

# **DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**A hipoxia-indukált faktor (HIF) jelátviteli útvonal  
aktivációjának szerepe a billentyű intersticiális sejtek  
oszteogén differenciálódásában és kalcifikációjában**

**Csiki Dávid Máté**

**Témavezető: Dr. Jeney Viktória**



**DEBRECENI EGYETEM**

**MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2023**

## Tartalomjegyzék

<b>I. Bevezetés</b>	<b>5</b>
<b>II. Irodalmi áttekintés</b>	<b>6</b>
<b>II.1. A kardiovaszkuláris rendszer kalcifikációja</b>	<b>6</b>
<b>II.2. Intima kalcifikáció</b>	<b>6</b>
<b>II.3. Média kalcifikáció</b>	<b>7</b>
<b>II.4. Aorta szívbillentyű kalcifikáció</b>	<b>7</b>
<b>II.4.1. A szív anatómiája és funkciója</b>	<b>7</b>
<b>II.4.2. Aortabillentyű</b>	<b>8</b>
<b>II.4.3. Aorta sztenózis</b>	<b>9</b>
<b>II.4.4. A billentyű kalcifikáció patofiziológiája</b>	<b>10</b>
<b>II.5. A foszfát és kalcium szerepe CKD-asszociált vaszkuláris és szívbillentyű kalcifikációban</b>	<b>12</b>
<b>II.6. A ROS szerepe a vaszkuláris és szívbillentyű kalcifikációban</b>	<b>13</b>
<b>II.7. A hipoxia szerepe a CKD-asszociált vaszkuláris és szívbillentyű kalcifikációban</b>	<b>14</b>
<b>III. Célkitűzés</b>	<b>17</b>
<b>IV. Anyagok és módszerek</b>	<b>18</b>
<b>IV.1. Sejttenyésztés</b>	<b>18</b>
<b>IV.2. Kalcifikáció indukálása</b>	<b>18</b>
<b>IV.3. Hipoxiás kezelés</b>	<b>18</b>
<b>IV.4. Alizarin vörös festés</b>	<b>19</b>
<b>IV.5. Kalcium depozitumok mennyiségi meghatározása</b>	<b>19</b>
<b>IV.6. A sejtek életképességének meghatározása</b>	<b>19</b>
<b>IV.7. Western blot analízis</b>	<b>20</b>
<b>IV.8. Géncsendesítés</b>	<b>21</b>
<b>IV.9. Az intracelluláris ROS képződés mennyiségi meghatározása</b>	<b>21</b>
<b>IV.10. Egér kísérletek</b>	<b>21</b>
<b>IV.11. A vesefunkció és az anémia laboratóriumi paramétereinek meghatározása egerekben</b>	<b>22</b>
<b>IV.12. Kalcifikáció detektálása Osteosense festéssel</b>	<b>22</b>
<b>IV.13. Hisztológia</b>	<b>22</b>
<b>IV.14. Statisztikai analízis</b>	<b>22</b>
<b>V. Eredmények</b>	<b>23</b>
<b>V.1. A szívbillentyű intersticiális sejtek OM-indukált oszteogén irányú differenciálódása és extracelluláris mátrix kalcifikációja</b>	<b>23</b>
<b>V.2. A hipoxia jelátviteli útvonal szerepe a szívbillentyű intersticiális sejtek OM-indukált kalcifikációjában</b>	<b>23</b>

<i>V.3. A hipoxia fokozza a szívbillentyű intersticiális sejtek OM-indukált oszteogén irányú differenciálódását és extracelluláris mátrix kalcifikációját</i>	24
<i>V.4. A hipoxia HIF-1<math>\alpha</math> és HIF-2<math>\alpha</math> függő módon fokozza a szívbillentyű intersticiális sejtek OM-indukált extracelluláris mátrix kalcifikációját</i>	26
<i>V.5. A hipoxia mimetikumok fokozzák a szívbillentyű intersticiális sejtek OM-indukált kalcifikációját</i>	28
<i>V.6. A ROS szerepe a szívbillentyű intersticiális sejtek kalcifikációjában</i>	30
<i>V.7. A DPD fokozza a szívbillentyű kalcifikációját in vivo CKD egérmodellben</i>	31
<i>V.8. A hipoxia fokozza a humán aorta simaizomsejtek magas foszfáttal indukált kalcifikációját</i>	33
<i>VI. Megbeszélés</i>	35
<i>VII. Konklúziók</i>	39
<i>VIII. Összefoglalás</i>	40
<i>IX. Summary</i>	41
<i>X. Köszönetnyilvánítás</i>	42
<i>XI. Irodalomjegyzék</i>	43
<i>XII. Publikációs lista</i>	51
<i>XIII. Tárgyszavak</i>	53
<i>XIV. Függelék</i>	54

## Rövidítések jegyzéke

**ALP:** alkalikus foszfatáz

**ATP:** adenzin-trifoszfát

**AV:** alizarin vörös

**BMP-2:** csont morfogenetikus fehérje 2

**Ca:** kalcium

**CC:** kobalt-klorid

**CKD:** krónikus veseelégtelenség

**DFO:** deferoxamin

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle's Medium

**DPD:** Daprodustat

**ECM:** extracelluláris mátrix

**ESA:** eritropoézis stimuláló ágens

**FBS:** főtális borjú szérum

**Glut-1:** glükóz transzporter 1

**HAoSMC:** humán aorta simaizomsejt

**HIF:** hipoxia-indukált faktor

**LDL:** alacsony denzitású lipoprotein

**Lp(a):** lipoprotein(a)

**NAC:** N-acetil-cisztein

**OCN:** oszteokalcin

**OM:** oszteogén médium

**PBS:** foszfáttal pufferolt sóoldat

**PHI:** prolil-hidroxiláz inhibitor

**Pi:** inorganikus foszfát

**ROS:** reaktív oxigén gyökök

**Runx2:** runt-related transzkripció faktor 2

**SDS:** nátrium-dodecil-szulfát

**Sox9:** sry-box transzkripció faktor 9

**VEC:** szívbillentyű endotéliális sejt

**VEGF:** vaszkuláris endotéliális növekedési faktor

**VIC:** szívbillentyű intersticiális sejt

**VSMC:** vaszkuláris simaizomsejt

## I. Bevezetés

Az aortabillentyű szűkület (aorta sztenózis) a fejlett országok leggyakoribb kardiovaszkuláris eredetű megbetegedése. Az érintettek kezdetben gyengeségre, fáradékonyságra panaszkodnak, majd a betegség előrehaladtával egyre súlyosabb tüneteket (szédülés, eszméletvesztés) tapasztalnak, mely akár halálhoz is vezethet. A megfelelő diagnózis felállítása különböző képalkotó diagnosztikai módszerekkel történik. A kialakult aorta sztenózis egyetlen hatékony terápiája a problémát okozó aortabillentyű műbillentyűre vagy állati eredetű billentyűre történő cseréje.

Az aorta sztenózist évtizedeken keresztül egy passzív, az öregedéssel együtt járó folyamatnak tekintették, melyet a kalcium sók szívbillentyűre történő lerakódásával magyaráztak. Mára számos kutatási eredmény igazolta, hogy a billentyű elváltozása egy szabályozott folyamat, mely a szívbillentyűt alkotó endotél sejtek (VEC) és az intersticiális sejtek (VIC) aktív részvételével zajlik. Az elváltozás kezdeti fázisát az endotél diszfunkció, az alacsony sűrűségű lipoprotein (LDL) retenció és az immunsejtek infiltrációja jellemzi, melyet a VIC-ek fenotípus váltása és a billentyű kalcifikációja követ.

Kialakulásában és progressziójában számos rizikófaktor játszik szerepet. A betegséget okozhatja veleszületett genetikai rendellenesség, az aortabillentyűket érő túlzott mechanikai stressz (pl. magas vérnyomás), továbbá különböző metabolikus rendellenességgel (pl. diabétesz) és egyéb súlyos betegséggel (pl. krónikus veseelégtelenség) társulva is előfordulhat.

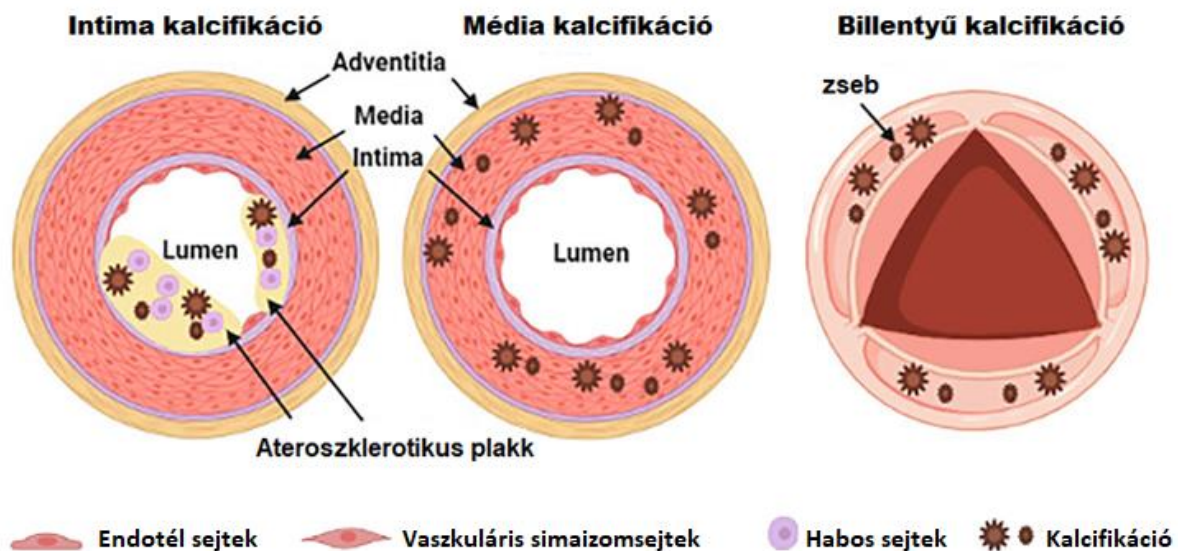
A végstádiumú krónikus veseelégtelenségben (CKD) szenvedő betegek körében gyakori a szívbillentyű kalcifikációja, amely az egyik leggyakoribb mortalitásért felelős kardiovaszkuláris szövődmény. Számos kutatási eredmény bizonyítja, hogy a CKD betegben jelenlevő hiperfoszfátémia és hiperkalcémia a vaszkuláris kalcifikáción túl, a szívbillentyű kalcifikáció legfőbb induktorai is, melyek a VIC-ek oszteogén irányú differenciálódását és kalcifikációját indukálják.

Kutatócsoportunk és más kutatók munkája rámutatott arra, hogy a szöveti hipoxia kóroki szereppel bír a vaszkuláris kalcifikáció kialakulása során. A kalcifikált billentyű jellemzője a szöveti hipoxia, mely területileg nagyfokú átfedést mutat a kalcifikálódott régióval. Ugyanakkor a hipoxia kóroki szerepe nem tisztázott szívbillentyű kalcifikációban és a háttérben álló sejtes mechanizmusban, a VIC-ek oszteogén irányú differenciálódásában sem. Ezért munkám célja a hipoxia és a HIF jelátviteli útvonal szerepének vizsgálata volt VIC-ek oszteogén irányú differenciálódásában, és a szívbillentyű kalcifikációjában CKD egérmodellben.

## II. Irodalmi áttekintés

### II.1. A kardiovaszkuláris rendszer kalcifikációja

Az érrendszert érintő ektópiás kalcifikációt hosszú időn keresztül az öregedéssel együtt járó passzív, degeneratív folyamatnak tekintették. Mára viszont számos kutatási eredménynek köszönhetően világossá vált, hogy a kalcifikáció különböző érfali sejtek által aktívan szabályozott folyamat, mely foszfátban és kalciumban gazdag hidroxipatit kristályok lerakódásához vezet az érfalban [1,2]. Jelenlegi ismereteink alapján a kalcifikáció kialakulásának elsődleges oka a kalcifikációt gátló inhibitorok (pl. pirofoszfát, mátrix Gla protein, fetuin-A) és a kalcifikációért felelős induktorok (pl. foszfát, kalcium, inflammatorikus citokinek) közötti egyensúly megbomlása [2,3]. Megjelenési formája szerint három fő típust különböztetünk meg: az intima, a média és a billentyű kalcifikációt (**1. ábra**) [1,4,5].



**1. ábra:** A kardiovaszkuláris rendszerben kialakuló kalcifikáció legfőbb típusai. Az intima kalcifikáció az érfal intima rétegében atheroszklerotikus plakkal asszociálva jelenik meg. Az média kalcifikáció az erek média rétegét teljes keresztmetszetében érintő kalcifikáció. A billentyű kalcifikáció főként az aortabillentyűt érintő kalcifikáció [4].

### II.2. Intima kalcifikáció

Az intima kalcifikáció az érfal legbelső rétegében az intimában alakul ki, jellemzően fokálisan, atheroszklerotikus plakkokkal asszociálva jelenik meg [6]. Az intima kalcifikáció legfőbb rizikófaktorai a plazma magas koleszterin és LDL szintje [7,8]. Az atheroszklerózis egy hosszú évek alatt kialakuló, komplex folyamat, melynek kezdeti fázisában az endothel sejtek aktivációja, az LDL endothelialis transzcitózisa és szubendothelialis retenciója, valamint az immunsejtek (makrofágok, T-limfociták) plakkba történő infiltrációja következik be [7,8]. A

plakk progressziója során az érfali simaizomsejtek sokrétű szerepet játszanak. Plaszticitásuk révén különböző stimulusok hatására különböző fenotípus változáson mennek keresztül. Az érfali simaizomsejtek a módosult LDL-ek hatására habos sejtekké, szöveti sérülésre reagálva szintetikus sejtekké, oszteogén stimulusokra reagálva pedig csontsejt-szerű sejtekké differenciálódnak [9]. A szintetikus sejtek az extracelluláris mátrixot (ECM) felépítő fehérjék (kollagén, proteoglikán, elasztin) fokozott expressziója révén a plakkokat ruptúrától védő fibrózus sapka kialakításában, míg az oszteoblaszt-szerű sejtek a plakk kalcifikációjában játszanak szerepet [10]. Az intima kalcifikáció megjelenési formája szerint lehet mikrokalcifikáció, vagy makrokalcifikáció, melyek eltérő módon befolyásolják a plakkok stabilitását [11]. A makrokalcifikáció főként a vastag fibrózus sapkával rendelkező stabil plakkok jellemzője, ezzel szemben a mikrokalcifikáció a vékony fibrózus sapkával rendelkező instabil plakkokban figyelhető meg [11,12].

### **II.3. Média kalcifikáció**

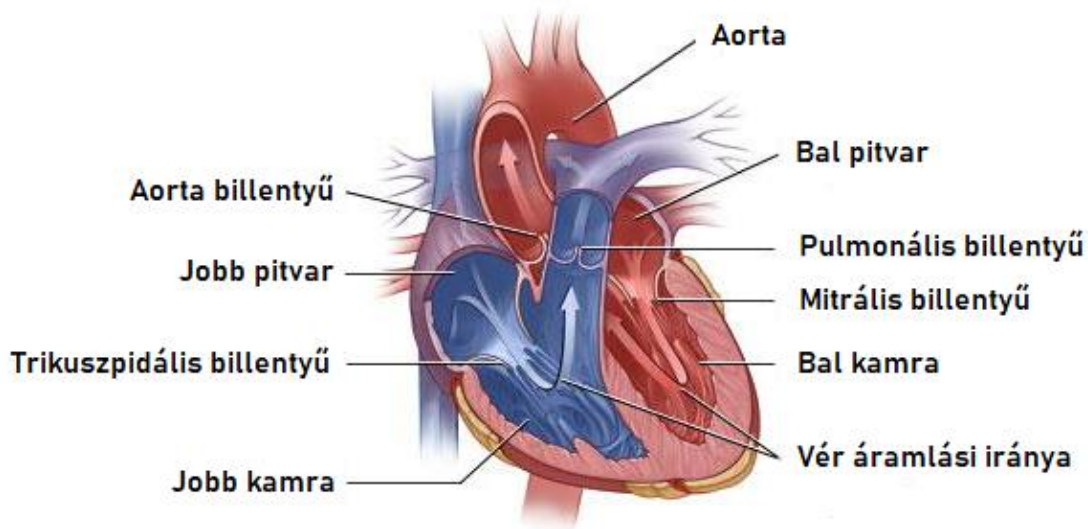
A második fő típus az erek média rétegét érintő kalcifikáció, az úgynevezett Mönckeberg szklerózis [13,14]. Ez a típus jellemzően az erek média rétegének teljes keresztmetszetét érintő diffúz kalcifikációként van jelen, melynek következtében kialakuló érfalmerevség a bal kamrai hipertrófián keresztül szívelégtelenséghez vezet [14,15]. Főként krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegek körében gyakori, ahol a legfőbb induktorok a vesefunkció romlása miatt kialakult hiperfoszfátémia, illetve a kalcium anyagcsere zavar, és a kalcium tartalmú foszfát kötők terápiás alkalmazása miatt kialakuló hiperkalcémia. A CKD betegek fokozott kalcifikációs hajlamához a kalcifikációs induktorok jelenléte mellett a kalcifikációs inhibitorok csökkent szintje is hozzájárulhat. Kimutatták, hogy CKD betegek plazmájában alacsonyabb a kalcifikációs inhibitorok, a pirofoszfát és a fetuin-A szintje [16,17]. A CKD betegek korai halálzásának hátterében többnyire kardiovaszkuláris szövődmények állnak, melyek kialakulásában a média kalcifikáció jelentős szerepet játszik [18,19].

### **II.4. Aorta szívbillentyű kalcifikáció**

#### **II.4.1. A szív anatómiája és funkciója**

A szív egy ökölnyi nagyságú, üreges, izmos falú szerv, mely a mellkas középvonalától kissé balra, a szegycsont mögött helyezkedik el. Legkülső rétege a szívburok (perikardium), amely egy kettős rétegű hártya. A középső rétege a szívizomzat (miokardium), a legbelső réteget pedig a szívbelhártya (endokardium) alkotja [20]. A szív vérellátását az aortából eredő koszorúerek biztosítják. Anatómiailag két fő részből: jobb és bal szívfélből áll, melyek további két részre:

pitvarokra és kamrákra oszlanak. A pitvarokat és a kamrákat a vitorlás mitrális és trikuszipidális billentyű, míg a kamrákat az aortától a zsebes aorta és pulmonális billentyű választja el egymástól (2. ábra) [21].



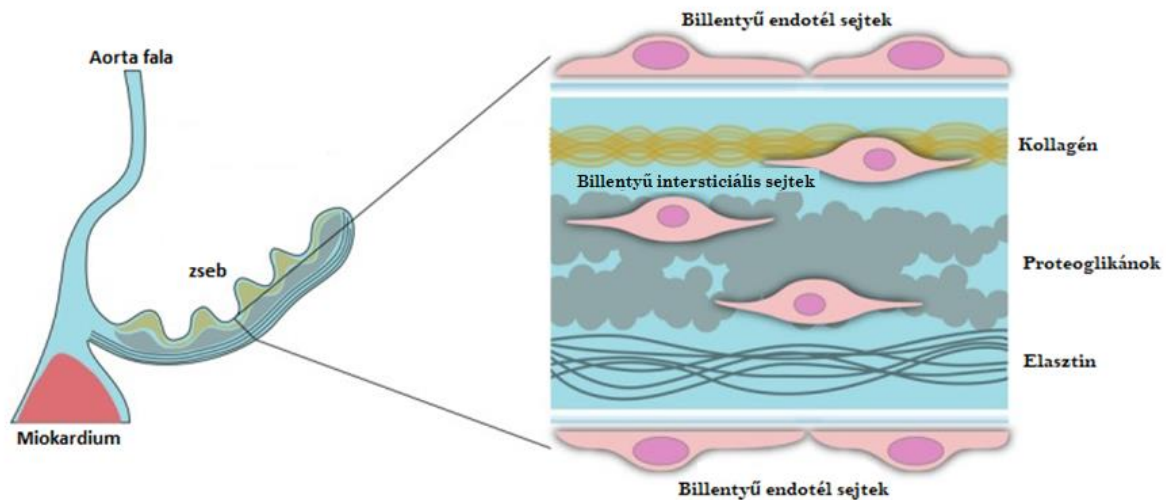
**2. ábra:** A szív felépítésének sematikus ábrázolása. A szív belsejében négy üreg található, két pitvar és két kamra. A jobb pitvarban és a jobb kamrában mindig szén-dioxidban gazdag, a bal oldali üregekben pedig oxigéndús vér áramlik. Az áramlás irányát az üregek közötti billentyűk teszik egyirányúvá. Forrás: <https://www.umevc.org/conditions-treatments/comprehensive-heart-valve-program>

A szív a szervek és szövetek oxigéndús vérellátását a pitvarok és kamrák szigorúan szabályozott, ritmikus összehúzódása révén biztosítja, mely során a szívbillentyűk szelepszerű működésük révén segítik elő a vér meghatározott irányba történő áramlását. A szervezet által elhasznált, szén-dioxidban dús vér a jobb pitvaron keresztül a jobb kamrába jut, majd a tüdőartérián keresztül a tüdőbe, ahol megtörténik a gázcsere. Ezt követően az oxigéndús vér a bal pitvaron keresztül a bal kamrába jut, mely a szív pumpafunkciójának köszönhetően az aortán keresztül biztosítja a különböző szervek és szövetek megfelelő vérellátását [21].

