

# **DIPLOMAMUNKA**

**Márton Rege Anna**

**2020**

**Állatorvostudományi Egyetem**  
Belgyógyászati Tanszék és Klinika

**A szérum hepcidinszint vizsgálata vesebeteg kutyákban LC-MS/MS  
módszerrel**

**Készítette:** Márton Rege Anna

**Témavezető:**

Dr. Vizi Zsuzsanna  
kórházvezető klinikai állatorvos, PhD-hallgató  
ÁTE Belgyógyászati Tanszék és Klinika

Budapest, 2020

## TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....	3
2. BEVEZETÉS .....	5
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....	7
3.1. A hepcidin.....	7
3.1.1. A hepcidin felfedezése .....	7
3.1.2. A hepcidin szerkezete .....	7
3.1.3. A hepcidin szintézise és forgalma a szervezetben .....	8
3.2. A hepcidin szerepe a szervezetben .....	8
3.2.1. A vasmetabolizmus .....	8
3.2.2. A hepcidin szerepe a vas anyagforgalmában .....	10
3.2.3. A hepcidin szintézisét befolyásoló tényezők .....	11
3.3. A hepcidin vizsgálata és kvantitatív mérési módszerei .....	13
3.3.1. A hepcidin vizsgálata a humán orvostudományban.....	13
3.3.2. A hepcidin vizsgálata kutyákban .....	14
3.4. A hepcidin szerepe az akut vesebetegségben (AKI) .....	15
3.5. A hepcidin szerepe a krónikus vesebetegségben (CKD).....	18
3.6. A hepcidin jelentősége a klinikai gyakorlatban.....	20
3.6.1. A hepcidin diagnosztikai és terápiás értéke vesebetegségben .....	20
3.6.2. A hepcidin-ferroportin tengely, mint terápiás célpont.....	21
3.7. Hecpidin az állatorvoslásban: A hepcidin és a vas-státusz összefüggése krónikus vesebeteg macskákban.....	22
4. CÉLKITŰZÉSEK .....	23
5. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	23
5.1. Mintavétel és a minták laboratóriumi vizsgálata .....	23
5.2. A hepcidin mennyiségi mérése .....	24
5.3. Statisztikai analízis .....	26
6. EREDMÉNYEK .....	27
6.1. A vizsgált populáció jellemzői .....	27
6.2. A vesebeteg kutyák szérum hepcidinszintjének vizsgálata .....	28
6.3. Korrelációs vizsgálatok és a hepcidin CRP szerinti vizsgálata .....	28
7. MEGBESZÉLÉS.....	30
8. ÖSSZEFOGLALÓ .....	32
9. SUMMARY .....	33
10. IRODALOMJEGYZÉK.....	34

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	37
NYILATKOZATOK.....	38

## 1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AKI	heveny vesekárosodás (acute kidney injury)
ALT	alanin-aminotranszferáz enzim
BMP-6	bone morphogenic protein-6
cDNS	cirkuláris DNS
CKD	krónikus vesebetegség (chronic kidney disease)
Cp	cöruoplazmin
CRP	C-reaktív protein
DcytB	dudnalis citokróm-B / ferri-reduktáz
DMT-1	divalent metal transporter-1
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EPO	erythropoietin
ESA	erythropoietin-stimulating agents
FPN	ferroportin
GFR	glomeruláris filtrációs ráta
Hb	hemoglobin
HCP-1	hem-carrier protein-1
HFE	hemochromatosis gén fehérje
HIF-1 $\alpha$	hypoxia indukálta faktor-1 $\alpha$
HO	hem-oxigenáz
Htk	hematokrit
IBD	gyulladásos bélbetegség (inflammatory bowel disease)
IL	interleukin
IRI	renal ischaemia reperfusion injury
IRIS	International Renal Interest Society
IRP 1	iron-regulatory protein 1
JAK-2	Janus-kináz-2
K-EDTA	trikálium-etilén-diamin-tetraecetsav
LC-MS/MS	folyadékkromatográfiához kapcsolt tömegspektrometria (liquid chromatography – mass spectrometry)
LEAP-1	liver-expressed antimicrobial peptide-1

LPS	lipopoliszacharid
LUC	large unstained cells
MCH	vörösvérsejtek átlagos hemoglobin-tartalma
MCHC	vörösvérsejtek átlagos hemoglobin-koncentrációja
MCV	vörösvérsejtek átlagos térfogata
mHJV	membránhoz kötött hemojuvenilin (membrane-associated hemojuvenilin)
mRNS	messenger RNS
NGAL	neutrophil gelatinase-associated lipocalin
RES	reticuloendothelialis rendszer
SAA	szérum amyloid-A
SDMA	szimmetrikus dimetil-arginin
SELDI-TOF	surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight
SMAD	small mothers against decapentaplegic protein
spp	species
STAT-3	signal transducer and activator of transcription-3
Tf	transzferrin
TfR-1 és -2	transzferrin-receptor-1 és -2
TVK	teljes vaskötő kapacitás (total iron-binding capacity)
vvs	vörösvérsejt

## 2. BEVEZETÉS

20 évvel ezelőtt humán kutatócsoportok azonosítottak egy, legnagyobb részben a májban termelődő fehérjét, amely a ferroportin-csatornához kötődve gátolja a vasfelszívódást, elzárja a mikroorganizmusok előtt a vasat, ezáltal antimikrobiális hatással rendelkezik. A hepcidinnek (hepatic bactericid protein) elnevezett fehérjéről azóta kiderült, hogy a vasháztartást szabályozó legfontosabb molekula a szervezetben, melynek szerepét számos humán orvosi kutatás vizsgálja különböző gyulladásos kórképekben, így a heveny és az idült vesebetegségben is. Az elmúlt évek eredményei arra engednek következtetni, hogy a hepcidin termelődését jelentősen stimulálja a szervezet gyulladásos állapota, ennek pedig nagy jelentősége van a gyulladásos nemregeneratív anaemia kialakulásában, valamint az akut megbetegedések során a vas által okozott sejtkárosodás mértékének csökkentésében. A hepcidin további kapcsolata a vesebetegségekkel, hogy a fehérje csak a veséken keresztül választódik ki, így a szervműködés beszűkülésével több hepcidin marad vissza, mint egy egészséges szervezetben, amely a molekula által kiváltott hatásokban szintén szerepet játszik.

Amikor egy kórkép kapcsán vérszegénységgel állunk szemben, az elkülönítő kórjelzés szempontjából értékes információt jelenthet, hogyha az anaemia kialakulásához vezető mechanizmusokat ismerjük, így a jövőben a hepcidin vérszintjének vizsgálata, annak klinikai gyakorlatban való alkalmazásának jelentősége számottevő lehet. A diagnosztikai munka mellett pedig a terápiás szempontokat is meghatározhatja, ugyanis humán orvosi kutatások során megfigyelték, hogy azok a vérszegény betegek, akiknél emelkedett hepcidinszintet mértek, egyértelműen rosszabbul reagáltak a vörösvérsejtek képzését támogató ESA-kezelésre (erythropoietin-stimulating agents). Továbbá lehetőség nyílhat olyan hatóanyagok használatára, melyek a hepcidin hatásmechanizmusát célozzák meg – számos ezek közül már vizsgálat alatt áll.

A hepcidin mérésének klinikai gyakorlati használata még az emberorvoslásban is csupán célkitűzés, melynek legfőbb oka, hogy a molekula mérésére még nem létezik egyezményes, a klinikai gyakorlatban rutinszerűen használható módszer. A legmegbízhatóbbnak jelenleg a folyadékkromatográfiához kapcsolt tömegspektrometriát (LC-MS/MS) tartják.

Bár a humán orvosi kutatások miatt számos adatról rendelkezünk már a hepcidin hatásával kapcsolatban, ennek a fehérjének a jelentősége kutyák vesebetegségeiben egyelőre nem ismert. Korábban az Állatorvostudományi Egyetem kutatásának keretein belül LC-MS/MS módszer segítségével meghatározták az egészséges kutyák hepcidinre vonatkozó

referenciatartományát, amely lehetővé tette, hogy a jövőben az egyes kórképekben ehhez képest mutakozó eltéréseket vizsgáljuk.



### **3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS**

#### **3.1. A hepcidin**

##### **3.1.1. A hepcidin felfedezése**

A hepcidin felfedezése, elnevezése és a vasmetabolizmusban betöltött szerepének felvetése a 2000-es évek elején három, egymástól független kutatócsoporthoz köthető. (1) Krause és mtsai (2000) egy addig ismeretlen, 25 aminosavból álló, ciszteinben és diszulfid-hidakban gazdag, defenzin-típusú peptidet mutattak ki emberi plazma ultrafiltrátumból, amelyről génexpressziós vizsgálatokkal megállapították, hogy legnagyobb részben a máj sejtei termelik, valamint antimikrobiális és dózisfüggő antifungális hatással is rendelkezik. Az ezen tulajdonságai alapján LEAP-1-nek (liver-expressed antimicrobial peptide) elnevezett, újonnan felfedezett fehérjével a veseszületett, nem specifikus immunitás egy új ajtaja tárult fel. (1,2,3)

Park és mtsai (2000) csupán néhány hónappal később emberi vizeletből egy szintén 25 aminosav hosszúságú, ciszteinben gazdag, antimikrobiális hatással bíró peptidet mutattak ki, melyről megállapították, hogy egy 84 aminosavból álló propeptid formájában keletkezik a májban. Ezen jellemzői alapján a kutatócsoport a felfedezett fehérjét hepcidinnek (hepatic bactericid protein) nevezte el. Tanulmányuk során a hepcidinnek másik két, rövidebb formáját is sikerült azonosítaniuk vizeletből, amelyek 20-, illetve 22 aminosav hosszúságúak (hepcidin-20, illetve hepcidin-22). (1,3,4)

Pigeon és mtsai (2000) nemsokkal ezután vetették fel elsőként a hepcidin és a vasmetabolizmus kapcsolatát, ugyanis megfigyelték, hogy csökkent májműködésű betegeknél gyakran figyelhető meg vasfelhalmozódás. Kísérletükben egészséges és vassal túladagolt egereket vizsgálva azonosítottak egy génszakaszt, amely az utóbbi csoportban nagyobb mennyiségben expresszálódik, és egy olyan fehérjét kódol, amely nagymértékű homológiát mutat az emberi hepcidinnel. (1,5)

##### **3.1.2. A hepcidin szerkezete**

A hepcidin szerkezete két  $\beta$ -redőből áll, melyek hajtókanyarként kapcsolódnak. Két szálát 4 intramolekuláris diszulfid-híd stabilizálja, amely egy sajátos létraszerű konfigurációt kölcsönöz a molekulának. Hidrofil és hidrofób oldalláncai révén amfipatikus tulajdonságú, ami a legtöbb antimikrobiális fehérjére jellemző. A szervezetben a hepcidinnek 20-, 22- és 25 aminosavas formája is megtalálható; a két, illetve öt aminosavval kevesebb molekulák az N-terminális vég megcsonkításából származnak. Mivel a molekula hatásmechanizmusáért éppen ez a rész felel, aktív formának csak a hepcidin-25 nevezhető, másik két alakja pedig lényegében inaktív. Míg a hepcidin-20 és-25 a vérből és a vizeletből is detektálható, addig a 22 aminosavas

forma csak a vizeletből mutatható ki, ami arra enged következtetni, hogy ez a molekula a hepcidin-25 vizeletben keletkezett degradációs terméke. (1,4,6,7,8,9,10,11,12) Az emberi hepcidin aminosav-szekvenciáját az 1. ábra szemlélteti.

1.ábra: A hepcidin aminosav-szekvenciája, a diszulfid-hidakat feltüntetve



Forrás: Park és mtsai, 2000 (4)

### 3.1.3. A hepcidin szintézise és forgalma a szervezetben

A hepcidin főleg a májban termelődik. Génje egy 84 aminosavból álló pre-prohepcidin nevű fehérjét kódol, amely enzimatis hasításon esik át, és egy 64 aminosav-tartalmú prohepcidinné bomlik, ami főleg a portalis vénák körül elhelyezkedő sejtekben termelődik. Ezután a molekula a furin-like proprotein konvertáz enzim hatására alakul át a 25 aminosavat tartalmazó aktív hepcidinné, ami a májsejtek basolateralis oldalán ürül a sinusoidokba. (1,7,12)

Mivel a molekula fehérje-affinitása alacsony (200-300 nM) az öt szállító  $\alpha$ 2-makroglobulinhoz, a hepcidin nagy része a vérben szabadon, kötetlen állapotban kering. Ennél fogva és kis molekulatömege (2,7 kDa) miatt szabadon, gyorsan filtrálódik a glomeruluson át, majd főleg a proximalis tubulusban megalin-dependens endocytosison megy keresztül. Reabszorpciója után a többi kis méretű fehérjéhez hasonlóan lebomlik, és csak egy kis mennyiség detektálható belőle a vizeletben. (10,13,14,15)

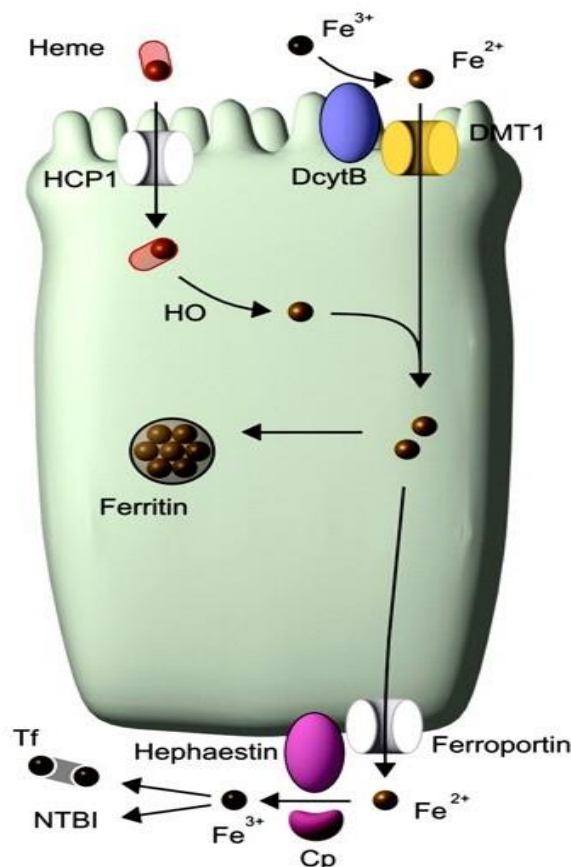
## 3.2. A hepcidin szerepe a szervezetben

