

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

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

Gecző-Lente Gréta

Témavezető: Dr. Jeney Viktória



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2026

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	4
2. Bevezetés.....	7
3. Irodalmi áttekintés	8
3.1. Ektópiás kalcifikáció	8
3.2. Krónikus vesebetegség és szövődményei	10
3.3. Az érfali simaizomsejtek oszteokondrogén irányú fenotípus váltásának induktorai és inhibitorai.....	12
3.4. Az érfali simaizomsejtek oszteokondrogén differenciálódásának hátterében álló jelentősebb molekuláris mechanizmusok	14
3.4.1. Az ER stressz.....	15
3.4.2. Hipoxia és a HIF útvonal aktivációja.....	17
3.5. <i>In vitro</i> , <i>ex vivo</i> és <i>in vivo</i> modellek a kalcifikáció vizsgálatára	20
3.6. A vaszkuláris kalcifikáció detektálási módszerei.....	22
3.6.1. Az OsteoSense festék	23
4. Célkitűzés	25
5. Anyagok és módszerek	26
5.1. Anyagok.....	26
5.2. Sejttenyésztés	26
5.3. A HAoSMC kalcifikációjának indukálása	26
5.4. Alizarin vörös festés és mérés.....	26
5.5. Oszteokalcinszint meghatározása	26
5.6. Az extracelluláris mátrix kalciumtartalmának meghatározása	27
5.7. Western blot.....	27
5.8. A CKD indukciója C57BL/6 egerekben adenint és foszfátot tartalmazó diétával.....	28
5.9. A kalcifikáció detektálása OsteoSense festékkel	28
5.10. Laboratóriumi értékek meghatározása	29
5.11. Hisztológia.....	29
5.12. Kvantitatív valós idejű PCR	29
5.13. Statisztikai analízis	30
6. Eredmények	31
6.1. OsteoSense festés alkalmazása lágyszöveti kalcifikáció detektálására CKD egérmodellben.....	31

6.1.1.	Az adenin és magas foszfáttartalmú diéta vesebetegséget idéz elő C57BL/6 egerekben	31
6.1.2.	Az aorta kalcifikációjának kimutatása OsteoSense festéssel CKD egerekben	32
6.1.3.	A vese kalcifikációjának kimutatása CKD egerekben	33
6.1.4.	Az oszteokondrogén markerek expressziója fokozódik CKD egerek aortájában és veséjében.....	34
6.1.5.	Szív, tüdő és májkalcifikáció kimutatása CKD egerekben	34
6.1.6.	Az oszteogén markerek mRNS szintje emelkedett a CKD egerek szívében, tüdejében és májában.....	36
6.1.7.	Az agy, a szem és a lép nem érintett a CKD-indukált lágyszöveti kalcifikációban	36
6.2.	A DPD kalcifikációra kifejtett hatásának vizsgálata <i>in vivo</i> CKD egérmodellben és <i>in vitro</i> humán érfali VSMC-ken	38
6.2.1.	A DPD aktiválja a HIF-1 útvonalat és ER stresszt indukál C57BL/6 egerekben ..	38
6.2.2.	A DPD fokozza a lágyszöveti kalcifikációt CKD egerekben	40
6.2.3.	A DPD ER stresszt indukál, valamint elősegíti a HAoSMC-k Pi- indukált kalcifikációját.....	41
6.2.4.	A DPD ATF4-függő módon fokozza a simaizomsejtek kalcifikációját.....	42
7.	Diszkusszió	44
8.	Konklúziók.....	47
9.	Összefoglalás	49
10.	Summary	50
11.	Köszönetnyilvánítás.....	51
12.	Irodalomjegyzék	52
13.	Publikációs lista	61
14.	Tárgyszavak	63
15.	Függelék	64

1. Rövidítések jegyzéke

AGE: előrehaladott glikációs végtermék

ALP: alkalikus foszfatáz

ARS: Alizarin Red S

ATF4: Aktiváló transzkripció faktor 4

ATF6: Aktiváló transzkripció faktor 6

ATP/UTP: adenzin-trifoszfát/uridin-trifoszfát

BMP-2: csont morfogenetikus fehérje 2

BMP-4: csont morfogenetikus fehérje 4

BMP-6: csont morfogenetikus fehérje 6

Ca: kalcium

CaP: Kalcium-foszfát

cAMP: ciklikus adenzin-monofoszfát

CHOP: ER stresszhez kapcsolódó apoptotikus faktor

CKD: krónikus vesebetegség

CKD+DPD: Krónikus vesebetegség + Daprodustat kezelés

CO₂: Szén-dioxid

CTRL: Kontroll (kezeletlen) csoport

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: dimetil-szulfoxid

DPD: Daprodustat

ECM: extracelluláris mátrix

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

ELISA: enzim kapcsolt immunoszorbens assay

eNOS: endoteliális NO-szintáz

EPO: eritropoietin

ER: Endoplazmatikus retikulum

Ero1: az ER oxidoreduktin-1

ERS: Endoplazmatikus retikulum stressz

ERAD: ER-asszociált degradációban

FBS: főtális borjú szérum

FGF23: fibroblaszt növekedési faktor 23

FIH-1: Factor Inhibiting HIF

FMT: Fluorescence Molecular Tomography – fluoreszcencia molekuláris tomográfia

Gpx: glutation-peroxidáz

H&E: Hematoxilin és eozin festés

H₂O₂: hidrogén-peroxid

HAoSMC: Human Aortic Smooth Muscle Cell – humán aorta simaizomsejt

HIF: Hypoxia-Inducible Factor – hipoxia-indukált faktor

HIF-1 α : hipoxia-indukált faktor 1 alfa

HPRT: hipoxantin-guanin-foszforibozil-transzferáz

IVIS: In vivo imaging system

IRE1: Inozitol-függő enzim 1

MGP: mátrix Gla protein

MSX2: Msh homeobox 2

Nox: NADPH-oxidáz

OCN: oszteokalcin

oxLDL: Oxidált alacsony sűrűségű lipoprotein

PBS: foszfáttal pufferolt sóoldat

PHD: prolil-hidroxiláz

PHI: Prolil-hidroxiláz inhibitor

Pi: inorganikus foszfát

PPi: Pirofoszfát

Prdx: peroxiredoxin

PTH: mellékpajzsmirigyhormon

ROS: reaktív oxigén gyök

Runx2: runt-related transzkripció faktor 2

SDS: nátrium-dodecyl-szulfát

SOD: szuperoxid-diszmutáz

Sox9: Sry-boksz transzkripció faktor 9

TGF- β : transformáló növekedési faktor beta

UPR: Unfolded Protein Response – hibás fehérjefeltekeredésre adott válasz

VEGF: vaszkuláris endotéliális növekedési faktor

VHL: von Hippel-Lindau

VKS: von Kossa-festés

VSMC: vaszkuláris simaizomsejt

XPB1: X-box binding protein transzkripciósfaktort

2. Bevezetés

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

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

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

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

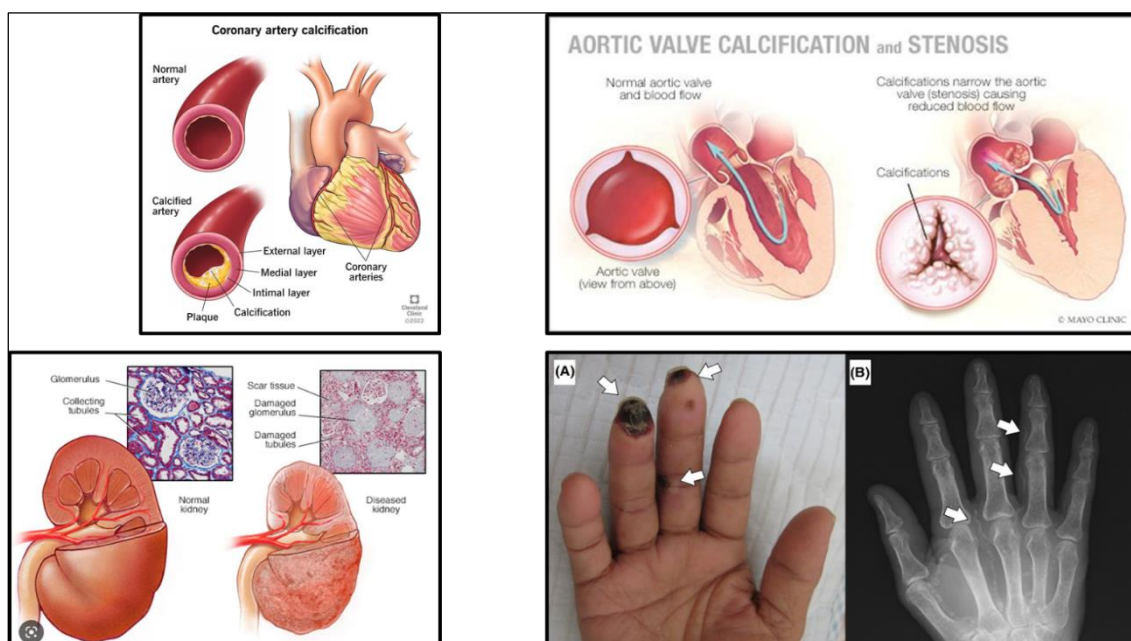
Munkám során a csontosodási folyamatok tanulmányozására kifejlesztett hidroxiapatit-specifikus OsteoSense festék alkalmazhatóságát vizsgáltam lágyszöveti kalcifikáció kimutatására adeninnel indukált CKD modellben C57BL/6 egértörzsben. Továbbá vizsgáltam az adenin-indukált CKD egérmodellt, valamint *in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

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Ektópiás kalcifikáció

Ektópiás kalcifikáció alatt kalcium-sók rendellenes lerakódását értjük különböző lágy szövetekben. Ez két fő módon alakulhat ki: disztrófiás kalcifikáció esetén a szövet károsodása vezet a kalcifikációhoz, míg a metasztatikus kalcifikáció hátterében szisztémás eltérés, mint például magas kalciumszint vagy vesebetegség áll.

Régen a lágy szöveti vagy ektópiás kalcifikációt passzív folyamatnak tekintették, de mára jelentős kutatási eredmények bizonyították, hogy aktív, különböző sejtek által szabályozott folyamat, amelyben szerepet játszik számos jelátviteli útvonal aktiválódása, a kalcifikációs induktorok és inhibitorok egyensúlyának felborulása, valamint genetikai tényezők is (1,2). Az ektópiás kalcifikáció legismertebb megjelenési formái a vaszkuláris kalcifikáció, a szívbillentyű- és vesekalcifikáció, valamint a kalcifilaxis (1. ábra).



1. ábra Az ektópiás kalcifikáció fő megjelenési formái. Aorta-, billentyű-, vesekalcifikáció és kalcifilaxis. Az ektópiás kalcifikáció során csontszerű anyag rakódik le a lágy szövetekben. Leggyakoribb a hidroxipatit felhalmozódása. Az ektópiás kalcifikáció fokozottan jelenik meg a krónikus veselégtelenségben, valamint típusai kifejezettebbek krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegekben.

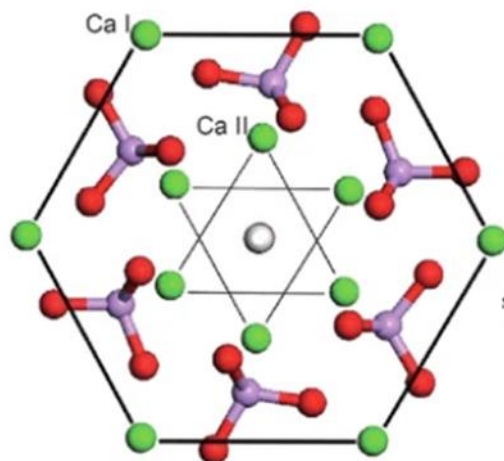
A vaszkuláris kalcifikáció az ektópiás kalcifikáció leggyakoribb formája, melynek során a kalciumsók, elsősorban a kalcium- és foszfáttartalmú hidroxipatit az érfalban rakódnak le. A kalcifikáció értinheti a tunica intimát, az ér legbelsőbb rétegét, valamint a tunica mediát, ennek

megfelelően megkülönböztetünk intima- illetve média kalcifikációt (3). Az intima kalcifikáció a közepes méretű artériákban, ateroszklerotikus plakkokkal asszociáltan, pontszerűen, míg a média kalcifikáció az erek teljes keresztmetszetében jelenik meg. A média kalcifikáció leggyakrabban a CKD-ban szenvedő, illetve a 2-es típusú diabéteszes betegeket érinti.

A szívbillentyű-kalcifikáció aortabillentyű szűkületet okoz, ami az egyik leggyakoribb szívbillentyű betegség a fejlett országokban. A szívbillentyű-kalcifikáció is aktív, a billentyű intersticiális sejtek részvételével zajló szabályozott folyamat, ami kezdetben az intima majd a média kalcifikációval mutat hasonlóságot.

A kardiovaszkuláris rendszer kalcifikációja mellett gyakran megfigyelhető a vese kalcifikációja, amely érintheti a vesekéreg vagy a velőállomány területét. Két fő formája ismert: a nefrokalcinózis, amikor diffúz kalciumlerakódás figyelhető meg a parenchymában, és a nephrolithiasis, amikor jól körülhatárolt kőképződés történik a gyűjtőrendszerben. A vese kalcifikáció hátterében leggyakrabban anyagcserezavarok állnak, például hiperkalcémia, hiperfoszfatémia, vesetubuláris acidózis vagy CKD. A lerakódások rontják a vesefunkciót, elősegítik a gyulladást és fibrózist, így hosszú távon hozzájárulhatnak a progresszív vesekárosodáshoz, különösen előrehaladott CKD betegeknél.

A kalcifilaxis, másnéven kalcifikáló urémiás arteriolopathia egy ritka, súlyos állapot, amelyet a kis és közepes méretű arteriolák falának kalcifikációja, intimális proliferációja és trombózisa jellemez. Leggyakrabban végstádiumú vesebetegségben fordul elő, de a nem urémiás formája is ismert. A folyamat következtében a bőr és a zsírszövet iszkémiája és nekrozisa alakul ki, amely fájdalmas, nehezen gyógyuló fekélyek megjelenéséhez vezet, elsősorban az alsó végtagokon vagy a törzsön. A kalcifilaxis pathomechanizmusa összetett, szerepet játszhat benne a kalcium- és foszfátanyagcsere-zavar, magas parathyorid hormonszint, K-vitamin-hiány, valamint gyulladásos és prokoaguláns állapotok. A kalcifilaxis prognózisa rossz, a halálozás gyakran szepsis vagy szöveti nekrosis következménye.



2. ábra A hidroxiapatit modellje. A hidroxiapatit az érlelmeszesedés során kialakuló érfali meszesedés egyik fő ásványi komponense, amely hozzájárul az artériák merevségének fokozódásához. Felhalmozódása az érfalban a plakkok stabilitását és szerkezetét is befolyásolja, ezáltal szerepet játszik a betegség előrehaladásában és szövődményeiben.

3.2. Krónikus vesebetegség és szövődményei

A CKD a vesefunkció tartós, progresszív csökkenését jelenti, amelynek végstádiumában veseátültetés vagy rendszeres szervpótló dialízis kezelés szükséges (4). Leggyakoribb kiváltó okai közé tartozik a diabétesz mellitusz, különösen a 2-es típusú, amely világszerte a CKD vezető etiológiai tényezője, valamint a hipertónia, amely az érfal károsítása és glomeruluszűrés romlása révén járul hozzá a vesefunkció csökkenéséhez. Emellett glomeruláris betegségek (pl. glomerulonephritis), policisztás vesebetegség, valamint krónikus gyulladásos és autoimmun állapotok is szerepet játszanak a CKD kialakulásában.

Epidemiológiai szempontból a CKD világszerte növekvő egészségügyi kihívást jelent. Becslések szerint a felnőtt populáció 8–16%-át érinti valamilyen stádiumú CKD, és a prevalencia a kor előrehaladtával, a diabétesz és hipertónia elterjedtségével párhuzamosan nő. A CKD korai szakaszában gyakran tünetmentes, ezért a diagnózis sokszor későn történik, amikor már jelentős szervi károsodás alakult ki, ami fokozza a kardiovaszkuláris és mortalitási kockázatot (5).

A CKD nemcsak a vesék filtrációs kapacitását érinti, hanem számos szisztémás szövődményt is okoz. A kiemelkedő társbetegségek közé tartozik az anémia, mely multifaktoriális eredetű. Legfőbb oka az eritropoetin (EPO) vesében történő csökkent termelődése, de hozzájárulhat a vasanyagcsere zavara következtében fellépő vashiány, a

krónikus gyulladás, a vörösvérsejtek lerövidült élettartama, valamint a folsav- és B12-vitaminhiány is (6). Az anémia kezelést igényel, hiszen jelentősen rontja a betegek életminőségét, valamint fokozza a kardiovaszkuláris kockázatot. A kezelés alapját a vaspótlás (orális vagy parenterális) és rekombináns EPO-készítmények vagy ezek alternatívájaként hematopoetikus stimuláló szerek (ESA, erythropoiesis-stimulating agents) adják. Az utóbbi években új terápiás lehetőségként jelentek meg a hipoxia-indukálta faktor (HIF) útvonalat szabályozó prolil-hidroxiláz inhibitorok (PHI). Ezen HIF-PHI-k a HIF útvonal aktivációján keresztül serkentik a szervezet saját eritropoetin-termelését és fokozzák az eritropoézist valamint javítják a vasfelhasználást, és szájon át is adhatók (7). A HIF-PHI gyógyszerek legfontosabb képviselői a Roxadustat, a Daprodustat, a Vadadustat, az Enarodustat, a Desidustat, a Molidustat és a Vadadustat, mely gyógyszerek különböző országokban és régiókban eltérő engedélyezési státusszal rendelkeznek. A HIF-PHI-k közül elsőként a Daprodustat használatát engedélyezték Japánban 2020-ban, majd az Egyesült Államokban 2023-ban, CKD-hoz társult anémia kezelésére.

A CKD másik jelentős társbetegsége az ásványianyag- és csontbetegség(CKD-MBD), másnéven veseoszteodisztrófia (8). A CKD-MBD-t szisztémás rendellenesség, amely több szervet és szervrendszert érint, és a szív- és érrendszeri betegségek, a csonttörések és egyéb szövődmények miatti fokozott halálozási kockázattal jár (9). A CKD-MBD a CKD korai szakaszában alakul ki, ezért rendkívül fontos a CKD-MBD korai stádiumban történő kimutatása, mely lehetséges a CKD-MBD szérum markereinek monitorozásával (10).

A CKD-MBD korai fázisában a vesefunkció mérsékelt csökkenése már finom, de biológiailag jelentős változásokat indít el a kalcium-foszfor-hormon tengelyben. A csökkent foszfátkiválasztás következtében nő a szervezet foszforterhelése, amely kompenzatórikusan fokozza a fibroblaszt növekedési faktor 23 (FGF23) és a parathormon (PTH) szekrécióját. Az emelkedett FGF23 gátolja az 1α -hidroxiláz aktivitását, ezáltal csökken a kalcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) termelés, ami mérsékli a bélrendszeri kalciumfelszívódást (11).

A kialakuló hipokalcémia és hiperfoszfatémia stimulálja a mellékpajzsmirigyet, így megindul a másodlagos hyperparathyreosis. Ebben a szakaszban a csontelváltozások és az érkalifikáció még többnyire nem észlelhetők, azonban a prokalkifikációs jelátviteli utak már aktiválódhatnak, előkészítve a későbbi struktúrális eltérések kialakulását.

A CKD-MBD második szakaszában jelentkezik a kardiovaszkuláris rendszer kalifikációja, melynek során kalcium-és foszfát kristályok rakódnak le az érfalban és a szívbillentyűkben (12),(13). A CKD-MBD harmadik szakaszában a csontanyagcsere rendellenességei

csonttörésként manifesztálódnak (14),(15). Az urémiás másodlagos hiperparatireózis, amelyet a magas keringő PTH koncentráció és a mellékpajzsmirigy-hiperplázia jellemez a krónikus vesebetegségben, fokozott csontátépülést idéz elő, amely szintén csonttöréshez vezet (16). Jelenleg a CKD-MBD megelőzésére szolgáló terápiás lehetőségek nagyon korlátozottak; céljuk a kalcium-, foszfor-, PTH- és D-vitamin-anyagcsere egyensúlyának helyreállítása.

3.3. Az érfali simaizomsejtek oszteokondrogén irányú fenotípus váltásának induktorai és inhibitorai

A kalcifikáció celluláris mechanizmusa többféle biológiai folyamatot foglal magába. A kalcifikáció lehet fiziológiás például a csontképződés, vagy patológiás folyamat, mely kategóriába soroljuk az érfali-, és billentyűkalcifikációt, valamint a meszes gócok kialakulását daganatokban.