#### II.4.2. Aortabillentyű

Az aortabillentyű avaszkuláris, metabolikusan aktív szövet, mely az aorta szájadékában helyezkedik el, amit egy fibrózus gyűrű kapcsol a bal kamrához. A billentyű három darab félhold alakú zsebből áll, és az egyes zsebek három rétegből tevődnek össze. Ugyanakkor előfordulhat, hogy egy fejlődési rendellenesség következtében csak kétszebes aortabillentyű alakul ki [22,23]. Az első réteg a fibrózus, mely I-es és III-as típusú kollagénben, a második réteg a szivacsos, mely proteoglikánokban, a harmadik ventrikuláris réteg pedig elasztinban

gazdag. A billentyűt kívülről a szívbillentyű endotél sejtek borítják, míg a belső rétegeket a szívbillentyű intersticiális sejtek alkotják (3. ábra) [22,23].

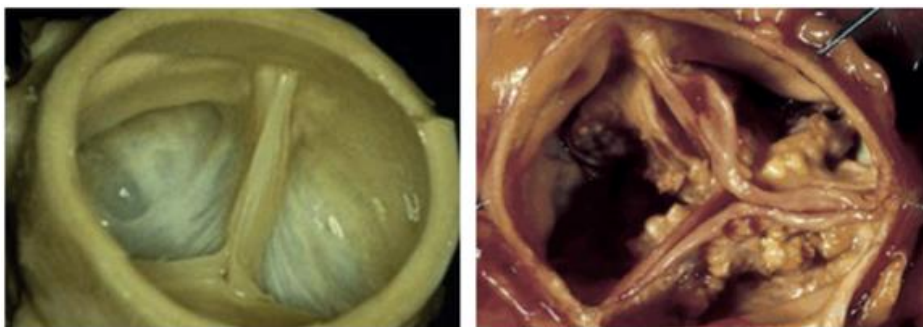


**3. ábra: Az aortabillentyű felépítésének sematikus ábrázolása.** Az aortabillentyűt kívülről a VEC-ek borítják, míg a belső réteget a VIC-ek alkotják, mely kollagénben, proteoglikánban, és elasztinban gazdag extracelluláris mátrixszal rendelkezik [22].

Az aortabillentyű fő funkciója a bal kamrából az aortába irányuló véráramlás szabályozása. A bal kamra összehúzódása során (szisztolé) a nyomás nő, ami az aortabillentyű kinyílását eredményezi. Ez lehetővé teszi az oxigéndús vér kipumpálását a bal kamrából az aortába, mely a szisztémás keringés ellátásáért felelős. A bal kamra ellazulásakor (diasztolé) az aortában a nyomás meghaladja a kamrában lévőét, ami az aortabillentyű bezáródását eredményezi, ezzel megakadályozva a vér visszaáramlását [22,23].

### II.4.3. Aorta sztenózis

Az aorta sztenózis, vagy másnéven az aortabillentyű szűkülete az egyik leggyakoribb szívbillentyű betegség a fejlett országokban, melyet a szívbillentyűk kalcifikációja okoz (4. ábra) [24,25]. Kialakulásának valószínűsége a kor előrehaladtával nő, a 65 év feletti populáció mintegy 25%-a érintett [26,27]. A szívbillentyűk elégtelen működésének következtében kialakuló nem megfelelő véráramlás enyhébb esetben fáradékonysághoz, gyengeséghez, súlyosabb esetben eszméletvesztéshez és halálhoz is vezethet, a mortalitási ráta közel 50% [28]. Jelenleg az egyetlen hatékony terápia az aortabillentyűk cseréje, amely történhet mélyaltatásban nyitott szívműtét útján, vagy pedig helyi érzéstelenítésben végzett katéteres aortabillentyű-beültetéssel [29,30].



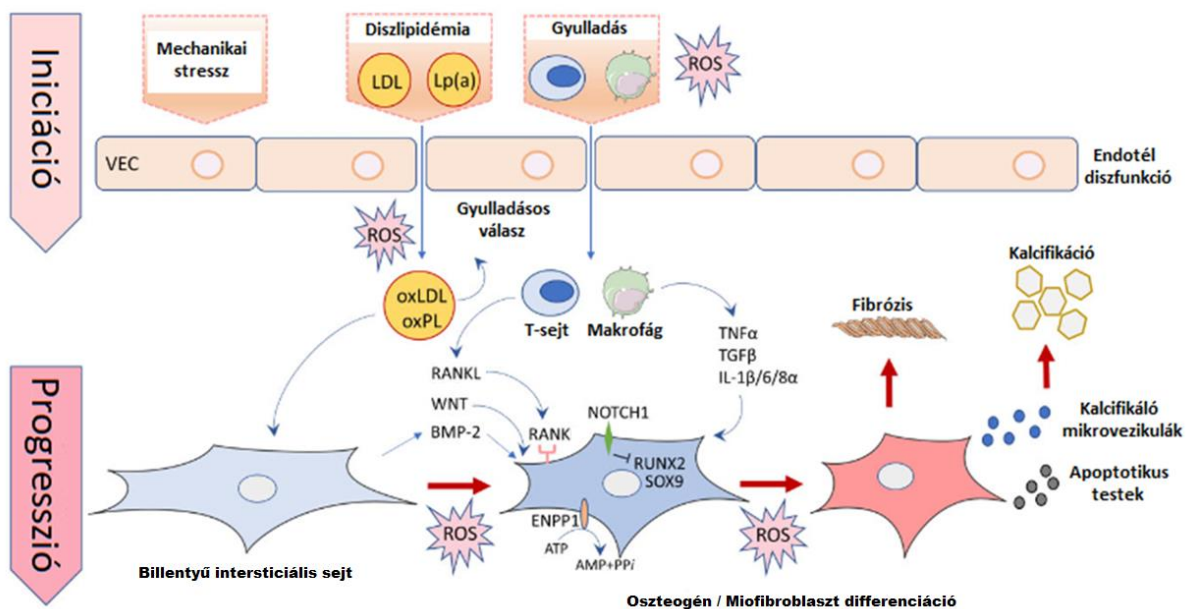
**4. ábra: Aortabillentyű kalcifikáció.** Az aortabillentyű kalcifikáció egy olyan patológiás elváltozás, ami a billentyű funkció romlása révén kardiovaszkuláris szövödmények kialakulásához vezet. Bal oldalon egy egészséges, a jobb oldalon pedig egy kalcifikált aortabillentyű makroszkópikus képe látható [24].

#### II.4.4. A billentyű kalcifikáció patofiziológiája

Az aorta sztenózist hosszú ideig keresztül egy passzív folyamatnak tekintették, azonban mára több kutatási eredmény igazolta, hogy a billentyű kalcifikáció egy aktív, sejtek által szabályozott folyamat [31]. A billentyű kalcifikáció kezdetben az intima kalcifikációval, míg az előrehaladott fázisban a média kalcifikáció folyamatával mutat hasonlóságot (**5. ábra**). Kialakulásában és progressziójában számos rizikófaktor játszik szerepet, például genetikai rendellenesség, aortabillentyűt érintő mechanikai stressz, továbbá ismert az is, hogy a szívbillentyű kalcifikáció diszlipidémiával, magas lipoprotein (a) ((Lp(a)) szinttel, valamint diabétesssel és egyéb metabolikus rendellenességekkel is társulhat [32,33].

Az aorta kalcifikáció kezdeti lépése az endotél aktiváció, melyet a fentebb említett rizikófaktorok idézhetnek elő [34]. Ennek hatására az aortabillentyű VEC-ek által alkotott rétegének az integritása sérül, ezáltal lehetővé válik a lipoproteinek ((LDL), (Lp(a)) bejutása és lerakódása a billentyű szubendotéliális rétegébe, ami krónikus gyulladást indukál [35]. Az endotél diszfunkció következtében a protektív endotéliális nitrogén-oxid szintáz (eNOS) útvonal sérül, emelkedik a NADPH-oxidáz szintje és fokozódik a reaktív oxigén gyökök (ROS) képződése. A ROS az infiltrálódott lipidek oxidatív módosulását (oxidált LDL (oxLDL), oxidált foszfolipid (oxPL)) idézi elő [36,37]. Az oxLDL a különböző sejt felszíni adhéziós molekulák expresszióját indukálja, melyre válaszként fokozódik az immunsejtek (monociták, makrofágok, T-sejtek) infiltrációja [38]. Az infiltrálódott immunsejtek pro-inflammatórikus citokineket (tumor nekrosis faktor (TNF), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6)) termelnek és fokozódik a nukleáris faktor kappa-B ligandum (RANKL) szekréciója [39,40]. Ennek hatására kialakul egy ROS-ban és gyulladással gazdag mikrokörnyezet, mely a szívbillentyű intersticiális sejtek miofibroblaszt és oszteogén irányú differenciálódását idézi elő [41]. A gyulladással gazdag mikrokörnyezet által kiváltott miofibroblaszt irányú differenciálódás a

kollagénben és elasztinban gazdag extracelluláris mátrix összetételének megváltozását eredményezi, mely fibrózishoz és a billentyű megvastagodáshoz vezet [42]. Ezzel szemben oszteogén differenciálódás során a gyulladásos citokinek a runt-related transzkripciós faktor 2 (Runx2) és a sry-box transzkripciós faktor 9 (Sox9) indukciója révén fokozzák az általuk szabályzott csont-morfogenikus (BMP-2) és az alkalikus foszfatáz (ALP) fehérjék expresszióját, mely a VIC-ek kalcifikációjához vezet. A mikrokalcifikáció tovább fokozódik a makrofágok és a VIC-ek által foszfátban és kalciumban gazdag, hidroxipatit tartalmú kalcifikáló mikrovezikulák és apoptotikus testek szekréciója révén, melyek a billentyű diffúz kalcifikációjához vezetnek [43].



**5. ábra: Az aorta szívbilentyű kalcifikáció patomechanizmusa.** A folyamat az endotél diszfunkcióval kezdődik, amelyet lipid lerakódás követ. A lipid lerakódás gyulladást indukál, mely immunsejtek infiltrációját eredményezi. Az infiltrálódott immunsejtek aktiválódnak és a VIC-ek oszteogén irányú differenciálódásán keresztül indukálják az aortabilentyű kalcifikációját. Ezt követően VIC-ek és a makrofágok kalcifikáló mikrovezikulák szekréciója révén az aortabilentyű diffúz kalcifikációját okozzák. ATP: adozin-trifoszfát; AMP: adozin-monofoszfát; BAV: kétzsebes aortabilentyű, ENPP1: ektonukleotid-pirofoszfátáz 1, IL: interleukin, NOTCH1: notch homológ 1, PPi: inorganikus pirofoszfát, TGFβ: transzformáló növekedési faktor β, TNFα: tumor nekrozis faktor α [43].

## II.5. A foszfát és kalcium szerepe CKD-asszociált vaszkuláris és szívbillentyű kalcifikációban

Élettani szempontból a foszfát nélkülözhetetlen a fogak és a csontok felépítésében [44]. A foszfát emellett a genetikai állományért felelős DNS és RNS alkotórésze, és számos egyéb biokémiai folyamatban, mint például az energiatermelésben is fontos szerepet játszik [45]. A táplálékkal bevitt foszfát abszorpciója a III-as típusú nátrium függő foszfát ko-transzportereken (PiT-1, PiT-2) keresztül az enterocitákban valósul meg [45]. A plazma fiziológiás foszfát szintjének (0,81 – 1,45 mmol/l) fenntartásért a vesék felelősek, melyek a szervezet számára felesleges foszfátot vizeletürítés révén távolítják el [46].

A foszfát mellett a kalciumnak is fontos élettani szerepe van. Az emberi szervezetben található kalcium nagy része (~99%) a csontokban és a fogakban található. Ezen kívül másodlagos hírvivőként kulcsszerepet játszik jelátviteli útvonalak szabályozásában, valamint a vérárvadásban és az izomkontrakcióban [47]. Felszívódása a duodénumban valósul meg aktív transzport folyamatok révén. A kalcium normál szintje a vérben 2,1-2,6 mmol/L, mely szigorúan szabályozott a kalcitonin és paratireoid hormonok (PTH) által, és normál körülmények között a kalcium a vese proximális tubulusaiban reabszorbeálódik [47,48].

A CKD-asszociált vaszkuláris kalcifikáció hátterében a vesefunkció romlásával járó ásványi- és csont anyagcserezavar eredményeképpen kialakuló hiperfoszfatémia és hiperkalcémia áll [46]. A kalcifikáció legfőbb induktora a magas foszfát szint, ami a vaszkuláris simaizomsejtek (VSMC-k) oszteogén irányú differenciálódását indukálja, melyet a emelkedett kalcium szint szinergista módon tovább fokoz [49,50].

Az oszteogén irányú differenciálódás során a VSMC-k fenotípus váltáson mennek keresztül, mely a VSMC-k a kontraktilis markereinek (pl.  $\alpha$ -simaizom aktin ( $\alpha$ -SMA), simaizom 22 $\alpha$  (SM22 $\alpha$ )) expressziójának csökkenésével jár, míg ezzel párhuzamosan az oszteogén transzkripciós faktorok (Runx2, Sox9) és az általuk szabályozott ALP és oszteokalcin (OCN) expressziója megemelkedik, ami az extracelluláris mátrix kalcifikációjához vezet [50,51]. A folyamat központi regulátora a Runx2, melynek szerepét bizonyítja, hogy simaizomsejt-specifikus deléciója esetén a kalcifikáció elmarad [52].

A CKD betegek körében rendkívül magas a kardiovaszkuláris eredetű elhalálozás. A hemodializált végstádiumú veseelégtelenségben szenvedő betegek esetén a szívbillentyű kalcifikáció prevalenciája nyolcszor nagyobb, és 10-20 évvel korábban jelenik meg az általános populációhoz viszonyítva [53]. A hiperfoszfatémia és a hiperkalcémia a vaszkuláris kalcifikáció mellett a szívbillentyű kalcifikáció induktorai is [54]. Számos bizonyíték van arra, hogy a

billentyű kalcifikáció egy aktív, sejtek által szabályozott folyamat, mely során a vaszkuláris kalcifikációhoz hasonlóan bekövetkezik a VIC-ek oszteogén irányú fenotípus váltása [32,54]. A VIC-ek oszteogén irányú differenciálódása során megemelkedik a Runx2, a BMP-2, az ALP, és az OCN expressziója, mely a sejtek kalcifikációjához vezet [54–56]. Továbbá, adenin és magas foszfát tartalmú diétával indukált krónikus vesebeteg patkány modellben kimutatták, hogy a foszfát szint emelkedése az oszteogén markerek és gyulladásos citokinek fokozott expressziója révén aortabillentyű kalcifikációt idéz elő [57].

## **II.6. A ROS szerepe a vaszkuláris és szívbillentyű kalcifikációban**

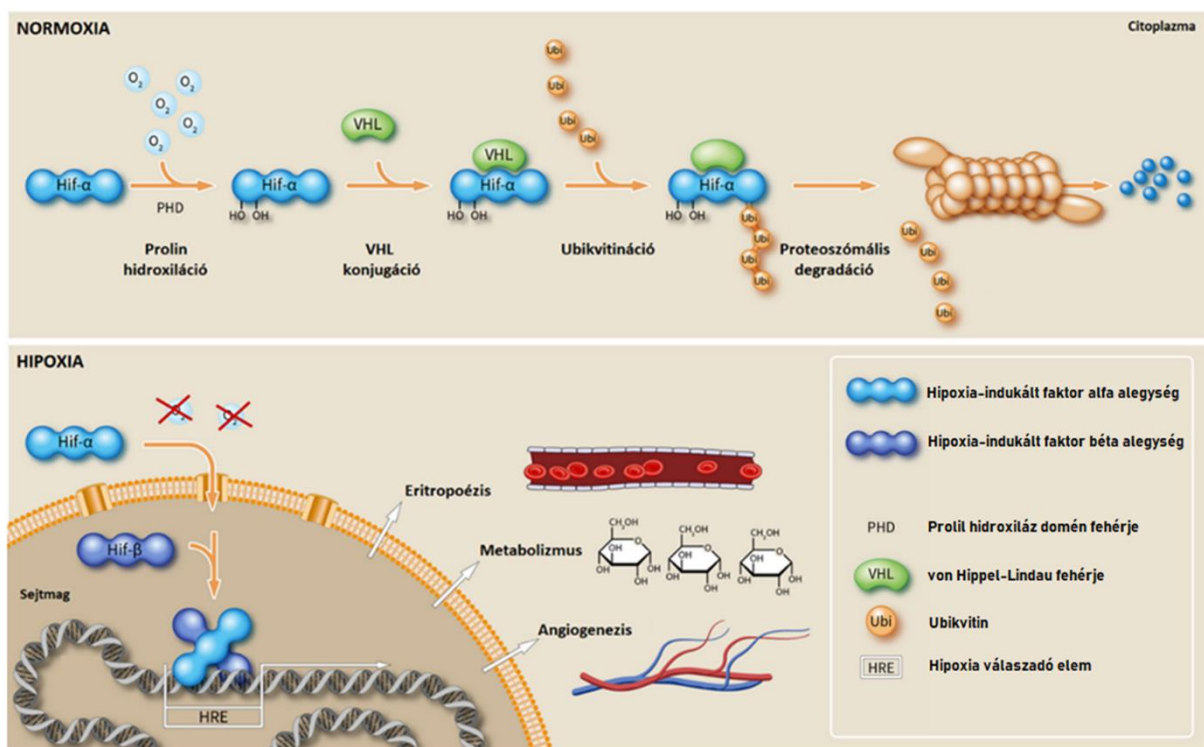
A reaktív oxigén gyökök különböző redox reakció során képződnek és számos jelátviteli útvonal aktiválásában vesznek részt. Fiziológias szintjét a ROS képződésért felelős oxidánsok és a ROS eliminálásért felelős antioxidánsok közötti egyensúly fenntartása szabályozza [58]. Amennyiben ez az egyensúly felborul a ROS képződés irányába, a túlzott mennyiségben képződő ROS oxidatív stressz kialakulásához vezet. Az oxidatív stressz pedig a különböző sejtalkotók (lipid, fehérje, DNS) strukturális és funkcionális károsítása révén szöveti károsodást okoz [59,60]. Az oxidatív stressz számos betegségben játszik kóroki szerepet, többek között a CKD-asszociált vaszkuláris kalcifikáció is összefüggésbe hozható emelkedett ROS képződéssel [61]. A VSMC-k kalcifikációja esetében a legfőbb ROS forrás a NADPH-oxidáz és a sejtek energiatermeléséért felelős organelluma, a mitokondrium. Ismert, hogy krónikus veseelégtelenségben jelenlévő magas foszfát szint fokozott ROS termelődést indukál, mely mitokondriális diszfunkción keresztül további ROS termeléshez vezet, melyet szoros összefüggésbe hoztak a kalcifikáció progressziójával [3]. Tanulmányok kimutatták, hogy különböző antioxidánsok alkalmazásával a ROS kalcifikációt fokozó hatása eredményesen gátolható, amely jelentős bizonyíték a ROS képződés vaszkuláris kalcifikációban betöltött szerepére [62,63].

A szív sejtjei rendkívül nagy energia igényűek, mely biztosításához nagy mennyiségű mitokondriumra van szükség. Az oxidatív stressz által előidézett mitokondriális diszfunkció csökkent ATP termeléshez és fokozott mitokondriális ROS képződéshez vezet, mely különböző szív- és érrendszeri betegségek kialakulását eredményezheti [23]. A szívbillentyű kalcifikáció tanulmányozása során egyre nagyobb szerepet tulajdonítanak a fokozott ROS képződésnek, melynek oka az antioxidáns rendszer sérülése [54,64]. Tanulmányok igazolták, hogy a túlzott ROS képződés a VIC-ek oszteogén irányú differenciálódását indukálja és ezáltal kitüntetett szerepet játszik az aortabillentyű kalcifikáció iniciációjában és progressziójában [43,54,65].

Ezen túlmenően emelkedett ROS képződést, valamint az oszteogén markerek megnövekedett expresszióját detektálták kalcifikált humán aortabillentyűkben [55,56,66].

## II.7. A hipoxia szerepe a CKD-asszociált vaszkuláris és szívbillentyű kalcifikációban

A szervezet élettani működésének fenntartásához létfontosságú a szövetek megfelelő oxigénellátása. Az oxigén szint csökkenése érintheti az egész szervezetet vagy csak egyes szöveteket [67]. Az emberi szervezet komplex adaptációs és túlélési mechanizmusokat fejlesztett ki a hipoxiás állapot kivédésére, illetve a hipoxia által okozott károsodás csökkentésére. Tartós hipoxia esetén fokozódik a vörösvérsejtképzés és az új erek képződése (angiogenezis), melynek célja a hipoxiás terület vérellátásának javítása [68].