### 3.2.1. A vasmetabolizmus

A vas egy olyan átmeneti fém, mely nélkülözhetetlen minden fejlettebb egysejtű, növény, állat és ember számára. Fontos összetevője a szervezetben lévő oxigénszállító molekuláknak (hemoglobin, myoglobin) és egyes enzimeknek (citokrómok), valamint részt vesz a szervezet nem specifikus védekező reakcióiban is. (1,6,15,16) Mivel szabad ion formájában erősen toxikus, a szervezetben mindig fehérjéhez kötötten fordul elő. (13) Egy átlagos felnőtt emberi szervezet 4-6 mg vasat tartalmaz, melynek kétharmada a vörösvérsejtekben – a hemoglobin részeként – található meg, 15-30%-a a reticuloendothelialis

(RES) sejtekben, hepatocytákban és enterocytákban raktározódik ferritin (vagy hemosiderin) formájában, 4-5%-a myoglobinban és egyéb fehérjékben fordul elő, és mindössze 0,1%-a kering a vérpályában, túlnyomórészt transferrinhez kötődve. A vasesyensúly szervezetszinten történő szigorú szabályozásának kettős célja van; egyfelől, hogy a sejtek hozzájussanak a biológiai folyamataikhoz szükséges vashoz, másrészt pedig, hogy elkerüljék a vas sejten belüli túlzott felhalmozódását, amely oxidatív károsodáshoz vezetne. (13)

2. ábra: A vas felszívódása a bélhámsejtekből és a transzportjában résztvevő molekulák



Forrás: Swinkels és mtsai, 2006 (17)

A szervezetbe a táplálékkal bejutó anorganikus, ionizált vas a béllumenben trivalens ( $\text{Fe}^{3+}$ ) formában található meg, amely nem képes felszívódni, így az enterocyták apicalis felszínén lévő ferri-reduktáz enzim divalens formává ( $\text{Fe}^{2+}$ ) alakítja. Ezután a divalens metál transzporter-1 (DMT-1) csatornán keresztül jut az enterocytákba, ahol apoferritinnel képez komplex ferri-vegyületet és ott ferritin formában raktározódik. Abban az esetben, ha a vas állati eredetű takarmánnyal kerül a szervezetbe, hem-ként van jelen a bélcsatornában és a hem-carrier protein-1 (HCP-1) segítségével, intakt módon szívódik fel a bélhámsejtekbe, ott a hem-

oxigenáz (HO) által lebomlik, majd ugyanúgy ferritinként raktározódik. A keringésbe az enterocyták basolateralis membránján lévő ferroportin (FPN) transzportfehérjén át kerül, majd a hephaestin vagy cöruoplazmin fehérje által oxidálódik vissza trivalens formává. Ebben az alakban képes kötődni az apotranszferrinhez, majd tranzferrinként szállítódik a vérplazmában célsejtjeihez. (1,6,13,16,17,18) A vas felszívódásának folyamatát a 2. ábra szemlélteti.

Mivel vas felszívódása a bélcsatornából lassú (néhány mg/nap), a szervezet igényeinek fedezése főképp az újrahasonosításából (előregedett vörösvérsejtekből) és a raktárakból való felszabadulásából adódik. (13)

A vas ürítése túlnyomórészt a leváló bélhámsejtekkel, bélsárral történik, de ugyanezzel a mechanizmussal kis mértékben a bőrön át is kiválasztásra kerülhet, illetve vérzéssel is távozhat. (10) Ürítése fiziológias körülmények között kismértékű (kevesebb, mint 0,1%-a a teljes vaskészletnek / nap), illetve nem szabályozott olyan szigorú mechanizmusokon át, mint a felszívódása, így a szérum vasszint meghatározásában csak a szervezet túltelítettsége vagy jelentős vérvesztés esetén van meghatározó szerepe, amikor megnövekszik a vas kiválasztása. (1,11,15,19)

### **3.2.2. A hepcidin szerepe a vas anyagforgalmában**

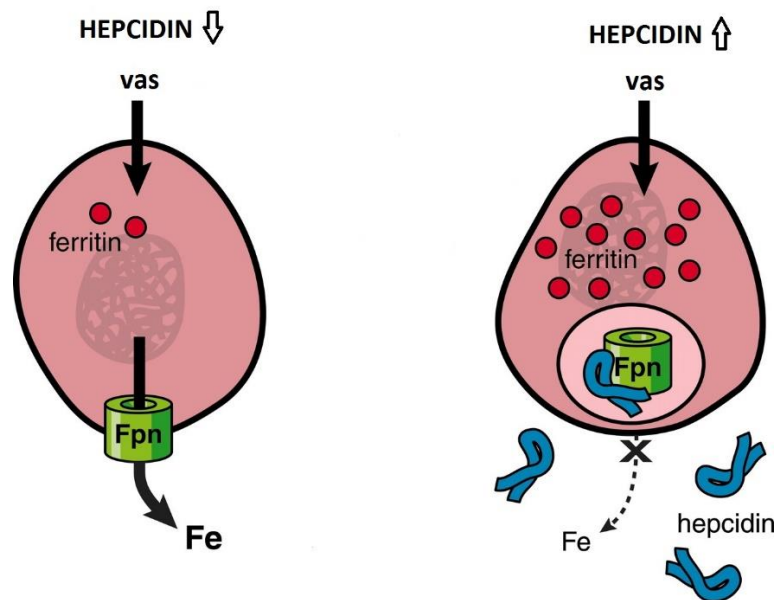
Mai tudásunk szerint a hepcidin a legfontosabb fehérje, amely a vashomeosztázist szabályozza. Hatását a ferroportin–csatornák gátlásán keresztül fejt ki, amelyek megtalálhatóak a bélhámsejteken kívül a májsejtekben, a szöveti macrophagokban és kismértékben a placenta trophoblast sejteiben is. Ahogy a hepcidin kötődik a FPN-csatornához, annak internalizációja és lizoszómális degradációja következik be. (3. ábra) Tekintve, hogy a FPN jelenleg az egyetlen ismert vasexporter, így gátlás alá kerül a vas bejutása a keringésbe és kialakul a hypoferraemia állapota. (1,12,13,15,16,20,21,22)

Ennek a mechanizmusnak a jelentősége kettős, egyrészt elzárja a bejutó kórokozók elől a vasat, tehát részt vesz a szervezet védelmi reakcióiban. Ez különösen hatásos olyan mikroorganizmusok ellen, amelyek patogenezise erősen a vashoz kötött – ezek az úgynevezett siderophil baktériumok, mint például *Vibrio spp*, *Yersinia enterocolitica*. (6,10,15,23,24)

A másik fontos szerepe pedig, hogy a hepcidin a ferroportinnal való direkt kapcsolata révén protektív hatással bír a szervezet vassal való túltelítődése ellen, amely súlyos oxidatív károsodáshoz vezetne. Jelentőségére rámutat, hogy a humán orvoslásban – és nagyon ritkán az állatorvosi területen is – előforduló örökletes hemochromatosis kórkép során hepcidin

hiányában korlátlan a vas felszívódása a bélcsatornából, aminek sejten belüli felhalmozódása súlyos szövetkárosodással és szervezetszintű következményekkel jár. (6,11,15,19,23,25,26)

3. ábra: A hepcidin hatásmechanizmusa a FPN-csatornákon keresztül



Forrás: Ganz, 2007 (26)

### 3.2.3. A hepcidin szintézisét befolyásoló tényezők

Felfedezése óta intenzív kutatás folyik a hepcidin szintézisét szabályozó faktorok és molekulák azonosítására. Jelenlegi ismereteink szerint a hepcidin szintjét a transferrin szaturációja és a vasraktárak teltsége, a szervezet gyulladásos állapota, az erythropoietikus aktivitás és a szisztémás hypoxia szabályozzák. (1,11,15,25,27)

I. Vasraktárfüggő szabályozás: A transferrin telítettségének közvetítése a hepatocyták, mint fő vasraktár felé, a felületükön lévő transferrin-receptor-1 és -2 (TfR-1, -2), valamint a hemochromatosis gén fehérjéből (HFE) létrejövő komplex által történik. Ennek eredményeként hármas komplex jön létre a TfR-2, HFE és a membránhoz kötött hemojuvenilin (mHJV) között. Utóbbi egy májban található fehérje, a bone morphogenic protein-6 (BMP-6) ko-receptora, ami által fokozza a hepcidin transzkripciójának mértékét az úgynevezett BMP/SMAD-útvonalon keresztül (small mothers against decapentaplegic proteins-mediated signaling pathway). A neogenin nevű transzmembrán fehérje támogatja ezt a folyamatot, mert segít a hármas komplex összeállításában és a mHJV funkciójában. A matripáz enzim azonban vashiányos állapotban gátolja ezt a jelátvitelt a mHJV-n keresztül, így ebben az esetben csökken a hepcidin transzkripciójának mértéke. (1,10,11,13,15,16,20,24,27,28)

II. Gyulladástól függő szabályozás: Gyulladásos folyamatok során egyes proinflammatorikus citokinek jelenléte, különböző jelátviteli mechanizmusokon át hatva stimulálja a hepcidin transzkripcióját. Ezek közül a legnagyobb jelentősége az interleukin-6-nak (IL-6) van, amely a JAK-2/STAT-3 (Janus-kináz-2/signal transducer and activator of transcription-3) útvonalon keresztül fejt ki hatását. (6,10,11,15,16,28). Ez az útvonal aktiválódik a fertőzések és különösen a patogén-specifikus molekulák – úgymint a lipopoliszacharidok (LPS) – jelenléte során is, amelyek a makrofágokon hatva indukálják azok IL-6 termelését, ez pedig a májsejtek hepcidin mRNS szintézisét stimulálja. (6,8,11,27,28,29)

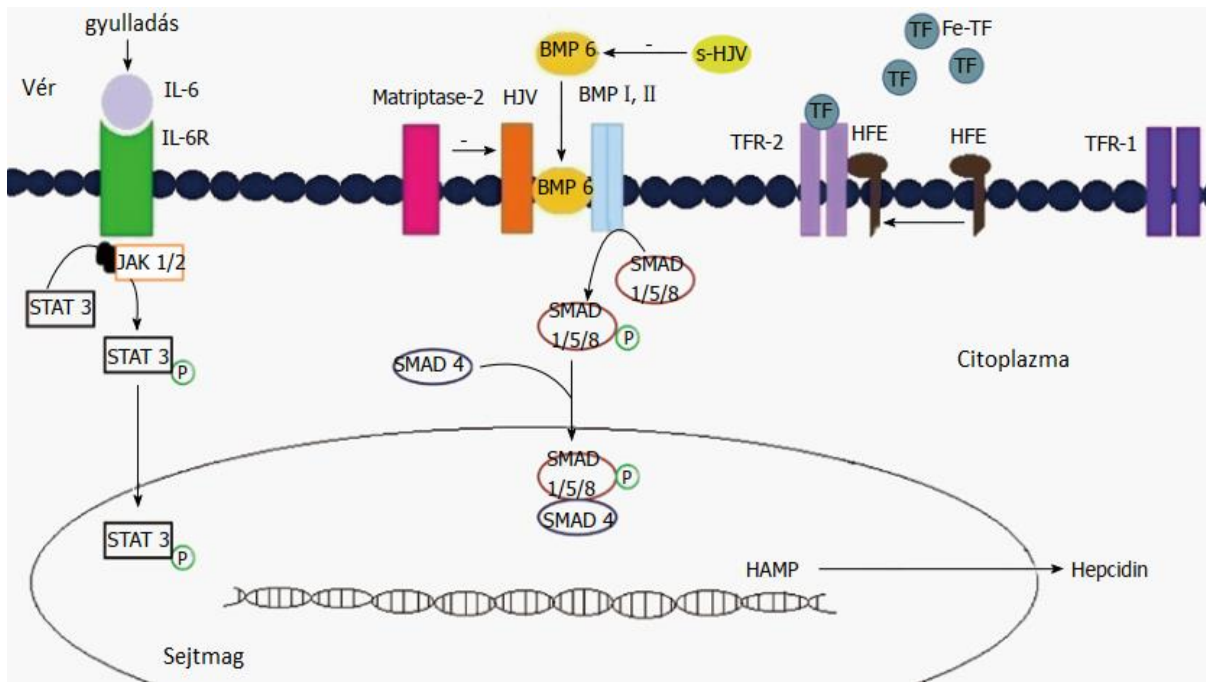
Nemeth és mtsai (2004) kutatásukban IL-6-tartalmú infúzióval kezelt emberek hepcidinszintjét vizsgálták 2 órával a beadás után, és azt tapasztalták, hogy az értéke szignifikánsan magasabbnak volt mérhető, mint a kezelés előtt. Emellett ugyanekkor a szérum vasszintjét és a transferrin telítettségét is összevetették az infúzió beadása előtti értékekkel, és mindkét esetben több, mint 30%-os csökkenést tapasztaltak, ami a hepcidin hatásának tulajdonítható. (27)

Mindezek alapján a hepcidin egy II. típusú akut fázis fehérjének tekinthető, ami egy molekuláris kapcsolatot biztosít a gyulladás, a vasmetabolizáció szabályozása és az ezáltal létrejövő anaemia között, hiszen a csontvelőben zajló vörösvérsejtképzés számára így kevesebb vas áll rendelkezésre. (6,8,12,21,22,25,27,29) A gyulladásos citokinek közül az IL-6 mellett az IL-1 $\beta$  ugyanezen az útvonalon keresztül, az activin B pedig a vasraktárfüggő szabályozásnál leírt BMP-6/SMAD útvonalon keresztül stimulálja a hepcidin szintézisét. (15,16)

III. Erythropoietikus aktivitástól és hypoxiától függő szabályozás: ha anaemia vagy hypoxia áll fenn a szervezetben, a szöveti oxigénnyomás csökkenése által aktivált hypoxia indukált faktor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) fokozza a vese interstitiumában lévő fibroblast-like sejtek erythropoietin (EPO) termelését. Ennek a folyamatnak a lezajlásához jelentős mennyiségű vasra van szükség, így mind az emésztőtraktusból való felszívódás, mind a hepatocytákból és macrophagokból való exportmechanizmusok felerősödnek. A hatás kifejtése érdekében az erythroferron, egy erythroblastok által termelt fehérje direkt módon gátolja a hepcidin szintézisét, kivédve annak hatását. Így tehát az erythropoietikus aktivitás növekedése és a szervezet hypoxiás állapota szupresszíven hatnak a hepcidin szintjére. (10,11,15,27,28)

A hepcidin szintézisét stimuláló molekuláris útvonalakat a 4. ábra szemlélteti.