A szérum, illetve a lokális kalcium- és foszfát-ion koncentrációk megnövekedése jelentős szerepet tölt be a lágyszöveti kalcifikációban, ugyanis ha a $[Ca^{2+}] \times [PO_4^{3-}]$ szorzat meghalad egy küszöböt, akkor kalcium-foszfát kristályok kicsapódása indul meg. Ez bekövetkezhet vesebetegségben (hiperfoszfatémia), hiperparatireózisban (fokozott kalciumfelszabadulás a csontokból), valamint D-vitamin túladagolás esetén is (17).

A vaszkuláris simaizomsejtek (VSMC-k) oszteokondrogén transzdifferentiálódása a vaszkuláris kalcifikáció sejtszintű alapmechanizmusa, egy aktívan szabályozott folyamat, amely hasonlít a csontképződéshez, és a kalcifikációt előidéző induktorok és inhibitorok közötti egyensúly felborulásának következménye (3. ábra) (18).

Az oszteokondrogén differentiálódás egyik legerősebb és egyben leginkább kutatott induktora a megemelkedett szervetlen foszfát (Pi), amelyet a CKD betegekben kialakuló média kalcifikáció legfontosabb patofiziológiai kiváltó tényezőjének tartanak (19), (20), (21). A megnövekedett extracelluláris kalciumszint (Ca) szinergista hatást fejt ki a Pi által kiváltott kalcifikációval, és egy friss tanulmány kimutatta, hogy a táplálékkal bevitt kalcium mennyisége összefügg az érfali kalcifikációval és az artériás merevséggel (22).

A Pi és Ca mellett több egyéb induktort is azonosítottak, amelyek előidézhetik a VSMC-k fenotípusváltását. A csont morfogenetikus fehérjék (BMP-k), a transzformáló növekedési faktor beta (TGF- β) család tagjai, amelyek sokoldalú szabályozó szerepet töltenek be a fejlődésben és a szöveti homeosztázisban és eredetileg a csontregeneráció induktoraiként jellemezték őket (23). Ezek közül a BMP-2, BMP-4 és BMP-6 jelenlétét kimutatták kalcifikált ateroszklerotikus léziókban, és feltételezik, hogy szerepet játszanak a kalcifikáció

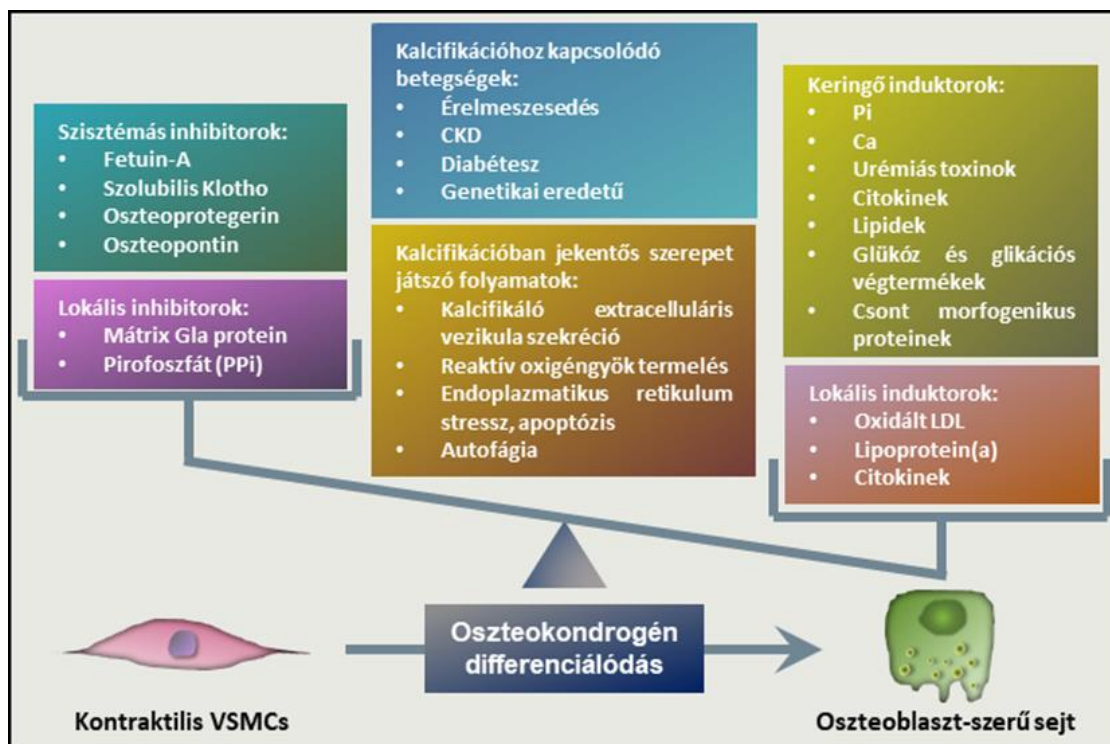
folyamatában (24). A BMP-2-ről kimutatták, hogy a Pi felvételének fokozásán keresztül vesz részt a VSMC-k fenotípus váltásában és kalcifikációjában (25).

A CKD-n kívül a média kalcifikáció diabéteszes betegekben is gyakori, és független prediktora a szív-érrendszeri eredetű halálozásnak (26). Ennek hátterében a magas glükóz illetve az előrehaladott glikációs végtermékek (AGE-k) kalcifikációt fokozó hatása áll (27). A szteroid-szerű molekulák, például a dexametazon, az ösztadiol és a D3-vitamin szintén szerepet játszanak az érfali kalcifikáció indukciójában. Az inflammáció általánosságban kapcsolatban áll az érfali kalcifikációval, és több gyulladásos citokin (például a TNF- α , oncostatin M, IL-1 β , és IL-6) szerepét is igazolták a folyamatban (28),(29,30).

A szisztémás hatások mellett helyi tényezők is hozzájárulhatnak a kalcifikációhoz. Például az oxidált alacsony sűrűségű lipoprotein (oxLDL), amely az ateroszklerotikus léziókban felhalmozódik, hozzájárul az intima kalcifikációhoz (31),(32). Ezen túlmenően újabb vizsgálatok kimutatták, hogy a hipoxia – vagyis az alacsony oxigénszint egy adott szövetben – előidézi a VSMC-k oszteokondrogén transzdifferentiálódását, és felgyorsítja a Pi által kiváltott kalcifikációt (33).

A pro-kalcifikációs hatásokat számos kalcifikációs inhibitor ellensúlyozza, melyek aktivitása normál körülmények között megvédi a lágyrészeket a kalcifikációtól. A kalcifikációs inhibitorok egyik csoportját az extracelluláris Ca-szabályozó fehérjék, például a mátrix Gla-fehérje (MGP) és a fetuin-A alkotja (34),(35). Egy másik inhibitorcsoportba tartozik a pirofoszfát (PPi) és különböző extracelluláris nukleotidok, mint például az ATP és az uridin-trifoszfát (UTP), amelyek az ekto-nukleotid-pirofoszfátáz/foszfodiészteráz enzimatis hasításával PPi forrásként szolgálnak (36). Ezen kívül bizonyos kationok, például a magnézium és a vas, szintén gátolják az érfali kalcifikációt (37),(38). Krónikus vesebetegségben ezeknek

az inhibitoroknak a szintje gyakran csökken, miközben az induktoroké megnő, ami az érfali meszesedés irányába tolja el az egyensúlyt.



3. ábra A vaszkuláris kalcifikáció mechanizmusa, induktorok és inhibitorok. A kalcifikáció inhibitorai és induktorai közötti egyensúly felborulása kulcsfontosságú az érrendszeri kalcifikáció patológiájában. Amennyiben az inhibitorok nem gátolják, a keringő és helyi kalcifikációs induktorok előidézik a VSMC-k oszteokondrogén differenciálódási folyamatát, melynek során a simaizomsejtek elveszítik kontraktilis fenotípusukat és oszteoblaszt-szerű sejtekké alakulnak át. Az érrendszeri kalcifikációban számos mechanizmust azonosítottak, mint például a gyulladás, a reaktív oxigénfajok (ROS) termelésének fokozódása, az apoptózis, a mátrixvezikula felszabadulása és az endoplazmatikus retikulum (ER) stressz.

(Tóth A, Balogh E, Jeney V. Regulation of Vascular Calcification by Reactive Oxygen Species. Antioxidants (Basel). 2020 Oct 8;9(10):963.)

3.4. Az érfali simaizomsejtek oszteokondrogén differenciálódásának hátterében álló jelentősebb molekuláris mechanizmusok

Az érfali simaizomsejtek oszteokondrogén irányú differenciálódása során a VSMC-k elveszítik kontraktilis fenotípusukat, és oszteoblaszt- vagy kondrocitaszerű sejté alakulnak át. A kalcifikáció mechanizmusának tanulmányozása során számos olyan molekuláris útvonalat azonosítottak, melyek döntő módon befolyásolják ezt a folyamatot (39). Ezek közül, disszertációm irodalmi áttekintésében csak az endoplazmatikus retikulum (ER) stressz és a hipoxia-indukált faktor (HIF) útvonalak bemutatására szorítkozom, melyek kapcsolódnak az általam végzett és a disszertációban bemutatott munkához.

3.4.1. Az ER stressz

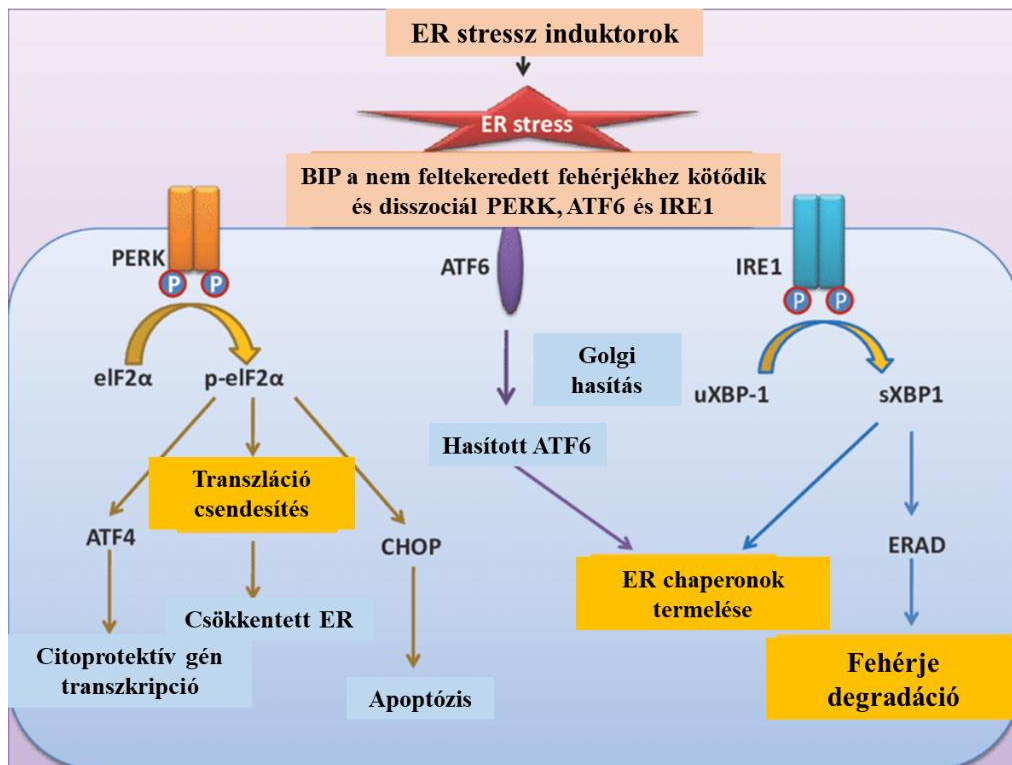
Az ER a szekréciós útvonal első organelluma, ahol a kiválasztott és a membránfehérjék hajtogatása, poszttranszlációs módosítása és összeszerelése történik (40). Az ER működésének zavara ER stresszt okoz, amelyet a hibásan hajtogatott fehérjék felhalmozódása jellemez az ER-ban. Az ER stressz és a fehérjetoxicitás káros hatásainak ellensúlyozására a sejtek védekező mechanizmust fejlesztettek ki, amelyet hibás fehérjefeltekeredésre adott válasznak (unfolded protein response, UPR) nevezünk (41). Az UPR egy összehangolt, bonyolult túlélési válasz, amelynek célja a hibásan hajtogatott fehérjék felhalmozódásának csökkentése és a normális ER-funkció helyreállítása (41).

Azonban ha az ER stressz tartósan fennmarad, vagy az adaptív válasz sikertelen, akkor egy terminális UPR program aktiválódik, amely apoptotikus sejthalálhoz vezet. Genetikai mutációk, környezeti tényezők és az öregedés mind kiválthatják a krónikus ER stresszt és az UPR hibás működését, amelyek fontos szereplőként jelennek meg több betegség, például a cukorbetegség, gyulladás, daganatok, neurodegeneratív és kardiovaszkuláris betegségek patomechanizmusában (42).

A hibásan hajtogatott fehérjék fokozott mennyiségét az ER-ban három transzmembrán receptor érzékeli: a PERK (protein kináz R (PKR)-szerű ER kináz), az ATF6 (aktiváló transzkripció faktor 6) és IRE1 (inozitol-függő enzim 1), amelyek az UPR három ágát alkotják (43). A szenzorokat a BiP/GRP78/Hspa5 chaperon tartja inaktív állapotban. A hibásan hajtogatott fehérjék ER-ban való felhalmozódása esetén a BiP molekulák a szenzorokról disszociálódnak, és aktiválódnak az UPR jelátviteli mechanizmusai (4. ábra).

A PERK aktivációja az eukarióta transzlációs iniciációs faktor 2α (eIF2 α) foszforilációjához vezet, ami általánosságban a fehérjeszintézis blokkolását váltja ki. Ugyanakkor a PERK/eIF2 α aktiváció hatására szelektíven megnő az aktiváló transzkripció faktor 4 (ATF4) expressziója, amely a sejtmagba jutva olyan UPR-célgéneket indukál, többek között a C/EBP homológ proteint (CHOP), amelyek a normál ER-funkció helyreállítását szolgálják (41). Az ATF6 aktiválódását követően az ATF6 a Golgi apparátusba transzlokálódik és hasítódik. Ezt követően az ATF6 N-terminális aktív fragmentje a sejtmagba transzlokálódik, ahol ER chaperonok valamint ER-asszociált degradációban (ERAD) résztvevő gének transzkripcióját indukálja. Az IRE-1 aktiválódását követően az IRE-1 molekulák oligomerizálódnak és autofoszforilálódnak, mely folyamatok eredményeként aktív RNáz-zá válnak. Az IRE1 hasítja az X-box binding protein transzkripció faktort (XBP1) kódoló mRNS-t. A hasított XBP1-ről átírt aktív XBP1 a sejtmagba transzlokálódik, és az ATF6-hoz hasonló

módon ER chaperonok és ERAD gének transzkripcióját fokozza. Tartósan fennálló ER stressz esetén az IRE1 stresszkinázokat, mint például c-Jun N-terminális kináz és p38 mitogén-aktivált protein kináz aktivál és apoptózist indukál.



4. ábra Az ER stressz jelátviteli útvonala. ER stressz hatására aktiválódnak az ER stressz szenzorok, a PERK, az ATF6 és az IRE1. Az aktivált PERK foszforilálja az eIF2 α -t, mely általánosságban transzláció gátlást okoz, ugyanakkor szelektíven fokozza az ATF4 és a CHOP expresszióját. Az ATF6 a Golgi apparátusban hasítódik. Az aktiválódott ATF6 serkenti az ER chaperonok expresszióját. Az ER stressz az IRE1 autofoszforilációját is kiváltja, aktiválva endoribonukleáz aktivitását, ami hasított aktív XBP-1-ek termelődéséhez vezet, ami ER chaperonok és ERAD gének transzkripcióját fokozza. https://www.researchgate.net/figure/ER-stress-signaling-pathway-Upon-induction-of-ER-stress-the-ER-chaperone-BiP-binds-to_fig1_260647260

Az utóbbi években egyre több bizonyíték utal arra, hogy az ER stressz és az UPR aktivációja kulcsszerepet játszik az érrendszeri kalcifikációban, melyben szerepet játszik az, hogy az ER stressz alapvetően befolyásolja a sejtek túlélését, az apoptózist, valamint az oszteogén gének expresszióját is befolyásolja. Az ATF4 aktiválódása fokozza az érfali simaizomsejtekben a csontképző gének, mint például a Runx2 és az osterix expresszióját (44). Emellett az ATF4 részt vesz az anyagcsere-folyamatok átalakításában is, például a foszfát- és kalciumanyagcserében, foszfátranzsporterek és egyes kalciumkötő fehérjék expressziójának fokozásán keresztül (45).

Vaszkuláris kalcifikáció szempontjából az ER három szenzora illetve ága közül kiemelkedő fontosságúnak bizonyult a PERK/eIF2 α /ATF4 útvonala (46). Duan és munkatársai kimutatták,

hogy a nikotin- és D-vitamin-indukált érfali kalcifikáció a patkányok aortájában az ER stressz markereinek (Grp78 és Grp94) fokozott expressziójával társult (47). Emellett az ER stressz által kiváltott apoptózis markerei, mint a CHOP és a kaszpáz-12, szintén megemelkedtek, ami azt sugallja, hogy az UPR terminális programja aktiválódott a meszesedő aortában. Későbbi tanulmányok az ATF4 kritikus szerepét igazolták az ER stressz által kiváltott VSMC oszteokondrogén differenciálódás közvetítésében (48) (49). Az ATF4 túlzott expressziója fokozza, míg gátlása csökkenti az érfali simaizomsejtek kalcifikációját. Az ATF4 célgénjei között azonosították a Runx2-t, az oszteokalcint, valamint az alkalikus foszfatázt.

Az ER stressz tartós fennállása a proteosztázis helyreállításának sikertelensége esetén apoptotikus program aktiválásához vezet. Duan és mtsai azt is kimutatták, hogy az ATF4 nemcsak az oszteogén átprogramozódásban, hanem az ER stressz-mediált apoptózisban is kulcsszerepet játszik (47). Az ATF4 fokozza a CHOP expresszióját, amely a sejthalál irányába tereli a VSMC-eket. Az apoptózis során keletkező apoptotikus testek mineralizációs magként szolgálnak, ezzel tovább erősítve a kalcifikációt.

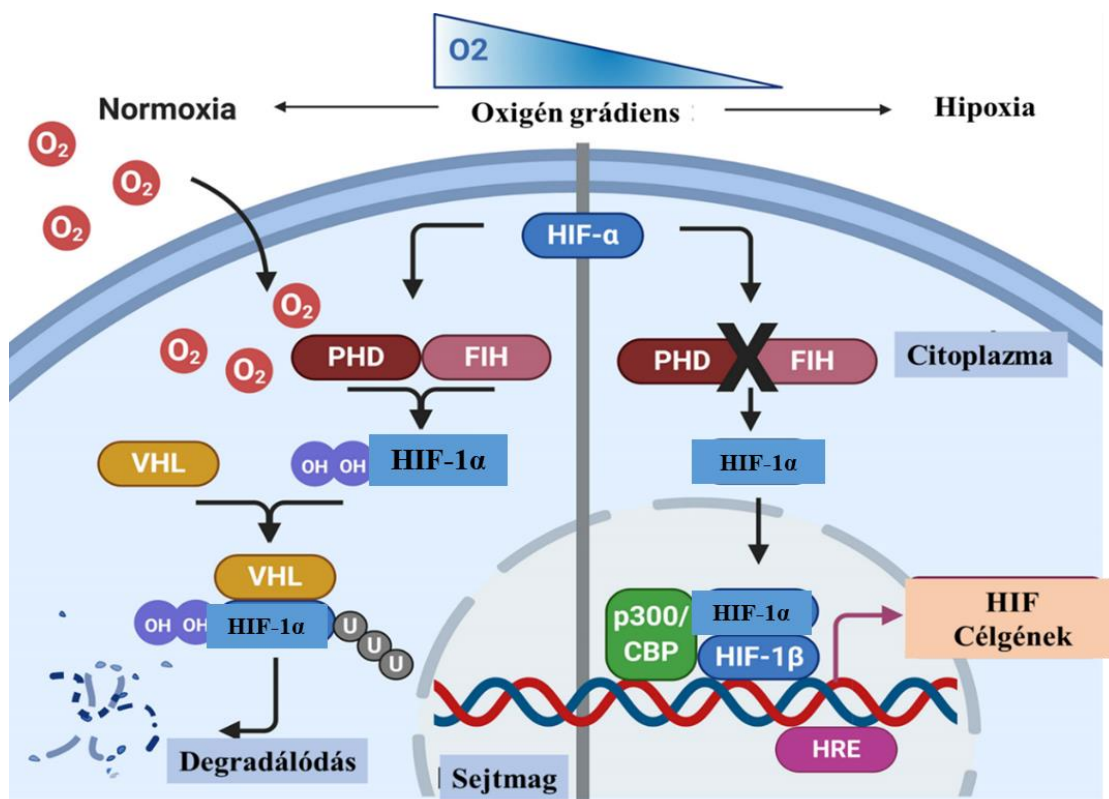
3.4.2. Hipoxia és a HIF útvonal aktivációja

A HIF-1 egy heterodimer transzkripciós faktor, amely egy oxigénérzékeny alfa alegységből (HIF-1 α) és egy stabil béta (HIF-1 β) alegységből áll (50). Normoxia alatt a HIF-1 α folyamatosan szintetizálódik, prolin-hidroxiláz enzimek (PHD-k) közreműködésével két konzervált prolin aminosaván hidroxilálódik majd ubiquitinálódik a von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligáz által és proteasomálisan degradálódik (51).