**6. ábra: A HIF jelátviteli útvonal aktivációja.** A HIF- $\alpha$  alegység normoxiás körülmények között hidroxilálódik, ubikvitinálódik majd ezt követően proteozómálisan degradálódik. Hipoxiás környezetben a HIF- $\alpha$  alegység hidroxilációja elmarad, stabilizálódik és a sejtmagba transzlokálódik, ahol heterodimert képez a HIF- $\beta$  alegységgel. Az aktív HIF a hipoxia válaszzelemeket tartalmazó gének promóter régióihoz kötődve indukálja a hipoxia által szabályozott gének transzkripcióját. Forrás: [www.hegasy.de](http://www.hegasy.de)

A szervezetet érő hipoxiára adott válasz kialakítását a HIF szabályozza (**6. ábra**). A HIF egy heterodimer transzkripciós faktor, amely egy konstitutívan expresszálódó stabil béta (HIF- $\beta$ ), és egy oxigén érzékeny instabil alfa (HIF- $\alpha$ ) alegységből áll [69,70]. A HIF- $\alpha$  alegységnek

három izoformája ismert, a HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  és a HIF-3 $\alpha$ , melyek bármelyike képes heterodimert képezni a hipoxia-indukált faktor  $\beta$  (HIF- $\beta$ ) alegységgel. A HIF jelátviteli útvonal szabályzásában kiemelt fontosságúak a vas és  $\alpha$ -ketoglutarát függő prolil-hidroxiláz enzimek, melyek molekuláris oxigén jelenlétében a HIF- $\alpha$  alegységek hidroxilációját végzik. Ezt követően a hidroxilált HIF- $\alpha$  alegységek ubikvitinálódnak és proteozómálisan degradálódnak, ezáltal képesek megakadályozni a HIF aktív formájának kialakulását és a HIF jelátviteli útvonal aktiválódását [71,72].

Csökkent szöveti oxigén szint esetén a prolil-hidroxiláz enzimek inaktiválódnak, melynek hatására a HIF- $\alpha$  alegység hidroxilációja elmarad. A citoplazmában a nem hidroxilált HIF- $\alpha$  alegység szintje megemelkedik, majd a nukleuszba transzlokálódik, ahol a HIF- $\beta$  alegységgel heterodimert képezve kialakul az aktív HIF forma, ami a hipoxia válaszelemeket tartalmazó gének promóter régiójában található hipoxia válaszadó elemhez (HRE) kötődve indukálja a hipoxia célgének transzkripcióját [73,74].

A szöveti hipoxia számos betegség esetén megfigyelhető, jelenléte ismert krónikus veseelégtelenségben is [75]. Kimutatták a HIF-1 jelenlétét CKD betegek veséjében, melyet a CKD progressziójával hoztak összefüggésbe [76]. A hipoxia CKD-asszociált vaszkuláris kalcifikációban betöltött szerepének tanulmányozása során Mokas és munkatársai kimutatták, hogy a magas foszfát a HIF-1 jelátviteli útvonal aktivációján keresztül fokozza a VSMC-k foszfáttal indukált oszteogén irányú differenciálódását és kalcifikációját [77]. Továbbá fokozott HIF-1 $\alpha$  expressziót mutattak ki krónikus veseelégtelen patkányok aortájában [77]. A hipoxia foszfát által indukált kalcifikációban betöltött szerepének további bizonyítéka, hogy a simaizom-specifikus HIF-1 $\alpha$  deficiens egerekből izolált aorta simaizomsejtekben a kalcifikáció elmarad [77].

Ismert, hogy a CKD gyakran társul anémiával, ami rendszeres kórházi kezelésekkal jár, ezzel jelentősen rontva a betegek életminőségét. A CKD-asszociált anémia elsődleges oka a károsodott veseműködés miatt bekövetkezett csökkent eritropoetin termelés [78]. A CKD-hoz társuló anémia kezelésére eritropoézis stimuláló ágenseket (ESA) alkalmaztak, melyek használatakor jelentősen megnőtt a kardiovaszkuláris események előfordulási gyakorisága [78]. Ez új, alternatív terápiás lehetőségek kifejlesztését sürgette, mely a HIF-1 útvonal aktiválását célozta meg úgynevezett prolil-hidroxiláz inhibitorok (PHI) segítségével [79]. Ezek az inhibitorok a HIF-1 útvonal aktiválásán keresztül fokozzák az eritropoézist és a vas mobilizációját a csontvelőből [79]. A legígéretesebb PHI a Daprodustat (DPD), melyet törzskönyvezték és 2020 óta alkalmaznak Japánban CKD-asszociált anémia kezelésére [80]. A klinikai tanulmányok nem vizsgálták a szer kardiovaszkuláris rizikóra gyakorolt hatását

egészen 2021-ig, amikor Singh és társai az ASCEND-D tanulmányban megállapították, hogy a DPD kezelés alatt álló CKD betegek körében a kardiovaszkuláris események bekövetkezése hasonló arányban volt megfigyelhető, mint az ESA-k közé tartozó darbepoetin alfa kezelésben részesülő betegekben [81]. Kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy a DPD fokozza a vaszkuláris simaizomsejtek magas foszfáttal indukált kalcifikációját *in vitro* [82].

Az aortabillentyű vérellátását és oxigenizációját normál esetben a szisztémás keringés diffúzió révén biztosítja. Aorta sztenózis következtében megvastagszik az aortabillentyű, melynek hatására csökken a VIC-ek vér- és oxigén ellátása, ami a billentyű csökkent funkciójához vezet [83]. Számos kutatási eredmény bizonyítja neovaszularizáció jelenlétét megvastagodott aortabillentyűkben, mely pozitív korrelációt mutat az aortabillentyű kalcifikációjával [84–86]. A neovaszularizáció hátterében a hipoxia jelátviteli útvonal aktivációja áll, mely során a HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  és a vaszkuláris endotéliális növekedési faktor (VEGF) fokozott expresszióját figyelték meg [87,88]. Továbbá, kimutatták a HIF-1 $\alpha$  és VEGF emelkedett szintjét kalcifikált humán aortabillentyűben is [87].

Munkánk során a HIF jelátviteli útvonal hipoxia általi aktivációjának szerepét vizsgáltuk a VIC-ek foszfát és kalcium által indukált oszteogén irányú differenciálódásában és kalcifikációjában *in vitro* és *in vivo* CKD-indukált egérmodellben.

### III. Célkitűzés

A rendelkezésünkre álló legfrissebb szakirodalmi adatok alapján az alábbi hipotéziseket fogalmaztuk meg.

**I. Hipotézis:** A magas foszfát és kalcium, mint kettős oszteogén stimulus a HIF jelátviteli útvonal aktivációján keresztül indukálja a VIC-ek oszteogén irányú differenciálódását és kalcifikációját *in vitro*.

- Oszteogén stimulus hatásának vizsgálata a VIC-ek oszteogén irányú differenciálódására és kalcifikációjára és a HIF jelátviteli útvonal aktivációjára.
- A HIF-1/2 jelátviteli útvonal gátlás hatásának vizsgálata VIC-ek oszteogén médium (OM)-indukált kalcifikációjára.

**II. Hipotézis:** A hipoxia a HIF jelátviteli útvonal aktivációján keresztül fokozza a VIC-ek OM-indukált oszteogén irányú differenciálódását és kalcifikációját *in vitro*.

- A hipoxia (1% O<sub>2</sub>) hatásának vizsgálata VIC-ek OM-indukált oszteogén differenciálódására és kalcifikációjára.
- A hipoxia és különböző hipoxia mimetikumok (Kobalt-klorid (CC), Deferoxamin (DFO), Daprodustat (DPD)) hatásának vizsgálata a VIC-ek HIF-1 $\alpha$  és HIF-2 $\alpha$  aktivációjára.
- A HIF-1/2 jelátviteli útvonal gátlás hatásának vizsgálata VIC-ek OM-indukált kalcifikációjára hipoxiás (1% O<sub>2</sub>, hipoxia mimetikumok) körülmények között.

**III. Hipotézis:** A hipoxia az emelkedett ROS termelődésén keresztül fokozza a VIC-ek oszteogén irányú differenciálódását és kalcifikációját *in vitro*.

- A hipoxia hatásának vizsgálata a VIC-ek ROS termelődésére.
- A ROS termelődés gátlás hatásának vizsgálata VIC-ek OM-indukált kalcifikációjára hipoxiás körülmények között.

**IV. Hipotézis:** a CKD-asszociált anémia kezelésére alkalmazott prolil-hidroxiláz inhibitor, a DPD fokozza a szívbillentyű kalcifikációt *in vivo*.

- A DPD hatásának vizsgálata a CKD-asszociált anémiára és a szív kalcifikációjára CKD egérmodellben *in vivo*.

**V. Hipotézis:** A hipoxia szinergista módon fokozza humán aorta simaizomsejtek (HAoSMC) magas foszfáttal indukált kalcifikációját.

- A hipoxia hatásának vizsgálata HAoSMC-k magas foszfáttal indukált kalcifikációjára.

## **IV. Anyagok és módszerek**

### **IV.1. Sejtenyésztés**

Kísérleteink során humán szívbillentyű intersticiális sejtekkel (VIC, P10462, Innoprot, Bizkaia, Spanyolország) és humán aorta simaizom sejtekkel (HAoSMC, 354-05A, Cell Applications, San Diego, CA, Egyesült Államok) dolgoztunk. A VIC-ek tenyésztéséhez 10%-os főtális borjú szérumot (FBS, Gibco, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, Egyesült Államok), 1% L-glutamint (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Egyesült Államok), 1% nátrium-piruvátot (Sigma-Aldrich), 1% antimikotikus és antibiotikus reagenst (Sigma-Aldrich) tartalmazó fibroblaszt tápfolyadékot (Fibroblast Medium, Innoprot) használtunk. A HAoSMC-ek tenyésztéséhez az előzőekben leírt mennyiségű reagensekkel kiegészített Dulbecco's Modified Eagle's Mediumot (DMEM, Sigma-Aldrich) tápfolyadékot használtunk. A sejteket 37°C-os hőmérsékletű inkubátorban tenyésztettük, 5% CO<sub>2</sub> szint mellett. Mindkét sejtípust 4 és 8 passzázs szám között konfluens állapotban használtuk.

### **IV.2. Kalcifikáció indukálása**

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

### **IV.3. Hipoxiás kezelés**

A hipoxiás körülmény biztosításához moduláris inkubátor kamrákat alkalmaztunk, amelyekbe a hipoxiás gázelegyet (94% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, Linde, Dublin, Írország) folyamatos, 0,1 L/perc áramlási sebességgel vezettük be. Néhány kísérletünkben különböző hipoxia mimetikumot: Daprodustat (DPD 20 µmol/L, MedChemExpress, Monmouth Junction, JC, Egyesült Államok), deferoxamin (DFO 40 µmol/L, Sigma-Aldrich), és kobalt-klorid (CC, 200 µmol/L, Sigma-Aldrich), valamint a HIF-1 inhibitor chetomint (12 nmol/L, Tocris Bioscience, Bristol, Egyesült Királyság) alkalmaztunk.

#### **IV.4. Alizarin vörös festés**

A sejtek kalcifikációjának detektálásához, a kalcium kötő alizarin vörös festéket használtuk. A folyamat során a 96 lyukú sejttenyésztő lemezen kezelt sejtekről óvatosan eltávolítottuk a médiumot, ezt követően foszfáttal pufferolt sóoldattal (PBS) mostuk őket, majd szobahőmérsékleten 20 percig 4%-os paraformaldehid oldattal fixáltuk a sejteket. Ezt követően a sejteket ismét átmostuk PBS oldattal, utána pedig 2%-os Alizarin vörös oldattal (pH 4,2, Sigma-Aldrich) szobahőmérsékleten festettük. Tíz perc után, a nem kötődött festéket többszöri desztillált vizes mosással eltávolítottuk, majd fényképet készítettünk a lemezről, és a bekötődött festéket feloldottuk 100 µl hexadecilpiridinium-klorid oldatban (100 mmol/L, Sigma-Aldrich). A mintákhoz tartozó abszorbancia értékeket mikrolemez olvasóval (TS 800, Biotek, Budapest, Magyarország) 562 nm-es hullámhosszon mértük.

#### **IV.5. Kalcium depozitumok mennyiségi meghatározása**

A kezeléseket 96 lyukú sejttenyésztő lemezen végeztük, melynek végén a sejtekről óvatosan eltávolítottuk a médiumot, majd PBS-sel mostuk. Ezt követően az extracelluláris mátrixot 100 µL sósavval (0,6 mol/L), szobahőmérsékleten 30 percig dekalcináltuk. A sósavas felülúszók kalcium tartalmának kvantitatív meghatározását kolorimetriás módszerrel végeztük (QuantiChrom Calcium Assay Kit, Gentaur Molecular Products, Kampenhout, Belgium) a gyártó által javasolt protokoll szerint. A dekalcinálást követően a sejteket PBS-sel ismét átmostuk, majd 0,1% nátrium-dodecil-szulfát (SDS, Sigma-Aldrich) és 0,1% nátrium-hidroxid tartalmú oldattal lizáltuk. A lizátumok fehérje koncentrációját BCA módszerrel (ThermoFisher Scientific) határoztuk meg. A sejtek kalcium tartalmát fehérjetartalomra normalizálva, mg Ca / mg fehérje arányban kifejezve adtuk meg.

#### **IV.6. A sejtek életképességének meghatározása**

A sejtek életképességének vizsgálatát 96 lyukú sejttenyésztő lemezen végeztük. A kísérlet végén a sejtekről óvatosan eltávolítottuk a médiumot és a sejtekhez 100 µL 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólium-bromid (MTT, 0,5 mg/ml, Sigma-Aldrich) reagenst adtunk, és a lemezt 37 °C-on 4 órán keresztül inkubáltuk. Ezt követően a sejtekhez adott MTT oldatot eltávolítottuk, és az inkubáció során képződött formazán kristályokat 100 µL dimetil-szulfoxidban (Sigma-Aldrich) feloldottuk, majd meghatároztuk a minták optikai denzitását 570 nm-es hullámhosszon. A kezelt sejtek életképességét a kezeletlen sejtek életképességéhez viszonyítva, százalékos arányban kifejezve adtuk meg.

## IV.7. Western blot analízis

A kezeléseket 6 lyukú sejtenyészti lemezen végeztük. A kezelés végén a sejtekről óvatosan eltávolítottuk a médiumot, PBS-sel mostuk, majd 120 µl Laemmli lízis pufferrel lizáltuk. A sejt lizátumokat 95 °C-os hőmérsékleten 5 percig denaturáltuk, majd szonikáltuk (Sonoplus, 3 x 10s, Bandelin Electronic GmbH, Berlin, Németország). A fehérjéket SDS poliakrilamid gélelektroforézissel (7,5-10%) méret szerint elválasztottuk (Mini Protean, 100V, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, Egyesült Államok), majd nitrocellulóz membránra (GE HealthCare, München, Németország) blottoltuk (Trans-blot SD, 45 perc, 12 V, Bio-Rad Laboratories.). Ezután szobahőmérsékleten egy órán keresztül 6%-os tejpor oldattal blokkoltuk a membránokat. Kísérleteink során a táblázatban felsorolt elsődleges antitesteket a megadott koncentrációkban 5%-os tejpor oldatban adtuk a membránokhoz, és egy teljes éjszakán keresztül inkubáltuk 4°C-on (**1. táblázat**). Az elsődleges antitestek bekötődése után a membránokat TBS-T-vel (Tris, 0,1% Tween 20) mostuk, majd torma peroxidázzal (HRP) konjugált anti-nyúl, illetve anti-egér (NA934, NA931, Amersham Biosciences, Amersham, Egyesült Királyság) másodlagos antitesttel (0,5 µg/ml) inkubáltuk szobahőmérsékleten 1 órán keresztül. Ezt követően a membránokat ismét TBS-T-vel mostuk, majd a bekötődött HRP-vel konjugált másodlagos antitestet Western ECL reagenssel (Bio-Rad Laboratories) detektáltuk. A kemilumineszcens jelet hagyományos módon, röntgenfilmen és digitális C-Digit Blot Scannerrel (LI-COR Bioscience, Lincoln, NE, Egyesült Államok) is detektáltuk. Ezután a membránokat 1:2000 hígításban alkalmazott anti-β-aktin antitesttel (sc-47778; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, Egyesült Államok) újra jelöltük és detektáltuk. A digitálisan detektált sávok esetében az intenzitás meghatározása a szoftverbe beépített analízáló alkalmazással történt, míg a hagyományos röntgen filmen detektált sávok intenzitásának meghatározásához a GelQuant szoftvert alkalmaztunk.

Fehérje	Cég, katalógusszám	Koncentráció
HIF-1α	GeneTex (Irvine, CA, USA), GTX127309	1 µg/ml
HIF-2α	Cell Signaling (Danvers, Massachusetts, USA), #7096	3 µg/ml
Glut-1	GeneTex (Irvine, CA, USA), GTX15309	0,25 µg/ml
Runx2	Proteintech (Rosemont, IL, USA), 20700-1-AP	0,6 µg/ml
Sox9	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), PA5-81966	0,1 µg/ml
ALP	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA), sc-365765	0,4 µg/ml

**1. táblázat: Az alkalmazott fehérjékre vonatkozó adatok.**

## **IV.8. Géncsendesítés**

A 60-80%-os konfluencia szintig felszaporított sejtek géncsendesítéséhez negatív kontroll (#4390843, ThermoFisher Scientific), targetált HIF-1 $\alpha$  (ID: 106498, ThermoFisher Scientific) és targetált HIF-2 $\alpha$  (ID: 106446, ThermoFisher Scientific) siRNS-sel transzfektáltuk a sejteket Lipofectamine® RNAiMAX reagenssel (Invitrogen, Waltham, MA, Egyesült Államok) a gyártó által javasolt protokoll szerint. A sejtek kalcifikációja 4-5 nap alatt történik meg, és mivel a géncsendesítés a protokoll szerint 72 óráig működik, ezért ezen kísérleteink során a géncsendesítést a harmadik napon megismételtük.

## **IV.9. Az intracelluláris ROS képződés mennyiségi meghatározása**

A kezeléseket 96 lyukú sejtenyésző lemezen végeztünk el. A kezelés végén a sejtekről óvatosan eltávolítottuk a médiumot, majd PBS-sel mostuk. Ezt követően az intracellulárisan képződő ROS mennyiségét CM-H2DCFDA kittel (Life Technologies, Carlsbad, CA, Egyesült Államok) határoztuk meg a gyártó által javasolt protokoll szerint. Egyes kísérletekben ROS inhibitor N-acetil-ciszteint (NAC, 1 mmol/L, Sigma-Aldrich) is alkalmaztunk.

## **IV.10. Egér kísérletek**

Az egerekkel végzett kísérleteinket a nemzetközi és egyetemi etikai szabályzatban foglaltak szerint, a Debreceni Egyetem Kutatásetikai Bizottsága által kiadott érvényes engedély (10/2021/DEMÁB) birtokában végeztük. Vizsgálataink során tizenöt darab, 8-10 hetes hím C57BL/6 egeret véletlenszerűen három csoportra: Ctrl, CKD, CKD+DPD osztottuk (n=5/csoport).

A CKD indukálásához kétfázisú diétát használtunk. Az első 6 hétben az egereket adenin (0,2%) és emelt foszfát (0,7%) tartalmú táppal etettük, majd ezt követően 3 héten keresztül adenin (0,2%) és magas foszfát (1,8%) tartalmú tápot kaptak (ssniff-Spezialdiäten GmbH, Soest, Németország). A DPD-t 1%-os metilcellulózban szuszpendáltuk, és naponta 15 mg/testsúly kg/nap dózisban orálisan adagoltuk a kétfázisú diéta második szakaszában a 7. és 9. hét között, míg ez idő alatt a CKD egerek azonos mennyiségű vivőanyagot kaptak. Az egerek életét CO<sub>2</sub> inhalációval oltottuk ki, majd szív punkcióval vért vettünk elemzés céljából.

#### **IV.11. A vesefunkció és az anémia laboratóriumi paramétereinek meghatározása egerekben**

Az egerek véréből származó minták foszfát, urea, kreatinin szintjeit Cobas® c502 készüléssel (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország) határoztuk meg, a citráttal antikoagulált vérminták elemzése pedig Siemens Advia-2120i hematológiai analizátorral (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY, Egyesült Államok) és a hozzá tartozó Multi Species szoftver 800 Mouse C57BL programmal történt.

#### **IV.12. Kalcifikáció detektálása Osteosense festéssel**

A lágyszövet kalcifikáció detektálásához Osteosense™ festéket (OsteoSense™ 680 EX, PerkinElmer, Waltham, MA, Egyesült Államok) alkalmaztunk. A kísérlet végén az egereket izofluránnal (Baxter, Deerfield, IL, Egyesült Államok) bódítottuk, majd ezt követően 100 µL DPBS-ben oldott 2 nmol OsteoSense™ festéket injektáltunk az egerekbe retro-orbitálisan. 12 óra elteltével kioltottuk az egerek életét, majd 5 mL PBS-sel perfundáltuk és izoláltuk a szerveket. Az OsteoSense™ festék szöveti jelenlétét *ex vivo* körülmények között IVIS Spectrum In Vivo Imaging műszerrel vizsgáltuk (PerkinElmer).

