

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A cink és a BGP-15, mint potenciális inhibitorok a vaszkuláris
simaizomsejtek magas glükóz és prolil-hidroxiláz inhibitor indukált
kalcifikációjában**

Nagy Annamária

Témavezető: Prof. Dr. Balla József



DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2023.

**A CINK ÉS A BGP-15, MINT POTENCIÁLIS INHIBITOROK A VASZKULÁRIS
SIMAIZOMSEJTEK MAGAS GLÜKÓZ ÉS PROLIL-HIDROXILÁZ INHIBITOR
INDUKÁLT KALCIFIKÁCIÓJÁBAN**

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

Írta: **Nagy Annamária** okleveles biotechnológus

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán Doktori Iskolája
(Trombózis, hemosztázis és vaszkuláris biológia programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Balla József

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Nagy Judit, az MTA doktora

Prof. Dr. Soltész Pál, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Kappelmayer János, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Nagy Judit, az MTA doktora

Prof. Dr. Soltész Pál, az MTA doktora

Prof. Dr. Reusz György, az MTA doktora

Prof. Dr. Tislér András, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2023. február 17. 13:00
DE ÁOK Urológiai Tanszék tanterme

1. BEVEZETÉS

A kardiovaszkuláris megbetegedések világszerte a halálozások egyharmadáért felelősek, melyben a vaszkuláris kalcifikációnak is, mint független rizikótényezőnek jelentős szerepe van. A krónikus veseelégtelenségben (chronic kidney disease, CKD) szenvedő betegeknél a vaszkuláris kalcifikáció és az anémia elsőrendű komplikációként jelentkezik, melyek prevenciója és terápiája napjainkban is komoly kihívást jelentenek a klinikusok számára. A vaszkuláris kalcifikáció patogenezisében a vaszkuláris simaizomsejtek elveszítik a fenotípusukra jellemző markereiket és ezzel egyidőben oszteogén fehérjéket expresszálnak, melynek eredményeként az extracelluláris mátrixban kalcium- és foszfát tartalmú hidroxipatit kristályokat halmoznak fel.

A CKD szövődményeként kialakult anémia terápiájában elsősorban a rekombináns eritropoetint (EPO) alkalmazzák, melynek alternatívái lehetnek a prolil-hidroxiláz inhibitorok (PHI-k). A PHI-k biztosítják, hogy a hipoxia indukálta faktorok (HIF-ek) normoxiás körülmények között aktívak legyenek, biztosítva ezzel a folyamatos endogén EPO szintézist. A tartós és folyamatos HIF aktiváció következtében azonban fokozódik a vaszkuláris simaizomsejtek oszteoblaszt irányú transzdifferentiációja. Mivel a CKD-s betegek magas szérum foszfát (Pi) szintje alapvetően induktora a kalcifikációs folyamatnak, így a PHI-k alkalmazása tovább fokozhatja a vaszkuláris kalcifikációt. Munkánk során azt vizsgáltuk, hogy a PHI (Roxadustat) hogyan befolyásolja a vaszkuláris simaizomsejtek magas Pi-indukált kalcifikációját.

A cink az esszenciális nyomelemek közé tartozik, melynek hiánya hozzájárul számos betegség kialakulásához, beleértve a kardiovaszkuláris megbetegedéseket is. Munkánk során vizsgáltuk, hogy a cinknek milyen szerepe van a PHI által fokozott magas Pi-indukált vaszkuláris kalcifikációban humán aorta simaizomsejteken. Eredményeink alapján elmondható, hogy a cink gátolja a vaszkuláris simaizomsejtek PHI által fokozott Pi-indukált kalcifikációját.