4. ábra: A hepcidin szintézisét stimuláló útvonalak



Forrás: Sebastiani és mtsai, 2016 (30)

### 3.3. A hepcidin vizsgálata és kvantitatív mérési módszerei

#### 3.3.1. A hepcidin vizsgálata a humán orvostudományban

Felfedezése óta több kutatás tűzte ki célul a hepcidin vizeletből vagy szérumból történő mennyiségi mérésére alkalmas megfelelő módszerének kidolgozását. Napjainkban kevés antitest alapú mérést alkalmaznak, mivel az eljárások hatékonyságát limitálja a molekula kis mérete, komplex struktúrája, alacsony koncentrációja, valamint a fajok közötti nagyfokú konzervatívizmusa, ami nehezíti a hepcidin ellenes antitestek hatékony fejlesztését és az izoformák azonosítását. Első meghatározása vizeletből történt kationcserélő kromatográfia segítségével, amit a hepcidin kemilumineszcens detekción alapuló mérése követett, a módszer azonban csak szemikvantitatívnak bizonyult. A szérumból való méréshez kipróbált Western blot használata szintén nem elterjedt. (1,7)

A szérumból ELISA-val (enzyme-linked immunosorbent assay) való mérés Ganz és mtsai (2008) nevéhez fűződik, akik kutatásuk során meghatározták a módszerhez köthető referenciatartományt. Újabban azonban a tömegspektrometrián alapuló módszerek terjedtek el a hepcidin méréséhez, melyek közül elsőként a SELDI-TOF (surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight) a hepcidin mindhárom formájának mérésére alkalmasnak bizonyult. A jelenlegi legelterjedtebb módszer azonban a vér hepcidin-25 szintjének mérésére egy másik tömegspektrometrián alapuló eljárás, a folyadékkromatográfiához kapcsolt

tömegspektrometria (LC-MS/MS). Ez az eljárás megfelelően megbízható és időhatékony, továbbá kizárólag a hepcidin aktív, 25 aminosavból álló formáját méri, szemben az ELISA módszerrel, így elkerülhetőek az ebből adódó mérési hibák. LC-MS/MS segítségével elsőként Itkonen és mtsai (2012) határozták meg a humán referencia-értéktartományt. Ez férfiak esetén 1,1-15,6 nmol/l, nők esetében pedig 18-50 év közt 0,4-9,2 nmol/l, 50 éves kor felett 0,7-16,8 nmol/l. A nemek közötti különbséget a menstruáció alatti vasvesztésnek, a nőknél lévő életkori eltérést pedig a menopauza előtti, illetve utáni állapotnak tulajdonítják. (7,12,32,33)

A mérések során fontos szem előtt tartani, hogy a hepcidin szobahőmérsékleten csupán egy napig, +4 °C-on 6 napon át, -20°C-on legalább 42 napig, -80°C-on pedig minimum 6 hónapig stabil. (13) A kapott eredményt továbbá befolyásolhatja a vérben keringő hepcidin koncentrációjának cirkadián változása, egyedenként a legalacsonyabb szintet ugyanis a reggeli órákban, a legmagasabb szintet pedig az esti órákban lehet tapasztalni. (32)

### 3.3.2. A hepcidin vizsgálata kutyákban

Fry és mtsai (2004) kutatásukban elsőként klónozták és szekvenálták a kutya hepcidin génjét, valamint meghatározták a hepcidin expressziójának szöveti megoszlását. (3) A kutya cDNS-ből levezetett, 85 aminosav-tartalmú pre-prohepcidin magas fokú, 74%-os homológiát mutatott az emberből izolált 84 aminosav-tartalmú prekursor formával, ami a sertéssel, patkánnyal és egérrel összevetve a legmagasabb. A hepcidinben meghatározott 4 láncon belüli diszulfid híd és 8 cisztein a többi fajban is megtalálható. A kutyából Western blot módszerrel kimutatott 9 kDa-os protein legnagyobb része a májból, kisebb hányada pedig a tüdőből és a vesékből volt kimutatható. (3,8) A Fry és mtsai (2004) által szekvenált kutya hepcidint az 5. ábra mutatja be.

5. ábra: A kutya hepcidinjének nukleotid- és aminosav-sorrendje

```

1  ATGGCACTCAGCTCGCAGACCCAGGCTGCCTGCCTCCTGCTCCTCCTCGCCAGCGTG
   M A L S S Q T Q A A C L L L L L L A S V
61  GCCAGTGTCTCAGTCCTTCCACACCAGACAGGACAGCTCACAGACCTCCGAGCCCAGGAC
   A S V S V L P H Q T G Q L T D L R A Q D
121 ACAGCTGGAGCCGAGGCAGGCCTGCAGCCCACGCTCCAGCTCCGGAGGCTAAGGAGGCGA
   T A G A E A G L Q P T L Q L R R L R R R
181 GACACCCACTTCCCCATCTGCATATTCTGCTGTGGCTGCTGTAAAACACCGAAGTGTGGG
   D T H F P I C I F C C G C C K T P K C G
241 CTCTGCTGCATAACATAG
   L C C I T *

```

Forrás: Fry és mtsai, 2004 (3)



A budapesti Állatorvostudományi Egyetemen már több kutatás keretén belül foglalkoztak egészséges kutyák szérum hepcidinszintjének megfelelő mérési módszerével, melynek során az ELISA módszer pontossága, és így a kapott referencia-értéktartomány pontossága is kétségbe vonhatóvá vált. (8) 2018-ban az LC-MS/MS-t alkalmazva elsőként sikerült pontos és megbízható módon vizsgálni a kutyák szérum hepcidinszintjét, melynek során 86 egészséges kutya értékei kerültek mérésre. Az eredmények alapján az átlagos hepcidinkoncentráció 16,6 ng/ml volt, a meghatározott referencia-értéktartomány pedig 5,3-36,4 ng/ml. (8,12)

### 3.4. A hepcidin szerepe az akut vesebetegségben (AKI)

A vese vizeletkiválasztó, filtrációs tevékenysége néhány nap, vagy akár órák alatt is súlyosan károsodhat, ilyenkor heveny vesekárosodásról beszélünk. Kimenetele változó, az előidéző ok és az elváltozás súlyosságának függvénye. Bár következményei gyakran végzetesek, de az időben alkalmazott gyógykezelés hatására visszafordíthatóak, tehát egy potenciálisan gyógyítható kórképről beszélhetünk. (33) A betegség stádiumokba való besorolását az IRIS (International Renal Interest Society) alkotta meg, melynek alapját a vérplazma kreatininszintje képezi. Ennek legfőbb jellemzőit az 1. táblázat szemlélteti. A betegség súlyosságának további megítélését teszi lehetővé a vizeletprodukciónak a mértéke és a veseműködést helyettesítő dialízis szükségessége. (34)

IRIS stádium	Plazma kreatinin (µmol/L)	Klinikai állapot
I	<140	nem azotaemiás AKI: - kórelőzmény vagy bármilyen vizsgálat alapján bizonyítékok AKI-ra - normálértéken belüli, de 25 µmol/L-nél nagyobb kreatininszint-emelkedés 48 óra alatt - oliguria vagy anuria 6 órán át - folyadékterápiára reagáló AKI
II	141-220	enyhe AKI – ld. I. stádium, valamint az azotaemiás CKD-s betegek esetén
III	221-439	középsúlyos-súlyos AKI – súlyosbodó azotaemia és progresszív veseelégtelenség
IV	440-880	
V	880<	

1. táblázat: Az akut vesebetegség stádiumai

Forrás: International Renal Interest Society, 2016 (34)

A szervezet különböző heveny megbetegedéseiben, így az AKI-ban is gyakori, hogy felborul a vasháztartás egyensúlya, sőt, az AKI patomechanizmusának egyik kulcseleme a vas által okozott oxidatív stressz. Ennek oktatában több tényező is szerepet játszik, úgymint a katekolaminok megnövekedett szintézise, metabolikus acidózis, szöveti károsodások, hemolízis és vérzés. Hatásukra a normális körülmények között elenyésző mennyiségű, katalitikus állapotban lévő vasionok mennyisége a keringésben megnő, ez pedig reaktív oxigénradikálok képződésén keresztül sejtkárosodáshoz vezet, ami pedig tovább súlyosbítja a betegség lefolyását. A nagy mennyiségű szabad vas továbbá elősegíti a különböző mikroorganizmusok elszaporodását és virulenciafaktoraik érvényesülését, ami szintén rosszabb prognózist von maga után. Ebben az aktív gyulladásos környezetben és a vér emelkedett vasszintjének hatására humán kutatások igazolták, hogy nagy mennyiségű hepcidin termelődik, amely a ferroportin-csatornák gátlásával csökkenti a keringő vas mennyiségét és az általa okozott sejtkárosodás mértékét, ezáltal protektív szerepet játszik ezekben a heveny megbetegedésekben. (24,35)

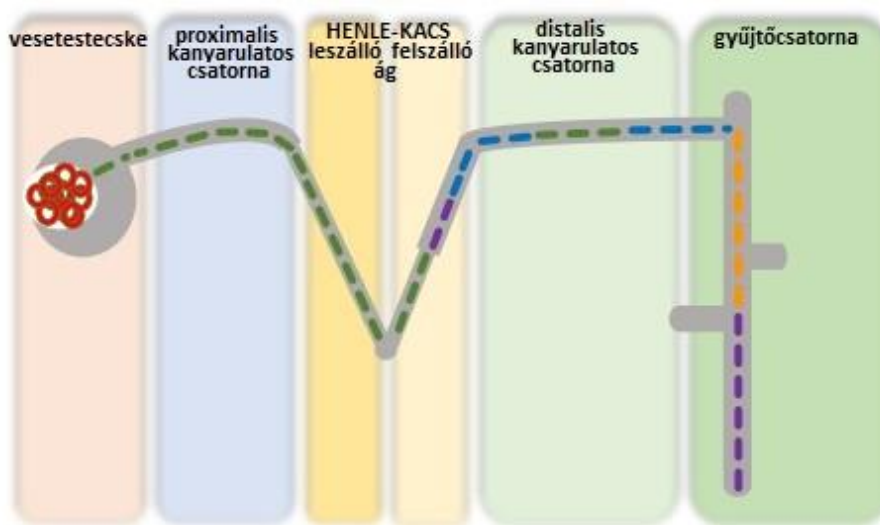
Scindia és munkatársai (2019) szeptikus eredetű AKI-ban vizsgálták a hepcidin jelentőségét, ahol a betegség kialakulásában szerepet játszik a mitokondriális diszfunkció, az endothel- és tubularis epithelkárosodás, valamint a gyulladásos citokinek által előidézett „vihar”. Egerekben kísérletesen lipopoliszacharidok által előidézett AKI esetében szignifikánsan kisebb mértékű glomeruláris károsodás jelentkezett az állatok hepcidinnel történő előkezelése mellett a kontrollcsoportéhoz képest. Bár a hepcidin nem fejtett ki közvetlen hatást a veseparenchymára, de mérsékelte az endotoxinok által okozott sejtkárosító hatást, támogatta a mitokondriális struktúra megőrzését, csökkentette a bacteraemia mértékét és javította a mortalitási arányt. Kimutatható volt továbbá az általa kiváltott hypoferraemia és a szöveti H-ferritin szint emelkedése – utóbbi ferroxidáz aktivitása és vasraktározó szerepe révén szintén korlátozta a mikroorganizmusok vashoz való hozzáférését. (16,24,35)

A hepcidin és a szervezet szeptikus állapota közötti kapcsolatot vizsgálva más kutatások megállapították, hogy a hemodialízisben vagy peritonealis dialízisben részesülő páciensek esetén az eljárás jellege további gyulladásos stimulációt jelent a szervezet számára, ami további szérumban hepcidinszint növekedést eredményezhet. (15,16)

A hepcidin és az AKI közti kapcsolat feltérképezésében a legtöbb humán klinikai kutatás azonban szív-műtéten átesett betegek posztoperatíván kialakult heveny vesebetegségét vizsgálja, ugyanis az eljárásnak ez az egyik leggyakoribb szövődménye. Ilyenkor a műteti körülmények hatására, hemodinamikai okokból következik be a vesekárosodás (IRI = renal ischaemia reperfusion injury), ami negatívan befolyásolja a morbiditást és a mortalitást,

valamint a későbbiekben krónikus vesebetegség kialakulásához vezet. Több tanulmány is rámutatott, hogy a vesekárosodás hatására helyileg is – főleg a Henle-kacs felszálló ágában és a distalis kanyarulatos csatornában – több hepcidin termelődhet, melynek hatására a vizeletben szignifikánsan nagyobb mennyiségű hepcidin-25 detektálható. Azoknál a betegeknél, akiknél ez megfigyelhető volt, egyértelműen kevésbé súlyos vesebetegség alakult ki vagy nem fordult elő ez a műtét utáni szövődmény, ami szintén a hepcidin védelmi szerepét támasztja alá. (14,18,24,36,37) A vese lokális hepcidinprodukciónak a nefron különböző szakaszaiban a 6. ábrán a színes szaggatott vonal szemlélteti.

