

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Humán mesenchymális őssejtek és
szemlencse epithél sejtek oszteogenikus
differentiálódásának vizsgálata**

Balogh Enikő

Témavezető:

Dr. Jeney Viktória



**DEBRECENI
EGYETEM**

DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2018

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék.....	2
2. Rövidítések jegyzéke.....	5
3. Bevezetés.....	6
4. Irodalmi áttekintés.....	7
4.1. Az oszteogenikus differenciálódás jelentősége a csontképződésben	7
4.1.1. A mesenchymális őssejtek.....	7
4.1.2. A MSCs elköteleződése és a többirányú differenciálódás képessége.....	8
4.1.3. A MSCs oszteoblaszt irányú differenciálódása.....	9
4.1.4. A MSCs szerepe a csontszövet átépülésében és regenerációjában.....	10
4.1.5. A MSCs szerepe az oszteoporózis kialakulásában.....	12
4.2. Az oszteoporózis és a vastöbblet összefüggései.....	12
4.2.1. Klinikai megfigyelések.....	13
4.2.1.1. Talasszémiák.....	13
4.2.1.2. Sarlósejtes anémia.....	13
4.2.1.3. Hemokromatózis.....	14
4.2.1.4. Menopauza.....	14
4.2.2. Vas túltelítettséggel kapcsolatos csontfenotípus állatmodellekben.....	15
4.2.3. Sejtes mechanizmusok.....	15
4.2.3.1. A vas hatása oszteoklasztok működésére.....	16
4.2.3.2. A vas hatása oszteoblasztok működésére.....	16
4.3. Az oszteogenikus differenciálódás ektópiás kalcifikációban.....	17
4.3.1. Az ektópiás kalcifikáció molekuláris mechanizmusa.....	17
4.3.2. Ektópiás kalcifikáció a szemben.....	18
4.3.3. A katarakta epidemiológiája.....	18
4.3.4. A szemlencse felépítése és élettana.....	18
4.3.5. A katarakta kialakulásának mechanizmusa.....	19
5. Célkitűzések.....	21
6. Anyagok és módszerek.....	22
6.1. Anyagok.....	22
6.2. Sejtenyésztés.....	22
6.3. BMSCs és HuLECs oszteogenikus differenciálódásának indukálása.....	22
6.4. BMSCs adipogén és kondrogén differenciálódásának indukálása.....	22
6.5. Alizarin vörös festés.....	22
6.6. Alcián kék festés.....	23
6.7. Oil red lipid festés.....	23
6.8. Kalcium mennyiségi meghatározása.....	23
6.9. Sejtek életképességének meghatározása.....	23
6.10. Az extracelluláris mátrix oszteokalcin tartalmának meghatározása.....	23
6.11. Alkalikus foszfatáz enzimaktivitás meghatározása.....	24
6.12. Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (qRT-PCR).....	24

6.13.	Western blot analízis.....	25
6.14.	Egér kísérletek.....	26
6.15.	Oszteoprogenitor sejtek izolálása kompakt csontból.....	26
6.16.	Humán lencse minták.....	26
6.17.	Statisztika.....	27
7.	Eredmények.....	28
7.1.	A vastöbbslet hatása BMSCs oszteogén, kondrogén és adipogén irányú differenciálódására.....	28
7.1.1.	A Pi és a Ca szinergista módon fokozza a BMSCs oszteogén differenciálódását.....	30
7.1.2.	A vastöbbslet gátolja a BMSCs oszteogenikus differenciálódását és mineralizációját.....	33
7.1.3.	A ferritin a vashoz hasonlóan gátolja a BMSCs oszteogenikus differenciálódását és mineralizációját.....	35
7.1.4.	A vastöbbslet csökkenti az oszteoprogenitor sejtek Runx2 expresszióját in vivo.....	36
7.1.5.	A vas túltelítettség nem befolyásolja a BMSCs kondrocita és adipocita irányú differenciálódását.....	36
7.2.	Lencse epithél sejtek oszteogén differenciálódása.....	38
7.2.1.	Az oszteogenikus stimuláció indukálja a HuLECs oszteogén differenciálódását és mineralizációját.....	38
7.2.2.	Eltérések és hasonlóságok a HuLECs oszteogenikus differenciálódása és az EMT között.....	42
7.2.3.	Az oszteogenikus differenciálódás markereinek kimutatása humán kataraktás szemlencsében.....	44
8.	Diszkusszió.....	45
9.	Konklúziók.....	50
10.	Összefoglalás.....	51
11.	Summary.....	52
12.	Köszönetnyilvánítás.....	53
13.	Irodalomjegyzék.....	54
14.	Publikációs lista.....	67
15.	Tárgyszavak.....	69
16.	Függelék.....	70

2. Rövidítések jegyzéke

A magyarra csak nehézkesen fordítható kifejezések angolul szerepelnek.

ALP: alkalikus foszfatáz

α -SMA: alfa-simaizom aktin

BMD: csontsűrűség

BCA: bicinkoninsav

BMP-2: csont morfogenetikus fehérje 2

BMSCs: csontvelői eredetű mezenchymális őssejtek

Ca: kalcium

CHX: cikloheximid

DMEM: Dulbecco-féle módosított sejtenyésztő médium

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

ECM: extracelluláris mátrix

ELISA: enzim-kapcsolt immunszorbens vizsgálat

EMT: epiteliális-mezenchimális transzformáció

FBS: főtális borjú szérum

FGF: fibroblaszt növekedési faktor

FTH: ferritin nehéz lánc

FTL: ferritin könnyű lánc

GSH: glutation

HA: hidroxipatit

HFE: humán hemokromatózis fehérje

HPRT: hipoxantin-guanin-foszforibozil-transzferáz

HuLECs: humán szemlencse epitél sejtek

LEC: szemlencse epitél sejt

MSCs: mesenchymális őssejtek

Msx2: Msh homeobox 2

NAC: N-acetil-cisztein

OCN: oszteokalcin

OPG: oszteoprotegerin

Pax-6: paired box 6 fehérje

PBS: foszfáttal pufferolt sóoldat

PDGF: trombocita eredetű növekedési faktor
Pi: inorganikus foszfát
PiT: foszfát transzporter
PFA: paraformaldehid
PPAR γ : peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor gamma
PXE: pseudoxanthoma elasticum
RANK: NF κ B aktivátor receptor
RANKL: RANK ligand
ROS: reaktív oxigén intermedierek
Runx2: Runt-related transcription factor 2
Sox9: (Sex Determining Region Y)-Box 9
SLUG: Snail transzkripció faktor
TFR1: transferrin receptor 1
TGF- β : transzformáló növekedési faktor- β
TNAP: nem szövetspecifikus alkalikus foszfataáz
TRAP: tartarát-rezisztens savas foszfataáz
TRIS: trisz-(hidroximetil)-amino-metán
TWEEN 20: polioxietilén (20)-szorbitán-laurát
VSMCs: vaszkuláris simaizom sejtek

3. Bevezetés

Az oszteogenikus differenciálódás fiziológiás és pathofiziológiás folyamatokban is szerepet játszik. Fiziológiás jelentősége a mineralizált szövetek kialakulásában, illetve a csontátépülésben van. A pathofiziológiás oszteogenikus differenciálódás pedig a lágy szövetek mineralizációjához köthető.

Az őssejtek oszteogén irányú differenciálódása egy komplex folyamat, melynek eredményeként oszteoblasztok jönnek létre, melyek a csontmátrix felépítésében vesznek részt. Az oszteogén differenciálódás gátlása a csontszövet anatómiai és strukturális integritásának csökkenését eredményezi. Régóta ismert, hogy a krónikusvas túltelítettség csontvesztéssel társul, melynek hátterében számos mechanizmust azonosítottak. Munkánk során a vastöbbslet hatását vizsgáltuk csontvelő eredetű mesenchymális őssejtek oszteoblaszt irányú differenciálódására. Megállapítottuk, hogy a vastöbbslet gátolja a mesenchymális őssejtek oszteogén differenciálódását, mely folyamat hozzájárulhat a krónikus vastöbbsletben kialakuló csontvesztéshez.

A lágy szövetek mineralizációja vagy más néven ektópiás kalcifikáció során a csontmátrixhoz hasonló hidroxipatit kristályok lerakódása figyelhető meg extraszkeletális szövetekben. Az ektópiás kalcifikáció legismertebb formája a vaszkuláris kalcifikáció, melynek hátterében jelenlegi ismereteink alapján a vaszkuláris simaizomsejtek oszteogén irányú transzdifferentiálódása áll. Érdekes módon a kalcifikált erekben található hidroxipatit kristályokhoz hasonló anyag jelenlétét figyelték meg kataraktás szemlencsében és csarnokvízben. A kataraktás szemlencsében lévő hidroxipatit kristályok képződésének mechanizmusára jelenlegi ismereteink nem szolgálnak magyarázattal.

Munkánk során feltételeztük, hogy a vaszkuláris kalcifikációhoz hasonlóan a kataraktás lencse kalcifikációja aktív, sejtek által irányított folyamat, melyben valószínűsítettük a lencse epithél sejtek oszteogén differenciálódásának szerepét. Megállapítottuk, hogy a vaszkuláris simaizomsejtekhez hasonló módon a lencse epithél sejtek oszteogén irányú differenciálódása és mineralizációja oszteogén stimulussal *in vitro* körülmények között indukálható. Néhány kataraktás szemlencsében oszteoblaszt-specifikus fehérjét tudtunk kimutatni, mely arra utalhat, hogy a lencse epithél sejtek oszteogén differenciálódása katarakta képződés során egyes esetekben bekövetkezhet.

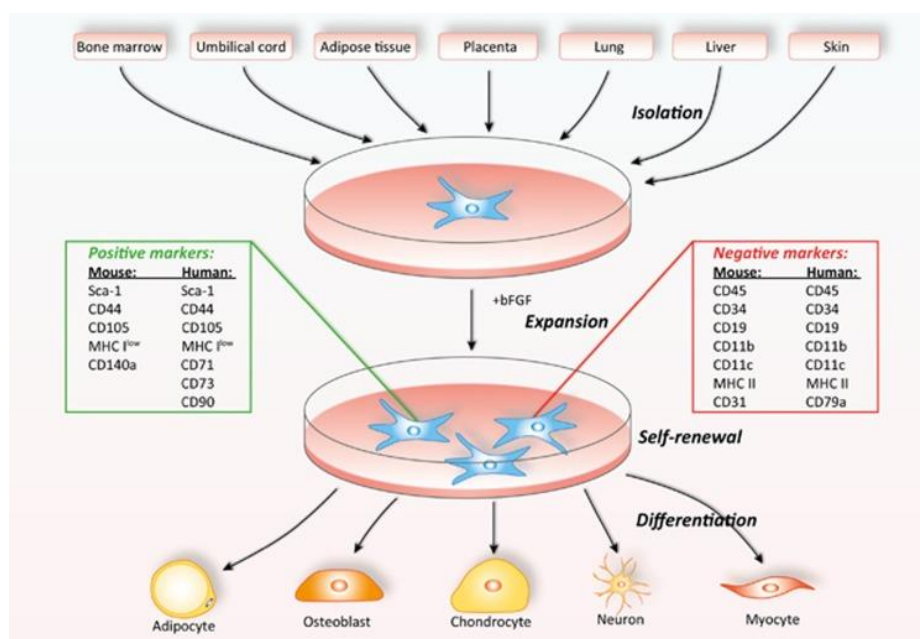
4. Irodalmi áttekintés

4.1. Az oszteogénikus differenciálódás jelentősége a csontképződésben

4.1.1. A mesenchymális őssejtek (MSCs)

Azokat a multipotens szöveti őssejteket, amelyekből a stroma összes sejtje (csont-, porc-, zsír, valamint a vérvérvetést támogató stroma) kialakulhat, mesenchymális őssejteknek nevezzük. A MSCs önmegújulásra képes, könnyen izolálható, nagy osztódó- és migrációs képességű sejtek. Mindezen tulajdonságok, valamint az autológ MSCs használatával az allogén transzplantációs válaszok kiküszöbölésének lehetősége új távlatokat nyitott a regeneratív orvoslásban (1-5).

A MSCs jelenlétét elsőként a csontvelőben figyelték meg, majd a későbbiekben számos – neonatális és felnőtt – szövetből izolálták, mint például köldökszinór, placenta, zsírszövet, máj, lép, bőr, tüdő (6-12).



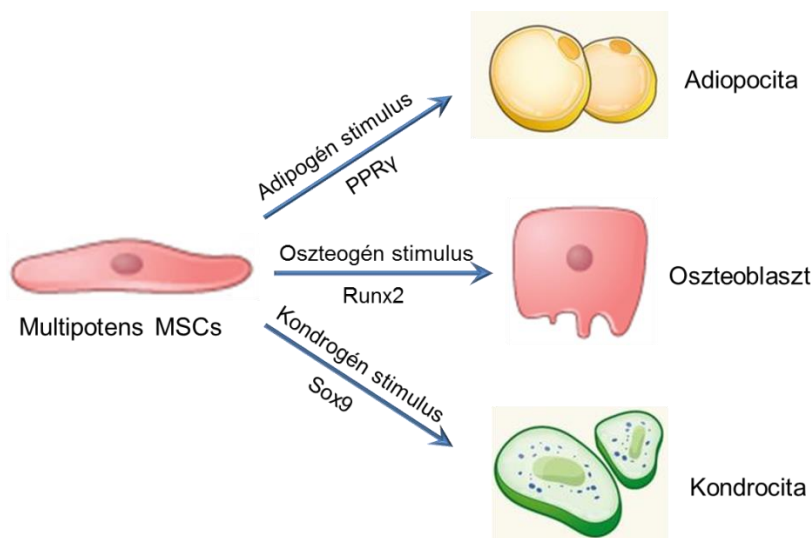
1. ábra A MSCs izolálása és differenciálódása. A MSCs-et különféle szövetekből izolálhatjuk. Az izolálás után a sejtek *in vitro* körülmények között szaporíthatók. Pozitív és negatív markerek mérésével meghatározható a MSCs kultúra tisztasága. A multipotens MSCs *in vitro* körülmények között különféle sejttypusokká képes differenciálódni. **Forrás:** Chen Q et al. Fate decision of mesenchymal stem cells. adipocytes or osteoblasts? Cell Death Differ. (13).

A MSCs orsó alakú, letapadó sejtek, melyek *in vitro* körülmények között egy sejtréteget képeznek és megtartják oszteoblaszt, adipocita és kondrocita irányú differenciálódási képességüket. A MSCs nem jellemezhetők egy kitüntetett sejtfelszíni markerrel, így az MSCs immunfenotípus azonosítására számos sejtfelszíni marker együttes megléte illetve hiánya alkalmas. A mesenchymális őssejtek CD44, CD73, CD29, CD90 és CD 105 pozitivitást mutatnak, ugyanakkor nem expresszálnak hematopoitikus vagy endothél markereket, úgymint CD11, CD14, CD31, CD34 és CD45 (13-15).

4.1.2. A MSCs elköteleződése, és a többirányú differenciálódás képessége

A már említett csont-, porc-, és zsírsejt irányú differenciálódáson kívül a MSCs további sejttypusokká is képesek differenciálódni, így kialakulhat belőlük például szív-, váz-, illetve simaizomsejt vagy fibroblaszt is (1. ábra) (8).

A MSCs különböző sejttypussá való differenciálódásának első lépése az őssejt elköteleződése az adott vonal irányába. A MSCs elköteleződését számos különféle ágens kiválthatja, általánosságban azonban elmondható, hogy a különféle induktorok egy-egy, az adott sejttypussá válást szabályozó, úgynevezett mester transzkripciós faktor indukcióját idézik elő (8). Ily módon a MSCs oszteogén irányú elköteleződését és differenciálódását a Runx2, a kondrogén differenciálódást a Sox9, míg a adipocita irányú differenciálódást a peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor gamma (PPAR γ) mester transzkripciós faktorok irányítják (8) (2. ábra).



2. ábra A MSCs elköteleződését és differenciálódását irányító mester transzkripciós faktorok. A MSC-k oszteogén irányú elköteleződését és differenciálódását elsősorban a Runx2, a kondrogén differenciálódást a Sox9, míg az adipocita irányú differenciálódást a PPAR γ mester transzkripciós faktorok irányítják.

Számos kutatócsoport figyelte meg azt, hogy ha egy adott irányú differenciálódást szabályozó mester transzkripciós faktor expressziója megemelkedik a MSCs-ben, akkor a további differenciálódási útvonalak gátlódnak. Különösen igaz ez az oszteogenikus illetve az adipogén differenciálódások tekintetében, melyek egymással inverz kapcsolatban állnak, így azok a szignál útvonalak, amelyek fokozzák az adipogén differenciálódást egyidejűleg gátolják az oszteogén differenciálódást, és ennek a fordítottja is igaz az esetek túlnyomó részében (13, 16).

4.1.3. A MSCs oszteoblaszt irányú differenciálódása

A MSCs oszteogenikus differenciálódását számos növekedési- és differenciálódási faktor kiváltja, mint például a transzformáló növekedési faktor-béta (TGF- β), a csont morfogenetikus protein (BMP) és a fibroblaszt növekedési faktor (FGF) (17, 18). A növekedési- és differenciálódási faktorok specifikus szignálútvonalakat aktiválnak, melyek kitüntetett szerepet játszanak mind az embrionális csontfejlődésben mind a posztnatális csont homeosztázisban.

A növekedési- és differenciálódási faktorok gyakran szinergista módon idézik elő a MSCs oszteogén differenciálódását (19). A TGF- β , BMP illetve FGF szignálútvonalak mellett a MSCs oszteogén differenciálódásában fontos szerepet játszik a Wnt, és a Hedgehog jelátviteli útvonal is (13, 20). A szignálútvonalak összehangolt aktivációja eredményezi a Runx2 mester oszteogén transzkripciós faktor expressziójának illetve aktivitásának emelkedését (21). A Runx2 embrionális csontfejlődésben betöltött kitüntetett szerepét bizonyítja, hogy a Runx2 hiányos egérben nincsenek differenciált oszteoblasztok, mely a csontképződés elmaradásával jár együtt. E miatt a Runx2 hiányos egerek nem életképesek, és születésük után rövidesen elpusztulnak (22, 23). A Runx2 transzkripciós faktor számos csont-specifikus fehérje, – mint például az oszteokalcin (OCN), az oszteopontin, a csont szialoprotein illetve az I-es típusú kollagén alfa-1 alegysége – transzkripcióját szabályozza (24). A növekedési- és differenciálódási faktorokon kívül az aszkorbinsav, a β -glicerofoszfát, a dexametazon illetve a D-vitamin is előidézi a MSCs oszteogenikus differenciálódását (25). Mostanában felmerült a reaktív oxigén intermedierek (ROS) szerepe a MSCs oszteogén differenciálódásában. Az eredmények arra engednek következtetni, hogy (i) a ROS szint lehet a közös nevező, amin keresztül a szerteágazó jelátviteli útvonalak előidézik a MSCs oszteogén differenciálódását, valamint hogy (ii) a ROS szigorúan szabályozott szintje elengedhetetlen a MSCs oszteogén differenciálódása során (26).

4.1.4. A MSCs szerepe a csontszövet átépülésében és regenerációjában

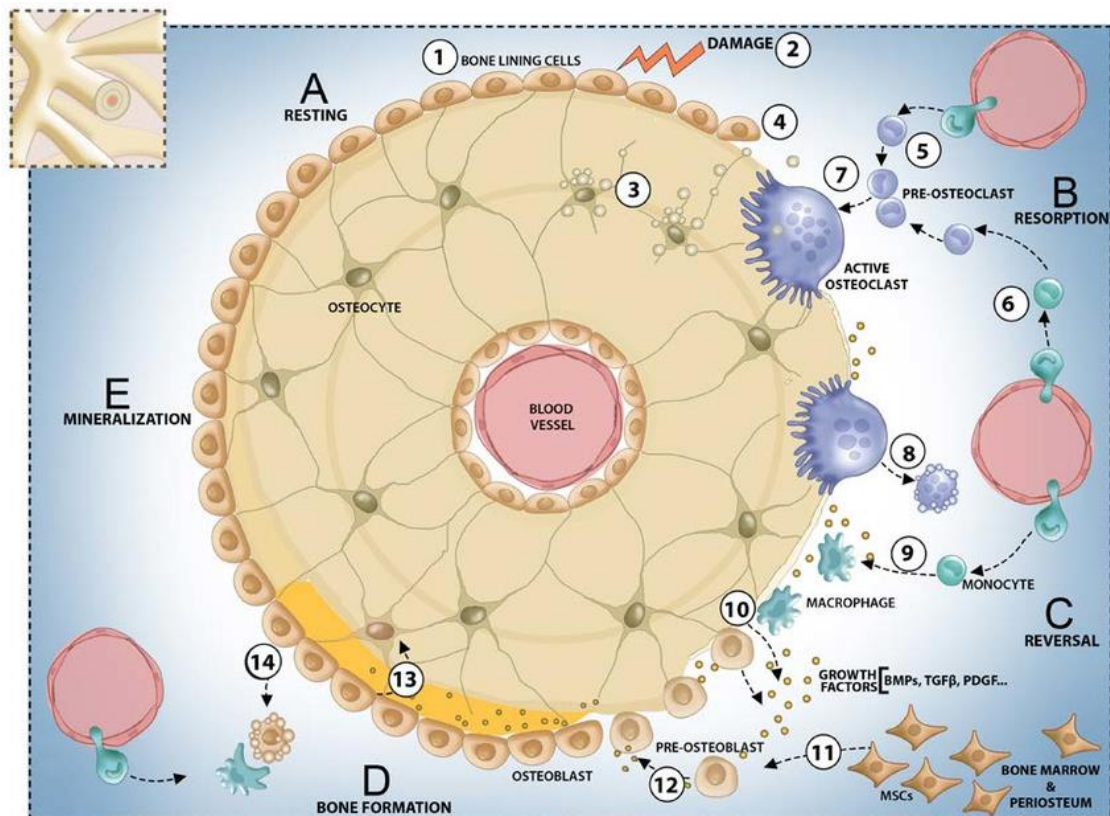
Az emberi csontrendszer élő szerv, mely a csúcs-csonttömeg elérése után is, mely 30-35 éves korra tehető, folyamatosan átépül. Ideális körülmények között egy év alatt az össz-csonttömeg 5-10 %-a újul meg. A csontátépülés összehangolt működése elengedhetetlen a csontszövet anatómiai és strukturális integritásának megőrzésében.

A csontszövet sejtekből és sejtközzötti állományból áll. A csontszövet extracelluláris mátrixának fő alkotórészei a kollagén rostok (I. típusú kollagén) és emellett egyéb, nem kollagén típusú molekulák: proteoglikánok (kondroitin-szulfát, heparin-szulfát, biglikán, dekorin), glikoproteinek (alkalikus foszfatáz, oszteonectin), sejteket összekötő fehérjék (fibronectin, oszteopontin, integrinek), γ -karboxilált fehérjék (oszteokalcin). A szervetlen állomány Ca^{2+} és PO_4^{3-} ionokból álló hidroxipapatit kristályok formájában rakódik le a kollagén rostok által létrehozott térhálóban (27).