A hiperglikémia és a glükóz metabolizmus zavara gyorsítja a vaszkuláris kalcifikáció progresszióját. A *diabetes mellitus* terápiájában fontos szerepe lehet egy új, inzulin-szenzitizáló gyógyszer-jelölt molekulának, a BGP-15-nek, melyről ismert, hogy aktiválja a hősokk protein 70 (Hsp70) antikalcifikációs dajkafehérjét. Munkánk során vizsgáltuk, hogy a BGP-15-nek milyen hatása van a humán aorta simaizomsejtek magas glükóz és/vagy magas Pi-indukált oszteoblaszt irányú transzdifferentiációjára. Megállapítottuk, hogy a BGP-15 a vaszkuláris simaizomsejtek kalcifikációjának egyik potenciális inhibitora.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A fejlett országokban a szív-és érrendszeri megbetegedések és szövődményeik a vezető halálokok közé sorolhatók. Az érbetegségek kialakulását és progresszióját, elsősorban az endothél sejtek diszfunkciója és aktivációja, az alacsony sűrűségű lipoprotein (low density lipoprotein, LDL) oxidatív módosulása és a simaizomsejtek kalcifikációja nagymértékben meghatározza.

2.1. Vaszkuláris kalcifikáció

A vaszkuláris kalcifikáció fontos szerepet játszik az érlemezsedés (atherosclerosis), a CKD, a *diabetes mellitus*, és számos kardiovaszkuláris megbetegedés patogenezisében úgy, mint a miokardiális infarktus, és koszorúér betegség. Korábbi tanulmányokban a kalcifikációt egy passzív, irreverzibilis folyamatnak tekintették, melyet elsősorban az öregedéssel hoztak összefüggésbe. Pontos mechanizmusa jelenleg nem ismert, jóllehet az elmúlt évek adatai azt mutatják, hogy a vaszkuláris kalcifikáció egy aktív, több lépéses, sejt-mediált és jól szabályozott folyamat, melynek hátterében az ásványi-anyagszerezavar állm mely a vaszkuláris simaizomsejtek (vascular smooth muscle cell, VSMC) oszteoblaszt irányú transzdifferentiációját eredményezi. Kialakulásának kockázatát számos tényező növeli úgy, mint a magas vérnyomás, a diszlipidémia, az elhízás, a glükóz metabolizmus zavara, de az oxidatív stressz, az anémia, a mikroinflammáció, mint nem-tradicionális faktorok is szerepet játszanak kialakulásában. A vaszkuláris kalcifikációnak két megjelenési formája van: (1) az *intima* kalcifikáció, amely az érfal *tunica intima* rétegében az ateroszklerotikus plakkok környezetében fokális mineralizációval jellemezhető, valamint a (2) *media* kalcifikáció, amely a *tunica media* rétegben diffúz mineralizációként jelenik meg és nem érinti az artéria *lumenét*. A CKD-s és hemodializált betegeknél a *media* kalcifikáció elsőrendű kóroki tünetként jelentkezik és megközelítőleg húszszorosára növeli a kardiovaszkuláris mortalitás és morbiditás kockázat. A CKD során megjelenő ásványi-, és csontanyagcsere zavar megnevezésére bevezették a betegség szisztémás jellegét leíró fogalmat a CKD-MBD (chronic kidney disease-mineral and bone disorder) kifejezést. CKD-s betegeknél nagy figyelmet igényel az egyik leggyakoribb társbetegség, a *diabetes mellitus*, mivel a hiperglikémia és a glükóz metabolizmus zavara felgyorsítja a vaszkuláris kalcifikáció folyamatát. Az I-es típusú cukorbetegség megközelítőleg 30%-ánál, míg a II-es típus cukorbetegség 50%-ánál alakul ki vesebetegség, melynek progressziója során a patológiás glükóz homeosztázishoz egy emelkedett plazma Pi szint is társul, mely fokozott rizikó tényezőként szerepet játszik a vaszkulopátia kialakulásában.