6. ábra: Helyi hepcidinintermelés a nefron különböző szakaszaiban



kék: magas, lila: közepes, narancssárga: alacsony, zöld: nincs helyi termelés

Forrás: Scindia és mtsai, 2018 (18)

Humán orvosi kutatások továbbá kimutatták, hogy akut vesebetegség során a hepcidin mellett egyéb akut fázis fehérjék termelődése is megnövekedhet, amik a túlzott mennyiségű vas megkötésében és a vese védelmében játszanak szerepet. Ezek közé tartozik a neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), hemopexin, haptoglobin, cöruoplazmin és ferritin, valamint a szervek közül legnagyobb mennyiségben a vesében termelődő iron-regulatory protein 1 (IRP 1), ami ezen fehérjék termelődését befolyásolja. A szervezet tehát a különböző heveny megbetegedések, ezáltal az AKI során is sokrétű szabályozó mechanizmusokon keresztül igyekszik helyreállítani a felborult vasháztartást, amiben a hepcidin szerepe kulcsfontosságúnak bizonyul. (18,24,35,36,37)

### 3.5. A hepcidin szerepe a krónikus vesebetegségben (CKD)

Krónikusnak nevezzük azokat a vesebetegségeket, amelyek több, mint három hónapja fennállnak. Ebben az esetben a veseműködés fokozatosan, folyamatosan csökken, a kórkép pedig az AKI-val szemben gyógyíthatatlan és progresszív jelleget mutat. A kórformával főleg idősebb állatok körében találkozhatunk, de előfordulhat fiatal egyedekben is veleszületett okokból, fertőzéseket vagy ureterelzáródást követően. (38) Az IRIS az idült vesebetegséget is különböző stádiumokba sorolja a plazma kreatininértéke, valamint legújabb ajánlásában az SDMA értéke (szimmetrikus dimetil-arginin) alapján is, súlyosságának további megítélését pedig lehetővé teszi a renalis eredetű proteinuria (vizelet fehérje/kreatinin arány) és a szisztémás artériás vérnyomás értéke. (38,39) A stádiumok legfőbb jellemzőit a kreatinin értéke szerint a 2. táblázat szemlélteti.

IRIS stádium	Plazma kreatinin (µmol/L)	Klinikai állapot
<b>veszélyeztetett</b>	<125	az állat nacionáléja vagy kórelőzménye alapján predisponált vesebetegség kialakulására (pl. egyes fajták, nefrotoxikus gyógyszer)
<b>I</b>	<125	nem azotaemiás – valamilyen más vizsgálati eredmény utal meglévő vesebetegsége: - képkotó eljárás alapján - vese tapintási lelete alapján - vesebiopszia lelete alapján - renalis eredetű proteinuria - növekvő plazma kreatinin a referencia tartományon belül - vizeletkoncentrációs zavar az extrarenalis kórokok kizárása után
<b>II</b>	125-180	enyhén azotaemiás – klinikai tünetekben általában nem vagy enyhén nyilvánul meg
<b>III</b>	180-440	mérsékelten azotaemiás – változatos és eltérően súlyos extrarenalis tünetek
<b>IV</b>	440<	nagy eséllyel kifejezett szisztémás klinikai tünetek és uraemiás krízis

2. táblázat: A krónikus vesebetegség stádiumai

Forrás: International Renal Interest Society, 2017 (39)

Az anaemia előfordulása krónikus vesebetegségben ismert és gyakori jelenség, fennállása pedig összefügg a betegség kedvezőtlenebb kórjóslatával, a magasabb rizikóval egyéb szisztémás jellegű mellékhatásokra, a rosszabb életminőséggel és a mortalitással. (10,11,16,20,22) Oktana több mechanizmusra is visszavezethető, melyek között szerepelnek az

uraemiás toxinok erythropoiesist gátló hatása, az EPO-hiány, a vörösvérsejtek lerövidült élettartama, valamint a vas csökkent felszívódása és fokozott ürítése – többnyire a kialakuló gyomorfekély miatti krónikus vérvesztés során. Ezeket az anaemiát kiváltó tényezőket egészíti ki az elmúlt évek kutatásai alapján a hepcidin, illetve a csökkent vasfelszívódást is ennek hatásával magyarázzák. (10,11,15,20,21,27,28)

Mindezek alapján a CKD során kialakuló anaemia típusa nem egységes. Előfordulhat ugyanis, hogy a szervezet abszolút vashiányban szenved, vagyis kevesebb vas található mind a keringésben, mind az intracellularis vasraktárakban, azonban a CKD –, mint egyéb krónikus betegségek – gyakran gyulladással anaemiát (anaemia of chronic disease, chronic disease-related anaemia vagy inflammation-related anaemia) alakít ki, amelyre a funkcionális vashiány jellemző. Ilyenkor hiába vannak megfelelő vasraktárak, nem jut ki a sejtekből a vas a keringésbe. Ez a hepcidin hatásának tulajdonítható, aminek megemelkedett szintje gátlás alatt tartja a vas keringésbe jutását a ferroportin-csatornákon keresztül. A jelenség a „reticuloendothelialis sejt blokádnak” néven is ismert. (6,10,15,16,18,20,21,22,25,27,28,40,41)

A funkcionális (másnéven szekunder) vashiány más kórképek során is leírásra került, melyek rendre valamilyen krónikus gyulladással állnak összefüggésben, úgymint a gyulladással bélbetegség (IBD), krónikus szívelégtelenség és májelégtelenség, rosszindulatú daganatos megbetegedések és a rheumatoid arthritis. Ezekben a betegségekben is már több kutatás igazolta, hogy megnő a hepcidin termelése, elmondható tehát, hogy fontos szerepet játszik a gyulladással nemregeneratív anaemia kialakításában. Állatkísérletek be is bizonyították, hogy a mesterségesen előidézett CKD során a „hepcidin knockout” egerekben sokkal enyhébb anaemia alakult ki, mint a kontrollcsoportban, ahol a hepcidin hatása is érvényesült. (15,16,20,24,27,28,41,42,43)

Funkcionális vashiányra és gyulladással anaemiára utal a betegek laboratóriumi leleteiben a hypoferraemia, a transferrin szaturációjának emelkedése, a hyperferritinaemia, valamint a microcytaer anaemia. A gyulladás során a pozitív akut fázis fehérjék – például a C-reaktív protein (CRP) – és a proinflammatorikus citokinek emelkedésével is találkozhatunk, melyek a krónikus vesebetegség során is jellemzően előfordulhatnak az uraemiás toxinok által teremtett környezet miatt. Emiatt fontos kihangsúlyozni, hogy a vasháztartást reprezentáló paraméterek mindegyikét jelentősen befolyásolja a gyulladás, mindez pedig a hepcidin szintjére is igaz, hiszen a vasraktárak mellett a gyulladás a másik szintézisét stimuláló útvonal. Vérbeli szintjét azonban jelentősen meghatározza a veseműködés is, tekintve, hogy a molekula kiválasztása kizárólag a vesén keresztül történik. Vesebetegség esetén –, legyen az akut vagy krónikus – csökken a glomeruláris filtrációs ráta (GFR), így a vérben több hepcidin halmozódik

fel, ami szintén elősegíti az anaemia kialakulását. Így tehát a hepcidin magas szintjével abban az esetben is számolni lehet, amikor CKD során semmilyen más gyulladásos marker értéke nem emelkedik. A humán kutatások alapján tehát jelenlegi tudásunk szerint, a krónikus vesebetegség során mért emelkedett szérumban hepcidinkoncentráció háttérben a vesefunkció beszűkülése által kialakult glomeruláris filtrációs ráta csökkenése és a gyulladásos citokinek jelenléte állnak. (11,13,15,16,20,21,22,24,25,27,28)

Az anaemia szervezetre gyakorolt kedvezőtlen következményein felül a magas hepcidinszint befolyásolhatja a CKD kezelését is, ugyanis limitálhatja a vörösvérsejtképzés támogatására használt ESA-kezelés (erythropoietin-stimulating agents) hatékonyságát, mintegy EPO-rezisztenciát okoz. Humán orvosi felmérések alapján a kezelt betegek 10-20%-a nem reagál erre a terápiára, patkánykísérletek pedig bebizonyították, hogy magas szérumban hepcidinszint esetén szignifikánsan rosszabban reagál a szervezet az ESA-kezelésre, mert ilyenkor kevesebb vas áll rendelkezésre az erythropoiesis számára. (6,15,16,20,21,25,44)

### **3.6. A hepcidin jelentősége a klinikai gyakorlatban**

#### **3.6.1. A hepcidin diagnosztikai és terápiás értéke vesebetegségben**

Tekintve, hogy több kutatásban leírták akut vesebetegség során a vizeletben mért magasabb hepcidinszintet, amelynek egyértelműen védelmi szerepet tulajdonítanak, felmerül a kérdés, vajon exogén hepcidin hatására mérsékelhető-e a szervi károsodás. Ez a feltevés patkánykísérletek és humán klinikai kutatások alkalmával is igazolást nyert, ugyanis ezekben az esetekben mesterségesen előidézett AKI, illetve szívűtétek előtt alkalmazott hepcidin-kezelés, hypoferraemiát okozó hatása révén kifejezetten protektívnek bizonyult, illetve egyes tanulmányok szerint az immunválaszt is javította. Ez alapján azoknak a betegeknek a jövőben javíthatja az esélyeit a profilaktikus hepcidin-kezelés, akiknél műtét előtt vagy közben közepes-nagy kockázatot állapítanak meg a posztoperatív AKI kialakulására. Ennek előnye lenne a jelenleg használatos vaskelátorokhoz képest, hogy a szervezet saját védelmi mechanizmusát használja fel a hypoferraemia kiváltására, így biztonságosabb, valamint hatékonyabban zárja el a mikrobák elől a vasat. Hátránya azonban, hogy protektív szerepén túl az anaemia kialakulását elősegíti, így még széleskörű kísérletek és vizsgálatok szükségesek jövőbeni alkalmazásához. (18,24,35,36)

Krónikus vesebetegségben felmerült a hepcidin diagnosztikai értéke, mint a vesebetegség és a gyulladásos anaemia új markere. Eddigi humán orvosi kutatások alapján a vér hepcidinszintje pozitív korrelációt mutatott a ferritin és a CRP értékével, valamint az anaemiával, negatív korrelációban pedig a szérumban vasszintjével és a transferrin szaturációjával

állt. Míg a CKD korai stádiumaiban a transferrin telítettsége és a ferritin szintje jobb markereknek bizonyult, előrehaladottabb esetekben a hepcidin jobban korrelált náluk az anaemiával és ekkor már a GFR-rel is szignifikáns pozitív korrelációt mutatott. Ennek alapján a jövőben a hepcidin prognosztikai értéke számottevő lehet, azonban fontos szem előtt tartani, hogy termelődését erősen befolyásolja a gyulladás (főleg társbetegségek esetén), illetve az egyeden belül megfigyelt gyors változások a gyulladásos státuszban nagy valószínűséggel nem teszik lehetővé rövidtávú biomarkerként való alkalmazását. (16,21,25,45)

A fent említetteken kívül az anaemia menedzsmentjében is nagyon fontos szerepet tulajdonítanak a jövőben a hepcidinnek. Ahogy CKD-ben egyre beszűkül a vesefunkció, egyre nagyobb az igény az ESA-kezelésre és a vaspótlásra, ugyanakkor a vér hepcidinszintje is egyre magasabb. Bár ez a terápiás lehetőségeket behatárolja, egyúttal meg is jósolhatja a magasabb ESA-dózis és a parenterális vaspótlás szükségességét, utóbbi ugyanis sokkal hatásosabbnak bizonyult magas hepcidinszint esetén a per os adott vassal szemben. Emellett patkánymodelleken leírták, hogy egy az ESA mellett adott, hepcidin expresszióját gátló molekula alkalmazásával szignifikánsan jobban reagáltak az állatok a kezelésre. (15,20,21,25,44)

A hepcidin sokrétű szerepét feltárva tehát ígéretes lehet jövőbeni alkalmazása a klinikai gyakorlatban, azonban fontos megjegyezni, hogy rutinszerű használatához további kutatásokra és mérési módszerének standardizálásra van szükség. (46)

### **3.6.2. A hepcidin-ferroportin tengely, mint terápiás célpont**

A hepcidin-ferroportin tengelyt ismerve új ajtók nyílhatnak meg egyes betegségek gyógykezelésében a hepcidin agonistáit és antagonistáit használva. Ezek a hatóanyagok jellemzően még tesztelés alatt állnak, illetve nem rendelkezünk pontos adatokról mellékhatásaikat illetően. Agonistái olyan vegyületek, melyek a hepcidin termelődését stimulálják vagy hasonló aktivitással rendelkeznek, így alkalmazásukkal elkerülhető lehet a szervezet túlzott mértékű vasfelhalmozódása többek között heveny gyulladásban, thalassemiák vagy örökletes hemochromatosis során. A hepcidin antagonistái ezzel szemben különböző pontokon akadályozhatják meg a ferroportin-csatornák gátlását. Ez a hatás humán kutatások szerint felhasználható a különböző krónikus gyulladásos betegségek mellett akár cardiovascularis vagy neurodegeneratív megbetegedések, valamint mellrák és prosztatatarák kezelése során is, utóbbi esetében pedig a hepcidin hatásmechanizmusát megcélzó terápia akár a daganatellenes terápiára is érzékenyítheti a hámsejteket. (30,46,47) Kifejezetten a vesebetegségből eredő anaemiában bizonyult hatékonynak az eddig elvégzett kísérletek alapján

a HIF-útvonalat aktiváló roxadustat, amely még jelentős gyulladással környezetben is számottevően növelte az endogén EPO-szintézist és csökkentette a szérumban hepcidin-szintjét, ezáltal helyreállította a vasmetabolizmust. (46) A jelenleg ismert, illetve kutatott agonista és antagonisták hatóanyagok csoportjait a 3. táblázat szemlélteti.

