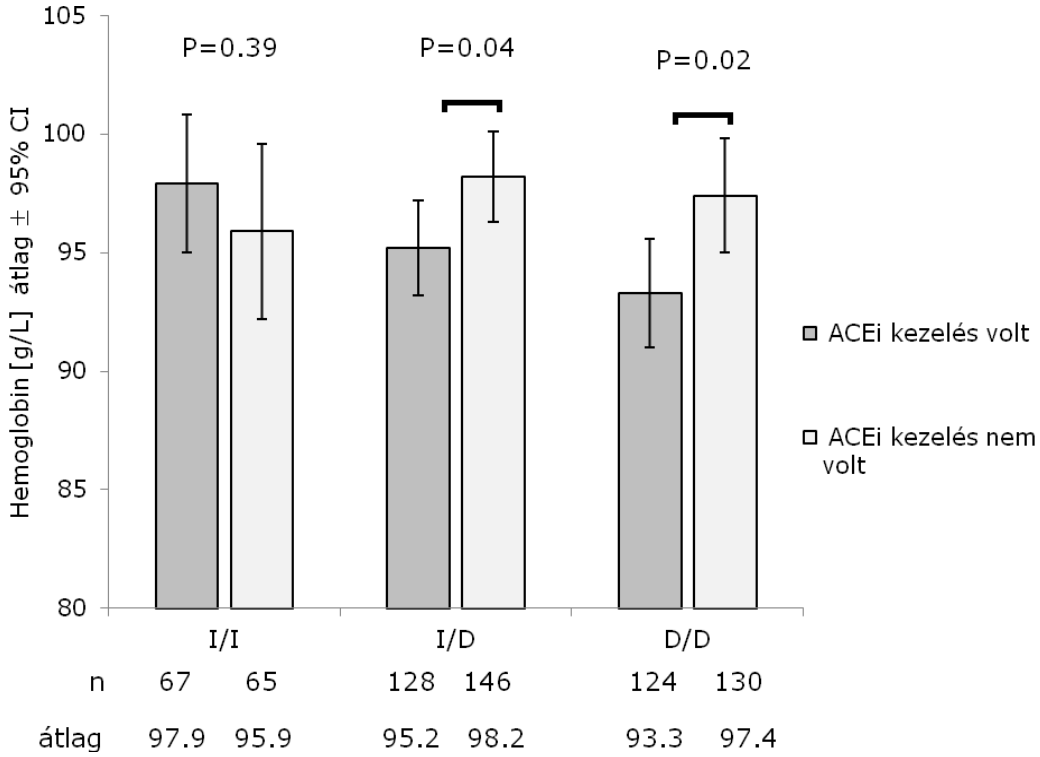
Paraméterek	teljes cohort	ACE genotípus			P
		I/I	I/D	D/D	
Betegszám n, (%)	660 (100 %)	132 (20 %)	274 (41.5 %)	254 (38.5 %)	-
Férfi, % (n)	51.7 (341)	53.8 (71)	51.8 (142)	50.4 (128)	0.82
Életkor, átlag±SD/év	54.5±16.5	54.8±15,9	54.1±15,9	54.7±14,8	0.88
Dialízis időtartama (hónapok) medián (IQR)	23.8 (11.2-46.6)	25.4 (12.1-49.2)	23.8 (11.4-49.0)	23.4 (10.7-40.3)	0.50
Diabetes mellitus % (n)	19.5 (129)	16.7 (22)	17.9 (49)	22.8 (58)	0.23
Hemoglobin (g/L)	96.3±12.8	96.9±13.3	96.8±11,	95.4±13.8	0.37
ACEi th. igen % (n)	48.3 (319)	50.7 (67)	46.7 (128)	48.8 (124)	0.73
rHuEpo kezelés igen % (n)	80.6 (532)	81.6 (107)	80.3 (220)	80.7 (205)	0.98
rHuEpo dózis medián (IQR)	16000 (13000-22000)	18000 (12000-20000)	16000 (13000-20000)	18000 (13000-24000)	0.22
ERI medián (IQR)	181.0 (133.3-241.0)	188.2 (125.0-241.0)	177.8 (132.1-225.0)	198.3 (139.7-257.1)	0.13

Az egyedüli szignifikáns különbség az ACE gátlóval kezelt és nem kezelt csoportok között található. A hemoglobin érték (95,5 ± 12,0 g/l vs. 97,4 ± 13,4 g/l; P = 0,02) alacsonyabb és az ESA kezelés gyakoribb (86,2 % vs. 75,4 %; P = 0,01) volt az ACE gátló kezelésben részesülteknél (6. táblázat).

6. táblázat A betegek különböző vizsgált összesített paraméterei az ACE gátló (ACEi) kezelés szerint. (ACEi+: ACE gátlás történt; ACEi-: ACE gátlás nem történt)

Paraméterek	teljes cohort	ACE gátló kezelés		P
		ACEi+	ACEi-	
Betegszám n, (%)	660 (100 %)	319 (48.3%)	341 (51.7%)	-
Férfi, % (n)	51.7 (341)	54.9 (175)	48.7 (166)	0.11
Életkor, átlag±SD/év	54.5±16.5	53.5±15.0	55.4±15.9	0.12
Előzetes dialízis idő (hó) medián (IQR)	23.8 (11.2-46.6)	25.0 (11.1-49.4)	23.0 (11.2-42.1)	0.11
Diabetes mellitus% (n)	19.5 (129)	16. 9 (54)	22.0 (75)	0.10
Hemoglobin (g/L)	96.3±12.8	95.5±12.1	97.4±13.4	0.02
ACEi kezelés igen % (n)	48.3 (319)			
rHuEpo kezelés igen % (n)	80.6 (532)	86.2 (275)	75.4 (257)	0.01
rHuEpo dózis medián (IQR)	16000 (13000-22000)	16000 (13000-24000)	18000 (12000-20000)	0.53
ERI medián (IQR)	181.0 (133.3-241.0)	183.5 (134.8-242.4)	179.9 (128.7-238.1)	0.53

Ezeket az eredményeket tovább elemezve azt találtuk, hogy a különböző genotípusú csoportokban az ACE gátló kezelésben nem részesülők között a hemoglobin érték szignifikánsan magasabb volt az I/D genotípusú (95,2 ± 11 g/l vs. 98,2 ± 11,9 g/l; P = 0,04) és a D/D genotípusú csoportokban (93,3 ± 13,2 g/l vs. 97,4 ± 14,2 g/l; P = 0,02). Azonban az I/I genotípusú csoportban nem találtunk a hemoglobin értékek között szignifikáns különbséget (97,9 ± 11,6 g/l vs. 95,9 ± 14,9 g/l; P = 0,39). Tehát az I/D és D/D genotípusú csoportba tartozó betegek között az ACE gátló kezelés mellett egyértelműen egy csökkenő tendenciát találtunk a hemoglobin értékben (4. ábra).



4. ábra A dializált krónikus veseelégtelenségben szenvedő különböző I/D genotípusú betegekben az ACE gátló (ACEi) kezelés hatása a szérum hemoglobin szintre. (A csoportok statisztikai összehasonlítása ANOVA (Tukey-test) elemzéssel történt.)

A hemoglobin értéket meghatározó faktorok után kutatva egyváltozós és többváltozós lineáris regressziós modellben is vizsgáltuk a paramétereket, melynek eredményeit a 7. táblázat tartalmazza (7. táblázat). Az egyváltozós lineáris regressziós modellben, ahol a hemoglobin a függő változó a női nem (P = 0,03), és az előzetes dialízis kezelés időtartamának 5 éves növekedése (P = 0,03), valamint az ACE gátló kezelés (P = 0,02) bizonyult szignifikáns faktoroknak. Az életkor 10 éves növekedése (P = 0,87), a diabetes mellitus (P = 0,12), és az ACE gén I/D polimorfizmusa (I/I és I/D + D/D; P = 0,51) nem mutatkoztak szignifikáns faktornak. A többváltozós lineáris regressziós modellben továbbra sem mutatkozott szignifikáns meghatározónak az életkor 10 éves emelkedése (P = 0,84), és az ACE gén I/D polimorfizmusa sem (I/I és I/D + D/D; P = 0,51). Továbbra is szignifikáns faktorként szerepelt a női nem (P = 0,02), az előzetes dialízis kezelés 5 éves növekedése (P = 0,01), és az ACE gátló kezelés (P = 0,01). Viszont a többváltozós modellben a diabetes mellitus szignifikáns (P = 0,04) meghatározónak mutatkozott.

7. táblázat Egyváltozós és többváltozós lineáris regressziós modell, ahol a hemoglobin a függő változó (ACEi th.: ACE gátló kezelés)

	Egyváltozós modell			Többváltozós modell		
	b*	95% CI	P	b*	95% CI	P
Nem (nő)	-2.25	-4.21 / -0.28	0.03	-2.39	-4.36 / -0.42	0.02
Életkor (10 év növekedés)	-0.05	-0.69 / 0.59	0.87	0.07	-0.60 / 0.73	0.84
Diabetes mellitus	1.97	-0.53 / 4.47	0.12	2.71	0.14 / 5.29	0.04
Dialízis időtartam (5 év növekedés)	1.97	0.15 / 3.79	0.03	2.44	0.54 / 4.34	0.01
ACEi th.	-2.39	-4.35 / -0.42	0.02	-2.53	-4.49 / -0.57	0.01
ACE genotípus (I/I vs. I/D+D/D)	-0.82	-3.29 / 1.65	0.51	-0.83	-3.27 / 1.62	0.51

Annak érdekében, hogy tovább tisztázzuk az ACE gátló hatását a hemoglobin szintre a különböző genotípusú betegekben, az ACE gátló kezelés és az ACE gén I/D polimorfizmus egyesített hatását is vizsgáltuk ANCOVA (analysis of covariance) modellben, ahová a dialízis kezelés időtartamát is addicionális faktorként bevettük. Ebben a modellben sem az ACE gátló kezelésnek, sem az ACE gén I/D polimorfizmusnak nem volt szignifikáns (P = 0,53 mind a két vizsgált paraméterre vonatkozóan) hatása a hemoglobin szintre. Ugyanakkor az ANCOVA modell és a többváltozós regressziós modell is felfedett egy szignifikáns (P = 0,02) interakciót az ACE gátló kezelés és az ACE I/D polimorfizmus között.

Tekintettel a számos addicionális interakcióra a vizsgált változók (nem, előzetes dialízis időtartam, diabetes mellitus, ACE I/D polimorfizmus, és ACE gátló kezelés) között, a hemoglobin értékre vonatkozó potenciálisan zavaró hatások kiküszöbölése érdekében elhatároztuk, hogy illesztett párokat hozunk létre. Azaz a meghatározó paraméterekre vonatkozóan hasonló betegeket állítunk egymással szemben az összehasonlításkor. Összesen 127 illesztett párt sikerült kialakítani az I/I és a D/D genotípusú csoportokból a következő változók figyelembevételével: nem, életkor, előzetes dialízis időtartam, diabetes mellitus jelenléte, és ACE gátló kezelés. A teljes vizsgált betegcsoport, és az illesztett párok paramétereinek összesített értékei a 8. táblázatban találhatók (8. táblázat). Összehasonlítva a két csoportot, hasonló értékeket találunk a betegek következő paramétereiben: férfiak aránya (51,7 % vs. 54,3 %; P = 0,48), átlag életkor (54,5 ± 16,5 év vs. 54,7 ± 14,5 év; P = 0,87), az előzetes medián dialízis idő (23,8 /11,2 – 46,6/ hónap vs. 28,1 /13,4 – 47,9/ hónap; P = 0,23), diabetes mellitus gyakorisága (19,5 % vs. 17,3 %; P = 0,45), hemoglobin érték (96,3 ± 12,8 g/l vs. 96,4 ± 13,0 gl; P = 0,92), ACE gátló kezelés gyakorisága (48,3 % vs. 51,2 %; P = 0,43), rHuEPO kezelés előfordulása (80,6 % vs. 81,9 %; P = 0,65), alkalmazott rHuEPO havi medián dózisa (16000 /13000 – 22000/ egység vs. 18000 /13000 – 24000/ egység; P = 0,90) és erythropoietin rezisztencia értéke (181,0 /133,3 – 241,0/ vs. 190,9 /130,8 – 242,4/; P = 0,89).

8. táblázat Illesztett párok demográfiai és laboratóriumi értékei (ACEi th.: ACE gátló kezelés)

Paraméterek	teljes cohort	Illesztett párok	P
Betegszám n, (%)	660 (100 %)	254 (100%)	-
Férfi, % (n)	51.7 (341)	54.3 (138)	0.48
Életkor, átlag±SD/év	54.5±16.5	54,7±14,5	0.87
Előzetes dialízis idő (hó) medián (IQR)	23.8 (11.2-46.6)	28.1 (13.4-47.9)	0.23
Diabetes mellitus % (n)	19.5 (129)	17.3 (44)	0.45
Hemoglobin (g/L) átlag ±SD	96.3±12.8	96.4±13.0	0.92
ACEi th. igen % (n)	48.3 (319)	51.2 (130)	0.43
rHuEpo kezelés igen % (n)	80.6 (532)	81.9 (208)	0.65
rHuEpo dózis medián (IQR)	16000 (13000-22000)	18000 (13000-24000)	0,90
ERI medián (IQR)	181.0 (133.3-241.0)	190.9 (130.8-242.4)	0.89

A további összefüggések feltárása érdekében a 254 I/I és D/D genotípusú betegből alkotott illesztett párokat tovább csoportosítottuk az ACE gátló kezelés alkalmazása szerint. A párok alcsoportok szerinti elemzése során a teljes vizsgált illesztett párok (n = 127 pár) alkotta betegcsoportban, és az ACE gátlót nem kapók alcsoportjában (n = 62 pár) nem mutatkozott szignifikáns különbség a párok két genotípusú (I/I vs. D/D) csoportja között. Igaz ugyan, hogy az ACE gátlóval nem kezelt D/D genotípusúak csoportjában összehasonlítva az I/I genotípusúak ACE gátlót szintén nem kapók csoportjával, számszerűen magasabb hemoglobin értéket (95,6 ± 14,1 g/l vs. 99,0 ± 12,8 g/l; P = 0,14) kaptunk az alacsonyabb gyakoriságot mutató rHuEPO

kezelés (77,4 % vs. 69,4 %; P = 0,40) ellenére, de ezek az eltérések nem érték el a szignifikancia határát.

