

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Lágyszöveti kalcifikáció vizsgálata OsteoSense festés alapú képkalkotó módszerrel, valamint az endoplazmás retikulum stressz szerepének vizsgálata a Daprodustat nevű prolil-hidroxiláz inhibitor érfali kalcifikációt fokozó hatásában

Gecző-Lente Gréta

Témavezető: Dr. Jeney Viktória



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Sejt-és Immunbiológia Doktori Iskola

Debrecen, 2026

**Lágyyszöveti kalcifikáció vizsgálata OsteoSense festés alapú
képalkotó módszerrel, valamint az endoplazmás retikulum stressz
szerepének vizsgálata a Daprodustat nevű prolil-hidroxiláz
inhibitor érfali kalcifikációt fokozó hatásában**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Gecző-Lente Gréta okleveles klinikai laboratóriumi kutató

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskolája keretében

Témavezető: Dr. Jeney Viktória, MTA doktora

Az értekezés bírálói:

Dr. Pomozi Viola, PhD

Dr. Vámosi György, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balogh István, MTA doktora

tagok: Dr. Vámosi György, PhD

Dr. Pomozi Viola, PhD

Dr. Gaál Botond Ágoston, PhD

Dr. Szeri Flóra, PhD

Az értekezés védésének helye és időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet,
A épület tanterme

2026. október 12. 13 óra

Bevezetés

A krónikus vesebetegség (CKD) világszerte emberek millióit érinti és jelenleg a nyolcadik leggyakoribb halálozási ok. Az élettartam növekedése és a társadalom elöregedése miatt a CKD jelentősége várhatóan tovább fog emelkedni az elkövetkező évtizedekben, további jelentős anyagi terheket róva az egészségügyi ellátórendszerre. A CKD betegekben megfigyelhető a kardiovaszkuláris rendszer (nagy és közepes erek, szívbillentyűk) kalcifikációja, ami jelentősen hozzájárul ezen betegek kardiovaszkuláris eredetű halálozásához.

A kardiovaszkuláris rendszer kalcifikációját korábban egy passzív, tisztán fizikokémiai folyamatnak tekintették, melynek során a foszfát és a kalcium megemelkedett plazma koncentrációja a kalcium-foszfát sók lerakódását idézi elő a lágy szövetekben. Az elmúlt 25 év áttörést hozott a vaszkuláris kalcifikáció mechanizmusának megértésében, és bizonyosságot nyert, hogy a folyamat sejtek által mediált és aktív szabályozás alatt áll.

A CKD és a vaszkuláris kalcifikáció patomechanizmusának megértése és a lehetséges terápiás célpontok azonosítása szempontjából nagyon jelentősek a CKD állatmodellek. Korábban a CKD elsődleges modellje az 5/6 szubtotális nefrektómia volt, melynek során egy invazív műtéti eljárással roncsolják a vesét. Az elmúlt évtizedben számos új CKD modellt fejlesztettek ki, melyek egyike az adenin tartalmú diétával kiváltott CKD.

Az adeninnel kiváltott CKD modellben intersticiális fibrózis, tubulus károsodás és jelentős vaszkuláris kalcifikáció alakul ki. Az adenin modell előnye, hogy a CKD kifejlődése nagy hasonlóságot mutat az emberekben kialakuló veseelégtelenséggel. Az *in vivo* képalkotó technikák egyre nagyobb jelentőséggel bírnak, nem csak a diagnosztikában, hanem az alap kutatásokban is. Így például a közeli infravörös képalkotás, melynek nagy előnye a mélyebb szöveti penetráció alkalmas lehet a kalcifikáció detektálására.

Munkám során, a csontosodási folyamatok tanulmányozására kifejlesztett hidroxipatit-specifikus OsteoSense festék alkalmazhatóságát vizsgáltam lágyszöveti kalcifikáció kimutatására adeninnel indukált CKD modellben C57BL/6 egértörzsben. Továbbá vizsgáltam az adenin-indukált CKD egérmodellt, valamint *in vitro* kalcifikációs módszereket alkalmazva a CKD betegekben kialakuló anémai kezelésére kifejlesztett Daprodustat (DPD) nevű prolil hidroxiláz inhibitor kalcifikációt fokozó hatásában az endoplazmás retikulum stressz szerepét.

Célkitűzések

1. A CKD-asszociált lágyszöveti kalcifikáció tanulmányozása érdekében kutatócsoportunkban szerettünk volna egy nem invazív CKD egérmodellt és a

kalcifikáció detektálására alkalmas érzékeny és specifikus módszert meghonosítani. A szakirodalmi adatok alapján az adenin és magas foszfát tartalmú táppal előidézett CKD egérmodell meghonosítását tűztük ki célul. További célunk volt kifejleszteni egy módszert melynek segítségével az Osteosense fluoreszcens festéket *in vivo* alkalmazva képessé válunk a CKD-asszociált kalcifikáció detektálására különféle lágy szövetekben.