Hepcidin-agonisták	Hepcidin-antagonisták
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. mini-hepcidinek: 7-9 aminosavból álló hepcidin-analógok – pl.: PR65</li> <li>2. BMP-6-analógok – pl.: HFE</li> <li>3. STAT/SMAD útvonal aktivátorai – pl.: genistein</li> <li>4. szteroidmolekulák, melyek a PGRMC-1-receptoron hatnak – pl: mifepriston</li> <li>5. matripáz enzim gátlói – pl.: 811-AA human protein</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. neutralizáló monoklonális ellenanyagok hepcidin vagy IL-6/IL-1 receptorra ellen – pl: tocilizumab</li> <li>2. antikalinnok – pl.: PRS-080</li> <li>3. BMP-6-HJV-SMAD útvonal gátlói – pl: dorsomorphin</li> <li>4. TNF<sub>2α</sub>-ellenanyagok – pl: golimumab</li> <li>5. STAT3-gátló kis molekulák – pl: AG490</li> <li>6. cardialis glikozidok nmol-os koncentrációban – pl.: fursultiamin</li> </ol>

3. táblázat: A hepcidin agonistái és antagonistái

Forrás: Sebastiani és mtsai, 2016 (30), Li és mtsai, 2020 (46), Rochette és mtsai, 2015 (47)

### 3.7. Hepcidin az állatorvoslásban: A hepcidin és a vas-státusz összefüggése krónikus vesebeteg macskákban

Az állatorvoslás területén idáig csupán macskák esetében, 1 tanulmányban vizsgálták a hepcidin és a vesebetegség kapcsolatát. Javard és mtsai (2017) azt a célt tűzték ki, hogy egészséges és CKD-ben szenvedő macskák szérumban hepcidin-, EPO- és vasszintjét összehasonlítsák, melynek során a hepcidin értékének meghatározásához az ELISA módszert használták humán kiték alkalmazásával. (22)

Az eredmények kiértékelése során megállapításra került, hogy a szérumból átlagosan mért hepcidin szintje krónikus vesebetegek esetén szignifikánsan magasabb a kontroll csoportéhoz képest, tehát az emelkedett kreatinin értékével pozitív korrelációban áll. Szignifikáns összefüggést mutatott továbbá az alacsony hematokrit és teljes vaskötő kapacitás (TVK) értékével, valamint a magas szérumban amyloid-A (SAA)-szinttel. Az anaemiás betegek körében a többi CKD-s esettel összehasonlítva szignifikánsan magasabb kreatinin- és SAA-értéket, illetve alacsonyabb TVK- és EPO-szintet állapítottak meg. A kutatás során kapott eredmények rámutatnak, hogy – a humán területhez hasonlóan macskák esetében is – a CKD kapcsán mért magas hepcidin-szinthez a gyulladással folyamatok és a csökkent vese clearance is hozzájárulnak. (22)



## **4. CÉLKITŰZÉSEK**

Kutatásunkban azt a célt tűztük ki, hogy az állatorvoslásban először, heveny, illetve idült vesebeteg kutyák szérumban hepcidinszintjét vizsgáljuk, összevessük a referenciatartománnyal, valamint korrelációs vizsgálatokat végezzünk a vesebetegség és a vérszegénység egyes, a klinikai gyakorlatban használt paramétereivel (hematokrit, reticulocytá-hemoglobin, albumin, vas, C-reaktív protein). Hosszútávú célkitűzésünk, hogy a továbbiakban egy nagyobb populációt vizsgálva és a páciensek kórlefolását követve megismerjük a hepcidin prognosztikai szerepét is a vesebetegségben, illetve differenciáldiagnosztikai szerepét a vérszegénységben.

Reményeink szerint a módszer és a vizsgálatok továbbfejlesztésével a jövőben a klinikai gyakorlati munkát segítheti a fehérje szintjének mérése a diagnózis felállításában és a terápiás szempontok meghatározásában is, ennek eléréséhez azonban még további kutatások szükségesek.

## **5. ANYAG ÉS MÓDSZER**

### **5.1. Mintavétel és a minták laboratóriumi vizsgálata**

A mintagyűjtés 2019 kezdetétől 2020 őszéig, az Állatorvostudományi Egyetem Kisállatklinikájának nefrológiai szakrendelésén és intenzív terápiás osztályán zajlott. A kutatásba akut vagy krónikus vesebetegséggel diagnosztizált azotaemiás kutyákat vontunk be, így a populációt összesen 31 kutya alkotta, akik közül 9 esetében akut, 22 esetében pedig krónikus vesebetegséget állapítottunk meg. A részletes kórelőzmény felvétele után valamennyi kutyán fizikális vizsgálatot és hasi ultrahang vizsgálatot végeztünk, amelyeket számos alkalommal vérnyomásmérés követett. Ezután a rutin diagnosztikai vizsgálatok részeként minden beteg esetében vér- és vizeletvételre került sor. A vérvétel a megfelelő terület fertőtlenítése után a v. cephalica antebrahiiból, a v. saphena lateralisból vagy a v. jugularis externából történt, K-EDTA-val (trikálium-etilén-diamin-tetraecetsav) alvadásban gátolt, valamint szérumban-szeparátoros mintavételi csövekbe. A vizeletet a megfelelő terület és a vizsgálófej fertőtlenítése után, ultrahang által vezérelt cystocentesissal vettük, vagy spontán ürített vizeletet gyűjtöttünk. A páciensek tulajdonosai az Állatvédelmi Nyilatkozat aláírásával hozzájárultak a vizsgálatokhoz és az adatok felhasználásához.

A vér- és vizeletminták diagnosztikai vizsgálatára 25 beteg esetében a PraxisLab Kft. laboratóriumában, 6 beteg esetében az Állatorvostudományi Egyetem laboratóriumában került sor. A vérvizsgálat magába foglalta a hematológiai, klinikai kémiai, valamint egyes speciális paraméterek meghatározását. A vizeletminták vizsgálata során az alap fizikai-kémiai

paraméterek, a vizeletüledék, illetve minden esetben a fehérje-kreatinin arány megállapításra kerültek.

A vérminták hematológiai vizsgálata során automata vérkép-meghatározás (Siemens Advia 120, illetve Advia 2120i géppel) és a vérkenet morfológiai vizsgálata (Olympus bx45, illetve Olympus CX31 mikroszkóppal) is elvégzésre került. A mindezek során mért legfontosabb paraméterek a következők voltak: vörösvérsejtszám (vvs. szám), hemoglobin (Hb), hematokrit (Htk), származtatott vvs. paraméterek (MCV=átlagos vvs. térfogat, MCH=átlagos vvs. Hb-tartalom, MCHC=átlagos vvs. Hb-koncentráció), vérlemezkeszám, fehérvérsejtszám és ezen belül az egyes sejtípusok száma (neutrophil, basophil és eosinophil granulocyta, lymphocyta, monocyta, LUC=large unstained cells), illetve reticulocyta-paraméterek (abszolút szám, %-os arány, reticulocyta-Hb, reticulocyta-MCV, reticulocyta-eloszlási szélesség).

A vérmintákból ülepedéssel és centrifugálással nyert szérum klinikai kémiai vizsgálatát Beckman coulter AU480, illetve Olympus 400 típusú géppel végezték. Ennek során mért legfontosabb paraméterek: összfehérje, albumin, ALT (alanin-aminotranszferáz), összbilirubin, epesavak, triglicerid, karbamid, kreatinin, egyes elektrolitok (nátrium, kálium, nátrium-kálium arány, klorid), illetve speciális paraméterek közül vas, teljes vaskötő kapacitás, látens vaskötő kapacitás, C-reaktív protein. Fontos kritérium volt, hogy a kreatinin szintje meghaladja a 150  $\mu\text{mol/l}$  értéket. A biokémiai vizsgálatok elvégzése után megmaradt szérummintákat  $-80^{\circ}\text{C}$ -ra fagyasztva tároltuk a hepcidin méréséig.

A vizeletvizsgálat során mért paraméterek a következők szerint alakultak: szín, átlátszóság, sűrűség, pH, fehérje, Hb, glükóz, keton, nitrit, urobilinogén, bilirubin, üledék, összfehérje, kreatinin, fehérje/kreatinin arány, nátrium, frakcionált nátrium-ürítés.

## **5.2. A hepcidin mennyiségi mérése**

A betegekből nyert vérszérumból egyedenként legalább 600  $\mu\text{L}$  mennyiséget  $-80^{\circ}\text{C}$ -ra fagyasztottunk és ezen a hőmérsékleten tároltuk a hepcidin mennyiségi méréséhez szükséges mintaelőkészítésig. A hepcidin kvantitatív mérése LC-MS/MS módszerrel az Állatorvostudományi Egyetem Élelmiszerhigiéniai Tanszékén történt. Kutatásunkban az egészséges kutyák referenciatartományának meghatározásához a korábban Vizi és mtsai (2020) által kidolgozott módszert és mérési körülményeket, műszereket használtuk a mérés során. (28)

A mintaelőkészítés során egyedenként 600  $\mu\text{L}$  szérumhoz 300  $\mu\text{L}$  0,1% hangyasavat tartalmazó vizes oldatot adtunk, majd az így kapott elegyet vortexeléssel homogenizáltuk. Ezután 500  $\mu\text{L}$  hideg víz hozzáadása és ismét homogenizálás következett. (Minden oldatot,

amelyet a vérszérumhoz adtunk, előzetesen jégben hűtöttünk.) Az így kapott, hígított szérummintát 1500  $\mu\text{L}$  metanollal és 1500  $\mu\text{L}$  vízzel kondicionált csövekbe (Phenomex C18) töltöttük. A nemkívánatos komponenseket 2x1000  $\mu\text{L}$  vízzel és 1000  $\mu\text{L}$  víz/metanol/ammónium-hidroxid 75/30/5 (v/v/v) oldatával mostuk ki. Ezután következett a leoldás fázisa, amely az 1. képen látható.

1. kép: Mintaelőkészítés, leoldási fázis

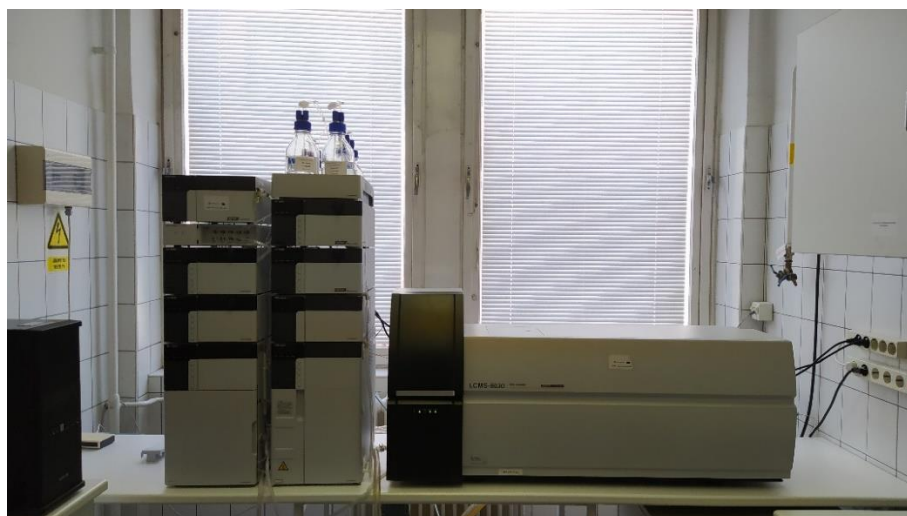


Forrás: saját fotó, 2020

Ennek során a csövek tartalmához 3x250  $\mu\text{L}$  0,1% hangyasavat tartalmazó metanol oldatot adtunk. Ezt 39°C-on, nitrogén áramban, 40 perc alatt szárazra pároltuk, így szilárd fázis maradt vissza, melyet visszaoldottunk 300  $\mu\text{L}$  acetonitril/víz/trifluor-ecetsav 33,8/66,2/0,1 (v/v/v) elegy hozzáadásával. A visszaoldott mintát homogenizálás után 4°C-on, 8000/perc fordulatszámon, 5 percen át centrifugáltuk, majd az így nyert felülúszót kromatográfiás vialba töltöttük, ez került az LC-MS/MS készülék által elemzésre.

A mennyiségi méréshez a tanszéken található Shimadzu LCMS 8030 LC-MS/MS készüléket használtuk, kombinálva electrospray ionisation (ESI) ionforrással. (2. kép)

2. kép: LC-MS/MS készülék



Forrás: saját fotó, 2020

Az analízishez kutya hepcidin standard-et (Peptides International) használtunk, a negatív kontroll pedig borjú szérum volt, mert ebben a fajban a hepcidin-25 aminosav sorrendje 6 aminosavban tér el a kutyáétól. Egy vesebeteg kutya szérummintájából három párhuzamos mérés készült, és amennyiben a kapott értékek közti relatív szórás nem haladta meg a 15%-ot, a három eredmény átlaga került a statisztikai vizsgálatba.