Hipoxiás körülmények között az oxigénfüggő PHD-k inaktívak, ami a hidroxiláció-ubiquitináció-degradáció elmaradásához és végsősoron a HIF-1 α stabilizálódásához vezet. A citoszólban feldúsult HIF-1 α a sejtmagba transzlokálódik, majd dimerizálódik a sejtmagban konstitutív módon jelenlévő béta alegységgel. A heterodimer a HIF-1 célgénjeiben található hipoxia válaszelemekhez (HRE) kötődik, koaktivátor molekulákat, mint például p300-at és ciklikus adenosin-monofoszfát (cAMP) válaszelem-kötő fehérjét toboroz (5. ábra). A HIF-1 komplex több mint 100 hipoxia-érzékeny célgén transzkripcióját aktiválja, melyek szerepet játszanak a sejt/szövet/szerv túléléséhez a hipoxiás környezetben (51).

A HIF-1 által indukált legjelentősebb adaptációs mechanizmusok magukban foglalják a vérképzés és az angiogenezis fokozódását, és az anyagcsere anaerob irányú eltolódását a

glükózfelvétel és glikolízis fokozódásán és a mitokondriumok oxigénfelhasználásnak csökkentésén keresztül (52) (53).



5. ábra A HIF-1 útvonala. Normoxiában a HIF-1 α alegység prolin-hidroxiláz enzimek (PHD-k) közreműködésével két konzervált prolin aminosaván hidroxilálódik, ubikvitinálódik a von Hippel-Lindau E3 ubikvitin ligáz által majd degradálódik. Hipoxiás környezetben a HIF-1 α alegység hidroxilációja elmarad, az alegység stabilizálódik és a sejtmagba transzlokálódik, ahol heterodimert képez a HIF-1 β alegységgel. Az aktív HIF-1 a hipoxia válaszelemeket tartalmazó gének promóter régióihoz kötődve indukálja a hipoxia által szabályozott gének transzkripcióját.

Az utóbbi 10 év kutatási eredményei arra utalnak, hogy a hipoxia szerepet játszik az érfali kalcifikáció kialakulásában. Hipoxiás epizódokkal járó betegségekben, mint például asztmában, krónikus obstruktív tüdőbetegségben (COPD) és obstruktív alvási apnoében megfigyelhető az aorta kalcium tartalmának emelkedése (54),(55). A hipoxia mindkét, az érfalat érintő kalcifikációtípusban – vagyis a média- és intima kalcifikációban is – jelen van.

A média kalcifikáció jelentősen fokozódik CKD-ben. Ismert, hogy a CKD betegek veséjében hipoxia van, mely gyorsítja a CKD progresszióját a vesefibrózis, a gyulladás és a kóros angiogenesis fokozásán keresztül (56),(57). Újabb eredmények szerint a CKD-hez

társuló hipoxia nem korlátozódik kizárólag a vese szövetére, hanem az érrendszerben is kimutatható (58).

Az intima kalcifikáció fokálisan, ateroszklerotikus plakkokhoz asszociáltan jelenik meg. Az érlemeszesedéses plakk jellemzően hipoxiás terület, különösen, ha az intima megvastagodása ellehetetleníti az oxigén diffúzióját a lumen irányából. A hipoxia jelenlétét az ateroszklerotikus plakkok középső régióiban állatkísérletes modellekben és humán nyaki verőér-léziókban is kimutatták (59,60). A hipoxia hatására neovaszkularizációt – vagyis kapilláris-szerű mikroerecskék benövését figyelték meg a megvastagodott média- és intima-rétegbe –, ami az előrehaladott ateroszklerotikus plakkok jellegzetes vonása (61). Újabb bizonyítékok azonban arra utalnak, hogy a hipoxia és az azt követő neovaszkularizáció már a korai ateroszklerotikus léziókban is megjelenik (62), különösen akkor, ha az intima vastagsága meghaladja az oxigén diffúziós határát (kb. 200–250 μm) (63). Állatkísérletek azt is kimutatták, hogy a hipoxia gyorsítja az érlemeszesedés progresszióját (64,65). A plakk hipoxia kapcsolatban áll a neovaszkularizációval, az anyagcsere-átalakulással, a lipidfelhalmozódás fokozódásával, a gyulladás erősödésével és a fokozott proteolízissel (66),(67).

Számos vizsgálat mutatott ki összefüggést a HIF-1 α szintje és az érfali kalcifikáció között. Például 2-es típusú diabéteszes betegekben a plazma HIF-1 α -szintje és a koszorúér-kalcifikáció mértéke között pozitív korrelációt találtak (68). Egy másik tanulmány kimutatta, hogy a HIF-1 α a meszesedett területekkel együtt lokalizálódik szűkült szívbillentyűkben (69). Ezen kívül kalcifikációt elősegítő faktorokat találtak pulmonális artériás hipertóniában szenvedő betegeknél is (70). Ugyanakkor a tény, hogy a hipoxia és a kalcifikáció együttesen fordul elő, nem feltétlenül jelenti azt, hogy a hipoxia okozati szerepet játszik az érfali meszesedésben.

Ezt a kérdést több friss tanulmány vizsgálta. Ruffenach és munkatársai kimutatták, hogy a pulmonális artériás hipertónia fokozott tüdőartériás kalcifikációval és a Runx2 expressziójának növekedésével jár a betegek tüdejében (70). Emellett *in vitro* kísérletekkel igazolták, hogy a Runx2 tartós expressziója aktiválja a HIF-1 α -t, amely végül a pulmonális simaizomsejtek oszteoblaszt-szerű sejtje történő transzdifferentiálódásához vezet (70). Mokas és munkatársai vizsgálták a hipoxia hatását érfali simaizomsejtek magas foszfáttal (Pi) kiváltott oszteogén differentiálódására és kalcifikációjára (58). Eredményeik szerint a hipoxia jelentősen fokozta a Pi által indukált oszteogén transzdifferentiálódást és kalcifikációt, ami releváns mechanizmus lehet a CKD-ben megfigyelt ásványianyag-egyensúlyzavarhoz társuló kalcifikációban (58). Nemrég kutatócsoportunkban Balogh és munkatársai közvetlen bizonyítékot találtak arra, hogy a hipoxia normál foszfát szintek mellett is kiváltja az érfali simaizomsejtek kalcifikációját (71). A VSMC-k tartós hipoxiának való kitettsége oszteokondrogén átprogramozást eredményez,

amelyet a Runx2 és Sox9 transzkripciós faktorok expressziójának növekedése jellemez (71). Érdekes módon a VSMC-k hosszú távú hipoxiás expozíciója az extracelluláris mátrix mineralizációját is kiváltotta (71).

A hipoxia mellett a HIF-1 aktiválására szolgáló HIF-PHI-k kalcifikációra kifejtett hatását is vizsgálta kutatócsoportunk. Tóth és munkatársai kimutatták, hogy a Daprodustat (DPD) fokozza a VSMC-k magas Pi-tal kiváltott kalcifikációját (72). A DPD kalcifikációt fokozó hatása lecsökkent HIF-1 α illetve HIF-2 α hiányában, és teljesen elmaradt mindkét HIF- α alegység hiányában (72). *In vivo* CKD egérmodellben kimutatták, hogy a DPD korrigálja a CKD-asszociált anémiát, azonban a DPD anémiát korrigáló dózisa fokozza az aorta és a vese kalcifikációját (72).

3.5. *In vitro*, *ex vivo* és *in vivo* modellek a kalcifikáció vizsgálatára

Az *in vitro* kalcifikációs modellek elengedhetetlen eszközök a kalcifikáció molekuláris és sejt szintű mechanizmusainak vizsgálatában. Ezekben a modellekben izolált sejtek (primer sejtek vagy sejt vonalak) kontrollált körülmények között, sejttenyésztő rendszerekben kerülnek vizsgálatra. E modellek segítségével azonosítottak számos indukáló tényezőt (pl. foszfát, kalcium, hipoxia) és inhibitorokat (pl. fetuin-A, mátrix Gla-fehérje, pirofoszfát, magnézium, vas), valamint feltárták a molekuláris mechanizmusokat, például az oszteokondrogén transz differenciálódást a simaizomsejtekben (73),(74),(75). A jelenleg alkalmazott *in vitro* modellek közé tartoznak az érfali simaizomsejtek (VSMC) leggyakrabban emberi vagy állati aortából izolált sejtek, amelyek magas foszfát vagy kalcium hatására kalcifikálódnak (76). A billentyű-intersticiális sejtek (VIC) aortabillentyűkből izolált sejtek, amelyek foszfát, hipoxia vagy gyulladásos stimulus hatására oszteoblaszt-szerű fenotípust vesznek fel (77). Az endotélsejtek (EC) bizonyítottan szerepet játszanak az érfali kalcifikációban az endotél-mezenchimális átmenet révén (78). Az őssejtek (MSC) szintén képesek oszteokondrogén irányba differenciálódni, és modellként szolgálnak a kalcifikáció tanulmányozására (79). A kettős sejttenyésztés (EC–VSMC kokultúra), amely az endothelium és simaizomsejtek közötti kommunikáció patológiás szerepének vizsgálatát teszi lehetővé (80).

A vizsgálatok során a gyakran használt induktorok közé a foszfát, a kalcium, β -glicerofoszfát, a hipoxia és magas glükóz, D-vitamin, dexametazon tartozik. A foszfát fokozza a Runx2 és oszteokalcin expresszióját, miközben csökkenti a simaizom markereket (81). A kalcium növeli a Pi-felvételt, szinergikus kölcsönhatás figyelhető meg a foszfáttal (82). A β -glicerofoszfát foszfátforrásként szolgál, emeli az ALP-aktivitást (83). A hipoxia aktiválja a

HIF1-jelátvitelt és a ROS-termelést, előidézve a simaizomsejtek kalcifikációját. Hasonló hatást vált ki a magas glükóz, D-vitamin, dexametazon, amelyek szintén fokozzák az oszteogén átprogramozódást (84).

Az *ex vivo* szövettenyésztés egy átmeneti modellrendszer az *in vitro* és *in vivo* rendszerek között. Az *ex vivo* szövettenyésztéses modellek számos előnyt kínálnak a kardiovaszkuláris meszesedés kutatásában. Ezek a modellek megőrzik a szöveti szerkezet és a sejtkapcsolatok komplexitását, miközben az *in vitro* sejt kultúrák egyszerű kísérleti kezelhetőségét is többé-kevésbé biztosítják. Így lehetővé teszik, hogy szervszintű folyamatokat vizsgáljunk kontrollált körülmények között. Az ilyen modellekben vad típusú egerekből származó vagy sejtspecifikusan génkiütött egerekből izolált szövetek tanulmányozhatók, ami segíti az új, meszesedésben szerepet játszó gének azonosítását (85). Emellett az örökletes emberi betegségek (például GACI, PXE, HGPS stb.) állatmodelljeiből származó aorták vagy billentyűk *ex vivo* tenyésztése is lehetőséget ad a patomechanizmus mélyebb megértésére. Ugyanakkor hiányoznak belőlük a szisztémás tényezők (pl. hormonok, immunsejtek), így az *in vivo* modellekhez képest korlátozottabbak (86).

Az aorta szervtenyésztés egy széles körben alkalmazott és hatékony módszer az érfal meszesedésének tanulmányozására. Eredetileg Diglio és munkatársai alkalmazták először a patkány aorta-gyűrűk *ex vivo* tenyésztését az új erek növekedésének vizsgálatára (87). Ezt követően Akiyoshi és munkatársai létrehozták a vaszkuláris meszesedés *ex vivo* modelljét, amelyben C57BL/6 egerek thoracalis aortáját izolálták, majd inorganikus foszfáttal stimulálták a kalcifikációt (88). Ez a modell lehetővé teszi, hogy a vérnyomástól és a keringéstől függetlenül vizsgáljuk az érfal meszesedésének sejtes és molekuláris folyamatait.

Az aorta kalcifikáció mellett a szívbillentyű kalcifikációja is vizsgálható *ex vivo* körülmények között. Az első ilyen modellt Watts és munkatársai dolgozták ki. Emberi aorta és pulmonális billentyűket izoláltak a halál beállta után 24 órán belül, majd 48 órán át tenyésztették, hogy felmérjék a szövet életképességét (89). Később kidolgozták a sertés billentyűk szervtenyésztéses modelljét is (90), amelynek nagy előnye, hogy a sertés billentyű anatómiája és szerkezete nagyon hasonló az emberéhez, a minták könnyen beszerezhetők, és alkalmasak a gyógyszeres vagy genetikai beavatkozások hatásainak vizsgálatára. Újabban Chester és munkatársai kifejlesztettek egy olyan modellt, amelyben teljes sertés szívbillentyűket kezeltek lipopoliszachariddal (LPS) és foszfáttal, amivel sikeresen indukálták a meszesedést (91). Ezen kívül szarvasmarha- és juhbillentyű-lemezeket is gyakran használnak az aortasztenózis kutatására (92).

Az aorta illetve billentyű kalcifikáció *in vivo* modellrendszerekben is tanulmányozható. Az intima és média kalcifikáció vizsgálata eltérő modellekben lehetséges. Az intima kalcifikáció modelljei többnyire ateroszklerotikus modellek (apolipoprotein E vagy LDL receptor deficiens egerek zsírdús diétával indukált érlermeszesedése), ezzel szemben a média kalcifikáció tanulmányozására gyakran CKD egérmodelleken történik. A CKD állatmodellek különböző módon prezentálják az emberi betegség aspektusait, például a vesekárosodás mértékét, a glomerulusfunkció romlását, a tubulointersticiális fibrózist, a gyulladást, valamint a társuló szövődményeket, mint például a vaszkuláris kalcifikáció, a hiperfoszfatémia vagy a szekunder hiperparatireózis.

A CKD tanulmányozására számos állatmodellt alkalmaznak. A leggyakoribb modellek közé tartozik az 5/6 nefrektómia, amely során a kísérleti állat vesetömegének nagy részét eltávolítják, így mesterségesen idéznek elő tartós vesekárosodást. Ez a modell jól tükrözi a CKD progresszióját és a hozzá kapcsolódó szövődményeket, például a vaszkuláris kalcifikációt (93). Egy másik fontos modell az adenin-indukált CKD, ahol a táplálékba kevert adenin toxikus hatása révén alakul ki vesekárosodás. Ez a módszer különösen alkalmas a foszfor-anyagcsere zavarainak és az érlermeszesedés vizsgálatára (94). Emellett léteznek genetikailag módosított egerek, amelyekben célzottan lehet vizsgálni bizonyos gének szerepét a CKD kialakulásában és lefolyásában. Végül a diabéteszes modellek, például a streptozotocinnal előidézett cukorbetegség, lehetővé teszik a diabéteszes nefropátia tanulmányozását (95). Ezek az állatmodellek fontos eszközt jelentenek a CKD patomechanizmusának jobb megértéséhez, valamint új terápiás lehetőségek fejlesztéséhez – különösen olyan szövődmények esetén, mint a vaszkuláris kalcifikáció, amely a CKD egyik súlyos következménye.

3.6. A vaszkuláris kalcifikáció detektálási módszerei

A kalcifikáció detektálására számos módszer alkalmazható. A módszerek lehetnek festési eljárások, melyek hisztológiai metszeteken vagy *en face* módon a teljes kiterített aortán alkalmazhatók. A két legelterjedtebb festési mód az alizarin vörös, illetve a von Kossa festés.

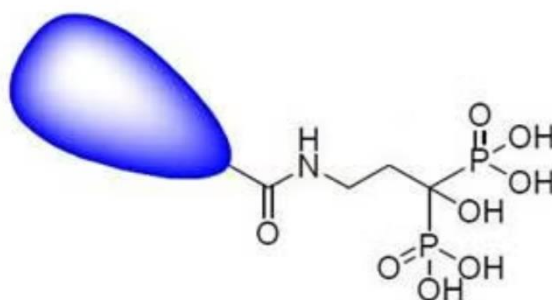
A von Kossa festés egy klasszikus hisztokémiai eljárás, amelyet a szövetekben található ásványi kalcium (főként kalcium-foszfát) kimutatására használnak. Bár gyakran emlegetik kalciumfestésként, valójában a foszfát- vagy karbonát-anionok ezüsttel való kimutatásán alapul (96). Valójában tehát nem a kalciumot, hanem a foszfátot/karbonátot mutatja ki, indirekt módon utalva a kalcifikációra. Az aortakalcifikáció mellett CKD-ben gyakran kialakul patológiás kalcifikáció a szívbillentyűkben, a vese tubulusokban és a perivaszkuláris szövetekben. A von

Kossa festést széles körben használják állatmodellek (pl. patkány, egér) vese-, ér- és csontszöveteiben valamint humán vesebiopsziák vagy post mortem minták elemzésére (97).

Az alizarin vörös festés szintén egy klasszikus hisztokémiai módszer, amelyet a kalciumionok közvetlen kimutatására használnak szövetmintákban vagy sejt kultúrákban. Különösen elterjedt a csontképződés, kalcifikáció, és oszteogén differenciáció vizsgálatára például mesenchymális őssejtek csont irányú differenciációja során. Az alizarin vörös S (ARS) egy anionos azo-festék, amely pH-függő szelektív módon narancs-piros színű kelátkomplexet képez a kalcium ionokkal. A színintenzitás arányos a kalcium mennyiségével, így kvantifikálható is. Az ARS festést széles körben alkalmazzák a tubuláris és vaszkuláris kalcifikáció megjelenítésére, patológias kalcifikáció jelzésére, oszteogén differenciáció vizsgálatára vagy az oszteoblaszt aktivitás és mineralizáció kimutatására is (98).

3.6.1. Az OsteoSense festék

Az elmúlt 10 évben új festékek és festési eljárások is kifejlesztésre kerültek, melyek a modern képalkotó módszerekkel ötvözve alkalmasak lehetnek a lágy szöveti kalcifikáció detektálására. Ebbe a csoportba tartozik az OsteoSense, mely egy fluoreszcensen jelölt biszfoszfónát alapú molekula (6. ábra).



6. ábra Az OsteoSense molekula szerkezete. Az OsteoSense egy flurofórral jelölt biszfoszfónát alapú kalcium-kötő molekula. <https://www.revivity.com/ask/ivisense-osteo-fluorescent-probes>

A festék biszfoszfónát-csoportja nagy affinitással kötődik a csontfelszínhez vagy a frissen mineralizálódó régiókban jelenlévő hidroxipatithoz, vagyis a kalcium-foszfát kristályos formájához. A molekulához kapcsolt fluorofór (pl. VivoTag 750) közeli infravörös tartományban (750 nm) bocsát ki fényt, ami mély szöveti penetrációt és alacsony háttérzajt biztosít (99). Nem radioaktív és nem invazív módszerként alkalmas élő állatokban történő optikai képalkotásra (In vivo Imaging System (IVIS), Fluorescence Molecular Tomography (FMT) rendszerekben).

Az OsteoSense elsődleges alkalmazási területe az oszteoblaszt aktivitás, a csontképződés és csontátépülés in vivo optikai követése volt, melyet napjainkban is gyakran alkalmaznak kisállat-modellekben a csontban zajló ásványianyag-beépülés valós idejű követésére, például osteoporosis, törésgyógyulás vagy csonttáttétek modellezése során (100). A csontvizsgálatokon túl hamar kiderült, hogy ugyanaz a hidroxipatit-affinitás lehetővé teszi lágyszöveti patológiás kalcifikációk kimutatását is. Ennek megfelelően az OsteoSense alkalmazhatóságát kiterjesztették vaszkuláris kalcifikáció, szívbillentyű-meszesedés, valamint renális és egyéb lágyszöveti mineralizáció in vivo vizsgálatára.