#### **IV.13. Hisztológia**

Az Osteosense™ festéssel történő képalkotást követően a szerveket 10%-os neutrális formalinban fixáltuk, majd paraffinba ágyaztuk, és 4 µm vastagságú metszeteket készítettünk. Deparaffinálás után hematoxilin-eozin, von Kossa és alizarin vörös festést végeztünk a gyártó által javasolt protokoll szerint (Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság).

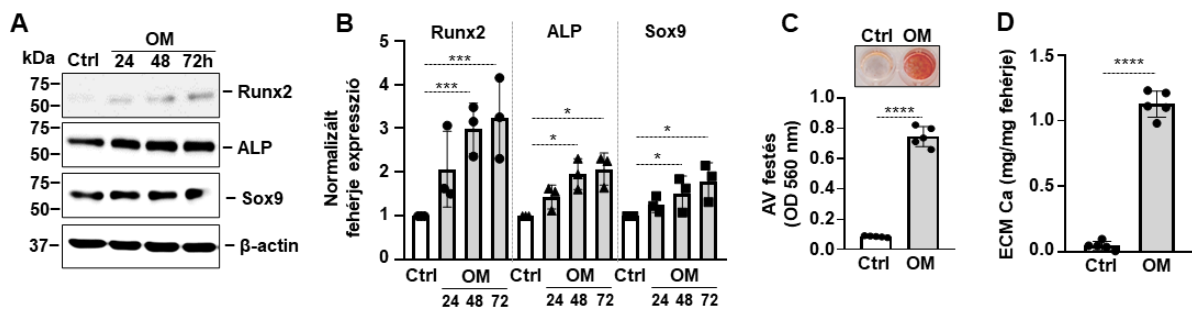
#### **IV.14. Statisztikai analízis**

A kísérletek eredményeit átlag  $\pm$  szórással adtuk meg. A statisztikai analízisek elvégzéséhez GraphPad Prism 8.01 szoftvert alkalmaztunk. A normál eloszlás meghatározását Shapiro-Wilk teszttel, a  $p$  értékek meghatározását parametrikus tesztekkel végeztük. A két csoport közötti statisztikailag szignifikáns különbségeket kétirányú Student-féle  $t$ -próbával, a kettőnél több csoport összehasonlítását ANOVA tesztet követő Tukey-féle többszörös összehasonlító analízissel, míg a számos kezelési csoport egyetlen kontrollhoz történő vizsgálatát ANOVA tesztet követő Dunnett's post-hoc teszttel elemeztük. A  $p < 0.05$  értékeket tekintettük szignifikánsnak.

## V. Eredmények

### V.1. A szívbillentyű intersticiális sejtek OM-indukált oszteogén irányú differenciálódása és extracelluláris mátrix kalcifikációja

A szívbillentyű kalcifikáció *in vitro* modelljének létrehozásához humán VIC-eket alkalmaztunk. A kísérlet során a kalcifikációt magas foszfát (2,5 mmol/L) és magas kalcium (0,3 mmol/L) tartalmú oszteogén médiummal indukáltuk. Megállapítottuk, hogy az OM kezelés időfüggő módon növelte az oszteogén irányú differenciálódás markereinek (Runx2, ALP, Sox9) fehérje expresszióját (7. ábra, A-B). Ezen kívül az OM indukálta a VIC-ek kalcifikációját, melyet alizarin vörös (AV) festéssel és az ECM kalcium tartalmának mérésével mutattunk ki (7. ábra, C-D).

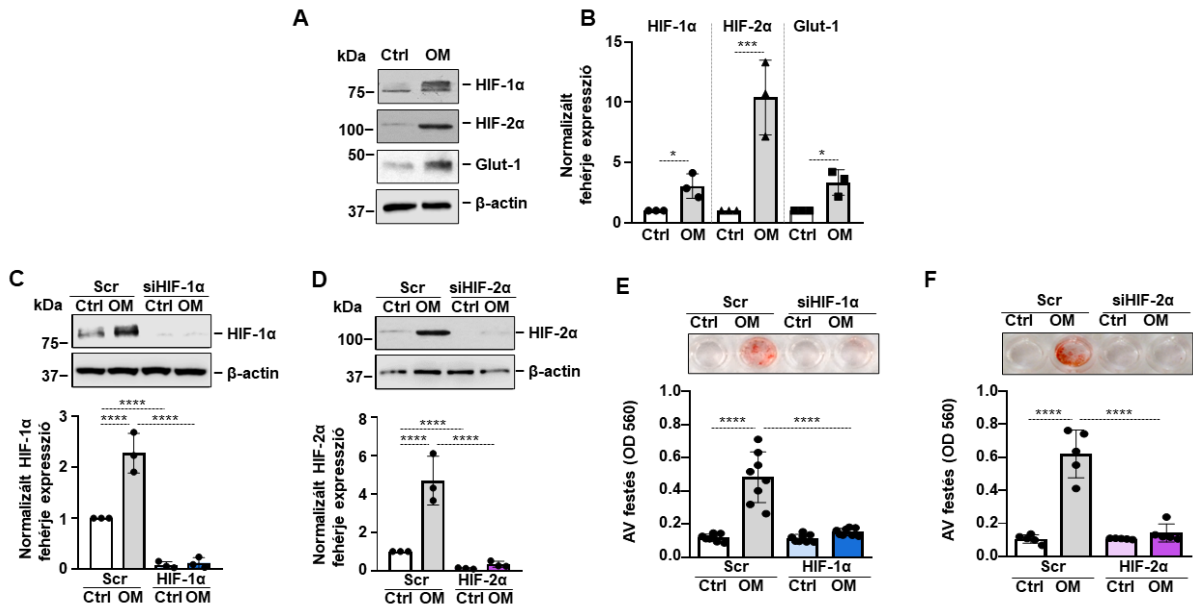


7. ábra: Az OM indukálja a VIC-ek oszteokondrogén irányú differenciálódását és kalcifikációját. A sejteket kontroll, illetve oszteogén körülmények között tartottuk. (A) Runx2, ALP, Sox9 és  $\beta$ -aktin fehérjék expresszióját bemutató reprezentatív Western blotok. (B) Runx2, ALP, Sox9 fehérje expresszió szintjeinek  $\beta$ -aktin-ra normalizált értékei ( $n=3$ ), (24, 48, 72 óra). (C) Az ECM-ben felhalmozódó kalcium depozitumok AV festésének reprezentatív képe és kvantifikálása ( $n=5$ ), (5. nap). (D) Sósavval oldott ECM kalcium tartalmának mennyiségi meghatározása ( $n=5$ ), (5. nap). Az eredmények átlag  $\pm$  szórásban vannak kifejezve. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

### V.2. A hipoxia jelátviteli útvonal szerepe a szívbillentyű intersticiális sejtek OM-indukált kalcifikációjában

Mokas és munkatársai kimutatták, hogy a HIF-1 útvonal aktivációja kulcsszerepet játszik a humán aorta simaizomsejtek magas foszfáttal indukált kalcifikációjában [77]. Ezen megállapítás alapján megvizsgáltuk a HIF jelátviteli útvonal szerepét a VIC-ek oszteogén irányú differenciálódásában és kalcifikációjában. Az előző kísérletben alkalmazott oszteogén tápfolyadékkal kezeltük a sejteket majd meghatároztuk a hipoxia specifikus markerek fehérje expresszióját. Az OM kezelés a HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , és a szabályzásuk alatt álló Glut-1 (glükóz transzporter 1) fehérjék fokozott expresszióját eredményezte (8. ábra, A-B). Ezt követően a

HIF jelátviteli útvonal kalcifikációban betöltött szerepének bizonyítására targetált siHIF-1 $\alpha$  és siHIF-2 $\alpha$  géncsökkentést alkalmaztunk (8. ábra, C-D), ami a VIC-ek kalcifikációjának teljes gátlásához vezetett (8. ábra, E-F). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az oszteogén stimulus hatására indukálódó HIF jelátviteli útvonal aktívan részt vesz a VIC-ek OM-indukált kalcifikációjában normoxiás körülmények között.

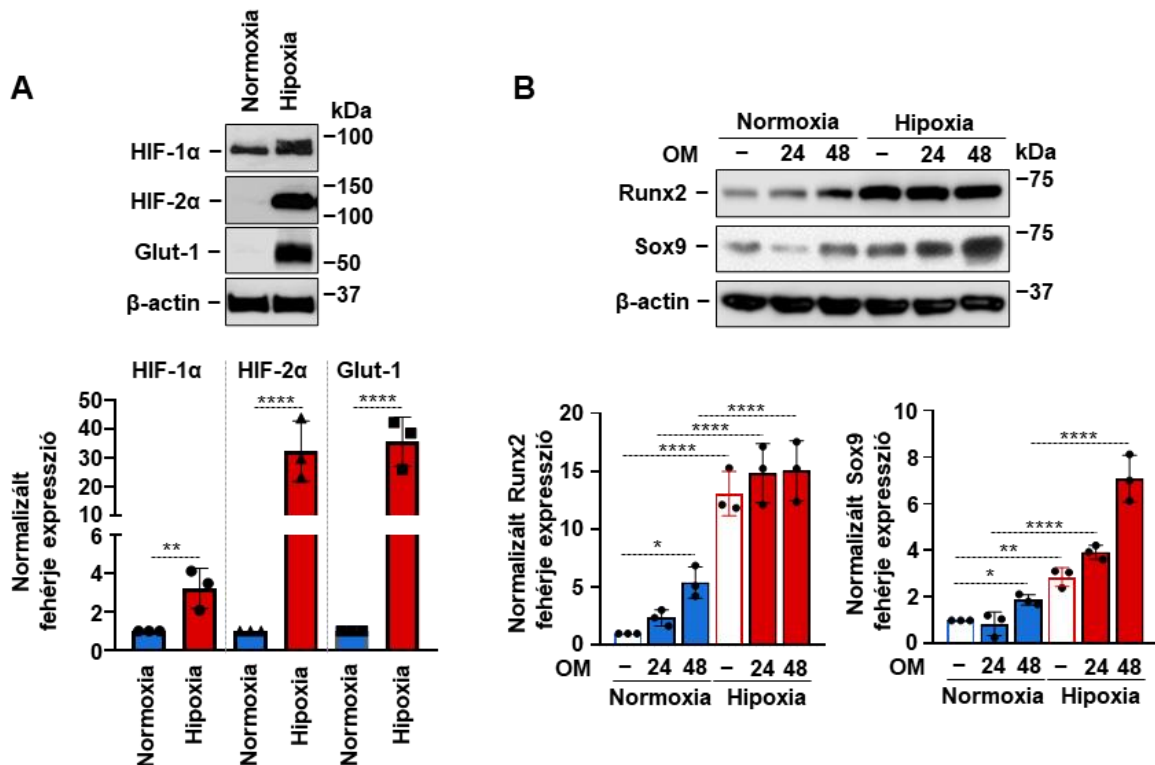


**8. ábra: A HIF jelátviteli útvonal szerepe VIC-ek OM-indukált kalcifikációjában.** A sejteket kontroll, illetve oszteogén körülmények között tartottuk. (A) HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , Glut-1 és  $\beta$ -aktin fehérjék expresszióját bemutató reprezentatív Western blotok. (B) HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , és Glut-1 fehérje expressziós szintjeinek  $\beta$ -aktin-ra normalizált értékei (n=3), (24 óra). (C-D) HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  és  $\beta$ -aktin fehérjék expresszióját bemutató reprezentatív Western blotok és a fehérjék expresszió szintjeinek  $\beta$ -aktin-ra normalizált értékei HIF-1 $\alpha$  és HIF-2 $\alpha$  géncsökkentést követően, kontroll (Scr) és HIF-1 $\alpha$ , illetve HIF-2 $\alpha$  siRNS hiányában vagy jelenlétében (n=3), (24 óra). (E-F) Az ECM-ben felhalmozódó kalcium depozitumok AV festésének reprezentatív képe és kvantifikálása (n=5), (4. nap). Az eredmények átlag  $\pm$  szórásban vannak kifejezve. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

### V.3. A hipoxia fokozza a szívbillentyű intersticiális sejtek OM-indukált oszteogén irányú differenciálódását és extracelluláris mátrix kalcifikációját

A következőkben azt vizsgáltuk, hogy a hipoxia hogyan befolyásolja a VIC-ek OM-indukált oszteogén irányú differenciálódását és az ECM kalcifikációját. Elsőként a sejtek hipoxiára adott válaszkészségét vizsgáltuk. A sejteket 24 órára normoxiás illetve hipoxiás körülmények között tartottuk, majd meghatároztuk a HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , és Glut-1 fehérjék expresszióját. Várakozásunknak megfelelően, hipoxiás körülmények között a HIF útvonal aktiválódott, mely a vizsgált célfehérjék fokozott expresszióját eredményezte (9. ábra, A). Ezt

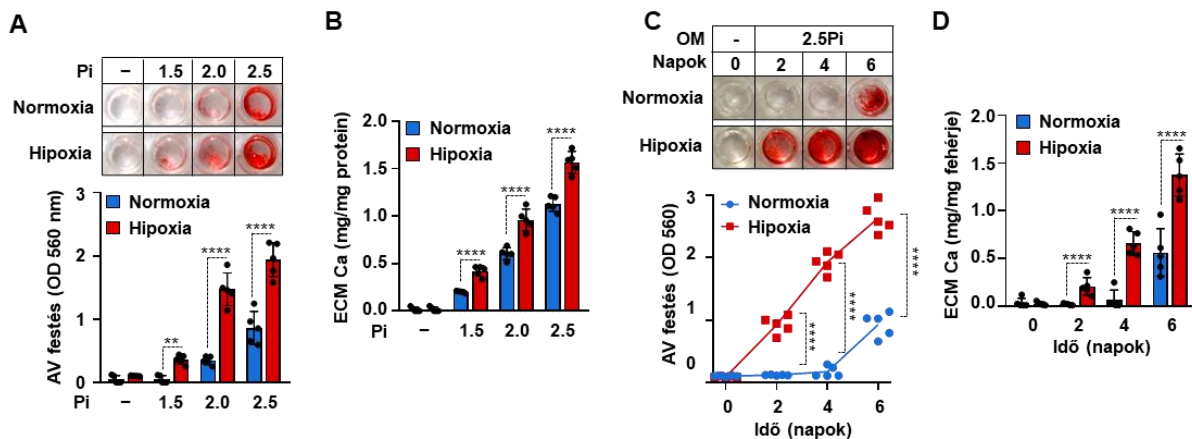
követően a sejteket oszteogén médiummal kezeltük normoxiás és hipoxiás körülmények között 24 és 48 órán keresztül. Normoxiában a 48 órás időpontban az OM hatására enyhén megemelkedett Runx2 és Sox9 fehérje expresszió látható, míg ezzel szemben hipoxiában a kontroll önmagában is emelkedett Runx2 expressziót eredményezett, melynek mértékét az OM kezelés nem tudta tovább fokozni. A Sox9 esetén hipoxiás körülmények között minden egyes vizsgált kondíció mellett magasabb fehérje expressziót tapasztaltunk normoxiás körülményekhez viszonyítva (9. ábra, B).



**9. ábra: A hipoxia fokozza a VIC-ek OM-indukált oszteogén irányú differenciálódását.** A sejteket kontroll, illetve oszteogén körülmények között tartottuk normoxiában és hipoxiában. (A) HIF-1a, HIF-2a, Glut-1, Runx2, Sox9, és β-aktin fehérjék expresszióját bemutató reprezentatív Western blotok (n=3), (24 óra) (B) HIF-1a, HIF-2a, Glut-1, Runx2, és Sox9 fehérje expresszió szintjeinek β-aktin-ra normalizált értékei (n=3), (24, 48 óra). Az eredmények átlag ± szórásban vannak kifejezve. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.005, \*\*\*\*p < 0.0001.

Következő kísérletünkben megvizsgáltuk a hipoxia VIC kalcifikációra gyakorolt hatását. A sejtek kalcifikációjának indukálásához különböző koncentrációjú foszfátot (1,5-2,5 mmol/L) tartalmazó médiumot alkalmaztunk normoxiás és hipoxiás körülmények között. A kísérletet követően az AV festés és az ECM kalcium tartalmának mérési eredményei alapján megállapítottuk, hogy a hipoxia minden egyes vizsgált foszfát koncentráció mellett fokozta a VIC-ek kalcifikációját. (10. ábra, A-B). A kalcifikáció időfüggését 2,5 mmol/L foszfátot

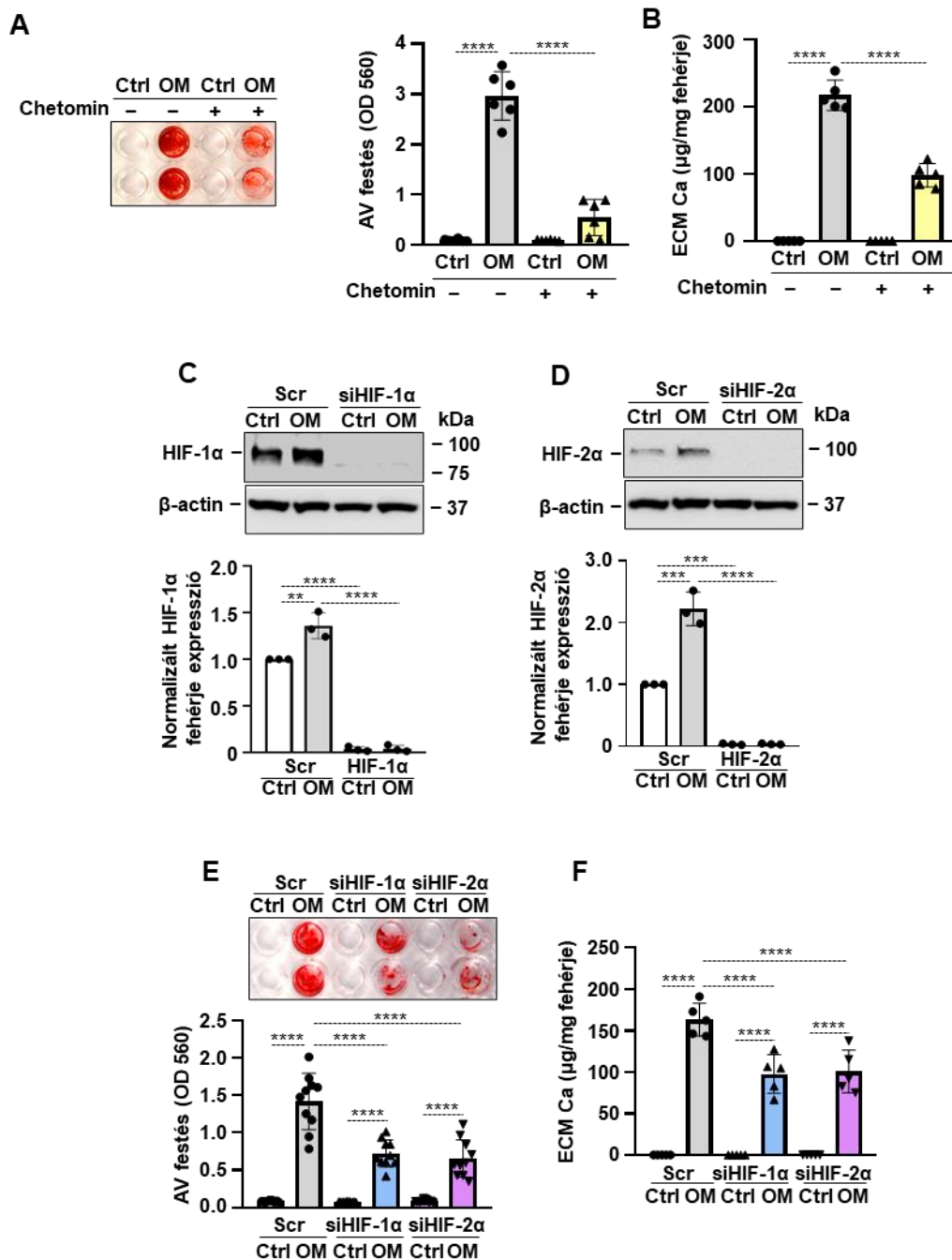
tartalmazó oszteogén médiumban vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy hipoxiás körülmények között a kalcifikáció már a második napon, ugyanakkor normoxiás körülmények között csak a hatodik napon kezdődött el (10. ábra, C). Az ECM kalcium tartalmának mérési eredményei megerősítik az AV festés eredményét, mely szerint a hipoxia fokozza a VIC-ek foszfáttal indukált kalcifikációját (10. ábra, D).