2. Kutatócsoportunk korábbi munkájában kimutatta a CKD betegek anémiakezelésében alkalmazott PHI Daprodustat kalcifikációt fokozó hatását *in vitro* sejtes modellben, valamint *in vivo* CKD egérmodellben. Ezzel kapcsolatban vizsgáltuk a DPD pro-kalcifikációs hatásának molekuláris mechanizmusát, melynek keretében célul tűztük ki az ER stressz szerepének tisztázását.

Anyagok és módszerek

- A kísérletek során humán aorta simaizomsejtekkel dolgoztunk, amelyeket Dulbecco's Modified Eagle's Medium tápfolyadékban tenyésztettünk 10% főtájis borjú szérummal, 1% L-glutaminnal, 1% nátrium-piruváttal, és 1% antibiotikus, antimikotikus reagenssel kiegészítve. A sejteket inkubátorban 5% CO₂ jelenlétében 37 °C-on tenyésztettük.
- A sejtek kalcifikációját ARS festéssel detektáltuk. A kísérlet végén a 96 lyukú lemezen tenyésztett sejtekről eltávolítottuk a tápfolyadékot, foszfáttal pufferolt sóoldattal átmostuk, majd 4%-os paraformaldehiddel fixáltuk 20 percen keresztül. A fixálást követően a sejteket újból átmostuk PBS-sel majd a sejtekhez 2%-os ARS oldatot adtunk. 15 perc múlva a festéket eltávolítottuk, majd a lemezt desztillált vízzel mostuk. Lefényképeztük a lemezt, majd 100 µl hexadecilpiridinium-klorid oldatot (100 mmol/L) adtunk hozzá, mely feloldja a bekötődött festéket, így a mérés kvantálhatóvá tehető. A minták abszorbanciáját mikrolemez olvasóval 562 nm-es hullámhosszon mértük le.
- Az oszteokalcin méréshez a sejteket 6 lyukú lemezen tenyésztettük. A kezelés végén a sejtekről eltávolítottuk a tápoldatot, PBS -sel mostuk, majd 100 µl etilén-diamin-tetraecetsavat (EDTA-t) (0,5 mol/L, pH 6,9) adtunk hozzá. Az oszteokalcin koncentrációját az EDTA-s felülszorból ELISA módszerrel határoztuk meg a protokollnak megfelelően.
- Az extracelluláris mátrix kalcium tartalmának méréséhez a sejteket 96 lyukú lemezen tenyésztettük. A kezelés végén a sejtekről eltávolítottuk a tápoldatot, PBS-sel mostuk,

és 0,6 mol/L-es koncentrációjú sósavval dekalcináltuk az extracelluláris mátrixot 5 percig szobahőmérsékleten. A sósavas felülúszó kalcium tartalmát QuantiChrom Calcium Assay kit-tel határoztuk meg az előírt protokollnak megfelelően. A dekalcinálást követően a sejteket újra átmostuk, majd lizáltuk 0,1% NaOH és 0,1% SDS tartalmú pufferben. A lizátum fehérje koncentrációját BCA Protein Assay kit-tel határoztuk meg és a kalcium tartalmat a fehérjetartalomra normalizálva adtuk meg.

- A sejtek fehérje expressziójának vizsgálatát Western blot analízissel végeztük, mely során a lizátumokat 7,5-10%-os SDS poliakrilamid gélen választottuk el, majd nitrocellulóz membránra blottoltuk, blokkoltuk tejpor oldattal és az elsődleges antitesttel inkubáltuk egy éjszakán át 4 °C-on. Másnap a membránokat 1 órán keresztül torna peroxidázzal konjugált anti-nyúl vagy anti-egér másodlagos antitesttel inkubáltuk, majd a detektáláshoz kemilumineszcens Western ECL reagenst használtunk és az eredményt röntgen filmen, illetve digitálisan rögzítettük.
- Az egerekkel végzett kísérleteinket a Debreceni Egyetem Kutatásetikai Bizottsága által kiadott érvényes engedély birtokában végeztük. A kísérletek során C57BL/6 hím (n=24), 8-12 hetes egereket vizsgáltunk. Az egereket véletlenszerűen 2 csoportra (n=12) osztottuk kontroll, valamint CKD. A kontroll csoport standard rágcsálótápot kapott, míg a CKD-t 2 fázisú adenint tartalmazó diétával váltottuk ki, melyek során az egerek 6 hétig 0,2% adenin és 0,7% foszfát tartalmú, majd a 7. héttől 0,2% adenin és 1,8% foszfát tartalmú rágcsáló tápot kaptak további 3 héten keresztül. A DPD hatását egy másik kísérletben vizsgáltuk, melynek során 10 hetes C57BL/6 egereket (n=30) három csoportra osztottunk: kontroll, CKD, CKD+DPD. A CKD-t az előző kísérlettel megegyező módon, kétfázisú adenint és emelt foszfátot tartalmazó diétával váltottuk ki. A DPD-t a kísérlet 7. hetétől naponta adagoltuk 1% metilcellulózban szuszpendálva orálisan, míg a DPD kezelésben nem részesülő egerek azonos térfogatú vivőanyagot kaptak.
- Az egerek lágyszöveti kalcifikációjának vizsgálatához OsteoSense 750EX festéket alkalmaztunk. A kísérlet végén az állatokat izoflurán belélegeztetésével bódítottuk, majd az OsteoSense festéket juttattuk be a retro-orbitális vénás sinuson keresztül. A képalkotást 18 órával az injekciót követően végeztük.
- Az egerektől vett vérből szérum urea, kreatinin, foszfát és kalcium szinteket határoztunk meg a Cobas® c502 automata készülék segítségével.