Az OsteoSense elsősorban az extracelluláris térben, illetve a mátrixhoz kötöten felhalmozódó hidroxipatit kristályokat jelöli, így főként a mineralizáció előrehaladottabb, kristályos fázisainak detektálására alkalmas. Bár bizonyos esetekben intracelluláris struktúrákhoz társuló kalciumlerakódások is megjelenhetnek, a festék hozzáférhetősége és penetrációja korlátozott lehet, ezért az intracelluláris kompartmentekben (pl. vezikulákban) jelenlévő, korai vagy amorf kalcium-foszfát formák kimutatása nem minden esetben megbízható.

Fontos előnye, hogy a fluoreszcens jel kvantitatív módon is értékelhető, mivel intenzitása arányos a jelenlévő hidroxipatit mennyiségével. A jel mérhető képalkotó rendszerekkel vagy fluoreszcens plate readerrel, és tipikusan relatív fluoreszcencia egységekben (RFU) kerül kifejezésre, amely megfelelő kalibráció mellett a mineralizáció mértékének összehasonlítására alkalmas. Az OsteoSense érzékenysége lehetővé teszi kis mennyiségű kalcifikáció detektálását is, azonban a mérhető jelintenzitást befolyásolhatják technikai és biológiai tényezők, például a szöveti fényelnyelés, autofluoreszcencia, véráramlás, valamint az állat fiziológiai állapota.

Számos előnye mellett az OsteoSense festék legfőbb korlátja, hogy nem alkalmas a különböző kalciumformák (pl. amorf vs. kristályos) megkülönböztetésére, mivel specifikusan a kristályos hidroxipatit-hoz kötődik. Ennek következtében az eredmények értelmezése eltérhet a klasszikus hisztokémiai módszerektől. Míg a von Kossa festés a foszfáttartalmú ásványi lerakódásokat, az Alizarin Red S pedig a kalciumionokat jelöli szélesebb spektrumban, addig az OsteoSense kifejezetten a hidroxipatit jelenlétét detektálja, így a különböző módszerek eredményei csak ezen sajátosságok figyelembevételével vethetők össze.

4. Célkitűzés

- 4.1. A CKD-asszociált lágyyszöveti kalcifikáció tanulmányozása érdekében kutatócsoportunkban szerettünk volna egy nem invazív CKD egérmodellt és a kalcifikáció detektálására alkalmas érzékeny és specifikus módszert meghonosítani. A szakirodalmi adatok alapján az adenin és magas foszfát tartalmú táppal előidézett CKD egérmodell meghonosítását tűztük ki célul. További célunk volt kifejleszteni egy módszert, melynek segítségével az Osteosense fluoreszcens festéket *in vivo* alkalmazva képessé válunk a CKD-asszociált kalcifikáció detektálására különféle lágyyszövetekben.
- 4.2. Kutatócsoportunk korábbi munkájában kimutatta a CKD betegek anémiakezelésében alkalmazott PHI Daprodustat kalcifikációt fokozó hatását *in vitro* sejtes modellben, valamint *in vivo* CKD egérmodellben. Ezzel kapcsolatban vizsgáltuk a DPD pro-kalcifikációs hatásának molekuláris mechanizmusát, melynek keretében célul tűztük ki az ER stressz szerepének tisztázását.

5. Anyagok és módszerek

5.1. Anyagok

Kísérleteink során a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) termékeit használtuk, amennyiben ezt eltérően nem jelöltük.

5.2. Sejtenyésztés

A kísérletek során humán aorta simaizomsejtekkel (HAoSMC, Cell Applications Inc, San Diego, CA, USA) dolgoztunk, amelyeket Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) tápfolyadékban tenyésztettünk 10% főtális borjú szérummal (FBS) (10270-106, Gibco, Grand Island, NY, USA), 1% L-glutaminnal, 1% nátrium-piruváttal, és 1% antibiotikus, antimikotikus reagenssel kiegészítve. A sejteket inkubátorban 5% CO₂ jelenlétében 37 °C-on tenyésztettük. A kísérletekhez a sejteket konfluens állapotig tenyésztettük, és 5-8 passzázs szám között használtuk fel.

5.3. A HAoSMC kalcifikációjának indukálása

A sejtek kalcifikációjának indukálásához oszteogén médiumot (OM) használtunk, amely során a 2% FBS tartalmú DMEM tápfolyadékot inorganikus foszfáttal (Pi, 1,5-2,5 mmol/L, pH 7,4) és kalciummal (Ca, 0,3 mmol/L) egészítettük ki. A tápfolyadékot 3 naponta cseréltük a kísérletek befejezéséig.

5.4. Alizarin vörös festés és mérés

A sejtek kalcifikációját ARS festéssel detektáltuk. A kísérlet végén a 96 lyukú platen tenyésztett sejtekről eltávolítottuk a tápfolyadékot, foszfáttal pufferolt sóoldattal (PBS-sel) átmostuk, majd 4%-os paraformaldehiddel fixáltuk 20 percen keresztül. A fixálást követően a sejteket újból átmostuk PBS-sel, majd a sejtekhez 2%-os ARS (pH 4,2) oldatot adtunk. 15 perc múlva a festéket eltávolítottuk, majd a platet desztillált vízzel mostuk. Lefényképeztük a platet, majd 100 µl hexadecilpiridinium-klorid oldatot (100 mmol/L) adtunk hozzá, mely feloldja a bekötődött festéket, így a mérés kvantitatívvá tehető. A minták abszorbanciáját mikroplate olvasóval (BioTek TS 800) 562 nm-es hullámhosszon mértük le.

5.5. Oszteokalcinszint meghatározása

Az oszteokalcin méréshez a sejteket 6 lyukú platen tenyésztettük. A kezelés végén a sejtekről eltávolítottuk a tápoldatot, PBS-sel mostuk, majd 100 µl etilén-diamin-tetraecetsavat

(EDTA-t) (0,5 mol/L, pH 6,9) adtunk hozzá. Az oszteokalcin koncentrációját az EDTA-s felülúszóból ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) módszerrel határoztuk meg a gyári protokollnak megfelelően.

5.6. Az extracelluláris mátrix kalciumtartalmának meghatározása

Az extracelluláris mátrix kalciumtartalmának méréséhez a sejteket 96 lyukú platen tenyésztettük. A kezelés végén a sejtekről eltávolítottuk a tápoldatot, PBS-sel mostuk, és 0,6 mol/L-es koncentrációjú sósavval dekalcináltuk az extracelluláris mátrixot 5 percig szobahőmérsékleten. A sósavas felülúszó kalcium tartalmát QuantiChrom Calcium Assay kit-tel (Gentaur, Kampenhout, Belgium) határoztuk meg az előírt protokollnak megfelelően. A dekalcinálást követően a sejteket újra átmostuk, majd lizáltuk 0,1% NaOH és 0,1% SDS tartalmú pufferben. A lizátum fehérjekoncentrációját BCA Protein Assay kit-tel (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) határoztuk meg és a kalciumtartalmat a fehérjetartalomra normalizálva adtuk meg.

5.7. Western blot

A Western blot módszerhez a sejteket 6-lyukú platen tenyésztettük és a kísérlet végeztével 120 μ L 2x Laemmli lízis pufferben lizáltuk. A kapott lizátumot 5 percig 95 °C-on denaturáltuk, szonikáltuk (2x5 másodperc) majd újabb 5 percig denaturáltuk. Mintánként azonos mennyiségű fehérjét (50 μ L) 7,5% vagy 10%-os SDS poliakrilamid gélen választottunk el Bio-Rad Mini Protean készülékkel 100 V feszültségen. Ezt követően a fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltuk (10600002, GE Healthcare, Amersham, Germany) 12 V feszültségen, 45 percen át félszáraz blottolóval (Bio-Rad Inc, Hercules, CA, USA). A membránt 6%-os tejpor oldattal blokkoltuk 1 órán keresztül szobahőmérsékleten, majd a membránhoz adtuk az elsődleges antitestet 5%-os tejpor oldatban. Az elsődleges antitesteket: az anti-ATF4 antitestet (#11815; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) 0.34 μ g/ml, msx. A membránt az elsődleges antitesttel 12 órán át 4 °C-on billegtettük, majd a membránt TBS-T-vel (Tris-sel pufferolt fiziológiás sóoldat, mely 0,1% Tween 20 detergenst tartalmaz) többször átmostuk. Ezt követően a membránokat 1 órán keresztül másodlagos antitesttel (anti-rabbit) tartottuk szobahőmérsékleten. Az inkubálást követően a membránokat újból TBS-T-vel mostuk, majd Western ECL reagenssel (Bio-Rad Inc., Hercules, CA, USA) hívtuk elő. Az eredményt röntgen filmen, illetve digitálisan rögzítettük (LI-COR, Lincoln, NE, USA). A sávok intenzitását a készülék szoftverébe épített analízáló szoftver, illetve a GelQuant szoftver segítségével

határoztuk meg. A detektálást követően a membránokat újrajelöltük anti- β -aktin antitesttel (sc-47778; Santa Cruz Biotechnology, Inc), melyet 0.5 μ g/ml koncentrációban alkalmaztunk.

5.8. A CKD indukciója C57BL/6 egerekben adenint és foszfátot tartalmazó diétával

Az egerekkel végzett kísérleteinket a Debreceni Egyetem Kutatásetikai Bizottsága által kiadott érvényes engedély (10/2021/DEMÁB) birtokában végeztük. A kísérletek során C57BL/6 hím (n=24), 8-12 hetes egereket vizsgáltunk. Az egereket véletlenszerűen 2, kontroll valamint CKD csoportra (n=12) osztottuk. A kontroll csoport standard rágsálótápot kapott, míg a CKD-t 2 fázisú adenint tartalmazó diétával váltottuk ki, melyek során az egerek 6 hétig 0,2% adenin és 0,7% foszfát tartalmú, majd a 7. héttől 0,2% adenin és 1,8% foszfát tartalmú rágsáló tápot kaptak további 3 héten keresztül (S8106- S075 és S8893-S006 SSsniff, Soest, Németország). A DPD hatását egy másik kísérletben vizsgáltuk, melynek során 10 hetes C57BL/6 egereket (n=30) három csoportra osztottunk: kontroll, CKD, CKD+DPD. A CKD-t az előző kísérlettel megegyező módon, kétfázisú adenint és emelt foszfátot tartalmazó diétával váltottuk ki. A DPD-t (MedChemExpress, Princeton, NJ, USA) a kísérlet 7. hetétől naponta adagoltuk 1% metilcellulózban szuszpendálva orálisan, míg a DPD kezelésben nem részesülő egerek azonos térfogatú vivőanyagot kaptak.

5.9. A kalcifikáció detektálása OsteoSense festékkel

Az egerek lágyszöveti kalcifikációjának vizsgálatához OsteoSense 750EX festéket alkalmaztunk (NEV10053EX, PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA). A kísérlet végén az állatokat izoflurán belélegeztetésével bódítottuk, majd az OsteoSense festéket 80 nmol/testsúly kg dózisban juttattuk be a retro-orbitális vénás sinuson keresztül. A képalkotást 18 órával az injekciót követően végeztük. Az egerek CO₂ bódítását követően, szívpunkción keresztül vért vettünk, majd 5 mL jéghideg PBS-sel perfundáltuk őket, és az összes szervet eltávolítottuk. A szerveket fekete háttérre helyeztük, majd világos látóteret és fluoreszcens felvételeket készítettünk IVIS Spectrum In Vivo Imaging System készülékkel (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Az OsteoSense 750EX festék gerjesztési maximuma kb. 750 nm, emissziós maximuma pedig 770 nm közelében található, ami alkalmassá teszi mély szöveti képalkotásra, alacsony háttérjel mellett, mivel ebben a spektrális tartományban minimális a szöveti autofluoreszcencia. A festék abszorpciós spektruma nagyjából 730–760 nm közé esik, csúcsabszorpciója 750 nm körül van. Képalkotási protokollunkban a gerjesztést 750 nm-en végeztük, a fluoreszcencia-emissziót pedig 770 nm-en gyűjtöttük a gyártói útmutatásnak

megfelelően. A fluoreszcens jelintenzitást az IVIS készülék beépített szoftverével mértük és elemeztük.

5.10. Laboratóriumi értékek meghatározása

Az egerektől vett vérből szérumban urea, kreatinin, foszfát és kalcium szinteket határoztunk meg a Cobas® c502 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) automata készülék segítségével.

5.11. Hisztológia

A szerveket 10%-os formalinban fixáltuk és paraffinba ágyasztuk. Ezt követően 4 µm vastag metszeteket vágunk. A metszeteket deparaffináltuk, majd rehidratáltuk. Ezek után Hematoxilin-eozin, von Kossa, valamint Alizarin Red S festést végeztünk. Az Alizarin Red S festés során a metszeteket előre elkészített 2%-os Alizarin Red oldatba tettük 5 percre és dehidratáltuk alkohol sorozat segítségével. A von Kossa festéshez a metszeteket 1%-os ezüst-nitrát oldatba helyeztük UV fény alá 1 órán keresztül. Ezt követően 5%-os nátrium-tiosulfáttal mostuk 5 percig, végül neutral fast red segítségével ellenfestettük.

5.12. Kvantitatív valós idejű PCR

A szervekből teljes RNS-t izoláltuk Tri-reagenssel (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA). Az RNS cDNS-sé átírását High-Capacity cDNS Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével végeztük. A PCR reakcióhoz iTaq™ Universal SYBR® Green Supermixet (Bio-Rad Laboratories) és az alábbi táblázatban felsorolt primereket használtuk (**1. táblázat**). A PCR reakciót a CFX96 Real-Time System (Bio-Rad Laboratories) készülékben hajtottuk végre. A target mRNS relatív mennyiségét a $\Delta\Delta C_t$ módszerrel határoztuk meg, melynek normáláshoz HPRT-t használtunk.

1. Táblázat A kvantitatív valós idejű PCR során használt primerek

Gén	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
Runx2	GCATCCTATCAGTTCCCAATG	GAGGTGGTGGTGCATGGT
Sox9	GCTCTACTCCACCTTCACTTAC	TGTGTGTAGACTGGTTGTTCC
BMP2	CGGACTGCGGTCTCCTAA	GGGGAAGCAGCAACACTAGA
HIF-1 α	GTTGCCACTTCCCCACAATG	TTCATGTCTAGACCACCGG
HPRT	TCCTCCTCAGACCGCTTTT	CCTGGTTCATCATCGCTAATC

5.13. Statisztikai analízis

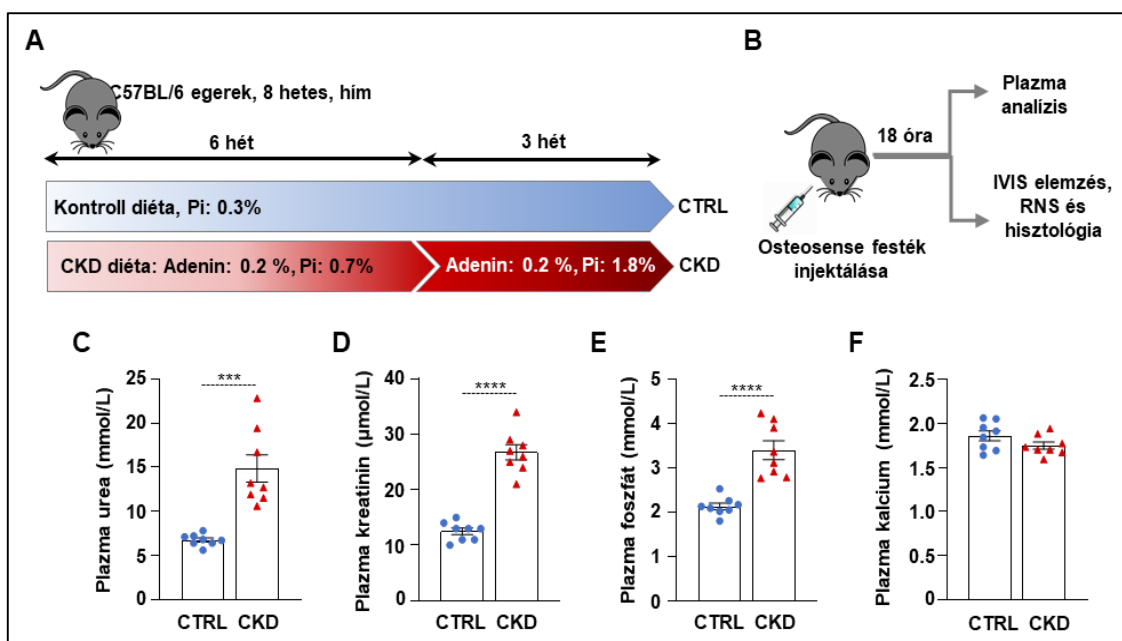
A statisztikai analízisek elvégzéséhez a GraphPad Prism 8.01 szoftvert alkalmaztuk. Az adatok normál eloszlásának ellenőrzését Shapiro-Wilk teszttel, a p értékek meghatározását parametrikus tesztekkel végeztük. A két csoport közötti statisztikailag szignifikáns különbségeket kétoldali Student-féle t -próbával, a kettőnél több csoport összehasonlítását ANOVA tesztet követő Tukey-féle többszörös összehasonlító analízissel, míg a számos kezelési csoport egyetlen kontrollal történő összehasonlítását ANOVA tesztet követő Dunnett's post-hoc teszttel elemeztük. A $p < 0.05$ értékeket tekintettük szignifikánsnak.

6. Eredmények

6.1. OsteoSense festés alkalmazása lágyszöveti kalcifikáció detektálására CKD egérmodellben

6.1.1. Az adenin és magas foszfáttartalmú diéta vesebetegséget idéz elő C57BL/6 egerekben

A lágyrészek meszesedését adeninnel indukált CKD egérmodellben vizsgáltuk, 8 hetes hím C57BL/6 egereken. A 24 egeret véletlenszerűen kontroll (CTRL) és CKD csoportba osztottuk. A CKD csoportban az egerek 6 hétig emelt foszfát- (0,7%) és adenintartalmú (0,2%) tápot kaptak, majd további 3 hétig magas foszfát (1,8%) és adenin tartalmú tápot (7A ábra). A kontroll csoportba tartozó egerek normál rágcsálótápot kaptak, melynek foszfáttartalma 0,3 % volt (7A ábra). A kísérlet vége előtt csoportonként 8-8 egeret izoflurán bódítás mellett Osteosense festékekkel oltottuk be, majd másnap szén-dioxid, vért vettünk tőlük, valamint szerveket gyűjtöttünk (7B ábra). A CKD egerekben a plazma urea valamint a kreatinin szintje megemelkedett a kontroll egerekhez képest, ami a vesekárosodást jelzi (7C-D ábra).



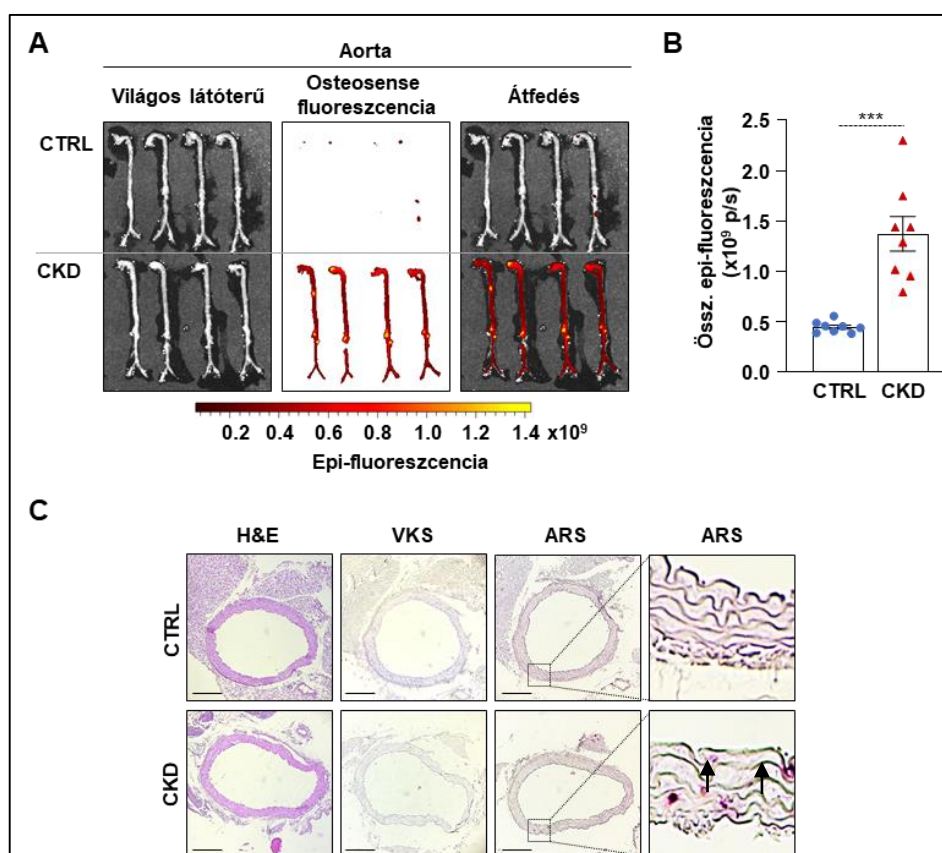
7. ábra A CKD indukciója adenin és magas foszfát tartalmú diétával C57BL/6 egerekben. (A-B) A kísérleti protokoll vázlatja. Szérum urea (C), kreatinin (D), foszfát (E) és kalcium (F) szintek. Az oszlopdiaagrammokon az átlag ± szórás látható. *p<0.005, ****p<0.001**

A vesefunkció progresszív romlása foszfát retencióhoz, a plazma foszfát szint emelkedéséhez vezet. A foszfát szint megemelkedése patofiziológiás jelentőségű a lágyszöveti kalcifikációban, különösen akkor, ha egyidejűleg a plazma kalciumtartalma is emelkedik. Ezért

a plazmából a vesefunkció paramétereinek meghatározásán kívül foszfát- és kalciummérést is végeztünk. A CKD egerek plazma foszfát szintje jelentősen megemelkedett a kontrollokhoz képest, azonban a kalcium szintnél szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk (7E-F ábra).