A csontszövet jellegzetes sejtjei az oszteoklasztok, az oszteoblasztok, és az oszteocyták (28). Az oszteoklasztok terminálisan differenciálódott több sejtmaggal rendelkező óriássejtek. Az oszteoklasztok a makrofágokkal és a dendritikus sejtekkel közös, hemopoetikus eredetű mieloid előalakokból számos faktor által szabályozott módon differenciálódnak. Fő funkciójuk a csontszövet reszorpciója (29). A MSCs eredetű oszteoblasztok fő funkciója a csontszövet kollagénben gazdag oszteoid állományának termelése (28). Morfológiailag fehérjeszintetizáló sejtek, fejlett Golgi és durva endoplazmatikus retikulum rendszerrel, illetve különféle szekréciós vezikulumokkal rendelkeznek (30). Az oszteoblasztok polarizált sejtek, az oszteoidot a csontmátrix irányába szekretálják (31). Végül, az érett csontszövet harmadik és egyben leggyakoribb sejtípusa az oszteocyta, mely az összes csontsejt 90-95 %-át teszi ki, a mineralizálódott csontszövettel körbezárt oszteoblasztokból fejlődik ki (32). Az oszteocyták számos, a környezetükből érkező mechanikai és kémiai szignált érzékelnek és integrálnak, szabályozzák a csontátépülésben szerepet játszó effektor sejtek, az oszteoblasztok és az oszteoklasztok aktivitását, ez által szabályozzák a csontátépülést (32, 33).

A csontátépülés első fázisában a nyugalomban lévő csontállomány felszínét borító úgynevezett burkoló sejtek (lining cells) helyére oszteoklasztok vándorolnak és proteolitikus enzimeik segítségével megkezdik a csont feloldását. Az így létrejött reszorpciós üreg (Howship-lacuna) környezetében a csont mátrix feloldása során számos olyan molekula válik szabaddá, mely befolyásolja a csontvelő mikrokörnyezetét, és befolyásolja a csontátépülést. Ilyen molekula például a TGF- β családba tartozó TGF- β 1, mely a csontszövet legmagasabb

koncentrációban (200 µg/kg) jelenlévő citokinje (34). A csontátépülés során a TGF-β1-et az oszteoklasztok aktiválják, és az aktív TGF-β1 grádiens hatására a MSCs a reszorpciós üreg irányába migrálnak (35). A csontszövetből felszabaduló citokinek (BMP, TGF-β) illetve növekedési faktorok (PDGF, FGF) a MSCs proliferációjában és oszteogén differenciálódásában is fontos szerepet játszanak (36). A csontátépülés utolsó fázisában a MSCs-ből differenciálódott oszteoblasztok először szerves állománnyal, főként I. típusú kollagénnel töltik ki a reszorpciós üreget, majd a mineralizáció során a kollagén hálóra épülnek be az ásványi anyagok, a Ca-ban és foszfátban gazdag hidroxipapatit (3. ábra).



3. ábra A csontátépülés mechanizmusa. A nyugalomban lévő csontállomány (A) felszínét burkoló sejtek (lining cells) borítják (1). A csontot ért mikrosérülés (2) az oszteociták apoptózisát és a burkoló sejtek leválását okozza (4). A sérülés környezetében lévő mikroerekből monociták vándorolnak a helyszínre és pre-oszteoklasztokká differenciálódnak (5,6). A reszorpciós fázisban (B) az oszteoklasztok a csontfelszínhez tapadnak, és megkezdik a csont feloldását (7). A reszorpciós fázis végén az oszteoklasztok leválnak a csontfelszínről és apoptózisban elpusztulnak (8). (C) A feloldott csontmátrix törmelégeit makrofágok távolítják el (9). A reszorpció során a csontszövetből felszabaduló citokinek és növekedési faktorok (10) kemotaktikusak a MSCs-re és előidézik a MSCs migrációját (11) és oszteogén differenciálódását (12). A csontképződés fázisában (D) az oszteoblasztok elsőként nem mineralizált mátrixot termelnek. A mineralizáció fázisa során (E) néhány oszteoblaszt oszteocitává differenciálódik (13), burkoló sejté alakul, vagy apoptózisban elpusztul (14) (37).

4.1.5. A MSCs szerepe az osteoporózis kialakulásában

Az osteoporózis vagy csonttriturálás a csont ásványianyag tartalmának csökkenését jelenti. Az osteoporózis jelenleg a világon az egyik legjelentősebb egészségügyi probléma, globálisan körülbelül évi 9 millióra tehető az osteoporózissal összefüggésbe hozható csonttörések száma (38). Hazai adatok alapján Magyarországon mintegy 600 ezer nő és 300 ezer férfi él osteoporózissal (39).

Az osteoporózis hátterében a csontátépülés finoman szabályozott mechanizmusának megbomlása áll, oly módon, hogy a csontreszorpció sebessége meghaladja a csontképzését (40). A csontsűrűség (bone mineral density: BMD) csökkenése a csontszerkezet minőségbeli romlásával jár. Nagymértékben megváltozik a csont mikroarchitektúrája, kollagénstruktúrája és csökken a mátrix mineralizációja.

Az osteoporózis legfőbb rizikófaktorai a magas életkor, azonban számos civilizációs ártalom, mint például a mozgásszegény életmód, a dohányzás, a stresszes életvitel, az egyoldalú táplálkozás, az alacsony Ca bevitel illetve a D vitamin hiánya is hozzájárulhat kialakulásához (38, 41, 42). E mellett bizonyos gyógyszerek, mint például pajzsmirigy hormonok, véralvadás gátlók, illetve szteroidok szedése is megzavarhatja a csontátépülés folyamatainak kényes egyensúlyát, ezáltal osteoporózist okozva (43). Továbbá különös jelentőségű a nők menopauza után kialakuló osteoporózisa, mely az 50 év feletti nők mintegy harmadát érinti (44).

Egyre világosabbá válik a MSC-k szerepe az öregedést kísérő csonttriturálás folyamatában. Az őssejtek számának csökkenése az életkor előrehaladtával vitatott, ugyanis a szakirodalomban vannak ezt alátámasztó, illetve cáfoló közlemények is, ugyanakkor ahhoz nem fér kétség, hogy az öregedés során megváltozik az őssejtek differenciálódási képessége (45). Számos tanulmányban kimutatták, hogy az idősebb egyénekből származó MSC-k osteogén differenciálódási képessége lecsökken, ezzel párhuzamosan viszont erősödik az adipogén differenciálódási hajlam (46-48). A MSC-k osteogén-adipogén differenciálódás egyensúlyának megbomlása következtében a zsírszövet térfogataránya megemelkedik osteoporetikus betegek csontvelőmintáiban (49).

4.2. Az osteoporózis és a vastöbbség összefüggései

Számos betegség illetve kondíció vezethet krónikus vasfelhalmozódáshoz, többek között az örökletes hemokromatózis, különféle hemoglobinopátiák, de akár a menopauzás tünetegyüttes részeként is kialakulhat. Estettanulmányok és klinikai tanulmányok derítették fényt arra, hogy

a krónikus vasfelhalmozódás a csontok gyengülésével jár együtt, amely jelentkezhet csökkent csontsűrűség, csonttritkulás, illetve csonttörések formájában is. A vas csont-metabolizmusra kifejtett negatív hatását számos vastöbbletet vizsgáló állatmodellben is megfigyelték és számos tanulmányban vizsgálták a vas oszteoklasztokra illetve az oszteoblasztokra kifejtett hatását.

4.2.1. Klinikai megfigyelések

4.2.1.1. Talasszémiák

A talasszémiák örökletes betegségek, melyek hátterében a hemoglobin alfa-, illetve béta-láncát kódoló gének különféle mutációja áll, mely eltérő mértékű anémiához vezet (50). A talasszémiás betegek hemoglobin szintjét csak rendszeres transzfúziós terápiával lehet biztosítani (50). Mivel a szervezetünkben nincs aktív, a vas eltávolítását célzó mechanizmus, ezért a transzfundált talasszémiás betegekben vas túltelítettség alakul ki. A főlegben lévő vas a szervekben rakódik le, elsősorban a májban, a szívben, a hasnyálmirigyben, illetve a hipofízisben. A vas túltelítettség megelőzése céljából a transzfundált talasszémiás betegek vaskeláló terápiában is részesülnek (51). Ennek ellenére a vastúltelítettség a betegség fő problémája, mely nagymértékben hozzájárul a talasszémiát kísérő több szervet érintő komplikációkhoz.

A kezeletlen talasszémiák leggyakoribb társbetegsége az oszteoporózis és a csonttörések, mely a kelációs terápia fejlődésével csökkenő tendenciát mutatott, azonban egy 2006-ban közölt tanulmány szerint a csonttörések száma ismét emelkedik a talasszémiás major és intermediate betegekben, mely valószínűleg a betegek magasabb életkorával hozható összefüggésbe (52-58). Lényeges kiemelni azt, hogy a csonttörések kockázata korrelál az anémia súlyosságával és a transzfúziók gyakoriságával. A talasszémiás betegekben a csontsűrűség csökkenése megbízható előjele a csonttöréseknek. Az alacsony csontsűrűség megjelenése a talasszémiás betegek életkorával drasztikusan nő, így az alacsony csontsűrűség a talasszémiás gyerekek kevesebb mint 10%-át érinti, ugyanakkor a felnőttek több mint 60%-a érintett függetlenül a kezelés sikerességétől (58).

4.2.1.2. Sarlósejtes anémia

A sarlósejtes anémia egy örökletes autoszomális recesszív betegség, mely mögött egy, a hemoglobin béta lánc génjében bekövetkezett pontmutáció áll. A sarlósejtes anémia a leggyakoribb hemoglobinopátia, mely csökkent élettartammal jár együtt (59). Sarlósejtes anémiában gyakori a csontérintettség, mely különböző módokon jelentkezhet, úgymint csont

fájdalmak, csigolya csont deformitások, osteopénia, osteoporózis illetve patológiás törések (60, 61). A sárlósejtes anémiás betegek több mint 70%-ában alakul ki alacsony csontsűrűség 30 éves korukra (62-65). A sárlósejtes anémiás betegek alacsony csontdenzitásának oka nem ismert, de összefüggésben áll a hemolízis mértékével és a hemoglobín szint csökkenésével (66). A sárlósejtes anémiás beteg vas státusza ellentmondásos. Egyes tanulmányok ugyanis azt írják le, hogy sárlósejtes anémiában vas túltelítettség van, míg mások vashiányról számolnak be (67, 68). Ez az ellentmondás valószínűleg a vas abnormalis kompartmentalizációjával magyarázható, mely a vas akkumulációját idézi elő a májban, lépben illetve vesében, ugyanakkor a csontvelői vasraktárak üresek (69). Minden esetre a magas szérumban vas szinttel rendelkező sárlósejtes anémiás betegek 70%-a alacsony csontsűrűséggel jellemezhető (70).

4.2.1.3. Hemokromatózis

A hemokromatózis a vasanyagcsere autoszómális, recesszív módon öröklődő betegsége, melyben fokozódik a vas felszívódása a bélben.

Hereditár hemokromatózis háttérében a vasanyagcsere szabályozó fehérjéket kódoló gének mutációja áll. Ezek közül a leggyakoribb a HFE génmutációval járó hemokromatózis, ritkábbak a nem HFE mutációhoz köthető hemokromatózis. A kaukázusi populációban a hemokromatózis leggyakoribb oka a HFE gén Cys282Tyr mutációja (71, 72). Az elmúlt 50 évben bebizonyosodott, hogy a hemokromatózis negatívan hat a csontokra és ízületekre (73). A hemokromatózis a betegek 40-80%-ában osteopéniával, 25-34%-ában osteoporózissal társul (74-76). Klinikai tanulmányok bizonyították, hogy hemokromatózisban a vas túltelítettség mértéke szorosan korrelál az osteoporózis súlyosságával (74, 77-79). A hemokromatózisban szenvedő betegekben osteoporotikus törések következhetnek be, melyen belül a csukló illetve gerinctörések gyakorisága összefüggésben áll a vas túltelítettség mértékével (80, 81).

4.2.1.4. Menopauza

A menopauza utáni osteoporózis az 50 évnél idősebb nők mintegy 30%-át érinti (44). A betegséget a fokozódó csontvesztés, és a csonttörések rizikójának emelkedése jellemzi, melynek eredményeként a menopauza után nők fele szenved el valamilyen osteoporózissal összefüggésbe hozható csonttörést (82, 83). A menopauzát követően kialakuló osteoporózis kialakulásában fontos szerepet játszik az ösztrogén szint csökkenése, mely kihat a csont metabolizmusra oly módon, hogy csökkenti a csontképződést és fokozza a csont reszorpciót (84).

A menopauza egy komplex folyamat, melyben a hormonális változásokat egyéb metabolikus változások is kísérik. Például az ösztrogén szint csökkenésével párhuzamosan a menopauza során a szérum ferritin szint 2-3-szoros emelkedését figyelték meg (85, 86). Annak ellenére, hogy a menopauzában megemelkedett vas/ferritin szint többnyire még a referencia tartományba esik, számos káros hatását írták le (87). Kim és munkacsoportja egy 940 menopauzán átesett nő részvételével végzett 3 éves retrospektív tanulmányban kimutatta, hogy az évenkénti csontvesztés sebessége szoros összefüggésben van a szérum ferritin szintjével oly módon, hogy a legnagyobb mértékű csontvesztés a felső negyedbe eső ferritin szintek mellett következik be (88). A szérum ferritin szint és a csontdenzitás közötti inverz összefüggés fennállását egy 45 év feletti nők körében végzett, Koreai, populáció alapú keresztmetszeti tanulmány is megerősítette (89).

4.2.2. Vas túltelítettséggel kapcsolatos csontfenotípus állatmodellekben

A vas túltelítettség csontmetabolizmusra gyakorolt hatását állatmodellekben is vizsgálták. Tsay és munkacsoportja C57/BL6 egereket 2 hónapon keresztül folytatott vas-dextrán kezeléssel tett vas túltelítetté, melynek következményeként több szervben vas akkumulációt és oszteoporózis kialakulását figyelték meg (90). A ROS scavenger N-acetil cisztein (NAC) részlegesen gátolta a vas túltelítettség csontdenzitásra gyakorolt negatív hatását, mely a ROS aktív szerepére utal a vas túltelítettség által indukált csontvesztés mechanizmusában (90).

A magas vas szint csontokra gyakorolt negatív hatását számos vas túltelítettséggel járó genetikailag módosított egérmódelben is megfigyelték. Például a th3 talasszémia egérmódel heterozigóta és homozigóta egyedeiben, valamint a hemizigóta β -globin knockout és a $\beta^{\text{IVSII-654}}$ knockin talasszémia egérmódellekben is megfigyelték a szivacsos csontállomány csökkenését, elvékonyodását, a trabekulák számának csökkenését, a tömör csontállomány elvékonyodását és a csontvelői tér kitágulását (91-93). A sarlósejtes anémia egérmódeljeiben is hasonló csont mikroszerkezeti változásokat, a csontdenzitás csökkenését, valamint a csont biomechanikai tulajdonságainak romlását figyelték meg (94, 95). Oszteoporetikus csont fenotípust figyeltek meg különféle hemokromatózis modellekben is, úgymint HFE (96, 97) illetve hepcidin (98, 99) deficiens egerekben, illetve hepcidin deficiens zebadániókban (100).

4.2.3. Sejtes mechanizmusok

A klinikai megfigyelések és az állatmodelleken végzett megfigyelések arra utalnak, hogy a vas túltelítettség megzavarja a csontátépülést; a képződés és a reszorpció kényes egyensúlyát. A jelenség háttérében álló sejtes mechanizmusok felderítése céljából számos tanulmányban vizsgálták a vastöbblet oszteoklasztokra, illetve oszteoblasztokra kifejtett hatását.

4.2.3.1. A vas hatása oszteoklasztok működésére

Az oszteoklasztok differenciálódását és a preoszteoklasztok fúzióját a RANK (receptor activator of nuclear factor κ B) ligand (RANKL) receptorhoz való bekötődése iniciálja (101). A RANKL receptorhoz való kötődését az oszteoprotegerin (OPG) gátolja, így az oszteoklasztogenezist a RANKL/OPG arány határozza meg (102), mely így módon fontos meghatározója a csontsűrűségnek és a csontrendszer integritásának (103).

Számos tanulmány bizonyítja hogy a vastöbblet fokozza az oszteoklasztok differenciálódását, aktivációját és a csontreszorpciót. Az oszteoklasztok sok mitokondriummal rendelkeznek (104). A mitokondriumok biogenezise vas-függő folyamat, hiszen a légzési lánc fehérjéi vastartalmú fehérjék. Ennek megfelelően az oszteoklasztok differenciálódása szoros összefüggést mutat a transferrin receptor 1 (Tfr1) expressziójával és a sejtek vasfelvételével (104, 105). A Tfr1 mediált vasfelvétel fokozza az oszteoklasztok differenciálódását, a vas kelálása ezzel szemben gátolja a differenciálódást és az oszteoklasztok csontreszorpciós képességét (105). Jia és munkatársai kimutatták, hogy a vas fokozza a RANKL által indukált oszteoklaszt differenciálódást (106). Ezzel összhangban Cornish és társai kimutatták, hogy a vaskeláló hatású glikoprotein, a laktoferrin, gátolja a monociták oszteoklaszttá való differenciálódását (107).

Az oszteoklasztok differenciálódása mellett a vas befolyásolja az érett oszteoklasztok csontreszorpciós aktivitásához nélkülözhetetlen fehérje, a tartarát-rezisztens savanyú foszfatáz (TRAP) expresszióját és aktivitását is (108, 109). A TRAP fehérjét kódoló mRNS 5'- végén található egy vas reguláló elem, ami által a fehérje expressziója a vas által szabályozott (110). E mellett a TRAP fehérje 2 Fe^{3+} iont tartalmaz, mely szükséges az enzim aktivitásához, ugyanis a TRAP aktivitás Fe^{3+} kelálókkal gátolható (111, 112).

Összességében ezek a tanulmányok arra utalnak, hogy a vas túltelítettség fokozza az oszteoklasztok differenciálódását és aktivitását, mely mechanizmusok hozzájárulhatnak a vas túltelítettségi állapotokat jellemző csontvesztéshez.

4.2.3.2. A vas hatása oszteoblasztok működésére

A kérdés, hogy vajon a vas befolyásolja-e az oszteoblasztok funkcióját, több mint 25 éve foglalkoztatja a kutatókat. Az egyik legelső eredmény ezzel kapcsolatosan az a megfigyelés volt, hogy a vastöbblet gátolja az oszteoblaszt-szerű oszteoszarkóma sejtek proliferációját (113). Később Messer és munkatársai kimutatták, hogy az oszteoblasztokban, a szervezet többi sejtjéhez hasonlatos módon, vasfőlönség hatására gyorsan lecsökken a transferrin receptor expressziója, ezzel szemben emelkedik a vas tárolásában szerepet játszó fehérje, a

ferritin könnyű (FtL) és nehéz láncainak (FtH) expressziója (114). Ezzel párhuzamosan megfigyelték az oszteoblaszt-specifikus markerek, az ALP, az OCN és a kollagén I expressziójának, és a mineralizált nodulusok számának csökkenését (114).

Munkacsoportunk korábbi munkájában kimutatta, hogy a vas (Fe^{2+}) dózisfüggő módon csökkenti a Runx2 oszteoblaszt-specifikus transzkripciós faktor, valamint a Runx2 kontrollja alatt álló gének expresszióját, és magas dózisban ($50 \mu\text{mol/L}$) a mineralizációs képesség teljes elvesztését okozza érett oszteoblasztokon és oszteoszarkóma sejteken egyaránt (115). A vas anti-oszteogén hatásmechanizmusának vizsgálata során kiderült, hogy a gátlás hátterében a FtH molekula áll, mely exogén módon a sejtekbe juttatva önmagában képes a vas hatását előidézni. A FtH molekula ferroxidáz aktivitással rendelkezik, mely kulcsfontosságúnak bizonyult a FtH anti-oszteogén hatásában (115, 116).

4.3. Az oszteogenikus differenciálódás ektópiás kalcifikációban

Az ektópiás kalcifikáció a lágy szövetek patológiás mineralizációja, melynek során hidroxiapatit (HA) halmozódik fel az érintett lágy szövetben. Leggyakoribb megjelenési formája a vaszkuláris kalcifikáció, illetve az aortabillentyűk kalcifikációja, de számos egyéb szervet/szövetet is érinthet, úgymint tüdő, izmok, szem.

4.3.1. Az ektópiás kalcifikáció molekuláris mechanizmusa

Az ektópiás kalcifikációt hosszú időn keresztül passzív folyamatként, az öregedés velejárójaként tartották számon. Az ektópiás kalcifikáció legaktívabban kutatott formája, a vaszkuláris kalcifikáció kapcsán azonban növekvő mennyiségű bizonyíték utal arra, hogy az egy szorosan szabályozott aktív folyamat. Napjainkra bebizonyosodott, hogy a vaszkuláris kalcifikáció hátterében az érfali sejtek oszteogén/kondrogén differenciálódása áll (117). A differenciálódás során a mineralizálódó sejtekben indukálódnak az oszteogén és a kondrogén differenciálódás mester transzkripciós faktorai a Runx2, illetve a Sox9 (118-120). Ennek következtében a mineralizálódó sejtek génexpressziós mintázata jelentősen megváltozik, a simaizomsejtekben például lecsökken a jellegzetes simaizom markerek expressziója, és megemelkedik az oszteoblaszt-specifikus fehérjék szintézise (121).

Az ektópiás kalcifikációs kutatások legfontosabb modellje a vaszkuláris simaizomsejtek (VSMCs) magas koncentrációjú inorganikus foszfáttal (Pi) indukált oszteogén differenciálódása (122). A Pi -mediált kalcifikáció során az extracelluláris foszfát a nátrium-dependens foszfát ko-transzporterén (PiT) keresztül kerül (123). A megemelkedett koncentrációjú intracelluláris foszfát indukálja az oszteo/kondrogén transzkripciós faktorokat

és a VSMCs fenotípusváltását. A foszfát oszteogén hatását a Ca koncentráció emelése szinergista módon fokozza (124). Az oszteogenikus differenciálódás eredményeképpen a megváltozott fenotípusú simaizom sejtek kalciumban és foszfátban gazdag HA kristályokat képeznek, melyek jelenlétét *in vivo* körülmények között kalcifikálódott erekben is kimutatták (117, 118, 125).

4.3.2. Ektópiás kalcifikáció a szemben

A szemet érintő ektópiás kalcifikációnak számos megjelenési formája van, és néha más szerveket is érintő ektópiás kalcifikációs kórkép részeként jelenik meg. Így például a pseudoxanthoma elasticum (PXE) rendellenességet a bőr, a retina és a keringési rendszer elasztikus rostjainak egyidejű kalcifikációja jellemzi (126). Egy esettanulmányban veseelégtelenséggel összefüggő másodlagos hiperparatireózisban szenvedő beteg csarnokvíz mintájában magas foszfát és Ca szinteket mértek, valamint HA kristályok jelenlétét mutatták ki (127). A szaruhártya (cornea) kalcifikációja is előfordul, általában krónikus szemgyulladás kísérő tüneteként vagy szövődményeként (128). Végezetül, a kataraktás szemlencsében a kalcifikálódott érfalban található HA-hoz hasonló kémiai összetételű és szerkezetű Ca-foszfát kristályok jelenlétét írták le (129, 130).