### 5.3. Statisztikai analízis

A kutatásunkba bekerült kutyák laboratóriumi vizsgálatának eredményeit Microsoft Office Excel 2010 programban gyűjtöttük össze. A vesebeteg páciensek hepcidinszintje és az egészséges kutyák értékei közötti szignifikancia ( $p < 0,05$ ) vizsgálatához az R statisztikai program Mann-Whitney-Wilcoxon próbáját, a korrelációs vizsgálatokhoz a Pearson-féle korrelációs tesztet alkalmaztuk. A hepcidin vizsgálatát faktor szerint kétmintás t-próbával végeztük. A hepcidinszint mérésének megbízhatóságát és pontosságát az Intra-Assay variációs koefficiens alapján ellenőriztük.

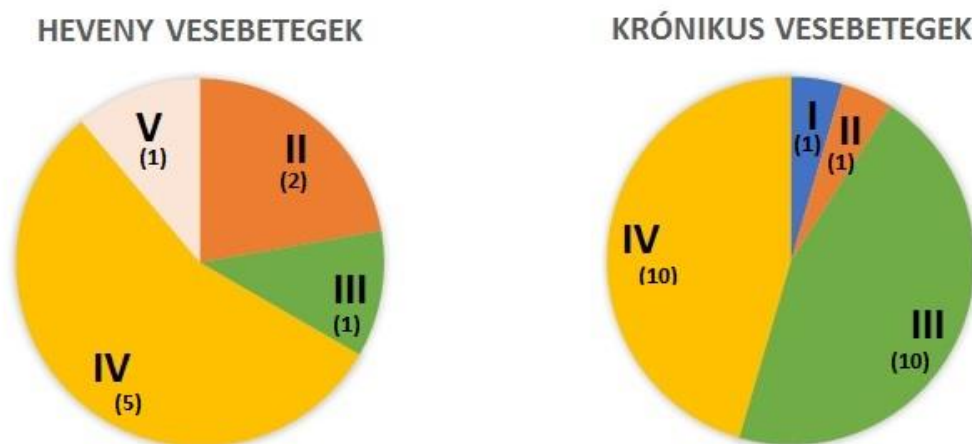
## 6. EREDMÉNYEK

### 6.1. A vizsgált populáció jellemzői

Kutatásunkban összesen 31 vesebeteg kutya adatai szerepelnek, fajtára, ivarra és életkorra való tekintet nélkül. A populációban 28 kutya fajtatiszta volt, akik közül legnagyobb számban a yorkshire terrier (n=3) és a golden retriever (n=3) fajta képviseltette magát. Mellettük előfordultak bull terrierek (n=2), berni pásztorkutyák (n=2) és csivavák (n=2), valamint az alábbi kutyafajtáknak 1-1 egyede: bernáthegyi, közép-ázsiai juhászkutya, schnauzer, boxer, puli, moszkvai őrkutya, whippet, staffordshire terrier, welsh terrier, rottweiler, ír szetter, cocker spániel, briard, cane corso, labrador retriever és német vizsla. A vizsgált kutyák ivari megoszlására jellemző volt, hogy 14 szuka és 19 kan alkotta a populációt; előbbi esetében 7, utóbbi esetében 3 páciens volt ivartalanítva. A kutyák átlagéletkora 8,1 év volt (1-14,6 év).

A 31 kutya közül 9 esetében heveny, 22 esetében pedig krónikus vesebetegséget állapítottunk meg. Heveny vesebetegek körében 3 kutya szenvedett valamilyen egyéb kórképtől, melyek a következők voltak: peritonitis (n=1), pyometra (n=1) és szepszis (n=1). Krónikus vesebetegek esetén 2 páciensnél állt fenn a pyometra diagnózisa társbetegségként. Az IRIS által meghatározott elvek szerint minden páciens esetében elvégeztük a betegség stádiumba való besorolását a vérplazma kreatininszintje alapján. Az egyes stádiumok közötti megoszlást a 7. ábra szemlélteti. Az AKI-val diagnosztizált kutyák körében két állat tartozott a II., egy a III., öt a IV., egy pedig az V. stádiumba. A CKD-ban szenvedő betegek közül 1-1 a II. és III. stádiumba, 10-10 pedig a III. és IV. stádiumba került. Mindezek alapján egyértelműen a súlyosabb esetek fordultak elő nagyobb arányban, így nem meglepő, hogy a kreatininértékek átlaga is magas; AKI esetén 613,7  $\mu\text{mol/L}$ , míg CKD esetében 550,9  $\mu\text{mol/L}$ .

7. ábra: A vizsgált betegek megoszlása a vesebetegség egyes stádiumai között



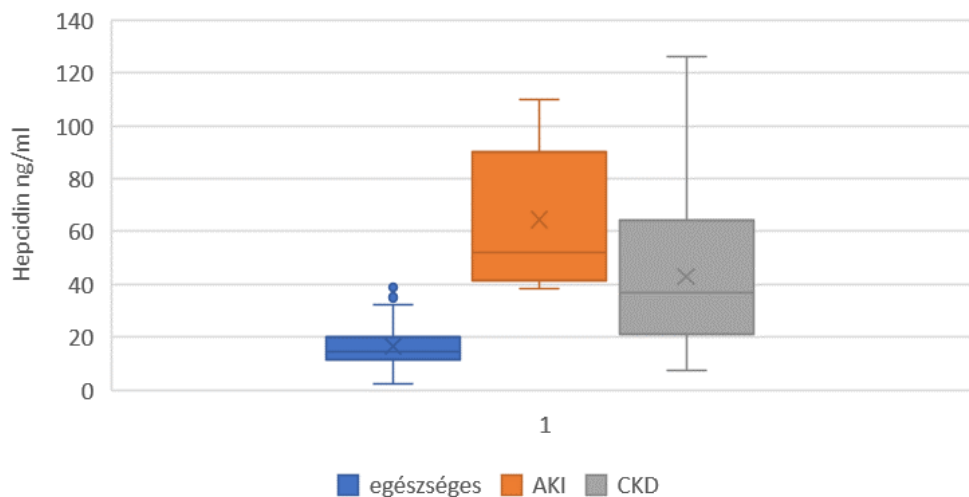
Az egészséges populációhoz képest a betegeknek szignifikánsan magasabb volt a karbamid- és kreatininkoncentrációja ( $p < 0,001$ ), továbbá szignifikánsan alacsonyabb a hematokrit értéke ( $p < 0,0001$ ), valamint a vaskoncentrációja ( $p < 0,005$ ).

## 6.2. A vesebeteg kutyák szérumban hepcidin szintjének vizsgálata

A heveny vesebeteg kutyák körében  $64,56 \pm 27,25$  ng/ml átlagos hepcidin koncentrációt mértünk (38,5-110,1 ng/ml). Ebben a betegcsoportban továbbá az egészséges kutyákhoz képest szignifikánsan magasabb koncentrációt ( $p = 0,004$ ) tapasztaltunk a Mann-Whitney-Wilcoxon próbát alkalmazva.

A krónikus vesebeteg populáció esetén  $42,92 \pm 28,28$  ng/ml átlagos hepcidin koncentrációt mértünk (7,6-121,1 ng/ml). A CKD-val diagnosztizált kutyák esetén továbbá szintén szignifikáns különbség mutatkozott az egészséges kutyákhoz képest ( $p < 0,001$ ), amely értéket szintén a Mann-Whitney-Wilcoxon próbával kaptunk. Kórképenként az eredményeket a 8. ábra mutatja be.

8. ábra: A hepcidin koncentrációja egészséges, valamint AKI-ban és CKD-ban szenvedő kutyákban



Szignifikáns eltérés az egészséges populációhoz képest AKI és CKD során is

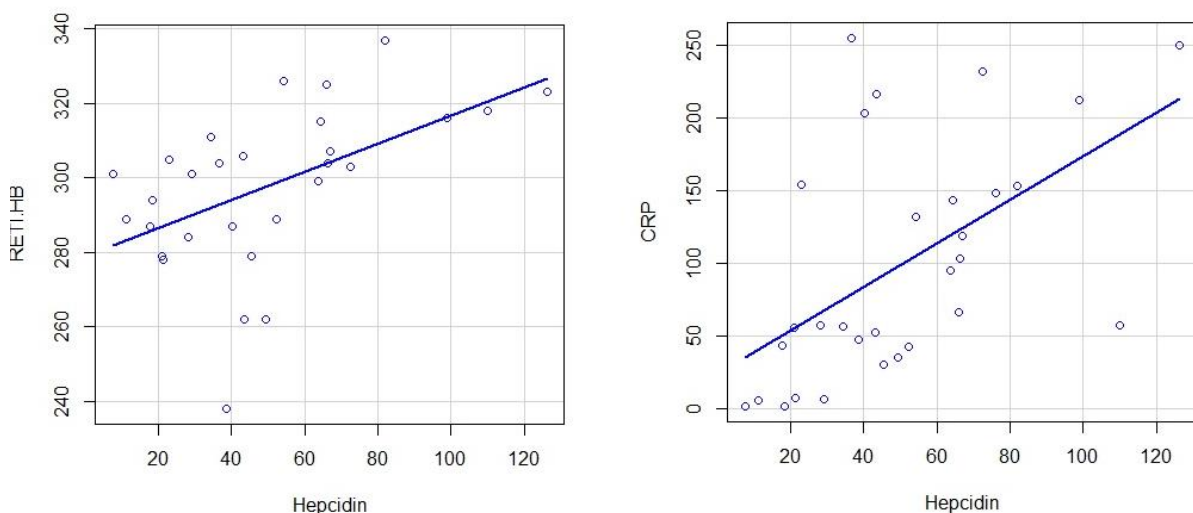
## 6.3. Korrelációs vizsgálatok és a hepcidin CRP szerinti vizsgálata

Kutatásunkban statisztikai vizsgálatokkal kerestük az összefüggést a hepcidin értéke és egyes laboratóriumi paraméterek között, amelyeket a mindennapi klinikai gyakorlatban gyakran vesszünk figyelembe a vesebeteg vagy vérszegény kutyák ellátása során. Ezek a

paraméterek a következők voltak: vas, hematokrit, reticulocytá-hemoglobin, albumin és C-reaktív protein. A korrelációs vizsgálatokat a Pearson-féle korrelációs teszttel, a teljes, 31 kutyát tartalmazó populációra vonatkoztatva végeztük.

Számításaink során nem tapasztaltunk szignifikáns korrelációt a hepcidin értéke és a vas ( $p=0,278$ ,  $R=0,2$ ), a hematokrit ( $p=0,318$ ,  $R=-0,19$ ), valamint az albumin szintje között ( $p=0,120$ ,  $R=-0,29$ ). Szignifikáns pozitív korrelációt mutatott azonban egymással a hepcidin és a CRP ( $p=0,002$ ,  $R=0,54$ ), ezen kívül a hepcidin és a reticulocytá-Hb ( $p=0,0045$ ,  $R=-0,51$ ). A szignifikáns korrelációkat a 9. ábra mutatja be.

9. ábra: A hepcidin korrelációja a reticulocytá-hemoglobinnal és a C-reaktív proteinnel



A CRP értékét vizsgálva továbbá azt tapasztaltuk, hogy a teljes populációban feltűnően nagy arányban fordultak elő a referenciatartományhoz képest emelkedett CRP-vel rendelkező betegek, vagyis akiknél gyulladás állt fenn. A populációt így két csoportra osztottuk; egy normál és egy gyulladásos csoportra, amit előbbi esetben 12 mg/L alatti, utóbbi esetben 12 mg/L feletti érték jellemezett. 31 kutyából 25 esetében állt fenn gyulladás, míg mindössze 6 kutya esetében nem volt tapasztalható ez az eltérés. A gyulladásos betegeknél 56,84 ng/ml átlagos hepcidinszintet mértünk (szórás  $\pm 27,32$  ng/ml), akiknél pedig nem állt fenn gyulladás, ott ez az érték 17,38 ng/ml volt (szórás  $\pm 7,56$  ng/ml). Emelkedett CRP-vel rendelkező, tehát gyulladásos betegeknél így a hepcidin szintje szignifikánsan magasabb, mint az egészséges állatoké ( $p<0,001$ ).

## 7. MEGBESZÉLÉS

Kutatásunk célja az volt, hogy az állatorvostudomány területén először, a humán orvoslásban legmegbízhatóbbnak tartott LC-MS/MS módszerrel vesebeteg kutyák szérumban hepcidin szintjét vizsgáljuk, összevessük a hepcidin referenciatartományával, valamint egyes laboratóriumi paraméterekkel. Kontrollcsoportként kutatócsoportunk korábbi tanulmányát használtuk, ahol az egészséges kutyák ugyanezzel a módszerrel mért hepcidin szintjének referenciatartománya meghatározásra került (28).

Összesen 31 kutya alkotta a populációt, akik közül 9 esetében akut, 22 esetében krónikus vesebetegséget állapítottunk meg – előbbi diagnózis során 3, utóbbi során pedig 2 kutyánál diagnosztizáltunk társbetegséget is. Mindkét betegcsoport esetén szignifikánsan magasabb volt a hepcidin koncentrációja, mint az egészséges kutyáké. Fontos megjegyezni, hogy a hepcidin termelődését a gyulladással állapot stimulálja, ezért a vizsgált kutyáknál egyidejűleg jelen lévő egyéb betegségek –, melyek minden esetben valamilyen gyulladással állapotot eredményeznek önmagukban is – hatása nem elhanyagolható az emelkedett hepcidinérték szempontjából. Azt azonban nem tudjuk megítélni, mennyire befolyásolhatták ezek a kapott eredményt.

A hepcidin vasháztartásban betöltött szerepe miatt egyes, a vérszegénység rutinnal klinikai vizsgálatában fontos paraméterekkel (hematokrit, reticulocyták-hemoglobin, vas) való összefüggést kerestük. Tekintve, hogy a hepcidin elzárja a keringés és a vörösvérsejtképzés elől a vasat, a humán kutatások eredményei alapján azt vártuk, hogy az említett paraméterekkel negatív korreláció mutatkozik. Bár a vesebeteg csoport Htk-szintje és vaskoncentrációja szignifikánsan alacsonyabb volt a kontrollcsoportéhoz képest, a hepcidinnel való korrelációs vizsgálatok során a beteg csoporton belül nem találtunk szignifikáns összefüggést, míg a reticulocyták-Hb értékével való korreláció a vártnál pozitív volt. Erre magyarázatot egyelőre nem találtunk.