**10. ábra:** A hipoxia fokozza a VIC-ek magas foszfáttal indukált kalcifikációját. A sejteket normoxiában és hipoxiában kezeltük különböző koncentrációjú foszfáttal (1,5-2,5 mmol/L). (A és C) Az ECM-ban felhalmozódó kalcium depozitumok AV festésének reprezentatív képe és kvantifikálása (n=5), (6. nap). (B és D) Sósavval oldott ECM kalcium tartalmának mennyiségi meghatározása (n=5), (6. nap). Az eredmények átlag ± szórásban vannak kifejezve. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.005, \*\*\*\*p < 0.0001.

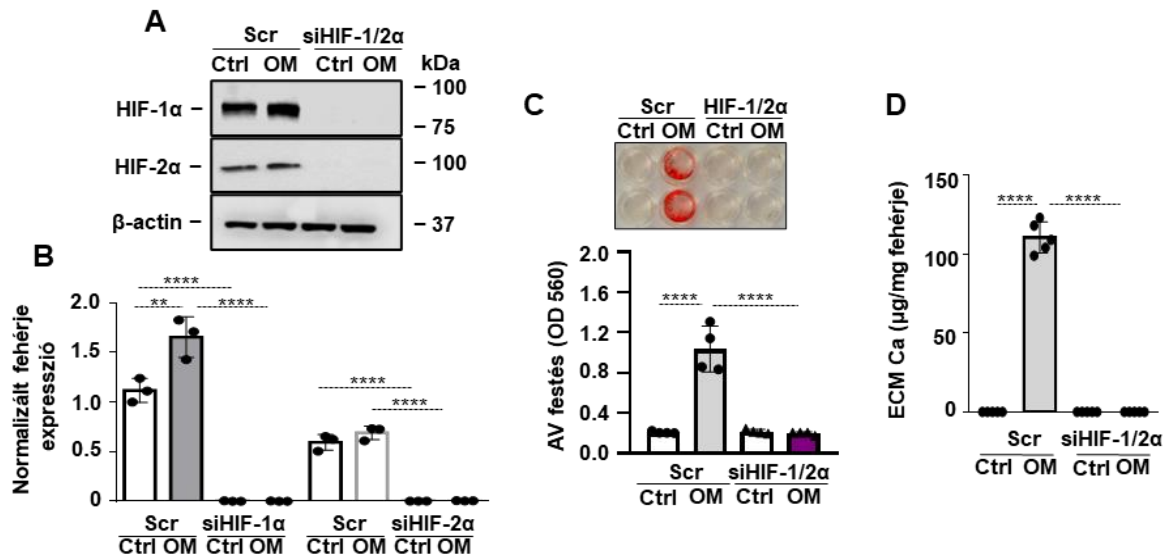
#### V.4. A hipoxia HIF-1 $\alpha$ és HIF-2 $\alpha$ függő módon fokozza a szívbillentyű intersticiális sejtek OM-indukált extracelluláris mátrix kalcifikációját

Annak megállapítására, hogy a HIF jelátviteli útvonal szerepet játszik-e a hipoxia kalcifikációt fokozó hatásában, elsőként a HIF-1 inhibitor chetomint alkalmaztunk. Megállapítottuk, hogy chetomin hatékonyan csökkentette a VIC-ek OM-indukált kalcifikációját, melyet a kísérletet követő AV festés és az ECM kalcium tartalom mérésének eredményei támasztottak alá (11. ábra, A-B). Ezt követően targetált HIF-1 $\alpha$ , illetve HIF-2 $\alpha$  siRNS-eket alkalmaztunk külön-külön (11. ábra, C-D), mely során a HIF-1 $\alpha$ , illetve HIF-2 $\alpha$  expressziójának csökkentése a kalcifikáció részleges gátlását eredményezte (11. ábra, E-F).



**11. ábra:** A hipoxia a HIF jelátviteli útvonal aktivációján keresztül fokozza a VIC-ek OM által indukált kalcifikációját. A sejteket kontroll, illetve oszteogén körülmények között tartottuk hipoxiában chetomin (12 nmol/L) jelenlétében vagy hiányában. (A) Az ECM-ban felhalmozódó kalcium depozitumok AV festésének reprezentatív képe és kvantifikálása (n=5), (5. nap). (B) Sósavval oldott ECM kalcium tartalmának mennyiségi meghatározása (n=5), (5. nap). (C-D) HIF-1α, HIF-2α és β-aktin fehérjék expresszióját bemutató reprezentatív Western blotok és a fehérjék expresszió szintjeinek β-aktin-ra normalizált értékei HIF-1α és HIF-2α géncsendesítést követően, kontroll (Scr) és HIF-1α, illetve HIF-2α siRNS hiányában vagy jelenlétében (n=3), (24 óra). (E) Az ECM-ban felhalmozódó kalcium depozitumok AV festésének reprezentatív képe és kvantifikálása (n=5), (4. nap). (F) Sósavval oldott ECM kalcium tartalmának meghatározása (n=5), (4. nap). Az eredmények adatok átlag ± szórásban vannak kifejezve. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.005, \*\*\*\*p < 0.0001.

Továbbá megvizsgáltuk a targetált HIF-1 $\alpha$ , illetve HIF-2 $\alpha$  siRNS-ek együttes alkalmazásának hatását is (12. ábra, A-B), mely során azt tapasztaltuk, hogy mindkét HIF- $\alpha$  alegység expressziójának együttes csökkentése a kalcifikáció teljes gátlását idézte elő, amit az AV festés és az ECM kalcium tartalmának mérési eredményei támasztanak alá (12. ábra, C-D). Ezen eredmények alapján kijelenthetjük, hogy a hipoxia által indukált HIF jelátviteli útvonal kulcsszerepet játszik a VIC-ek OM-indukált kalcifikációjának hipoxia általi fokozódásában.

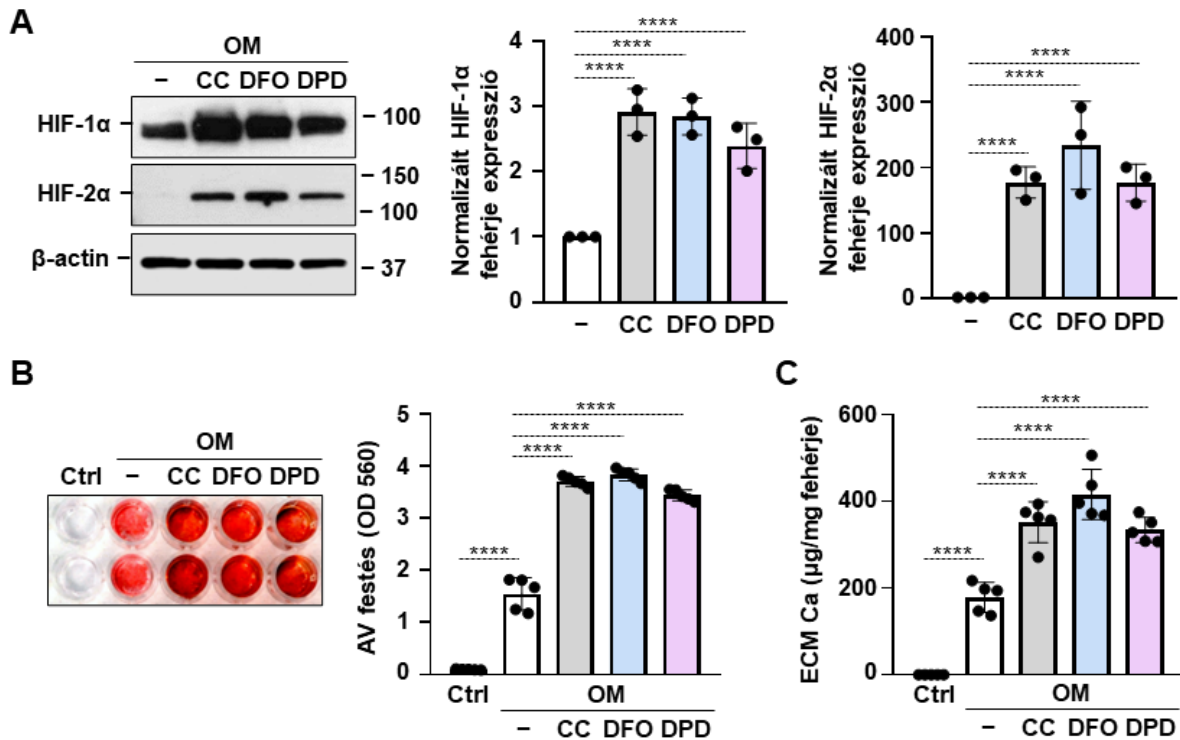


**12. ábra:** A hipoxia a HIF jelátviteli útvonal aktivációján keresztül fokozza a VIC-ek OM által indukált kalcifikációját. A sejteket kontroll, illetve oszteogén körülmények között tartottuk hipoxiában. (A-B) HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  és  $\beta$ -aktin fehérjék expresszióját bemutató reprezentatív Western blotok és a fehérjék expresszió szintjeinek  $\beta$ -aktin-ra normalizált értékei HIF-1 $\alpha$  és HIF-2 $\alpha$  géncsendesítést követően, kontroll (Scr) és HIF-1 $\alpha$ , illetve HIF-2 $\alpha$  siRNS hiányában vagy jelenlétében (n=3), (24 óra). (C) Az ECM-ban felhalmozódó kalcium depozitumok AV festésének reprezentatív képe és kvantifikálása (n=5), (4. nap). (D) Sósavval oldott ECM kalcium tartalmának meghatározása (n=5), (4. nap). Az eredmények adatok átlag  $\pm$  szórásban vannak kifejezve. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

## V.5. A hipoxia mimetikumok fokozzák a szívbillentyű intersticiális sejtek OM-indukált kalcifikációját

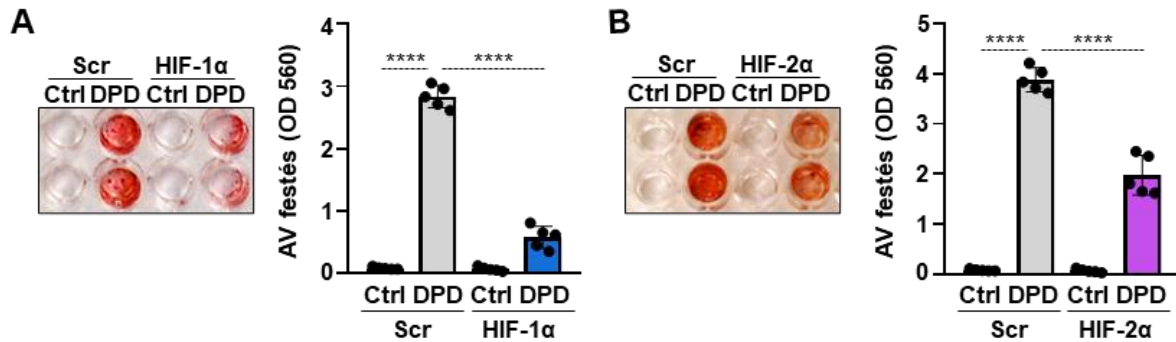
A hipoxia mimetikumok a prolil hidroxiláz enzim aktivitását gátolva stabilizálják a HIF-1 $\alpha$ -t normoxiás körülmények között. A következő kísérletünkben három különböző hipoxia mimetikum: CC, DFO, és a DPD hatását vizsgáltuk VIC-ek oszteogén tápfolyadékkal indukált kalcifikációjára. Megállapítottuk, hogy az általunk használt hipoxia mimetikumok mindegyike jelentősen fokozta a HIF-1 $\alpha$ , és a HIF-2 $\alpha$  fehérjék expresszióját (13. ábra, A). Ezt követően megvizsgáltuk a hipoxia mimetikumok OM-indukált kalcifikációra gyakorolt hatását és

megállapítottuk, hogy az általunk vizsgált hipoxia mimetikumok fokozták a VIC-ek kalcifikációját (13. ábra, B-C). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy nem csak a valódi hipoxia, hanem a hipoxia mimetikumok is képesek fokozni a VIC-ek OM-indukált kalcifikációját.



**13. ábra: A hipoxia mimetikumok fokozzák a VIC-ek OM-indukált kalcifikációját.** A sejteket kontroll (Ctrl) illetve oszteogén (OM) körülmények között tartottuk különböző hipoxia mimetikumok: CC, 200 μmol/L, DFO, 40 μmol/L és DPD, 20 μmol/L jelenlétében vagy hiányában. (A) HIF-1α, HIF-2α és β-aktin fehérjék expresszióját bemutató reprezentatív Western blotok és a fehérjék expresszió szintjeinek β-aktin-ra normalizált értékei (n=3), (24 óra). (B) Az ECM-ban felhalmozódó kalcium depozitumok AV festésének reprezentatív képe és kvantifikálása (n=5), (5. nap). (C) Sósavval oldott ECM kalcium tartalmának mennyiségi meghatározása (n=5), (5. nap). Az eredmények átlag ± szórásban vannak kifejezve. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.005, \*\*\*\*p < 0.0001.

Ezt követően a DPD kalcifikációt fokozó hatásmechanizmusában vizsgáltuk a HIF-1α és HIF-2α szerepét. Géncsendesítést végeztünk, és megállapítottuk, hogy a HIF-1α, illetve a HIF-2α csökkent expressziója a kalcifikáció részleges gátlását eredményezte (14. ábra, A-B).

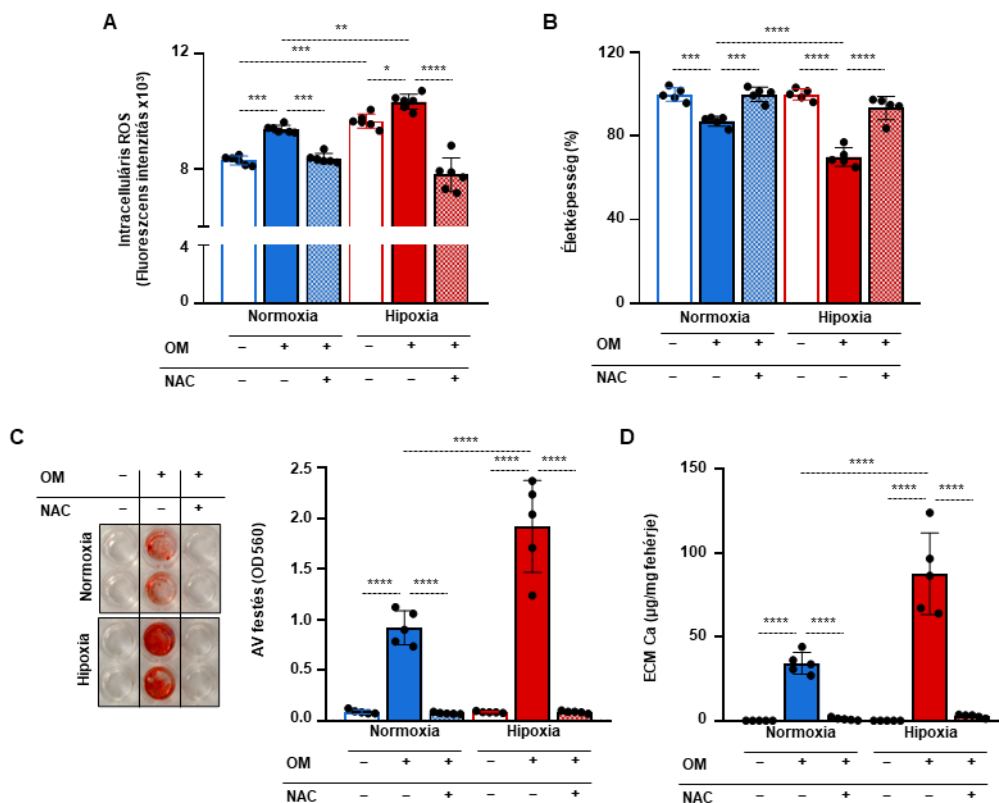


**14. ábra: A HIF-1 $\alpha$  és HIF-2 $\alpha$  géncsendesítése csökkenti a VIC-ek OM+DPD indukált kalcifikációját. (A és B) Az ECM-ban felhalmozódó kalcium depozitumok festésének reprezentatív képe és kvantifikálása ( $n=5$ ), (4. nap). Az eredmények átlag  $\pm$  szórásban vannak kifejezve. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .**

## V.6. A ROS szerepe a szívbillentyű intersticiális sejtek kalcifikációjában

Ismert, hogy a túlzott ROS képződés, és az általa előidézett oxidatív stressz kulcsszerepet játszik a VIC-ek oszteogén irányú differenciálódásában [43]. Ezért megvizsgáltuk a ROS képződés szerepét a VIC-ek OM, valamint OM+hipoxia által indukált kalcifikációjában. A sejteket oszteogén médiummal kezeltük normoxiás és hipoxiás körülmények között, majd megmértük az intracellulárisan képződő ROS mennyiségét. Megállapítottuk, hogy az OM fokozta a VIC-ek ROS termelését normoxiás, illetve hipoxiás körülmények között is (**15. ábra, A**). Kimutattuk továbbá, hogy a hipoxia a normoxiához viszonyítva fokozta a ROS termelődést mind kontroll, mind OM körülmények között (**15. ábra, A**). A glutation prekursor NAC hatékonyan csökkentette a ROS termelődés OM-mel indukált, illetve hipoxia-általi fokozódását (**15. ábra, A**).

Az apoptózis és az ezzel együtt járó apoptotikus sejtek felszabadulása szintén egy, a kalcifikáció kialakulásában jelentős szerepet játszó folyamat. Mivel a túlzott ROS képződés sejthalálhoz vezethet, ezért megvizsgáltuk a VIC-ek életképességét. Az oszteogén stimulus normoxiás körülmények között enyhe, míg hipoxiás körülmények között fokozottabb sejtpusztulást idézett elő, melyet a NAC kezelés hatékonyan gátolt (**15. ábra, B**). Ezt követően megvizsgáltuk a NAC szívbillentyű intersticiális sejtek kalcifikációjára gyakorolt hatását, és azt tapasztaltuk, hogy a NAC a reaktív oxigén gyökök képződésének csökkentésén keresztül hatékonyan gátolja az OM-indukált kalcifikációt (**15. ábra, C-D**).



**15. ábra: A ROS képződés szerepe a VIC-ek OM-indukált kalcifikációjában.** A sejteket kontroll (Ctrl) illetve oszteogén (OM) körülmények között tartottuk normoxiában és hipoxiában NAC (1 mmol/L) jelenlétében vagy hiányában. **(A)** Az intracellulárisan képződött ROS mennyiségi meghatározása (n=6), (4. nap). **(B)** A sejtek életképessége (n=5), (4. nap). **(C)** Az ECM-ban felhalmozódó kalcium depozitumok AV festésének reprezentatív képe és kvantifikálása (n=5), (4. nap). **(D)** Sósavval oldott ECM kalcium tartalmának meghatározása (n=5), (4. nap). Az eredmények átlag ± szórásban vannak kifejezve. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.005, \*\*\*\**p* < 0.0001.