9. táblázat Illesztett párok csoportjában a hemoglobin, rHuEPO kezelés gyakoriság és havi dózis, valamint az erythropoietin rezisztencia index összehasonlítása figyelembe véve az ACE gátló kezelést

Paraméterek	ACE genotípus		P
	I/I	D/D	
	teljes cohort (127 pár)		
Hemoglobin (g/L) átlag±SD	96.9±13.0	96.0±13.1	0.53
rHuEpo kezelés igen % (n)	82.7 % (105)	81.1 % (103)	0.74
rHuEpo medián dózis (IU/hó) (Q1-Q3)	18 000 (12 000-22 000)	18 000 (13 000-24 000)	0,40
ERI medián (Q1-Q3)	189.5 125.0-241.0	197.5 133.3-244.9	0.20
	ACE gátlókezelés nélkül (62 pár)		
Hemoglobin (g/L) átlag±SD	95.6±14.1	99.0±12.8	0.14
rHuEpo kezelés igen % (n)	77.4 (48)	69.4 (43)	0.40
rHuEpo medián dózis (IU/hó) (Q1-Q3)	18 500 14 500-20 000	18 000 12 000-20 000	0.73
ERI medián (Q1-Q3)	202.0 137.2-243.2	177.8 122.4-225.0	0.59
	ACE gátló kezelés mellett (65 pairs)		
Hemoglobin (g/L) átlag±SD	98.2±11.9	93.0±12.8	0.006
rHuEpo kezelés igen % (n)	87.7 (57)	92.3 (60)	0.55
rHuEpo medián dózis (IU/hó) (Q1-Q3)	16000 12 000-24 000	17000 14 000-24 000	0,16
ERI medián (Q1-Q3)	175.0 116.5-233.0	199.1 147.9-250.0	0.046

Ezzel ellentétben az ACE gátló kezelésben is részesülő illesztett párok csoportjai között a D/D genotípusú csoportban szignifikánsan alacsonyabb hemoglobin (98,2 ± 11,9 g/l vs. 93,0 ± 12,8 g/l; P = 0,006), és szignifikánsan magasabb (175,0 /116,5 – 233,0/ vs. 199,1 /147,9 – 250,0/; P = 0,046) erythropoietin rezisztencia hányadost (ESA dózisa / Hb) lehetett mérni (9. táblázat).

7. MEGBESZÉLÉS

A krónikus veseelégtelenségben több okra visszavezethetően nagyon gyakori a vérszegénység. A legismertebb okok között szerepel a vörösvértestek életidejének csökkenése és a vesében termelődő erythropoietin hiány, vagy lényeges csökkenése következtében lelassuló erythropoiesis. Így a vörösvértestek pusztulásával nem tud lépést tartani azok termelődése, ami anémiát eredményez. Az erythropoietin hiánya szükségessé teszi a külső erythropoietin pótlást, melyet a rekombináns biotechnológiai úton előállított különböző erythropoietin készítmények tesznek lehetővé. Azonban az ESA hatását az erythropoiesisre számos tényező befolyásolja, melyeket minden betegnél keresni szükséges a jobb gyógyszerhatásosság, azaz a hatékony vérképzés érdekében. Ellenkező esetben csak egyre nagyobb erythropoietin dózisokkal lehet elérni, vagy megközelíteni a kívánt cél hemoglobin értéket, ami az erythropoietin rezisztencia kialakulásával jár. Ennek jelentősége abban is keresendő, hogy a dializált krónikus veseelégtelenségben szenvedő egyedekben a magasabb erythropoietin dózis igény, vagy a nagyobb erythropoietin rezisztencia kapcsolatban van a betegek magasabb halálozásával is (Nishio A és mtsai 2013, Okazaki M és mtsai 2014). Az itt bemutatásra kerülő három eredeti munkámmal a krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegek hatásosabb erythropoiesisének megértéséhez, eléréséhez, és ezen keresztül remélhetőleg jobb életkilátásukhoz járultam hozzá. Továbbfejlesztésre került az ESA hatóanyagok farmakokinetika és farmakodinamika közötti összefüggését illusztráló modell. További tényeket sikerült találni a D-vitamin vérképzésben betöltött fontos szerepével kapcsolatosan. Végül, de nem utolsó sorban új bizonyítékokat sikerült kimutatni az ACE farmakológiai gátlásának és az ACE gén I/D polimorfizmusának külön-külön, és együttesen is a vérképzésre kifejtett hatásukról, mely felhívja a figyelmet az egyénre szabott kezelés fontosságára, és választ adhat a korábbi vizsgálatok egymásnak ellentmondó eredményeire is. A következőkben megtartva a közlemények időbeni megjelenésének sorrendiségét, részletesen tárgyalom a disszertáció tárgyát képező kutatási eredmények jelentőségét a klinikai gyakorlatban, és viszonyát más hasonló témájú munkákhoz is.

7.1. Az EPO molekula és különböző ESA készítmények szerkezetének hatása a farmakodinamikai tulajdonságokra

E téma keretein belül bemutatásra kerültek az ESA készítmények hatásosságában lényeges szerepet játszó, illetve meghatározó faktorok közül a pegiláció, a szénhidrát, és sziálsav tartalom jelentősége. Részletezésre került, hogy a csökkent EPO receptor affinitású ESA gyógyszereknél magasabb dózisra van szükség, hogy a minimálisan szükséges számú receptor folyamatosan kötődni tudjon a ligandjához és az erythroid előalakok differenciálódni tudjanak, illetve elkerüljék az apoptózist. Ezen élettani jelenség mögötti küszöb koncentráció (MEC: Minimal Effective Concentration) fogalmát először Besarab és munkatársai (Besarab A és mtsai 1992) javasolták. Ezt a küszöb értéket, a minimálisan hatékony ESA koncentrációt, hosszú távon meghaladni a minél lassúbb kiürülésű, tehát minél hosszabb felezési idejű ESA készítményekkel, illetve az epoetinek ebből a szempontból előnyösebb szubkután alkalmazásával lehet. Besarab és munkacsoportja abból indult ki, hogy a dializált vesebetegek 80 százaléka eléri a célértéket, ahogyan ők fogalmaztak 30 - 40 százalékos hematokrit értéket a heti háromszor és intravénásan adagolt epoetin béta készítménnyel. A betegek fennmaradó része azonban rosszul reagált az epoetin kezelésre, mert a célérték eléréséhez a szokásos epoetin dózis akár kétszerese (150 U/kg intravénásan heti háromszor) is szükséges volt néhány betegüknél. Ezért is figyeltek fel arra, hogy a szubkután epoetin adagolás mellett, adott esetben alacsonyabb dózisokkal mégis hatékonyabban tudták kezelni a betegeket annak ellenére, hogy az intravénás alkalmazás esetén a maximális gyógyszer-koncentráció megközelítőleg tízszeresen magasabb volt az előző alkalmazási módhoz képest. A szubkután és intravénás adagolás között megmutatkozó eltérő farmakokinetika, és az abból adódó eltérő farmakodinamika magyarázatára keresték a választ. Vizsgálatukban azt találták, hogy a megfelelő hematokrit érték fenntartásához betegekként eltérő, de 30 – 100 mU/ml szérum epoetinre van szükség. Érthetővé vált, hogy a szubkután adagolás mellett a hosszabb felezési idő miatt, illetve a gyakoribb, a heti egyszeri adagolás helyett a heti háromszori adagolásra való áttérés jobban ki tudja elégíteni az erythropoiesis igényt. Megállapították, hogy nem elsősorban a maximális gyógyszer-koncentráció, hanem sokkal inkább az elhúzódó és a minimális küszöbkoncentráció feletti gyógyszer koncentrációtól függ az erythropoiesis erőssége.

Ekkor azonban még csak epoetin alfa és epoetin béta állt rendelkezésre, melyeknek a molekuláris szerkezete és a farmakokinetikája is nagyon hasonló volt egymáshoz. Szintén nagyon hasonló volt a készítmények EPO receptorhoz való affinitása, ami miatt még a minimálisan hatékony epoetin koncentráció is közel azonos lehetett. Később azonban újabb, más molekulaszerkezetű erythropoietin analógok (darbepoetin alfa, PEG-epoetin-béta) kerültek kifejlesztésre, melyeknek lényegesen eltért (5 – 50 – 100 szoros mértékben) a receptorhoz való kötődés erőssége, és a felezési idejük az első epoetinekhez képest. Ennek következtében más dózisban, más adagolási gyakorisággal kellett ezeket az új készítményeket alkalmazni, mert többek között máshol volt az eltérő ESA készítményeknek a még minimálisan hatékony küszöbkoncentrációjuk. Amíg az epoetinek esetében a szubkután alkalmazás előnyösebb az intravénáshoz képest, mert a készítmények szérumban mérhető koncentrációi hosszabb ideig találhatók a változatlan küszöbkoncentráció felett, a darbepoetin alfa esetében ez egészen másként alakul. A két alkalmazási mód és azonos dózisok mellett hasonló erythropoiesis növekedés jön létre, mert a darbepoetin beadását követően közel hasonló ideig mérhető a küszöbkoncentráció felett a gyógyszer koncentrációja. A darbepoetin hatásmechanizmusának, illetve az epoetin és darbepoetin különböző farmakokinetikájának bemutatására Macdougall IC által írt (Macdougall IC 2002) közleményben a szerző szintén az erythropoietin küszöbkoncentráció elméletét használta, azonban még nem tett említést ez utóbbi eltérő nagyságára a különböző ESA készítmények esetében. Fontos hangsúlyozni, hogy az ESA készítmények hosszabb felezési ideje és receptorhoz való affinitása egymástól függetlenül is változhat készítményről készítményre. Ezért egyáltalán nem szükségszerű, hogy egy hosszabb felezési idejű ESA nagyobb biológiai aktivitást mutasson. Szintén nem szükségszerű hogy egy gyengébb EPO receptorhoz történő affinitás az esetleges EPO receptoron keresztüli degradáció miatt egyértelműen hosszabb felezési idővel párosuljon (Agoram B és mtsai 2009). Továbbá az is egy paradox tény, hogy az epoetinekhez képest egy gyengébb receptorhoz történő affinitással rendelkező ESA nagyobb biológiai aktivitással rendelkezik. Mindezek váltották ki az igényt a korábbi MEC koncepció kiterjesztésére, és még érthetőbbé tételére, figyelembe véve az új ESA készítmények eltérő farmakológiai tulajdonságait is. A modell tovább fejlesztését, azaz ESA készítményre egyedileg jellemző erythropoietikus küszöbkoncentráció bevételét a

Besarab által javasolt MEC koncepcióba saját munkacsoportunk javasolta először a 2010 évben megjelent közleményünkben (Kiss Z és mtsai 2010). A Besarab és munkacsoportja által javasolt első modellhez képest szükség volt egy új modellre, amelyben a küszöbkoncentráció illusztrálása is változik a felezési idő és a dózis mellett.

A tovább fejlesztett modellben szemléletesen bemutatásra került az epoetin alfához képest két eltérő ESA farmakokinetikája. Amikor az idő előrehaladtával az ESA készítmények ürülnek a szervezetből és a szérumban mérhető koncentrációjuk az egyedileg rájuk jellemző minimálisan hatékony koncentráció alá kerül, akkor a továbbiakban megszűnik az erythropoietikus hatás még annak ellenére is, hogy mérhető a hatóanyag a szérumban. A korábban itt is bemutatott elméleti matematikai modell segítségével könnyen illusztrálható, és megérthető nemcsak egy, vagy a hasonló ESA készítmények farmakokinetikája és farmakodinamikája közötti összefüggés, hanem egymástól több szempontból lényegesen eltérő ESA készítmények erythropoietikus hatása is jól érthetővé válik a dózis, felezési idő és receptor affinitás függvényében. Az elméleti modell lehetővé teszi a különböző faktorok egyidejű teoretikus ábrázolását és ezek együttes hatásából következő erythropoietikus hatást. Mindez segítheti a klinikusokat az ESA hatóanyagok megfelelő alkalmazásában, és következményesen az erythropoietin rezisztencia csökkentésében. Jól érthetővé válik például az is, hogy a darbepoetin alfa miért teszi lehetővé a ritkább adagolást a mellett, hogy a hatásosság nem csökken (1. ábra). Ezt az elméletet a humán klinikai vizsgálatok is alátámasztották (Carrera F és mtsai 2006, Ling B és mtsai 2005). A koncepció arra is felhívja a figyelmet, hogy önmagában egy hosszú felezési idejű ESA nem feltétlenül ad egy flexibilisebb, vagy hatékonyabb kezelési lehetőséget. Jól látható a bemutatott második ábrán (2. ábra), hogy mennyire limitálhatja a magas erythropoietin küszöbkoncentráció a hosszú felezési időből adódó előnyt. Ráadásul óvatosságra ad okot, hiszen egy esetleges magas szérum hemoglobin érték esetén később lehet kompenzálni a túlkezelést. Másik oldalról, az esetleges óvatosságból adódóan később kerülhet elérésre a cél hemoglobin érték. Az elméleti modell alapot szolgálhat a későbbiekben egy konkrét értékeken alapuló kalkulátor létrehozásában, ami segítheti egy konkrét ESA készítmény helyes alkalmazását. Ehhez nagyon fontos lenne, hogy a felezési idő mellett, különböző betegcsoportokban a minimálisan hatékony szérum koncentrációt minden egyes ESA készítménynél a későbbiekben meghatározzák. Ugyanis erythropoietin

rezisztencia esetén amennyiben az EPO pótlás renális anémiában történik, a gyógyszer dózisának emelése helyett, vagy éppen annak csökkentése mellett az ESA készítmény EPO receptorhoz való affinitását figyelembe véve, egy gyakoribb alkalmazás, vagy az adagolás módjának megváltoztatása lehetővé teheti az eredményesebb erythropoiesist. Klinikumban az is fontos kérdés lenne, hogy erythropoietin rezisztencia esetén a minimálisan hatékony koncentráció körül, lényegesen az alatt, vagy a fölött mérhető a szérumban a hatóanyag. A már nagyon magas szérum erythropoietin koncentráció esetében nem csak a gyógyszer alkalmazásának változtatásával lehet tovább lépni, hanem egyéb erythropoietin rezisztenciát meghatározó faktorok után kell kutatni, és azokat korrigálni szükséges. Mindezek a téma részleteibe menő elméleti meggondolások a jövőben remélhetőleg hamarosan hozzájárulnak az ESA kezelés mechanizmusának pontosabb megértéséhez, és még pontosabb, és hatékonyabb renális anémia kezeléshez. Ugyancsak fontos és iránymutató lehet a javasolt modell a gyógyszerkutatás számára is, hogy a jövőben a klinikai gyakorlat számára elérhető új ESA hatóanyagoknak viszonylag erős affinitása legyen a receptorukhoz miközben hosszú gyógyszer felezési idővel rendelkezzenek.

7.2. A D-vitamin hiány, mint erythropoietin rezisztencia faktor

Az elvégzett saját vizsgálat megerősítette, hogy a D-vitamin szerepe messze túlmutat a csont és ásványi anyagcsere ép működésében játszott szerepén. 142 dializált krónikus vesebeteg retrospektív gyűjtött adatainak elemzése során szerzett eredmények alátámasztják a feltételezést, hogy a D-vitamin-hiány egy jelentős erythropoietin rezisztencia faktor, hiszen a D-vitamin ellátottság szignifikáns, pozitív és független összefüggést mutatott a szérum Hb szinttel és fordított összefüggés található az EPO dózis és hemoglobin hányadossal. Minél alacsonyabb a D-vitamin ellátottság, annál nagyobb EPO dózisokkal lehet elérni egy csökkenő Hb szintet, azaz annál nagyobb az EPO dózis és a Hb hányadosa, azaz az erythropoietin rezisztencia mértéke. Az összefüggések szignifikáns mértékűek maradtak akkor is, amikor többváltozós modellben elemeztük a D-vitamin szerepét a hemoglobin szint, valamint az erythropoietin dózis és hemoglobin hányados alakulására vonatkozóan (Kiss Z és mtsai 2011).