4.3.3. A katarakta epidemiológiája

A szürkehályog, vagy más néven katarakta, a szemlencse elhomályosulása, ami világszerte a vezető vaksági ok (131). A Egészségügyi Világszervezet (WHO) a betegségek okozta össztársadalmi teherről szóló tanulmánya alapján 2010-ben 35,1 millióan szenvedtek katarakta okozta látáscsökkenéstől a világon (132). A kimutatás alapján világszerte 285 millió ember szenved látáscsökkenéstől, 39 millióan pedig vakságtól, amelynek mintegy harmadát szürkehályog okozza. A katarakta leggyakrabban idős korban alakul ki, előfordulási gyakorisága 65 év felett 25%, 80 év felett pedig 50% (133). Az európai társadalom progresszív öregedése magával vonja a szürkehályog előfordulási gyakoriságának emelkedését. Napjainkban a szürkehályog gyógyításának egyetlen módja a műtéti beavatkozás. 2014-ben az évente elvégzett műtétek száma Magyarországon meghaladta a 84 ezret (134).

4.3.4. A szemlencse felépítése és élettana

A szemlencse átlátszó, hám eredetű, vérerektől és idegektől mentes szövet, egy bikonvex lencséhez hasonlítható, amelynek elülső felszíne laposabb, a hátsó része pedig domború. A lencse állományát kívülről egy üvegszerű hártya, a lencsetok határolja. A lencse sejtes állományát kétféle sejt alkotja, a lencse epithél sejtek, és a belőlük differenciálódó sejtmagot

és organellumokat vesztett megnyúlt lencserostok. Az epithél sejtek szabályos köbhámsejt réteget alkotnak a lencsetok alatt a lencse elülső felszínén az egyenlítőig, a lencse belsejét a lencserostok töltik ki (135-137). A lencserostok organellum mentessége és szoros illeszkedése minimalizálja a lencse fényszórását, és biztosítja a lencse fényáteresztését a 390-1200 nm közötti hullámhossz tartományban (138). E mellett a szemlencse áttetszőségének és fénytörő tulajdonságainak fenntartásában a krisztallinok is fontos szerepet játszanak. A krisztallinok a lencsében nagy mennyiségben megtalálható vízdékony dajkafehérjék, fő funkciójuk a lencsefehérjék aggregációjának megelőzése (139, 140).

4.3.5. A katarakta kialakulásának mechanizmusa

Az utóbbi évtizedek kutatásai sok, a katarakta kialakulásának molekuláris mechanizmusát érintő kérdésre választ adtak ugyan, de a kórfolyamat még így sem ismert teljes egészében (139).

Ismert, hogy a katarakta etiológiájában fontos szerepet játszó tényezők, mint például a fokozott UV sugárzás vagy a magas glükóz szint a lencse epithél sejtekben apoptózist indukálnak (141, 142). A lencse epithél sejtek apoptózisa így a katarakta kialakulásának háttérben álló mechanizmusok egyike (143, 144).

Szakirodalmi adatok alapján az apoptózis mellett a lencse epithél sejtek mesenchymális irányú differenciálódása (epithel-mesenchymal transition: EMT) is szerepet játszik a katarakta kialakulásában. Az EMT kiváltó oka lehet valamilyen sérülés, de legfontosabb előidézője a TGF- β szintjének emelkedése. Jellegzetes a TGF- β hatásának kitett lencse epithél sejtek morfológiai változása, melynek során elvesztik jellegzetes térkő alakjukat, és fibroblasztra emlékeztető hosszúkás orsó alakú sejtekké differenciálódnak (145-148). A morfológiai változás mellett a TGF- β hatására a lencse epithél sejtekben jelentősen lecsökken a fenotípusos fehérjemarkerek (β -katenin, E-cadherin, Pax6, ZO-1) expressziója, és emelkedik a mesenchymális sejtekre jellemző extracelluláris mátrix fehérjék (alpha-simaizom aktin, laminin, tenaszcin, proteoglikánok, fibronektin, 1-es típusú kollagén) expressziója (145-148). Az EMT-ben fontos szerepet játszik a Snail szupercsaládba tartozó Slug transzkripciósfaktor, mely például az E-cadherin expresszióját is regulálja (149).

A katarakta kialakulásában továbbá fontos szerepet játszanak a krisztallinok. A krisztallinok a szemlencse vízben oldódó fehérjeinek mintegy 80%-át alkotják, hosszú életű fehérjék, melyek a szem öregedésével módosulnak, dajkafunkciójuk romlik. Ennek következtében a lencsében oldhatatlan fehérje aggregátumok keletkeznek, melyeken a lencsébe jutó fény szóródik (150-152).

Az oxidatív stressz számos öregedéssel együtt járó betegségben szerepet játszik és ez alól a katarakta sem kivétel (133). A fiatal szemlencse tartalmaz antioxidánsokat, pl. aszkorbinsav, redukált glutation (GSH), amelyek védő hatásúak a fehérjék oxidációjával és degradációjával szemben. Kimutatták, hogy a kor előrehaladtával a lencsében csökken az antioxidáns molekulák mennyisége és aktivitása (153, 154). Ennek következtében a fehérjék szulfhidril (SH) csoportjai oxidálódnak. 45 éves kor felett a lencse nukleuszában csökkenni kezd a GSH mennyisége, mellyel párhuzamosan nő az oxidált glutation mennyisége. A szem belsejében az oxidációs folyamatok olyan mértékben károsíthatják a szemlencsében található fehérjéket és lipideket, amely hozzájárulhat a katarakta kialakulásához.

5. Célkitűzések

Az előzőekben részletesen bemutatott klinikai megfigyelések és alapkutatási eredmények alapján az alábbi hipotéziseket fogalmaztuk meg:

1. Hipotézis: A vastöbbslet gátolja a MSCs oszteogén irányú differenciálódását.

Ennek kapcsán az alábbi célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

- 1.1 Megvizsgáljuk, hogy a vastöbbslet gátolja-e csontvelői eredetű MSCs (BMSCs) oszteogén irányú differenciálódását és extracelluláris mátrix mineralizációját *in vitro*.
- 1.2 Vizsgáljuk a ferritin hatását BMSCs oszteogén irányú differenciálódására.
- 1.3 Célul tűztük ki a krónikus vas túltelítettség hatásának vizsgálatát a kompakt csont eredetű oszteoprogenitor sejtek oszteogén differenciálódására *in vivo*, vas túltelítettség egér modellben.
- 1.4 További célunk volt annak a kérdésnek a megválaszolása, hogy a vastöbbslet befolyásolja-e BMSCs adipogén illetve kondrogén irányú differenciálódását.

2. Hipotézis: A lencse epithél sejtek oszteogén stimulus hatására oszteogén differenciálódáson mennek keresztül, mely folyamat hozzájárulhat a kataraktás szemlencsében található hidroxipatit kristályok kialakulásához.

Ennek kapcsán az alábbi célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

- 2.1 Megvizsgáljuk, hogy humán lencse epithél sejtekben (HuLECs) oszteogén stimulussal előidézhető-e oszteogén irányú differenciálódás és az extracelluláris mátrix mineralizációja *in vitro*.
- 2.2 Célul tűztük ki az eltérések és hasonlóságok vizsgálatát a HuLECs oszteogenikus differenciálódása és az EMT között.
- 2.3 További célunk volt a kataraktás szemlencsében oszteogén differenciációra utaló markerek vizsgálata.

6. Anyagok és Módszerek

6.1. *Anyagok*

A vizsgálatokhoz használt anyagok, amennyiben másként nem jelöltük a Sigma-tól (Sigma Aldrich, St. Luis, MO, USA) származtak.

6.2. *Sejtenyésztés*

A kísérleteket humán csontvelő eredetű mesenchymális őssejteken (BMSCs, ScienCell) és humán lencse epithél (HuLECs, ScienCell) sejteken végeztünk. A BMSCs-et 10% FBS (Gibco, ThermoFisher Scientific Grand Island, NY, USA), 200 mmol/ml L-glutamin, 10,000 U/ml penicillin, 10mg/ml streptomycin, 25 µg/ml amphotericin B és 1 mmol/L nátrium-piruvát tartalmú DMEM tápfolyadékban tenyésztettük. Kísérleteinkben a BMSCs passzázs száma 4-7 között volt. A HuLECs-et 10% FBS, 10,000 U/ml penicillin és streptomycin tartalmú EpiCM tápfolyadékban tenyésztettük. A sejtek passzázs száma 3-4 között volt. Néhány kísérletben immortalizált humán lencse epithél sejteket (iHuLEC, CRL-11421, ATCC Manassas, VA, USA) használtunk, melyet a HuLECs-hez hasonlóan tenyésztettünk.

6.3. *BMSCs és HuLECs oszteogenikus differenciálódásának indukálása*

A sejtek oszteoblaszt irányú differenciálódását megemelt kalcium (CaCl_2) és Pi (NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , pH 7.4) tartalmú oszteogenikus médiummal indukáltuk. A hozzáadott CaCl_2 mennyisége 0-1.2 mmol/L között változott, míg a hozzáadott Pi mennyisége 0-3,5 mmol/L volt. A sejteket kétnaponta kezeltük, az egyes kísérletek ábraalírásában szereplő ideig.

6.4. *BMSCs adipogén és kondrogén differenciálódásának indukálása*

A sejtek konfluenssé válása után a tenyésztő médiumot kondrogén differenciáltató médiumra (StemPro Chondrogenesis Supplement, Gibco, Grand Island, NY, USA), illetve adipogén differenciáltató médiumra (StemPro Adipogenesis Supplement, Gibco, Grand Island, NY, USA) cseréltük. A sejtek kezelését kétnaponta végeztük el, az ábraalírásokban szereplő ideig.

6.5. *Alizarin vörös festés*

Alizarin vörös festéssel tettük láthatóvá az extracelluláris mátrixban felhalmozódó kalcium depozitumokat. Az eljárás során a 96 lyukú tenyésztőedényben tenyésztett és kezelt sejteket 2 alkalommal 100µL PBS-sel mostuk, majd 4%-os paraformaldehid oldattal fixáltuk (10 perc, szobahőmérséklet). A fixálást követően a sejteket Alizarin vörös oldattal (2%, pH 4,3) festettük (20 perc, szobahőmérséklet).

6.6. Alcián kék festés

A kondrogén differenciálódás nyomonkövetésére Alcián kék festést végeztünk, melyet a NovaUltra Special Stain Kit (IHC World, Ellicott City, MD, USA) segítségével kivitelezünk a gyártó utasításai szerint.

6.7. Oil Red lipid festés

Az adipogén differenciálódás nyomonkövetésére Oil red O festést végeztünk. Ennek során a sejteket 2 alkalommal mostuk 100 μ L PBS-sel, majd fixáltuk 4%-os paraformaldehid oldattal 30 percig. A fixálás után újból mostuk a sejteket, majd 60%-os izopropanollal inkubáltuk 5 percig. Ezt követően az átszűrt munkaoldattal megfestettük a sejteket 10 percig enyhén rázogatva a lemezt szobahőmérsékleten. A festéket eltávolítottuk, mostuk desztillált vízzel, majd fénymikroszkópban megtekintettük az eredményt és lefényképeztük.

6.8. Kalcium mennyiségi meghatározása

Az extracelluláris mátrix kalcium tartalmát QuantiChrome Calcium Assay Kit (BioAssay System, Hayward, USA) segítségével határoztuk meg. A kezeléseket 96 lyukú tenyésztőedényben végeztük. A kísérlet végeztével eltávolítottuk a médiumot, a lemezt mostuk 2 alkalommal 100 μ L PBS-sel, majd az extracelluláris mátrix Ca tartalmát 100 μ L sósavval (0,6 mol/L) oldottuk ki (30 perc, szobahőmérséklet). A mérést a gyártó utasításai alapján végeztük. A minták abszorbanciáját 612 nm-en Powerwave XS lemezolvasóval (Bio-Tek) mértük meg. A minták Ca tartalmát fehérje tartalomra normalizáltuk.

6.9. Sejtek életképességének meghatározása

Az életképesség vizsgálatát 96 lyukú lemezen végeztük. A kísérlet végeztével a sejteket 2 alkalommal 100 μ L PBS-sel mostuk és hozzáadtunk 150 μ L MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólium-bromid) reagenst, majd a lemezt 4 órára visszahelyeztük a sejtenyésztő inkubátorba. Ezt követően az MTT oldatot eltávolítottuk, és a keletkezett formazán kristályokat 100 μ L dimetil-szulfoxidban (DMSO) feloldottuk, majd lemezolvasó segítségével lemértük a minták abszorbanciáját 570 nm-en. A kezelt sejtek életképességét a nem kezelt sejtek életképességéhez (100%) viszonyítva százalékban fejeztük ki.

6.10. Az extracelluláris mátrix oszteokalcin tartalmának meghatározása

Az OCN meghatározáshoz a sejteket 6 lyukú tenyésztőedényben tenyésztettük. A kezeléseket végeztével a sejteket 2 alkalommal 500 μ L PBS-sel mostuk, majd 100 μ L 0,5 mol/L EDTA oldattal (pH: 6,9) 30 percen keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követően a felülúszót összegyűjtöttük és a minták OCN tartalmát ELISA módszerrel (Human Osteocalcin

Instant ELISA Bender MedSystems 2020) határoztuk meg a gyártó utasításait követve. A minták OCN tartalmát fehérje tartalomra normalizáltuk. A fehérjetartalom meghatározásához az EDTA eltávolítása után a sejteket szolubilizáltuk a következő összetételű lízis puffreben: 5 mmol/L EDTA, 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris, 0,5% Igepal CA-630, 1% Triton-X 100, 1% Complete Mini proteáz inhibitor (Roche, Basel, Svájc). A lizátumok fehérjetartalmát BCA módszerrel határoztuk meg.

6.11. Alkalikus foszfatáz enzimaktivitás meghatározása

Az ALP aktivitás meghatározásához a sejteket 96 lyukú lemezen tenyésztettük. A kezelést követően a sejteket 2 alkalommal 100 µL PBS-sel mostuk, majd 100 µL szolubilizáló oldatban (összetétel!) lizáltuk őket. Az aktivitás méréséhez 35 µL sejt-lizátumhoz 130 µL szubsztrátot (ALP Yellow Liquid Szubsztrát) adtunk, majd 405 nm-en 30 percig 37 °C-on inkubálva követtük nyomon a 4-nitrofenol képződését. A minták fehérjetartalmát is meghatároztuk, és a minták ALP aktivitását fehérje tartalomra normalizálva adtuk meg.

6.12. Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (qRT-PCR)

RNS izoláláshoz a sejteket 6 lyukú tenyésztőedényben kezeltük. A sejteket a kezelések végeztével Trizol (RNA-STAT60, Tel-Test B Labs, Alvin, TX, USA) reagenssel tártuk fel. Az RNS minták tisztítását a gyártó utasításait követve végeztük. Az RNS minták koncentrációját és tisztaságát 260 illetve 280 nm-en meghatározott optikai denzitásuk aránya alapján számítottuk ki, melyhez a méréseket NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) készüléken végeztük. Ezt követően mintánként 2 µg RNS-t írtunk át cDNS-sé, melyhez High Capacity cDNA RT kitet (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) használtunk. A PCR reakciót valós idejű qPCR készülékben (CFX96 Real-Time System, Bio-Rad Inc., Hercules, CA, USA) végeztünk el. A target gének amplifikációja során iTaq™ Universal Probes Supermix master mixet (Bio-Rad, Inc) és validált FAM fluorofórral konjugált TaqMan próbát, és hozzá tervezett primereket alkalmaztunk. Az általunk alkalmazott TaqMan amplifikációs rendszerek (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) száma: Sox9: Hs01001343; Runx2: Hs535845; OCN: Hs01587814; az α-sima izom aktin: Hs00426835; Slug: Hs001619; E-cadherin: Hs1023894; Pax6: Hs00240871. Háztartási génként a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) és hipoxantinguanin foszforibozil transzferáz (HPRT) mRNS szintjét határoztuk meg TaqMan módszerrel a próba VIC fluorofórral való jelölése mellett. A relatív génexpressziós változásokat delta-delta Ct módszerrel számítottuk ki.

6.13. Western Blot analízis

A sejteket 6 lyukú tenyésztőedényben tenyésztettük és kezeltük, majd a kísérlet végétével 2 alkalommal 100 µL PBS pufferrel mostuk, és 100 µL szolubilizáló oldatban (150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Tris, 1% Triton-X 100, 0,5% Igepal CA-630 és 1% Complete Mini proteáz inhibitor (Roche, Basel, Svájc) lizáltuk. A sejtízátumot centrifugáltuk, a felülúszót megtartottuk, és meghatároztuk a fehérje koncentrációját BCA módszerrel (Pierce, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). A mintákat denaturáltunk (95°C, 15 perc) β-merkaptóetanolt tartalmazó SDS mintafelvívő pufferben, majd a fehérjéket 10%-os SDS poliakrilamid gélen elválasztottuk. Az elektroforézist Bio-Rad Mini Protean készülékkel végeztük 100 V feszültséggel. Ezt követően a mintákat nitrocellulóz membránra (GE Healthcare, Amersham, Germany) blottoltuk 12 V feszültséggel 45 percen keresztül fűlszárz blottolóval (Bio-Rad Inc., Hercules, CA, USA). Ezt követően a membránt tejpor oldattal (6%-os) blokkoltuk 1 órán keresztül szobahőmérsékleten, majd a membránhoz adtuk az elsődleges antitestet (1. táblázat) 1%-os tejpor oldatban (4°C, 12 óra).

1. Táblázat: A Western Blot-ok során felhasznált elsődleges antitestek listája			
Target fehérje	Cég	Katalógus szám	Munkaoldat hígítása
Sox9	Abcam, Cambridge, UK	ab26414	1:1000
Runx2	Proteintech, Chicago, IL, USA	20700-1-AP	1:1000
ALP	Santa Cruz Biotech. Inc., Dallas, TX, USA	sc-30203	1:200
FtH	Santa Cruz Biotech. Inc., Dallas, TX, USA	sc-25617	1:600
FtL	Santa Cruz Biotech. Inc., Dallas, TX, USA	sc-25616	1:400
AGG	ProteinTech, Chicago, IL, USA	13880-1-AP	1:500
FABP4	ProteinTech, Chicago, IL, USA	15872-1-AP	1:500
GAPDH	Novus Biologicals, Littleton, CO, USA	NB300-221	1:1000

A membránt TBS-T pufferrel (0,1% Tween 20 tartalmú tris-buffered-saline) mostuk, majd 1 órán keresztül inkubáltuk a torma peroxidázzal konjugált anti-nyúl (NA934) és anti egér (NA-931) másodlagos antitesttel (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA). A membránt mostuk TBS-T-vel, majd Western ECL reagens (Bio-Rad Inc., Hercules, CA, USA)) segítségével előhívtuk. Az eredményt röntgenfilmen jelenítettük meg.

6.14. Egér kísérletek

A vizsgálatot a Debreceni Egyetem Intézményi Kutatásetikai Bizottsága engedélyével végeztük. 10 darab C57BL/6 egeret (8-10 hetes, hím) véletlenszerűen két csoportra osztva használtunk fel. A vas túltelítettséget vas-dextrán (200 mg/ testtömeg kg, 200 µl végtérfogatban PBS-ben hígítva) intraperitoneális (*i.p.*) adásával váltottuk ki. A kezelést háromszor ismételtük meg, egy-egy nap szünetet tartva. A kontroll egerek PBS-t (200 µl, *i.p.*) kaptak. Az egerek életét szén-dioxiddal való lélegeztetéssel oltottuk ki, majd eltávolítottuk az egerek síp-és combcsontját.

6.15. Oszteoprogenitor sejtek izolálása kompakt csontból

Az oszteoprogenitor sejteket a Zhu és munkatársai által közölt protokoll szerint izoláltuk (155). A síp-és combcsontokról a leválasztást követően eltávolítottuk az epifízist. A csontdarabokat mozsárban összetörtük jéghideg 2% FBS-t, 1 mmol/L EDTA-t tartalmazó PBS-ben. A csontvelőtől való megszabadulás érdekében ezt a mosási lépést ötször megismételtük. Ezt követően a csontszövetet 0,25%-os I. típusú kollagenázzal emésztettük 5 percre, szobahőmérsékleten, majd a csontokat 1-2 mm-es darabkákra szeleteltük, és további 45 percre keresztül 37 °C-on emésztettük őket. Az így kinyert szuszpenziót 70 µm-es pórusméretű szűrőn átszűrtük és lecentrifugáltuk (300g, 10 perc, szobahőmérséklet). Ezt követően a sejtszuszenziót Trizol reagenssel tártuk fel RNS kinyerése céljából.

6.16. Humán lencse minták

A humán lencse minták katarakta eltávolító műtéten átesett betegekből származtak (N=10, 6/4 nő/férfi, átlagéletkor: $71,5 \pm 9,1$). A minták gyűjtése a Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar Szemészeti Klinikáján a Regionális Etikai Bizottság engedélyével, a Helsinki Deklarációban foglalt irányelveknek megfelelően a betegek írásos beleegyezésével történt. Az összes katarakta minta szenilis típusú volt. A kontroll lencse minták humán kadáver szemből (N=10, 7/3 nő/férfi, átlagéletkor: $64,4 \pm 11,5$) származtak. A lencsét folyékony nitrogénben fagyasztottuk le, majd feldolgozásig -70 °C-on tároltuk. A lencse mintákból Ca tartalmat és OCN szinteket határoztunk meg. A Ca méréshez a minta egy-negyed részét 300 µL sósavban (0,6mol/L) egy órán keresztül szobahőmérsékleten rázogatva inkubáltuk. Ezt követően a mintákat centrifugáltuk (2000 g, 5 perc, szobahőmérséklet) és a minták Ca tartalmát az előzőekben ismertetett módon a felülúszókból határoztuk meg. OCN méréséhez a maradék mintát 300 µL EDTA-ban (0,5 mol/L, pH 6.9) tártuk fel. A minta feltárását fagyasztás-olvasztás kétszeri ismétlésével és ultrahangos kezeléssel (folyamatos mód, 30 másodperc) segítettük elő. Végezetül a mintákat centrifugáltuk (2000 g, 5 perc, 4 °C)

és OCN tartalmukat a felülúszókból az előzőekben ismertetett ELISA módszerrel határoztuk meg.

6.17. Statisztika

Az eredményeket átlagérték $\pm$ standard deviáció formában adtuk meg. Az eredmények statisztikai analízisét t-próbával vagy többszörös összehasonlítás esetén ANOVA módszerrel végeztük el. A statisztikai analízist GraphPadPrism 5.02 Windows szoftverrel (GraphPad Software, San Diego California USA) végeztük. A $p < 0,05$ eredményeket tekintettük szignifikáns módon eltérőnek.