## V.7. A DPD fokozza a szívbillentyű kalcifikációját *in vivo* CKD egérmodellben

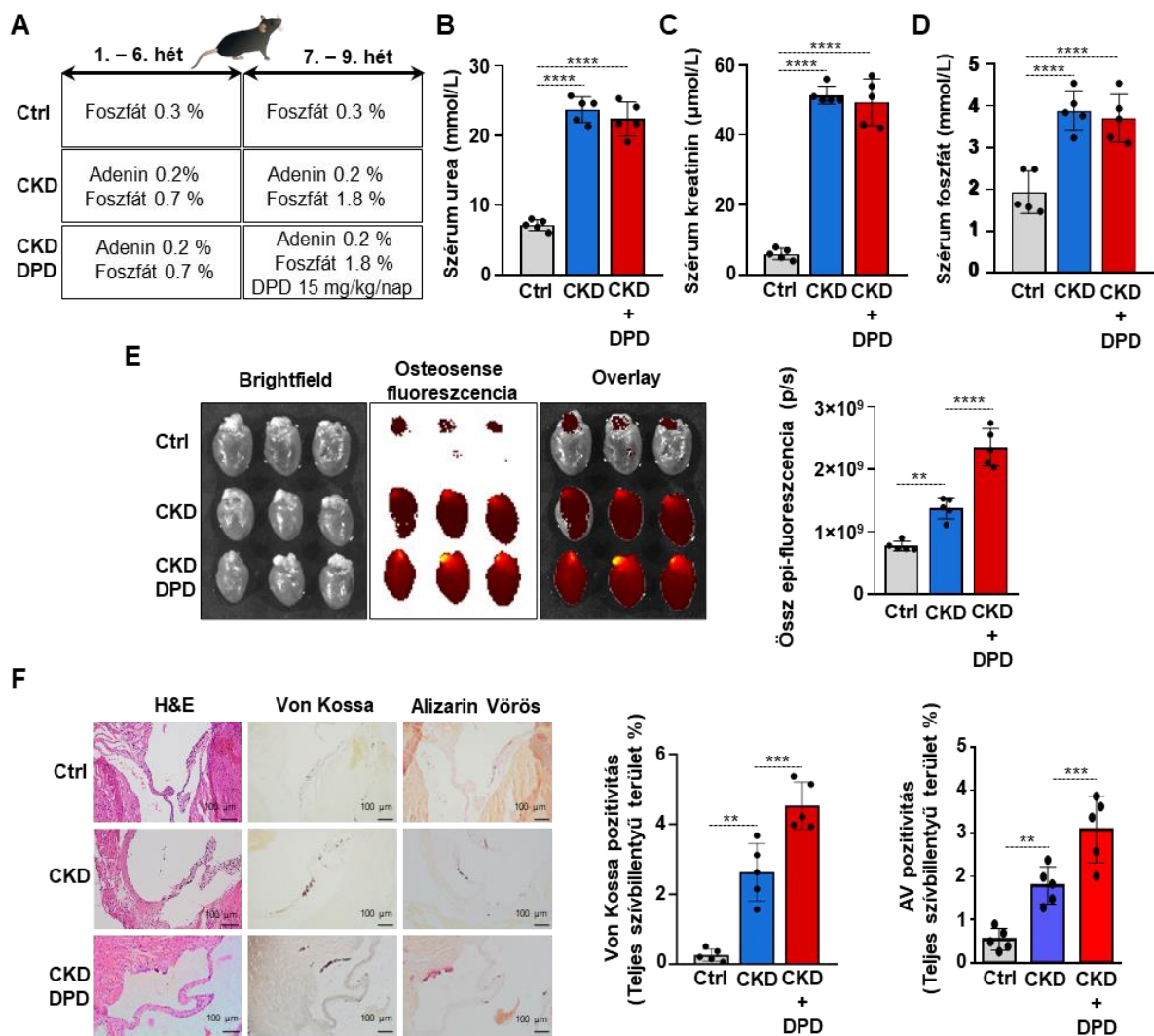
A CKD betegek körében gyakori a szívbillentyű kalcifikációja, és a betegek leggyakoribb halálzási oka valamilyen kardiovaszkuláris esemény [53]. Továbbá, a krónikus veseelégtelen betegekben gyakran alakul ki anémia az elégtelen eritropoézis miatt. A DPD egy az eritropoézis fokozására kifejlesztett gyógyszer, melyet Japánban törzskönyveztek CKD-asszociált anémia kezelésére. A DPD *in vitro* kísérleteinkben fokozta a VIC-ek kalcifikációját, így a következőkben a DPD szívbillentyű kalcifikációra gyakorolt hatását vizsgáltuk *in vivo* CKD egérmodellben. A kísérlet során tizenöt darab, 8-10 hetes hím, C57BL/6 egeret véletlenszerűen 3 csoportba osztottunk: Ctrl, CKD, CKD+DPD (**16. ábra, A**). A CKD indukálását kétfázisú diétával valósítottuk meg, melynek során az első 6 hétben az egereket adenin (0,2%) és emelt

foszfát (0,7%), míg az ezt követően három héten keresztül adenin (0,2%) és magas foszfát (1,8%) tartalmú táppal etettük és a diéta második fázisában a DPD-t orálisan adagoltunk az egereknek 15 mg/testtömeg kg napi dózisban (**16. ábra, A**). A DPD 15 mg/testtömeg kg/nap dózisát előkísérletekben határoztuk meg; ez a legalacsonyabb DPD dózis mely megelőzi az anémia kialakulását az általunk alkalmazott CKD modellben. Várakozásunknak megfelelően az alkalmazott diéta CKD-asszociált anémia kialakulását eredményezte az egerekben, melyet a csökkent hemoglobin és hematokrit szint, valamint csökkent vörösvértest szám jellemez (**2. táblázat**). A CKD által előidézett anémiát a DPD kezelés hatékonyan korrigálta, melyet a hematológiai adatokban látható normalizált hemoglobin és hematokrit szint, illetve vörösvértest szám mutat (**2. táblázat**).

Hematológiai paraméter	Kontroll	CKD	CKD+DPD	p érték Ctrl vs CKD	p érték CKD vs CKD+DPD
Hemoglobin (g/L)	117.4 ± 3.6	80.2 ± 8.9	119.2 ± 3.3	<0.0001	<0.0001
Vörösvértest-szám (T/L)	8.014 ± 0.15	6.044 ± 0.561	8.046 ± 0.29	<0.0001	<0.0001
Hematokrit	0.439 ± 0.017	0.301 ± 0.031	0.432 ± 0.014	<0.0001	<0.0001

**2. táblázat: A kísérlet során mért hematológiai paraméterek.**

A CKD kialakulása a szérum urea (**16. ábra, B**), kreatinin (**16. ábra, C**), és foszfát (**16. ábra, D**) szintek emelkedésével járt, melyet a DPD kezelés nem befolyásolt. A DPD szív kalcifikációjára gyakorolt hatásának vizsgálata során hidroxipatit-specifikus OsteoSense™ festéket alkalmaztunk, melyet az analízis előtt 12 órával intravénásan juttattunk az egerekbe. A CKD-s egerek szívében magasabb fluoreszcencia intenzitást detektáltunk a kontroll egerekéhez viszonyítva, míg a DPD-vel kezelt egerek szívének fluoreszcencia intenzitása meghaladta a CKD-s egerekét is (**16. ábra, E**). Továbbá a szíveken szövettani vizsgálatként hematoxilín-eozin festést, valamint a kalcifikáció kimutatása céljából von Kossa és AV festést végeztünk. A von Kossa és AV festések alapján megállapítottuk, hogy a CKD+DPD csoportba tartozó egerek szív szövetein látható a legerősebb festődés, amely fokozott szívbillentyű kalcifikációra utal, míg a kontroll csoportba tartozó egerek szívében kalcifikáció egyáltalán nem volt detektálható (**16. ábra, F**). Ezek az eredmények összességében arra utalnak, hogy az általunk alkalmazott DPD dózis bár hatékonyan korrigálja a CKD-asszociált anémiát, de fokozza a szív kalcifikációját CKD egerekben.

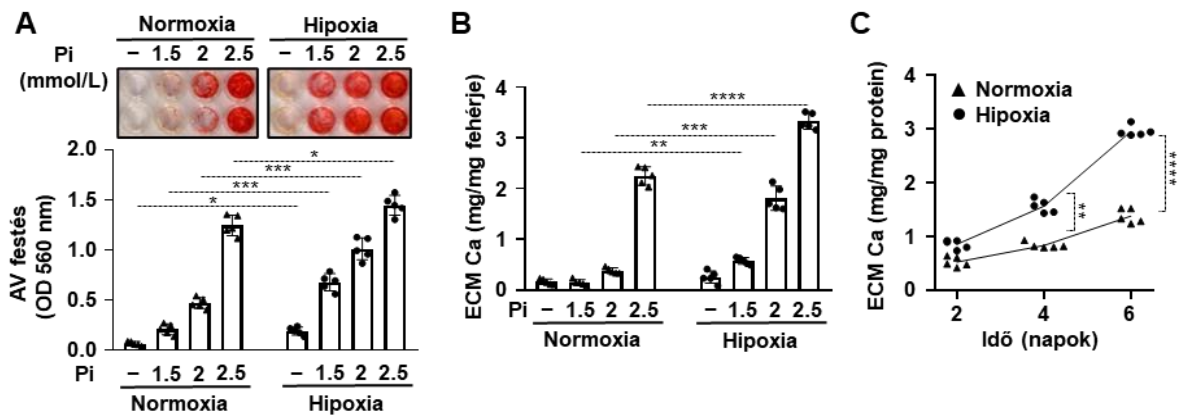


**16. ábra: A DPD fokozza a CKD egerek szívének kalcifikációját. (A)** A kísérlet protokolljának vázlatja. **(B-D)** Szérum urea, szérum kreatinin és szérum foszfát szintek. **(E)** Ctrl, CKD, CKD+DPD egerek szív kalcifikációjának OsteoSense<sup>TM</sup> festéssel végzett fluoreszcens képalkotása és kvantifikálása (n=5/csoport). **(F)** Az egerek szívbillentyűinek szövettani elemzése H&E, von Kossa és AV festéssel. Nagyítás: 400x. Az eredmények átlag ± szórásban vannak kifejezve (n=5). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.005, \*\*\*\*p < 0.0001.

## V.8. A hipoxia fokozza a humán aorta simaizomsejtek magas foszfáttal indukált kalcifikációját

Az előzőekben bemutatott kísérleteink során bebizonyítottuk, hogy a hipoxia a HIF jelátviteli útvonal aktivációján keresztül fokozza a VIC-ek OM-indukált oszteogén differenciálódását és kalcifikációját. A vaszkuláris simaizomsejtek intima és média kalcifikáció során is kerülhetnek hipoxiás környezetbe, ezért utolsó kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy hogyan hat a hipoxia a HAoSMC-k OM-indukált kalcifikációjára. A HAoSMC-et különböző

koncentrációjú foszfáttal (1,5-2,5 mmol/L) kiegészített tápoldatban kezeltük normoxiás és hipoxiás körülmények között. A kísérlet után a HAoSMC-k ECM kalcifikációját AV festéssel detektáltuk, amely során a hipoxiás körülmények között az összes vizsgált foszfát koncentráció esetén nagyobb intenzitású festődést detektáltunk normoxiás körülményekhez viszonyítva (**17. ábra, A**). Az ECM kalcium tartalmának mérési eredményei is alátámasztják az AV festés eredményét, mivel hipoxiás körülmények között az ECM-ben több kalcium halmozódott fel normoxiás körülményekhez képest (**17. ábra, B**). Ezt követően 2,5 mmol/L Pi alkalmazása mellett megvizsgáltuk HAoSMC-k kalcifikációjának időfüggését. Megállapítottuk, hogy hipoxiás körülmények között a kalcifikáció sokkal gyorsabb, már a második napon elkezdődik, ezzel szemben normoxiás körülmények között csak az negyedik napot követően kezdett el emelkedni az ECM kalcium tartalma (**17. ábra, C**). Ezen eredmények együttesen megerősítik a hipoxia kalcifikációt fokozó hatását humán aorta simaizomsejtekben.



**17. ábra:** A hipoxia fokozza a HAoSMC-k magas foszfáttal indukált ECM kalcifikációját. A sejteket különböző foszfát koncentráció (1,5-2,5 mmol/L) mellett kezeltük normoxiában és hipoxiában. (A) Az ECM-ben felhalmozódó kalcium depozitumok AV festésének reprezentatív képe és kvantifikálása (n=5), (6. nap). (B-C) Sósavval oldott ECM kalcium tartalmának mennyiségi meghatározása (n=5), (2-6. nap). Az eredmények átlag ± szórás arányban vannak kifejezve \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

## VI. Megbeszélés

A krónikus veseelégtelenség egy irreverzibilis és progresszív, beszűkült vesefunkcióval járó súlyos megbetegedés [89]. Az érintettek várható élettartalmának jelentős csökkenése a szív- és érrendszert érintő betegségek fokozott kockázatával magyarázható, melyek közül kiemelt jelentőséggel bír a szívbillentyű kalcifikációja [90]. A CKD betegekben az ásványi- és csontanyagcsere zavar által kialakult hiperfoszfatémia és hiperkalcémia a szívbillentyű kalcifikáció legfőbb induktorai. A szívbillentyű kalcifikációjában jelentős szerepet játszik a szívbillentyű intersticiális sejtek oszteogén irányú differenciálódása és kalcifikációja, ezért a billentyű kalcifikáció mechanizmusának tanulmányozására széleskörűen alkalmazott *in vitro* modell alapját a VIC-ek képezik [53].

Oszteogén stimulus hatására a VIC-ekben megjelenő oszteokondrogén transzkripciós faktorok (Runx2, Sox9) és az általuk szabályozott fehérjék például (ALP) expressziója megemelkedik, valamint az ECM kalcifikációja fokozódik [43]. Ismert, hogy az aorta szívbillentyűk oszteogén differenciálódásának legfőbb regulátora a Runx2 transzkripciós faktor, melyet az bizonyít, hogy Runx2 tranziens kiütése aorta sztenózis patkánymodellben az oszteogén markerek csökkent expressziójához és csökkent szívbillentyű kalcifikációhoz vezet [91,92]. Ezzel szemben a Sox9 transzkripciós faktor szívbillentyű kalcifikációban betöltött szerepéről a szakirodalomban ellentétes eredmények jelentek meg. Palacios és munkatársai a Sox9 fokozott expresszióját, míg Peacock és munkatársai pedig a Sox9 csökkent expresszióját figyelték meg szívbillentyű kalcifikációban [93,94]. Az ALP szívbillentyű kalcifikációban betöltött szerepére vonatkozóan Guo és munkatársai kimutatták, hogy szérum ALP szintje korrelál a hemodializált CKD betegek szívbillentyű kalcifikáció mértékével [95]. Az általam bemutatott kísérletekben magas foszfát és kalcium tartalmú oszteogén tápfolyadékkal indukáltuk a VIC-ek oszteogén irányú differenciálódását, és megállapítottuk, hogy a kettős oszteogén stimulus időfüggő módon növelte az oszteogén specifikus markereinek (Runx2, ALP, Sox9) fehérje expresszióját (**7. ábra, A-B**), és indukálta az VIC-ek kalcifikációját (**7. ábra, C-D**).

A szöveti hipoxia számos betegség, mint például a CKD patomechanizmusában is fontos szerepet játszik [76]. Az emberi szervezet komplex túlélési stratégiát fejlesztett ki a hipoxiás állapot kivédésére, melynek legfőbb célja a létfontosságú szervek és szövetek megfelelő oxigén ellátottságának biztosítása [68]. A hipoxiára adott válasz kialakításában a HIF heterodimer transzkripciós faktorok játszanak központi szerepet, melyek szabályzásáért az oxigén érzékeny HIF-1/2 $\alpha$  alegységek felelősek [71]. Korábban Mokas és munkatársai vizsgálták a hipoxia

hatását az érfali simaizomsejtek magas foszfáttal indukált kalcifikációjában és meglepő módon azt találták, hogy a magas foszfát HIF-1 $\alpha$  stabilizációt idéz elő normoxiás körülmények között [77]. Ennek a jelenségnek egy lehetséges magyarázata az, hogy a foszfát egy erős Runx2 induktor, és korábbi vizsgálatok azt mutatják, hogy a Runx2 verseng a von Hippel Lindau fehérjével a HIF-1 $\alpha$ -hoz való kötődésért, ezáltal gátolja a HIF-1 $\alpha$  ubikvitinációját és proteozómális degradációját [96]. Ezzel összhangban egy korábbi tanulmányban kimutatták, hogy a lipopoliszacharid (LPS) és interferon gamma (IFN $\gamma$ ) a HIF-1 $\alpha$  aktivációján keresztül fokozza a VIC-ek kalcifikációját [97]. Munkánk során hasonló mechanizmust figyeltünk meg, hiszen az általunk alkalmazott oszteogén stimulus a HIF jelátviteli útvonal aktivációját idézte elő normoxiás körülmények között VIC sejtekben. **(8. ábra A-B)**.

Kimutattuk, hogy az OM-indukált HIF jelátviteli útvonal aktivációja fontos szerepet játszik VIC-ek kalcifikációjában, melynek legfőbb bizonyítéka, hogy a HIF-1 $\alpha$  és a HIF-2 $\alpha$  géncsendesítés hatására az OM-indukált kalcifikáció elmaradt **(8. ábra C-F)**. A HIF jelátviteli útvonal további vizsgálatának céljából megvizsgáltuk a hipoxia VIC-ek OM-indukált kalcifikációra gyakorolt hatását. Megállapítottuk, hogy a hipoxia általi HIF jelátviteli útvonal aktiválódása jelentős mértékben növelte a hipoxia specifikus markerek (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , Glut-1) és az oszteogén markerek (Runx2, Sox9) fehérje expresszióját **(9. ábra)**, továbbá szinergista módon fokozta a VIC-ek OM-indukált kalcifikációját **(10. ábra)**. Korábban a hipoxia foszfát indukált kalcifikációt fokozó hatásáról számoltak be VSMC-k oszteogén differenciálódása során is, melyet a mi kutatócsoportunk is megerősített **(17. ábra)** [77].

A VIC-ek OM+hipoxia indukált kalcifikációjának hátterében tovább vizsgáltuk a HIF jelátviteli útvonal szerepét, mely során megállapítottuk, hogy a HIF-1 inhibitor chetomin részlegesen gátolja a VIC-ek kalcifikációját. Salim és munkatársai kimutatták, hogy egy másik HIF-1 inhibitor a PX-478 gátolja a sertés aortabillentyű kalcifikációját [98]. Kísérleteink során célzott HIF-1 $\alpha$  vagy HIF-2 $\alpha$  géncsendesítést alkalmazva a kalcifikáció csökkenését **(11. ábra)**, mindkét gén csendesítése esetén pedig a kalcifikáció teljes gátlását tapasztaltuk **(12. ábra)**. Mindezeket figyelembe véve elmondhatjuk, hogy a HIF jelátviteli útvonal fontos szerepet játszanak VIC-ek oszteogén differenciálódásában mind normoxiás, mind hipoxiás körülmények között.

A hipoxia VIC-ek OM-indukált kalcifikációjában betöltött szerepének további vizsgálatához különböző hipoxia mimetikumokat (CC, DFO, DPD) alkalmaztunk, melyek eltérő módon stabilizálják a HIF- $\alpha$  alegységeket és ezáltal gátolják a prolin-hidroxiláz enzimek működését normoxiás körülmények között [99]. Az általunk alkalmazott PHI mindegyike stabilizálta a HIF-1 $\alpha$  és a HIF-2 $\alpha$  alegységeket és fokozták a VIC-ek OM-indukált kalcifikációját normoxiás

körülmények között (**13. ábra**). Ezzel az eredménnyel összhangban áll a kutatócsoportunk korábbi eredménye, miszerint a DPD, a GlaxoSmithKline által kifejlesztett kis molekulású PHI fokozza a VSMC-k foszfáttal indukált kalcifikációját [82]. Korábban egy másik prolil-hidroxiáz inhibitorral, Roxadustattal is végeztek hasonló *in vitro* kalcifikációs kísérletet, melyben a mi eredményünkkel összhangban azt találták, hogy a Roxadustat a DPD-hez hasonlóan fokozza a VSMC-k magas foszfáttal indukált kalcifikációját [100]. Ezt követően megállapítottuk, hogy a HIF-1 $\alpha$ , illetve a HIF-2 $\alpha$  géncsendesítés részlegesen gátolja a DPD kalcifikációt fokozó hatását VIC-ekben (**14. ábra**).

A túlzott ROS képződés általi oxidatív stressz számos betegségben, köztük a szívbillentyű kalcifikáció patomechanizmusában is szerepet játszik. Aorta sztenózisban szenvedő betegekből származó kalcifikált aortában emelkedett ROS képződést mutattak ki [101]. Jelenlegi szakirodalmi adatok alapján a hipoxia és ROS közötti kapcsolat sejttípustól függően igen ellentmondásos, hiszen egyes munkákban a hipoxia hatására csökkenő, míg másokban emelkedő ROS termelődést írtak. A hipoxiás pulmonáris hipertenzió vizsgálata során is ellentmondásba ütköző eredmények születtek, hiszen Mehta és társai csökkent, míg ezzel szemben Waypa és munkatársai emelkedett ROS képződésről számolt be pulmonáris artéria simaizomsejtekben és koronária artéria simaizomsejtekben [102,103].

Összeségében a rendelkezésre álló szakirodalmi adatok alapján a legtöbb bizonyíték arra utal, hogy a hipoxia a mitokondriális elektrontranszportlánc működési zavarát idézi elő, mely fokozza a ROS képződést [104]. Munkánk során azt tapasztaltuk, hogy hipoxia hatására fokozódott a ROS képződés mind a kontroll, mind az OM-mel kezelt sejtekben (**15. ábra, A**). Ugyanakkor hipoxia+OM stimuláció hatására jelentősen csökkent a sejtek életképessége (**15. ábra B**). A hipoxia általi fokozott ROS képződést és a sejtéletképesség csökkenését az általunk alkalmazott antioxidáns (NAC) hatékonyan gátolta (**15. ábra C-D**). Továbbá, Kanno és munkatársai kimutatták, hogy hipoxiás körülmények között tartott szívbillentyű intersticiális sejtekben csökkent az oxidatív stressz markerek (pl. szuperoxid-dizmutáz) expressziója, míg a sejtciklus szabályzásáért felelős ciklinek expressziója megemelkedett [105].