Ezek az összefüggések komoly klinikai jelentőséggel bírnak, hiszen az erythropoietin rezisztencia gyakori kihívás a klinikumban, és ráadásul az idevonatkozó tanulmányok a mortalitás alakulásában (Kilpatrick RD és mtsai 2008, Zheng Z és mtsai 2013) jelentős szerepét bizonyítják. Számos, a bevezetőben már részletezett faktort sikerült találni, melyek csökkentik az erythropoiesist és az erythropoietin hatásosságát. Ezeket a faktorokat a klinikumban rendszeresen ellenőrzik, azonban ennek ellenére számos esetben nem sikerül az erythropoietin rezisztencia pontos okát megtalálni. Az itt bemutatásra került saját eredmények meggyőzőek abban a tekintetben, hogy a D-vitamin hiány az egyike a nem hagyományos faktoroknak. Ráadásul nem ütközhet akadályba a 25(OH)D_3 kimutatása a klinikai gyakorlatban, és a számos D-vitamin tartalmú készítménynek köszönhetően a beteg szükségletének megfelelően könnyen pótolható a hiány. Kutatási eredményünk fontosságára hívja fel a figyelmet az is, hogy egy nemrég megjelent összefoglaló munkában a D-vitamin-hiány és az erythropoietin rezisztencia közötti összefüggésre krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegekben a saját munkacsoportunk munkájára hivatkoztak egyedüliként a közlemény egyik táblázatában (Icardi A és mtsai 2013).

A D-vitaminnak komoly jelentősége van a vérképzés folyamatában, ahogy az a bevezetőben már részletezésre került. Számos potenciális mechanizmus magyarázhatja a saját eredményeket, melyek megfelelnek a korábbi kutatások által feltárt összefüggéseknek, és megerősítik azokat. Elsőként meg kell említeni, hogy korábbi, elsősorban kalcitriollal elvégzett vizsgálatok azt bizonyítják, hogy a D-vitamin genomikus és nem genomikus mechanizmusokon keresztül facilitálja az erythropoiesist (Deicher R és Hörl WH 2005). Erre utal többek között egy in vitro vizsgálat eredménye, mely szerint a kalcitriol kalcium jelenlétében serkenti a peritoneálisan dializált betegekből származó erythroid előalakok (BFU-E, CFU-E) proliferációját (Carozzi S és mtsai 1990). Valószínűleg ebben az esetben a nem genomikus mechanizmus van előtérben, és a folyamat az intracelluláris kalcium növekedésén keresztül jöhet létre. A genomikus folyamat része lehet, hogy a kalcitriol képes megnövelni az erythropoietin receptorok számát a sejtfelszinen, melyre utal a receptort meghatározó mRNS jelenlétének növekedése is. Az erythropoietint kódoló gén szakasz promoter régiójában sikerült meghatározni egy D-vitamintól függő elemet, mely szükséges a gén transzkripciójának elindulásához (Alon DB és mtsai 2002). Ezen

túlmenően több száz gén esetében sikerült bizonyítani a D-vitamin alapvető szerepét a transzkripció folyamatában (Holick MF 2007). Feltételezhető, hogy a jövőben még számos gén átíródás esetében lehet további bizonyítékokat találni. Az erythroid előalakok érése során számtalan transzkripciós faktornak szükséges elérni a megfelelő géneket és okkal feltételezhető, hogy számos ponton létezik a D-vitaminnak fontos szerepe ebben a folyamatban. Mindezek az eredmények azt bizonyítják, hogy a D-vitaminnak az erythropoietintől független szerepe is van az erythropoiesis folyamatában.

A következő lehetséges mechanizmus, mely során a D-vitamin csökkentheti az erythropoietin rezisztenciát az a D-vitamin és parathormon kapcsolatával magyarázható (Kovesdy CP és Kalantar-Zadeh K 2008). Jól ismert tény, hogy a parathormon szintézis a D-vitamin szabályozása alatt van, és amikor a D-vitamin szintje csökkent, a parathormon termelődés kontrollja is csökken, és ezáltal megnövekedik a szérumban mérhető koncentrációja. Ez az egyensúly különösen gyakran borul fel a végstádiumú veseelégtelenségben, hiszen a kalcitriol termelés a vesefunkció hiánya miatt gyakorlatilag megszűnik, a natív D-vitamin szint pedig sajnálatosan nagyon gyakran alacsony ezen betegekben. Így kialakul a sHPT (szekunder hyperparathyreiosis) klinikai képe (Mucsi I és mtsai 2005, Gómez-Alonso C és mtsai 2003), mely hozzájárulhat a magas parathormon szint miatt a renális anémia súlyosbodásához is (Brancaccio D és mtsai 2004, Neves PL és mtsai 2006). A parathormon lehetséges gátló hatása a vérképzésre több mechanizmuson keresztül is megtörténhet. Direkt gátló hatást találtak a vörösvértest előalakok érési folyamatában és csökken az endogén erythropoietin termelés is. E mellett a vörösvértestek túlélése is rövidül és fokozódik azok eliminálása is a keringésből (Brancaccio D és mtsai 2004, Gaweda AE és mtsai 2010). Ráadásul a vörös csontvelőben magas szérum parathormon koncentráció hatására fibrózis indul el, ami szintén gátló hatású az éppen itt zajló vérképzésre (Rao DS és mtsai 1993). Egy hazai munkacsoport (Nazem AK és Makó J 1997) még viszonylag az első eredmények megjelenésének idejében közölt egy megfigyelést, hogy a dializált és sHPT tüneteit mutató betegek intravénás kalcitriollal történt kezelése során a szérum parathormon csökkenésén túl az alkalmazott erythropoietin pótlás mennyiségét is csökkenteni lehetett a megfelelő hemoglobin érték fenntartása mellett. Ez a mechanizmus a saját kutatási anyagban sem zárható ki, hiszen a szérum intakt parathormon (iPTH) szint szignifikáns

összefüggést mutatott a havi erythropoietin dózisigénnyel és az ESA és Hb hányadossal is. Sőt a többváltozós lineáris regressziós modellben, ahol az ESA dózis és a hemoglobin hányados volt a függő változó az iPTH szignifikáns prediktornak bizonyult. Ennek ellenére ki lehet jelenteni a saját eredmények alapján, hogy a 25(OH)D_3 szérum szint független meghatározója a hemoglobin szintnek és az ESA dózis és hemoglobin hányadosnak is, hiszen az egyváltozós és a többváltozós lineáris regressziós modellben is, ahol a szérum iPTH is szerepelt, a D-vitamin szignifikáns meghatározó maradt.

A malnutríció is egy fontos pont a saját vizsgálati anyagban, hiszen ez a faktor is belejátszhatott az elemzések során kapott eredmények alakulásába. A vizsgált betegcsoportban a D-vitamin-hiányos betegek egyben alacsony szérum albuminnal is rendelkeztek, bár a csoportok közötti különbségek nem voltak klinikailag jelentősek. Viszont a szérum albumin szignifikáns összefüggést mutatott a hemoglobin szinttel. Azonban a D-vitamin független meghatározó szerepe a vérképzésben a saját anyagban szignifikáns maradt akkor is, amikor az adat statisztikailag korrigálva lett a szérum albumin szintre. Mindezek ellenére nem lehet teljesen kizárni a lehetőséget, hogy a malnutríció esetleg szerepet játszhatott a vizsgálatunkban talált összefüggések alakulásában.

Az utóbbi időben több közlemény is foglalkozik a gyulladás és D-vitamin, illetve a gyulladás és vérképzés kapcsolatával. A gyulladás folyamatában szerepet játszó citokinek mint például számos interleukin, TNF-α (tumor necrosis factor-α), β és γ-interferon, sokszor ellentétes hatást gyakorolnak a különböző előalakokra, mégis összességében gátló hatással rendelkeznek a vérképzés folyamatában. Továbbá a gyulladásos jelekre aktiválódnak a makrofágok is, mely aktiváció eredményezheti az elöregedett vörösvértestek gyorsabb eliminációját a keringésből, hozzájárulva a csökkenő hemoglobin értékhez. A vasfelszívódás és vasanyagcsere is sérül a gyulladásos folyamatokban, ami csökkentheti a vas elérhetőségét az erythropoiesis számára, és ezáltal növelheti az erythropoietin rezisztencia erősödését (Bárány P 2001). Másik oldalon számos vizsgálati eredményt közöltek, hogy a natív és az aktív D-vitamin csökkenti a gyulladási folyamatokat, és az ezzel társuló citokinek számát (Icardi A és mtsai 2013). Ezért nem kizárható, hogy a jobb D-vitamin ellátottság esetleg a gyulladási citokinek számának csökkenése útján is hozzájárulhatott a saját vizsgálati eredményhez. A bevezetőben már említett vizsgálat (Kendrick J és mtsai 2009)

megerősítette, hogy dialízis kezelésre még nem szoruló krónikus vesebetegekben az alacsonyabb 25(OH)D_3 szérum koncentráció, és a magasabb szérum C-reaktív protein szint függetlenül kapcsolatban vannak a hemoglobin szinttel. Sajnálatos tény, hogy a saját vizsgálatban nem vizsgáltuk a gyulladási paraméterek erythropoiesis folyamatában játszott szerepét. Egy támpontot jelenthet azonban ebben a kérdésben a fehérvérsejtek száma, mely egy „surrogate" jele lehet a szisztémás gyulladási folyamatoknak. A saját anyagunkban a fehérvérsejt szám nem mutatott összefüggést a D-vitamin szérum koncentrációjával és a hemoglobin szinttel sem.

A saját vizsgálati anyagban az átlag szérum 25(OH)D_3 koncentráció alacsonynak (31,6 nmol/l) tekinthető, és a vizsgált betegek közel két harmadánál ez a koncentráció a D-vitamin-hiány, vagy inszufficiencia kategóriájába sorolható. Ezek az eredmények hasonlóak a nemzetközi adatokhoz, hiszen az idősek között (Scharla SH 1998) és a dializált krónikus vesebetegek között (Ghazali A és mtsai 1999, Cannata-Andia JB és Gómez Alonso C 2002) is függetlenül a geográfiai elhelyezkedéstől hasonlóan nagy arányban fordul elő a D-vitamin-hiányos állapot.

A saját vizsgálatnak is van néhány további korlátja, melyeket későbbiekben, egy másik vizsgálatban célszerű lenne kiküszöbölni. A retrospektív, keresztmetszeti és egy centrumból származó adatgyűjtés nem küszöböli ki az esetlegesen fennálló átmeneti állapotokból következő torzításokat. Az adatbázis nem tartalmazott részleteket az esetleges vashiánnyal kapcsolatosan, bár a legtöbb beteg intravénás vaspótlásban részesült a legalább 20 százalékos transzferrin szaturáció elérése érdekében. A különböző gyulladást jelző paraméterek jelenlétéről sincs információ. A korlátozó tényezők ellenére a saját vizsgálatból származó eredmények és következtetések meggyőzőeknek tarthatóak.

Eredményeink felhívják a figyelmet egy prospektív és randomizált klinikai vizsgálat szükségességére, melyben egyértelműen tisztázható a D-vitaminpótlás terápiás jelentősége az erythropoietin rezisztencia csökkentésében. Néhány kevés betegszámú és rövid ideig folytatott vizsgálatban adagoltak ergokalciferolt dializált felnőtt (Saab G és mtsai 2007, Kumar VA és mtsai 2011) és gyermek (Rianthavorn P és Boonyapapong P 2013) vesebetegeknek, és ezek az eredmények bíztatóak voltak, és alátámasztják a saját vizsgálat eredményét is. Ezekben a vizsgálatokban az ergokalciferol adagolását követően megemelkedett a hemoglobin szint, vagy/és csökkenteni lehetett az

erythropoietin szükségletet. Amennyiben a későbbiekben indított prospektív és randomizált vizsgálatok megerősítik az itt talált eredményeket, azoknak komoly hatása várható, hiszen a D-vitaminpótlással csökkenthető az ESA dózis igénye, és az erythropoietin rezisztencia, melyek végső soron a betegek életminőségén túl az életkilátásaikat is javíthatja. Addig is az itt közölt eredmények bátoríthatják a klinikusokat, hogy erythropoietin rezisztencia klinikai képét mutató betegeikben keressék az esetleges D-vitamin-hiányt, és amennyiben az igazolódik, pótolják azt. Továbbá vizsgálati eredményünk arra is biztatást ad, hogy a D-vitamin pótlást ne csak a csont és ásványi-anyagcserezavar oldaláról tekintsék a klinikusok, hanem figyeljenek a D-vitamin ellátottságra is. Annál is inkább fontos feladat lehet ez a gyakorlat, mert a jelen vizsgáltba bevont betegek két harmadánál alacsony D-vitamin szintet lehetett mérni.

7.3. Az ACE gén I/D polimorfizmus, az ACE gátlás és közös hatásuk a renális anémia mértékére

A keresztmetszeti elrendezésű saját vizsgálat eredménye megerősíti, hogy az ACE gén I/D polimorfizmus válogatatlan hemodializált krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegekben nem befolyásolja a vérképzést, míg az ACE gátló kezelés vérképzést csökkentő hatását sikerült ebben a betegcsoportban is igazolni. Ez utóbbi hatóanyag által kiváltott gátló hatás a D/D genotípusú, illetve D alléllal rendelkező betegeken jelent meg, mely fokozta az erythropoietin rezisztenciát is. Vizsgálati eredményeink felhívják a figyelmet arra, hogy a renin-angiotenzin rendszer vérképzésre kifejtett hatását a klinikai gyakorlatban az ACE gén I/D polimorfizmus és az ACE farmakológiai gátlásának együttes figyelembe vételével szükséges értékelni és vizsgálni. A krónikus veseelégtelenségben szenvedő, és kaukázusi típusú betegek adataiból származó eredményeink közleményben való nyilvánosságra kerülésekor munkacsoportunk elsőként közölte az ACE gén I/D polimorfizmus és az ACE farmakológiai gátlásának együttes hatását a vérképzésre (Kiss Z és mtsai 2015).

Az itt közölt eredmények részben magyarázatát adhatják a korábbi vizsgálatok egymásnak ellentmondó következtetéseinek, hiszen az ACE gén I/D polimorfizmus és az ACE gátlás hatását az erythropoiesisre a két tényező együttes hatásának figyelembe

vétele nélkül folytatták. Munkánk eredeti feltételezése volt, hogy a genetikai hatás csak akkor tud zavartalanul megnyilvánulni, ha az azokat érintő élettani folyamatokba nem avatkozunk bele. Márpedig az ACE enzimet érintő vizsgálatok esetében a farmakológiai enzim gátlás lényegesen beavatkozik az élettani, vagy esetleg már a kórélettani folyamatokba. Ez magyarázatát adhatja annak, hogy az értekezés bevezetőjében már említett munkák mellett a munkacsoportok egyik része talált összefüggést (Schiffl H és Lang SM 1999, Matsumura M és mtsai 1997), illetve gátló hatást az ACE gátlás és az erythropoiesis és anémia kialakulása között, míg más közölt kutatási eredmények nem támasztották alá (Abu-Alfa AK és mtsai 2000, Hayashi K és mtsai 2001, Saudan P és mtsai 2006) ezt a kapcsolatot. A mi vizsgálati eredményünk alapján ezeknél a tanulmányoknál is felvetődik az ACE gén I/D polimorfizmusának a hatása az eredményekre. Ugyanis a teljes beteganyagunkban az ACE gátló kezelés mellett a betegeknek szignifikánsan alacsonyabb volt a hemoglobin értéke, ami az ACE gátló vérképzésre kifejtett gátló hatását bizonyítja. Azonban további genetikai vizsgálatokkal sikerült kimutatni, hogy ez a gátló hatás a saját vizsgálati adatainkban nem univerzális. Azaz csak az I/D és D/D genotípusú betegekben jelenik meg, míg az I/I genotípusú betegekben a mi vizsgálatunkban nem jelentkezik. Jól mutatja továbbá az ACE gátló negatív hatását az erythropoiesisre az is, hogy a legalább 100 g/l hemoglobin értéket elérő betegek aránya az ACE gátló kezelésben is részesülők csoportjában szignifikánsan (P = 0,05) kevesebb volt a D/D genotípusú csoportban. Ez utóbbi genotípusú csoportban 27 százalék, míg az I/I genotípusú betegek között az elérők aránya 42,1 százalék volt. Tehát elképzelhető, hogy a korábbi egymásnak ellentmondó eredmények mögötti okok között a vizsgált betegcsoportok genotípus összetételének különbözősége is szerepelhetett, illetve az alkalmazott ACE gátlás esetlegesen elfedte az ACE gén I/D polimorfizmusából adódó különbségeket.