2.2. Vaszkuláris simaizomsejtek kalcifikációja és oszteoblaszt irányú transzdifferentiációja

Végstádiumú veseelégtelenségben (end-stage renal disease, ESRD) a vaszkuláris kalcifikáció fő induktora a tartósan magas szérumban lévő Pi szint, mivel a vesefunkciók csökkenésének következtében csökken a Pi elimináció. Korábbi tanulmányok eredményei azt mutatják, hogy az emelkedett extracelluláris Pi szint a VSMC-k oszteoblaszt irányú fenotípus-váltását és kalcifikációját idézi elő. Az extracelluláris Pi sejtekbe történő bejutása elsősorban egy membrán transzporterrel, a Pit-1 nátrium-dependens foszfát kotranszporterrel keresztül történik. A megemelkedett intracelluláris Pi koncentráció indukálja az oszteogén differentiáció markereinek (BMP-2 [bone morphogenetic protein-2], Runx-2 [Run-related transcription factor], Osterix [Osx], MSX-2 [Homeobox protein-2]) expresszióját. A simaizomsejtek a mineralizáció során elveszítik sejtspecifikus markereiket (ACTA-2 [smooth muscle actin(α)-2], TAGLN [transgelin]), mellyel egyidőben az oszteoblaszt sejtekre jellemző fehérjék expressziója nő. A vaszkuláris kalcifikáció folyamatának egyik mester regulátora a Runx-2, mely transzkripciós faktorként részt vesz az oszteoblaszt differentiálódásban, és szabályozza a csont mátrix fehérjék expresszióját. Az alkalikus foszfatáz (alkaline phosphatase, ALP) az oszteoblaszt irányú transz-differentiáció korai fázisában aktiválódó hidroláz enzim, mely az extracelluláris mátrix kalcium depozitumainak kialakulását gátló pirofoszfát szintjét csökkenti. A normál csontképződés és a vaszkuláris kalcifikáció egyik jellegzetes mediátora a BMP-2, amely a Transforming Growth Factor- β (TGF- β) szupercsaládba tartozó citokinek közé sorolható, és fő funkciója az oszteogén gének transzkripciós szabályozása. Az oszteogenezisben és a VSMC-k mineralizációjában fontos szerepe van az oszteokalcinnak (osteocalcin, OC), mely egy K-vitamin-függő nem kollagén típusú extracelluláris mátrix fehérje. Az OC poszttranszlációs γ -karboxiláció eredményeként képes nagy affinitással kötődni a kalciumhoz és a hidroxipatitához.

A VSMC-k oszteoblaszt-szerű fenotípus váltását indukáló tényezők mellett fiziológiásan megtalálhatóak a kalcifikációt gátló endogén inhibitorok is (Fetuin-A, Osteopontin, MGP [Matrix-Gla protein], pirofoszfát [piroPi]).

Az elmúlt néhány év kutatási eredményei azt mutatják, hogy a vaszkulátúra sejtjei által szekretált extracelluláris vezikulumoknak (EV) kiemelkedő szerepük van a kardiovaszkuláris rendszer fiziológiás és patofiziológiás folyamataiban is. Az EV-k kettős lipidréteggel rendelkező, membrán nélküli részecskék, melyek intracelluláris hírvivőként funkcionálnak és három csoportba oszthatók: exoszóma (30-100nm), mikrovezikulumok (200-1000nm) és az „apoptotic body”-k (1-4 μ m). A keringő EV-k képesek fehérjéket, lipideket és aminosavakat szállítani, mellyel részt vesznek az intracelluláris jelátviteli folyamatok szabályozásában. A

VSMC-k által szekretált EV-k fontos szerepet játszanak a vaszkuláris kalcifikáció korai szakaszában. A VSMC-k fiziológiai körülmények között is szekretálnak extracelluláris EV-ket, melyek nem tartalmaznak hidroxipatit kristályokat, viszont megtalálható bennük a Fetuin-A és az MGP fehérje, melyek a kalcifikáció jellegzetes inhibitorai.