A krónikus veseelégtelenség gyakran társul egyéb krónikus betegségekkel, mint például anémiával [106]. A CKD-asszociált anémiát sokáig rekombináns eritropoetinnel, vagy eritropoézist stimuláló szerekkel kezelték, azonban a közelmúltban végzett vizsgálatok során kiderült, hogy ezen gyógyszerek alkalmazása jelentősen megnöveli a szív- és érrendszeri szövődmények kialakulásának kockázatát [107]. Ezért egy új gyógyszer csoportot fejlesztettek ki, az úgynevezett prolil-hidroxiáz inhibitorokat, melyek közül a legígéretesebb szer a Daprodustat (DPD), mely a prolil-hidroxiáz domén gátlásán keresztül a HIF-1 jelátviteli

útvonal aktivációjához és az eritropoézis indukciójához vezet [108]. Az új generációs hipoxia mimetikumot, a DPD-t Japánban 2020 óta alkalmazzák a CKD-asszociált anémia kezelésére [109]. Miután az *in vitro* kísérleti eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a DPD fokozza a VIC-ek OM-indukált kalcifikációját, megvizsgáltuk a DPD billentyű kalcifikációra kifejtett hatását *in vivo* CKD egérmodellben is. Az *in vivo* modell megalkotásához Tani és munkatársai által publikált CKD egérmodellt vettük alapul, melyet a hiperfoszfátémia és a hozzá tartozó csontanyagcsere zavar tanulmányozása céljából fejlesztettek ki [110]. Kísérletesen a CKD-t adenin és magas foszfát tartalmú diétával váltottuk ki C57BL/6 egerekben. A CKD kialakulását a magas szérum urea, kreatinin és foszfát szint bizonyítja, melyek emelkedett szintjét a DPD kezelés nem befolyásolta (**16. ábra, B-D**). Az alkalmazott diéta a CKD mellett anémia kialakulását is eredményezte, melyet a csökkent hemoglobin, hematokrit és vörösvértest szám jellemez, amit a DPD kezelés hatékonyan korrigált (**2. táblázat**). Ezen kívül bebizonyítottuk, hogy az általunk alkalmazott diéta a szívszövet és a szívbillentyűk kalcifikációjához vezetett, amelyet a DPD kezelés tovább fokozott (**16. ábra E-F**). Korábbi kutatási eredményeink során a DPD hasonló kalcifikációt fokozó hatását tapasztaltuk aorta kalcifikációban [82]. A közelmúltban végzett fázis 3 klinikai vizsgálatok során a DPD és az ESA anémiára gyakorolt hatását tanulmányozták CKD betegekben és arra a következtetésre jutottak, hogy az új generációs DPD ugyanolyan hatékonyan kezelte a CKD-asszociált anémiát, viszont a nemkívánatos kardiovaszkuláris események bekövetkezésének aránya hasonló volt, mint az ESA kezelésben részesülő betegek körében [81].

Összegezve elmondhatjuk, hogy a HIF jelátviteli útvonal hipoxia és hipoxia mimetikumok általi aktivációja HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  és ROS-függő módon fokozza VIC-ek OM-indukált kalcifikációját. Az új generációs prolin-hidroxiláz inhibitor DPD bár hatékonyan korrigálja a CKD-asszociált anémiát, ezzel párhuzamosan fokozza a szívszövet és szívbillentyűk kalcifikációját CKD egérmodellben. Annak megválaszolására, hogy ez a mechanizmus hozzájárul-e a CKD betegeket érintő súlyos kardiovaszkuláris események bekövetkezéséhez további vizsgálatokra van szükség.

## VII. Konklúziók

Munkánk során a HIF jelátvitel útvonal aktivációjának szerepét vizsgáltuk VIC-ek OM-indukált oszteogén irányú differenciálódására normoxiás és hipoxiás körülmények között. Továbbá, *in vivo* CKD egérmodellben vizsgáltuk a prolil hidroxiláz inhibitor DPD hatását a szív és a szívbillentyűk CKD-indukált kalcifikációjára.

### Megállapítottuk, hogy:

- A magas foszfát és kalcium kettős oszteogén stimulus indukálja a VIC-ek oszteogén irányú differenciálódását, ECM kalcifikációját és a HIF jelátviteli útvonal aktivációját *in vitro*.
- A hipoxia a HIF jelátviteli útvonal aktivációján keresztül fokozza a VIC-ek OM-indukált oszteogén irányú differenciálódását és ECM kalcifikációját *in vitro*.
- A ROS képződés hipoxiában fokozódik, és hogy a fokozott ROS termelés kulcsszerepet játszik a VIC-ek OM-indukált ECM kalcifikációjában normoxiás és hipoxiás körülmények között is *in vitro*.
- A kettős oszteogén stimulus által indukált kalcifikáció antioxidánsokkal és a HIF jelátviteli útvonal gátlásával normoxiás körülmények között teljesen, míg hipoxia jelenlétében részlegesen gátolható *in vitro*.
- A DPD a HIF jelátviteli útvonal aktivációján keresztül fokozza a VIC-ek OM-indukált ECM kalcifikációját *in vitro*.
- A DPD fokozza a szív és a szívbillentyűk kalcifikációját CKD egér modellben *in vivo*.
- A VIC-ekhez hasonlóan a hipoxia szinergista módon fokozza a HAoSMC-k foszfát-indukált kalcifikációját *in vitro*.

## VIII. Összefoglalás

A végstádiumú krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegek leggyakoribb kardiovaszkuláris szövődménye az aortabillentyű kalcifikációja. A krónikus veseelégtelenség során az ásványi- és csontanyagcsere zavar miatt kialakult hiperfoszfatémia és hiperkalcémia az aortabillentyűt felépítő VIC-ek oszteogén irányú fenotípus váltását idézi elő, mely a kalcifikáció kialakulásához vezet. A szöveti hipoxia jelenléte ismert aorta kalcifikációban, viszont pontos szerepe még tisztázatlan. Munkánk során a hipoxia általi HIF jelátviteli útvonal aktivációjának szerepét vizsgáltuk a VIC-ek foszfát és kalcium által indukált oszteogén irányú differenciálódásában és kalcifikációjában. Kimutattuk, hogy a hipoxia HIF-1/2 $\alpha$  függő módon fokozza a VIC-ek OM-által indukált oszteogén differenciálódását és az ECM kalcifikációját. A HIF jelátviteli útvonal aktivációjának VIC-ek OM-indukált kalcifikációjában betöltött szerepét bizonyítja, hogy a HIF aktiváció chetominnal, és HIF-1/2 $\alpha$  géncsendesítési módszerrel történő gátlása normoxiás körülmények között az kalcifikáció teljes, míg hipoxiás körülmények között a kalcifikáció részleges gátlását eredményezte. A hipoxia és a ROS képződés közötti kapcsolat vizsgálata során megállapítottuk, hogy a hipoxia ROS-függő módon fokozza VIC-ek OM-indukált kalcifikációját, mely antioxidánsokkal hatékonyan gátlható. A CKD-asszociált anémia kezelésére Japánban 2020 óta az új generációs prolil-hidroxiláz inhibitor DPD-t is alkalmazzák. Kutatócsoportunk korábbi munkája során kimutatta, hogy DPD fokozza a foszfáttal indukált VSMC-k kalcifikációját *in vitro*, és *in vivo* CKD egérmodellben, ezért megvizsgáltuk a DPD szívbillentyű kalcifikációra gyakorolt hatását is. Megállapítottuk, hogy a DPD a HIF jelátviteli útvonal aktivációján keresztül fokozza a VIC-ek kalcifikációját, mely a HIF-1/2 $\alpha$  együttes géncsendesítése révén gátlható. A DPD kalcifikációra gyakorolt hatását *in vivo* CKD egérmodellben tovább vizsgáltuk, és megállapítottuk, hogy a DPD a CKD-asszociált anémiát hatékonyan korrigálja, viszont fokozza a szívszövet és szívbillentyű kalcifikációját. A DPD pro-kalcifikációs hatásának ismeretében a betegellátásban történő alkalmazása előtt célszerű körültekintően eljárni. Figyelembe kell venni az anémia súlyosságát, a plazma foszfát és kalcium szinteket és a beteg aktuális kardiovaszkuláris állapotát a nem kívánatos kardiovaszkuláris szövődmények elkerülésének érdekében.

## IX. Summary

Valve calcification (VC) is a severe cardiovascular complication in chronic kidney disease (CKD) patients. VC is an active, cell-regulated process with the involvement of osteogenic transition of valve interstitial cells (VICs). The presence of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) is described in human calcified valves, but the role of HIF-1 activation in VC has not been fully elucidated.

Therefore, in this work we have investigated whether hypoxia and HIF signaling is actively participated in high phosphate and calcium (OM)-induced osteogenic differentiation of VICs and subsequent valve calcification. We determined that hypoxia increased the expression of OM-induced osteogenic markers (Runx2, Sox9, ALP) and hypoxia-regulated markers (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , Glut-1) and the extracellular matrix calcification of VICs. Our results show that the activation of HIF signaling pathway plays a crucial role in OM-induced calcification of VICs. We showed that the inhibition of HIF signaling pathway by chetomin or HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  knock-down, lead to complete abolishment of calcification under normoxic conditions, whereas under hypoxic conditions we observed only partial inhibition. Furthermore, we examined the connection between hypoxia and reactive oxygen species (ROS) production, and we showed that hypoxia increased ROS production and accelerated the OM-induced calcification, which was inhibited by the antioxidant N-acetyl-cysteine.

The prolyl-hydroxylase enzyme inhibitor Daprodustat (DPD) is a new-generation drug to treat patients with CKD-associated anemia. Previous study of our research group revealed that DPD increased high phosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells (VSMCs) *in vitro* and *in vivo* CKD mice model. Therefore, we investigated the pro-calcifying effect of DPD on valve calcification, and we demonstrated that DPD increased the OM-induced calcification of VICs via the activation of HIF signaling pathway, which can be blocked by HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  knock-down. We examined the pro-calcifying effect of DPD *in vivo*, in adenine-induced CKD mice model and we found that DPD corrects CKD-associated anemia, but it promotes valve calcification. Before using this drug, the severity of anemia, plasma phosphate and calcium levels, and the cardiovascular status of the patients should be carefully judged to avoid unwanted cardiovascular complications.

## X. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megragadni az alkalmat, hogy kifejezzem hálás köszönetemet mindazoknak, akik a doktori disszertációm elkészítésében segítségemre voltak.

❖ Témavezetőmnek, Dr. Jeney Viktóriának, aki 4 évvel ezelőtt ismeretlenül is bizalmat szavazott nekem és ezáltal lehetőséget biztosított számomra a doktori disszertációm elkészítéséhez. Továbbá a hasznos szakmai tanácsaiért, támogatásáért, és a doktori disszertációm koordinálásáért.

❖ Munkatársamnak és egyben páromnak, Tóth Andreának a tudása megosztásáért, lelkiismeretes, pontos és precíz munkavégzéshez szükséges útmutatásaiért, az építő jellegű kritikáiért és támogatásáért.

❖ A Vaszkuláris Pathofiziológiai Kutatócsoport munkatársainak: Dr. Balogh Enikőnek, Dr. Benard Bogonko Nyakundinak, Dr. Erdei Juditnak, Arpan Chowdhurnak, Lente Grétának, és Haneen Ababnehnak a kísérletekben nyújtott segítségért.

❖ A kollaborációs partnereknek a közreműködésért.

❖ Végül, de nem utolsó sorban pedig édesanyámnak mondok hálás szívvel köszönetet a tanulmányaimban nyújtott önzetlen támogatásáért.

## XI. Irodalomjegyzék

- [1] C. S. B. Viegas and D. C. Simes, *Inflammation and calcification in the vascular tree; insights into atherosclerosis*. Elsevier Inc., 2017. doi: 10.1016/B978-0-12-805417-8.00015-9.
- [2] C. M. Giachelli, “Inducers and inhibitors of biomineralization: Lessons from pathological calcification,” *Orthod. Craniofacial Res.*, vol. 8, no. 4, pp. 229–231, 2005, doi: 10.1111/j.1601-6343.2005.00345.x.
- [3] A. Tóth, E. Balogh, and V. Jeney, “Regulation of vascular calcification by reactive oxygen species,” *Antioxidants*, vol. 9, no. 10, pp. 1–24, 2020, doi: 10.3390/antiox9100963.
- [4] T. Li *et al.*, “Matrix Vesicles as a Therapeutic Target for Vascular Calcification,” *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 10, no. January, pp. 1–15, 2022, doi: 10.3389/fcell.2022.825622.
- [5] M. Bäck and J. B. Michel, “From organic and inorganic phosphates to valvular and vascular calcifications,” *Cardiovasc. Res.*, vol. 117, no. 9, pp. 2016–2029, 2021, doi: 10.1093/cvr/cvab038.
- [6] R. C. Thompson *et al.*, “Atherosclerosis across 4000 years of human history: The Horus study of four ancient populations,” *Lancet*, vol. 381, no. 9873, pp. 1211–1222, 2013, doi: 10.1016/S0140-6736(13)60598-X.
- [7] G. Candore *et al.*, “Atherosclerosis,” *Cytokine Gene Polymorphisms Multifactorial Cond.*, vol. 104, pp. 363–378, 2006, doi: 10.29309/tpmj/2017.24.10.717.
- [8] E. J. Akers, S. J. Nicholls, and B. A. Di Bartolo, “Plaque calcification: Do lipoproteins have a role?,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 39, no. 10, pp. 1902–1910, 2019, doi: 10.1161/ATVBAHA.119.311574.
- [9] A. L. Durham, M. Y. Speer, M. Scatena, C. M. Giachelli, and C. M. Shanahan, “Role of smooth muscle cells in vascular calcification: Implications in atherosclerosis and arterial stiffness,” *Cardiovasc. Res.*, vol. 114, no. 4, pp. 590–600, 2018, doi: 10.1093/cvr/cvy010.
- [10] G. L. Basatemur, H. F. Jørgensen, M. C. H. Clarke, M. R. Bennett, and Z. Mallat, “Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis,” *Nat. Rev. Cardiol.*, vol. 16, no. 12, pp. 727–744, 2019, doi: 10.1038/s41569-019-0227-9.
- [11] H. Jinnouchi *et al.*, “Calcium deposition within coronary atherosclerotic lesion: Implications for plaque stability,” *Atherosclerosis*, vol. 306, no. January, pp. 85–95, 2020, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2020.05.017.
- [12] L. Kawtharany, L. Bessueille, H. Issa, E. Hamade, K. Zibara, and D. Magne, “Inflammation and Microcalcification: A Never-Ending Vicious Cycle in Atherosclerosis?,” *J. Vasc. Res.*, vol. 59, no. 3, pp. 137–150, 2022, doi: 10.1159/000521161.
- [13] Y. Yamamoto, Y. Ishikawa, M. Shimpo, and M. Matsumura, “Mönckeberg’s sclerosis,” *J. Gen. Fam. Med.*, vol. 22, no. 1, pp. 55–56, 2021, doi: 10.1002/jgf2.380.
- [14] C. E. Barra Couri, G. A. da Silva, J. A. Baddini Martinez, F. de A. Pereira, and F. J.

- Albuquerque de Paula, “Monckeberg’s sclerosis - Is the artery the only target of calcification?,” *BMC Cardiovasc. Disord.*, vol. 5, pp. 1–8, 2005, doi: 10.1186/1471-2261-5-34.
- [15] H. S. Hwang *et al.*, “Vascular calcification and left ventricular hypertrophy in hemodialysis patients: Interrelationship and clinical impacts,” *Int. J. Med. Sci.*, vol. 15, no. 6, pp. 557–563, 2018, doi: 10.7150/ijms.23700.
- [16] W. C. O’Neill, M. K. Sigrist, and C. W. McIntyre, “Plasma pyrophosphate and vascular calcification in chronic kidney disease,” *Nephrol. Dial. Transplant.*, vol. 25, no. 1, pp. 187–191, 2010, doi: 10.1093/ndt/gfp362.
- [17] S. M. Moe *et al.*, “Role of calcification inhibitors in the pathogenesis of vascular calcification in chronic kidney disease (CKD),” *Kidney Int.*, vol. 67, no. 6, pp. 2295–2304, 2005, doi: 10.1111/j.1523-1755.2005.00333.x.
- [18] M. Rogers, C. Goettsch, and E. Aikawa, “Medial and intimal calcification in chronic kidney disease: stressing the contributions.,” *J. Am. Heart Assoc.*, vol. 2, no. 5, pp. 1–5, 2013, doi: 10.1161/JAHA.113.000481.
- [19] P. Dube *et al.*, “Vascular calcification in chronic kidney disease: Diversity in the vesselwall,” *Biomedicines*, vol. 9, no. 4, 2021, doi: 10.3390/biomedicines9040404.
- [20] A. Krishnan, H. Sharma, D. Yuan, A. F. Trollope, and L. Chilton, “The Role of Epicardial Adipose Tissue in the Development of Atrial Fibrillation, Coronary Artery Disease and Chronic Heart Failure in the Context of Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus: A Narrative Review,” *J. Cardiovasc. Dev. Dis.*, vol. 9, no. 7, 2022, doi: 10.3390/jcdd9070217.
- [21] P. A. Iaizzo, “Chapter 5 Anatomy of the Human Heart,” *Handb. Card. Anatomy, Physiol. Devices Second Ed.*, pp. 1–659, 2005.
- [22] A. Rutkovskiy *et al.*, “Valve interstitial cells: The key to understanding the pathophysiology of heart valve calcification,” *J. Am. Heart Assoc.*, vol. 6, no. 9, pp. 1–23, 2017, doi: 10.1161/JAHA.117.006339.
- [23] G. Pedriali *et al.*, “Aortic valve stenosis and mitochondrial dysfunctions: Clinical and molecular perspectives,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 14, pp. 1–24, 2020, doi: 10.3390/ijms21144899.
- [24] A. J. Fletcher, T. Singh, M. B. J. Syed, and M. R. Dweck, “Imaging aortic valve calcification: significance, approach and implications,” *Clin. Radiol.*, vol. 76, no. 1, pp. 15–26, 2021, doi: 10.1016/j.crad.2020.04.007.
- [25] B. R. Lindman *et al.*, “Calcific aortic stenosis,” *Nat. Rev. Dis. Prim.*, vol. 2, 2016, doi: 10.1038/nrdp.2016.6.
- [26] D. S. S. C. M. Otto, B. K. Lind, D. W. Kitzman, B. J. Gersh, “ASSOCIATION OF AORTIC-VALVE SCLEROSIS WITH CARDIOVASCULAR MORTALITY AND MORBIDITY IN THE ELDERLY,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 341, no. 3, pp. 142–147, 1999. doi: 10.1056/NEJM199907153410302.
- [27] P. Dutta and J. Lincoln, “Calcific Aortic Valve Disease: a Developmental Biology Perspective,” *Curr. Cardiol. Rep.*, vol. 20, no. 4, 2018, doi: 10.1007/s11886-018-0968-9.

- [28] A. Hartley *et al.*, “Trends in Mortality From Aortic Stenosis in Europe: 2000–2017,” *Front. Cardiovasc. Med.*, vol. 8, no. October, pp. 1–9, 2021, doi: 10.3389/fcvm.2021.748137.
- [29] T. Jiang, S. M. Hasan, M. Faluk, and J. Patel, “Evolution of Transcatheter Aortic Valve Replacement | Review of Literature,” *Curr. Probl. Cardiol.*, vol. 46, no. 3, p. 100600, 2021, doi: 10.1016/j.cpcardiol.2020.100600.
- [30] F. E. C. M. Peeters *et al.*, “Calcific aortic valve stenosis: hard disease in the heart: A biomolecular approach towards diagnosis and treatment,” *Eur. Heart J.*, vol. 39, no. 28, pp. 2618–2624, 2018, doi: 10.1093/eurheartj/ehx653.
- [31] W. Bian, Z. Wang, C. Sun, and D.-M. Zhang, “Pathogenesis and Molecular Immune Mechanism of Calcified Aortic Valve Disease,” *Front. Cardiovasc. Med.*, vol. 8, no. December, pp. 1–7, 2021, doi: 10.3389/fcvm.2021.765419.
- [32] P. R. Goody *et al.*, “Aortic Valve Stenosis: From Basic Mechanisms to Novel Therapeutic Targets,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 40, no. 4, pp. 885–900, 2020, doi: 10.1161/ATVBAHA.119.313067.
- [33] I. Manduteanu, D. Simionescu, A. Simionescu, and M. Simionescu, “Aortic valve disease in diabetes: Molecular mechanisms and novel therapies,” *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 25, no. 20, pp. 9483–9495, 2021, doi: 10.1111/jcmm.16937.
- [34] N. M. Rajamannan *et al.*, “Calcific Aortic Valve Disease: Not Simply a Degenerative Process,” *Circulation*, vol. 124, no. 16, pp. 1783–1791, 2011, doi: 10.1161/circulationaha.110.006767.
- [35] C. M. Otto, J. Kuusisto, D. D. Reichenbach, A. M. Gown, and K. D. O’Brien, “Characterization of the early lesion of ‘degenerative’ valvular aortic stenosis: Histological and immunohistochemical studies,” *Circulation*, vol. 90, no. 2, pp. 844–853, 1994, doi: 10.1161/01.CIR.90.2.844.
- [36] J. D. Miller, Y. Chu, R. M. Brooks, W. E. Richenbacher, R. Peña-Silva, and D. D. Heistad, “Dysregulation of Antioxidant Mechanisms Contributes to Increased Oxidative Stress in Calcific Aortic Valvular Stenosis in Humans,” *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 52, no. 10, pp. 843–850, 2008, doi: 10.1016/j.jacc.2008.05.043.
- [37] F. Parhami *et al.*, “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.*, vol. 17, no. 4, pp. 680–687, 1997, doi: 10.1161/01.ATV.17.4.680.
- [38] D. Mohty *et al.*, “Association between plasma LDL particle size, valvular accumulation of oxidized LDL, and inflammation in patients with aortic stenosis,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 28, no. 1, pp. 187–193, 2008, doi: 10.1161/ATVBAHA.107.154989.
- [39] A. Galeone *et al.*, “Aortic valvular interstitial cells apoptosis and calcification are mediated by TNF-related apoptosis-inducing ligand,” *Int. J. Cardiol.*, vol. 169, no. 4, pp. 296–304, 2013, doi: 10.1016/j.ijcard.2013.09.012.
- [40] K. Isoda, T. Matsuki, H. Kondo, Y. Iwakura, and F. Ohsuzu, “Deficiency of interleukin-1 receptor antagonist induces aortic valve disease in BALB/c Mice,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 30, no. 4, pp. 708–715, 2010, doi:

10.1161/ATVBAHA.109.201749.