- A szerveket 10%-os formalinban fixáltuk és paraffinba ágyaztuk. Ezt követően 4 µm vastag metszeteket vágunk. A metszeteket deparaffináltuk, majd rehidratáltuk. Ezek után Hematoxilin-eozin, von Kossa, valamint Alizarin Red S festést végeztünk.
- A szervekből teljes RNS-t izoláltuk Tri-reagenssel. Az RNS cDNS-sé átírását High-Capacity cDNS Reverse Transcription Kit segítségével végeztük. A PCR reakcióhoz iTaq™ Universal SYBR® GreenSupermixet és az alábbi táblázatban felsorolt primereket használtunk. A PCR reakciót a CFX96 Real-Time System készülékben hajtottuk végre.
- A statisztikai analízisek elvégzéséhez GraphPad Prism 8.01 szoftvert alkalmaztunk. A normál eloszlás meghatározását Shapiro-Wilk teszttel, a *p* értékek meghatározását parametrikus tesztekkel végeztük. A két csoport közötti statisztikailag szignifikáns különbségeket kétirányú Student-féle *t*-próbával, a kettőnél több csoport összehasonlítását ANOVA tesztet követő Tukey-féle többszörös összehasonlító analízissel, míg a számos kezelési csoport egyetlen kontrollhoz történő vizsgálatát ANOVA tesztet követő Dunnett's post-hoc teszttel elemeztük. A *p* <0.05 értékeket tekintettük szignifikánsnak.

Eredmények

1. OsteoSense festés alkalmazása lágyszöveti kalcifikáció detektálására CKD egérmodellben

A lágyrészek meszesedését adeninnel indukált CKD egérmodellben vizsgáltuk, 8 hetes hím C57BL/6 egereken. A plazmából a vesefunkció paramétereinek meghatározásán kívül foszfát és kalciummérést is végeztünk. A CKD egerek plazma foszfát szintje jelentősen megemelkedett a CTRL-hoz képest, azonban a kalcium szintnél szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk. Az aortákról a mintagyűjtést követő 4 órán belül felvételeket készítettünk az IVIS Imaging műszer segítségével. Az OsteoSense jelintenzitása szignifikánsan magasabb volt a CKD egerek aortájában a CTRL egerek aortájához viszonyítva.

Az OsteoSense festés intenzív kalcifikációt jelzett a CKD egerek veséjében, ugyanakkor a CTRL egerek veséjében alacsony volt a jelintenzitás. A világos látóterés felvételeken a CKD-s egerek veséjében szövet szerkezeti módosulásokat, atrófiát és fibrózist detektáltunk, melyek a veseelégtelenségre jellemző elváltozások. A H&E festés tubuláris dilatációt mutatott, és a meszesedés mind alizarin vörös, mind von Kossa festéssel kimutatható volt a CKD egerekből származó vesékben.

Jelenlegi ismereteink szerint az érfali kalcifikáció egy aktív folyamat, melynek során oszteokondrogén irányú differenciálódás zajlik. Ezért a következő kísérletünkben az oszteokondrogén markerek expressziójának CKD hatására bekövetkező változását tanulmányoztuk CTRL és CKD egerekből származó aorta illetve vese RNS mintákban. Négy transzkripciós faktor, a Runx2, Sox9, Msx2, és a Bmp2 mRNS szintjeit határoztuk meg. Általánosságban elmondható, hogy az oszteokondrogén transzkripciós faktorok mRNS expressziója CKD hatására fokozódott a CTRL-hoz képest, az aortában és a vesében is. A szövetek között azonban jelentős eltéréseket tapasztaltunk a tekintetben, hogy mely transzkripciós faktor szintje változott jelentősebben. Az aortában az Msx2 és Bmp2 szintje emelkedett leginkább, ezzel szemben a vesében a Sox9 és a Runx2 expressziója fokozódott legnagyobb mértékben.