7. Eredmények

7.1. *A vastöbblet hatása BMSCs oszteogén, kondrogén és adipogén irányú differenciálódására*

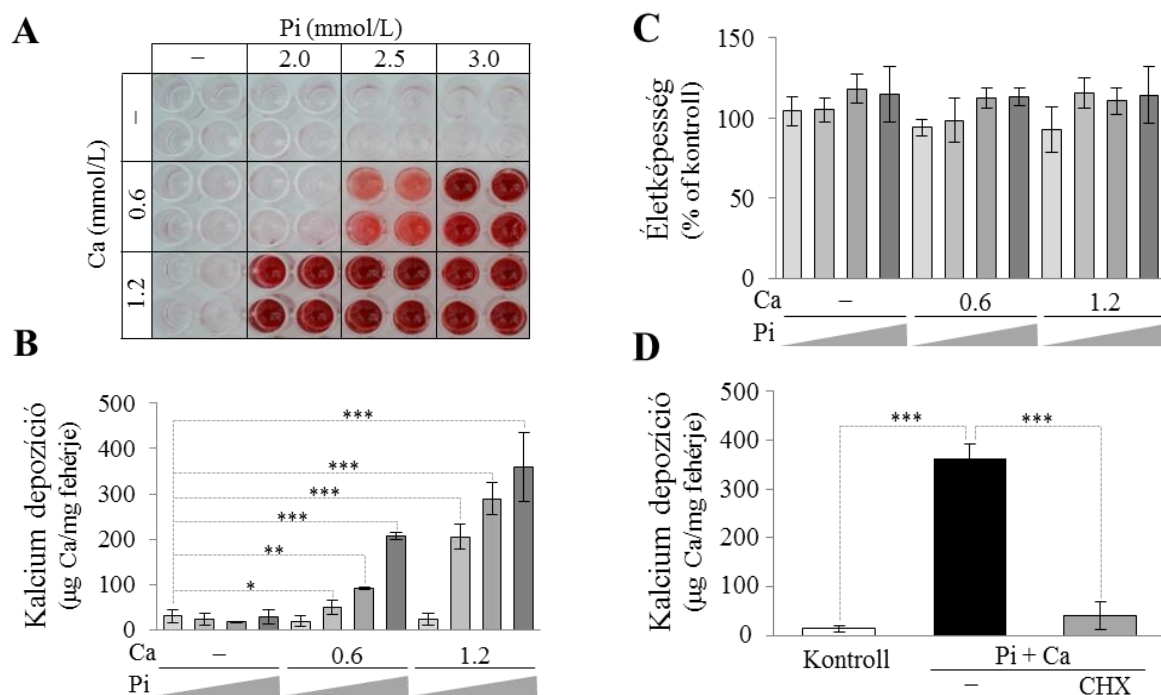
7.1.1. *A Pi és a Ca szinergista módon fokozza a BMSCs oszteogén differenciálódását*

A krónikus vastöbblet a csontok gyengülésével jár együtt, amely jelentkezhet oszteopénia, oszteoporózis, csökkent csontsűrűség, illetve csonttörések formájában is. Kutatócsoportunk korábbi munkájában kimutatta, hogy a vastöbblet gátolja a vaszkuláris simaizomsejtek szervetlen foszfáttal és Ca-mal előidézett oszteogén differenciálódását. A simaizomsejtek oszteogén irányú differenciálódását ugyanazok a mester transzkripciós faktorok regulálják, melyek az őssejtek oszteoblaszt irányú differenciálódását irányítják, és a két folyamat ezen túlmenően is rengeteg hasonlóságot mutat. Az azonban nem ismert, hogy a vastöbblet vajon a simaizomsejtekhez hasonlóan az őssejtek oszteogén irányú differenciálódását is gátolja-e. Kísérleteinket csontvelő eredetű mesenchymális őssejteken végeztük.

Első célunk az optimális Pi és Ca dózisok beállítása volt, mely előidézi a BMSCs oszteogén differenciálódását a sejtek életképességének számottevő befolyásolása nélkül. Ennek érdekében a BMSCs-et 0-3 mmol/L Pi-tal, illetve és 0-1,2 mmol/L Ca-mal kiegészített tápfolyadékkal kezeltük 5 napon keresztül. Az oszteogén differenciálódás következtében emelkedik az extracelluláris mátrix Ca tartalma, ennek kimutatása céljából a kezelést követően Alizarin vörös festést végeztünk. Azt tapasztaltuk, hogy önmagában a Pi és a Ca az extracelluláris mátrix mineralizációját nem befolyásolja. Ezzel szemben a Pi és a Ca együttes alkalmazása szinergista módon előidézte a mátrix mineralizációját (4.A ábra). Az Alizarin vörös festés mellett az extracellulár mátrix Ca tartalmát kvantitatív módon is meghatároztuk. Az Alizarin vörös festéshez hasonlóan, a Ca mérés is alátámasztotta azt, hogy a Pi és a Ca szinergista módon indukálják a BMSCs extracelluláris mátrix mineralizációját (4.B ábra).

A sejtek életképességét megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az általunk alkalmazott Pi és Ca dózisok nem befolyásolják a BMSCs életképességét 5 napos kezelést követően (4.C ábra). A dózisgörbék alapján kiválasztottuk azt a Pi és Ca dózist, melyet a munka további részében alkalmaztunk a BMSCs oszteogén differenciálódásának kiváltására. Így a továbbiakban az oszteogén differenciálódást 3 mmol/L Pi-tal és 1,2 mmol/L Ca-mal kiegészített tápfolyadékkal (oszteogenikus médium) idéztük elő.

Annak bizonyítására, hogy az oszteogénikus médium jelenlétében kialakuló extracelluláris mátrix mineralizáció a sejtek aktív részvételével zajló folyamat, a kezeléseket a fehérjeszintézist gátló cikloheximid (CHX) jelenlétében is elvégeztük, és 5 nap elteltével megmértük az extracelluláris mátrix Ca tartalmát. A CHX jelenlétében nem tapasztaltunk mineralizációt, ami azt bizonyítja, hogy a BMSCs mineralizációjához de novo fehérjeszintézis szükséges (4.D ábra).

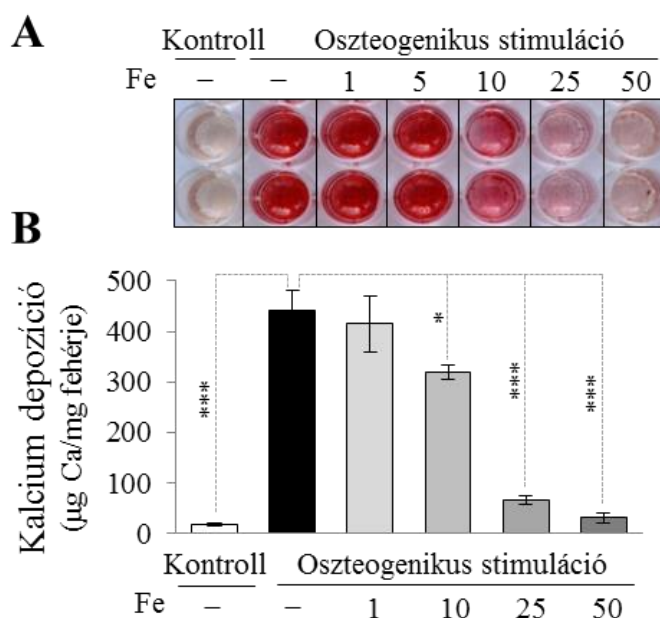


4. ábra A Pi és a Ca dóziszfüggő módon fokozza a BMSCs mineralizációját.

A BMSCs-t 96 lyukú lemezen tenyésztettünk. A tenyészet konfluenssé válása után a tenyésztő médiumot különböző Pi és Ca tartalmú tápfolyadékra cseréltük. (A) Reprezentatív Alizarin vörös festés 5 nap kezelés után (N=3). (B) 5 nap kezelés után a sejteket HCl-val dekalcináltuk, és megmértük a minták Ca tartalmát. (C) A sejtek életképességét 5 napos kezelést követően MTT módszerrel határoztuk meg. (D) Konfluens BMSCs sejteket kontroll vagy oszteogénikus tápfolyadékban tartottunk cikloheximid (CHX, 10 µg/mL) hiányában illetve jelenlétében. 5 nap elteltével a sejteket HCl-val dekalcináltuk és megmértük a minták Ca tartalmát. (B-D) A grafikonokon 3 kísérlet triplikátumban kivitelezett átlaga ± standard deviáció (SD) van feltüntetve. *p < 0.05, p < 0.01, ***p < 0.005.

7.1.2. A vastöbblet gátolja a BMSCs oszteogenikus differenciálódását és az extracelluláris mátrix mineralizációját

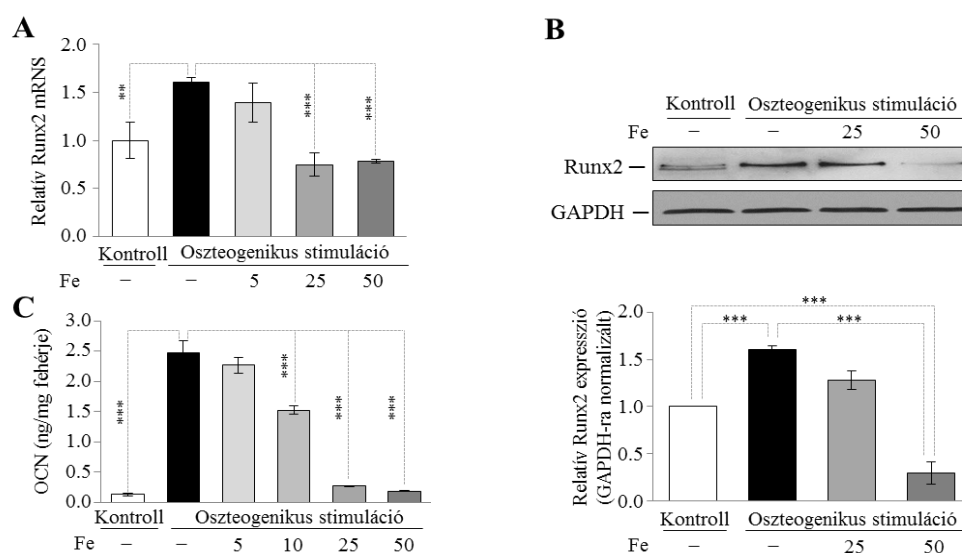
A következő kísérletekben azt vizsgáltuk, hogy a BMSCs oszteogenikus tápfolyadékkal kiváltott extracelluláris mátrix mineralizációja vastöbblettel gátolható-e. Ennek érdekében a BMSCs-t vas jelenlétében illetve hiányában oszteogenikus tápfolyadékkal kezeltünk, és Alizarin vörös festéssel vizsgáltuk az extracelluláris mátrix mineralizációját. A vasat vas-ammónium citrát formájában 1-50 $\mu\text{mol/L}$ koncentrációtartományban alkalmaztuk. A vastöbblet dózisfüggő módon gátolta az extracelluláris mátrix mineralizációját, és 50 $\mu\text{mol/L}$ koncentrációban a mineralizáció teljes elmaradását eredményezte (5.A ábra). A mineralizáció kvantitatív méréséhez a sejteket dekalcináltuk és meghatároztuk a minták Ca tartalmát. A vas 10 $\mu\text{mol/L}$ koncentráció felett dózisfüggő módon csökkentette a BMSCs extracelluláris mátrixába oszteogenikus stimuláció hatására beépült Ca mennyiségét (5.B ábra).



5. ábra A vastöbblet dózisfüggő módon gátolja BMSCs oszteogenikus stimulus által indukált extracelluláris mátrix mineralizációját. (A-B) BMSCs sejteket kontroll illetve oszteogenikus tápfolyadéokban tenyésztettünk vas jelenlétében (0-50 $\mu\text{mol/L}$). (A) Reprezentatív Alizarin vörös festés 5 nap kezelés után (N=3). (B) 5 nap kezelés után a sejteket HCl-val dekalcináltuk, és megmértük a minták Ca tartalmát. A grafikonon 3 kísérlet triplikátumban kivitelezett átlaga $\pm$ SD van feltüntetve. * $p < 0.05$, * $p < 0.005$.**

Az oszteogenikus stimulus hatására bekövetkező extracelluláris mátrix mineralizáció hátterében a sejtek oszteogén differenciálódása áll. Következő kísérletünkben azt vizsgáltuk,

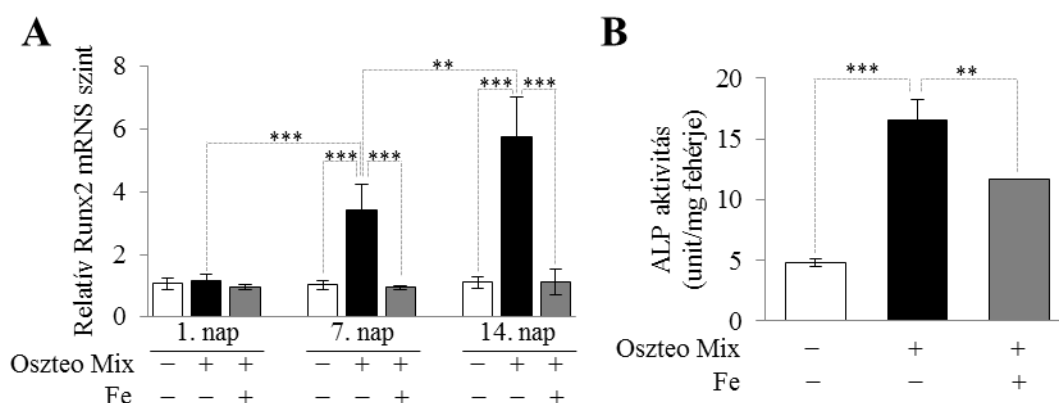
hogy a mineralizáció vas általi gátlása összefüggésben áll-e a BMSCs oszteogenikus differenciációjának gátlásával. Elsőként megvizsgáltuk a vas hatását az oszteogenezis mester transzkripciós faktorának, a Runx2-nek a szintjére. Oszteogén stimulus hatására a Runx2 mRNS szintje 1,6-szorosára emelkedett, mely emelkedést a vas 25 $\mu\text{mol/L}$ koncentrációban gátolt (6.A ábra). A mRNS szinttel párhuzamosan az oszteogén stimulus hatására megemelkedett a BMSCs Runx2 fehérje expressziója (6.B ábra). Érdekes módon a vas 50 $\mu\text{mol/L}$ koncentrációban a Runx2 fehérje expresszióját a kontroll sejtek expressziója alá csökkentette (6.B ábra). Ezt követően vizsgáltuk a vastöbblet hatását a Runx2 regulációja alatt álló fehérje, az OCN expressziójára. Oszteogenikus stimulus hatására jelentősen megemelkedett az OCN szintje a BMSCs extracelluláris mátrixában, melyet a vas dóziszfüggő módon gátolt, 25 $\mu\text{mol/L}$ és a feletti koncentrációban teljes inhibíciót okozva (6.C ábra).



6. ábra A vastöbblet gátolja a BMSCs Pi és Ca többlettel indukált oszteogenikus differenciálódását. (A-C) BMSCs-et kontroll illetve oszteogenikus tápfolyadékban tenyésztettünk vas jelenlétében (0-50 $\mu\text{mol/L}$) 5 napon keresztül. (A) A Runx2 mRNS szinteket qRT-PCR módszerrel határoztuk meg. (B) A minták Runx2 illetve GAPDH expresszióját bemutató reprezentatív Western Blotok (N=3). A Runx2 relatív expresszióját GAPDH-ra normalizáltuk. A diagrammon 3 kísérlet átlaga $\pm$ SD látható. (C) Az OCN szinteket EDTA-val szolubilizált extracelluláris mátrix mintákból ELISA módszerrel határoztuk meg. Az oszlopdigrammokon (A, C) 3 triplikátumban végzett kísérlet átlaga $\pm$ SD van feltüntetve. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$.

A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy vajon a vas anti-oszteogenikus hatása a BMSCs Pi és Ca által indukált oszteogenikus differenciálódására nézve szelektív, vagy inkább egy általános oszteogenezis inhibitor. Ennek a kérdésnek a megválaszolása céljából a BMSCs oszteogenikus differenciálódását dexametazont, aszkorbinsavat és β -glicerofoszfátot tartalmazó oszteogén keverékkel indukáltuk vas hiányában és jelenlétében. A Runx2 mRNS szintjét mértük a kezelés első, hetedik és tizennegyedik napján. Az oszteogén stimulus hatására a Runx2 mRNS szintjének időfüggő emelkedését tapasztaltuk, mely a 7. napon 3,4-szeres, a 14. napon 5,75-szörös volt. A vastöbbllet 50 $\mu\text{mol/L}$ koncentrációban alkalmazva mindkét időpontban teljes mértékben gátolta az oszteogén stimulus által indukált Runx2 mRNS szintek emelkedését (7.A ábra).

Ez után azt vizsgáltuk, hogy a dexametazont, aszkorbinsavat és β -glicerofoszfátot tartalmazó oszteogén keverék hogyan hat a BMSCs ALP aktivitására. Azt tapasztaltuk, hogy az oszteogén keverék több mint háromszorosára emelte a BMSCs ALP aktivitását ($4,76 \pm 0,36$ vs. $16,59 \pm 1,69$ unit/mg fehérje). Az oszteogén keverék ALP aktivitást fokozó hatását a vastöbbllet szignifikáns módon csökkentette (7.B ábra).

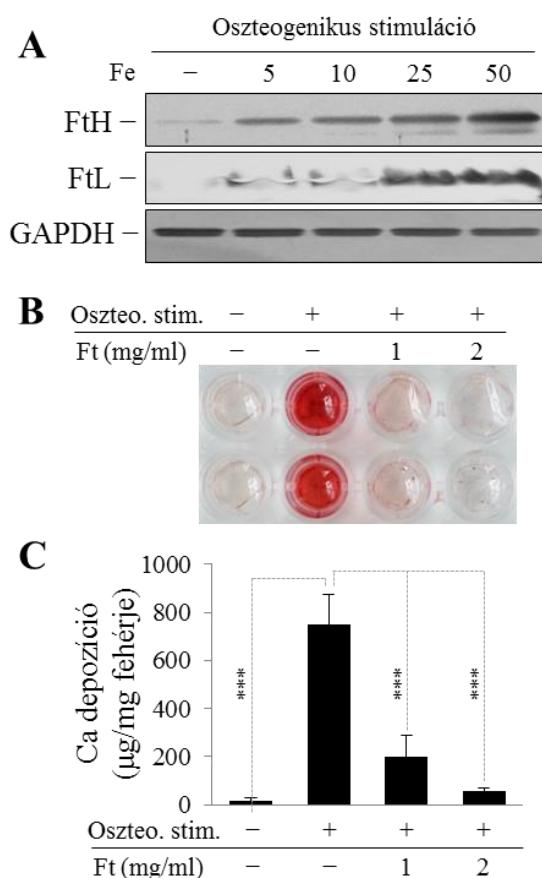


7. ábra A vastöbbllet gátolja a BMSCs dexametazon, aszkorbinsav, β -glicerofoszfát által indukált oszteogenikus differenciálódását. (A-B) BMSCs-et kontroll tápfolyadékban, vagy dexametazont ($0,1 \mu\text{mol/L}$), aszkorbinsavat ($50 \mu\text{mol/L}$) és β -glicerofoszfátot (2 mmol/L) tartalmazó oszteogenikus tápfolyadékban tenyésztettünk vastöbbllet hiányában illetve jelenlétében ($50 \mu\text{mol/L}$). (A) A Runx2 mRNS szinteket az 1. 7. és 14. napon qRT-PCR módszerrel határoztuk meg. (B) Az ALP aktivitást a 7. napon határoztuk meg. Az oszlopdiagrammokon 3 triplikátumban végzett kísérlet átlaga $\pm$ SD van feltüntetve. $p < 0.01$, $***p < 0.005$.**

7.1.3. A ferritin a vashoz hasonlóan gátolja a BMSCs oszteogénikus differenciálódását és az extracelluláris mátrix mineralizációját

Kutatócsoportunk korábbi munkájában kimutatta, hogy a vas a ferritin indukcióján keresztül gátolja a simaizomsejtek oszteogén transzdifferentiálódását és az oszteoblasztok működését [26, 31]. Így a következő kísérletünkben azt vizsgáltuk meg, hogy a ferritin a BMSCs sejtek oszteogén differenciálódásában is szerepet játszik-e.

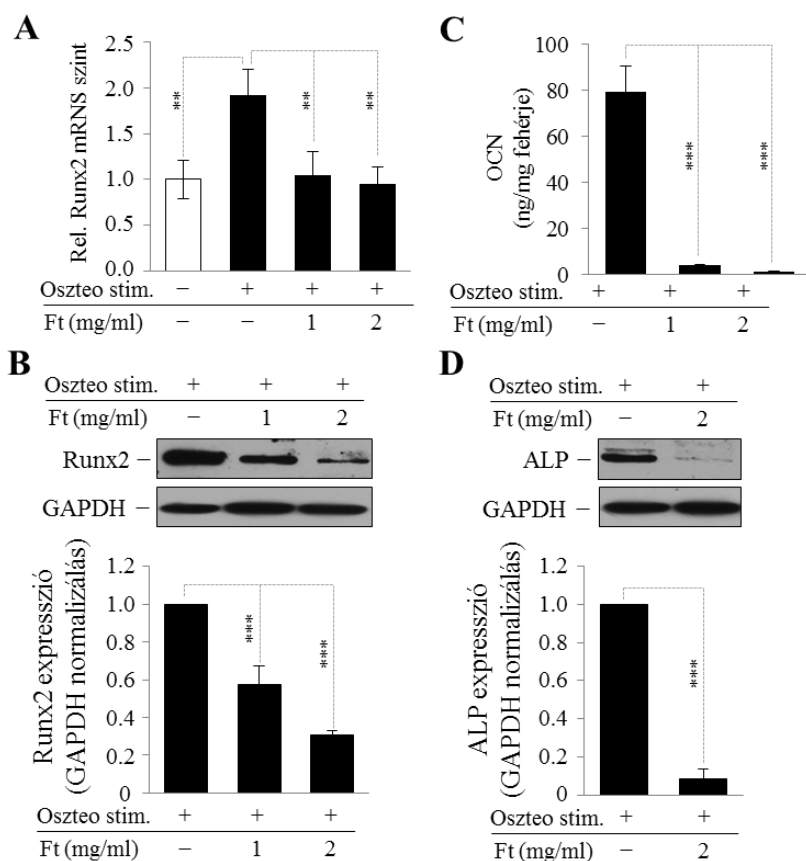
Elsőként a ferritin 2 alegységének expresszióját vizsgáltuk meg normál és megemelt vasszintek mellett BMSCs-ben. Azt találtuk, hogy a vas dózisfüggő módon indukálja mind a két ferritin alegységet, (FtH, és FtL) (8.A ábra). Ezt követően azt tanulmányoztuk, hogy az exogén módon adott humán ferritin befolyásolja-e a BMSCs oszteogén differenciálódását. A sejteket oszteogénikus tápfolyadékban 1, illetve 2 mg/ml-es ferritin koncentrációk jelenlétében tartottuk 5 napon keresztül. A ferritin alacsonyabb dózisa mellett gyenge, míg a magas dózis mellett egyáltalán nem tapasztaltunk Alizarin vörös pozitivitást (8.B ábra). Ezt az eredményt megerősítette az extracelluláris mátrix Ca tartalmának mérése is (8.C ábra).