A szérum és a szöveti ACE aktivitás is jelentősen függ az ACE gén I/D polimorfizmusától, így a D/D genotípusúakban jelentősen magasabb ez az aktivitás (Rigat B és mtsai 1990), következményesen az angiotenzin-II szintje is emelkedett lehet az I/I genotípusúakhoz képest. Elképzelhető, hogy a D/D genotípusú betegcsoportban az ACE gátlás egy viszonylagosan nagyobb angiotenzin-II esést eredményezhet, ami önmagában is egy erythropoiesis lassulást okozhat, és ehhez kell még számba venni az angiotenzin-II csökkenő hatásból adódó kevesebb erythropoietin termelést is. Ennek

oka, hogy a kevesebb angiotenzin-II nem okoz akkora vazokonstrikciót a vese artériáiban és ezáltal nem növeli a szöveti hypoxiát, ami csökkenti az erythropoietin belső termelődést is. Ennek a magyarázatnak megfelel az a vizsgálati eredmény, hogy ACE gátlás mellett kevesebb szérum erythropoietint lehet mérni (Hatano M és mtsai 2000). A betegek saját erythropoietin termelését nem szabad figyelmen kívül hagyni, hiszen a vizsgált betegeink között 20 – 25 százalék körüli azok aránya, akik nem szorultak külső erythropoietin pótlásra. Ugyanakkor az ACE gátló erythropoietin rezisztenciát növelő hatására utal az is, hogy szignifikánsan (P = 0,01) nagyobb arányban részesültek a rHuEPO kezelésben azok a betegek, akik ACE gátlásban is részesültek. Korábbi két vizsgálatban (Varagunam M és mtsai 2003, Sharples EJ és mtsai 2006) peritoneálisan dializáltak között a D/D genotípusú betegek esetében alacsonyabb volt a rHuEPO igény. Ezek a vizsgálati eredmények teljesen alátámasztják a saját vizsgálati eredményre épülő, és itt részletezett okokat és összefüggéseket. Bár a saját és a két említett vizsgálat között lényeges különbségek is vannak, hiszen a dialízis modalitás eltérő volt, és nagy valószínűséggel különbözött a reziduális veseműködés, és a krónikus gyulladás mértéke is eltérő lehetett. Amíg a saját vizsgálatban az ACE gátlás gyakorisága a betegek között megközelítette az 50 százalékot, addig a másik két vizsgálatban ennek aránya lényegesen alacsonyabb volt.

Saját vizsgálati anyagban feltételezhető volt, hogy az ACE gátló kezelésben nem részesülők a D/D genotípusú betegek esetében erőteljesebb angiotenzin-II szinttel és relatív magasabb erythropoietin szinttel rendelkeznek. Ennek megfelelően az illesztett párok elemzésekor valóban a D/D genotípusúak között számszerűleg egy magasabb hemoglobin értéket találtunk annak ellenére, hogy ebben az alcsoportban kevesebben szorultak erythropoietin pótlásra. Azonban a különbségek nem érték el a szignifikancia határát, ezért az eredmények nem tekinthetők klinikailag relevánsnak. A saját eredményben megjelenő tendenciának megfelelő a koreai munkacsoport (Jeong KH és mtsai 2008) által közölt eredmény is, hiszen a munkacsoport ki tudta mutatni a D/D genotípusúak alacsonyabb erythropoietin rezisztencia értékét az I/I és az I/D genotípusúakhoz viszonyítva. Ebben a kérdésben a koreai eredményhez képest a saját vizsgálatban hiányzó szignifikáns különbséget magyarázhatja az esetlegesen eltérő allél gyakoriság a két vizsgált lakosság között, valamint ACE gátló használat gyakoriságának eltérése a különböző genotípusúak között.

Az itt részletezett saját vizsgálatnak számos gyenge pontja is van. Elsőként kell megemlíteni a keresztmetszeti adatgyűjtést, ami nem teszi lehetővé, hogy vizsgáljuk hosszabb távon a hemoglobin, erythropoietin dózis igény, és rezisztencia hosszútávon történő változásait. Az eredményeket bizonyára befolyásolták egyéb jól ismert faktorok is, melyeket nem vizsgáltunk még az illesztett párok esetében sem. Ezek közé a faktorok közé tartozhatnak a következők: krónikus gyulladást jelző markerek, vas státusz és pótlás, parathormon szint, maradék vesefunkció, dialízis dózis, korábbi vesetranszplantáció, immunszuppresszív kezelések, dohányzás és alkohol fogyasztás szokásai. Nem lehet teljesen kizárni, hogy mindezek a faktorok befolyásolhatták a hemodializáltak erythropoiesisét. A saját vizsgálatban nincs adat a szérum ACE aktivitásról, vagy az angiotenzin-II és erythropoietin szintjéről. Ezeket a paramétereket a korábbi vizsgálatokban egybehangzóan igazolták, ezért nem valószínű, hogy ettől eltérő eredmény született volna a saját vizsgálatban. Az általunk közölt eredményekben nincs adat arról, hogy melyik ACE gátló készítményt kapta a beteg és milyen hosszú ideig került az alkalmazásra. Bár ezt csak nagyon kevés vizsgálatban nézték, és nem valószínű, hogy ezeknek a részleteknek a figyelembe vétele megváltoztatta volna a saját vizsgálatban talált összefüggéseket. Az illesztett párok elemzésekor sok beteg kiesett, ami gyengíti az eredményeket, de ugyanakkor tisztább viszonyokat is teremtett az összefüggések kimutatása céljából. Tekintettel arra, hogy a saját vizsgálatban kaukázusi típusú betegek kerültek vizsgálatra, és a különböző régiókban élők genotípus megoszlása eltérő lehet, nem feltétlenül általánosíthatóak a saját eredmények.

A saját eredmények, minden limitációjuk ellenére iránymutatóak a későbbi kutatásokhoz, mert felhívják a figyelmet a genetikai polimorfizmus és a farmakológiai ACE gátlás együttes szerepének figyelembe vételére. Ugyanakkor a klinikai gyakorlatban is érdemes kutatni erythropoietin rezisztencia esetén a genetikai és farmakológiai hatást külön-külön, és együttesét is.

8. KÖVETKEZTETÉS

Az értekezésben bemutatott saját kutatások tehát megerősítik a bevezetőben részletezetteket, hogy az ESA kezelésben részesülő krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegekben az erythropoietin rezisztencia kialakulása mögött mindig keresni kell, és az esetek egy jó részében meg is lehet találni az okokat, melyek közé tartozhatnak többek között a helyes ESA alkalmazás szempontjai, a megfelelő D-vitamin ellátottság, és a betegek ACE gén I/D polimorfizmusának és az ACE farmakológiai gátlásának együttes, és egyedi hatásai is.

A különböző szerkezetű újabb ESA készítmények megjelenésével igény keletkezett klinikai és kutatói oldalról, hogy a korábban kialakított erythropoietikus minimális küszöbkoncentráció elmélete is tovább fejlesztésre kerüljön. Az első rHuEPO készítmények, az epoetinek megjelenésekor egy erythropoietin molekula farmakodinamikáját jól lehetett megbecsülni a dózis és a felezési idő ismeretében, hiszen a készítményeknek hasonló volt a szerkezete és a farmakológiai jellemzőik is. Azonban az újabb ESA készítmények szerkezete jelentősen eltért az első rHuEPO készítményektől és ennek megfelelően különbözött a farmakokinetikájuk és bioaktivitásuk is. Később az addig szokásos jellemzőkön (felezési idő, alkalmazott dózis és MEC) kívül az EPO receptor és a ligandja között létrejövő egyedi és ESA készítményenként változó affinitás értéknek a figyelembe vétele is szükségessé vált a farmakodinamikai modellezésekor. Az újabb ESA készítmények receptorhoz történő egyedi affinitása miatt a konkrét ESA készítményre jellemző, és az erythropoiesishez minimálisan szükséges erythropoietin szérum koncentráció (MEC) is változik. Ráadásul az új ESA készítmények nemcsak az epoetinek EPO receptorhoz való affinitásától tértek el, hanem egymástól is jelentősen eltérő farmakológiai értékeket mutattak. Így az eltérő dinamikájú ESA és EPO receptor kapcsolódást is figyelembe kellett venni egy új modell kialakításakor. Ebben az új modellben tehát változtatható a dózis, a felezési idő, és a receptor affinitást tükröző minimális hatékony küszöbkoncentráció. Ezt a tovább fejlesztett modellt elsőként közöltük, melynek segítségével könnyebben megérthető a különböző ESA készítmények farmakokinetika és farmakodinamika közötti

összefüggései, illetve a bioaktivitásukkal kapcsolatos különböző értékeik. Ugyancsak segítheti a modell az esetlegesen fellépő erythropoietin rezisztencia esetén egy adott ESA készítmény alkalmazott dózisának, adagolás módjának és gyakoriságának módosításával a kielégítőbb erythropoiesis elősegítését. Mindezek miatt későbbiekben szükség lenne meghatározni minden ESA készítmény minimálisan hatékony küszöbkoncentrációját, hogy ezáltal pontosabban meghatározásra kerülhessen egy ESA készítmény legoptimálisabb alkalmazási módja. Különösen fontos lenne ismerni ezt az erythropoietikus küszöb koncentrációt erythropoietin rezisztencia esetén, mert így az ESA készítményeket adott esetben a beteg egyénre szabva lehetne alkalmazni a kielégítőbb vérképzés érdekében.

Sikerült kimutatni a szérum 25(OH)D_3 koncentráció és az erythropoiesis szignifikáns kapcsolatát dializált krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegekben. Saját vizsgálati eredmény alapján az alább felsorolt eredmények születtek.

- A szérum 25(OH)D_3 szérum koncentrációja pozitív, szignifikáns és más paraméterektől függetlenül összefüggést mutat a hemoglobin szinttel.
- A szérum 25(OH)D_3 szérum koncentrációja fordított, szignifikáns és más paraméterektől függetlenül összefüggést mutat az erythropoietin havi dózisa és a hemoglobin hányadosával.
- A szérum 25(OH)D_3 szérum koncentrációja fordított, szignifikáns és más paraméterektől függetlenül összefüggést mutat a szükséges havi erythropoietin dózissal.

Az itt felsorolt saját vizsgálati eredmények megfelelnek a korábban ebben a témában végzett kutatások eredményeinek. Ugyanakkor szükségessé tesznek egy prospektív és randomizált klinikai vizsgálatot, melyben igazolni lehet a natív D-vitamin pótlás jelentős szerepét az erythropoietin rezisztencia csökkentésében krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegekben.

A dializált krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegeken vizsgálva az ACE gátlás, ACE gén I/D polimorfizmus és erythropoiesis vonatkozásában sikerült kimutatni több szignifikáns összefüggést is, melyeket alább sorolok.

- ACE gátló kezelés mellett szignifikánsan alacsonyabb a szérum hemoglobin szint és szignifikánsan több dializált beteg szorul erythropoietin pótlásra.
- Az ACE gátló kezelés D/D genotípusú, vagy D alléllal rendelkező betegekben szignifikánsan alacsonyabb hemoglobin szintet eredményez összehasonlítva azonos genotípusú és az ACE gátlót nem kapók csoportjával.
- Az ACE gén I/D polimorfizmusa önmagában és válogatatlan betegcsoporton nem befolyásolja jelentősen az erythropoiesis folyamatát.
- A D/D genotípusú betegekben az ACE farmakológiai gátlása szignifikánsan erőteljesebb hemoglobin csökkenést és erythropoietin rezisztencia növekedést okoz az I/I genotípusú betegekhez hasonlítva.
- Az ACE gátló alkalmazása mellett, a különböző korábbi vizsgálati betegcsoportokban tapasztalt, és az erythropoiesisre vonatkozó egymásnak ellentmondó eredmények kapcsolatban lehetnek az ACE gén I/D polimorfizmusával, illetve az ACE farmakológiai gátlásának és az ACE gén I/D polimorfizmusának együttes hatásával.

Mindezek alapján megállapítható, hogy erythropoietin rezisztencia esetén mindig érdemes figyelembe venni a RAAS gátlás jelenlétét, és különösen fontos lehet a betegek genotipizálása is, hogy a genetikai és a farmakológiai hatás együttesével is számolni lehessen. Különösen fontos ez a D alléllel rendelkező betegek esetében, akiknél az ACE gátlás alkalmazása esetén az erythropoiesis legerőteljesebben gátlódik. A későbbi vizsgálatok tervezésénél is ajánlatos figyelembe venni e két paraméter jelenlétét.

9. ÖSSZEFOGLALÁS

A krónikus veseelégtelenség progressziója során megjelenik a renális anémia, melynek oka elsősorban a belső erythropoietin hiány és az urémizálódó állapot. Szinte minden beteg ezért külső erythropoietin pótlásra szorul, de ennek ellenére a dializáltak akár 10 százalékánál is megjelenhet az erythropoietin rezisztencia, amikor a beteg nem reagál kielégítően a külső erythropoietin pótlásra. Az erythropoietin rezisztencia klinikai jelentőséggel bír, mert összefüggésben van az életkilátással és az életminőséggel is. Ezért alapvető fontosságú mindazoknak a faktoroknak az ismerete, melyek ezt az állapotot előidézik.

Az értekezésben ismertetett saját munkák az erythropoietin hatóanyagok farmakológiai paramétereinek, a D-vitamin ellátottság szerepének és az angiotenzin konvertáz enzim aktivitásának szerepét érintik az erythropoietin rezisztencia kialakulásában. Az első téma egy elméleti munka, az utóbbi kettő dializált krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegek keresztmetszeti vizsgálatából származó adatok elemzésének eredménye.