A vesebetegség kutyákban gyakran jár bizonyos akut fázis fehérjék értékének változásával, melyek közül az albumin és a C-reaktív protein értékét vetettük össze a hepcidinével. Az albumin szintje, negatív akut fázis fehérje lévén gyulladás során csökken, továbbá értékét jelentősen befolyásolja a proteinuria is, amely gyakori velejárója a vesebetegségnek. Ezek alapján negatív korrelációt vártunk a hepcidin szintjével, azonban az összefüggés nem volt szignifikáns. A CRP egy pozitív akut fázis fehérje, vagyis vérből mérhető értéke gyulladás során megemelkedik, így ez esetben pozitív korrelációt feltételeztünk. Statisztikai vizsgálatunk alapján szignifikáns pozitív korreláció mutatkozott, emellett pedig sikerült igazolnunk azt is, hogy az emelkedett CRP-vel rendelkező betegek átlagos hepcidin szintje szignifikánsan nagyobb azokhoz képest, akiknek a szervezetében nem állt fenn



gyulladás. Ezeknek a korrelációs vizsgálatoknak a jelentősége az volt, hogy megvizsgáljuk, a hepcidin értéke, melyről klinikai tapasztalataink nincsenek, hogyan viszonyul olyan markerekhez, amelyeket a napi gyakorlatban használunk, mindez pedig a hepcidin jövőbeni alkalmazásához vezető úton fontos információ.

Kutatásunk alapján heveny, illetve idült vesebetegségben szenvedő kutyák szérumban hepcidinszintje megemelkedik, melyhez a humán tanulmányok alapján hozzájárul a kórkép során kialakuló gyulladásos állapot és a veseműködés beszűkülésével csökkenő hepcidinkiválasztás is. Az eredményeket limitálta az alacsony mintaszámú populáció, valamint a vesebetegség különböző stádiumai közötti megoszlás.

További kutatást igényel a hepcidin diagnosztikai értéke szempontjából, hogy a betegség súlyossága hogyan befolyásolja a vizsgált fehérje szintjét, vagyis, hogy a humán orvosi eredményekhez hasonlóan kutyák esetén is az előrehaladott stádiumokban számíthatunk-e inkább a hepcidinszint emelkedésére. További vizsgálatok szükségesek a vashiányos anaemia és a gyulladásos nemregeneratív anaemia közötti pontosabb elkülönítő kórjelzéshez, egy vérszegény populációt vizsgálva, valamint korrelációs számításokat végezve a hepcidin és a vasháztartás egyéb paramétereinek között (például TVK, ferritin, transferrin). Hosszútávú célkitűzés továbbá, hogy a hepcidin prognosztikai értékét vizsgáljuk, tehát minden beteg kórlefordulását szorosan követve meghatározzuk, mennyiben jelzi a vizsgált fehérje a negatív kórjelzést. Ezen kívül reményeink szerint a jövőben lehetőség nyílik terápiás oldalról is megközelíteni a hepcidin szerepét nemregeneratív anaemiás és EPO-kiegészítést igénylő kutyák körében. Mindezekhez a vizsgálatok továbbfejlesztése szükséges, kutatásunk azonban hozzájárult a vesebeteg kutyák újszerű diagnosztikai és kezelési szempontjainak jövőbeni alkalmazásához.

## 8. ÖSSZEFOGLALÓ

A heveny és a krónikus vesebetegségben számos mechanizmus ismert, amely vérszegénységhez vezet. Ezek közé tartozik az utóbbi évek humán orvosi kutatásai alapján a hepcidin nevű antimikrobiális fehérjének tulajdonított hatás is, melynek jelentősége kutyák vesebetegségeiben eddig még nem ismert. A hepcidin, mint a vasmetabolizmus legfontosabb szabályozó hormonja, a kórkép során kialakuló gyulladással kapcsolatos folyamatok hatására elzárja a szervezet vaskészletét, illetve megakadályozza a vas felszívódását a bélhámsejtekből, ezzel hypoferraemiát és nemregeneratív anaemiát alakít ki. További kapcsolata a veseelégtelenséggel, hogy a fehérje csak a veséken keresztül kerül kiválasztásra, így a szervműködés beszűkülésével a csökkenő glomeruláris filtrációs ráta hatására több hepcidin marad vissza a keringésben, mint egy egészséges szervezet esetében. A humán orvosi tanulmányok alapján a vérszegénység vesebetegekben negatív prognosztikai faktornak minősül és az életminőséget is rontja.

Kutatásunk célja, hogy a folyadékkromatográfiához kapcsolt tömegspektrometria (LC-MS/MS) segítségével meghatározzuk akut és krónikus vesebetegségben szenvedő kutyák szérumban hepcidinkoncentrációját, majd összehasonlítsuk a hepcidin korábban egészséges kutyákban meghatározott referenciatartományával (5,3-36,4 ng/ml). További célkitűzésünk, hogy a fehérje szintjének korrelációját vizsgáljuk a vesebetegség, illetve az anaemia egyes, a klinikai gyakorlatban használt paramétereivel (vas, reticulocytá-hemoglobin, C-reaktív protein, albumin, hematokrit).

Kutatásunkba összesen 31 vesebeteg kutyát vontunk be, akik közül 9 esetében akut, 22 esetében pedig krónikus vesebetegséget állapítottunk meg. Az LC-MS/MS módszerrel történt méréseket követően a két kórkép esetében külön-külön vizsgáltuk a hepcidin szintjét, a korrelációs vizsgálatokat pedig a teljes vesebeteg populációra vonatkoztatva végeztük. Akut vesebetegekben az egészséges állatokéhoz képest szignifikánsan magasabb koncentrációt mértünk ( $p=0,004$ ), a hepcidin átlagos értéke 64,56 ng/ml (szórás  $\pm 27,25$  ng/ml) volt. Krónikus vesebetegekben szintén szignifikánsan magasabb hepcidinkoncentráció mutatkozott ( $p<0,001$ ), az átlagos érték pedig 42,92 ng/ml (szórás  $\pm 28,28$  ng/ml) volt. Emellett a hepcidin értéke szignifikáns korrelációt mutatott a reticulocytá-hemoglobin ( $p=0,0045$ ) és a C-reaktív protein értékével ( $p=0,0018$ ).

A hepcidin vesebetegekben mért magasabb értéke a jövőben segíthet a vashiányos anaemia és a gyulladással kapcsolatos nem-regeneratív anaemia okainak elkülönítésében, valamint a szervezet vas státuszának, gyulladással kapcsolatos állapotának és EPO-kezelésre való fogékonyságának meghatározásában, emellett új terápiás lehetőségek célpontját is képezheti.

## 9. SUMMARY

Anaemia is a common feature of chronic kidney disease (CKD) and acute kidney injury (AKI) and its pathogenesis is multifactorial. Recent researches in human medicine suggest that anaemia may be caused by the key iron-regulatory hormone, hepcidin and its significance in dogs is yet unknown. In kidney disease, inflammation increases blood hepcidin which sequesters the iron in storages and inhibits enteral iron absorption, hereby it contributes to hypoferraemia and non-regenerative anaemia. Furthermore, as glomerular filtration rate decreases, circulating hepcidin level elevates compared to a healthy organism's. According to clinical studies in human medicine, anaemia in kidney disease is associated with adverse outcomes and lower quality of life.

Our study aims to measure serum hepcidin concentration in dogs with AKI or CKD with liquid-chromatography tandem mass spectrometry method (LC-MS/MS) and examine how much it differs from the reference range of healthy dogs (5,3-36,4 ng/ml). Additionally, we examined the correlation between hepcidin and a few parameters of kidney disease and anaemia which we use in clinical daily routine (iron, reticulocyte-hemoglobin, C-reactive protein, albumin, haematocrit).

The study population included 31 dogs – 9 with acute kidney injury and 22 with chronic kidney disease. After using the LC-MS/MS method, we examined the serum hepcidin levels separately in AKI and CKD patients, however the correlation analysis was performed on the whole population. Patients with AKI had significantly elevated hepcidin levels compared to healthy dogs ( $p=0,004$ ), with mean hepcidin of 64,56 ng/ml (deviation  $\pm 27,25$  ng/ml). The CKD group with mean hepcidin of 42,92 ng/ml (deviation  $\pm 28,28$  ng/ml) showed also significant difference to the healthy ones ( $p<0,001$ ). Furthermore, correlation appeared to be significant between hepcidin and C-reactive protein ( $p=0,0018$ ) and reticulocyte-hemoglobin ( $p=0,0045$ ).

Elevated level of serum hepcidin in kidney disease patients may help us in the future to differentiate iron-deficiency anaemia from inflammation-related non-regenerative anaemia. In addition, it may be useful to define iron status, inflammatory statement and responsiveness for erythropoietin-administration. Moreover, recent studies of human medicine see the above mentioned elevated level as a new therapeutic target.

## 10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Balogh Á. 2009: A vasháztartást szabályzó hepcidin kimutatása és szerepe a perinatális vasháztartásban. Doktori értekezés. Budapest, Semmelweis Egyetem Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola. URL: [http://phd.semmelweis.hu/mwp/phd\\_live/vedes/export/baloghadam.d.pdf](http://phd.semmelweis.hu/mwp/phd_live/vedes/export/baloghadam.d.pdf), Megtekintve: 2019.07.13.
2. Krause, A., Neitz, S., Mägert, H.-J., Schulz, A., Forssmann, W.-G., Schulz-Knappe, P., Adermann, K., 2000: LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Letters*, 480. 2-3. p. 147-150. URL: [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)01920-7](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)01920-7) letöltve: 2019.01.16.
3. Fry, M. M., Liggett, J. L., & Baek, S. J. (2004). Molecular cloning and expression of canine hepcidin. *Veterinary Clinical Pathology*, 33. 4. p. 223–227. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2004.tb00377.x> letöltve: 2019.08.03.
4. Park, H. C., Valore, V. E., Waring, J. A., Ganz, T., 2000: Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *The Journal of Biological Chemistry*, 276. 11. p. 7806–7810. URL: <https://doi.org/10.1074/jbc.m008922200> letöltve: 2019.07.14.
5. Pigeon, C., Ilyin, G., Courselaud, B., Leroyer, P., Turlin, B., Brissot, P., Loréal, O., 2000: A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide, hepcidin, is overexpressed during iron overload. *The Journal of Biological Chemistry*, 276. 11. p. 7811-7819. URL: <https://www.jbc.org/content/276/11/7811> letöltve: 2019.08.07.
6. Ganz, T., 2003: Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anaemia of inflammation. *Blood*, 102. 3. p. 783-788. URL: <https://doi.org/10.1182/blood-2003-03-0672> letöltve: 2019.08.03.
7. Kemna, E.H.J.M., Tjalsma, H., Willems, H.L., Swinkels, D.W., 2008: Hepcidin: from discovery to differential diagnosis. *Haematologica*, 93. 1. p. 90-97. URL: <https://haematologica.org/article/view/4723> letöltve: 2019.08.07.
8. Bagi, M., 2018: Egészséges kutyák szérumban hepcidin szintjének vizsgálata LC/MS módszerrel. TDK dolgozat. Állatorvostudományi Egyetem, Belgyógyászati Tanszék és Klinika
9. Abbas, I.M., Vranic, M., Hoffmann, H., El-Khatib, A.H., Montes-Bayón, M., Möller, H.M., Weller, M.G., 2018: Investigation of the copper peptide hepcidin-25 by LC-MS/MS and NMR. *International Journal of Molecular Sciences*, 19. 8. p. 2271. URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/8/2271> letöltve: 2020.08.25.
10. Ganz, T., Nemeth, E., 2012: Hepcidin and iron homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1823. 9. p. 1434-1443. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.01.014> letöltve: 2019.07.10.
11. Babbitt, J.L., Lin, H.Y., 2010: Molecular mechanisms of hepcidin regulation: Implications for the anaemia of CKD. *American Journal of Kidney Diseases*, 55. 4. p. 726–741. URL: <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2009.12.030> letöltve: 2019.02.16.
12. Vizi, Zs., Lányi, K., Bagi, M., Laczay, P., Balogh, N., Sterczler, Á., 2020: Serum hepcidin measurements in healthy dogs using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Veterinary Clinical Pathology*, 49. p. 292-298. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/vcp.12872> letöltve: 2020.09.30.
13. Vizi, Zs., Aradi, Zs., Sterczler, Á., 2014: A hepcidin szerepe a vasanyagcsere szabályozásában. Irodalmi áttekintés. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 136. 671-675.
14. Peters, H.P.E., Laarakkers, C.M.M., Pickkers, P., Masereeuw, R., Boerman, O.C., Eek, A., Cornelissen, E.A.M., Swinkels, D.W., Wetzels, J.F.M., 2013: Tubular reabsorption and local production of urine hepcidin-25. *BMC Nephrology*, 14. 70. URL: <https://doi.org/10.1186/1471-2369-14-70> letöltve: 2020.08.01.
15. Ganz, T., Nemeth, E., 2016: Iron balance and the role of hepcidin in chronic kidney disease. *Seminars in Nephrology*, 36. 2. p. 87-93. URL: <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2016.02.001> letöltve: 2019.08.07.
16. Ueda N., Takasawa K., 2018: Impact of inflammation on ferritin, hepcidin and the management of iron deficiency anemia in chronic kidney disease. *Nutrients*, 10(9). 1173. URL: <https://www.mdpi.com/2072-6643/10/9/1173/htm> letöltve: 2019.07.05.