Ezt követően azt vizsgáltuk meg, hogy a CKD-indukált kalcifikáció érint-e más létfontosságú szervet. Elsőként a szívet, a tüdőt és a májat elemeztük. A CKD egerekből származó szív és tüdő mintákban a teljes szervet érintő OsteoSense festődést detektáltunk. A szívben, a tüdőben és a májban is vizsgáltuk az oszteokondrogén markerek mRNS szintjét CTRL és CKD egerekben. A Runx2 és Bmp2 szintek emelkedését tapasztaltunk CKD egerek szívében és májában, ugyanakkor a tüdőben a Sox9 mRNS szintje emelkedett szignifikánsan a CTRL egerekéhez képest.

Majd a CTRL és CKD egerek agyában, szemében és lépében vizsgáltuk a kalcifikációt OsteoSense festéssel. Mind a CTRL, mind a CKD egerek agyában detektáltunk mikromeszesedékes gócpontokat, azonban az agyak összes fluoreszencia intenzitása nem mutatott statisztikailag szignifikáns különbséget a két csoport között. Egyes egereknél mind a CTRL, mind a CKD csoportból OsteoSense jelet figyeltünk meg a retinában, amely gyakrabban jelent meg a CKD csoportban.

2. A DPD kalcifikációra kifejtett hatásának vizsgálata *in vivo* CKD egérmodellben és *in vitro* humán érfali VSMC-ken

Kutatócsoportunk korábbi munkájában kimutatta, hogy a hipoxia a HIF útvonal aktivációján keresztül fokozza az érfali simaizomsejtek kalcifikációs hajlamát. Ezen kívül munkacsoportunk azt is bizonyította, hogy a hipoxia mellett a hipoxia mimetikumok, melyek normoxiás körülmények között aktiválják a HIF útvonalat is pro-kalcifikációs hatásúak. A DPD a CKD-asszociált anémia kezelésére kifejlesztett PHD inhibitor, mely a PHD gátlásán keresztül aktiválja a HIF útvonalat.

A DPD vizsgálata során 15 C57BL/6 hím (8-12 hetes) egeret véletlenszerűen három csoportba (n=5/csoport) osztottunk be; CTRL, CKD és CKD+DPD (CKDD). A CTRL egerek normál rágszálótápot kaptak. A CKD-t az előző fejezetben ismertetett módon, adenin- és magas foszfát-tartalmú diétával indukáltuk. A DPD dózisát előkísérletekben határoztuk meg, és azt a legalacsonyabb dózist választottuk, mely megelőzte, hogy a CKD egerekben anémia alakuljon ki. Ennek megfelelően kísérletünkben a DPD-t orálisan adagoltuk. A DPD teljesen mértékben korrigálta a CKD által kiváltott vérszegénységet, amit a CTRL és a CKDD egerek hasonló hemoglobin-, vörösvérsejt-szám- és hematokritértékei mutattak. A megemelkedett plazma urea-, kreatinin- és foszfátszintek azt mutatták, hogy a CKDD egerek vesefunkciója ugyanolyan mértékben romlott, mint a CKD egereké. A CKD-kezelés nem változtatta meg a plazma kalciumszintjét. A vesében és az aortában vizsgáltuk néhány HIF célgén (glükóz transzporter 1 (Glut1), vaszkuláris endoteliális növekedési faktor A (VEGFA)) és ER stressz marker (ATF4, CHOP, glükóz-regulált protein 78 (GRP78)) mRNS expresszióját. Megállapítottuk, hogy a CKD hatására fokozódott a Glut1, az ATF4, a CHOP és a GRP78 mRNS expressziója a vesében. A DPD-kezelés mind a HIF-, mind az ER stressz-választ fokozta. Az aortában a CKDD-kezelés háromszorosára növelte a Glut1, a VEGFA és a CHOP mRNS expresszióját a CTRL-hoz viszonyítva.

Az ER stressz marker ATF4 és CHOP fehérjeexpressziójának jelentős növekedését figyeltük meg CKDD egerek veséiben. Ezt követően a DPD aorta és vesekalcifikációra kifejtett hatását vizsgáltuk OsteoSense festéssel az előző kísérleti elrendezésben. A CKD egerek veséjében és aortájában az OsteoSense festés jelentős kalcifikációt mutatott, mely a DPD-vel kezelt CKDD egerekben tovább erősödött. A CTRL egerekhez képest a Runx2, a Sox9, a BMP2 és a Msx2 mRNS szintje magasabb volt a CKD egerek veséiben. A DPD-vel kezelt állatok veséiben a Sox9 és Msx2 mRNS szintje szignifikánsan magasabb volt a CKD egerekhez viszonyítva. Az aortában a CKD a BMP2 mRNS expressziójának növekedését váltotta ki a CTRL-hoz viszonyítva, míg a CKDD a Sox9, BMP2 és Msx2 mRNS szintjének jelentős emelkedését okozta.