8. ábra A ferritin vas hatására indukálódik, és gátolja a BMSCs extacelluláris mátrix mineralizációját. (A) A BMSCs-et oszteogénikus tápfolyadékban tenyésztettünk vas jelenlétében (0-50 µmol/L) 5 napon keresztül. A minták FtH, FtL és GAPDH expresszióját bemutató reprezentatív Western Blotok (N=3). (B-C) A BMSCs-et kontroll illetve oszteogénikus körülmények között tartottunk Ft (1 illetve 2 mg/mL) hiányában és jelenlétében 5 napon keresztül. (B) Reprezenattív Alizarin vörös festés (N=3). (C) A sejteket HCl-val dekalcináltuk, és megmértük a minták Ca tartalmát. A grafikonon 3 kísérlet triplikátumban kivitelezett átlaga ± SD van feltüntetve. ***p < 0.005.

Az oszteogénikus stimulus hatására bekövetkező mineralizáció hátterében a sejtek oszteogén differenciálódása áll, így a következő kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy a mineralizáció Ft

általi gátlása összefüggésben áll-e a BMSCs oszteogénikus differenciációjának gátlásával. Elsőként megvizsgáltuk a Ft hatását a Runx2 mRNS és fehérje szintjére (9. ábra). Oszteogén stimulus hatására a Runx2 mRNS szintje közel kétszeresére emelkedett, ezzel szemben a Ft jelenlétében a Runx2 mRNS szintje a kontroll sejtek szintjén maradt. (9.A ábra).

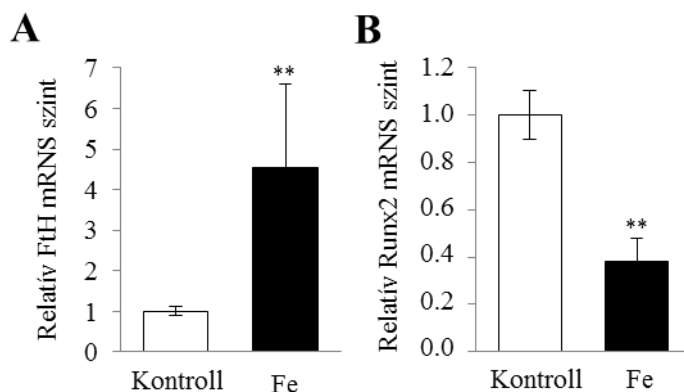


9. ábra A Ft gátolja a BMSCs oszteogén differenciációját. (A-D) A BMSCs-et kontroll vagy oszteogénikus tápfolyadékban kezeltük Ft (1 illetve 2 mg/mL) hiányában és jelenlétében 5 napon keresztül. (A) A Runx2 mRNS szinteket qRT-PCR módszerrel határoztuk meg. A grafikonon 3 kísérlet triplikátumban kivitelezett átlaga $\pm$ SD van feltüntetve. (B) A Runx2 és a GAPDH expresszióját bemutató reprezentatív Western Blotok (N=3). A Runx2 relatív expresszióját GAPDH-ra normalizáltuk. A diagrammon 3 kísérlet átlaga $\pm$ SD látható. (C) Az OCN szinteket EDTA-val szolubilizált extracelluláris mátrix mintákból ELISA módszerrel határoztuk meg. (D) Az ALP és a GAPDH expresszióját bemutató reprezentatív Western Blotok (N=3). Az ALP relatív expresszióját GAPDH-ra normalizáltuk. A diagrammon 3 kísérlet átlaga $\pm$ SD látható. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$.

A mRNS szinttel párhuzamosan a Ft dózisfüggő módon csökkentette az oszteogén stimulus hatására megemelkedett Runx2 fehérje expresszióját (9.B ábra). Végül megvizsgáltuk a Ft hatását a Runx2 által szabályozott oszteoblaszt specifikus fehérjék expressziójára. Azt tapasztaltuk, hogy a Ft jelenlétében az OCN és ALP expressziójának oszteogén stimulussal indukált emelkedése elmarad (9.C, D ábra).

7.1.4. A vastöbbllet csökkenti az oszteoprogenitor sejtek Runx2 expresszióját in vivo

Következő kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy a vastútelítettség hatással van-e oszteoprogenitor sejtek oszteogén irányú differenciálódási képességére in vivo körülmények között. Ennek érdekében C57BL/6 egerekben vas-dextrán adásával vas tútelítettséget hoztunk létre, és összehasonlítottuk a belőlük izolált kompakt csont eredetű oszteoprogenitor sejtek FtH és Runx2 mRNS szintjeit kontroll egerekével. A vas-dextrán kezelés hatására több mint négyszeresére emelkedett a sejtek FtH mRNS szintje, amiből arra következtettünk, hogy a vas tútelítés létrehozása sikeres volt, és érintette a kompakt csontban található oszteoprogenitor sejtpopulációt is (10.A ábra). E mellett a vassal tútelített egerek oszteoprogenitor sejtjeiben jelentős mértékű Runx2 mRNS szint csökkenést észleltünk.

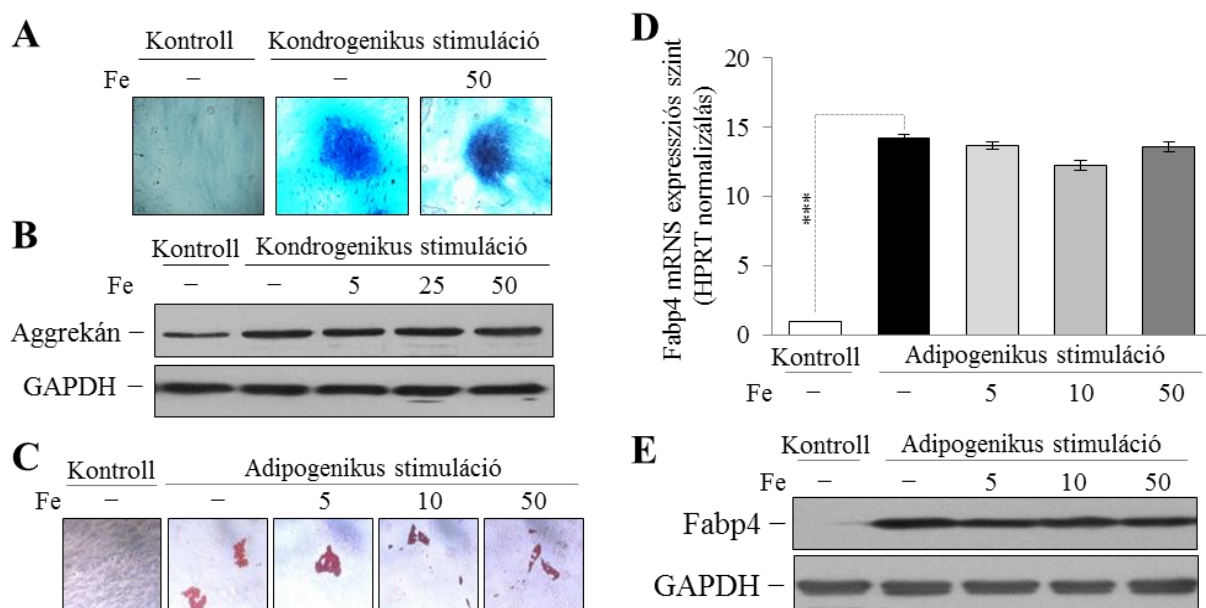


10. ábra A vastöbbllet emeli a FtH és csökkenti a Runx2 mRNS expresszióját kompakt csont oszteoprogenitor sejtekben C57BL/6 egerekben. (A-B) C57BL/6 egereket vas-dextránnal (200 mg/kg, 200 μ L PBS-ben hígítva, i.p., n=5) kezeltünk háromszor egy héten, minden második nap. Egyidejűleg a kontroll egereket (n=5) 200 μ L PBS-sel injektáltuk. Az egerek comb és sípcsontjaiból oszteoprogenitor sejteket izoláltunk. A FtH, Runx2 és GAPDH mRNS szinteket qRT-PCR módszerrel határoztuk meg. A FtH és Runx2 mRNS expresszióját GAPDH-ra normalizáltuk. Az ábrán az 5 egérből nyert triplikátumban meghatározott értékek átlaga $\pm$ SD van feltüntetve. **p < 0.01.

7.1.5. A vas túltelítettség nem befolyásolja a BMSCs kondrocita és adipocita irányú differenciálódását

A BMSCs multipotens sejtek, amelyek az oszteogén differenciálódáson kívül képesek kondrocita és adipocita sejtekké is differenciálódni. A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy a vas a kondrogén illetve az adipogén differenciálódási útvonalakat befolyásolja-e. Elsőként a kondrocita irányú differenciálódást tanulmányoztuk. Ehhez a BMSCs-et kondrogenikus médiumban tenyésztettünk, vas túladagolás mellett 14 napon keresztül. A kondrogén differenciálódást Alcián kék festéssel követtük nyomon, és azt tapasztaltuk, hogy a BMSCs kondrogén irányú differenciálódását a vas fölöslege 50 $\mu\text{mol/L}$ koncentrációban sem befolyásolta (11.A ábra). Az aggregátum a porszövet extracelluláris mátrixának egyik legfontosabb strukturális összetevője, ezért a következő kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy a vastöbblet befolyásolja-e az aggregátum expresszióját. A kondrogén stimuláció hatására az aggregátum expressziója a vastöbblettől függetlenül emelkedett, így megerősítést nyert az Alcián festéssel nyert eredményünk, mi szerint a vastöbblet a BMSCs kondrogén irányú differenciálódását nem befolyásolja (11.B ábra).

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a vastöbblet befolyásolja-e a BMSCs adipocita irányú differenciálódását. Ennek érdekében a BMSCs-et adipogén médiumban tenyésztettük vastöbblet, vagy normál vas szint mellett. Az adipogén differenciálódást 33 napon keresztül végeztük, majd Oil Red O festést alkalmaztunk az adipociták detektálására. Az Oil Red O festés arra utalt, hogy a vastöbblet nem befolyásolja a BMSCs adipogén differenciálódását (11.C ábra). Ezt követően a zsírsavkötő fehérje 4 (fatty acid binding protein 4, Fabp4), mely egy adipocita specifikus fehérje, mRNS és fehérje expresszióját is megvizsgáltuk normál illetve megemelt vasszintek mellett. A Fabp4 mRNS expressziója az adipogén stimulus hatására csaknem 15-szörös emelkedést mutatott, melyet a vastöbblet nem befolyásolt (11.D ábra). A Fabp4 fehérje expressziója szintén drasztikus emelkedést mutatott adipogén differenciálódási körülmények között. A vastöbblet nem befolyásolta a Fabp4 adipogén stimulus általi indukcióját (11.E ábra).



11. ábra A vastöbbllet nem befolyásolja a BMSCs kondrogenikus és adipogenikus differenciálódását. (A-B) A BMSCs-et kondrogén differenciálódási médiumban kezeltük normál vagy megemelt vasszintek mellett (0-50μmol/L) 14 napon keresztül. (A) Reprezentatív Alcian kék festés (N=3) (B) Az aggrecán és a GAPDH expresszióját Western Blot módszerrel határoztuk meg teljes sejtlizátumból. (C-E) A BMSCs-et adipogén differenciálódási médiumban kezeltük normál vagy megemelt vasszintek mellett (0-50μmol/L) 33 napon keresztül. (C) Reprezentatív Oil Red O festés (N=3). (D) A Fabp4 relatív mRNS szintjét qRT-PCR módszerrel határoztuk meg, és HPRT-re normalizáltuk. Az ábrán 3 kísérlet triplikátumban meghatározott értékek átlaga ± SD van feltüntetve. ***p <0.005. (E) Reprezentatív Western Blotok a Fabp4 és a GAPDH fehérjék expressziójának bemutatására (N=3).

7.2. *Lencse epithél sejtek oszteogén differenciálódása*

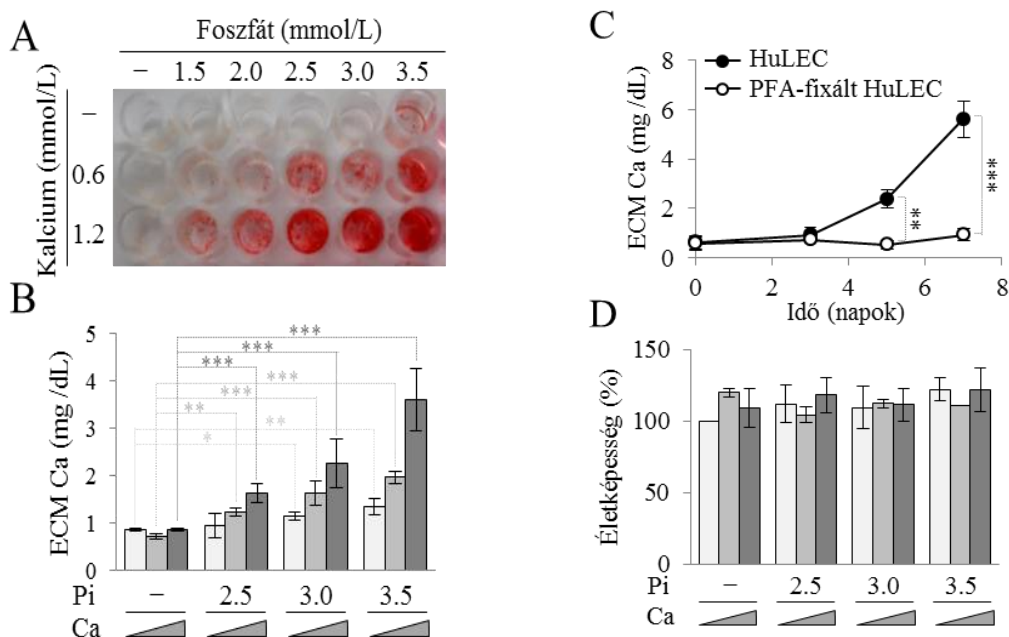
7.2.1. *Az oszteogenikus stimuláció indukálja a HuLECs oszteogén differenciálódását és az extracelluláris mátrix mineralizációját*

A kataraktás szemlencsében a kalcifikálódott érfalban található HA-hoz hasonló kémiai összetételű és szerkezetű Ca-foszfát kristályok jelenlétét írták le, melynek képződésére a katarakta kialakulásának egyetlen ismert mechanizmusa sem ad magyarázatot. Kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy oszteogén stimulus hatására bekövetkezhet-e a humán szemlencse epithél sejtek oszteogén differenciálódása és az extracelluláris mátrix mineralizációja. Kutatócsoportunk korábbi munkáiban megnövelt Pi és Ca szintekkel idézte elő VSMCs és BMSCs oszteogén differenciálódását, így a HuLECs esetén elsőként azt vizsgáltuk, hogy a magas Pi illetve Ca szintek okoznak-e mineralizációt lencse epithel sejtek extracelluláris mátrixában.

Ennek érdekében konfluens HuLECs-et Pi-tal (0-3.5 mmol/L) és Ca-mal (0-1.2 mmol/L) kiegészített oszteogenikus médiumban tartottuk 7 napon keresztül. A HuLECs sejtek extracelluláris mátrix mineralizációját Alizarin vörös festéssel vizualizáltuk (12.A ábra). A foszfát többlet 3,5 mmol/L koncentrációban indukálta a HuLECs extracelluláris mátrix mineralizációját. Ezzel szemben a megemelt Ca koncentráció önmagában nem idézett elő mineralizációt, viszont szinergista módon fokozta a megemelt Pi által indukált mineralizációt (12.A ábra). Az Alizarin vörös festéssel nyert eredményünk megerősítése céljából meghatároztuk az extracelluláris mátrix Ca tartalmát. Ehhez a sejteket 7 napos kezelés után dekalcináltuk, és meghatároztuk a minták Ca tartalmát. Az Alizarin vörös festéssel összhangban a megemelt Pi 3.5 mmol/L koncentrációban fokozta a HuLECs kalcifikációját, és a megemelt Ca szint dóziszfüggő módon fokozta a Pi hatását (12.B ábra).

Annak a kérdésnek a tisztázására, hogy a HuLECs magas Pi és Ca hatására bekövetkező extracelluláris mátrix mineralizációja aktív folyamat és nem a HA passzív precipitációja, a kísérletet paraformaldehiddel (PFA) fixált sejteken is megismételtük. Élő és PFA-val fixált HuLEC sejteket oszteogenikus médiumban (2,5 mmol/L hozzáadott Pi és 1,2 mmol/L hozzáadott Ca) kezeltük. Az extracelluláris mátrix Ca tartalmát a kísérlet kezdő napján, majd a harmadik, ötödik és hetedik napon is meghatároztuk. A nem fixált sejtek extracelluláris mátrix mineralizációja az 5. napon elkezdődött és tovább emelkedett a 7. napig. Ezzel ellentétben, a PFA-val fixált sejtek extracelluláris mátrixának Ca tartalma nem emelkedett a hét napos kezelés alatt (12.C ábra). Szakirodalmi adatok szerint a simaizomsejtek oszteogén differenciálódásában és extracelluláris mátrix mineralizációjában

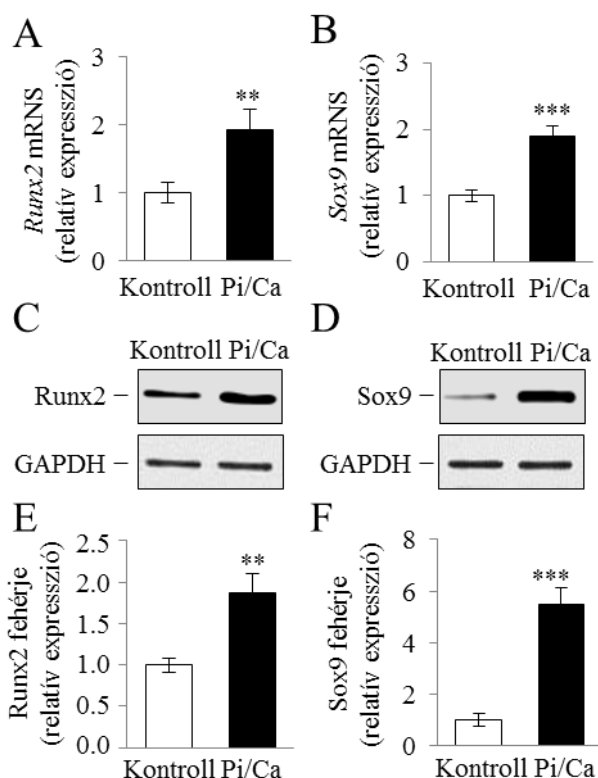
szerepet játszik a sejtek apoptózisa, ezért következő kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy az általunk alkalmazott oszteogén stimulus indukál-e apoptózist HuLECs-ben. Ennek érdekében a HuLECs-et oszteogénikus tápfolyadékban tartottuk 7 napon keresztül, majd MTT módszerrel meghatároztuk a sejtek életképességét. Megállapítottuk, hogy az oszteogén stimulus HuLECs esetében nem okozott viabilitáscsökkenést (12.D ábra).



12. ábra Magas Pi és Ca hatása HuLECs extracelluláris mátrix mineralizációjára és a sejtek életképességére. (A, B és D) HuLECs-et Pi-tal (0-3.5 mmol/L) és Ca-mal (0-1.2 mmol/L) kiegészített oszteogén médiumban kezeltünk 7 napon keresztül. (A) Reprezentatív Alizarin vörös festés (N=3). (B) A sejteket HCl-val dekalcináltuk, és meghatároztuk a minták Ca tartalmát. (C) Ca akkumuláció időfüggése élő vagy PFA-val fixált HuLECs extracelluláris mátrixában oszteogénikus stimulus (2.5 mmol/L Pi és 1,2 mmol/L Ca) mellett. (D) A sejtek MTT módszerrel meghatározott életképessége 7 napos kezelést követően. (B-D) A diagrammokon 3, quadriplikátumban végzett kísérlet átlaga $\pm$ SD van feltüntetve. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$.

Az extracelluláris mátrix mineralizációjának hátterében vaszkuláris simaizomsejtek esetén a sejtek oszteogén differenciálódása áll, így a következő kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy ez a HuLECs esetén is fennáll-e. A sejteket 24 órára oszteogénikus médiumba (2.5 mmol/L Pi és 1.2 mmol/L Ca) helyeztük, majd megmértük a Runx2 oszteogén, és Sox9 kondrogén mester transzkripciós faktorok mRNS szintjeit. Az oszteogénikus stimulus hatására mindkét

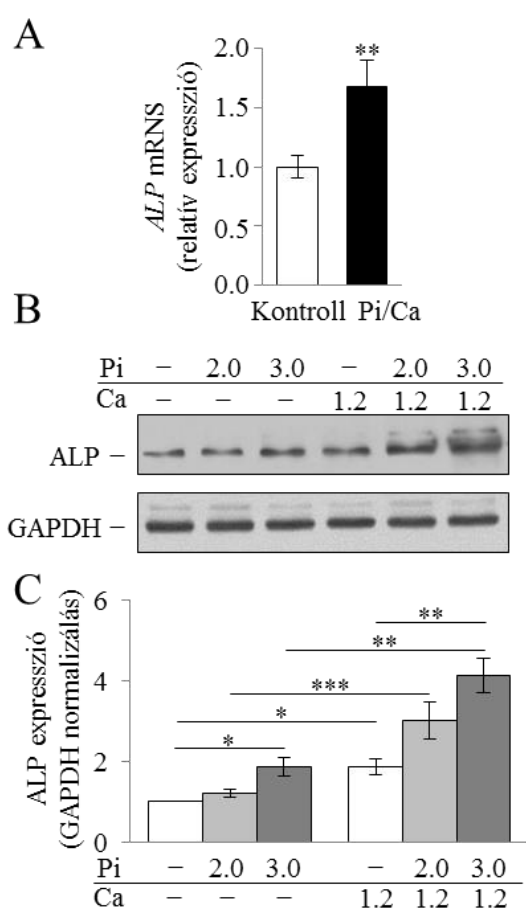
transzkripciós faktor szintje majdnem kétszeres emelkedést mutatott a kontroll sejtekhez viszonyítva (13.A-B ábra). Ezt követően fehérje szinten vizsgáltuk a Runx2 és Sox9 transzkripciós faktorok oszteogén stimulus hatására bekövetkező változását. A Western Blot technikával nyert eredmények 1,9-szeres Runx2 indukciót és 5,5-szörös Sox9 (11. D és F ábra) fehérje expresszió emelkedést mutattak az oszteogén médiával kezelt sejtekben a kontroll sejtekhez viszonyítva (13.C-F ábra).



13. ábra A Runx2 és Sox9 mRNS és fehérje expressziójának fokozódása oszteogén stimulus hatására HuLECs-ben. (A-F) HuLECs-et kontroll vagy oszteogénikus körülmények között (2.5 mmol/L Pi és 1.2 mmol/L Ca) tartottunk 24 órán keresztül. (A-B) A Runx2 és Sox9 relatív mRNS szintjét qRT-PCR módszerrel határoztuk meg, és HPRT-re normalizáltunk. A diagrammokon 3, triplikátumban végzett kísérlet átlaga $\pm$ SD van feltüntetve. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$. (C-D) Reprezentatív Western Blot a Runx2 és a Sox9 expressziójának kimutatására (N=3). A target fehérjék detektálása után a membránokat GAPDH ellenes antitesttel újra jelöltük. (E-F) A Runx2 és Sox9 fehérjék GAPDH-ra normalizált relatív expressziója. Az diagrammok 3 kísérlet átlagát $\pm$ SD mutatják. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$.