17. Swinkels, D.W., Janssen, M.C.H., Bergmans, J., Marx, J.J.M., 2006: Hereditary hemochromatosis: Genetic complexity and diagnostic approaches. *Clinical Chemistry*, 52. 6. p. 950-968. URL: <https://academic.oup.com/clinchem/article/52/6/950/5627076> letöltve: 2019.02.13.
18. Scindia, Y., Leeds, J., Swaminathan, S., 2019: Iron homeostasis in healthy kidney and its role in acute kidney injury. *Seminars in Nephrology*, 39. 1. p. 76-84. URL: [https://www.seminarsinnephrology.org/article/S0270-9295\(18\)30157-8/fulltext](https://www.seminarsinnephrology.org/article/S0270-9295(18)30157-8/fulltext) letöltve: 2020.07.20.
19. Fleming, E.R., Sly, W.S., 2001: Heparin: A putative iron-regulatory hormone relevant to hereditary hemochromatosis and the anaemia of chronic disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98. 15. p. 8160-8162. URL: <https://www.pnas.org/content/98/15/8160> letöltve: 2019.07.05.
20. Babitt, J.L., Lin, H.Y., 2012: Mechanisms of anaemia in CKD. *J Am Soc Nephrol.*, 23. 10. p. 1631–1634. URL: <https://jasn.asnjournals.org/content/23/10/1631> letöltve: 2019.02.16.
21. Hanudel, M.R., Rappaport, M., Gabayan, V., Jung, G., Salusky, I.B., Nemeth, E., Ganz, T., Zaritsky, J., 2017: Increased serum hepcidin contributes to the anemia of chronic kidney disease in a murine model. *Haematologica*, 102. 3. p. 85-88. URL: <https://haematologica.org/article/view/8022> letöltve: 2019.08.07.
22. Javard R., Grimes, C., Bau-Gaudreault, L., Dunn, M., 2017: Acute-phase proteins and iron status in cats with chronic kidney disease (CKD). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 31. 2. p. 457-464. URL: <https://doi.org/10.1111/jvim.14661> letöltve: 2019.02.13.
23. Arezes, J., Jung, G., Gabayan, V., Valore, E., Ruchala, P., Gulig, P.A., Ganz, T., Nemeth, E., Bulut, Y., 2015: Heparin-induced hypoferrremia is a critical host defence mechanism against the siderophilic bacterium *Vibrio vulnificus*. *Cell Host Microbe*, 17. 1. p. 47-57. URL: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.12.001> letöltve: 2019.08.07.
24. Chawla, L.S., Beers-Mulroy, B., Tidmarsh, G.F., 2019: Therapeutic opportunities for hepcidin in acute care medicine. *Critical Care Clinics*, 35. p. 357-374. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2018.11.014> letöltve: 2020.08.11.
25. Zaritsky, J., Young, B., Wang, H-J., Westerman, M., Olbina, G., Nemeth, E., Ganz, T., Rivera, S., Nissenson, A.R., Salusky, I.B., 2009: Heparin – a potential novel biomarker for iron status in chronic kidney disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 4. 6. p. 1051-1056. URL: <https://cjasn.asnjournals.org/content/4/6/1051> letöltve: 2019.08.07.
26. Ganz, T., 2007: Molecular control of iron transport. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18. 2. p. 394-400. URL: <https://jasn.asnjournals.org/content/18/2/394> letöltve: 2019.08.05.
27. Nemeth, E., Rivera, S., Gabayan, V., Keller, C., Taudorf, S., Pedersen, B.K., Ganz, T., 2004: IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *The Journal of Clinical Investigation*, 113. 9. p. 1271–1276. URL: <https://www.jci.org/articles/view/20945> letöltve: 2019.12.23.
28. Fraenkel, P.G., 2017: Anaemia of inflammation: A review. *Medical Clinics of North America*, 101. 2. p. 285-296. URL: <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2016.09.005> letöltve: 2020.07.18.
29. Nemeth, E., Valore, E.V., Territo, M., Schiller, G., Lichtenstein, A., Ganz, T., 2003: Heparin, a putative mediator of anaemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood*, 101. 7. p. 2461-2463.
30. Sebastiani, G., Wilkinson, N., Pantopoulos, K., 2016: Pharmacological targeting of the hepcidin/ferroportin axis. *Frontiers in Pharmacology*, 7. 160. p. 1-11. URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2016.00160/full> letöltve: 2019.08.06.
31. Itkonen, O., Parkkinen, J., Stenman, U.H., Hämäläinen, H., 2012: Preanalytical factors and reference intervals for serum hepcidin LC-MS/MS method. *Clin Chim Acta*, 413. 7-8. p. 696-701. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.12.015> megtekintve: 2019.08.07.
32. Enko, D., Zelzer, S., Fauler, G., Hermann, M., 2019: Evaluation of a commercial liquid-chromatography high-resolution mass-spectrometry method for the determination of hepcidin-25. *Biochemica Medica (Zagreb)*, 29.

2. 1-10. URL: <https://www.biochemia-medica.com/en/journal/29/2/10.11613/BM.2019.020701/fullArticle> letöltve:2020.04.02.
33. Vörös, K. (Ed.), 2019: Állatorvosi Belgyógyászat I. kötet. A kutyák és macskák betegségei. Második átdolgozott, bővített kiadás. 434 p.
34. International Renal Interest Society: Grading of acute kidney injury (2016). URL: [http://www.iris-kidney.com/pdf/4\\_idc-revised-grading-of-acute-kidney-injury.pdf](http://www.iris-kidney.com/pdf/4_idc-revised-grading-of-acute-kidney-injury.pdf) letöltve: 2019.08.07.
35. Scindia, Y., Wlazo, E., Leeds, J., Loi, V., Ledesma, J., Cechova, S., Ghias, E., Swaminathan, S., 2019: Protective role of hepcidin in polymicrobial sepsis and acute kidney injury. *Frontiers in pharmacology*, 10. 615. p. 1-18. URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2019.00615/full> letöltve: 2020.04.02.
36. Choi, N., Rigatto, C., Zappitelli, M., Gao, A., Christie, S., Hiebert, B., Arora, R.C., Ho, J., 2018: Urinary hepcidin-25 is elevated in patients that avoid acute kidney injury following cardiac surgery. *Canadian Journal of Kidney Health and Disease*, 5. p. 1-9. URL: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2054358117744224> letöltve: 2020.07.20.
37. Cho, S.Y., Hur, M., 2020: Hepcidin and neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker for acute kidney injury linked iron metabolism. *Annals of Laboratory Medicine*, 40. 2. p. 97-98. URL: <https://doi.org/10.3343/alm.2020.40.2.97> letöltve: 2020.07.20.
38. Vörös, K. (Ed.), 2019: Állatorvosi Belgyógyászat I. kötet. A kutyák és macskák betegségei. Második átdolgozott, bővített kiadás. 448 p.
39. International Renal Interest Society: IRIS staging of CKD (modified 2019). URL: [http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS\\_Staging\\_of\\_CKD\\_modified\\_2019.pdf](http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS_Staging_of_CKD_modified_2019.pdf) letöltve: 2020.09.30.
40. Bârsan, L., Stanciu, A., Stancu, S., Căpușă, C., Brătescu, L., Mandache, E., Radu, E., Mircescu, G., 2015: Bone marrow iron distribution, hepcidin and ferroportin expression in renal anaemia. *Hematology*, 20. 9. p. 543-552. URL: <https://doi.org/10.1179/1607845415y.0000000004> letöltve: 2020.04.02.
41. Paköz, Z.B., Çekiç, C., Arabul, M., Yüksel, E.S., İpek, S., Vatansever, S., Ünsal, B., 2016: An evaluation of the correlation between hepcidin serum levels and disease activity in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology Research and Practice*, 2015. Artical ID 810942. URL: <https://www.hindawi.com/journals/grp/2015/810942/> letöltve: 2020.05.24.
42. Syed, S., Michalski, E.S., Tangpricha, V., Chesdachai, S., Kumar, A., Prince, J., Ziegler, T.R., Suchdev, P., Kugathasan, S., 2017: Vitamin-D status is associated with hepcidin and hemoglobin concentrations in children with inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 23. 9. p. 1650-1658. URL: <https://academic.oup.com/ibdjournal/article/23/9/1650/4560756> letöltve: 2020.05.24.
43. Martinelli, M., Strisciuglio, C., Alessandrella, A., Rossi, F., Aurichio, R., Campostrini, R., Girelli, D., Nobili, D., Staiano, A., Perrotta, S., Miele, E., 2016: Serum hepcidin and iron absorption in pediatric inflammatory bowel disease. *Journal of Chron's and Colitis*, 10. 5. p. 566-674. URL: <https://academic.oup.com/ecco-jcc/article/10/5/566/2462300> letöltve: 2020.05.24.
44. Theurl, M., Nairz, M., Schroll, A., Sonnweber, T., Asshoff, M., Haschka, D., Seifert, M., Willenbacher, W., Wilflingseder, D., Posch, W., Murphy, A.T., Witcher, D.R., Theurl, I., Weiss, G., 2014: Hepcidin as a predictive factor and therapeutic target in erythropoiesis-stimulating agent treatment for anaemia of chronic disease in rats. *Haematologica*, 99. 9. p. 1516-1524. URL: <https://haematologica.org/article/view/7146> letöltve: 2020.05.24.
45. Sonkar, S.K., Singh, N.K., Sonkar, G.K., Pandey, S., Bhosale, B., Kumar, A., Usman, K., 2019: Association of hepcidin and anaemia in early chronic kidney disease. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation*, 30. 2. p. 315-324. URL: <https://doi.org/10.4103/1319-2442.256838> letöltve: 2020.05.24.
46. Li, Z.L., Tu, Y., Liu, B.C., 2020: Treatment of renal anaemia withroxadustat: advantages and achievement. *Kidney Diseases*, 6. p. 65-73. URL: <https://www.karger.com/Article/FullText/504850> letöltve: 2020.05.11.
47. Rochette, L., Gudjoncik, A., Guenancia, C., Zeller, M., Cottin, Y., Vergely, C., 2015: The iron-regulatory hormone hepcidin: A possible therapeutical target? *Pharmacology & Therapeutics*, 146. p. 35-52. URL: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.09.004> megtekintve: 2020.05.11.

## 11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni mindenekelőtt a témavezetőmnek, Dr. Vizi Zsuzsannának, hogy lehetőséget kaptam mellette aktívan részt venni a kutatásban, szakmai és emberi hozzáállása is példaértékűvé vált számomra. Köszönettel tartozom Dr. Falus Fruzsinnának, Dr. Szabó Korinnának és Dr. Manczur Ferencnek, hogy hétről hétre betekintést nyerhettem mellettük a nefrológia világába, nekik is köszönhetem, hogy ennyire megszerettem ezt a területet.

Köszönettel tartozom Dr. Lányi Katalinnak és az Élelmiszerhigiéniai Tanszék munkatársainak a mérési módszer kidolgozásáért, a mérések elvégzéséért és minden készségesen átadott tudásért, ami a mintaelőkészítés és az LC-MS/MS elvének megértését szolgálta.

Köszönöm Bajcsayné Fábíán Ibolyának a statisztikai analízis során nyújtott segítségét.

Szeretném kifejezni köszönetemet továbbá a PraxisLab Kft. és az Állatorvostudományi Egyetem laboratóriumának munkatársainak a közreműködésüket és segítőkészségüket a minták diagnosztikai vizsgálata során.

Hálával tartozom a nagyszerű családomnak, amiért mindig hittek bennem és érdeklődve fogadták a kutatás során szerzett élményeimet és eredményeimet. Végül, de nem utolsó sorban pedig nagyon hálás vagyok a csodás barátaimnak, közülük legjobban Bartók Kingának, amiért ők is mindig támogattak és segítséget nyújtottak, amikor szükségem volt rá.

A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap (ESZA) társfinanszírozásával valósult meg (a támogatási szerződés száma: AZ EFOP-3.6-3-VEKOP-16-2017-00005, címe: Tudományos utánpótlás erősítése hallgatók tudományos műhelyeinek és programjainak támogatásával, a mentorálás folyamatának kidolgozásával).



A kutatás az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-20-2-I-ÁTE-2 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának szakmai támogatásával készült.



## NYILATKOZATOK

HuVetA

### ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT\*

Név: MARTON REGE ANNA  
Elérhetőség (e-mail cím): marton.rege@gmail.com  
A feltöltendő mű címe: A SZERŐN HEPUDINSÁJÁT VÁSSZALATA  
VESEBETES KUTYÁKBAN LC-MS/MS MÓDSZERREL  
A mű megjelenési adatai: 2020  
Az átadott fájlok száma: 1

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédtett PDF formára konvertálja és szolgáltatssa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyeznek, hogy a HuVetA egynél több (csak a HuVetA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg **(egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel)**:

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban -ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címekre) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),



Kérjük, **nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:**



Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénytörtő módon visszaélne.

Budapest, 2020. év NOVEMBER hó 13 nap



aláírás  
szerző/a szerzői jog tulajdonosa

---

*A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutýra Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltassa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.*

*A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén*

- *a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
- *a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*
- *az Állatorvostudományi Egyetem és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- *a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
- *a nyílt hozzáférés támogatása.*

## NYILATKOZAT TDK- ÉS DIPLOMAMUNKA AZONOSSÁGÁRÓL

Alulírott ..... MÁRTON REGE ANNA ..... nyilatkozom, hogy  
diplomamunkám, melynek címe ... A SZÉRM HEPICIDINSZINT VIZSGÁLATA  
HESEBETEG KUTYÁKBAN LC-MS/MS MÓDSZERREL ..... tartalmi és formai szempontból teljes  
mértékben megegyezik azonos című, a ... 2020 ..... évi TDK konferencián szerepelt  
dolgozatommal.

Budapest, 2020.10.30.

Márton Rege Anna

Márton Rege Anna