Összességében ezek az eredmények azt mutatják, hogy a DPD-kezelés hipoxia választ és ER-stresszt vált ki, növeli az oszteo-/kondrogén markerek expresszióját, és elősegíti a kalcifikációt a CKD egerek veséjében és aortájában. A DPD ER stresszt indukál, valamint elősegíti a HAoSMC-k Pi- indukált kalcifikációját. Tekintettel arra, hogy a vesében a DPD kezelés hatására az ATF4 expressziója jelentősen megemelkedett, és az ATF4 kalcifikációban betöltött kulcsszerepe ismert, elsőként a DPD ATF4 expressziójára kifejtett hatását vizsgáltuk.

Kimutattuk, hogy a DPD dózisfüggő módon fokozza az ATF4 mRNS és fehérje expresszióját is HAoSMC-ken.

Az ATF4 kalcifikációban betöltött kulcsszerepe ismert, így következő kísérletünkben azt vizsgáltuk meg, hogy a DPD pro-kalcifikációs hatása összefüggésben áll-e az ATF4 fokozott expressziójával. Az ATF4 expresszióját siRNS technológiával csökkentettük, melynek hatékonyságát western blottal ellenőriztük le. Az ATF4 kiütése hatására mérséklődött a DPD kalcifikációt fokozó hatása, melyet Alizarin vörös festéssel, valamint az extracelluláris mátrix kalcium és OCN szintjének meghatározásával mutattunk ki.

Diszkusszió

A kardiovaszkuláris rendszer kalcifikációja a krónikus veseelégtelenség gyakori komplikációja, mely szerepet játszik a CKD betegek korai kardiovaszkuláris okra visszavezethető halálozásában. A kardiovaszkuláris rendszeren kívül egyéb lágyyszövetek kalcifikációja is bekövetkezik CKD-ban, melyek közül legismertebb a vesekalcifikáció, mely szerepet játszik a CKD súlyosbodásában, és a kalcifilaxis, melynek során a bőrszövet kis és közepes méretű arteriolái kalcifikálódnak, melynek következtében nehezen gyógyuló fekélyek alakulnak ki az alsó végtagokon vagy a törzsön. A többi szerv és szövet kalcifikációja kevésbé kutatott.

Kutatócsoportunk érdeklődésének középpontjában a CKD-asszociált kalcifikáció mechanizmusának megértése áll, melynek egyik modellrendszere az adenin tartalmú diétával kiváltott CKD C57BL/6 egerekben. Az utóbbi években került látóterünkbe az OsteoSense festék, melyet pár kutatócsoport alkalmazott kalcifikáció számszerűsítésére. Ezekben a munkákban az OsteoSense festést *in vitro* végezték el kalcifikált VSMC-ken, aortákon, illetve szívbillentyűkön. Ugyanakkor az OsteoSense festék *in vivo* is alkalmazható, és számos csontosodási folyamatokkal kapcsolatos munkában használták. Az OsteoSense festést *in vivo* körülmények között aorta kalcifikáció kimutatására kutatócsoportunk alkalmazta elsőként.

Az OsteoSense *in vivo* alkalmazása felveti annak a lehetőségét, hogy a lágyyszöveti kalcifikációt tetszőleges szövetekben vizsgáljuk. A disszertációm első felében kontroll és CKD egerek szerveinek kalcifikációját vizsgáltam OsteoSense festéssel. Kimutattuk, hogy a CKD egerekben a kalcifikáció érinti az aortát, a szívet, a vesét, a tüdőt, és a májat. Ugyanakkor nem találtunk kalcifikáció fokozódást az agyban, a lépben és a szemben.

Az OsteoSense festés sokkal érzékenyebben mutatta ki a kalcifikációt az aortában mint a klasszikus kalcifikációs festési eljárások, a VKS és ARS festés. Az aorta mellett a kontroll

egerekhez viszonyítva jelentős kalcifikációt tapasztaltunk a CKD egerek veséjében, mely összhangban áll a humán adatokkal, mely szerint a vesekalcifikáció gyakori kísérője a CKD-nak. A vesék meszesedése a CKD korai stádiumában kezdődik, prevalenciája a betegség előrehaladtával növekszik és végstádiumú CKD-ban a betegek több mint felében detektálható. Ismert továbbá az is, hogy a vesék meszesedése nem csak egy passzív kísérőjelenség, hanem etiopatogenetikai tényező a CKD progressziójában. A vese kalcifikációját VKS és ARS festéssel is megerősítettük.

Az aorta és a vese mellett a szívben, a tüdőben és a májban találtunk CKD-val összefüggő meszesedést, míg a kontroll egerekből származó szervekben nem észleltünk kalcifikációt. A szív, különösen az aorta- és mitrális billentyűk meszesedése gyakran társul krónikus vesebetegséghez, különösen a hemodialízisben részesülő CKD betegek körében. A billentyűmeszesedés 10-20 évvel korábban jelentkezik krónikus vesebetegeknél, mint az átlagpopulációban, ami hozzájárul a kardiovaszkuláris események magas előfordulásához és prevalenciájához még a fiatal krónikus vesebetegeknél is.