6.1.2. Az aorta kalcifikációjának kimutatása OsteoSense festéssel CKD egerekben

Az egerek boncolását követően az aortát sztereoszkóp alatt leválasztottuk a szívről és megtisztítottuk a kötőszövettől. Az aortáról a mintagyűjtést követő 4 órán belül felvételeket készítettünk az IVIS Imaging műszer segítségével.



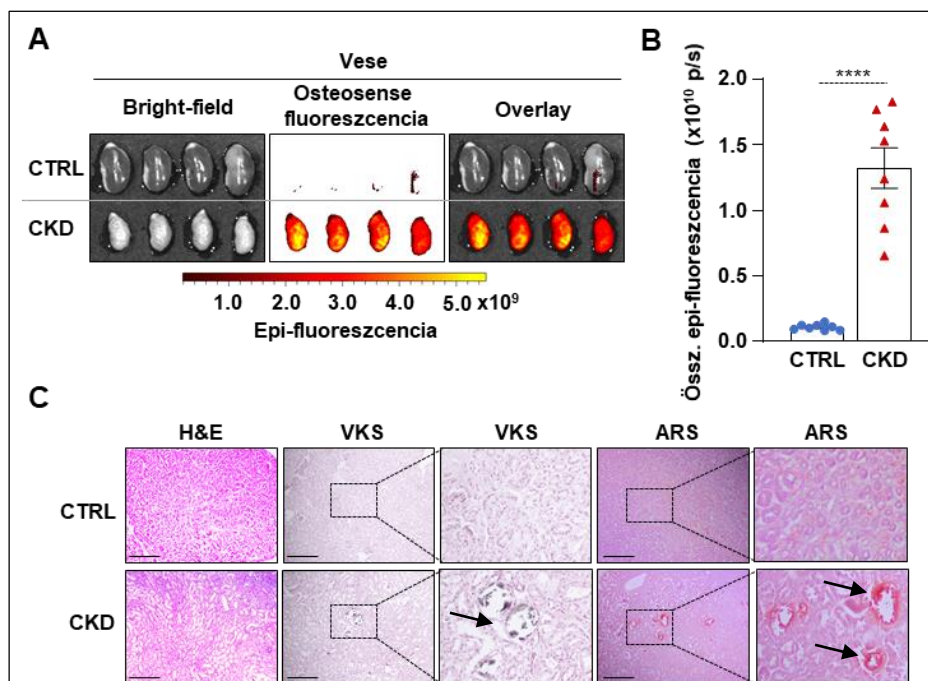
8. ábra Aorta kalcifikáció kimutatása egerekben. Az egereket az előző ábrán bemutatott módon kezeltük. (A) A CTRL és CKD egerek aortáiról készült világos látóteres és fluoreszcens felvételek. (B) Teljes epifluoreszcens jelintenzitás. Az oszlop-diagrammokon ábrázolt adatok átlag ± szórásként vannak kifejezve, n = 8. A p érték kiszámításához t-próbát alkalmaztunk. ***p<0.005 (C) CTRL és CKD egerek aortájának szövettani analízise. Reprezentatív hematoxilin-eozin (H&E) von Kossa (VKS) és alizarin vörös (ARS) felvételek. Lépték: 200µm.

Az OsteoSense jelintenzitása szignifikánsan magasabb volt a CKD egerek aortájában a kontroll egerek aortájához viszonyítva (8A-B ábra). Az OsteoSense festés kalcium felhalmozódást mutatott ki a CKD egerekből származó aorták teljes hosszában. A

legintenzívebb festődést a hasi régióban detektáltunk, különösen a veseartéria kiindulási helyén, valamint az aortaívben (**8A ábra**). Csoportonként 4-4 egeret OsteoSense festés kihagyásával dolgoztunk fel. Ezen egerek szerveinek egy részét paraffinba ágyasztuk, másik részéből RNS-t izoláltunk. A paraffinba ágyazott aorta mintákból metszeteket készítettünk, melyeken hematoxilin-eozin, von Kossa és ARS festést végeztünk. A kontroll és CKD egerekből származó aorta minták hisztológiai képe nagyfokú hasonlóságot mutatott, szerkezeti elváltozást nem találtunk, eltekintve néhány kalcifikációs gócponttól, melyet ARS festéssel detektáltunk a CKD egerek aortájában (**8C ábra**).

6.1.3. A vese kalcifikációjának kimutatása CKD egerekben

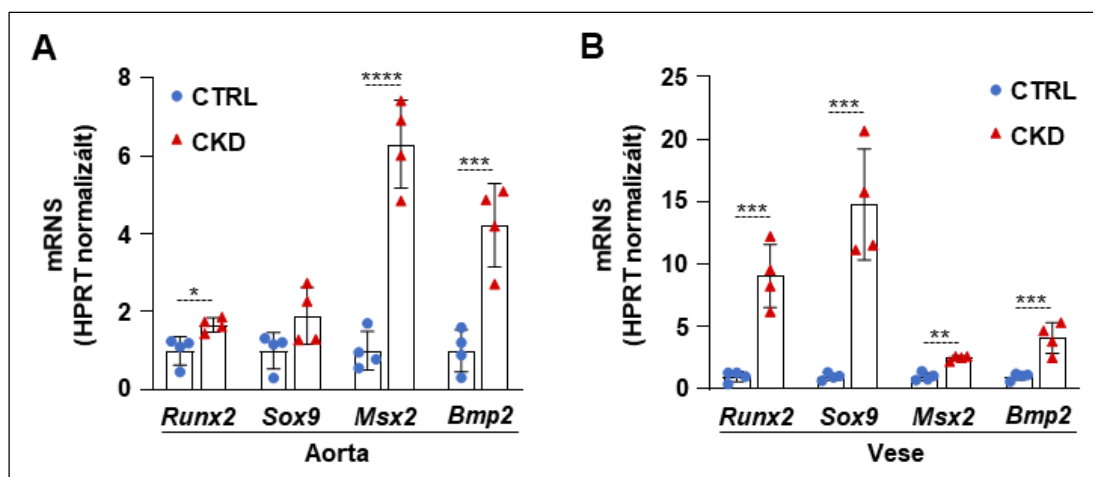
Az OsteoSense festés intenzív kalcifikációt jelzett a CKD egerek veséjében, ugyanakkor a kontroll egerek veséjében alacsony volt a jelintenzitás (**9A-B ábra**). A világos látóteres felvételeken a CKD-s egerek veséjében szövet szerkezeti módosulásokat, atrófiát és fibrózist detektáltunk, melyek a veseelégtelenségre jellemző elváltozások (**9A ábra**). A H&E festés tubuláris dilatációt mutatott, és a meszesedés mind alizarin vörös, mind von Kossa festéssel kimutatható volt a CKD egerekből származó vesékben (**9C ábra**).



9. ábra Vese kalcifikáció kimutatása egerekben. (A) A CTRL és CKD egerek veséiről készült világos látóteres és fluoreszcens felvételek. (B) Teljes epifluoreszcens jelintenzitás. Az oszlop-diagrammokon ábrázolt adatok átlag ± szórásaként vannak kifejezve, n = 8. A p érték kiszámításához t-próbát alkalmaztunk. ***p<0.005 (C) CTRL és CKD egerek veséjének szövettani analízise. Reprezentatív hematoxilin-eozin (H&E) von Kossa (VKS) és alizarin vörös (ARS) felvételek. Lépték: 200µm.

6.1.4. Az oszteokondrogén markerek expressziója fokozódik CKD egerek aortájában és veséjében

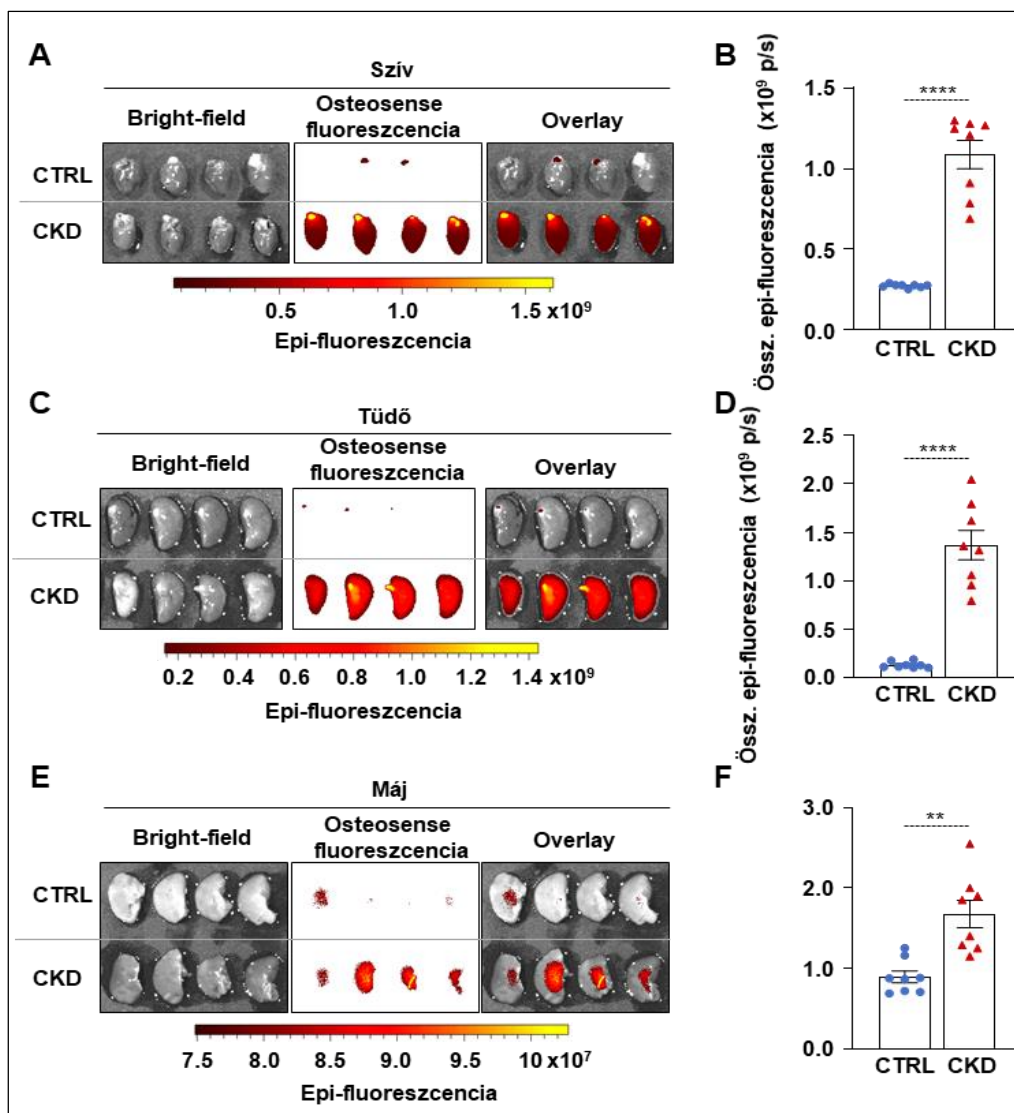
Jelenlegi ismereteink szerint az érfali kalcifikáció egy aktív folyamat, melynek során oszteokondrogén irányú differenciálódás zajlik. Ezért a következő kísérletünkben az oszteokondrogén markerek expressziójának CKD hatására bekövetkező változását tanulmányoztuk kontroll és CKD egerekből származó aorta illetve vese RNS mintákban. Négy transzkripciós faktor, a Runx2, Sox9, Msx2, és a Bmp2 mRNS szintjeit határoztuk meg. Általánosságban elmondható, hogy az oszteokondrogén transzkripciós faktorok mRNS expressziója CKD hatására fokozódott a kontrollhoz képest, az aortában és a vesében is. A szövetek között azonban jelentős eltéréseket tapasztaltunk a tekintetben, hogy mely transzkripciós faktor szintje változott jelentősebben. Az aortában az Msx2 és Bmp2 szintje emelkedett leginkább, ezzel szemben a vesében a Sox9 és a Runx2 expressziója fokozódott legnagyobb mértékben (10A-B ábra).



10. ábra Oszteokondrogén transzkripciós faktorok mRNS expressziója CTRL és CKD egerekből származó aorta és vese mintákban. (A és B) Az aorták és vesék mRNS marker szintjei CTRL és CKD egerekben. Az adatok átlag ± szórásaként vannak kifejezve, n=4. A *p* érték kiszámításához t-próbát alkalmaztunk. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.005,

6.1.5. Szív, tüdő és májkalcifikáció kimutatása CKD egerekben

Ezt követően azt vizsgáltuk meg, hogy a CKD-indukált kalcifikáció érint-e más létfontosságú szervet. Elsőként a szívet, a tüdőt és a májat elemeztük. A CKD egerekből származó szív és tüdő mintákban a teljes szervet érintő OsteoSense festődést detektáltunk.

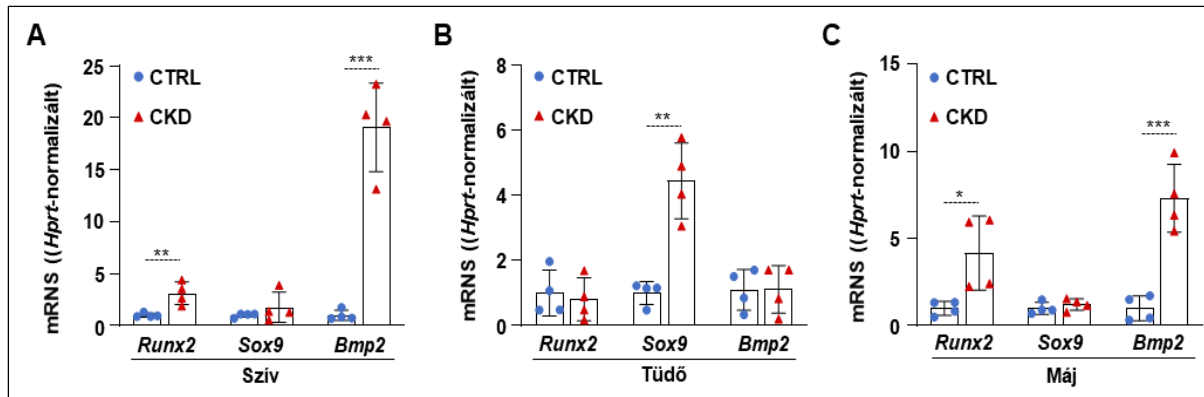


11. ábra Szív-, tüdő- és májkalcifikáció kimutatása egerekben. (A, C, E) A CTRL és CKD egerek szívéről, tüdejéről, illetve májáról készült világos látóteres és fluoreszcens felvételek. (B, D, F) Teljes epifluoreszcens jelintenzitás. Az oszlopdiagrammokon ábrázolt adatok átlag ± szórásként vannak kifejezve, n = 8. A *p* érték kiszámításához t-próbát alkalmaztunk. ***p*<0.01, *****p*<0.001

A szívben a jel intenzitása az aorta belépési pontjánál volt a legintenzívebb, a tüdő esetében pedig a tüdőkapunál (11A-D ábra). A kontroll egerekből származó szívekben csak a fő erek belépési pontjainál tapasztaltunk OsteoSense pozitivitást. A szívhez és tüdőhöz viszonyítva alacsonyabb intenzitású OsteoSense festődést tapasztaltunk a CKD egerek májában. A lebenyek festődése a májartéria belépési pontja környéki centrális régióban volt megfigyelhető, a lebenyek perifériás részei nem mutattak festődést (11E-F ábra). A CKD egerekből származó máj szövetek OsteoSense jelintenzitása szignifikánsan magasabb volt, mint a kontroll egereké (11E-F ábra).

6.1.6. Az oszteogén markerek mRNS szintje emelkedett a CKD egerek szívében, tüdejében és májában

A szívben, a tüdőben és a májban is vizsgáltuk az oszteokondrogén markerek mRNS szintjét kontroll és CKD egerekben. A Runx2 és Bmp2 szintek emelkedését tapasztaltunk CKD egerek szívében és májában, ugyanakkor a tüdőben a Sox9 mRNS szintje emelkedett szignifikánsan a kontroll egerekéhez képest (12A-C ábra).

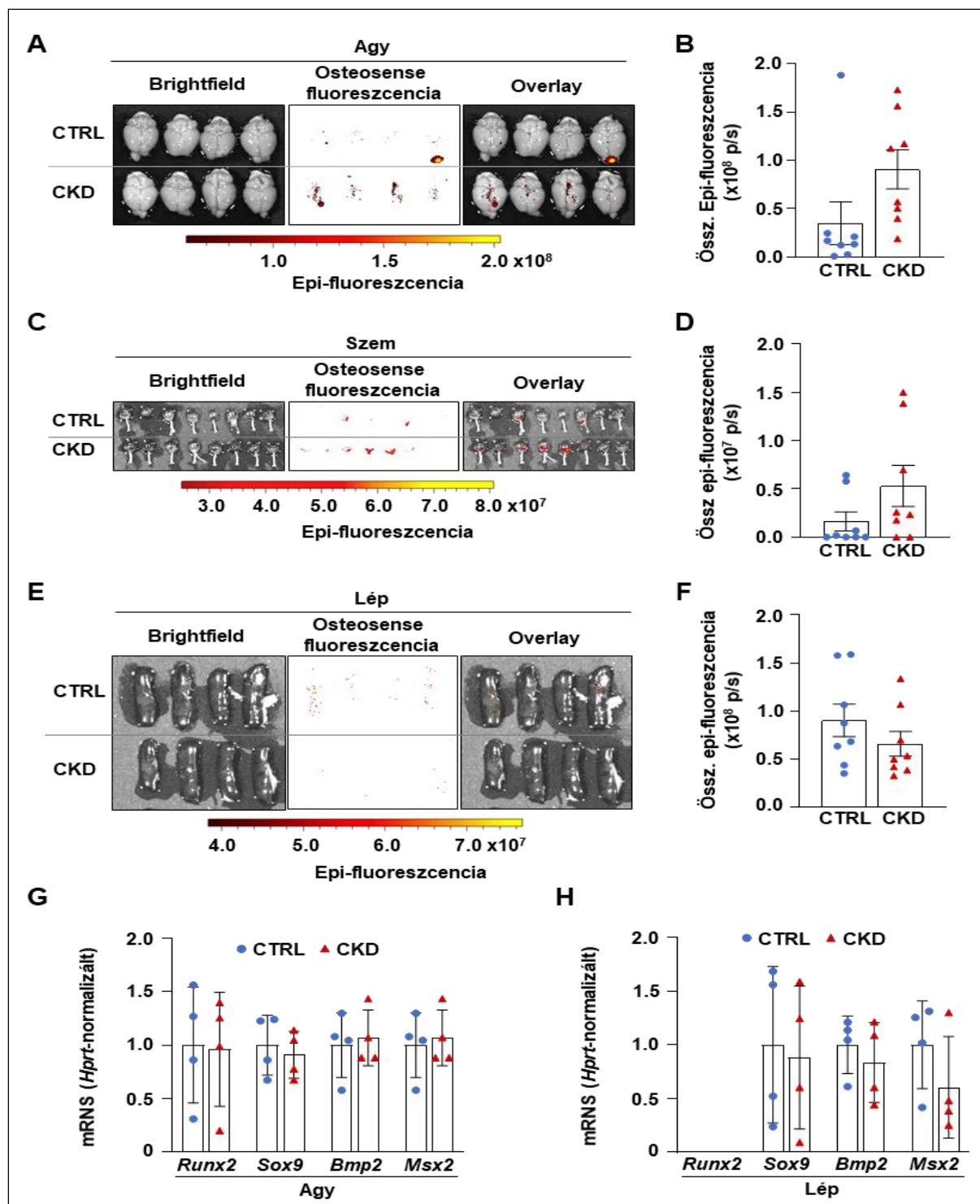


12. ábra Oszteokondrogén transzkripciós faktorok mRNS expressziója CTRL és CKD egerekből származó szív, tüdő és máj mintákban. (A-C) A szív, tüdő és máj mRNS markerek szintjei CTRL és CKD egerekben. Az adatok átlag $\pm$ szórásként vannak kifejezve, $n = 4$. A p érték kiszámításához t-próbát alkalmaztunk. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$

6.1.7. Az agy, a szem és a lép nem érintett a CKD-indukált lágyszöveti kalcifikációban

Ezt követően a kontroll és CKD egerek agyában, szemében és lépében vizsgáltuk a kalcifikációt OsteoSense festéssel. Mind a kontroll, mind a CKD egerek agyában detektáltunk mikromeszesedékes gócpontokat, azonban az agyak összes fluoreszcencia intenzitása nem mutatott statisztikailag szignifikáns különbséget a két csoport között (13A-B ábra).