Az ebben az értekezésben ismertetett három saját kutatásokból származó megállapítások röviden a következők. (1) A korábban javasolt minimális erythropoietikus küszöbkoncentráció koncepciója tovább fejlesztésre került. Ezt az tette szükségessé, hogy eltérő szerkezetű és farmakokinetikájú új hatóanyagok kerültek a klinikai gyakorlatba, melyeknek eltérő az erythropoietin receptorhoz való affinitásuk. Ez utóbbi változó értéket mutató elem beemelése a koncepcióba, illetve egy új kiegészített modell megalkotása alapvetően segíti az erythropoietin hatóanyagok helyesebb használatát és bioaktivitásuk jobb szemléltetését. (2) A D-vitamin ellátottság független, szignifikáns és inverz összefüggést mutat az erythropoietin rezisztenciával. Minél magasabb a szérum $25(OH)D_3$ koncentráció, annál magasabb a szérum hemoglobin szint egy csökkenő külső erythropoietin pótlás mellett. (3) Az angiotenzin konvertáz enzimet meghatározó gén I/D polimorfizmusa nem befolyásolja jelentősen az erythropoiesist. Továbbá az angiotenzin konvertáz enzim gátlása erythropoiesis gátló hatású, amely a D/D genotípusú, illetve D alléllel rendelkező betegekben jelenik meg.

10. SUMMARY

During progression of chronic kidney disease renal anemia is one of the frequent consequences particularly due to lack of endogenous erythropoietin production and uremic condition. Therefore, almost all patients require exogenous erythropoietin supplementation, however, up to 10 percent of dialyzed patients erythropoietin resistance may appear, when effectiveness of the therapy is far from the efficient level. Erythropoietin resistance is an important clinical phenomenon because of its relation to quality of life and also mortality. As a result, knowledge of those factors which can promote this condition is essential.

In this dissertation, the presented publications written by own workgroups cover role of pharmacological parameters of erythropoietin agents, vitamin D deficiency, activity of angiotensin converting enzyme in development of the erythropoietin resistance. The first theme is a theoretical work and the followings are results of analysis of two cross-sectional trials with chronic kidney disease patients on dialysis therapy.

There are three results from own working groups in this dissertation, which are the followings. (1) Previously proposed conception of minimal effective concentration is extended. It was a need because new erythropoietin agents with different structures and pharmacological parameters including different affinity to their receptor entered into the clinical practice. Creation of a new extended model with changing receptor affinity certainly supports more proper use of erythropoietin agents and demonstration of their bioactivity as well. (2) There is a significant and inverse association between vitamin D sufficiency and erythropoietin resistance. The higher serum concentration of $25(OH)D_3$ can reach, the higher serum hemoglobin level with decreasing exogenous erythropoietin requirement is. (3) Angiotensin converting enzyme gene I/D polymorphism doesn't influence significantly erythropoiesis. Furthermore, inhibition of the enzyme results in negative effect on erythropoiesis in patients with D/D genotype or D allele.

11. IRODALOMJEGYZÉK

1. Abu-Alfa AK, Cruz D, Perazella MA, Mahnensmith RL, Simon D, Bia MJ. (2000) ACE inhibitors do not induce recombinant human erythropoietin resistance in hemodialysis patients. Am J Kidney Dis, 35(6): 1076-1082.
2. Afsar B, Agca E, Turk S. (2015) Comparison of erythropoietin resistance in hemodialysis patients using calcitriol, cinacalcet, or paricalcitol, J Clin Pharmacol, 55(11): 1280-1285.
3. Agoram B, Aoki K, Doshi S, Gegg C, Jang G, Molineux G, Narhi L, Elliott S. (2009) Investigation of the effects of altered receptor binding activity on the clearance of erythropoiesis-stimulating proteins: Nonerythropoietin receptor-mediated pathways may play a major role. J Pharm Sci, 98(6): 2198-2211.
4. Ajmal A, Gessert CE, Johnson BP, Renier CM, Palcher JA. (2013) Effect of angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers on hemoglobin levels. BMC Res Notes, 6: 443. doi: 10.1186/1756-0500-6-443.
5. Albitar S, Genin R, Fen-Chong M, Serveaux MO, Bourgeon B. (1998) High dose enalapril impairs the response to erythropoietin treatment in haemodialysis patients. Nephrol Dial Transplant, 13(5): 1206-1210.
6. Albitar S, Genin R, Fen-Chong M, Serveaux MO, Schohn D, Chuet C. (1997) High-dose alfacalcidol improves anaemia in patients on haemodialysis. Nephrol Dial Transplant, 12(3): 514-518.
7. Alon DB, Chaimovitz C, Dvilansky A, Lugassy G, Douvdevani A, Shany S, Nathan I. (2002) Novel role of 1,25(OH)2D3 in induction of erythroid progenitor cell proliferation. Exp Hematol, 30(5): 403-409.
8. Aucella F, Scalzulli RP, Gatta G, Vigilante M, Carella AM, Stallone C. (2003) Calcitriol increases burst-forming unit-erythroid proliferation in chronic renal failure. A synergistic effect with r-HuEpo. Nephron Clin Pract, 95(4): c121-127.
9. Aucella F, Vigilante M, Margaglione M, Grandone E, del Popolo A, Forcella M, Procaccini D, Salatino G, Passione A, Ktena M, De Min A, Stallone C. (2000) Polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene in end-stage renal failure patients. Nephron, 85(1): 54-59.

10. Azizi M, Rousseau A, Ezan E, Guyene TT, Michelet S, Grognet JM, Lenfant M, Corvol P, Ménard J. (1996) Acute angiotensin-converting enzyme inhibition increases the plasma level of the natural stem cell regulator N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline. J Clin Invest, 97(3): 839-844.
11. Badve SV, Hawley CM, Johnson DW. (2011) Is the problem with the vehicle or the destination? Does high-dose ESA or high haemoglobin contribute to poor outcomes in CKD? Nephrology (Carlton), 16(2): 144-153.
12. Bárány P. (2001) Inflammation, serum C-reactive protein, and erythropoietin resistance. Nephrol Dial Transplant, 16(2): 224-227.
13. Barger-Lux MJ, Heaney RP, Lanspa SJ, Healy JC, DeLuca HF. (1995) An investigation of sources of variation in calcium absorption efficiency. J Clin Endocrinol Metab, 80(2): 406-411.
14. Bamgbola OF. (2011) Pattern of resistance to erythropoietin-stimulating agents in chronic kidney disease. Kidney International, 80: 464-474.
15. Besarab A, Flaharty KK, Erslev AJ, McCrea JB, Vlasses PH, Medina F, Caro J, Morris E. (1992) Clinical pharmacology and economics of recombinant human erythropoietin in end-stage renal disease: the case for subcutaneous administration. J Am Soc Nephrol, 2(9): 1405-1416.
16. Bjelakovic G, Gluud LL, Nikolova D, Whitfield K, Wetterslev J, Simonetti RG, Bjelakovic M, Gluud C. (2014) Vitamin D supplementation for prevention of mortality in adults. Cochrane Database Syst Rev, 1: CD007470.
17. Bikle DD, Nemanic MK, Gee E, Elias P. (1986) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 production by human keratinocytes. Kinetics and regulation. J Clin Invest, 78(2): 557-566.
18. Blazsek I, Farabos C, Quittet P, Labat ML, Bringuier AF, Triana BK, Machover D, Reynes M, Misset JL. (1996) Bone marrow stromal cell defects and 1 alfa,25-dihidroxyvitamin D3 deficiency underlying human myeloid leukemias. Cancer Detect Prev, 20(1): 31-42.
19. Bover J, Egido J, Fernández-Giráldez E, Praga M, Solozábal-Campos C, Torregrosa JV, Martínez-Castelao A. (2015) Vitamin D, vitamin D receptor and the importance of its activation in patients with chronic kidney disease. Nefrologia, 35(1): 28-41.

20. Bradbury BD, Danese MD, Gleeson M, Critchlow CW. (2009) Effect of Epoetin alfa dose changes on hemoglobin and mortality in hemodialysis patients with hemoglobin levels persistently below 11 g/dL. Clin J Am Soc Nephrol, 4(3): 630-637.
21. Brancaccio D, Cozzolino M, Gallieni M. (2004) Hyperparathyroidism and anemia in uremic subjects: a combined therapeutic approach. J Am Soc Nephrol, 15 Suppl 1: S21-S24.
22. Brown WM, Maxwell P, Graham AN, Yakkundi A, Dunlop EA, Shi Z, Johnston PG, Lappin TR. (2007) Erythropoietin receptor expression in non-small cell lung carcinoma: a question of antibody specificity. Stem Cells, 25(3): 718-722.
23. Cannata-Andía JB, Gómez Alonso C. (2002) Vitamin D deficiency: a neglected aspect of disturbed calcium metabolism in renal failure. Nephrol Dial Transplant, 17(11): 1875-1878.
24. Carozzi S, Ramello A, Nasini MG, Schelotto C, Caviglia PM, Cantaluppi A, Salit M, Lamperi S. (1990) Ca++ and 1,25(OH)2D3 regulate in vitro and in vivo the response to human recombinant erythropoietin in CAPD patients. Adv Perit Dial, 6: 312-315.
25. Carrera F, Oliveira L, Maia P, Mendes T, Ferreira C. (2006) The efficacy of intravenous darbepoetin alfa administered once every 2 weeks in chronic kidney disease patients on hemodialysis. Nephrol Dial Transplant, 21: 2846–2850.
26. Charytan C, Goldfarb-Rumyantzev A, Wang YF, Schwenk MH, Spinowitz BS. (1998) Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors on response to erythropoietin therapy in chronic dialysis patients. Am J Nephrol, 18(6): 498-503.
27. Chu X, Tong Q, Cheung JY, Wozney J, Conrad K, Mazack V, Zhang W, Stahl R, Barber DL, Miller BA. (2004) Interaction of TRPC2 and TRPC6 in erythropoietin modulation of calcium influx. J Biol Chem, 279(11): 10514-10522.
28. Cruz DN, Perazella MA, Abu-Alfa AK, Mahnensmith RL. (1996) Angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy in chronic hemodialysis patients: any evidence of erythropoietin resistance? Am J Kidney Dis, 28(4): 535-540.

29. Davis JM, Arakawa T, Strickland TW, Yphantis DA. (1987) Characterization of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells. Biochemistry, 26: 2633–2638.
30. Deicher R, Hörl WH. (2005) Hormonal adjuvants for the treatment of renal anaemia. Eur J Clin Invest, 35 Suppl 3: 75-84.
31. Delorme E, Lorenzini T, Giffin J, Martin F, Jacobsen F, Boone T, Elliott S. (1992) Role of glycosylation on the secretion and biological activity of erythropoietin. Biochemistry, 31: 9871–9876.
32. Doshi S, Krzyzanski W, Yue S, Elliott S, Chow A, Pérez-Ruixo JJ. (2013) Clinical Pharmacokinetics and pharmacodynamics of erythropoiesis-stimulating agents. Clin Pharmacokinetic, 52: 1063-1083.
33. Dusso A, González EA, Martin KJ. (2011) Vitamin D in chronic kidney disease. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 25(4): 647-655.
34. Egrie JC, Browne JK. (2001) Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). Nephrol Dial Transplant, 16(Suppl 3): 3–13.
35. Elliott S, Chang D, Delorme E, Eris T, Lorenzini T. (2004) Structural requirements for additional N-linked carbohydrate on recombinant human erythropoietin. J Biol Chem, 279: 16854–16862.
36. Elliott S, Egrie J, Browne J, Lorenzini T, Busse L, Rogers N, Ponting I. (2004) Control of rHuEPO biological activity: The role of carbohydrate. Exp Hematol, 32(12): 1146-1155.
37. Elliott SG, Foote M, Molineux G. Eryhtropoietins, erythropoietic factors, and erythropoiesis. Birkhauser Verlag, Basel, 2009: 1-326.
38. Elliott S, Lorenzini T, Asher S, Aoki K, Brankow D, Buck L, Busse L, Chang D, Fuller J, Grant J, Hernday N, Hokum M, Hu S, Knudten A, Levin N, Komorowski R, Martin F, Navarro R, Osslund T, Rogers G, Rogers N, Trail G, Egrie J. (2003) Enhancement of therapeutic protein in vivo activities through glycoengineering. Nat Biotechnol, 21: 414-421.
39. Elliott S, Lorenzini T, Chang D, Barzilay J, Delorme E. (1997) Mapping of active site of recombinant human erythropoietin. Blood, 89: 493–502.

40. Elliott S, Pham E, Macdougall IC. (2008) Erythropoietins: A common mechanism of action. Experimental Hematology, 36: 1573-1584.
41. Erslev AJ, Wilson J, Caro J. (1987) Erythropoietin titers in anemic, nonuremic patients. J Lab Clin Med, 109(4): 429-433.
42. Ertürk S, Kutlay S, Karabulut HG, Keven K, Nergizoglu G, Ates K, Bokesoy I, Duman N. (2002) The impact of vitamin D receptor genotype on the management of anemia in hemodialysis patients. Am J Kidney Dis, 40(4): 816-823.
43. Ertürk S, Nergizoğlu G, Ateş K, Duman N, Erbay B, Karatan O, Ertuğ AE. (1999) The impact of withdrawing ACE inhibitors on erythropoietin responsiveness and left ventricular hypertrophy in haemodialysis patients. Nephrol Dial Transplant, 14(8): 1912-1916.
44. Fata E, Ágota K, Horváth DE, Virágh É, Kányási M, Kovács L, Balogh D, Schaffer É, Oláh A, Lőcsei Z, Salamon A, Toldy E. (2014) A D-vitamin-ellátottság vizsgálata kórházi kezelést igénylő betegek körében. LAM KID, 4(3): 109-123.
45. Fisher JW. (2003) Erythropoietin: Physiology and pharmacology update. Exp Biol Med, 228: 1-14.
46. Fisher JW, Samuels AI, Langston JW. (1967) Effects of angiotensin and renal artery constriction on erythropoietin production. J Pharmacol Exp Ther, 157(3): 618-625.
47. Foley RN, Parfrey PS, Harnett JD, Kent GM, Murray DC, Barre PE. (1996) The impact of anemia on cardiomyopathy, morbidity, and mortality in end-stage renal disease. Am J Kidney Dis, 28: 53–61.
48. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. (1998) Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. Am J Kidney Dis, 32(5 Suppl 3): S112-S119.
49. Fournier A, Fardellone P, Achard JM, Ghazali A, Pruna A, El Esper N, Morinière P. (1999) Importance of vitamin D repletion in uraemia. Nephrol Dial Transplant, 14(4): 819-823.
50. Fyhrquist F, Saijonmaa O. (2008) Renin-angiotensin system revisited. J Intern Med, 264(3): 224-236.