- [41] S. E. P. New and E. Aikawa, “Cardiovascular calcification-an inflammatory disease,” *Circ. J.*, vol. 75, no. 6, pp. 1305–1313, 2011, doi: 10.1253/circj.CJ-11-0395.
- [42] J. J. Kaden *et al.*, “Inflammatory regulation of extracellular matrix remodeling in calcific aortic valve stenosis,” *Cardiovasc. Pathol.*, vol. 14, no. 2, pp. 80–87, 2005, doi: 10.1016/j.carpath.2005.01.002.
- [43] H. Z. E. Greenberg, G. Zhao, A. M. Shah, and M. Zhang, “Role of oxidative stress in calcific aortic valve disease and its therapeutic implications,” *Cardiovasc. Res.*, vol. 118, no. 6, pp. 1433–1451, 2022, doi: 10.1093/cvr/cvab142.
- [44] B. L. Foster *et al.*, “Phosphate: Known and potential roles during development and regeneration of teeth and supporting structures,” *Birth Defects Res. Part C - Embryo Today Rev.*, vol. 84, no. 4, pp. 281–314, 2008, doi: 10.1002/bdrc.20136.
- [45] C. M. Shanahan, M. H. Crouthamel, A. Kapustin, and C. M. Giachelli, “Arterial calcification in chronic kidney disease: Key roles for calcium and phosphate,” *Circ. Res.*, vol. 109, no. 6, pp. 697–711, 2011, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.234914.
- [46] R. Villa-Bellosta, “Vascular calcification: Key roles of phosphate and pyrophosphate,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 24, 2021, doi: 10.3390/ijms222413536.
- [47] K. D. Cashman, “Calcium intake, calcium bioavailability and bone health,” *Br. J. Nutr.*, vol. 87, no. S2, pp. S169–S177, 2002, doi: 10.1079/bjn/2002534.
- [48] R. Carroll and G. Matfin, “Endocrine and metabolic emergencies: Hypocalcaemia,” *Ther. Adv. Endocrinol. Metab.*, vol. 1, no. 1, pp. 29–33, 2010, doi: 10.1177/2042018810366494.
- [49] N. J. Paloian and C. M. Giachelli, “A current understanding of vascular calcification in CKD,” *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.*, vol. 307, no. 8, pp. F891–F900, 2014, doi: 10.1152/ajprenal.00163.2014.
- [50] J. Voelkl *et al.*, “Signaling pathways involved in vascular smooth muscle cell calcification during hyperphosphatemia,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 76, no. 11, pp. 2077–2091, 2019, doi: 10.1007/s00018-019-03054-z.
- [51] T. Matsubara *et al.*, “BMP2 regulates osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation,” *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 43, pp. 29119–29125, 2008, doi: 10.1074/jbc.M801774200.
- [52] Y. C. Y. Sun, C. H. Byon, K. Yuan, J. Chen, X. Mao, J. M. Heath, A. Javed, K. Zhang, P. G. Anderson, “Smooth Muscle Cell-Specific Runx2 Deficiency Inhibits Vascular Calcification,” *Circ. Res.*, vol. 111, no. 5, pp. 543–552, 2012, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.267237.
- [53] P. Ureña-Torres *et al.*, “Valvular heart disease and calcification in CKD: More common than appreciated,” *Nephrol. Dial. Transplant.*, vol. 35, no. 12, pp. 2046–2053, 2021, doi: 10.1093/NDT/GFZ133.
- [54] M. Rattazzi, E. Bertacco, A. Del Vecchio, M. Puato, E. Faggini, and P. Pauletto, “Aortic valve calcification in chronic kidney disease,” *Nephrol. Dial. Transplant.*, vol. 28, no. 12, pp. 2968–2976, 2013, doi: 10.1093/ndt/gft310.
- [55] S. J. Li, Y. H. Kao, C. C. Chung, W. Y. Chen, W. li Cheng, and Y. J. Chen, “Activated

- p300 acetyltransferase activity modulates aortic valvular calcification with osteogenic transdifferentiation and downregulation of Klotho,” *Int. J. Cardiol.*, vol. 232, pp. 271–279, 2017, doi: 10.1016/j.ijcard.2017.01.005.
- [56] E. E. Wirrig, R. B. Hinton, and K. E. Yutzey, “Differential expression of cartilage and bone-related proteins in pediatric and adult diseased aortic valves,” *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 50, no. 3, pp. 561–569, 2011, doi: 10.1016/j.yjmcc.2010.12.005.
- [57] M. Shuvy *et al.*, “Uraemic hyperparathyroidism causes a reversible inflammatory process of aortic valve calcification in rats,” *Cardiovasc. Res.*, vol. 79, no. 3, pp. 492–499, 2008, doi: 10.1093/cvr/cvn088.
- [58] H. Sies and D. P. Jones, “Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 21, no. 7, pp. 363–383, 2020, doi: 10.1038/s41580-020-0230-3.
- [59] M. Schieber and N. S. Chandel, “ROS function in redox signaling and oxidative stress,” *Curr. Biol.*, vol. 24, no. 10, pp. R453–R462, 2014, doi: 10.1016/j.cub.2014.03.034.
- [60] Y. W. Kim and T. V. Byzova, “Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease,” *Blood*, vol. 123, no. 5, pp. 625–631, 2014, doi: 10.1182/blood-2013-09-512749.
- [61] A. I. Casas *et al.*, “Reactive Oxygen-Related Diseases: Therapeutic Targets and Emerging Clinical Indications,” *Antioxidants Redox Signal.*, vol. 23, no. 14, pp. 1171–1185, 2015, doi: 10.1089/ars.2015.6433.
- [62] C. H. Byon, J. M. Heath, and Y. Chen, “Redox signaling in cardiovascular pathophysiology: A focus on hydrogen peroxide and vascular smooth muscle cells,” *Redox Biol.*, vol. 9, pp. 244–253, 2016, doi: 10.1016/j.redox.2016.08.015.
- [63] M. M. Zhao *et al.*, “Mitochondrial reactive oxygen species promote p65 nuclear translocation mediating high-phosphate-induced vascular calcification in vitro and in vivo,” *Kidney Int.*, vol. 79, no. 10, pp. 1071–1079, 2011, doi: 10.1038/ki.2011.18.
- [64] D. D. Heistad, “Endothelial Function in the Time of the Giants: Paul M. Vanhoutte Lecture,” *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, vol. 52, no. 10, pp. 843–850, 2008, doi: 10.1016/j.jacc.2008.05.043.Dysregulation.
- [65] Y. T. Linda L. Demer, “Vascular Calcification: Pathobiology of a Multifaceted Disease,” *Circulation*, vol. 117, no. 22, pp. 2938–2948, 2008, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.743161.Vascular.
- [66] M. Liberman *et al.*, “Oxidant generation predominates around calcifying foci and enhances progression of aortic valve calcification,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 28, no. 3, pp. 463–470, 2008, doi: 10.1161/ATVBAHA.107.156745.
- [67] Y. Della Rocca *et al.*, “Hypoxia: molecular pathophysiological mechanisms in human diseases,” *J. Physiol. Biochem.*, vol. 78, no. 4, pp. 739–752, 2022, doi: 10.1007/s13105-022-00912-6.
- [68] N. Takeda, “The roles of hypoxia signaling in tissue remodeling,” *Folia Pharmacol. Jpn.*, vol. 155, no. 1, pp. 26–29, 2020, doi: 10.1254/fpj.19114.
- [69] G. L. Semenza, “Oxygen Sensing, Homeostasis, and Disease,” pp. 537–547, 2011. doi: 10.1056/NEJMra1011165.

- [70] G. L. Semenza, “REGULATION OF MAMMALIAN O<sub>2</sub> HOMEOSTASIS BY HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR 1,” *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 15, pp. 551–578, 1999. doi: 10.1146/annurev.cellbio.15.1.551.
- [71] G. L. Semenza, “HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 13, no. 2, pp. 167–171, 2001, doi: 10.1016/S0955-0674(00)00194-0.
- [72] A. C. R. Epstein *et al.*, “C. elegans EGL-9 and Mammalian Homologs Define a Family of Dioxygenases that Regulate HIF by Prolyl Hydroxylation,” *Cell*, vol. 107, pp. 43–54, 2001. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00507-4.
- [73] G. L. Semenza, “Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway.,” *Sci. STKE*, vol. 2007, no. 407, pp. 9–12, 2007, doi: 10.1126/stke.4072007cm8.
- [74] G. L. Wang and G. L. Semenza, “General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 90, no. 9, pp. 4304–4308, 1993, doi: 10.1073/pnas.90.9.4304.
- [75] B. Wang, Z. L. Li, Y. L. Zhang, Y. Wen, Y. M. Gao, and B. C. Liu, “Hypoxia and chronic kidney disease,” *eBioMedicine*, vol. 77, p. 103942, 2022, doi: 10.1016/j.ebiom.2022.103942.
- [76] L. Gunaratnam and J. V. Bonventre, “HIF in kidney disease and development,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 20, no. 9, pp. 1877–1887, 2009, doi: 10.1681/ASN.2008070804.
- [77] S. Mokas *et al.*, “Hypoxia-inducible factor-1 plays a role in phosphate-induced vascular smooth muscle cell calcification,” *Kidney Int.*, vol. 90, no. 3, pp. 598–609, 2016, doi: 10.1016/j.kint.2016.05.020.
- [78] A. Gafter-Gvili, A. Schechter, and B. Rozen-Zvi, “Iron Deficiency Anemia in Chronic Kidney Disease,” *Acta Haematol.*, vol. 142, no. 1, pp. 44–50, 2019, doi: 10.1159/000496492.
- [79] N. Gupta and J. B. Wish, “Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylase Inhibitors: A Potential New Treatment for Anemia in Patients With CKD,” *Am. J. Kidney Dis.*, vol. 69, no. 6, pp. 815–826, 2017, doi: 10.1053/j.ajkd.2016.12.011.
- [80] R. A. Brigandi *et al.*, “A novel hypoxia-inducible factor-prolyl hydroxylase inhibitor (GSK1278863) for anemia in CKD: A 28-day, phase 2A randomized trial,” *Am. J. Kidney Dis.*, vol. 67, no. 6, pp. 861–871, 2016, doi: 10.1053/j.ajkd.2015.11.021.
- [81] A. K. Singh *et al.*, “Daprodustat for the Treatment of Anemia in Patients Undergoing Dialysis,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 385, no. 25, pp. 2325–2335, 2021, doi: 10.1056/nejmoa2113379.
- [82] A. Tóth *et al.*, “Daprodustat Accelerates High Phosphate-Induced Calcification Through the Activation of HIF-1 Signaling,” *Front. Pharmacol.*, vol. 13, no. February, pp. 1–12, 2022, doi: 10.3389/fphar.2022.798053.
- [83] V. Katsi, N. Magkas, A. Antonopoulos, G. Trantalis, K. Toutouzas, and D. Tousoulis, “Aortic valve: anatomy and structure and the role of vasculature in the degenerative process,” *Acta Cardiol.*, vol. 76, no. 4, pp. 335–348, 2021, doi: 10.1080/00015385.2020.1746053.
- [84] Y. Soini, T. Salo, and J. Satta, “Angiogenesis is involved in the pathogenesis of nonrheumatic aortic valve stenosis,” *Hum. Pathol.*, vol. 34, no. 8, pp. 756–763, 2003,

doi: 10.1016/S0046-8177(03)00245-4.

- [85] A. Charest *et al.*, “Distribution of SPARC during neovascularisation of degenerative aortic stenosis,” *Heart*, vol. 92, no. 12, pp. 1844–1849, 2006, doi: 10.1136/hrt.2005.086595.
- [86] S. Syväranta *et al.*, “Vascular endothelial growth factor-secreting mast cells and myofibroblasts: A novel self-perpetuating angiogenic pathway in aortic valve stenosis,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 30, no. 6, pp. 1220–1227, 2010, doi: 10.1161/ATVBAHA.109.198267.
- [87] I. Perrotta, F. M. Moraca, A. Sciangula, S. Aquila, and S. Mazzulla, “HIF-1 $\alpha$  and VEGF: Immunohistochemical profile and possible function in human aortic valve stenosis,” *Ultrastruct. Pathol.*, vol. 39, no. 3, pp. 198–206, 2015, doi: 10.3109/01913123.2014.991884.
- [88] H. Akahori *et al.*, “Nuclear factor- $\kappa$ B-hypoxia-inducible factor-2 pathway in aortic valve stenosis,” *J. Heart Valve Dis.*, vol. 23, no. 5, pp. 558–566, Sep. 2014, PMID: 25799704.
- [89] C. P. Kovesdy, “Epidemiology of chronic kidney disease: an update 2022,” *Kidney Int. Suppl.*, vol. 12, no. 1, pp. 7–11, 2022, doi: 10.1016/j.kisu.2021.11.003.
- [90] P. Romagnani *et al.*, “Chronic kidney disease,” *Nat. Rev. Dis. Prim.*, vol. 3, 2017, doi: 10.1038/nrdp.2017.88.
- [91] S. Guauque-Olarte *et al.*, “Calcium Signaling Pathway Genes RUNX2 and CACNA1C Are Associated with Calcific Aortic Valve Disease,” *Circ. Cardiovasc. Genet.*, vol. 8, no. 6, pp. 812–822, 2015, doi: 10.1161/CIRCGENETICS.115.001145.
- [92] S. Dharmarajan *et al.*, “Role of Runx2 in Calcific Aortic Valve Disease in Mouse Models,” *Front. Cardiovasc. Med.*, vol. 8, no. October, pp. 1–15, 2021, doi: 10.3389/fcvm.2021.687210.
- [93] L. Palacios, Cristina., Gonzales, “Human degenerative valve disease is associated with up-regulation of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 receptor-mediated bone formation,” *J Am Coll Cardiol.*, vol. 47, no. 8, pp. 1707–1712, 2006, doi: 10.1016/j.jacc.2006.02.040.Human.
- [94] J. D. Peacock, A. K. Levay, D. B. Gillaspie, G. Tao, and J. Lincoln, “Reduced Sox9 function promotes heart valve calcification phenotypes in vivo,” *Circ. Res.*, vol. 106, no. 4, pp. 712–719, 2010, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.213702.
- [95] J. Guo *et al.*, “Serum Alkaline Phosphatase Level Predicts Cardiac Valve Calcification in Maintenance Hemodialysis Patients,” *Blood Purif.*, vol. 49, no. 5, pp. 550–559, 2020, doi: 10.1159/000505846.
- [96] S. H. Lee *et al.*, “Runx2 protein stabilizes hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  through competition with von Hippel-Lindau protein (pVHL) and stimulates angiogenesis in growth plate hypertrophic chondrocytes,” *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 18, pp. 14760–14771, 2012, doi: 10.1074/jbc.M112.340232.
- [97] I. Parra-Izquierdo *et al.*, “Lipopolysaccharide and interferon- $\gamma$  team up to activate HIF-1 $\alpha$  via STAT1 in normoxia and exhibit sex differences in human aortic valve interstitial cells,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1865, no. 9, pp. 2168–2179, 2019, doi: 10.1016/j.bbadis.2019.04.014.

- [98] M. T. Salim, N. Villa-Roel, B. Vogel, H. Jo, and A. P. Yoganathan, “HIF1A inhibitor PX-478 reduces pathological stretch-induced calcification and collagen turnover in aortic valve,” *Front. Cardiovasc. Med.*, vol. 9, no. November, pp. 1–9, 2022, doi: 10.3389/fcvm.2022.1002067.
- [99] A. Nowak-Stępniewska, P. N. Osuchowska, H. Fiedorowicz, and E. A. Trafny, “Insight in Hypoxia-Mimetic Agents as Potential Tools for Mesenchymal Stem Cell Priming in Regenerative Medicine,” *Stem Cells Int.*, vol. 2022, 2022, doi: 10.1155/2022/8775591.
- [100] A. Nagy *et al.*, “Zinc Inhibits HIF-Prolyl Hydroxylase Inhibitor-Aggravated VSMC Calcification Induced by High Phosphate,” *Front. Physiol.*, vol. 10, no. January, pp. 1–15, 2020, doi: 10.3389/fphys.2019.01584.
- [101] E. Branchetti *et al.*, “Antioxidant enzymes reduce DNA damage and early activation of valvular interstitial cells in aortic valve sclerosis,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 33, no. 2, 2013, doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300177.
- [102] J. P. Mehta, J. L. Campian, J. Guardiola, J. A. Cabrera, E. K. Weir, and J. W. Eaton, “Generation of oxidants by hypoxic human pulmonary and coronary smooth-muscle cells,” *Chest*, vol. 133, no. 6, pp. 1410–1414, 2008, doi: 10.1378/chest.07-2984.
- [103] G. B. Waypa *et al.*, “Hypoxia triggers subcellular compartmental redox signaling in vascular smooth muscle cells,” *Circ. Res.*, vol. 106, no. 3, pp. 526–535, 2010, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.206334.
- [104] K. A. Smith, G. B. Waypa, and P. T. Schumacker, “Redox signaling during hypoxia in mammalian cells,” *Redox Biol.*, vol. 13, no. March, pp. 228–234, 2017, doi: 10.1016/j.redox.2017.05.020.
- [105] K. Kanno *et al.*, “Hypoxic Culture Maintains Cell Growth of the Primary Human Valve Interstitial Cells with Stemness,” 2021. doi: 10.3390/ijms221910534.
- [106] J. L. Babitt and H. Y. Lin, “Mechanisms of anemia in CKD,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 23, no. 10, pp. 1631–1634, 2012, doi: 10.1681/ASN.2011111078.
- [107] R. M. Hanna, E. Streja, and K. Kalantar-Zadeh, “Burden of Anemia in Chronic Kidney Disease: Beyond Erythropoietin,” *Adv. Ther.*, vol. 38, no. 1, pp. 52–75, 2021, doi: 10.1007/s12325-020-01524-6.
- [108] T. Ishii, T. Tanaka, and M. Nangaku, “Profile of daprodustat in the treatment of renal anemia due to chronic kidney disease,” *Ther. Clin. Risk Manag.*, vol. 17, pp. 155–163, 2021, doi: 10.2147/TCRM.S293879.
- [109] S. Dhillon, “Daprodustat: First Approval,” *Drugs*, vol. 80, no. 14, pp. 1491–1497, 2020, doi: 10.1007/s40265-020-01384-y.
- [110] T. Tani, H. Orimo, A. Shimizu, and S. Tsuruoka, “Development of a novel chronic kidney disease mouse model to evaluate the progression of hyperphosphatemia and associated mineral bone disease,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–12, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-02351-6.

## XII. 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/332/2023.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Csiki Dávid Máté

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Csiki, D. M.**, Ababneh, H., Tóth, A., Lente, G., Szőőr, 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: 3.6 (2022)
2. Tóth, A., **Csiki, D. M.**, Nagy, B. J., Balogh, E., Lente, G., Ababneh, H., Szőőr, 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





### További közlemények

3. Szabó, L., Balogh, N., Tóth, A., Angyal, Á., Gönczi, M., **Csiki, D. M.**, Tóth, C., Balatoni, I., Jeney, V., Csernoch, L., Dienes, B.: The mechanosensitive Piezo1 channels contribute to the arterial medial calcification.

*Front. Physiol.* 13, 1037230, 2022.

DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2022.1037230>

IF: 4

4. Balogh, E., Chowdhury, A., Ababneh, H., **Csiki, D. M.**, Tóth, A., Jeney, V.: Heme-Mediated Activation of the Nrf2/HO-1 Axis Attenuates Calcification of Valve Interstitial Cells.

*Biomedicines.* 9 (4), 1-17, 2021.

DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines9040427>

IF: 4.757

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 17,957**

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

**9,2**

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

Debrecen, 2023.07.06.



### **XIII. Tárgyszavak**

Krónikus veseelégtelenség, anémia, foszfát, kalcium, vaszkuláris kalcifikáció, vaszkuláris simaizomsejtek, aorta sztenózis, szívbillentyű kalcifikáció, szívbillentyű intersticiális sejtek, oszteogén differenciálódás, hipoxia, HIF aktiváció, Daprodustat, reaktív oxigén gyökök

Chronic kidney disease, anemia, phosphate, calcium, vascular calcification, vascular smooth muscle cells, aortic stenosis, valvular calcification, valvular interstitial cells, osteogenic differentiation, hypoxia, HIF activation, Daprodustat, reactive oxygen species

## **XIV. Fűggelék**