Egyes egereknél mind a kontroll, mind a CKD csoportból OsteoSense jelet figyeltünk meg a retinában, amely gyakrabban jelent meg a CKD csoportban (13C ábra). A fluoreszcens jel intenzitásának átfogó elemzése azonban nem mutatott különbséget a két csoport között (13D ábra). Sem a kontroll sem a CKD egerek lépében nem tapasztaltunk kalcifikációt (13E-F ábra). Az OsteoSense festéssel párhuzamosan az agy és lép mintákból meghatároztuk az oszteokondrogén markerek mRNS szintjeit, melyek nem különböztek a kontroll és CKD állatokból származó mintákban (13G-H ábra).



13. ábra Az agy, a szem és a lép kalcifikációjának vizsgálata egerekben. (A, C, E) A CTRL és CKD egerek agyáról, szeméről, illetve lépéről készült világos látóteres és fluoreszcens felvételek. (B, D, F) Teljes epifluoreszcens jelintenzitás. Az oszlopdiagrammokon ábrázolt adatok átlag $\pm$ szórásként vannak kifejezve, $n = 8$. A p érték kiszámításához t-próbát alkalmaztunk. (G-H) Az agy és a lép mRNA markerek szintjei CTRL és CKD egerekben. Az adatok átlag $\pm$ szórásként vannak kifejezve, $n = 4$. A p érték kiszámításához t-próbát alkalmaztunk.

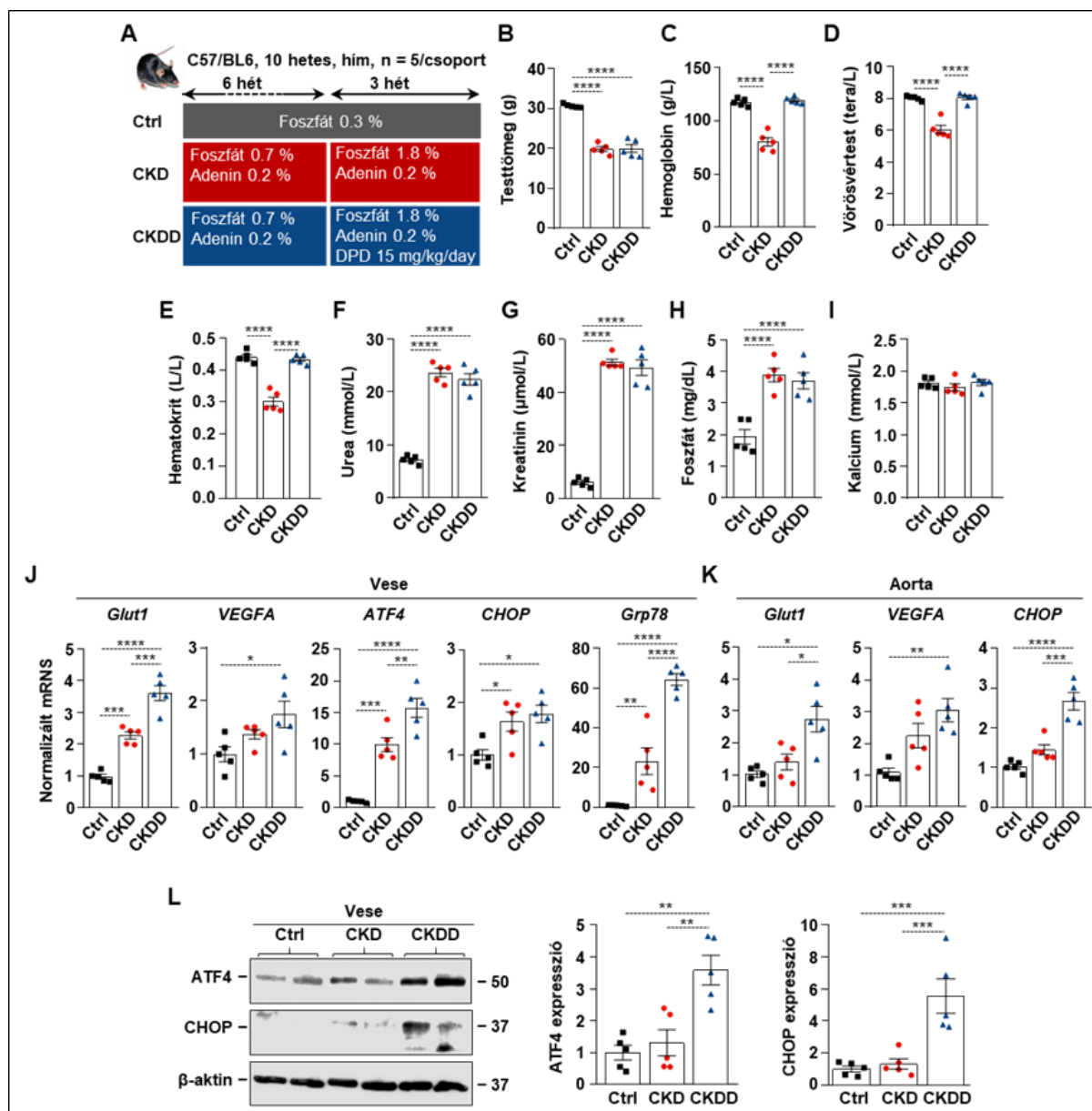
6.2. A DPD kalcifikációra kifejtett hatásának vizsgálata *in vivo* CKD egérmodellben és *in vitro* humán érfali VSMC-ken

6.2.1. A DPD aktiválja a HIF-1 útvonalat és ER stresszt indukál C57BL/6 egerekben

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

A DPD vizsgálata során 15 C57BL/6 hím (8-12 hetes) egeret véletlenszerűen három csoportba (n=5/csoport) osztottunk be; CTRL, CKD és CKD+DPD (CKDD). A kontroll egerek normál rágszálótápot kaptak. A CKD-t az előző fejezetben ismertetett módon, adenin- és magas foszfát-tartalmú diétával indukáltuk (**14A ábra**). A DPD dózist előkísérletekben határoztuk meg, és azt a legalacsonyabb dózist választottuk, mely megelőzte, hogy a CKD egerekben anémia alakuljon ki. Ennek megfelelően kísérletünkben a DPD-t orálisan adagoltuk 15 mg/kg/nap dózisban, a kísérlet utolsó 3 hetében (**14A ábra**). Az egerek testsúlyát hetente mértük, a hematológiai paramétereket és a vesefunkciót a kísérlet végén határoztuk meg. Mind a CKD, mind a CKDD egerek kezdeti súlyuk körülbelül egyharmadát elvesztették a kísérlet során (**14B ábra**). A DPD teljesen mértékben korrigálta a CKD által kiváltott vérszegénységet, amit a CTRL és a CKDD egerek hasonló hemoglobin-, vörösvérsejtszám- és hematokritértékei mutattak (**14C, E ábra**). A megemelkedett plazma urea-, kreatinin- és foszfátszintek azt mutatták, hogy a CKDD egerek vesefunkciója ugyanolyan mértékben romlott, mint a CKD egereké (**14F-I ábra**). A CKD-kezelés nem változtatta meg a plazma kalciumszintjét (**14I ábra**). A vesében és az aortában vizsgáltuk néhány HIF célgén (glükóz transzporter 1 (Glut1), vaszkuláris endoteliális növekedési faktor A (VEGFA)) és ER stressz marker (ATF4, CHOP, glükóz-regulált protein 78 (GRP78)) mRNS expresszióját. Megállapítottuk, hogy a CKD hatására fokozódott a Glut1, az ATF4, a CHOP és a GRP78 mRNS expressziója a vesében (**14J ábra**). A DPD-kezelés mind a HIF, mind az ER stresszválaszt fokozta (**14J ábra**). Az aortában a CKDD-kezelés háromszorosára növelte a Glut1, a VEGFA és a CHOP mRNS expresszióját a CTRL-hoz viszonyítva (**14K ábra**).

Az ER stressz marker ATF4 és CHOP fehérjeexpressziójának jelentős növekedését figyeltük meg CKDD egerek veséiben (14L ábra).

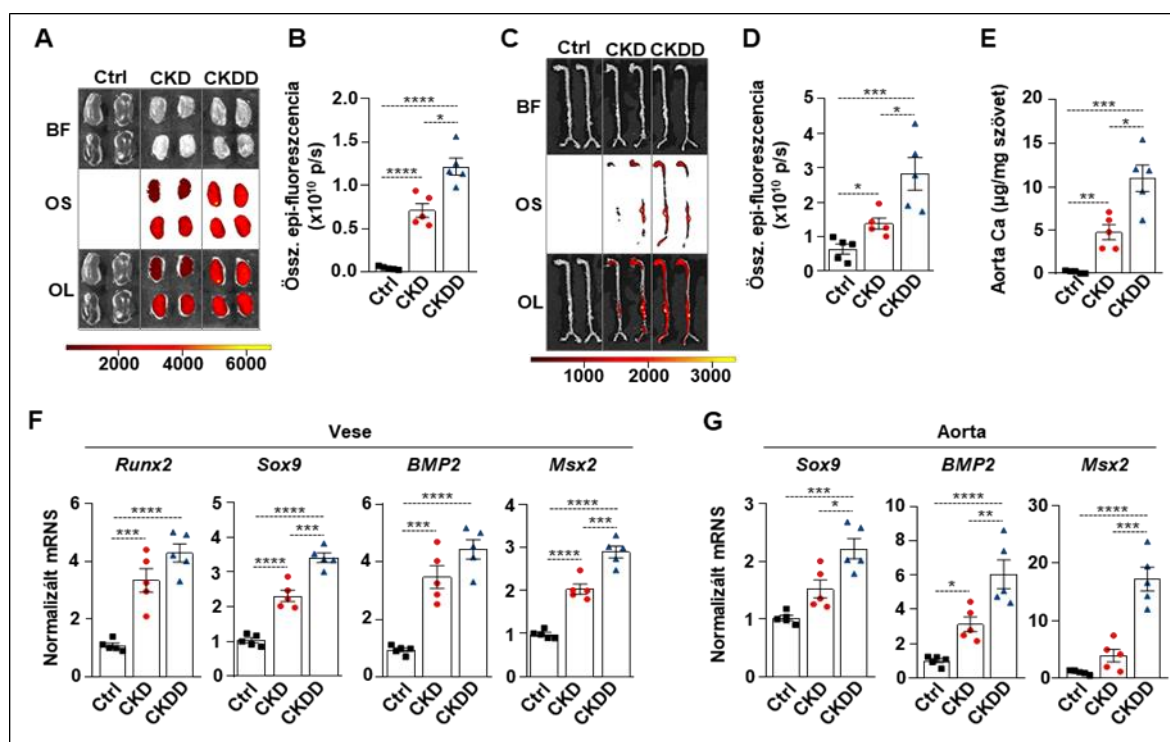


14. ábra A DPD fokozza a HIF útvonal és az ER stressz aktivációját CKD egerekben.

(A) A kísérleti protokoll vázlatja; (B) Testtömeg; (C) Hemoglobin; (D) Vörösvértest; (E) Hematokrit; (F) Urea; (G) Kreatinin; (H) Foszfát; (I) Kalciumszint; (J és K) mRNA markerek szintje vese-és aortamintákban; (L) ATF4 és CHOP fehérjeexpressziója vese lizátumban. A membránokat β-aktinra normalizáltuk. Reprezentatív western blot analízis. Az adatok átlag ± szórásban vannak kifejezve, n=5. A *p* érték kiszámításához ANOVA-t alkalmaztunk, majd Tukey többszörös összehasonlító tesztjét alkalmaztuk. **p*<0,05, ***p*<0,01, ****p*<0,005, *****p*<0,001

6.2.2. A DPD fokozza a lágyszöveti kalcifikációt CKD egerekben

Ezt követően a DPD aorta és vesekalcifikációra kifejtett hatását vizsgáltuk OsteoSense festéssel az előző kísérleti elrendezésben. A CKD egerek veséjében és aortájában az OsteoSense festés jelentős kalcifikációt mutatott, mely a DPD-vel kezelt CKDD egerekben tovább erősödött (**15A-D ábra**). Az aorta kalciumszintjének mérése alátámasztotta a DPD kalcifikációt fokozó hatását (**15E ábra**). A kalcifikáció a fiziológiás csontképződéshez hasonló, szabályozott folyamat, ezért a következő lépésben az oszteo-/kondrogén markerek expresszióját vizsgáltuk vese- és aorta mintákban. A kontroll egerekhez képest a Runx2, a Sox9, a BMP2 és a Msx2 mRNS szintje magasabb volt a CKD egerek veséiben. A DPD-vel kezelt állatok veséiben a Sox9 és Msx2 mRNS szintje szignifikánsan magasabb volt a CKD egerekhez viszonyítva (**15F ábra**). Az aortában a CKD a BMP2 mRNS expressziójának növekedését váltotta ki a kontrollhoz viszonyítva, míg a CKDD a Sox9, BMP2 és Msx2 mRNS szintjének jelentős emelkedését okozta (**15G ábra**).

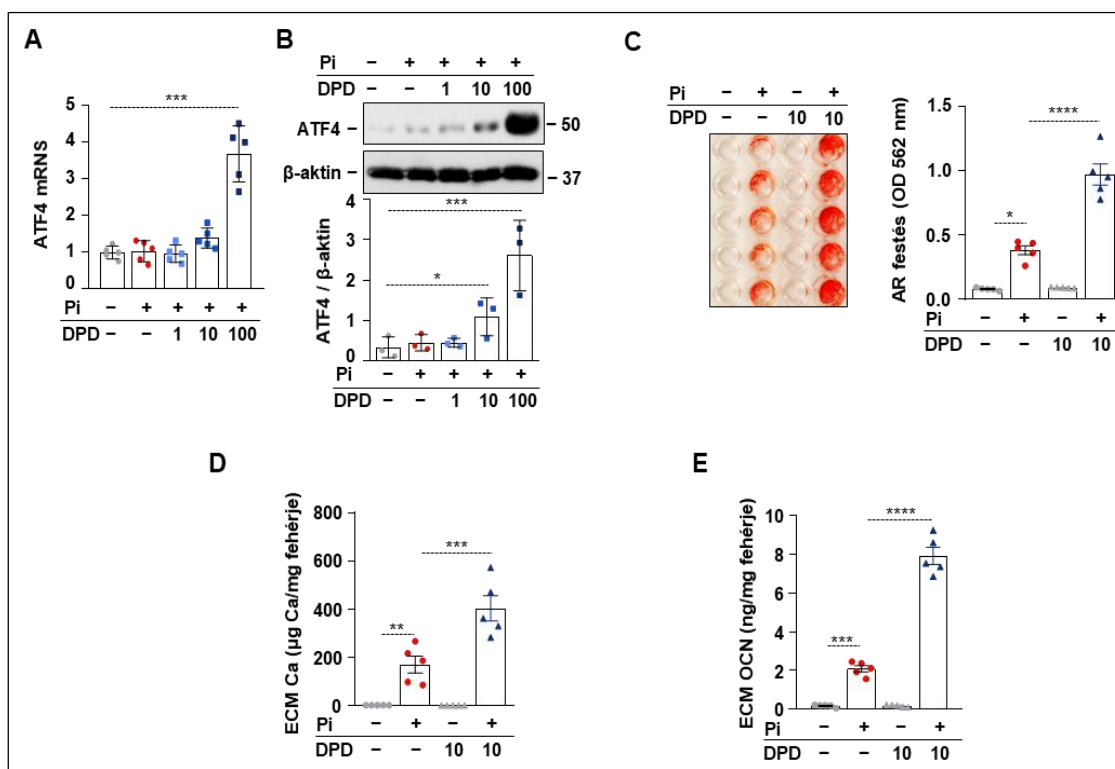


15. ábra A DPD fokozza a lágyszövetek kalcifikációját a CKD egerek veséjében és aortájában. (A, C) A CTRL, CKD és CKDD egerek veséjének és aortájának világos látóterés és fluoreszcens felvételei BF: Brigh-field, OS: Osteosense fluoreszcencia, OL: Overlay. (B, D) Teljes epifluoreszcens jelintenzitás. (E) Az aorták Ca-tartalma fehérjeszintre normalizálva. (F) Oszteogén markerek mRNS- szintjei a vesében és az aorta mintákban. Az adatok átlag ± szórásként vannak kifejezve, n=5. A *p* érték kiszámításához ANOVA-t alkalmaztunk, majd Tukey többszörös összehasonlító tesztjét

Összességében ezek az eredmények azt mutatják, hogy a DPD-kezelés hipoxia választ és ER-stresszt vált ki, növeli az oszteo-/kondrogén markerek expresszióját, és elősegíti a kalcifikációt a CKD egerek veséjében és aortájában.

6.2.3. A DPD ER stresszt indukál, valamint elősegíti a HAoSMC-k Pi-indukált kalcifikációját

A DPD kalcifikációt fokozó hatása hátterében álló mechanizmust *in vitro* körülmények között HAoSMC kalcifikációs modellt alkalmazva vizsgáltuk tovább. Tekintettel arra, hogy a vesében a DPD kezelés hatására az ATF4 expressziója jelentősen megemelkedett, és az ATF4 kalcifikációban betöltött kulcsszerepe ismert, elsőként a DPD ATF4 expressziójára kifejtett hatását vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy a DPD dóziszfüggő módon fokozza az ATF4 mRNS és fehérje expresszióját is HAoSMC-ken (16A-B ábra).



16. ábra A DPD fokozza az ATF4 expresszióját és a HAOSMC-k foszfát (Pi)-indukált kalcifikációját. A HAoSMC-eket szervesen foszfáttal (2 mmol/l) kiegészített oszteogén táptalajban tenyésztettük DPD (10 μ mol/l) jelenlétében vagy hiányában. (A-B) Az ATF4 mRNS és ATF4 fehérjeexpressziója teljes sejt lizátumokban (6 óra). Reprezentatív Western blot és normalizálás β -aktinra (n=3). (C) Reprezentatív Alizarin vörös festés (4 nap) és kvantálása (n=5). (D) HCl-ben oldott extracelluláris mátrix minták Ca-tartalma. (E) EDTA-val szolubilizált extracelluláris mátrix minták osteokalcin (OCN) tartalma (8 nap). Az adatok átlag $\pm$ szórásaként vannak kifejezve. A p érték kiszámításához ANOVA-t majd Tukey többszörös összehasonlító tesztjét alkalmaztuk. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005, ****p<0,001.

A DPD kalcifikációra gyakorolt hatását normál és emelt foszfátszint mellett is vizsgáltuk. A DPD (10 $\mu\text{mol/L}$) önmagában nem idézett elő kalcifikációt, azonban jelentősen fokozta a foszfát (2 mmol/L) kalcifikációt indukáló hatását (**16C ábra**). A DPD jelenléte az extracelluláris mátrixban foszfát hatására dúsuló kalcium mennyiségét 2,4-szeresére fokozta (**16D ábra**). Emellett DPD jelenlétében az extracelluláris mátrixban felhalmozódó OCN mennyisége is mintegy négyszeresére fokozódott a csak foszfáttal kezelt sejtekhez képest (**16E ábra**).