51. Freudenthaler SM, Schreeb K, Körner T, Gleiter CH. (1999) Angiotensin II increases erythropoietin production in healthy human volunteers. Eur J Clin Invest, 29(10): 816-823.
52. Gaweda AE, Goldsmith LJ, Brier ME, Aronoff GR. (2010) Iron, inflammation, dialysis adequacy, nutritional status, and hyperparathyroidism modify erythropoietic response. Clin J Am Soc Nephrol, 5(4): 576-581.
53. Ghazali A, Fardellone P, Pruna A, Atik A, Achard JM, Oprisiu R, Brazier M, Remond A, Morinière P, Garabedian M, Eastwood J, Fournier A. (1999) Is low plasma 25-(OH)vitamin D a major risk factor for hyperparathyroidism and Looser's zones independent of calcitriol? Kidney Int, 55(6): 2169-2177.
54. Glicklich D, Burris L, Urban A, Tellis V, Greenstein S, Schechner R, Devarajan P, Croizat H. (2001) Angiotensin-converting enzyme inhibition induces apoptosis in erythroid precursors and affects insulin-like growth factor-1 in posttransplantation erythrocytosis. J Am Soc Nephrol, 12(9): 1958-1964.
55. Glorieux G, Vanholder R. (2001) Blunted response to vitamin D in uremia. Kidney Int Suppl, 78: S182-S185.
56. Goicoechea M, Vazquez MI, Ruiz MA, Gomez-Campdera F, Perez-García R, Valderrábano F. (1998) Intravenous calcitriol improves anaemia and reduces the need for erythropoietin in haemodialysis patients. Nephron, 78(1): 23-27.
57. Gómez-Alonso C, Naves-Díaz ML, Fernández-Martín JL, Díaz-López JB, Fernández-Coto MT, Cannata-Andía JB. (2003) Vitamin D status and secondary hyperparathyroidism: the importance of 25-hydroxyvitamin D cut-off levels. Kidney Int Suppl, (85): S44-S48.
58. Goodkin DA, Bragg-Gresham JL, Koenig KG, Wolfe RA, Akiba T, Andreucci VE, Saito A, Rayner HC, Kurokawa K, Port FK, Held PJ, Young EW. (2003) Association of comorbid conditions and mortality in hemodialysis patients in Europe, Japan, and the United States: the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). J Am Soc Nephrol, 14(12): 3270-3277.
59. Gross AW, Lodish HF. (2006) Cellular trafficking and degradation of erythropoietin and novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). J Biol Chem, 281(4): 2024-2032.

60. Gossmann J, Burkhardt R, Harder S, Lenz T, Sedlmeyer A, Klinkhardt U, Geiger H, Scheuermann EH. (2001) Angiotensin II infusion increases plasma erythropoietin levels via an angiotensin II type 1 receptor-dependent pathway. Kidney Int, 60(1): 83-86.
61. Gupta M, Miller BA, Ahsan N, Ulsh PJ, Zhang MY, Cheung JY, Yang HC. (2000) Expression of angiotensin II type I receptor on erythroid progenitors of patients with post transplant erythrocytosis. Transplantation, 70(8): 1188-1194.
62. Hatano M, Yoshida T, Mimuro T, Kimata N, Tsuchiya K, Sanaka T, Nihei H. (2000) The effects of ACE inhibitor treatment and ACE gene polymorphism on erythropoiesis in chronic hemodialysis patients. Nihon Jinzo Gakkai Shi, 42(8): 632-639.
63. Hattangadi SM, Lodish HF. (2007) Regulation of erythrocyte lifespan: do reactive oxygen species set the clock? J Clin Invest, 117(8): 2075-2077.
64. Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, Dominguez CE, Jurutka PW. (1998) The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. J Bone Miner Res, 13(3): 325-349.
65. Hayashi K, Hasegawa K, Kobayashi S. (2001) Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors on the treatment of anemia with erythropoietin. Kidney Int, 60(5): 1910-1916.
66. Heaney RP. (2008) Vitamin D in health and disease. Clin J Am Soc Nephrol, 3: 1535-1541.
67. Hebbel RP, Eaton JW. (1989) Pathobiology of heme interaction with the erythrocyte membrane. Semin Hematol, 26: 136–149.
68. Holick MF. (2007) Vitamin D deficiency. N Engl J Med, 357(3): 266-281.
69. Holick MF. (2005) Vitamin D for Health and in chronic kidney disease. Seminars in Dialysis, 18(4): 266-275.
70. Hsu CH, Patel S. (1992) Uremic plasma contains factors inhibiting 1 alpha-hydroxylase activity. J Am Soc Nephrol, 3(4): 947-952.
71. Hsu CH, Patel SR, Young EW. (1992) Mechanism of decreased calcitriol degradation in renal failure. Am J Physiol, 262(2 Pt 2): F192-F198.

72. Icardi A, Paoletti E, De Nicola L, Mazzaferro S, Russo R, Cozzolino M. (2013) Renal anaemia and EPO hyporesponsiveness associated with vitamin D deficiency: the potential role of inflammation. Nephrol Dial Transplant, 28(7): 1672-1679.
73. Imai N, Kawamura A, Higuchi M, Oh-eda M, Orita T, Kawaguchi T, Ochi N. (1990) Physicochemical and biological comparison of recombinant human erythropoietin with human urinary erythropoietin. J Biochem, 107(3): 352-359.
74. Inoue A, Babazono T, Iwamoto Y. (2008) Effects of the Renin-Angiotensin system blockade on hemoglobin levels in type 2 diabetic patients with chronic kidney disease. Am J Hypertens, 21(3): 317-322.
75. Ishani A, Solid CA, Weinhandl ED, Gilbertson DT, Foley RN, Collins AJ. (2008) Association between number of months below K/DOQI haemoglobin target and risk of hospitalization and death. Nephrol Dial Transplant, 23(5): 1682–1689.
76. Ishigami J, Onishi T, Shikuma S, Akita W, Mori Y, Asai T, Kuwahara M, Sasaki S, Tsukamoto Y. (2013) The impact of hyporesponsiveness to erythropoietin-stimulating agents on time-dependent mortality risk among CKD stage 5D patients: a single-center cohort study. Clin Exp Nephrol, 17(1): 106-114.
77. Jarsch M, Brandt M, Lanzendörfer M, Haselbeck A. (2008) Comparative erythropoietin receptor binding kinetics of C.E.R.A. and epoetin-beta determined by surface plasmon resonance and competition binding assay. Pharmacology, 81: 63-69.
78. Jelkmann W. (1992) Erythropoietin: structure, control of production, and function. Physiol Rev, 72: 449-489.
79. Jimeno L, Rodado R, Barrios Y, Campos M, Llorente S, Nicolas F, Minguela A. (2005) Influence of angiotensin-converting enzyme polymorphism gene, IGF-1, and other factors in the response rate of hematocrit to enalapril treatment in patients with posttransplant erythrocytosis. Transplant Proc, 37(2): 1012-1013.
80. Jeong KH, Lee TW, Ihm CG, Lee SH, Moon JY. (2008) Polymorphisms in two genes, IL-1B and ACE, are associated with erythropoietin resistance in Korean patients on maintenance hemodialysis. Exp Mol Med, 40(2): 161-166.

81. Julian BA, Brantley RR Jr, Barker CV, Stopka T, Gaston RS, Curtis JJ, Lee JY, Prchal JT. (1998) Losartan, an angiotensin II type 1 receptor antagonist, lowers hematocrit in posttransplant erythrocytosis. J Am Soc Nephrol, 9(6): 1104-1108.
82. Jones SS, D'Andrea AD, Haines LL, Wong GG. (1990) Human erythropoietin receptor: cloning, expression, and biologic characterization. Blood, 76(1): 31-35.
83. Kalantar-Zadeh K, Kuwae N, Regidor DL, Kovesdy CP, Kilpatrick RD, Shinaberger CS, McAllister CJ, Budoff MJ, Salusky IB, Kopple JD. (2006) Survival predictability of time-varying indicators of bone disease in maintenance hemodialysis patients. Kidney Int, 70(4): 771-780.
84. Katavetin P, Tungsanga K, Eiam-Ong S, Nangaku M. (2007) Antioxidative effects of erythropoietin. Kidney Int Suppl, 107: S10-S15.
85. Kaysen GA, Müller HG, Ding J, Chertow GM. (2006) Challenging the validity of the EPO index. Am J Kidney Dis, 47: 157–166.
86. KDIGO Guidelines. (2012) KDIGO Clinical Practice Guideline for Anemia in Chronic Kidney Disease. Kidney International Supplements, 2(4): 280-335.
87. Kendrick J, Targher G, Smits G, Chonchol M. (2009) 25-Hydroxyvitamin D deficiency and inflammation and their association with hemoglobin levels in chronic kidney disease. Am J Nephrol, 30(1): 64-72.
88. Kilpatrick RD, Critchlow CW, Fishbane S, Besarab A, Stehman-Breen C, Krishnan M, Bradbury BD. (2008) Greater epoetin alfa responsiveness is associated with improved survival in hemodialysis patients. Clin J Am Soc Nephrol, 3(4): 1077-1083.
89. Kiss I, Kiss Z, Ambrus C, Szabó A, Szegedi J, Balla J, Ladányi E, Csiky B, Árkossy O, Török M, Túri S, Kulcsár I; CKD-MBD Working Group of Hungarian Society of Nephrology. (2013) Age-dependent parathormone levels and different CKD-MBD treatment practices of dialysis patients in Hungary--results from a nationwide clinical audit. BMC Nephrol, 14: 155. doi: 10.1186/1471-2369-14-155.
90. Kiss I, Ambrus C, Kulcsár I, Szegedi J, Kerkovits L, Tislér A, Kiss Z; BBAVHU-DIALGENE Workgroup. (2014) Interaction between Angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and Angiotensin-

converting enzyme inhibition on survival in hemodialyzed patients. Medicine (Baltimore), 93(28): e315. doi: 10.1097/MD.0000000000000315.

91. Kiss Z, Elliott E, Jedynasty K, Tesar V, Szegedi J. (2010) Discovery and basic pharmacology of erythropoiesis-stimulating agents (ESAs), including the hyperglycosylated ESA, darbepoetin alfa: an update of the rationale and clinical impact. Eur J Clin Pharmacol, 66: 331–340.

92. Kiss Z, Ambrus C, Almasi C, Berta K, Deak G, Horonyi P, Kiss I, Lakatos P, Marton A, Molnar MZ, Nemeth Z, Szabo A, Mucsi I. (2011) Serum 25(OH-cholecalciferol concentration is associated with hemoglobin level and erythropoietin resistance in patients on maintenance hemodialysis. Nephron Clin Pract, 117: c373-c378.

93. Kiss Z, Ambrus Cs, Kulcsár I, Szegedi J, Kiss 1 on behalf of the ACEGENE-BB_HU Workgroup. (2015) Effect of ACE gene I/D polymorphism and ACE inhibition on erythropoiesis in patients on hemodialysis. Journal of Renin Angiotensin Aldosteron System, 16(4):1021-1027. (IF: 2,4)

94. Kimata N, Akiba T, Pisoni RL, Albert JM, Satayathum S, Cruz JM, Akizawa T, Andreucci VE, Young EW, Port FK. (2005) Mineral metabolism and haemoglobin concentration among haemodialysis patients in the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). Nephrol Dial Transplant, 20(5): 927-935.

95. Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. (2007) The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. Pharmacol Rev, 59(3): 251-287.

96. Korkor AB. (1987) Reduced binding of [3H]1,25-dihydroxyvitamin D3 in the parathyroid glands of patients with renal failure. N Engl J Med, 316(25): 1573-1577.

97. Kovesdy CP, Kalantar-Zadeh K. (2008) Vitamin D receptor activation and survival in chronic kidney disease. Kidney Int, 73(12): 1355-1363.

98. Koulouridis I, Alfayez M, Trikalinos TA, Balk EM, Jaber BL. (2013) Dose of erythropoiesis-stimulating agents and adverse outcomes in CKD: a metaregression analysis. Am J Kidney Dis, 61(1): 44-56.

99. Koury MJ, Bondurant MC. (1988) Maintenance by erythropoietin of viability and maturation of murine erythroid precursor cells. J Cell Physiol, 137(1): 65-74.

100. Kramer A, Stel V, Zoccali C, Heaf J, Ansell D, Grönhagen-Riska C, Leivestad T, Simpson K, Pálsson R, Postorino M, Jager K; ERA-EDTA Registry. (2009) An update on renal replacement therapy in Europe: ERA-EDTA Registry data from 1997 to 2006. Nephrol Dial Transplant, 24(12): 3557-3566.

101. Kumar VA, Kujubu DA, Sim JJ, Rasgon SA, Yang PS. (2011) Vitamin D supplementation and recombinant human erythropoietin utilization in vitamin D-deficient hemodialysis patients. J Nephrol, 24(1): 98-105.

102. Lac PT, Choi K, Liu IA, Meguerditchian S, Rasgon SA, Sim JJ. (2010) The effects of changing vitamin D levels on anemia in chronic kidney disease patients: a retrospective cohort review. Clin Nephrol, 74(1): 25-32.

103. LaClair RE, Hellman RN, Karp SL, Kraus M, Ofner S, Li Q, Graves KL, Moe SM. (2005) Prevalence of calcidiol deficiency in CKD: a cross-sectional study across latitudes in the United States. Am J Kidney Dis, 45(6): 1026-1033.

104. Le Meur Y, Lorgeot V, Comte L, Szelag JC, Aldigier JC, Leroux-Robert C, Praloran V. (2001) Plasma levels and metabolism of AcSDKP in patients with chronic renal failure: relationship with erythropoietin requirements. Am J Kidney Dis, 38(3): 510-517.

105. Lin FK, Suggs S, Lin CH, Browne JK, Smalling R, Egrie JC. (1985) Cloning and expression of the human erythropoietin gene. Proc Natl Acad Sci USA, 82: 7580–7584.

106. Ling B, Walczyk M, Agarwal A, Carroll W, Liu W, Brenner R. (2005) Darbepoetin alfa administered once monthly maintains haemoglobin concentration in patients with chronic kidney disease. Clin Nephrol, 63: 327–334.

107. Locatelly F, Andrulli S, Memoli B, Maffei C, Del Vecchio L, Aterini S, De Simone W, Mandalari A, Brunori G, Amato M, Cianciaruso B, Zoccali C. (2006) Nutritional-inflammation status and resistance to erythropoietin therapy in haemodialysis patients. Nephrol Dial Transplant, 21(4): 991-998.

108. Macdougall IC. (1999) The role of ACE inhibitors and angiotensin II receptor blockers in the response to epoetin. Nephrol Dial Transplant, 14(8): 1836-1841.
109. Macdougall IC. (2002) Optimizing the use of erythropoietic agents – pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. Nephrol Dial Transplant, 17 Suppl 5: 66-70.
110. Macdougall IC, Cooper AC. (2005) Hyporesponsiveness to erythropoietic therapy due to chronic inflammation. Eur J Clin Invest, 35 (Suppl. 3): 32–35.
111. Macdougall IC, Gray SJ, Elston O, Breen C, Jenkins B, Browne J, Egrie J. (1999) Pharmacokinetics of novel erythropoiesis stimulating protein compared with epoetin alfa in dialysis patients. J Am Soc Nephrol, 10: 2392–2395.
112. Macdougall IC, Robson R, Opatrna S, Liogier X, Pannier A, Jordan P, Dougherty FC, Reigner B. (2006) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous and subcutaneous continuous erythropoietin receptor activator (C.E.R.A.) in patients with chronic kidney disease. Clin J Am Soc Nephrol, 1: 1211–1215.
113. McMahon LP, Cai MX, Baweja S, Holt SG, Kent AB, Perkovic V, Leikis MJ, Becker GJ. (2012) Mortality in dialysis patients may not be associated with ESA dose: a 2-year prospective observational study. BMC Nephrol, 13: 40. doi: 10.1186/1471-2369-13-40.
114. Mann MC, Hobbs AJ, Hemmelgarn BR, Roberts DJ, Ahmed SB, Rabi DM. (2015) Effect of oral vitamin D analogs on mortality and cardiovascular outcomes among adults with chronic kidney disease: a meta-analysis. Clin Kidney J, 8(1): 41-48.
115. Marinkovic D, Zhang X, Yalcin S, Luciano JP, Brugnara C, Huber T, Ghaffari S. (2007) Foxo3 is required for the regulation of oxidative stress in erythropoiesis. J Clin Invest, 117(8): 2133-2144.
116. Marrero MB, Schieffer B, Paxton WG, Heerdt L, Berk BC, Delafontaine P, Bernstein KE. (1995) Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. Nature, 375(6528): 247-250.
117. Matsumura M, Nomura H, Koni I, Mabuchi H. (1997) Angiotensin-converting enzyme inhibitors are associated with the need for increased recombinant human

erythropoietin maintenance doses in hemodialysis patients. Risks of Cardiac Disease in Dialysis Patients Study Group. Nephron, 77(2): 164-168.