A tüdő kalcifikálódása ugyancsak gyakori CKD betegekben. A mi eredményünk összhangban áll korábbi tanulmányokkal is, melyben a szerzők tüdőmeszesedést detektáltak 5/6 nefrektómiával kiváltott CKD egérmódelben.

Emberekben a CKD-val összefüggő májkalcifikáció nagyon ritka. Az OsteoSense festés nagy érzékenysége lehetővé tette számunkra, hogy először észleljünk diffúz májkalcifikációt CKD egérmódelben. Ez a módszer tehát lehetőséget ad a ritka állapot jelenleg ismeretlen mechanizmusának tanulmányozására. Aktív kalcifikációs mechanizmusokra utal az, hogy a CKD hatására kalcifikálódott szövetekben, illetve szervekben megemelkedett volt egyes oszteokondrogén differenciálódásban kulcsszerepet játszó transzkripciós faktorok szintje.

A CKD az agy szerkezetére és működésére egyaránt hatással van. A munkánk során a hidroxipatit lerakódását vizsgáltuk az agyban és nem találtunk szignifikáns különbséget az agy kalcifikációjában a CKD és a kontroll egerek között.

A szemet illetően a szaruhártya-, kötőhártya- és retina-meszesedések gyakran megfigyelhetők hemodialízisben részesülő krónikus vesebetegeknél. Kutatócsoportunk korábbi munkájában adeninnel indukált CKD módelben szaruhártya meszesedést mutatott ki kalcifikációra hajlamos DBA/2J egerekben, és bizonyítékot találtunk arra, hogy a magas foszfát- és kalciumszint Runx2-függő módon váltja ki a szaruhártya hámsejtjeinek oszteokondrogén differenciálódását. Az itt bemutatott kísérletben C57BL/6 egerekben nem láttunk szaruhártya-meszesedést, de OsteoSense jelet tapasztaltunk a szem retinális részéből,

ami gyakoribb volt a CKD csoportban, mint a kontroll csoportban, bár a különbség nem volt szignifikáns.

A lép meszesedése ritka, de egy nemrégiben készült, többközpontú vizsgálatban beszámoltak lép meszesedéséről kalcifikációs urémiás arteriolopátiával diagnosztizált betegeknel. Jelen tanulmányunkban azt találtuk, hogy a CKD nem váltott ki lép meszesedést C57BL/6 egerekben. Az OsteoSense festéssel összhangban nem találtunk emelkedést az oszteogén markerek mRNS szintjében a CKD egerek agyában és lépében.

Összességében ez a tanulmány kimutatta, hogy az OsteoSense festés érzékeny és hatékony módszer a krónikus vesebetegséghez társuló lágyrész-meszesedés kimutatására. A képalkotó szer megbízhatóan azonosított több meszesedett szervet, és feltárta az ektopikus meszesedés szövetspecifikus mintázatait. Ezek az eredmények összhangban vannak a korábbi ismereteinkkel, amelyek kimutatták a meszesedés szisztémás jellegét krónikus vesebetegségben, különösen az érrendszeri és veseşövetekben. Korrelációt találtunk az OsteoSense pozitivitás és az oszteokondrogén differenciálódási markerek megnövekedett expressziója között, és megállapítottuk, hogy az oszteokondrogén markerek szövetspecifikusan szabályozódnak CKD körülmények között. Az OsteoSense festés olyan szervekben is kimutatott kalcifikációt, mint a máj és a szív, amelyeket ritkábban vizsgálnak a standard CKD modellekben. Specificitása, roncsolásmentes jellege és az egész szerv vizsgálatára való képessége miatt az OsteoSense hatékony eszköz az ektopikus meszesedés *in vivo* és *ex vivo* értékeléséhez. Ígéretesnek tűnik a jövőbeli preklinikai vizsgálatok számára, amelyek célja a lágyrészek meszesedési mechanizmusainak megértése és a meszesedésgátló terápiák kifejlesztése és azok hatékonyságának értékelése.

Disszertációm második felében a CKD-hoz társuló anémia kezelésére alkalmazott új hatásmechanizmusú PHI, a DPD kalcifikációra kifejtett hatását vizsgáltam *in vitro* érfali simaizomsejt modellen, valamint az előzőekben részletesen bemutatott adenin-indukált CKD egérmodellben. A DPD a PHI családba tartozó gyógyszer, mely a HIF útvonal aktivációján keresztül serkenti a szervezet saját eritropoetin-termelését, fokozza az eritropoézist és a vasszintézist, ez által korrigálja az anémiát. A DPD-t 2020 óta használják Japánban, és 2023 óta az Egyesült Államokban CKD-hoz társult anémia kezelésére.