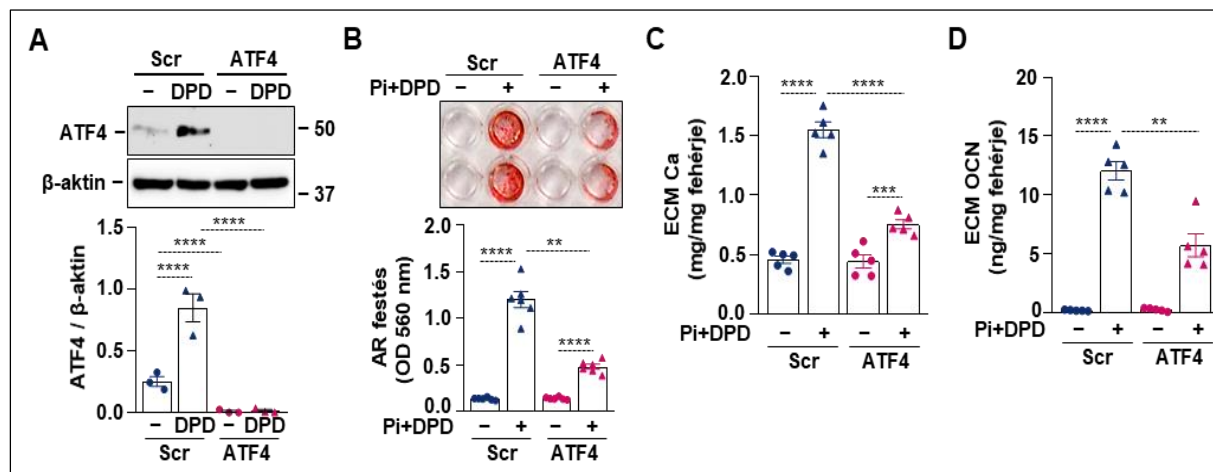
6.2.4. A DPD ATF4-függő módon fokozza a simaizomsejtek kalcifikációját

Az ATF4 kalcifikációban betöltött kulcsszerepe jól ismert, ezért következő kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy a DPD pro-kalcifikációs hatása összefüggésben áll-e az ATF4 fokozott expressziójával. Ennek érdekében az ATF4 expresszióját siRNS technológia alkalmazásával csökkentettük. A géncsendesítés hatékonyságát Western blot analízissel ellenőriztük, amely szignifikáns mértékű ATF4 fehérjeszint-csökkenést igazolt a kontrollhoz képest (**17A ábra**).

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy az ATF4 csökkent expressziója miként befolyásolja a DPD által indukált kalcifikációs folyamatokat. Eredményeink azt mutatták, hogy az ATF4 kiütése jelentősen mérsékelte a DPD kalcifikációt fokozó hatását. A kalcifikáció mértékét Alizarin vörös festéssel értékeltük, amely az extracelluláris kalciumlerakódások csökkenését jelezte az ATF4-silencing hatására.

Ezeket az eredményeket kvantitatív mérésekkel is alátámasztottuk: meghatároztuk az extracelluláris mátrix kalciumtartalmát, valamint az oszteokalcin (OCN) szintjét, amelyek szintén szignifikáns csökkenést mutattak ATF4 knockdown mellett (**17B-D ábra**).

Összességében eredményeink arra utalnak, hogy a DPD pro-kalcifikációs hatása legalább részben az ATF4 expressziójának fokozásán keresztül érvényesül.



17. ábra Az ATF4 kulcsszerepet játszik a DPD kalcifikációt fokozó hatásában. (A) A HAoSMC-eket megemelt szervetlen foszfát (2 mmol/L) és DPD (10 μmol/L) tartalmú oszteogén tápfolyadékban tartottuk Scr (scrambled) vagy ATF4-ellenes siRNS jelenlétében. (A) ATF4 és β-aktin fehérjeexpressziója teljes sejt lizátumból (24 h). (B) Reprezentatív Alizarin vörös festés és mennyiségi meghatározása (4. nap). (C) Kalcium akkumuláció az extracelluláris mátrixban (4. nap). (D) Az extracelluláris mátrix OCN tartalma (6. nap). Az adatok átlag ± szórásban vannak kifejezve. A *p* érték kiszámításához ANOVA-t majd Tukey többszörös összehasonlító tesztjét alkalmaztuk. ***p*<0,01, ****p*<0,005, *****p*<0,001.

7. Diszkusszió

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

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

Kutatócsoportunk érdeklődésének középpontjában a CKD-asszociált kalcifikáció mechanizmusának megértése áll, melynek egyik modellrendszere az adenin tartalmú diétával kiváltott CKD C57BL/6 egerekben. Az utóbbi években került látóterünkbe az OsteoSense festék, melyet pár kutatócsoport alkalmazott kalcifikáció számszerűsítésére. Ezekben a munkákban az OsteoSense festést *in vitro* végezték el kalcifikált VSMC-ken, aortákon, illetve szívbillentyűkön (101) (102). Ugyanakkor az OsteoSense festék *in vivo* is alkalmazható, és számos csontosodási folyamatokkal kapcsolatos munkában használták. Az OsteoSense festést *in vivo* körülmények között aorta kalcifikáció kimutatására kutatócsoportunk alkalmazta elsőként (72).

Az aorta és a vese mellett a szívben, a tüdőben és a májban találtunk CKD-val összefüggő meszesedést, míg a kontroll egerekből származó szervekben nem észleltünk kalcifikációt. A szív, különösen az aorta- és mitrális billentyűk meszesedése gyakran társul krónikus vesebetegséghez, különösen a hemodialízisben részesülő CKD betegek körében. A billentyűmeszesedés 10-20 évvel korábban jelentkezik krónikus vesebetegeknél, mint az átlagpopulációban, ami hozzájárul a kardiovaszkuláris események magas előfordulásához és prevalenciájához még a fiatal krónikus vesebetegeknél is (105).

A tüdő kalcifikálódása ugyancsak gyakori CKD betegekben; egy nemrégiben készült tanulmány alapján, melyben mellkasi CT és röntgenfelvételeket analizáltak, a CKD betegek 3%-ánál észleltek tüdőmeszesedést (106). A mi eredményünk összhangban áll Westenfeld és munkatársai korábbi tanulmányával is, melyben a szerzők tüdőmeszesedést detektáltak 5/6 nefrektómiával kiváltott CKD egérmodellben (107). Emberekben a CKD-val összefüggő májkalcifikáció nagyon ritka. Az irodalomban mindössze 7 korábban leírt esetet találtunk. Ezen ritka megfigyelések alapján úgy tűnik, hogy a diffúz májkalcifikáció CKD-ben elsősorban olyankor alakul ki, amikor csökken a máj perfúziója. A hét eset közül a májkalcifikáció két betegnél szепtikus sokk után alakult ki, két másik betegnél pedig vérzéses sokk volt a klinikai háttérben (108),(109).

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

A CKD az agy szerkezetére és működésére egyaránt hatással van (110). Vinters és munkatársai egy nemrégiben végzett tanulmányban 40 CKD-s beteg boncolásával az agy neuropatológiai rendellenességeit vizsgálták. Az alanyok több mint felénél ischaemiás infarktus alakult ki, amely nagy artéria ateroszklerózissal és arterioloszklerózissal járt együtt (111). Bugnicourt és munkatársai a CKD-s betegeknek az intrakraniális artéria kalcifikációjának magas prevalenciáját találták (112). Munkánk során a hidroxipatit lerakódását vizsgáltuk az agyban és nem találtunk szignifikáns különbséget az agy kalcifikációjában a CKD és a kontroll egerek között.

A szemet illetően a szaruhártya-, kötőhártya- és retina-meszesedések gyakran megfigyelhetők hemodialízisben részesülő krónikus vesebetegeknél (113)(114).

Kutatócsoportunk korábbi munkájában adeninnel indukált CKD modellben szaruhártya meszesedést mutatott ki kalcifikációra hajlamos DBA/2J egerekben, és bizonyítékot találtunk arra, hogy a magas foszfát- és kalciumszint Runx2-függő módon váltja ki a szaruhártya hámsejtjeinek oszteokondrogén differenciálódását (115). Az itt bemutatott kísérletben C57BL/6 egerekben nem láttunk szaruhártya-meszesedést, de OsteoSense jelet tapasztaltunk a szem retinális részéből, ami gyakoribb volt a CKD csoportban, mint a kontroll csoportban, bár a különbség nem volt szignifikáns.

A lép meszesedése ritka, de egy nemrégiben készült, többközpontú vizsgálatban beszámoltak a lép meszesedéséről kalcifikációs urémiás arteriolopátiával diagnosztizált betegeknél (116). Kísérleteinkben azt találtuk, hogy a CKD nem váltott ki lép meszesedést C57BL/6 egerekben. Az OsteoSense festéssel összhangban nem találtunk emelkedést az oszteogén markerek mRNS szintjében a CKD egerek agyában és lépében.

A kalcifikáció mellett a CKD számos egyéb szisztémás szövődményt is okoz, melyek közül kiemelkedő jelentőségű az anémia, mely nagymértékben rontja a CKD betegek életminőségét, fokozza a betegség progresszióját és hozzájárul a kardiovaszkuláris eredetű, valamint bármely okra visszavezethető halálhoz.

Disszertációm második felében a CKD-hoz társuló anémia kezelésére alkalmazott új hatásmechanizmusú PHI, a DPD kalcifikációra kifejtett hatását vizsgáltam *in vitro* érfali simaizomsejt modellen, valamint az előzőekben részletesen bemutatott adenin-indukált CKD egérmodellben. A DPD a PHI családba tartozó gyógyszer, mely a HIF útvonal aktivációján keresztül serkenti a szervezet saját eritropoetin-termelését, fokozza az eritropoézist és a vasszintézist, ez által korrigálja az anémiát (7). A DPD-t 2020 óta használják Japánban, és 2023 óta az Egyesült Államokban CKD-hoz társult anémia kezelésére.

Munkacsoportunk korábbi munkájában kimutatta, hogy az adenin-indukált CKD egérmodellben anémia alakul ki, mely sikeresen korrigálható DPD-vel (72). Ugyanakkor azt is kimutattuk, hogy a DPD anémiát korrigáló dózisa fokozza a CKD egerek aortakalcifikációját a HIF-1 útvonal indukcióján keresztül (72). Munkám során tovább vizsgálva a DPD pro-kalcifikációs hatásmechanizmusát megállapítottuk, hogy a DPD *in vitro* körülmények között ER stresszt indukál érfali simaizomsejtekben. A különböző ER stressz útvonalakat vizsgálva megállapítottuk, hogy a DPD elsősorban az ER stressz PERK ágát aktiválja, melynek eredményeként fokozódik az ATF4, és a CHOP expressziója. Az ATF4 kulcsszerepet játszik a vaszkuláris kalcifikáció mechanizmusában, melynek legdöntőbb bizonyítéka, hogy simaizomsejt targetált ATF4 knock-out egérben CKD körülmények között elmarad a média

kalcifikációja (117). Ezzel összhangban áll a mi eredményünk is, miszerint ATF4 hiányában elmarad a DPD kalcifikációt fokozó hatása.

A DPD kalcifikációra gyakorolt hatásmechanizmusát tovább vizsgálva megállapítottuk, hogy a DPD 15 mg/kg/nap dózisban alkalmazva korrigálja a CKD egerekben kialakult anémiát; a DPD-vel kezelt egerek hemoglobin és hematokrit szintje a kontroll szintjén marad. Korábbi eredményünkkel összhangban a DPD fokozta az aorta kalcifikációt CKD egerekben. Munkánk során a vese kalcifikációját is vizsgáltuk, és az aortához hasonlóan a kalcifikáció fokozódását találtuk DPD-vel kezelt CKD egerekben. A DPD fokozta az oszteokondrogén markerek (Sox9, Runx2, BMP2, Msx2) és a HIF target gének (Glut-1, VEGFA) mRNS expresszióját mind az aortában, mind a vesében. *In vitro* eredményeinkhez hasonlóan a DPD fokozta az ER stressz markerek az ATF4, CHOP és GRP78 mRNS expresszióját aortában és vesében is.

Összegezve második tanulmányunkat, a szakirodalmi adatokkal összhangban megállapítottuk, hogy a DPD alkalmas a CKD-asszociált anémia korrigálására. Ugyanakkor aggályokat vet fel az, hogy pozitív hatása mellett a DPD fokozza az ER stresszt és a CKD egerek aorta- és vesekalcifikációját. Egy 2021-ben publikált tanulmányban a DPD hatását vizsgálták dializált vesebetegekben 2,5 éven keresztül, és azt találták, hogy az anémia sikeres korrekciója mellett a betegek negyedénél alakultak ki súlyos kardiovaszkuláris szövődmények (Singh AK, 2021. N. Eng. J. Med.). További vizsgálatokat igényel annak megállapítása, hogy a CKD betegeket érintő kardiovaszkuláris szövődmények kialakulásában a DPD kalcifikációt fokozó hatása szerepet játszik-e.

8. Konklúziók

Munkánk során a CKD-asszociált lágyszöveti kalcifikáció tanulmányozására egy nem invazív CKD egérmodellt és a kalcifikáció detektálására alkalmas érzékeny és specifikus módszert honosítottunk meg. Továbbá vizsgáltuk a DPD pro-kalcifikációs hatásának molekuláris mechanizmusában az ER stressz szerepét.

A disszertációt megalapozó két publikált tanulmány legfontosabb megállapításai:

- Az OsteoSense festés hatékonyan azonosítja az aorta kalcifikációját a korai szakaszban, míg a hagyományos festési technikák ebben a stádiumban alig mutatnak ki kalcifikációt.
- Az OsteoSense festéssel kimutatható a vese, a máj, a tüdő és a szív kalcifikációja CKD egerekben.

- A CKD nem indukált kalcifikációt a lépben, az agyban, illetve a szemben.
- Az OsteoSense pozitivitás korrelációt mutat az oszteokondrogén transzkripciósfaktorok fokozott mRNA expressziójával.
- A DPD korrigálja az anémiát CKD egerekben.
- A DPD fokozza az aorta és vesekalcifikációt CKD egerekben.
- A DPD fokozza a HIF célgének, oszteokondrogén markerek és ER stressz markerek mRNA expresszióját CKD egerek aortájában és veséjében, az ATF4 és CHOP fehérje expresszióját CKD egerek veséjében.
- A DPD fokozza az ATF4 és CHOP ER stressz markerek expresszióját érfali simaizomsejtekben.
- A DPD ATF4-függő módon fokozza az érfali simaizomsejtek foszfáttal indukált kalcifikációját.

9. Összefoglalás

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

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

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

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

10. Summary

CKD is an increasing global public health problem, accompanied by high cardiovascular mortality. One of the major complications of CKD is vascular and soft tissue calcification, an active, cell-regulated process in which vascular smooth muscle cells undergo osteo/chondrogenic transdifferentiation.

One of the aims of our work was to establish a CKD mouse model induced by adenine and a high-phosphate diet, and to achieve non-invasive detection of calcification using the specific fluorescent dye OsteoSense. Another goal was to elucidate the molecular mechanisms underlying the pro-calcific effects of DPD, employing the previously established CKD mouse model and the optimized OsteoSense-based detection method for calcification. Using *in vivo* imaging, we demonstrated that OsteoSense is suitable for detecting CKD-associated soft tissue calcification, particularly in the aorta, kidney, heart, lung, and liver. In the calcified tissues, we also observed increased expression of osteogenic markers.

Our findings on DPD showed that DPD effectively prevents the development of anemia in CKD mice. However, it also has adverse effects, as it enhances calcification. Using *in vitro* and *in vivo* approaches, we identified a central role for the transcription factor ATF4, a key component of the UPR, in mediating the calcification-promoting effect of DPD.

11. Köszönetnyilvánítás

Elsőként témavezetőmnek, *Dr. Jeney Viktóriának* tartozom hálával a példaértékű szakmai irányításáért, tanácsaiért és a sok segítségéért. Valamint a türelméért, amit az elmúlt 4 évben és a disszertációm elkészítése alatt tanúsított irányomban. Az elmúlt évek alatt rengeteget támogatott, bármikor fordulhattam hozzá és sokat tanultam tőle, amit igyekszem kamatoztatni a jövőben.

Köszönet *Dr. Papp Zoltán* professzor úrnak, hogy az általa irányított intézményben végezhettem munkám.

Köszönöm a *Vaszkuláris Pathofiziológiai Kutatócsoport* volt és jelenlegi munkatársainak a közreműködésüket és támogatásukat, kiemelve Dr. Tóth Andreát, Dr. Csiki Dávid Mátét, Dr. Haneen Ababneht és Dr. Balogh Enikőt.

Köszönettel tartozom *együttműködő partnereinknek* és a publikációk *társszerzőinek* az értékes munkájukért és támogatásukért.

Végül szeretném megköszönni *családomnak és barátaimnak* a támogatást, valamint a biztatást.

12. Irodalomjegyzék

1. Avogaro A, Fadini GP. Mechanisms of ectopic calcification: implications for diabetic vasculopathy. *Cardiovasc Diagn Ther.* 2015. október;5(5):34352–34352.
2. Paloiian NJ, Giachelli CM. A current understanding of vascular calcification in CKD. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2014. október 15.;307(8):F891-900.
3. Rogers M, Goettsch C, Aikawa E. Medial and intimal calcification in chronic kidney disease: stressing the contributions. *J Am Heart Assoc.* 2013. szeptember 23.;2(5):e000481.
4. Hruska KA, Mathew S, Lund R, Qiu P, Pratt R. Hyperphosphatemia of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int.* 2008. július;74(2):148–57.
5. Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, Hirst JA, O’Callaghan CA, Lasserson DS, és mtsai. Global Prevalence of Chronic Kidney Disease - A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2016;11(7):e0158765.
6. Honda H, Hosaka N, Ganz T, Shibata T. Iron Metabolism in Chronic Kidney Disease Patients. *Contrib Nephrol.* 2019;198:103–11.
7. Singh AK, Carroll K, Perkovic V, Solomon S, Jha V, Johansen KL, és mtsai. Daprodustat for the Treatment of Anemia in Patients Undergoing Dialysis. *N Engl J Med.* 2021;385(25):2325–35.
8. Moe S, Drüeke T, Cunningham J, Goodman W, Martin K, Olgaard K, és mtsai. Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* 2006. június;69(11):1945–53.
9. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl.* 2009;(113):S1-130.
10. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Update Work Group. KDIGO 2017 Clinical Practice Guideline Update for the Diagnosis, Evaluation, Prevention, and Treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl.* 2017. július;7(1):1–59.
11. Neyra JA, Hu MC, Moe OW. Klotho in Clinical Nephrology: Diagnostic and Therapeutic Implications. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN.* 2020;16(1):162–76.
12. Yamada S, Nakano T. Role of Chronic Kidney Disease (CKD)–Mineral and Bone Disorder (MBD) in the Pathogenesis of Cardiovascular Disease in CKD. *J Atheroscler Thromb.* 2023. augusztus 1.;30(8):835–50.
13. Blacher J, Guerin AP, Pannier B, Marchais SJ, London GM. Arterial calcifications, arterial stiffness, and cardiovascular risk in end-stage renal disease. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 2001. október;38(4):938–42.
14. Jørgensen HS, David K, Salam S, Evenepoel P, European Renal Osteodystrophy (EUROD) workgroup, an initiative of the CKD-MBD working group of the ERA-EDTA. Traditional and Non-traditional Risk Factors for Osteoporosis in CKD. *Calcif Tissue Int.* 2021. április;108(4):496–511.

15. Jadoul M, Albert JM, Akiba T, Akizawa T, Arab L, Bragg-Gresham JL, és mtsai. Incidence and risk factors for hip or other bone fractures among hemodialysis patients in the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study. *Kidney Int.* 2006. október;70(7):1358–66.
16. Komaba H, Kakuta T, Fukagawa M. Management of secondary hyperparathyroidism: how and why? *Clin Exp Nephrol.* 2017. március;21(Suppl 1):37–45.
17. Shanahan CM, Crouthamel MH, Kapustin A, Giachelli CM. Arterial calcification in chronic kidney disease: key roles for calcium and phosphate. *Circ Res.* 2011. szeptember 2.;109(6):697–711.
18. Tóth A, Balogh E, Jeney V. Regulation of Vascular Calcification by Reactive Oxygen Species. *Antioxid Basel Switz.* 2020. október 8.;9(10):963.
19. Shigematsu T, Kono T, Satoh K, Yokoyama K, Yoshida T, Hosoya T, és mtsai. Phosphate overload accelerates vascular calcium deposition in end-stage renal disease patients. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2003. június;18 Suppl 3:iii86-89.
20. Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, McNair R, Schurgers LJ, Proudfoot D, és mtsai. Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2004;15(11):2857–67.
21. Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, és mtsai. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res.* 2000. szeptember 29.;87(7):E10-17.
22. Sun Y, Byon CH, Yang Y, Bradley WE, Dell'Italia LJ, Sanders PW, és mtsai. Dietary potassium regulates vascular calcification and arterial stiffness. *JCI Insight.* 2017. október 5.;2(19):e94920, 94920.
23. Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem (Tokyo).* 2010;147(1):35–51.
24. Cai J, Pardali E, Sánchez-Duffhues G, ten Dijke P. BMP signaling in vascular diseases. *FEBS Lett.* 2012. július 4.;586(14):1993–2002.
25. Li X, Yang HY, Giachelli CM. BMP-2 promotes phosphate uptake, phenotypic modulation, and calcification of human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis.* 2008;199(2):271–7.
26. Chen NX, Moe SM. Arterial calcification in diabetes. *Curr Diab Rep.* 2003. február;3(1):28–32.
27. Chen NX, Duan D, O'Neill KD, Moe SM. High glucose increases the expression of Cbfa1 and BMP-2 and enhances the calcification of vascular smooth muscle cells. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2006;21(12):3435–42.
28. Mori K, Shioi A, Jono S, Nishizawa Y, Morii H. Dexamethasone enhances In vitro vascular calcification by promoting osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999. szeptember;19(9):2112–8.
29. Jono S, Nishizawa Y, Shioi A, Morii H. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 increases in vitro vascular calcification by modulating secretion of endogenous parathyroid hormone-related peptide. *Circulation.* 1998. szeptember 29.;98(13):1302–6.