118. Messa P, Cozzolino M, Brancaccio D, Cannella G, Malberti F, Costanzo AM, di Luzio Paparatti U, Festa V, Gualberti G, Mazzaferro S; FARO Study Group. (2015) Effect of VDRA on survival in incident hemodialysis patients: results of the FARO-2 observational study. BMC Nephrol, 16: 11. doi: 10.1186/s12882-015-0006-8.
119. Miller JA, Scholey JW. (2004) The impact of renin-angiotensin system polymorphisms on physiological and pathophysiological processes in humans. Curr Opin Nephrol Hypertens, 13(1): 101-106.
120. Miller JE, Molnar MZ, Kovesdy CP, Zaritsky JJ, Streja E, Salusky I, Arah OA, Kalantar-Zadeh K. (2012) Administered paricalcitol dose and survival in hemodialysis patients: a marginal structural model analysis. Pharmacoepidemiol Drug Saf, 21(11): 1232-1239.
121. Minutolo R, Conte G, Cianciaruso B, Bellizzi V, Camocardi A, De Paola L, De Nicola L. (2012) Hyporesponsiveness to erythropoiesis-stimulating agent and renal survival in non-dialysis CKD patients. Nephrol Dial Transplant, 27(7): 2880-2886.
122. Misiti J, Spivak JL. (1979) Erythropoiesis in vitro. Role of calcium. J Clin Invest, 64(6): 1573-1579.
123. Miyake T, Kung CK, Goldwasser E. (1977) Purification of human erythropoietin. J Biol Chem, 252(15): 5558-5564.
124. Molnar MZ, Czira M, Ambrus C, Szeifert L, Szentkiralyi A, Beko G, Rosivall L, Remport A, Novak M, Mucsi I. (2007) Anemia is associated with mortality in kidneytransplanted patients – a prospective cohort study. Am J Transplant, 7: 818–824.
125. Monostori P, Hracskó Z, Karg E, Varga IS, Kiss Z, Boros T, Kiss E, Haszon I, Papp F, Sümegi V, Bereczki C, Túri S. (2009) Erythropoiesis-stimulating agent withdrawal and oxidative stress in hemodialysis. Clin Nephrol, 71(5): 521-526.
126. Monostori P, Kocsis GF, Ökrös Z, Bencsik P, Czétényi O, Kiss Z, Gellén B, Bereczki C, Ocsovszki I, Pipis J, Pálóczi J, Sárközy M, Török S, Varga IS, Kiss I, Fodor E, Csont T, Ferdinandy P, Túri S. (2013) Different administration

schedules of darbepoetin alfa affect oxidized and reduced glutathione levels to a similar extent in 5/6 nephrectomized rats. Clin Exp Nephrol, 17(4): 569-574.

127. Mora C, Navarro JF. (2000) Negative effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors on erythropoietin response in CAPD patients. Am J Nephrol, 20(3): 248

128. Morrone LF, Di Paolo S, Logoluso F, Schena A, Stallone G, Giorgino F, Schena FP. (1997) Interference of angiotensin-converting enzyme inhibitors on erythropoiesis in kidney transplant recipients: role of growth factors and cytokines. Transplantation, 64(6): 913-918.

129. Mrug M, Julian BA, Prchal JT. (2004) Angiotensin II receptor type 1 expression in erythroid progenitors: implications for the pathogenesis of postrenal transplant erythrocytosis. Semin Nephrol, 24(2): 120-130.

130. Mrug M, Stopka T, Julian BA, Prchal JF, Prchal JT. (1997) Angiotensin II stimulates proliferation of normal early erythroid progenitors. J Clin Invest, 100(9): 2310-2314.

131. Mucsi I, Almási C, Deák G, Marton A, Ambrus C, Berta K, Lakatos P, Szabó A, Horváth C. (2005) Serum 25(OH)-vitamin D levels and bone metabolism in patients on maintenance hemodialysis. Clinical Nephrology, 64(4): 288-294.

132. Nakamoto H, Kanno Y, Okada H, Suzuki H. (2004) Erythropoietin resistance in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. Adv Perit Dial, 20: 111-116.

133. Nakao K, Shirakura T, Azuma M, Maekawa T. (1967) Studies on erythropoietic action of angiotensin II. Blood, 29(5): 754-760.

134. Nazem AK, Makó J. (1997) The effect of calcitriol on renal anaemia in patients undergoing long-term dialysis. Int Urol Nephrol, 29(1): 119-127.

135. Nemere I, Farach-Carson MC. (1998) Membrane receptors for steroid hormones: a case for specific cell surface binding sites for vitamin D metabolites and estrogens. Biochem Biophys Res Commun, 248(3): 443-449.

136. Nishio A, Chhatkuli BP, Ma JZ, Kalantari K. (2013) Higher doses of erythropoietin-stimulating agents and hyporesponsiveness to their effects are associated with increased mortality among prevalent hemodialysis patients. Blood Purif, 36(1): 29-33.

137. Neves PL, Triviño J, Casaubon F, Santos V, Mendes P, Romão P, Bexiga I, Bernardo I. (2006) Elderly patients on chronic hemodialysis with hyperparathyroidism: increase of hemoglobin level after intravenous calcitriol. Int Urol Nephrol, 38(1): 175-177.
138. Norman AW. (2006) Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. Endocrinology, 147(12): 5542-5548.
139. Odabas AR, Cetinkaya R, Selcuk Y, Keles S, Bilen H. (2003) The effect of high dose losartan on erythropoietin resistance in patients undergoing haemodialysis. Panminerva Med, 45(1): 59-62.
140. Ogawa T, Shimizu H, Kyono A, Sato M, Yamashita T, Otsuka K, Nitta K. (2014) Relationship between responsiveness to erythropoiesis-stimulating agent and long-term outcomes in chronic hemodialysis patients: a single-center cohort study. Int Urol Nephrol, 46(1): 151-159.
141. Okazaki M, Komatsu M, Kawaguchi H, Tsuchiya K, Nitta K. (2014) Erythropoietin resistance index and the all-cause mortality of chronic hemodialysis patients. Blood Purif, 37(2): 106-112.
142. Panichi V, Rosati A, Bigazzi R, Paoletti S, Mantuano E, Beati S, Marchetti V, Bernabini G, Grazi G, Rizza GM, Migliori M, Giusti R, Lippi A, Casani A, Barsotti G, Tetta C; RISCAVID Study Group. (2011) Anaemia and resistance to erythropoiesis-stimulating agents as prognostic factors in haemodialysis patients: results from the RISCAVID study. Nephrol Dial Transplant, 26(8): 2641-2648.
143. Patel NM, Gutiérrez OM, Andress DL, Coyne DW, Levin A, Wolf M. (2010) Vitamin D deficiency and anemia in early chronic kidney disease. Kidney Int, 77(8): 715-720.
144. Patel SR, Ke HQ, Vanholder R, Koenig RJ, Hsu CH. (1995) Inhibition of calcitriol receptor binding to vitamin D response elements by uremic toxins. J Clin Invest, 96(1): 50-59.
145. Patterson SD, Rossi JM, Paweletz KL, Fitzpatrick VD, Begley CG, Busse L, Elliott S, McCaffery I. (2015) Functional EpoR pathway utilization is not detected in primary tumor cells isolated from human breast, non-small cell lung,

colorectal, and ovarian tumor tissues. PLoS One, 10(3): e0122149. doi: 10.1371/journal.pone.0122149. eCollection 2015.

146. Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. (2006) Physiology of local renin-angiotensin systems. Physiol Rev, 86(3): 747-803.
147. Paliouras C, Alivanis P, Passadakis P. (2015) Favorable effect of paricalcitol on erythropoiesis in patients undergoing chronic hemodialysis treatment. ERA-EDTA, 28 – 31 May 2015, London, Abstract FP682, Nephrol Dial Transplant, 30(Suppl 3): FP682.
148. Perlstein TS, Pande R, Berliner N, Vanasse GJ. (2011) Prevalence of 25-hydroxyvitamin D deficiency in subgroups of elderly persons with anemia: association with anemia of inflammation. Blood, 117(10): 2800-2806.
149. Pfeffer MA, Burdmann EA, Chen CY, Cooper ME, de Zeeuw D, Eckardt KU, Feyzi JM, Ivanovich P, Kewalramani R, Levey AS, Lewis EF, McGill JB, McMurray JJ, Parfrey P, Parving HH, Remuzzi G, Singh AK, Solomon SD, Toto R; TREAT Investigators. (2009) A trial of darbepoetin alfa in type 2 diabetes and chronic kidney disease. N Engl J Med, 361(21): 2019-2032.
150. Pilz S, Tomaschitz A, Friedl C, Amrein K, Drechsler C, Ritz E, Boehm BO, Grammer TB, März W. (2011) Vitamin D status and mortality in chronic kidney disease. Nephrol Dial Transplant, 26(11): 3603-3609.
151. Pratt MC, Lewis-Barned NJ, Walker RJ, Bailey RR, Shand BI, Livesey J. (1992) Effect of angiotensin converting enzyme inhibitors on erythropoietin concentrations in healthy volunters. Br J Clin Pharmacol, 34(4): 363-365.
152. Rao DS, Shih MS, Mohini R. (1993) Effect of serum parathyroid hormone and bone marrow fibrosis on the response to erythropoietin in uremia. N Engl J Med, 328(3): 171-175.
153. Regidor DL, Kopple JD, Kovesdy CP, Kilpatrick RD, McAllister CJ, Aronovitz J, Greenland S, Kalantar-Zadeh K. (2006) Associations between changes in hemoglobin and administered erythropoiesis-stimulating agent and survival in hemodialysis patients. J Am Soc Nephrol, 17: 1181–1191.
154. Rianthavorn P, Boonyapapong P. (2013) Ergocalciferol decreases erythropoietin resistance in children with chronic kidney disease stage 5. Pediatr Nephrol, 28(8): 1261-1266.

155. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. (1990) An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. J Clin Invest, 86(4): 1343-1346.
156. Rosivall L, Kiss István. Nephrologia, Medintel Könyvkiadó, Budapest, 2003: 157-185, 208-211, 309-323, 729-797, 1100-1109.
157. Rodgers KE, Xiong S, Steer R, diZerega GS. (2000) Effect of angiotensin II on hematopoietic progenitor cell proliferation. Stem Cells, 18(4): 287-294.
158. Saab G, Young DO, Gincherman Y, Giles K, Norwood K, Coyne DW. (2007) Prevalence of vitamin D deficiency and the safety and effectiveness of monthly ergocalciferol in hemodialysis patients. Nephron Clin Pract, 105(3): c132-138.
159. Santoro D, Caccamo D, Lucisano S, Buemi M, Sebekova K, Teta D, De Nicola L. (2015) Interplay of vitamin D, erythropoiesis, and the renin-angiotensin system. Biomed Res Int, 2015: 145828. doi: 10.1155/2015/145828.
160. Saudan P, Halabi G, Perneger T, Wasserfallen JB, Wauters JP, Martin PY; Western Switzerland Dialysis Group. (2006) ACE inhibitors or angiotensin II receptor blockers in dialysed patients and erythropoietin resistance. J Nephrol, 19(1): 91-96.
161. Sasu BJ, Hartley C, Schultz H, McElroy P, Khaja R, Elliott S, Egrie JC, Browne JK, Begley CG, Molineux G. (2005) Comparison of epoetin alfa and darbepoetin alfa biológical activity under different administration schedules in normal mice. Acta Haematol, 113: 163-174.
162. Sawyer ST, Krantz SB, Goldwasser E. (1987) Binding and receptor-mediated endocytosis of erythropoietin in Friend virus-infected erythroid cells. J Biol Chem, 262(12): 5554-5562.
163. Scharla SH. (1998) Prevalence of subclinical vitamin D deficiency in different European countries. Osteoporosis Int, 8: S7-S12.
164. Schiffl H, Lang SM. (1999) Angiotensin-converting enzyme inhibitors but not angiotensin II AT 1 receptor antagonists affect erythropoiesis in patients with anemia of end-stage renal disease. Nephron, 81(1): 106-108.

165. Sezer S, Tutal E, Bilgic A, Ozdemir FN, Haberal M. (2007) Possible influence of vitamin D receptor gene polymorphisms on recombinant human erythropoietin requirements in dialysis patients. Transplant Proc, 39(1): 40-44.
166. Sharples EJ, Varagunam M, Sinnott PJ, McCloskey DJ, Raftery MJ, Yaqoob MM. (2006) The effect of proinflammatory cytokine gene and angiotensin-converting enzyme polymorphisms on erythropoietin requirements in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. Perit Dial Int, 26(1): 64-68.
167. Shoji T1, Shinohara K, Kimoto E, Emoto M, Tahara H, Koyama H, Inaba M, Fukumoto S, Ishimura E, Miki T, Tabata T, Nishizawa Y. (2004) Lower risk for cardiovascular mortality in oral 1alpha-hydroxy vitamin D3 users in a haemodialysis population. Nephrol Dial Transplant, 19(1): 179-184.
168. Sinclair AM, Coxon A, McCaffery I, Kaufman S, Paweletz K, Liu L, Busse L, Swift S, Elliott S, Begley CG. (2010) Functional erythropoietin receptor is undetectable in endothelial, cardiac, neuronal, and renal cells. Blood, 115(21): 4264-4272.
169. Sinclair AM. (2013) Erythropoiesis stimulating agents: approaches to modulate activity. Biologics, 7: 161-174.
170. Sim JJ, Lac PT, Liu IL, Meguerditchian SO, Kumar VA, Kujubu DA, Rasgon SA. (2010) Vitamin D deficiency and anemia: a cross-sectional study. Ann Hematol, 89(5): 447-452.
171. Syed RS, Reid SW, Li C, Cheetham JC, Aoki KH, Liu B, Zhan H, Osslund TD, Chirino AJ, Zhang J, Finer-Moore J, Elliott S, Sitney K, Katz BA, Matthews DJ, Wendoloski JJ, Egrie J, Stroud RM. (1998) Efficiency of signalling through cytokine receptors depends critically on receptor orientation. Nature, 395: 511-516.
172. Szczech LA, Barnhart HX, Inrig JK, Reddan DN, Sapp S, Califf RM, Patel UD, Singh AK. (2008) Secondary analysis of the CHOIR trial epoetin-alpha dose and achieved hemoglobin outcomes. Kidney Int, 74: 791–798.
173. Solomon SD, Uno H, Lewis EF, Eckardt KU, Lin J, Burdmann EA, de Zeeuw D, Ivanovich P, Levey AS, Parfrey P, Remuzzi G, Singh AK, Toto R, Huang F, Rossert J, McMurray JJ, Pfeffer MA; Trial to Reduce Cardiovascular Events with Aranesp Therapy (TREAT) Investigators. (2010) Erythropoietic response

and outcomes in kidney disease and type 2 diabetes. N Engl J Med, 363(12): 1146-1155.