Az alkalikus foszfatáz (ALP) egy foszfohidrolitikus enzim, amely fontos szerepet tölt be a csontmineralizáció során, valamint a nem oszteogén szövetek patológiás mineralizációjában

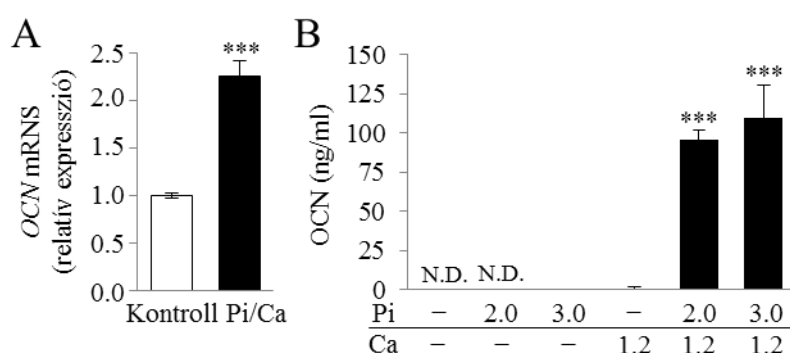
is. Ezért a továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy az oszteogén stimulus előidézi-e az ALP enzim mRNS és fehérje expressziójának, valamint az aktivitásának az emelkedését. Az ALP mRNS szintjét kontroll és kalcifikáló (Pi/Ca) körülmények között tartott HuLECs-ben határoztuk meg 7 nap kezelést követően. Oszteogén stimulus (2.5 mmol/L Pi és 1.2 mmol/L Ca) hatására a HuLECs-ben az ALP mRNS szint 1,7-szeres emelkedését tapasztaltuk (14.A ábra). Az ALP mRNS szint emelkedését követte az ALP fehérje expressziójának emelkedése is (14.B ábra). Az ALP expresszióját vizsgáltuk megemelt Pi (2, 3 mmol/L), megemelt Ca (1.2 mmol/L), és a két trigger együttes jelenléte mellett. Az ALP expresszió 1,7-szeres emelkedését tapasztaltuk magas Pi (3 mmol/L) és magas Ca (1,2 mmol/L) szintek mellett (14.B-C ábra). A Pi és a Ca együttes adása az ALP expresszióját 4,1-szeresére növelte (14.B-C ábra). Az alacsonyabb Pi koncentráció (2 mmol/L) önmagában nem fokozta az ALP expresszióját, azonban magas Ca jelenlétében az ALP expresszió 4,1-szeres emelkedését figyeltük meg (14.B-C ábra).



14. ábra Az oszteogénikus stimulus fokozza a HuLECs ALP mRNS és fehérje expresszióját. (A-C) HuLECs-et kontroll illetve magas Pi és Ca tartalmú tápfolyadékban kezeltünk 7 napon keresztül. (A) Az ALP mRNS szintjét qRT-PCR módszerrel határoztuk meg, és HPRT-re normalizáltuk. A diagramm 3, triplikátumban végzett kísérlet átlagát $\pm$ SD mutatják. (B) Reprezentatív Western Blot (N=3) az ALP expressziójának bemutatására. Az ALP detektálása után a membránt GAPDH ellenes antitesttel újra jelöltük. (C) Az ALP fehérje expresszióját GAPDH-ra normalizáltuk. A diagrammokon 3 kísérlet átlaga $\pm$ SD standard deviáció van feltüntetve. * $p < 0.005$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$.

Az OCN egy kalciumkötő fehérje, fontos alkotóeleme a csont extracelluláris mátrixnak, és jelenlétét lágyszövet kalcifikációkban is kimutatták. A következő kísérletünkben azt

vizsgáltuk, hogy a HuLECs oszteogén stimulus hatására bekövetkező extracelluláris mátrix mineralizációja során változik-e az OCN expressziója. Ehhez a sejteket kontroll és kalcifikáló (Pi/Ca) körülmények között tartottuk 7 napon keresztül, és megmértük az OCN mRNS expresszióját, és az extracelluláris mátrixba beépült OCN fehérje szintjét. Oszteogénikus stimulus hatására az OCN mRNS szintje több mint kétszeresére emelkedett (15.A ábra). A HuLECs extracelluláris mátrixában kontroll körülmények között nem tudtunk OCN-t kimutatni, ezzel szemben az oszteogén körülmények között, magas Pi és Ca jelenlétében tartott HuLECs extracelluláris mátrixában jelentős mértékű OCN felhalmozódást tapasztaltunk (15.B ábra).

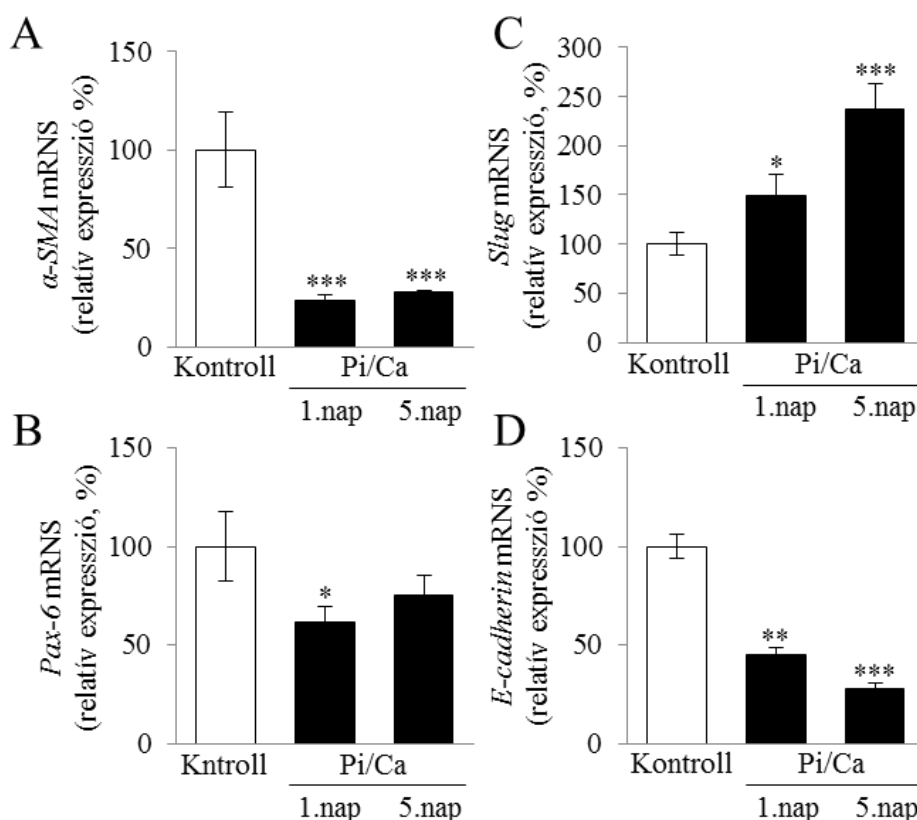


15. ábra Az oszteogénikus stimulus fokozza az OCN mRNS és fehérje expresszióját HuLECs-ben. (A-B) A HuLECs-et kontroll és oszteogénikus körülmények között tartottunk 7 napon keresztül. (A) Az OCN mRNS szintjét qRT-PCR módszerrel határoztuk meg, és HPRT-re normalizáltuk. A diagrammon 3, triplikátumban végzett kísérlet átlaga $\pm$ SD van ábrázolva. (B) A sejtek extracelluláris mátrixát EDTA-val szolubilizáltuk és a minták OCN tartalmát ELISA módszerrel határoztuk meg. A diagrammon 3, duplikátumban végzett kísérlet átlaga $\pm$ SD lett feltüntetve. *** $p < 0.005$.

7.2.2. Eltéérések és hasonlóságok a HuLECs oszteogénikus differenciálódása és az EMT között

A katarakta kialakulásában szerepet játszik a HuLECs mesenchymális sejt irányú differenciálódása. A gyakorta TGF- β -val indukált folyamat fő jellemzője, hogy hatására a lencse epitél sejtekben jelentősen lecsökken a fenotípusos fehérjemarkerek, pl. β -katenin, E-cadherin, Pax6, és a ZO-1 expressziója, de emelkedik a mesenchymális sejtekre jellemző extracelluláris mátrix fehérjék, pl. α -SMA, laminin, tenascin, proteoglikánok, fibronectin és az 1-es típusú kollagén expressziója. A következő kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy az oszteogén stimulus EMT-hoz hasonló változásokat indukál-e HuLECs-ben. E célból a sejteket

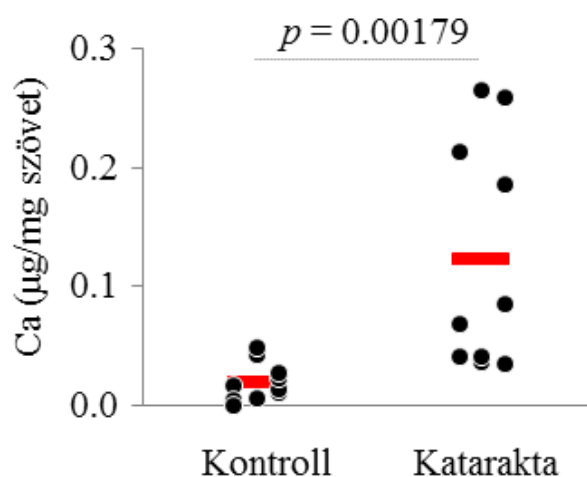
kontroll vagy oszteogenikus (Pi: 2.5 mmol/L, Ca: 1.2 mmol/L) körülmények között tartottuk, és meghatároztuk az α -SMA, Slug, Pax-6 és E-cadherin mRNA expresszióját 24 óra után és öt napos kezelést követően. Elsőként az α -SMA mRNA szintjét vizsgáltuk, és megállapítottuk, hogy az oszteogén stimulus hatására jelentősen csökkent az expressziója, tehát ebben a vonatkozásban az oszteogén differenciálódás és az EMT ellentétes hatású (16.A ábra). Ezzel szemben oszteogén stimulus hatására átmeneti csökkenést figyeltünk meg a Pax6 epithelsejt marker mRNA szintjében, mely az EMT során is megfigyelhető (16.B ábra). Végezetül az EMT-ben fontos szerepet játszó Snail szupercsaládba tartozó Slug transzkripciós faktor, és az általa regulált E-cadherin mRNA expresszióját vizsgáltuk. Azt találtuk, hogy az EMT-ben megfigyeltékhez hasonló módon az oszteogenikus stimulus hatására emelkedett a Slug mRNAs szintje, mely az E-cadherin mRNA szintjének csökkenésével társult (16.C-D ábra).



16. ábra Oszteogenikus stimulus hatása az EMT markereire. (A-D) A HuLECs-et kontroll és oszteogenikus körülmények között tartottunk 1 illetve 5 napon keresztül. Az α -SMA, Slug, Pax-6 és E-cadherin mRNA expresszióját qRT-PCR módszerrel határoztuk meg és HPRT-re normalizáltunk. A diagrammokon két, triplikátumban végzett kísérlet átlaga $\pm$ SD vannak feltüntetve. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$.

7.2.3. Az oszteogenikus differenciálódás markereinek kimutatása humán kataraktás szemlencsében

Végezetül azt vizsgáltuk, hogy a kataraktás szemlencsében kimutathatóak-e az oszteogén differenciációra utaló markerek. Kísérletünkben 10 kataraktás egyén katarakta műtét során eltávolított lencsáját és 10 kontroll lencsét használtunk fel. Elsőként a lencsék Ca tartalmát mértük meg. A kataraktás lencsék Ca tartalma több mint hatszorosa volt a kontroll minták Ca tartalmának (0.123 ± 0.097 vs. 0.019 ± 0.016 $\mu\text{g Ca/mg}$ szövet) (17. ábra). Ezt követően a lencse minták OCN koncentrációját határoztuk meg ELISA módszerrel. A kontroll minták OCN szintje minden esetben a detekciós határ alatt volt. Ezzel szemben a 10 kataraktás lencséből 2 esetben tudtunk OCN-t detektálni (0.52 ng/mL és 0.69 ng/mL). OCN pozitivitást a legmagasabb Ca tartalmú lencse minták mutattak.



17. ábra Kontroll és kataraktás lencsék Ca koncentrációja. Kontroll ($N=10$) és kataraktás ($N=10$) lencsákat HCl-val dekalcináltunk, és meghatároztuk az így nyert minták Ca tartalmát. A Ca szinteket a szövet nedves tömegére normalizáltuk. Az eredmények $\mu\text{g/mg}$ szövet értékben lettek megadva.

8. Diszkusszió

Az oszteogén differenciálódásnak alapvetően 2 formáját különböztetjük meg, a fiziológiás és a patológiás differenciálódást. A fiziológiás oszteogén differenciálódás megfigyelhető a csontképződés és a csontátépülés során. Csontszövetre emlékeztető szövet kialakulása azonban az extraszkeletális szövetekben is megfigyelhető, melynek hátterében az esetek egy részében patológiás oszteogén differenciálódás áll. Ebben a munkában egy fiziológiás és egy patológiás oszteogén differenciálódási folyamatot tanulmányoztunk nagyrészt *in vitro* körülmények között. Vizsgálatainkat BMSCs-en illetve HuLEC-en végeztük.

A BMSCs oszteogén irányú elköteleződése és differenciálódása kulcsszerepet játszik a csontképződésben, növekedésben és a csúcs-csonttömeg elérésében, mely 30-35 éves korra tehető. A folyamat szerepe azonban ezután sem csökken, hiszen az emberi csontrendszer élő, folyamatosan átépülő szövet, mely átépülés során egy év alatt az össz-csonttömeg 5-10 %-a újul meg. A csont átépülés összehangolt működése elengedhetetlen a csontszövet anatómiai és strukturális integritásának megőrzésében. A BMSCs kulcsszerepe a csontmetabolizmusban abból ered, hogy a BMSCs oszteogén differenciálódása során keletkeznek a csontképző oszteoblasztok.

A csontátépülés kényes egyensúlyának megbomlása számos betegségben megfigyelhető. Így például a krónikus vasfelhalmozódás olyan irányba módosítja a csontátépülést, hogy a csontfelszívódás sebessége meghaladja a csontképződését, melynek következménye a csontok gyengülése, amely jelentkezhet oszteopénia, oszteoporózis, csökkent csontsűrűség, illetve csonttörések formájában is (156). A vastöbbllet által előidézett csontgyengülés egyik oka a kutatócsoportunk korábbi munkájában feltárt mechanizmus, az oszteoblasztok aktivitásának vastöbbllet okozta csökkenése (115).

Jelen munkánkban kimutattuk, hogy a vastöbbllet gátolja a BMSCs oszteogén irányú differenciálódását és az extracelluláris mátrix mineralizációját. Kísérleteink során az oszteogén differenciálódás kiváltására magas Pi és Ca tartalmú oszteogén médiumot használtunk. Ezt a fajta oszteogén médiumot a szakirodalomban elsőként használtuk BMSCs oszteogén differenciációjának előidézésére. A BMSCs oszteogén differenciálódásának kiváltására a szakirodalomban leggyakrabban BMP-t, dexametazont, aszkorbinsav-2 foszfátot, β -glicerofoszfátot, illetve ezek kombinációit alkalmazzák (157). Kutatócsoportunk korábbi munkájában a VSMCs oszteogén transzdifferentiálódásának előidézésére használtunk magas Pi és Ca tartalmú oszteogén médiumot, ezért alkalmaztuk ezt a BMSCs sejtek esetén is

(116). A Pi és a Ca dózisfüggő és szinergista módon indukálta a BMSCs sejtek oszteogén differenciálódását és az extracelluláris mátrix mineralizációját. Eredményeink összhangban vannak korábbi VSMCs-en végzett kísérletek eredményeivel (124). Megállapítottuk továbbá, hogy a magas Pi és Ca tartalmú oszteogén médium hatására a BMSCs oszteogén differenciálódása sokkal gyorsabban bekövetkezik mint a korábbiakban említett induktorok esetében (5 nap vs. 8-14 nap) (158).

A vastöbbllet 50 $\mu\text{mol/L}$ koncentrációban a BMSCs oszteogén differenciálódásának és mineralizációjának teljes gátlását idézte elő. Ez az eredmény összhangban áll Zarjou et al. korábbi eredményével, melyben kimutatták, hogy a vastöbbllet 50 $\mu\text{mol/L}$ koncentrációban a VSMCs oszteogén transzdifferentiálódásának teljes gátlását okozza (116). A kétfajta sejtnél tapasztalt azonos válasz - az oszteogenikus differenciálódás vastöbbllet általi teljes gátlása - tovább erősíti azt az elgondolást, hogy a fiziológiás és a patológiás kalcifikációt hasonló mechanizmusok szabályozzák. A vasfeleslegre adott legmarkánsabb sejtszintű válasz, a vas tárolásában kulcsszerepet játszó fehérje, a ferritin indukciója. Zarjou et al. korábbi munkájában kimutatta, hogy a vas oszteogén differenciálódást gátló hatásáért a ferritin indukciója a felelős (116). Ezen eredmények nyomán mi is megvizsgáltuk a ferritin szerepét a BMSCs oszteogén differenciálódásának vastöbbllet által előidézett gátlásában. Kísérleteink igazolták, hogy a ferritin a VSMCs oszteogén transzdifferentiálódásához hasonlóan a BMSCs oszteogén differenciálódását is gátolja.

Az oszteogén differenciálódás mester transzkripciós faktora a Runx2, melynek legfontosabb bizonyítéka, hogy a Runx2 hiányos egérben nincsenek differenciált oszteoblasztok, a csontképződés elmarad, így az egerek születésük után rövidesen elpusztulnak (22, 23). A Runx2 transzkripciós faktor számos csont-specifikus fehérje, transzkripcióját szabályozza (24). Munkánk során megállapítottuk, hogy a vastöbbllet a Runx2 transzkripciós faktor expressziójának csökkentésén keresztül gátolja az oszteogén differenciálódást. A Runx2 transzkripciós faktort a BMSCs-ek kontroll körülmények között is expresszálják, mely oszteogén stimulus hatására fokozódik. Figyelemre méltó az a megfigyelésünk, hogy a vastöbbllet oszteogén körülmények mellett a Runx2 transzkripciós faktor expresszióját a kontroll sejtek Runx2 expressziója alá csökkentette. Kimutattuk, hogy a vastöbbllet *in vivo* körülmények között is csökkenti a kompakt csontban található oszteoprogenitor sejtek Runx2 expresszióját. Véleményünk szerint ez a mechanizmus szerepet játszhat a szisztémás vastültelítettséggel társult oszteoporózis kialakulásában.

Az BMSCs többirányú differenciálódás képességgel rendelkeznek. Számos kutatócsoport figyelte meg azt, hogy a BMSCs oszteogenikus illetve az adipogén differenciálódási képessége egymással inverz kapcsolatban áll, így például az oszteogén differenciálódási képesség csökkenése gyakran fokozza az adipogén irányú differenciálódást (13, 16). E miatt munkánk során vizsgáltuk a vastöbbslet hatását a BMSCs kondrogén illetve adipogén irányú differenciálódásra is. A vastöbbslet nem befolyásolta a BMSCs kondrogén illetve adipogén differenciálódását, így megállapítottuk, hogy a szakirodalomból ismert inverz kapcsolat a BMSCs oszteogén és adipogén differenciálódási képessége között vastöbbslet esetén nem áll fenn.

Az ektópiás kalcifikáció, a HA lerakódása a lágszövetekben, számos szervet, többek között a szemet is érintheti. Fourier transzformációs infravörös spektroszkópiás és Raman mikrospektroszkópiás vizsgálatok a kataraktás szemlencsében a kalcifikálódott érfalban található HA-hoz hasonló kémiai összetételű és szerkezetű Ca-foszfát kristályok jelenlétét írták le (129, 130). A szakirodalomban található, a katarakta etiopathogenezisét feltáró vizsgálatok nem adnak magyarázatot a HA kataraktás szemlencsében való jelenlétére, így a HuLEC sejteken végzett kísérleteink elsődleges célja annak a megállapítása volt, hogy ezek a sejtek a VSMCs-hez hasonló módon képesek-e oszteogén irányú transzdifferentiálódására és extracelluláris mátrix mineralizációra.

A HuLECs oszteogén differenciálódását magas Pi és Ca tartalmú oszteogén tápfolyadékkal indukáltuk. A magas Pi és Ca tartalmú tápfolyadékot elterjedten használják VSMCs oszteogén differenciálódásának indukálására a vaszkuláris kalcifikáció kutatásában, így kutatócsoportunk is használta korábbi munkájában (116). A Pi dózisfüggő módon indukálta a HuLECs extracelluláris mátrix mineralizációját, melyet a Ca nagymértékben fokozott. Ez összhangban van a szakirodalomban fellelhető, a VSMCs Pi és Ca hatására bekövetkező oszteogén differenciálódását bemutató eredményekkel (124). Kísérleteinkben azt is bizonyítottuk, hogy a HuLECs extracelluláris mátrix mineralizációja *de novo* fehérjeszintézist igénylő folyamat. Ezzel a folyamat aktív voltára kívántunk bizonyítékot szolgáltatni, tekintettel arra, hogy a vaszkuláris kalcifikációt évtizedeken keresztül passzív, degeneratív folyamatnak tekintették.

További kérdés annak a tisztázása, hogy az *in vitro* kalcifikációs rendszerünkben használt Pi és Ca szintek mennyire tekinthetők pathofiziológiásan relevánsnak a katarakta kialakulásában. A lencse egy érmentes szövet, amelyet a csarnokvíz lát el tápanyagokkal. Ismert a csarnokvíz Pi (2.19 mg/dl) és Ca koncentrációja (5.74 mg/dl) nem diabéteszes

kataraktás betegek esetén (159). Az általunk használt kalcifikációs tápfolyadék ötször annyi Pi-t és kétszer annyi Ca-ot tartalmazott mint a kataraktás egyénekből származó csarnokvíz. Ugyanakkor figyelembe kell vennünk azt, hogy a katarakta kialakulása hosszú folyamat, melynek modellezése *in vitro* körülmények között nem egyszerű. Másrészt azt feltételezzük, hogy a katarakta kialakulása igen komplex folyamat, melyben számos egyéb, még fel nem derített fiziológiás/pathofiziológiás induktor és inhibitor szerepet játszhat. Erre utalhat a fetuin-A kalcifikációs inhibitor jelenléte a csarnokvízben (160). További erőfeszítéseket igényel a fiziológiás/pathofiziológiás szempontokból releváns kalcifikációs induktorok és inhibitorok azonosítása.

A Runx2 nem csak a fiziológiás oszteogén differenciálódás mester transzkripciós faktora, de az ektópiás kalcifikációban is központi szerepet játszik. Fokozott Runx2 expressziót detektáltak oszteogén stimulusnak kitett VSMCs-ben, valamint kalcifikálódott erekben is (118, 119). A Runx2 vaszkuláris kalcifikációban betöltött központi jelentőségének legfőbb bizonyítéka a kalcifikáció elmaradása VSMCs targetált kondicionált Runx2 deficiens egerekben (161). Újabb eredmények arra utalnak, hogy a vaszkuláris kalcifikáció során az oszteogén útvonal mellett a kondrogén differenciálódási útvonal is bekapcsol, melyre a Sox9 fokozott expressziója utal (120). Ennek ismeretében vizsgáltuk az oszteogén stimulus hatását HuLECs Runx2 és Sox9 expressziójára. Kimutattuk, hogy az oszteogén stimulus hatására bekövetkező HuLECs minealizáció fokozott Runx2 és Sox9 expresszióval társul. A lencse epithél sejtek Runx2 és Sox9 expressziója nem egyedülálló tulajdonság az epithél sejtek körében, ugyanis proximális tubulus, dentális,- és emlő epithél sejtek is expresszálnak Runx2 és Sox9 markereket (162-166). A különböző eredetű epithél sejtekben a megemelkedett Runx2 és Sox9 expresszióhoz egy összejszerű fenotípus köthető, amihez oszteogenikus differenciálódás és regeneratív lehetőségek társulnak (162-166).