Munkacsoportunk korábbi munkájában kimutatta, hogy az adenin-indukált CKD egérmodellben anémia alakul ki, mely sikeresen korrigálható DPD-vel. Ugyanakkor azt is kimutattuk, hogy a DPD anémiát korrigáló dózisa fokozza a CKD egerek aortakalcifikációját a HIF-1 útvonal indukcióján keresztül. Munkám során tovább vizsgálva a DPD pro-kalcifikációs hatásmechanizmusát megállapítottuk, hogy a DPD *in vitro* körülmények között ER stresszt

indukál érfali simaizomsejtekben. A különböző ER stressz útvonalakat vizsgálva megállapítottuk, hogy a DPD elsősorban az ER stressz PERK ágát aktiválja, melynek eredményeként fokozódik az ATF4, és a CHOP expressziója. Az ATF4 kulcsszerepet játszik a vaszkuláris kalcifikáció mechanizmusában, melynek legdöntőbb bizonyítéka, hogy simaizomsejt targetált ATF4 knock-out egérben CKD körülmények között elmarad a média kalcifikációja. Ezzel összhangban áll a mi eredményünk is, miszerint ATF4 hiányában elmarad a DPD kalcifikációt fokozó hatása.

A DPD kalcifikációra gyakorolt hatásmechanizmusát tovább vizsgálva megállapítottuk, hogy a DPD korrigálja a CKD egerekben kialakult anémiát, illetve a DPD-vel kezelt egerek hemoglobin és hematokrit szintje a kontroll szintjén marad. Korábbi eredményünkkel összhangban a DPD fokozta az aorta kalcifikációt CKD egerekben. Ebben a munkában a vese kalcifikációját is vizsgáltuk, és az aortához hasonlóan a kalcifikáció fokozódását találtuk DPD-vel kezelt CKD egerekben. A DPD fokozta az oszteokondrogén markerek (Sox9, Runx2, BMP2, Msx2) és a HIF target gének (Glut-1, VEGFA) mRNS expresszióját mind az aortában, mind a vesében. *In vitro* eredményeinkhez hasonlóan a DPD fokozta az ER stressz markerek az ATF4, CHOP és GRP78 mRNS expresszióját aortában és vesében is.

Összegezve második tanulmányunkat, a szakirodalmi adatokkal összhangban megállapítottuk, hogy a DPD alkalmas a CKD-asszociált anémia korrigálására. Ugyanakkor aggályokat vet fel az, hogy a pozitív hatása mellett a DPD fokozza az ER stresszt és a CKD egerek aorta és vesekalcifikációját. További vizsgálatokat igényel annak a megállapítása, hogy a CKD betegeket érintő kardiovaszkuláris szövődmények kialakulásában a DPD kalcifikációt fokozó hatása szerepet játszik-e.

Összefoglalás

A krónikus vesebetegség világszerte növekvő népegészségügyi probléma, amelyet magas kardiovaszkuláris mortalitás kísér. A CKD egyik fő szövődménye a vaszkuláris és lágyszöveti kalcifikáció, amely aktív, sejtszinten szabályozott folyamat, központi eleme az érfali simaizomsejtek oszteokondrogén fenotípusváltása.

Munkánk egyik célja, egy adeninnel és magas foszfáttartalmú táppal kiváltott CKD egérmodell kialakítása, valamint a kalcifikáció nem invazív kimutatása volt, specifikus OsteoSense fluoreszcens festék alkalmazásával. Másik célunk a DPD pro-kalcifikációs hatásának hátterében álló molekuláris mechanizmus feltérképezése állt, mely munkában használtuk az előzőekben kidolgozott CKD egérmodellt és a kalcifikáció detektálására optimalizált OsteoSense festést.

Az *in vivo* képalkotási vizsgálatokkal igazoltuk, hogy az OsteoSense festék alkalmas a CKD-asszociált lágyszöveti kalcifikáció detektálására, különösen az aortában, vesében, szívben, tüdőben és májban. A kalcifikált szövetekben az oszteogén markerek expressziójának fokozódását is megfigyeltük.

A DPD-vel kapcsolatos eredményeink igazolták, hogy a DPD hatékonyan megelőzi az anémia kialakulását CKD egerekben. Ugyanakkor negatív hatása is van a DPD-nek, ugyanis fokozza a kalcifikációt. *In vitro* és *in vivo* módszerekkel bizonyítottuk az UPR-ban jelentős funkcióval bíró ATF4 transzkripciós faktor központi szerepét a DPD kalcifikációt fokozó hatásában.