30. Balica M, Boström K, Shin V, Tillisch K, Demer LL. Calcifying subpopulation of bovine aortic smooth muscle cells is responsive to 17 beta-estradiol. *Circulation*. 1997. április 1.;95(7):1954–60.
31. Parhami F, Morrow AD, Balucan J, Leitinger N, Watson AD, Tintut Y, és mtsai. Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation. A possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997. április;17(4):680–7.
32. Bear M, Butcher M, Shaughnessy SG. Oxidized low-density lipoprotein acts synergistically with beta-glycerophosphate to induce osteoblast differentiation in primary cultures of vascular smooth muscle cells. *J Cell Biochem*. 2008. szeptember 1.;105(1):185–93.
33. Mokas S, Larivière R, Lamalice L, Gobeil S, Cornfield DN, Agharazii M, és mtsai. Hypoxia-inducible factor-1 plays a role in phosphate-induced vascular smooth muscle cell calcification. *Kidney Int*. 2016. szeptember;90(3):598–609.
34. Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, és mtsai. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature*. 1997. március 6.;386(6620):78–81.
35. Schinke T, Amendt C, Trindl A, Pöschke O, Müller-Esterl W, Jähnen-Dechent W. The serum protein alpha2-HS glycoprotein/fetuin inhibits apatite formation in vitro and in mineralizing calvaria cells. A possible role in mineralization and calcium homeostasis. *J Biol Chem*. 1996;271(34):20789–96.
36. Patel JJ, Zhu D, Opdebeeck B, D’Haese P, Millán JL, Bourne LE, és mtsai. Inhibition of arterial medial calcification and bone mineralization by extracellular nucleotides: The same functional effect mediated by different cellular mechanisms. *J Cell Physiol*. 2018. április;233(4):3230–43.
37. Ter Braake AD, Shanahan CM, de Baaij JHF. Magnesium Counteracts Vascular Calcification: Passive Interference or Active Modulation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(8):1431–45.
38. Zarjou A, Jeney V, Arosio P, Poli M, Antal-Szalmás P, Agarwal A, és mtsai. Ferritin prevents calcification and osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2009. június;20(6):1254–63.
39. Byon CH, Javed A, Dai Q, Kappes JC, Clemens TL, Darley-Usmar VM, és mtsai. Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling. *J Biol Chem*. 2008. május 30.;283(22):15319–27.
40. Pluquet O, Pourtier A, Abbadie C. The unfolded protein response and cellular senescence. A review in the theme: cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2015. március 15.;308(6):C415–425.
41. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep*. 2006. szeptember;7(9):880–5.
42. Oakes SA, Papa FR. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. *Annu Rev Pathol*. 2015;10:173–94.
43. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007. július;8(7):519–29.

44. Masuda M, Miyazaki-Anzai S, Keenan AL, Shiozaki Y, Okamura K, Chick WS, és mtsai. Activating transcription factor-4 promotes mineralization in vascular smooth muscle cells. *JCI Insight*. 1(18):e88646.
45. Furmanik M, Shanahan CM. ER stress regulates alkaline phosphatase gene expression in vascular smooth muscle cells via an ATF4-dependent mechanism. *BMC Res Notes*. 2018. július 16.;11:483.
46. Shanahan CM, Furmanik M. Endoplasmic Reticulum Stress in Arterial Smooth Muscle Cells: A Novel Regulator of Vascular Disease. *Curr Cardiol Rev*. 2017;13(2):94–105.
47. Duan X, Zhou Y, Teng X, Tang C, Qi Y. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis is activated in vascular calcification. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009. október 2.;387(4):694–9.
48. Duan XH, Chang JR, Zhang J, Zhang BH, Li YL, Teng X, és mtsai. Activating transcription factor 4 is involved in endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis contributing to vascular calcification. *Apoptosis Int J Program Cell Death*. 2013. szeptember;18(9):1132–44.
49. Masuda M, Ting TC, Levi M, Saunders SJ, Miyazaki-Anzai S, Miyazaki M. Activating transcription factor 4 regulates stearate-induced vascular calcification. *J Lipid Res*. 2012;53(8):1543–52.
50. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995. június 6.;92(12):5510–4.
51. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. *Sci STKE Signal Transduct Knowl Environ*. 2007. október 9.;2007(407):cm8.
52. Fuhrmann DC, Brüne B. Mitochondrial composition and function under the control of hypoxia. *Redox Biol*. 2017;12:208–15.
53. Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab*. 2006. március;3(3):187–97.
54. Green FHY, Butt JC, James AL, Carroll NG. Abnormalities of the bronchial arteries in asthma. *Chest*. 2006. október;130(4):1025–33.
55. Williams MC, Murchison JT, Edwards LD, Agustí A, Bakke P, Calverley PMA, és mtsai. Coronary artery calcification is increased in patients with COPD and associated with increased morbidity and mortality. *Thorax*. 2014;69(8):718–23.
56. Fu Q, Colgan SP, Shelley CS. Hypoxia: The Force that Drives Chronic Kidney Disease. *Clin Med Res*. 2016. március;14(1):15–39.
57. Movafagh S, Raj D, Sanaei-Ardekani M, Bhatia D, Vo K, Mahmoudieh M, és mtsai. Hypoxia Inducible Factor 1: A Urinary Biomarker of Kidney Disease. *Clin Transl Sci*. 2017. május;10(3):201–7.
58. Mokas S, Larivière R, Lamalice L, Gobeil S, Cornfield DN, Agharazii M, és mtsai. Hypoxia-inducible factor-1 plays a role in phosphate-induced vascular smooth muscle cell calcification. *Kidney Int*. 2016. szeptember;90(3):598–609.

59. Björnheden T, Levin M, Evaldsson M, Wiklund O. Evidence of hypoxic areas within the arterial wall in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999. április;19(4):870–6.
60. Sluimer JC, Gasc JM, van Wanroij JL, Kisters N, Groeneweg M, Sollewijn Gelpke MD, és mtsai. Hypoxia, hypoxia-inducible transcription factor, and macrophages in human atherosclerotic plaques are correlated with intraplaque angiogenesis. *J Am Coll Cardiol.* 2008. április 1.;51(13):1258–65.
61. O’Brien ER, Garvin MR, Dev R, Stewart DK, Hinohara T, Simpson JB, és mtsai. Angiogenesis in human coronary atherosclerotic plaques. *Am J Pathol.* 1994. október;145(4):883–94.
62. Jeziorska M, Woolley DE. Neovascularization in early atherosclerotic lesions of human carotid arteries: its potential contribution to plaque development. *Hum Pathol.* 1999;30(8):919–25.
63. Torres Filho IP, Leunig M, Yuan F, Intaglietta M, Jain RK. Noninvasive measurement of microvascular and interstitial oxygen profiles in a human tumor in SCID mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994. március 15.;91(6):2081–5.
64. Nakano D, Hayashi T, Tazawa N, Yamashita C, Inamoto S, Okuda N, és mtsai. Chronic hypoxia accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Hypertens Res Off J Jpn Soc Hypertens.* 2005. október;28(10):837–45.
65. Jun J, Reinke C, Bedja D, Berkowitz D, Bevans-Fonti S, Li J, és mtsai. Effect of intermittent hypoxia on atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis.* 2010. április;209(2):381–6.
66. Libby P, Folco E. Tension in the plaque: hypoxia modulates metabolism in atheroma. *Circ Res.* 2011. október 28.;109(10):1100–2.
67. Tóth A, Jeney V. Hypoxia-Induced Changes in Endothelial Cell Phenotype and Function. *Antioxid Redox Signal.* 2025. május 28.;
68. Li G, Lu W hua, Ai R, Yang J hong, Chen F, Tang Z zhi. The relationship between serum hypoxia-inducible factor 1 α and coronary artery calcification in asymptomatic type 2 diabetic patients. *Cardiovasc Diabetol.* 2014. február 24.;13:52.
69. Perrotta I, Moraca FM, Sciangula A, Aquila S, Mazzulla S. HIF-1 α and VEGF: Immunohistochemical Profile and Possible Function in Human Aortic Valve Stenosis. *Ultrastruct Pathol.* 2015. május;39(3):198–206.
70. Ruffenach G, Chabot S, Tanguay VF, Courboulain A, Boucherat O, Potus F, és mtsai. Role for Runt-related Transcription Factor 2 in Proliferative and Calcified Vascular Lesions in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016;194(10):1273–85.
71. Balogh E, Tóth A, Méhes G, Trencsényi G, Paragh G, Jeney V. Hypoxia Triggers Osteochondrogenic Differentiation of Vascular Smooth Muscle Cells in an HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor 1)-Dependent and Reactive Oxygen Species-Dependent Manner. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019. június;39(6):1088–99.
72. Tóth A, Csiki DM, Nagy B, Balogh E, Lente G, Ababneh H, és mtsai. Daprodustat Accelerates High Phosphate-Induced Calcification Through the Activation of HIF-1 Signaling. *Front Pharmacol.* 2022;13:798053.

73. Schinke T, Amendt C, Trindl A, Pöschke O, Müller-Esterl W, Jahn-Dechent W. The serum protein alpha2-HS glycoprotein/fetuin inhibits apatite formation in vitro and in mineralizing calvaria cells. A possible role in mineralization and calcium homeostasis. *J Biol Chem.* 1996;271(34):20789–96.
74. Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, és mtsai. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature.* 1997. március 6.;386(6620):78–81.
75. Orriss IR, Arnett TR, Russell RGG. Pyrophosphate: a key inhibitor of mineralisation. *Curr Opin Pharmacol.* 2016. június;28:57–68.
76. Ceccherini E, Cecchetti A, Gisone I, Persiani E, Morales MA, Vozzi F. Vascular Calcification: In Vitro Models under the Magnifying Glass. *Biomedicines.* 2022. október 6.;10(10):2491.
77. Mohler ER, Chawla MK, Chang AW, Vyavahare N, Levy RJ, Graham L, és mtsai. Identification and characterization of calcifying valve cells from human and canine aortic valves. *J Heart Valve Dis.* 1999. május;8(3):254–60.
78. Jiang H, Li L, Zhang L, Zang G, Sun Z, Wang Z. Role of endothelial cells in vascular calcification. *Front Cardiovasc Med.* 2022;9:895005.
79. Cheng SL, Shao JS, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA. MSX2 promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation of multipotent mesenchymal progenitors. *J Biol Chem.* 2003;278(46):45969–77.
80. Ceccherini E, Persiani E, Cabiati M, Guiducci L, Del Ry S, Gisone I, és mtsai. A Dynamic Cellular Model as an Emerging Platform to Reproduce the Complexity of Human Vascular Calcification In Vitro. *Int J Mol Sci.* 2024. július 6.;25(13):7427.
81. Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, és mtsai. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res.* 2000. szeptember 29.;87(7):E10-17.
82. Yang H, Curinga G, Giachelli CM. Elevated extracellular calcium levels induce smooth muscle cell matrix mineralization in vitro. *Kidney Int.* 2004;66(6):2293–9.
83. Shioi A, Nishizawa Y, Jono S, Koyama H, Hosoi M, Morii H. Beta-glycerophosphate accelerates calcification in cultured bovine vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15(11):2003–9.
84. Jono S, Nishizawa Y, Shioi A, Morii H. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 increases in vitro vascular calcification by modulating secretion of endogenous parathyroid hormone-related peptide. *Circulation.* 1998. szeptember 29.;98(13):1302–6.
85. Rutsch F, Buers I, Nitschke Y. Hereditary Disorders of Cardiovascular Calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2021;41(1):35–47.
86. Kachanova OS, Boyarskaya NV, Docshin PM, Scherbinin TS, Zubkova VG, Saprankov VL, és mtsai. Ex vivo model of pathological calcification of human aortic valve. *Front Cardiovasc Med.* 2024;11:1411398.
87. Diglio CA, Grammas P, Giacomelli F, Wiener J. Angiogenesis in rat aorta ring explant cultures. *Lab Invest J Tech Methods Pathol.* 1989. április;60(4):523–31.

88. Akiyoshi T, Ota H, Iijima K, Son BK, Kahyo T, Setou M, és mtsai. A novel organ culture model of aorta for vascular calcification. *Atherosclerosis*. 2016;244:51–8.
89. Watts LK, Duffy P, Field RB, Stafford EG, O’Brien MF. Establishment of a viable homograft cardiac valve bank: a rapid method of determining homograft viability. *Ann Thorac Surg*. 1976. március;21(3):230–6.
90. Lester WM, Gotlieb AI. In vitro repair of the wounded porcine mitral valve. *Circ Res*. 1988. április;62(4):833–45.
91. Chester AH, Sarathchandra P, McCormack A, Yacoub MH. Organ Culture Model of Aortic Valve Calcification. *Front Cardiovasc Med*. 2021;8:734692.
92. Lacerda CMR, Kisiday J, Johnson B, Orton EC. Local serotonin mediates cyclic strain-induced phenotype transformation, matrix degradation, and glycosaminoglycan synthesis in cultured sheep mitral valves. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012. május 15.;302(10):H1983–1990.
93. Messaoudi H, Levesque T, Perzo N, Berg E, Feugray G, Dumesnil A, és mtsai. Subtotal Nephrectomy Associated with a High-Phosphate Diet in Rats Mimics the Development of Calcified Aortic Valve Disease Associated with Chronic Renal Failure. *J Clin Med*. 2023. február 15.;12(4):1539.
94. Shobeiri N, Pang J, Adams MA, Holden RM. Cardiovascular disease in an adenine-induced model of chronic kidney disease: the temporal link between vascular calcification and haemodynamic consequences. *J Hypertens*. 2013;31(1):160–8.
95. Ren X, Wei Q, Shao H, Sun Z, Liu N. A rat model of diabetic artery calcification. *J Endocrinol Invest*. 2012. május;35(5):497–503.
96. Schneider MR. Von Kossa and his staining technique. *Histochem Cell Biol*. 2021;156(6):523–6.
97. Li Q, Zhou Q, Li S, Li S, Liao W, Yu L, és mtsai. Target analysis and identification of curcumin against vascular calcification. *Sci Rep*. 2024. július 28.;14(1):17344.
98. Mo YQ, Li BQ, Wu HY. [The application value of alizarin red S in vascular calcification]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. 2024. július 8.;53(7):734–7.
99. Tower RJ, Campbell GM, Müller M, Will O, Glüer CC, Tiwari S. Binding kinetics of a fluorescently labeled bisphosphonate as a tool for dynamic monitoring of bone mineral deposition in vivo. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2014. szeptember;29(9):1993–2003.
100. Greco A, Herrmann J, Babic M, Gummi MR, van der Giet M, Tölle M, és mtsai. Molecular Imaging and Quantification of Smooth Muscle Cell and Aortic Tissue Calcification In Vitro and Ex Vivo with a Fluorescent Hydroxyapatite-Specific Probe. *Biomedicines*. 2022. szeptember 14.;10(9):2271.
101. Krohn JB, Hutcheson JD, Martínez-Martínez E, Irvin WS, Bouten CVC, Bertazzo S, és mtsai. Discoidin Domain Receptor-1 Regulates Calcific Extracellular Vesicle Release in Vascular Smooth Muscle Cell Fibrocalcific Response via Transforming Growth Factor- β Signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016. március;36(3):525–33.

102. Wanga S, Hibender S, Ridwan Y, van Roomen C, Vos M, van der Made I, és mtsai. Aortic microcalcification is associated with elastin fragmentation in Marfan syndrome. *J Pathol*. 2017;243(3):294–306.
103. Evenepoel P, Daenen K, Bammens B, Claes K, Meijers B, Naesens M, és mtsai. Microscopic nephrocalcinosis in chronic kidney disease patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2015. május 1.;30(5):843–8.
104. Gimenez LF, Solez K, Gordon Walker W. Relation between renal calcium content and renal impairment in 246 human renal biopsies. *Kidney Int*. 1987. január;31(1):93–9.
105. Jankowski J, Floege J, Fliser D, Böhm M, Marx N. Cardiovascular Disease in Chronic Kidney Disease: Pathophysiological Insights and Therapeutic Options. *Circulation*. 2021. március 16.;143(11):1157–72.
106. Parivakkam Mani A, K S, Sundar R, Yadav S. Pulmonary Manifestations at Different Stages in the Chronic Kidney Disease: An Observational Study. *Cureus*. 2023. május;15(5):e39235.
107. Westenfeld R, Schäfer C, Smeets R, Brandenburg VM, Floege J, Ketteler M, és mtsai. Fetuin-A (AHSG) prevents extraosseous calcification induced by uraemia and phosphate challenge in mice. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2007. június;22(6):1537–46.
108. Hayashi K, Kitamura M, Tomura H, Yamaguchi K, Kawazu T, Sawase K, és mtsai. Hemodialysis Patient with Diffuse Liver Calcification After Septic Shock. *Am J Case Rep*. 2021. október 28.;22:e933386.
109. Kinjo K, Yamashiro M, Akamine K, Kinjo M, Oshiro M. Diffuse hepatocellular calcification developing in a patient on chronic hemodialysis after ischemic hepatitis. *Intern Med Tokyo Jpn*. 2007;46(20):1729–33.
110. Miglinas M, Cesniene U, Janusaite MM, Vinikovas A. Cerebrovascular Disease and Cognition in Chronic Kidney Disease Patients. *Front Cardiovasc Med*. 2020;7:96.
111. Vinters HV, Magaki SD, Williams CK. Neuropathologic Findings in Chronic Kidney Disease (CKD). *J Stroke Cerebrovasc Dis Off J Natl Stroke Assoc*. 2021. szeptember;30(9):105657.
112. Bugnicourt JM, Chillon JM, Massy ZA, Canaple S, Lamy C, Deramond HAA, és mtsai. High Prevalence of Intracranial Artery Calcification in Stroke Patients with CKD: A Retrospective Study. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009. 0;4(2):284.
113. Klaassen-Broekema N, van Bijsterveld OP. Limbal and corneal calcification in patients with chronic renal failure. *Br J Ophthalmol*. 1993. szeptember;77(9):569–71.
114. Seyahi N, Altiparmak MR, Kahveci A, Yetik H, Kanberoglu K, Serdengecti K, és mtsai. Association of conjunctival and corneal calcification with vascular calcification in dialysis patients. *Am J Kidney Dis*. 2005. március 1.;45(3):550–6.
115. Ababneh H, Tóth A, Lente G, Balogh E, Csiki DM, Nagy B, és mtsai. High phosphate and calcium induce osteoblastic phenotype switching and calcification of corneal epithelial cells in a Runx2-dependent and synergistic manner; a possible mechanism of chronic kidney disease-associated corneal calcification. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*. 2024. június 1.;1870(5):167171.

116. Lee YW, Tan MH, Bavanandan S, Bee BC, Lim CTS, Mohd R, és mtsai. Calcific Uremic Arteriopathy (CUA) Among Malaysian Dialysis Patients: Clinical Characteristics, Treatment, and Outcomes. *Cureus*. 2024;16(11):e73711.
117. Masuda M, Miyazaki-Anzai S, Keenan AL, Shiozaki Y, Okamura K, Chick WS, és mtsai. Activating transcription factor-4 promotes mineralization in vascular smooth muscle cells. *JCI Insight*. 2016;1(18):e88646.

13. 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/539/2025.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Lente Gréta

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

MTMT azonosító: 10089904

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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

További közlemények

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





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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 36,937

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 9,7

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

Debrecen, 2025.10.03.



14. Tárgyszavak

Krónikus veseelégtelenség, foszfát, kalcium, vaszkuláris meszesedés, OsteoSense festék, lágyrész meszesedés, oszteogén differenciálódás, hipoxia, HIF1 útvonal, Endoplazmatikus retikulum stressz, Daprodustat, mineralizáció

Chronic kidney disease, phosphate, calcium, vascular calcification, Osteosense dye, soft tissue calcification, osteogenic differentiation, hypoxia, HIF1 signalling pathway, ER stress, Daprodustat, ectopic mineralization

15. Függelék