174. Suttorp MM, Hoekstra T, Rotmans JI, Ott I, Mittelman M, Krediet RT, Dekker FW. (2013) Erythropoiesis-stimulating agent resistance and mortality in hemodialysis and peritoneal dialysis patients. BMC Nephrol, 14: 200. doi: 10.1186/1471-2369-14-200.

175. Takács I, Benkő I, Toldy E, Wikonkál N, Szekeres L, Bodolay E, Kiss E, Szabó B, Valkusz Zs, Kovács T, Szabó A, Bittner N, Várbíró Sz, Sziller I, császár A, Kiss RG, Lakatos P. (2014) Második magyarországi konszenzus a D-vitamin szerepéről a betegségek megelőzésében és kezelésében. Magyar Orvos, 1 (Szupplementum): 1-26.

176. Teng M, Wolf M, Ofsthun MN, Lazarus JM, Hernán MA, Camargo CA Jr, Thadhani R. (2005) Activated injectable vitamin D and hemodialysis survival: a historical cohort study. J Am Soc Nephrol, 16(4): 1115-1125.

177. Teng M1, Wolf M, Lowrie E, Ofsthun N, Lazarus JM, Thadhani R. (2003) Survival of patients undergoing hemodialysis with paricalcitol or calcitriol therapy. N Engl J Med, 349(5): 446-456.

178. Tentori F, Hunt WC, Stidley CA, Rohrscheib MR, Bedrick EJ, Meyer KB, Johnson HK, Zager PG; Medical Directors of Dialysis Clinic Inc. (2006) Mortality risk among hemodialysis patients receiving different vitamin D analogs. Kidney Int, 70(10): 1858-1865.

179. Toell A, Degenhardt S, Grabensee B, Carlberg C. (1999) Inhibitory effect of uremic solutions on protein-DNA-complex formation of the vitamin D receptor and other members of the nuclear receptor superfamily. J Cell Biochem, 74(3): 386-394.

180. Tolman C, Richardson D, Bartlett C, Will E. (2005) Structured conversion from thrice weekly to weekly erythropoietic regimens using a computerized decision-support system: a randomized clinical study. J Am Soc Nephrol, 16: 1463-1470.

181. van der Sman-de Beer F, Verhagen C, Rombach SM, Boorsma P, van Manen JG, Korevaar JC, van den Bogaard R, Boeschoten EW, Krediet RT, Navis GJ, Vandenbroucke JP, Dekker FW; NECOSAD Study Group. (2005) ACE I/D

polymorphism is associated with mortality in a cohort study of patients starting with dialysis. Kidney Int, 68(5): 2237-2243.

182. Varagunam M, McCloskey DJ, Sinnott PJ, Raftery MJ, Yaqoob MM. (2003) Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and erythropoietin requirement. Perit Dial Int, 23(2): 111-115.
183. Vlahakos DV, Marathias KP, Madias NE. (2010) The role of the renin-angiotensin system in the regulation of erythropoiesis. Am J Kidney Dis, 56(3): 558-565.
184. Watowich SS. (1999) Activation of erythropoietin signaling by receptor dimerization. Int J Biochem Cell Biol, 31: 1075–1088.
185. Wolf M, Shah A, Gutierrez O, Ankers E, Monroy M, Tamez H, Steele D, Chang Y, Camargo CA Jr, Tonelli M, Thadhani R. (2007) Vitamin D levels and early mortality among incident hemodialysis patients. Kidney International, 72: 1004-1013.
186. Usalan C, Erdem Y, Cağlar M, Altun B, Arici M, Bakkaloğlu M, Yasavul U, Turgan C, Cağlar S. (1998) Effect of enalapril on exaggerated erythropoietin response to phlebotomy in erythrocytosic renal transplant patients. Nephrol Dial Transplant, 13(11): 2884-2889.
187. Zhang Y, Thamer M, Stefanik K, Kaufman J, Cotter DJ. (2004) Epoetin requirements predict mortality in hemodialysis patients. Am J Kidney Dis, 44: 866–876.
188. Zheng Z, Shi H, Jia J, Li D, Lin S. (2013) Vitamin D supplementation and mortality risk in chronic kidney disease: a meta-analysis of 20 observational studies. BMC Nephrol, 14: 199. doi: 10.1186/1471-2369-14-199.
189. Zittermann A. (2003) Vitamin D in preventive medicine: are we ignoring the evidence? British Journal of Nutrition, 89: 552-572.
190. Zittermann A, Jungvogel A, Prokop S, Kuhn J, Dreier J, Fuchs U, Schulz U, Gummert JF, Börgermann J. (2011) Vitamin D deficiency is an independent predictor of anemia in end-stage heart failure. Clin Res Cardiol, 100(9): 781-788.

12. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE (Összesített Impact Factor: 17,805)

12.1. A disszertációhoz kapcsolódó közlemények (Impact Factor: 4,438, két első szerzős tudományos közlemény)

1. **Kiss Z**, Elliott S, Jedynasty K, Tesar V, Szegedi J. (2010) Discovery and basic pharmacology of erythropoiesis-stimulating agents (ESAs), including the hyperglycosylated ESA, darbepoetin alfa: an update of the rationale and clinical impact. European Journal of Clinical Pharmacology, 66: 331-340. (A folyóirat IF értékét Összefoglaló cikk típusú közlemény miatt nem tüntetjük fel.)
2. **Kiss Z**, Ambrus Cs, Almási Cs, Berta K, Deák Gy, Horonyi P, Kiss I, Lakatos P, Marton A, Molnár MZs, Németh Zs, Szabó A, Mucsi I. (2011) Serum 25OH-cholecalciferol concentration is associated with hemoglobin level and erythropoietin resistance in patients on maintenance hemodialysis. Nephron Clinical Practice, 117: c373-c378. (IF: 2,038)
3. **Kiss Z**, Ambrus Cs, Kulcsár I, Szegedi J, Kiss 1 on behalf of the ACEGENE-BB_HU Workgroup. (2015) Effect of ACE gene I/D polymorphism and ACE inhibition on erythropoiesis in patients on hemodialysis. Journal of Renin Angiotensin Aldosteron System, 16(4):1021-1027. (IF: 2,4)

12.2. A diszertáció témájához kapcsolódó, de abban nem szereplő közlemények

1. Monostori P, Kocsis GF, Ökrös Zs, Bencsik P, Czétényi O, **Kiss Z**, Ocsovszki I, Pipis J, Pálóczi J, Sárközy M, Török Sz, Varga IS, Kiss I, Fodor E, Csont T, Ferdinandy P, Túri S. (2013) Different administration schedules of darbepoetin alfa affect oxidized and reduced gluthatione levels to a similar extent in 5/6 nephrectomized rats. Clinical and Experimental Nephrology, 17(4): 569-574. (IF:1,708)

2. Kiss I, Szegedi J, Kulcsár I, Deák Gy, **Kiss Z**, Remport Á, Ambrus Cs. (2013) Célértékek, kétségek és bizonyosságok a renális anaemia kezelésében. Paradigmaváltások a vesepótló kezelésben. A krónikus vesebetegek minőségi dialízis- és gyógyszeres kezelése. II. Hypertonia és Nephrologia, 17(2): 59-62.
3. **Kiss Z**, Mucsi I, Túri S, Szabó A, Kiss I, Szebeni A, Kecskeméti V, Tóth M, Lakatos P. (2011) Parathormon extraszkeletális hatásai. LAM-KID, 1(3): 21-27.
4. Monostori P, S Varga I, **Kiss Z**, Kiss I, Haszon I, Papp F, Sümegi V, Bereczki Cs, Németh I, Túri S. (2010) Erythropoiesisstimuláló hatóanyagok és az oxidatív stressz kapcsolata hemodializált betegekben Hypertonia és Nephrologia, 14(6): 281-285.
5. Monostori P, Hracskó Zs, Boros T, Karg E, Kiss É, S. Varga I, **Kiss Z**, Haszon I, Papp F, Sümegi V, Bereczki Cs, Túri S. (2009) Alterations in oxidative stress during the erythropoietin therapy and its transient withdrawal in hemodialysed patients. Clinical Nephrology, 71(5): 521-526. (IF: 1,373)
6. **Kiss Z**, Kulcsár I, Kiss I. (2008) Hemoglobin variabilitás krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegekben. Orvosi Hetilap, 149(41): 1923-1932.

12.3. A disszertációtól független közlemények

1. Kiss I, Szegedi J, Kulcsár I, Ambrus Cs, Kerkovits L, Tislér A, **Kiss Z**. 2015Az angiotenzin-konvertáz enzim (ACE) -gén inszerciós/deléció (I/D) polimorfizmusának hatása hemodializált betegek túlélésére. Hypertonia és Nephrologia, 19(4): 159-163.
2. Kiss I, Ambrus Cs, Kulcsár I, Szegedi J, Kerkovits L, Tislér A, **Kiss Z** on behalf of the BBAVHU-DIALGENE Workgroup. (2014) Interaction between angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and angiotensin-converting enzyme inhibition on survival in hemodialyzed patients. Medicine (Baltimore), 93(28): e315. doi: 10.1097/MD.0000000000000315. (IF: 5,723)
3. Kiss I, **Kiss Z**, Ambrus Cs, Szabó A, Szegedi J, Balla J, Ladányi E, Csiky B, Árkossy O, Török M, Túri S, Kulcsár I. (2013) Age dependent parathormone

level and different CKD-MBD treatment practice of dialysed patients in Hungary - results from nationwide clinical audit. BMC Nephrology, 14: 155. doi: 10.1186/1471-2369-14-155. (IF: 1,52)

4. Józsa L, **Kiss Z**. (2013) Paleolit táplálkozás napjainkban és az őskőkorban. Orvosi Hetilap, 154(8): 318-321.
5. **Kiss Z**, Kiss I, Józsa L. (2012) Osteoporosis és a táplálkozás kapcsolata az emberré válás története során. LAM-KID, 2(3): 39-45.
6. Kiss I, **Kiss Z**, Szabó A, Szegedi J, Balla J, Ladányi E, Csiky B, Árkossy O, Török M, Túri S, Kulcsár I. (2012) Szakmai irányelvek és klinikai gyakorlat: a csont- és ásványianyagcsere-betegség klinikai auditja felnőtt dializált betegekben Magyarországon. Hypertonia és Nephrologia, 16(1): 23-30.
7. **Kiss Z**, Ambrus Cs, Szabó A, Szegedi J, Balla J, Török M, Ladányi E, Csiky B, Árkossy O, Túri S, Kulcsár I, Kiss I. (2012) Csontelváltozás és lágyrész-kalcifikáció és meghatározó faktorai dializált betegekben. Hypertonia és Nephrologia, 16(3-4): 139-147.
8. Linder A, Fornádi K, Lázár AS, Czira ME, Dunai A, Zoller R, Véber O, Szentkirályi A, **Kiss Z**, Toronyi É, Mucsi I, Novák M, Molnár MZs. (2012) Periodic Limb Movements in Sleep are independent risk factor for stroke and cardiovascular disease in patients with renal failure. Journal of Sleep Research, 21: 297-307. (IF: 3,043)
9. **Kiss Z**, Szabó A, Mucsi I, Túri S, Balla J, Török M, Kulcsár I, Szegedi J, Csiky B, Ladányi E, Árkossy O, Tislér A, Deák Gy, Kiss I. (2011) Kalcimimetikum szerepe a dializáltak szekunder hyperparathyreosisának (sHPT) kezelésében. Hypertonia és Nephrologia, 15(4): 162-169.
10. Lakatos P, **Kiss Z**, Kuluncsics Z, Szekeres L, Horváth Cs, Poór Gy. (2011) A RANK-ligand-gátlás előnyei a posztmenopauzás osteoporosis kezelésében. Magyar Reumatologia, 52: 34–39.
11. Kiss E, Kuluncsics Z, **Kiss Z**, Poór Gy. (2010) Monoklonális antitest terápia, különös tekintettel a denosumabra. Orvosi Hetilap, 151: 2137-2144.
12. **Kiss Z**, Mucsi J, Papp Gy, Kopa Zs. (2005) Gondolatok a PDE5 gátlókat összehasonlító preferencia vizsgálatokról. Magyar Andrológia, 10(2): 59-63.

13. Révai T, Harmos G, **Kiss Z**. (2000) Antilipémiás szerek a nephrosis syndromában. Praxis, 9(11): 72-73.
14. Révai T, **Kiss Z**, Somos É. (2000) Nefrózis szindróma és a renális dopaminerg-rendszer. Medicus Universalis, 32(3): 211-212.
15. Révai T, Harmos G, **Kiss Z**. (1999) Losartan alkalmazása peritoneális tuberculosissal kapcsolatos nefrozis szindromában. Medicus Universalis, 32(3): 149-150.
16. Révai T, Harmos G, **Kiss Z**. (1999) A diabetesz nefropátia genetikai prediszpozíciója. Medicus Universalis, 32(2): 79-80.
17. Révai T, Somos É, Harmos G, **Kiss Z**. (1999) A diabetesz nefropátia vizsgálata Mircal-teszt felhasználásával a II. Kerületben gondozott diabeteszes betegekben és a mikroalbuminuria mérésének jelentősége a betegek gondozásában. Medicus Universalis, 32(1): 11-13.

13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Az itt közölt eredmények nem születhettek volna meg a vizsgálatokban részt vevő betegek és a kollégák nélkül. Különösen hálás vagyok a folyamatos szakmai és emberi támogatásért, amit Kiss István professzor úrtól kaptam. Többek között az erythropoietin kezeléssel kapcsolatos kérdések iránti elköteleződésem, majd a klinikai vizsgálatok és publikációk nagy része is professzor úr személyéhez kötődik. Hivatástudata, és emberi méltósága már majd két évtizedes például szolgál a számomra. Köszönetemet fejezem ki Steven Elliott-nak, akitől rengeteget tanulhattam az erythropoietin készítmények szerkezete és hatásmechanizmusa közötti kapcsolatról. Az Ő segítségével és mindig türelmes támogatásával kerülhetett közlésre az elméleti modell, a MEC koncepció továbbfejlesztése. A D-vitamin témájú munka dr. Mucsi István személyéhez kötődik. István magas szintű szakmai elköteleződése szintén példa értékű a számomra. Nagyon megtisztelő a számomra, hogy kutatási ötleteim, szakmai kérdéseim mindig nyitott fülekre talál a vele való közös beszélgetésekkor. Több éves munkakapcsolat köt össze dr. Ambrus Csabával, akivel több tudományos munkán is dolgoztunk együtt, melyek szép és értékes pillanatok számomra. A mindig magas szintű statisztikai elemzéseket dr. Paksy Andrásnak köszönöm. A nephrológia területén végzett munkám során több kiváló kollégával is találkozhattam, akik valamilyen formában hozzájárultak e terület iránti elköteleződésemhez, hatottak rám és mélyítették az ismereteimet. A teljesség igénye nélkül, de mindenképpen meg kell említenem a következő emberek neveit: dr. Angyal Csilla, dr. Nagy Judit, dr. Túri Sándor, dr. Szabó András. Köszönöm barátomnak dr Mucsi Jánosnak a folyamatos szakmai és emberi támogatást. Hálás vagyok a szüleimnek, gyerekeimnek és a páromnak, akik elviselték a munka miatti távollétemet, és akikkel egyre erősödő és értékesebb kapcsolat köt össze és ezáltal magam is erősebb lehetek.