Az értekezésben ismertetett új tudományos eredmények összefoglalása

1. Az OsteoSense festés hatékonyan azonosítja az aorta kalcifikációját a korai szakaszban, míg a hagyományos festési technikák ebben a stádiumban alig mutatnak ki kalcifikációt.
2. Az OsteoSense festéssel kimutatható a vese, a máj, a tüdő és a szív kalcifikációja CKD egerekben.
3. A CKD nem indukált kalcifikációt a lépben, az agyban, illetve a szemben.
4. Az OsteoSense pozitivitás korrelációt mutat az oszteokondrogén transzkripciós faktorok fokozott mRNS expressziójával.
5. A DPD korrigálja az anémiát CKD egerekben.
6. A DPD fokozza az aorta és vesekalcifikációt CKD egerekben.
7. A DPD fokozza a HIF célgének, oszteokondrogén markerek és ER stressz markerek mRNS expresszióját CKD egerek aortájában és veséjében, az ATF4 és CHOP fehérje expresszióját CKD egerek veséjében.
8. A DPD fokozza az ATF4 és CHOP ER stressz markerek expresszióját érfali simaizomsejtekben.
9. A DPD ATF4-függő módon fokozza az érfali simaizomsejtek foszfáttal indukált kalcifikációját.

Saját publikációk jegyzéke



5. Csiki, D. M., Ababneh, H. M., Tóth, A., **Lente, G.**, Szőör, Á., Tóth, A., Fillér, C., Juhász, T., Nagy, B. J., Balogh, E., Jeney, V.: Hypoxia-inducible factor activation promotes osteogenic transition of valve interstitial cells and accelerates aortic valve calcification in a mice model of chronic kidney disease.
Front. Cardiovasc. Med. 10, 1-15, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fcvm.2023.1168339>
IF: 2.8
6. Tóth, A., Csiki, D. M., Nagy, B. J., Balogh, E., **Lente, G.**, Ababneh, H. M., Szőör, Á., Jeney, V.: Daprodustat Accelerates High Phosphate-Induced Calcification Through the Activation of HIF-1 Signaling.
Front. Pharmacol. 13, 1-12, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2022.798053>
IF: 5.6
7. Sári, Z., Mikó, E., Kovács, T., Jankó, L., Csonka, T., **Lente, G.**, Sebő, É., Tóth, J., Tóth, D., Árkosy, P., Boratkó, A., Ujlaki, G., Török, M., Kovács, I., Szabó, J., Kiss, B. K., Méhes, G., Goedert, J. J., Bai, P.: Indolepropionic Acid, a Metabolite of the Microbiome, Has Cytostatic Properties in Breast Cancer by Activating AHR and PXR Receptors and Inducing Oxidative Stress.
Cancers (Basel). 12 (9), 1-27, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers12092411>
IF: 6.639
8. Kovács, T., Mikó, E., Vida, A., Sebő, É., Tóth, J., Csonka, T., Boratkó, A., Ujlaki, G., **Lente, G.**, Kovács, P., Tóth, D., Árkosy, P., Kiss, B. K., Méhes, G., Goedert, J. J., Bai, P.: Cadaverine, a metabolite of the microbiome, reduces breast cancer aggressiveness through trace amino acid receptors.
Sci Rep. 9 (1), 1-14, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-37664-7>
IF: 3.998

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 36,937

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

9,7

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

Debrecen, 2025.10.03.





Nyilvántartási szám: DEENK/539/2025.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Lente Gréta
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10089904

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Lente, G.**, Tóth, A., Balogh, E., Csiki, D. M., Nagy, B. J., Szöőr, Á., Jeney, V.: The OsteoSense Imaging Agent Identifies Organ-Specific Patterns of Soft Tissue Calcification in an Adenine-Induced Chronic Kidney Disease Mouse Model.
Int. J. Mol. Sci. 26 (17), 1-14, 2025.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms26178525>
IF: 4.9 (2024)
2. Tóth, A., **Lente, G.**, Csiki, D. M., Balogh, E., Szöőr, Á., Nagy, B. J., Jeney, V.: Activation of PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP branch of endoplasmic reticulum stress response and cooperation between HIF-1 α and ATF4 promotes Daprodustat-induced vascular calcification.
Front. Pharmacol. 15, 1-12, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2024.1399248>
IF: 4.8

További közlemények

3. Ababneh, H. M., Balogh, E., Csiki, D. M., **Lente, G.**, Fenyvesi, F., Tóth, A., Jeney, V.: High glucose promotes osteogenic differentiation of human lens epithelial cells through hypoxia-inducible factor (HIF) activation.
J. Cell. Physiol. 239 (5), 1-12, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.31211>
IF: 4
4. Ababneh, H. M., Tóth, A., **Lente, G.**, Balogh, E., Csiki, D. M., Nagy, B. J., Szöőr, Á., Jeney, V.: High phosphate and calcium induce osteoblastic phenotype switching and calcification of corneal epithelial cells in a Runx2-dependent and synergistic manner; a possible mechanism of chronic kidney disease-associated corneal calcification.
Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis Dis. 1870 (5), 1-20, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2024.167171>
IF: 4.2