A nem szövetspecifikus ALP (TNAP) enzimek szinte mindenféle szövetben expresszálódnak, legnagyobb mértékben a májban, a vesében és a csontokban. A TNAP az extracelluláris pirofoszfát hidrolízisét katalizálja (167). Mivel a pirofoszfát a HA képződés potens inhibitora, így a magas TNAP aktivitás fokozott kalcifikációs potenciállal társul (168). Így például a TNAP VSMCs targetált fokozott expressziója vaszkuláris kalcifikációt, magas vérnyomást, szívhipertrófiát és korai halált eredményez egerekben, míg a TNAP aktivitás farmakológiai gátlása megfordítja ezeket a káros folyamatokat (169). Az ALP expressziója és aktivitása jelentősen megemelkedik kalcifikált VSMCs-ben (170). Érdekes módon a kataraktás betegek plazmájában az ALP aktivitása jelentős emelkedést mutat, bár ennek

háttérben inkább májkárosodást valószínűsítene (171). Ezen eredmények nyomán vizsgáltuk az ALP expressziójának és enzimaktivitásának oszteogén stimulus hatására bekövetkező változását HuLECs-ben. A VSMCs-hez hasonlóan oszteogén stimulus hatására emelkedett a HuLECs ALP expressziója és enzimaktivitása.

Az OCN a Runx2 transzkripciós kontrollja alatt álló csontspecifikus fehérje, mely jelentős expressziót mutat mineralizált csontmátrixban, porcban és dentális szövetekben. E mellett magas OCN szinteket mértek mineralizált extraszkeletális szövetekben, például kalcifikált erekben és calciphyllaxisban szenvedő betegek bőr léziójában (119, 172). Munkánk során vizsgáltuk az oszteogén stimulus hatását HuLECs OCN expressziójára, és megállapítottuk, hogy a HuLECs oszteogén differenciálódása során nő az OCN expressziója. Ez összhangban áll számos korábbi simaizomsejteken végzett kísérlet eredményével, melyekben kimutatták, hogy VSMCs-ben oszteogén stimulus hatására nő az OCN expressziója (118, 173). Az OCN expresszióját kataraktás szemlencsékben is vizsgáltuk. Az általunk vizsgált 10 betegből származó kataraktás lencsék közül kettőben találtunk detektálható mennyiségű OCN-t, míg a 10 kontroll lencse egyikében sem detektáltunk OCN-t. Ebből azt a következtetést vontuk le, hogy az esetek némelyikében előfordulhat a lencse epithél sejtek oszteogén differenciálódása.

BMSCs-en végzett munkánk folytatását jelenti majd a vas/ferritin anti-oszteogén hatásának háttérben álló szignál transzdukciós útvonal/útvonalak vizsgálata. A lencse epithél sejtek oszteogén differenciálódásával kapcsolatos munkánk folytatásaként vizsgálni fogjuk a katarakta kialakulásában bizonyítottan szerepet játszó faktorok, mint például a magas glükóz szint, illetve a szteroidok oszteogén differenciálódást kiváltó hatását HuLECs sejteken. E mellett szeretnénk az oszteogén differenciálódás szerepét a katarakta kialakulásában tovább vizsgálni *in vivo* egérmodellekben.

9. Konklúziók

1. Munkánk első részében a vastöbbslet hatását vizsgáltuk BMSCs oszteogén, kondrogén és adipogén irányú differenciálódására. Ezzel kapcsolatban az alábbi megállapításokat tettük:

- 1.1. Megállapítottuk, hogy a vastöbbslet gátolja a BMSCs oszteogén irányú differenciálódását és extracelluláris mátrix mineralizációját *in vitro*.
- 1.2. Kimutattuk, hogy a ferritin a vashoz hasonló módon gátolja a BMSCs oszteogén differenciálódását és extracelluláris mátrix mineralizációját.
- 1.3. Megállapítottuk, hogy a krónikus vastöbbslet csökkenti a kompakt csontból származó oszteoprogenitor sejtek Runx2 szintjét egerekben.
- 1.4. Kimutattuk, hogy a vastöbbslet nem befolyásolja BMSCs adipogén illetve kondrogén irányú differenciálódást.

Ezek az eredmények igazolják feltevésünk helyességét, és felvetik annak a lehetőségét, hogy a mesenchymális őssejtek oszteogén differenciálódásának vastütelítettség általi gátlása szerepet játszik a krónikus vastöbblethez társuló csontvesztésben.

2. Munkánk második részében a HuLECs oszteogén irányú differenciálódás képességét vizsgáltuk. Ezzel kapcsolatban az alábbi megállapításokat tettük:
 - 2.1. Megállapítottuk, hogy a HuLECs-ben oszteogén körülmények hatására oszteogén irányú differenciálódás és extracelluláris mátrix mineralizáció idézhető elő.
 - 2.2. Megállapítottuk, hogy vannak hasonlóságok és eltérések is a HuLECs oszteogén differenciálódása és az EMT között.
 - 2.3. Megállapítottuk, hogy a kataraktás szemlencsék Ca tartalma magasabb, mint a kontrolloké, és néhány kataraktás szemlencsében OCN jelenlétét tudtuk kimutatni.

Ezek az eredmények igazolják hipotézisünk helyességét, és felvetik annak a lehetőségét, hogy a lencse epithél sejtek oszteogén differenciálódása hozzájárul a kataraktás lencsében előforduló hidroxipatit kristályok képződéséhez.

10. Összefoglalás

Munkánk során BMSCs és HuLECs oszteogén differenciálódás folyamatait tanulmányoztunk. A BMSCs-en végzett kísérleteink fő célja annak a vizsgálata volt, hogy a vas túltelítettség hogyan befolyásolja a BMSCs oszteoblaszt irányú differenciálódását. Irodalmi adatok bizonyítják, hogy a krónikus vastöbblet a csontok gyengülésével jár együtt, melynek változatos klinikai megjelenési formái vannak. Kimutattuk, hogy a vastöbblet gátolja a BMSCs oszteogén stimulussal indukált oszteogén differenciálódását és az extracelluláris mátrix mineralizációját. E hatás mögött a Runx2 oszteogén mester transzkripciós faktor indukációjának vas általi gátlása áll, melynek következtében elmarad a Runx2 által szabályzott csontosodásban szerepet játszó fehérjék oszteogén stimulus hatására történő indukciója. A vas túltelítettséget egerekben létrehozva az oszteoprogenitor sejtek csökkent Runx2 mRNS szintjét figyeltük meg. A BMSCs többirányú differenciációra képes multipotens őssejt, így vizsgáltuk a vastöbblet hatását adipogén és kondrogén irányú differenciálódásában is, és azt tapasztaltuk, hogy a vastöbblet ezeket az útvonalakat nem befolyásolta.

HuLECs-en végzett munkánk célja annak a vizsgálata volt, hogy oszteogén stimulus kiváltja-e a HuLECs oszteogén differenciálódását és az extracelluláris mátrix mineralizációját. Irodalmi adatok ugyanis HA kristályok jelenlétét bizonyították kataraktás szemlencsében, azonban a HA képződésére a tudományos irodalomban nem találtunk magyarázatot. Kimutattuk, hogy oszteogén stimulussal a HuLECs oszteogén differenciálódása, és az extracelluláris mátrix mineralizációja kiváltható. A mineralizáció hátterében a Runx2 oszteogén, és a Sox9 kondrogén mester transzkripciós faktorok, valamint az általuk szabályzott fehérjék expressziójának oszteogén stimulus hatására bekövetkező emelkedése áll. Megfigyeltük, hogy a HuLECs oszteo/kondrogén differenciálódása során részben hasonló gének indukálódnak, mint a jól ismert EMT során. Humán szemlencséken végzett vizsgálataink során megállapítottuk, hogy néhány kataraktás szemlencsében kimutatható mennyiségben volt jelen a csontmátrix egyik fontos fehérjéje, az OCN, míg a kontroll lencsékben az OCN expressziója minden esetben az általunk használt módszer kimutathatósági határa alatt volt. OCN pozitivitást a magas Ca tartalmú lencséknel tapasztaltunk, bár ebből a minták alacsony száma miatt következtetést nem tudtunk levonni.

Összességében munkánk hozzájárulhat a vastúltelítettséggel társuló csontabnormalitások, valamint a katarakta kapcsán megfigyelt HA depozíció hátterében álló folyamatok jobb megértéséhez.

11. Summary

In this work we studied osteogenic differentiation of BMSCs and HuLECs. The aim of our work with BMSCs was to investigate the effect of iron overload on osteogenic differentiation of BMSCs. Accumulating evidence suggest a link between chronic iron overload and bone abnormalities. Here we showed that excess iron inhibits osteogenic stimuli-induced osteogenic differentiation and extracellular matrix mineralization of BMSCs. Excess iron inhibited the osteogenic stimuli-mediated upregulation of Runx2, the master transcription factor of osteogenesis. Subsequently, iron inhibited upregulation of Runx2-regulated osteoblast-specific proteins in BMSCs. Iron overload in mice resulted in decreased Runx2 mRNA levels in compact bone-derived osteoprogenitor cells. Because BMCSs are multipotent cells with a capability to differentiate into adipogenic and chondrogenic lineages, we investigated the effect of excess iron on these pathways. We found no effect of iron on either adipogenic or chondrogenic differentiation of BMCSs.

The aim of our work with HuLECs was to investigate whether osteogenic stimuli induces osteogenic differentiation and extracellular matrix mineralization of HuLECs. Previous studies showed the presence of HA crystals in cataractous lenses, but the exact mechanism of the formation of HA crystals remained to be elucidated. Here we showed that osteogenic stimuli induces osteogenic differentiation and extracellular matrix mineralization of HuLECs. We found that osteogenic stimuli increased the expressions of Runx2 and Sox9, the master regulators of osteogenesis and chondrogenesis respectively, and their target genes. Our work revealed that the genes activated during osteochondrogenic differentiation and EMT are partially overlap. OCN, an osteoblast-specific protein, was expressed in 2 out of 10 cataractous lenses, whereas no OCN could be detected in control lenses. Ca content was higher in human cataractous lenses, compared to non-cataractous controls and were highest in the OCN positive samples.

Overall our work can contribute to fuller understanding the mechanisms of iron-overload associated bone loss and lens calcification.

12. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, *Dr. Jeney Viktóriának*, aki magasszintű szakmai tudásával az elmúlt évek során segítette munkámat, akihez bármikor fordulhattam segítségért, nélkülözhetetlen támogatást nyújtott eredményeim eléréséhez és segített elsajátítani a kutatói szakma alapjait. Hálásan köszönöm, hogy követendő példát adott számomra munkaszeretetből, és az igényességre való törekvésből.

Köszönöm *Dr. Balla József és Dr. Balla György* professzor uraknak, hogy lehetővé tették számomra, hogy az értekezésem alapjául szolgáló kísérleteim egy részét a Vaszkuláris Biológiai Kutató Laboratóriumban végezhettem.

Köszönetemet fejezem ki *Dr. Paragh György* professzor úrnak és *Dr. Seres Ildikó* tudományos főmunkatársnőnek, akik biztosították számomra, hogy tudományos munkámat a Belgyógyászati Intézet Kutató Laboratóriumában folytathassam.

Köszönöm a Belgyógyászati Intézet jelenlegi és volt munkatársainak, különösen *Dr. Bányai Emesének, Dr. Becs Gergelynek, Dr. Gyetvai Ágnesnek, Dr. Balázsne Szőnyi Anikónak és Dr. Bodó Tímeának*, valamint *id. Dr. Nagy Bélának és Dr. Nagy Béla Jr.-nak* a sok tanácsot és a közös munkát.

Köszönettel tartozom *Tóth Andrea* PhD hallgatónak, aki nélkülözhetetlen segítséget nyújtott a kísérletek megvalósításában.

Köszönöm a kutatócsoport jelenlegi PhD hallgatónak, így *Erdei Juditnak és Bogonko Benard Nyakundinak* a támogatását.

Külön szeretném megköszönni *Orosz Józsefnek*, aki az állatkísérletekkel kapcsolatban támogatta munkámat.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni *családomnak*, de legfőképpen *nagymamámnak* illetve *barátaimnak*, mert az ő szeretetük és biztatásuk nélkül jelen disszertáció nem készülhetett volna el.

Balogh Enikő az Emberi Erőforrások Minisztériuma Új Nemzeti Kiválóság (ÚNKP-16-3-III) és Nemzeti Tehetség Program (NTP-EFÖ-P15) támogatásában részesült. A kutatás pénzügyi háttérét az alábbi pályázatok biztosították: OTKA Kutatási Pályázat (Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (NKFI-6 K116024/2015) és GINOP-2.3.2-15-2016-00005.

13. Irodalomjegyzék

1. Barachini S, *et al.* (2009) Morpho-Functional Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord Blood for Potential Uses in Regenerative Medicine. *Stem Cells Dev* 18(2):293-305.
2. Dimarino AM, Caplan AI, & Bonfield TL (2013) Mesenchymal stem cells in tissue repair. *Front Immunol* 4:201.
3. Tribe HC, McEwan J, Taylor H, Oreffo ROC, & Tare RS (2017) Mesenchymal Stem Cells: Potential Role in the Treatment of Osteochondral Lesions of the Ankle. *Biotechnology journal*.
4. Kiernan J, Davies JE, & Stanford WL (2017) Concise Review: Musculoskeletal Stem Cells to Treat Age-Related Osteoporosis. *Stem cells translational medicine* 6(10):1930-1939.
5. Macrin D, Joseph JP, Pillai AA, & Devi A (2017) Eminent Sources of Adult Mesenchymal Stem Cells and Their Therapeutic Imminence. *Stem cell reviews*.
6. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, & Kulagina NN (1976) Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental hematology* 4(5):267-274.
7. Mushahary D, Spittler A, Kasper C, Weber V, & Charwat V (2017) Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*.
8. Almalki SG & Agrawal DK (2016) Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. *Differentiation; research in biological diversity* 92(1-2):41-51.
9. Kruse C, *et al.* (2006) Adult pancreatic stem/progenitor cells spontaneously differentiate in vitro into multiple cell lineages and form teratoma-like structures. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft* 188(6):503-517.
10. Pierdomenico L, *et al.* (2005) Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation* 80(6):836-842.
11. Sellheyer K & Krahel D (2010) Cutaneous mesenchymal stem cells: status of current knowledge, implications for dermatopathology. *Journal of cutaneous pathology* 37(6):624-634.
12. Sabatini F, *et al.* (2005) Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 85(8):962-971.
13. Chen Q, *et al.* (2016) Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? *Cell death and differentiation* 23(7):1128-1139.

14. Haynesworth SE, Baber MA, & Caplan AI (1992) Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone* 13(1):69-80.
15. Suva D, et al. (2004) Non-hematopoietic human bone marrow contains long-lasting, pluripotential mesenchymal stem cells. *Journal of cellular physiology* 198(1):110-118.
16. Gimble JM & Nuttall ME (2012) The relationship between adipose tissue and bone metabolism. *Clin Biochem* 45(12):874-879.
17. Gimble JM, et al. (2008) In vitro Differentiation Potential of Mesenchymal Stem Cells. *Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie* 35(3):228-238.
18. Ng F, et al. (2008) PDGF, TGF-beta, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood* 112(2):295-307.
19. Acil Y, Ghoniem AA, Wiltfang J, & Gierloff M (2014) Optimizing the osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells by the synergistic action of growth factors. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 42(8):2002-2009.
20. Wu M, Chen G, & Li YP (2016) TGF-beta and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone research* 4:16009.
21. Franceschi RT, et al. (2003) Multiple signaling pathways converge on the Cbfa1/Runx2 transcription factor to regulate osteoblast differentiation. *Connect Tissue Res* 44 Suppl 1:109-116.
22. Otto F, et al. (1997) Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89(5):765-771.
23. Komori T, et al. (1997) Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89(5):755-764.
24. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, & Karsenty G (1997) Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89(5):747-754.
25. de Girolamo L, Sartori MF, Albisetti W, & Brini AT (2007) Osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells: comparison of two different inductive media. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 1(2):154-157.
26. Atashi F, Modarressi A, & Pepper MS (2015) The role of reactive oxygen species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: a review. *Stem Cells Dev* 24(10):1150-1163.

27. Lakatos P TI (2006) *Metabolikus csontbetegségek* (Medintel, Budapest).
28. Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simoes MJ, & Cerri PS (2015) Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed research international* 2015:421746.
29. Ikeda K & Takeshita S (2016) The role of osteoclast differentiation and function in skeletal homeostasis. *J Biochem* 159(1):1-8.
30. Capulli M, Paone R, & Rucci N (2014) Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Archives of biochemistry and biophysics* 561:3-12.
31. Marks SC, Jr. & Popoff SN (1988) Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. *The American journal of anatomy* 183(1):1-44.
32. Franz-Odenaal TA, Hall BK, & Witten PE (2006) Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 235(1):176-190.
33. Schaffler MB, Cheung WY, Majeska R, & Kennedy O (2014) Osteocytes: master orchestrators of bone. *Calcif Tissue Int* 94(1):5-24.
34. Hering S, *et al.* (2001) TGFbeta1 and TGFbeta2 mRNA and protein expression in human bone samples. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* 109(4):217-226.
35. Crane JL & Cao X (2014) Bone marrow mesenchymal stem cells and TGF-beta signaling in bone remodeling. *The Journal of clinical investigation* 124(2):466-472.
36. Ng F, *et al.* (2008) PDGF, TGF-beta, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood* 112(2):295-307.
37. Matsumoto MA, Bigueti CC, Fonseca AC, & Saraiva PP (Bone tissue healing dynamics: from damage to reconstruction. (Jorunal of Molecular Signaling Updates, 2016, 1, 33-40 33).
38. Briggs AM, *et al.* (2016) Musculoskeletal Health Conditions Represent a Global Threat to Healthy Aging: A Report for the 2015 World Health Organization World Report on Ageing and Health. *Gerontologist* 56:S243-S255.
39. Silman AJ FD, O'Neil TW, Mituszova M, Szilagyi M, Kiss C, Poor G (1997) Prevalence of vertebral deformity in Hungary: the European Vertebral Osteoporosis Study. (Orvosi hetilap), pp 2647-2652.
40. Lakatos P (1999) *A kalciumháztartás és csontszövet anyagcsere-betegségei* (Medicina, Budapest).

41. Takács I LP (2006) *Metabolikus csontbetegségek* (Medintel, Budapest).
42. Lane NE (2006) Epidemiology, etiology, and diagnosis of osteoporosis. *Am J Obstet Gynecol* 194(2 Suppl):S3-11.
43. Watts NB (2017) Adverse bone effects of medications used to treat non-skeletal disorders. *Osteoporosis Int* 28(10):2741-2746.
44. Black DM & Rosen CJ (2016) Postmenopausal Osteoporosis. *The New England journal of medicine* 374(21):2096-2097.
45. Ganguly P, *et al.* (2017) Age-related Changes in Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells: A Potential Impact on Osteoporosis and Osteoarthritis Development. *Cell transplantation* 26(9):1520-1529.
46. Bethel M, Chitteti BR, Srour EF, & Kacena MA (2013) The Changing Balance Between Osteoblastogenesis and Adipogenesis in Aging and its Impact on Hematopoiesis. *Current osteoporosis reports* 11(2):99-106.
47. Kim M, *et al.* (2012) Age-related alterations in mesenchymal stem cells related to shift in differentiation from osteogenic to adipogenic potential: Implication to age-associated bone diseases and defects. *Mech Ageing Dev* 133(5):215-225.
48. Rosen CJ & Bouxsein ML (2006) Mechanisms of disease: is osteoporosis the obesity of bone? *Nat Clin Pract Rheum* 2(1):35-43.
49. Justesen J, *et al.* (2001) Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. *Biogerontology* 2(3):165-171.
50. Weatherall DJ (1997) The thalassaemias. *BMJ* 314(7095):1675-1678.
51. Bayanzay K & Alzoebe L (2016) Reducing the iron burden and improving survival in transfusion-dependent thalassemia patients: current perspectives. *J Blood Med* 7:159-169.
52. Dede AD, *et al.* (2016) Thalassemia-associated osteoporosis: a systematic review on treatment and brief overview of the disease. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*.
53. Exarchou E, *et al.* (1984) Fractures and epiphyseal deformities in beta-thalassemia. *Clinical orthopaedics and related research* (189):229-233.
54. Finsterbush A, Farber I, Mogle P, & Goldfarb A (1985) Fracture patterns in thalassemia. *Clinical orthopaedics and related research* (192):132-136.
55. Dines DM, Canale VC, & Arnold WD (1976) Fractures in thalassemia. *J Bone Joint Surg Am* 58(5):662-666.

56. Fung EB, *et al.* (2008) Fracture prevalence and relationship to endocrinopathy in iron overloaded patients with sickle cell disease and thalassemia. *Bone* 43(1):162-168.
57. Ruggiero L & De Sanctis V (1998) Multicentre study on prevalence of fractures in transfusion-dependent thalassaemic patients. *J Pediatr Endocrinol Metab* 11 Suppl 3:773-778.
58. Vogiatzi MG, *et al.* (2006) Prevalence of fractures among the Thalassemia syndromes in North America. *Bone* 38(4):571-575.
59. Hamideh D & Alvarez O (2013) Sickle cell disease related mortality in the United States (1999-2009). *Pediatric blood & cancer* 60(9):1482-1486.
60. Almeida A & Roberts I (2005) Bone involvement in sickle cell disease. *British journal of haematology* 129(4):482-490.
61. Osunkwo I (2013) An update on the recent literature on sickle cell bone disease. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 20(6):539-546.
62. Miller RG, *et al.* (2006) High prevalence and correlates of low bone mineral density in young adults with sickle cell disease. *American journal of hematology* 81(4):236-241.
63. Sadat-Ali M, *et al.* (2008) Low bone mass due to sickle cell anemia: is it becoming a real issue? *West Afr J Med* 27(4):218-223.
64. Sadat-Ali M & Al Elq AH (2007) Sickle cell anaemia: is it a cause for secondary osteoporosis? *West Afr J Med* 26(2):134-137.
65. Sarrai M, Duroseau H, D'Augustine J, Moktan S, & Bellevue R (2007) Bone mass density in adults with sickle cell disease. *British journal of haematology* 136(4):666-672.
66. Baldanzi G, *et al.* (2011) Low bone mass density is associated with hemolysis in Brazilian patients with sickle cell disease. *Clinics (Sao Paulo)* 66(5):801-805.
67. Koren A, Fink D, Admoni O, Tennenbaum-Rakover Y, & Levin C (2010) Non-transferrin-bound labile plasma iron and iron overload in sickle-cell disease: a comparative study between sickle-cell disease and beta-thalassemic patients. *European journal of haematology* 84(1):72-78.
68. Koduri PR (2003) Iron in sickle cell disease: a review why less is better. *American journal of hematology* 73(1):59-63.
69. Natta C, Creque L, & Navarro C (1985) Compartmentalization of iron in sickle cell anemia--an autopsy study. *Am J Clin Pathol* 83(1):76-78.
70. Sadat-Ali M, Sultan O, Al-Turki H, & Alelq A (2011) Does high serum iron level induce low bone mass in sickle cell anemia ? *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 24(1):19-22.

71. McLaren GD & Gordeuk VR (2009) Hereditary hemochromatosis: insights from the Hemochromatosis and Iron Overload Screening (HEIRS) Study. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*:195-206.
72. Feder JN, *et al.* (1996) A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nature genetics* 13(4):399-408.
73. Guggenbuhl P, Brissot P, & Loreal O (2011) Miscellaneous non-inflammatory musculoskeletal conditions. Haemochromatosis: the bone and the joint. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 25(5):649-664.
74. Guggenbuhl P, *et al.* (2005) Bone mineral density in men with genetic hemochromatosis and HFE gene mutation. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 16(12):1809-1814.
75. Valenti L, *et al.* (2009) Association between iron overload and osteoporosis in patients with hereditary hemochromatosis. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 20(4):549-555.
76. Richette P, Ottaviani S, Vicaut E, & Bardin T (2010) Musculoskeletal complications of hereditary hemochromatosis: a case-control study. *The Journal of rheumatology* 37(10):2145-2150.
77. Diamond T, Stiel D, & Posen S (1989) Osteoporosis in hemochromatosis: iron excess, gonadal deficiency, or other factors? *Ann Intern Med* 110(6):430-436.
78. Sinigaglia L, *et al.* (1997) Bone and joint involvement in genetic hemochromatosis: role of cirrhosis and iron overload. *The Journal of rheumatology* 24(9):1809-1813.
79. Angelopoulos NG, Goula AK, Papanikolaou G, & Tolis G (2006) Osteoporosis in HFE2 juvenile hemochromatosis. A case report and review of the literature. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 17(1):150-155.
80. Eyres KS, *et al.* (1992) Osteoporotic fractures: an unusual presentation of haemochromatosis. *Bone* 13(6):431-433.
81. Duquenne M, *et al.* (1996) Spontaneous multiple vertebral fractures revealed primary haemochromatosis. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 6(4):338-340.

82. Cummings SR, Black DM, & Rubin SM (1989) Lifetime risks of hip, Colles', or vertebral fracture and coronary heart disease among white postmenopausal women. *Arch Intern Med* 149(11):2445-2448.
83. Cummings SR & Melton LJ (2002) Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *Lancet* 359(9319):1761-1767.
84. Bowring CE & Francis RM (2011) National Osteoporosis Society's Position statement on hormone replacement therapy in the prevention and treatment of osteoporosis. *Menopause Int* 17(2):63-65.
85. Milman N & Kirchhoff M (1992) Iron stores in 1359, 30- to 60-year-old Danish women: evaluation by serum ferritin and hemoglobin. *Annals of hematology* 64(1):22-27.
86. Zacharski LR, Ornstein DL, Woloshin S, & Schwartz LM (2000) Association of age, sex, and race with body iron stores in adults: analysis of NHANES III data. *Am Heart J* 140(1):98-104.
87. Jian J, Pelle E, & Huang X (2009) Iron and menopause: does increased iron affect the health of postmenopausal women? *Antioxidants & redox signaling* 11(12):2939-2943.
88. Kim BJ, et al. (2012) Iron overload accelerates bone loss in healthy postmenopausal women and middle-aged men: a 3-year retrospective longitudinal study. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 27(11):2279-2290.
89. Kim BJ, Lee SH, Koh JM, & Kim GS (2013) The association between higher serum ferritin level and lower bone mineral density is prominent in women ≥ 45 years of age (KNHANES 2008-2010). *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 24(10):2627-2637.
90. Tsay J, et al. (2010) Bone loss caused by iron overload in a murine model: importance of oxidative stress. *Blood* 116(14):2582-2589.
91. Vogiatzi MG, et al. (2010) Changes in bone microarchitecture and biomechanical properties in the th3 thalassemia mouse are associated with decreased bone turnover and occur during the period of bone accrual. *Calcif Tissue Int* 86(6):484-494.
92. Thongchote K, Svasti S, Teerapornpuntakit J, Krishnamra N, & Charoenphandhu N (2014) Running exercise alleviates trabecular bone loss and osteopenia in hemizygous beta-globin knockout thalassemic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 306(12):E1406-1417.
93. Thongchote K, et al. (2015) Bone microstructural defects and osteopenia in hemizygous betaIVSII-654 knockin thalassemic mice: sex-dependent changes in bone density and osteoclast function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 309(11):E936-948.

94. Green M, *et al.* (2015) Microarchitectural and mechanical characterization of the sickle bone. *J Mech Behav Biomed Mater* 48:220-228.
95. Xiao L, *et al.* (2016) Loss of Bone in Sickle Cell Trait and Sickle Cell Disease Female Mice Is Associated With Reduced IGF-1 in Bone and Serum. *Endocrinology* 157(8):3036-3046.
96. Guggenbuhl P, *et al.* (2011) Bone status in a mouse model of genetic hemochromatosis. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 22(8):2313-2319.
97. Doyard M, *et al.* (2016) Decreased Bone Formation Explains Osteoporosis in a Genetic Mouse Model of Hemochromatosis. *PloS one* 11(2):e0148292.
98. Shen GS, *et al.* (2014) Hepcidin1 knockout mice display defects in bone microarchitecture and changes of bone formation markers. *Calcif Tissue Int* 94(6):632-639.
99. Sun L, *et al.* (2014) Hepcidin deficiency undermines bone load-bearing capacity through inducing iron overload. *Gene* 543(1):161-165.
100. Jiang Y, Yan Y, Wang X, Zhu G, & Xu YJ (2016) Hepcidin inhibition on the effect of osteogenesis in zebrafish. *Biochemical and biophysical research communications* 476(1):1-6.
101. Teitelbaum SL & Ross FP (2003) Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 4(8):638-649.
102. Hofbauer LC, Kuhne CA, & Viereck V (2004) The OPG/RANKL/RANK system in metabolic bone diseases. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 4(3):268-275.
103. Boyce BF & Xing L (2007) Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis research & therapy* 9 Suppl 1:S1.
104. Roodman GD (2009) Osteoclasts pump iron. *Cell metabolism* 9(5):405-406.
105. Ishii KA, *et al.* (2009) Coordination of PGC-1beta and iron uptake in mitochondrial biogenesis and osteoclast activation. *Nature medicine* 15(3):259-266.
106. Jia P, *et al.* (2012) Ferric ion could facilitate osteoclast differentiation and bone resorption through the production of reactive oxygen species. *J Orthop Res* 30(11):1843-1852.
107. Cornish J, *et al.* (2004) Lactoferrin is a potent regulator of bone cell activity and increases bone formation in vivo. *Endocrinology* 145(9):4366-4374.
108. Halleen JM, *et al.* (2000) Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 15(7):1337-1345.

109. Zaidi M, Moonga B, Moss DW, & MacIntyre I (1989) Inhibition of osteoclastic acid phosphatase abolishes bone resorption. *Biochemical and biophysical research communications* 159(1):68-71.
110. Alcantara O, Reddy SV, Roodman GD, & Boldt DH (1994) Transcriptional regulation of the tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) gene by iron. *The Biochemical journal* 298 (Pt 2):421-425.
111. Hayman AR, Warburton MJ, Pringle JA, Coles B, & Chambers TJ (1989) Purification and characterization of a tartrate-resistant acid phosphatase from human osteoclastomas. *The Biochemical journal* 261(2):601-609.
112. Hayman AR & Cox TM (1994) Purple acid phosphatase of the human macrophage and osteoclast. Characterization, molecular properties, and crystallization of the recombinant di-iron-oxo protein secreted by baculovirus-infected insect cells. *The Journal of biological chemistry* 269(2):1294-1300.
113. Diamond T, Pojer R, Stiel D, Alfrey A, & Posen S (1991) Does Iron Affect Osteoblast Function - Studies Invitro and in Patients with Chronic Liver-Disease. *Calcified Tissue Int* 48(6):373-379.
114. Messer JG, Kilbarger AK, Erikson KM, & Kipp DE (2009) Iron overload alters iron-regulatory genes and proteins, down-regulates osteoblastic phenotype, and is associated with apoptosis in fetal rat calvaria cultures. *Bone* 45(5):972-979.
115. Zarjou A, *et al.* (2010) Ferritin ferroxidase activity: a potent inhibitor of osteogenesis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 25(1):164-172.
116. Zarjou A, *et al.* (2009) Ferritin prevents calcification and osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 20(6):1254-1263.
117. Giachelli CM (2001) Ectopic calcification: new concepts in cellular regulation. *Z Kardiol* 90 Suppl 3:31-37.
118. Jono S, *et al.* (2000) Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circulation research* 87(7):E10-17.
119. Tyson KL, *et al.* (2003) Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23(3):489-494.
120. Neven E, Dauwe S, De Broe ME, D'Haese PC, & Persy V (2007) Endochondral bone formation is involved in media calcification in rats and in men. *Kidney international* 72(5):574-581.

121. Giachelli CM, *et al.* (2001) Vascular calcification and inorganic phosphate. *Am J Kidney Dis* 38(4 Suppl 1):S34-37.
122. Giachelli CM (2003) Vascular calcification: in vitro evidence for the role of inorganic phosphate. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 14(9 Suppl 4):S300-304.
123. Lau WL, Festing MH, & Giachelli CM (2010) Phosphate and vascular calcification: Emerging role of the sodium-dependent phosphate co-transporter PiT-1. *Thromb Haemost* 104(3):464-470.
124. Shanahan CM, Crouthamel MH, Kapustin A, & Giachelli CM (2011) Arterial calcification in chronic kidney disease: key roles for calcium and phosphate. *Circulation research* 109(6):697-711.
125. Virmani R, Joner M, & Sakakura K (2014) Recent highlights of ATVB: calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34(7):1329-1332.
126. Gorgels TG, *et al.* (2012) Abcc6 deficiency in the mouse leads to calcification of collagen fibers in Bruch's membrane. *Experimental eye research* 104:59-64.
127. Eom Y, *et al.* (2013) Calcium hydroxyapatite crystals in the anterior chamber of the eye in a patient with renal hyperparathyroidism. *Cornea* 32(11):1502-1504.
128. Jhanji V, Rapuano CJ, & Vajpayee RB (2011) Corneal calcific band keratopathy. *Current opinion in ophthalmology* 22(4):283-289.
129. Chen KH, Cheng WT, Li MJ, Yang DM, & Lin SY (2005) Calcification of senile cataractous lens determined by Fourier transform infrared (FTIR) and Raman microspectroscopies. *J Microsc* 219(Pt 1):36-41.
130. Chiang SY, Horng CT, Lee WH, & Chang CJ (2004) Calcified cataractous lens. *J Cataract Refract Surg* 30(7):1586-1589.
131. Foster A & Resnikoff S (2005) The impact of Vision 2020 on global blindness. *Eye (Lond)* 19(10):1133-1135.
132. Thylefors B, Négrel AD, Pararajasegaram R, & Dadzie KY (1995) Global data on blindness. *Bull World Health Organ* 73(1):115-121.
133. Vinson JA (2006) Oxidative stress in cataracts. *Pathophysiology* 13(3):151-162.
134. Nagy Z KH, Salacz Gy, (2014) Katarakta és refraktív regiszter 2014. Societas Hungarica Ad Implantandam Oculi Lenticulam (SHIOL) Kongresszusa. (Balatonalmádi).
135. I. S (2010) A lencse (lens crystallina) betegségei. In Süveges I. (szerk.) Szemészet. (Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest).
136. Skuta GL CL, Weiss JS. (2011) The Eye. In Fundamentals and Principles of Ophthalmology, Basic and Clinical Science Course. American Academy of Ophthalmology. (San Francisco).

137. J. S (2002) Az idegrendszer és az érzékszervek. In Réthelyi M. (szerk.). ed M. R (Funkcionális anatómia III. Medicina Kiadó, Budapest), pp 1369-1788.
138. Hejtmancik JF (2008) Congenital cataracts and their molecular genetics. *Semin Cell Dev Biol* 19(2):134-149.
139. Francis PJ, Berry V, Moore AT, & Bhattacharya S (1999) Lens biology: development and human cataractogenesis. *Trends Genet* 15(5):191-196.
140. Harding JJ & Dilley KJ (1976) Structural proteins of the mammalian lens: a review with emphasis on changes in development, aging and cataract. *Exp Eye Res* 22(1):1-73.
141. Wu ZM, *et al.* (2008) Ginkgo biloba extract prevents against apoptosis induced by high glucose in human lens epithelial cells. *Acta Pharmacol Sin* 29(9):1042-1050.
142. Li WC & Spector A (1996) Lens epithelial, cell apoptosis is an early event in the development of UVB-induced cataract. *Free Radical Bio Med* 20(3):301-311.
143. Zhang L, *et al.* (2010) Apoptosis: its functions and control in the ocular lens. *Curr Mol Med* 10(9):864-875.
144. Li WC, *et al.* (1995) Lens Epithelial-Cell Apoptosis Appears to Be a Common Cellular Basis for Non-Congenital Cataract Development in Humans and Animals. *Journal of Cell Biology* 130(1):169-181.
145. Ma B, Kang Q, Qin L, Cui L, & Pei C (2014) TGF- β 2 induces transdifferentiation and fibrosis in human lens epithelial cells via regulating gremlin and CTGF. *Biochem Biophys Res Commun* 447(4):689-695.
146. Gamulescu MA, *et al.* (2006) Transforming growth factor beta2-induced myofibroblastic differentiation of human retinal pigment epithelial cells: regulation by extracellular matrix proteins and hepatocyte growth factor. *Exp Eye Res* 83(1):212-222.
147. de longh RU, Wederell E, Lovicu FJ, & McAvoy JW (2005) Transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in the lens: a model for cataract formation. *Cells Tissues Organs* 179(1-2):43-55.
148. Shu DY, Wojciechowski MC, & Lovicu FJ (2017) Bone Morphogenetic Protein-7 Suppresses TGF β 2-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in the Lens: Implications for Cataract Prevention. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 58(2):781-796.
149. Choi J, Park SY, & Joo CK (2007) Transforming growth factor-beta1 represses E-cadherin production via slug expression in lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(6):2708-2718.
150. Spector A (1972) Aggregation of α -crystallin and its possible relationship to cataract formation. *Isr J Med Sci* 8(8):1577-1582.

151. Wada E, Sugiura T, Nakamura H, & Tsumita T (1981) Studies on lens proteins of mice with hereditary cataract. I. Comparative studies on the chemical and immunochemical properties of the soluble proteins of cataractous and normal mouse lenses. *Biochim Biophys Acta* 667(2):251-259.
152. Moreau KL & King JA (2012) Protein misfolding and aggregation in cataract disease and prospects for prevention. *Trends Mol Med* 18(5):273-282.
153. Truscott RJ (2005) Age-related nuclear cataract-oxidation is the key. *Exp Eye Res* 80(5):709-725.
154. Marsili S, *et al.* (2004) Cataract formation in a strain of rats selected for high oxidative stress. *Exp Eye Res* 79(5):595-612.
155. Zhu H, *et al.* (2010) A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone. *Nat Protoc* 5(3):550-560.
156. Jeney V (2017) Clinical Impact and Cellular Mechanisms of Iron Overload-Associated Bone Loss. *Frontiers in pharmacology* 8:77.
157. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, & Bruder SP (1997) Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 64(2):295-312.
158. Siddappa R, Fernandes H, Liu J, van Blitterswijk C, & de Boer J (2007) The response of human mesenchymal stem cells to osteogenic signals and its impact on bone tissue engineering. *Curr Stem Cell Res Ther* 2(3):209-220.
159. Kim CJ & Choi SK (2007) Analysis of aqueous humor calcium and phosphate from cataract eyes with and without diabetes mellitus. *Korean J Ophthalmol* 21(2):90-94.
160. Edward DP & Bouhenni R (2011) Anterior segment alterations and comparative aqueous humor proteomics in the buphthalmic rabbit (an American Ophthalmological Society thesis). *Trans Am Ophthalmol Soc* 109:66-114.
161. Lin ME, *et al.* (2016) Runx2 Deletion in Smooth muscle Cells Inhibits Vascular Osteochondrogenesis and Calcification but not Atherosclerotic Lesion Formation. *Cardiovascular research*.
162. Jiawen S, *et al.* (2014) Osteogenic differentiation of human amniotic epithelial cells and its application in alveolar defect restoration. *Stem Cells Transl Med* 3(12):1504-1513.
163. Jia Z, *et al.* (2015) Role of calcium in the regulation of bone morphogenetic protein 2, runt-related transcription factor 2 and Osterix in primary renal tubular epithelial cells by the vitamin D receptor. *Mol Med Rep* 12(2):2082-2088.

164. Someya H, *et al.* (2015) Thymosin beta 4 is associated with RUNX2 expression through the Smad and Akt signaling pathways in mouse dental epithelial cells. *Int J Mol Med* 35(5):1169-1178.
165. Ferrari N, *et al.* (2015) Runx2 contributes to the regenerative potential of the mammary epithelium. *Sci Rep* 5:15658.
166. Kumar S, *et al.* (2015) Sox9 Activation Highlights a Cellular Pathway of Renal Repair in the Acutely Injured Mammalian Kidney. *Cell Rep* 12(8):1325-1338.
167. Hessle L, *et al.* (2002) Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(14):9445-9449.
168. Hui M, Li SQ, Holmyard D, & Cheng P (1997) Stable transfection of nonosteogenic cell lines with tissue nonspecific alkaline phosphatase enhances mineral deposition both in the presence and absence of beta-glycerophosphate: possible role for alkaline phosphatase in pathological mineralization. *Calcif Tissue Int* 60(5):467-472.
169. Sheen CR, *et al.* (2015) Pathophysiological role of vascular smooth muscle alkaline phosphatase in medial artery calcification. *J Bone Miner Res* 30(5):824-836.
170. Becs G, *et al.* (2016) Pharmacological induction of ferritin prevents osteoblastic transformation of smooth muscle cells. *J Cell Mol Med* 20(2):217-230.
171. Donnelly CA, *et al.* (1995) Some blood plasma constituents correlate with human cataract. *Br J Ophthalmol* 79(11):1036-1041.
172. Lian JB, Boivin G, Patterson-Allen P, Grynblas M, & Walzer C (1983) Calcergy and calciphylaxis: timed appearance of gamma-carboxyglutamic acid and osteocalcin in mineral deposits. *Calcif Tissue Int* 35(4-5):555-561.
173. Severson AR, Ingram RT, & Fitzpatrick LA (1995) Matrix proteins associated with bone calcification are present in human vascular smooth muscle cells grown in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 31(11):853-857.

14. Publikációs lista



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

Nyilvántartási szám: DEENK/79/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Balogh Enikő
Neptun kód: G2J99Q
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Balogh, E.**, Tolnai, E., Nagy, B. J., Nagy, B., Balla, G., Balla, J., Jeney, V.: Iron overload inhibits osteogenic commitment and differentiation of mesenchymal stem cells via the induction of ferritin.
Biochim. Biophys. Acta-Mol. Basis Dis. 1862 (9), 1640-1649, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.06.003>
IF: 5.476
2. **Balogh, E.**, Tóth, A., Tolnai, E., Bodó, T., Bányai, E., Szabó, D. J., Petrovski, G., Jeney, V.: Osteogenic differentiation of human lens epithelial cells might contribute to lens calcification.
Biochim. Biophys. Acta-Mol. Basis Dis. 1862, 1724-1731, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.06.012>
IF: 5.476

További közlemények

3. Potor, L., Nagy, P., Méhes, G., Hendrik, Z., Jeney, V., Pethő, D., Vasas, A., Pálkás, Z., **Balogh, E.**, Gyetvai, Á., Whiteman, M., Torregrossa, R., Wood, M. E., Olvasztó, S., Nagy, P., Balla, G., Balla, J.: Hydrogen Sulfide Abrogates Hemoglobin-Lipid Interaction In Atherosclerotic Lesion.
Oxidative Med. Cell. Longev. 2018, 1-16, 2018.
IF: 4.593 (2016)
4. Erdei, J., Tóth, A., **Balogh, E.**, Nyakundi, B. B., Bányai, E., Ryffel, B., Paragh, G., Cordero, M. D., Jeney, V.: Induction Of NLRP3 Inflammasome Activation By Heme In Human Endothelial Cells.
Oxidative Med. Cell. Longev. 2018, 1-14, 2018.
IF: 4.593 (2016)





5. **Balogh, E.**, Nagy, B. J., Gyetvai, Á., Bene, Z., Hendrik, Z., Jeney, V., Nagy, P., Papp, Á., Balla, J., Balla, G., Kappelmayer, J., Nagy, B.: Impaired Immunosuppressive Effect of Bronchoalveolar Mesenchymal Stem Cells in Hypersensitivity Pneumonitis: preliminary findings.
Cytom. Part B-Clin. Cytom. [Epub ahead of print], 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.b.21490>
IF: 2.474
6. Becs, G., Zarjou, A., Agarwal, A., Sikura, K. É., Becs, Á., Nyitrai, M., **Balogh, E.**, Bányai, E., Eaton, J. W., Arosio, P., Poli, M., Jeney, V., Balla, J., Balla, G.: Pharmacological induction of ferritin prevents osteoblastic transformation of smooth muscle cells.
J. Cell. Mol. Med. 20 (2), 217-230, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jcmm.12682>
IF: 4.499
7. Bányai, E., **Balogh, E.**, Fagyas, M., Arosio, P., Hendrik, Z., Király, G., Szemán-Nagy, G., Tanczos, B., Pócsi, I., Balla, G., Balla, J., Bánfalvi, G., Jeney, V.: Novel functional changes during podocyte differentiation: increase of oxidative resistance and H-ferritin expression.
Oxid. Med. Cell. Longev. 2014, 1-10, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/976394>
IF: 3.516
8. Ruzsnavszky, O., Dienes, B., Oláh, T., Vincze, J., Gáll, T., **Balogh, E.**, Szemán-Nagy, G., Bátor, R., Lontay, B., Erdődi, F., Csernoch, L.: Differential Effects of Phosphatase Inhibitors on the Calcium Homeostasis and Migration of HaCaT Keratinocytes.
PLoS One. 8 (4), e61507, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0061507>
IF: 3.534
9. Horváth, E., Szemán-Nagy, G., Turáni, M., **Balogh, E.**, Papp, G., Pollák, E., Pócsi, I., Pesti, M., Bánfalvi, G.: Effect of the fungal mycotoxin patulin on the chromatin structure of fission yeast.
J. Basic Microbiol. 52 (6), 642-652, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.201100515>
IF: 1.198

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 35,359

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 10,952

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

Debrecen, 2018.03.26.



15. Tárgyszavak

humán mesenchymális őssejtek, oszteogenikus differenciáció, vas, ferritin, RUNX2, humán lencse epithél sejtek, kalcifikáció, katarakta,

human mesenchymal stem cells, osteogenic differentiation, iron, ferritin, RUNX2, human lens epithelial cells, calcification, cataract

16. Függelék