2.3. A prolil-hidroxiláz inhibitorok hatásai a CKD-s betegek anémiájának terápiajában

CKD-ban a vaszkuláris kalcifikáció mellett az egyik legjelentősebb komplikáció az anémia, mivel a vérképzés folyamata alapvető károsodást szenved, valamint nagymértékben csökken vagy megszűnik az endogén EPO termelés. Az anémia kezelésében elsősorban rekombináns EPO-t, vagy eritropoézis stimuláló gyógyszert alkalmaznak, melyek hatékonysága nagy variabilitást mutat és gyakran súlyos szövődményeket eredményeznek. A CKD-asszociált anémia kezelésében egyre szélesebb körben ismertek a PHI-k (Roxadustat, Vadadustat), melyek a HIF prolil-hidroxiláz domén (PHD) fehérjét gátolják. A vérképződés szabályozásában fontos szerepet játszó EPO valamint az EPO receptor szintézisét, a vas abszorpcióban és transzportban, valamint a hem szintézisben részt vevő fehérjét is szabályozzák. A HIF-1 egy heterodimer transzkripciós faktor, amely egy oxigén-érzékelő α alegységből és egy β alegységből áll. A HIF-1 akkor lesz aktív, ha a két alegység dimerizálódik és transzlokálódik a sejtmagba, ahol a HIF által szabályozott gének CRE elemeihez kötődik, majd a p300 és CREB-kötő fehérjékkel, mint ko-aktivátorokkal együtt aktiválják a célgéneket. Normoxiában a prolil-hidroxiláz enzimek (PHD1, PHD2, PHD3 izoformák) hidroxilálják a HIF fehérjét, majd a VHL fehérje protein komplex ubiquitinálja és végül proteaszómálisan degradálódik, mely hatással van a HIF által szabályozott gének aktivációjára. Állatkísérletes és humán klinikai tanulmányokban leírták, hogy a PHD enzim PHI általi gátlása fokozta az endogén EPO termelést.

A Roxadustat egy orálisan alkalmazható gyógyszer, mely PHI-ként gátolja a PHD enzimet aktivitását, ezáltal emeli a HIF transzkripciós aktivitását. Ennek eredményeként a Roxadustat dózisfüggő módon emeli a kezelt betegek hemoglobin szintjét és szignifikánsan csökkenti a hepcidin szintet. CKD-s betegnél a hemoglobin szint emelése mellett a Roxadustat emelte a szérum transzferrin szintet, csökkentette a ferritin szintet, így elmondható, hogy a vas metabolizmus normalizálásában is fontos szerepe van. A PHI-k vizsgálatával egyidőben számos tanulmány bizonyította, hogy a HIF fehérjének szerepük van a vaszkuláris kalcifikációban is. A hipoxia és a vaszkuláris kalcifikáció direkt kapcsolata és molekuláris mechanizmusa még nem ismert. A hipoxia fő mester regulátora a HIF-1 α , mely fokozza a glikolízist és csökkenti az oxidatív foszforilációt, mellyel elősegíti a sejtek adaptációját a

hipoxiás környezethez. A piruvát-dehidrogenáz kináz-1-4 (PDK 1-4) a glükóz metabolizmus mitokondriális regulátorai, melyek csökkentik a PDH aktivitását, ezáltal gátolják a piruvát → acetil-CoA átalakulást. A PDK- 4 és a HIF-1 α expressziója emelkedik nemcsak hipoxia során, hanem a vaszkuláris simaizmok mineralizációja során is. Ismert, hogy a HIF-1 α képes a PDK-4 promóteréhez kötődni, így hatással van a PDK-4 által szabályozott gének expressziójára is.

2.4. A cink-hiány szerepe a kardiovaszkuláris-, és egyéb betegségek patogenezisében

2.4.1. A cink élettani hatásai

A cink nélkülözhetetlen nyomelem minden élő szervezet számára, mivel részt vesz a sejtmembrán integritásának fenntartásában, a sejtproliferációban/differenciációban, és számos biokémiai folyamatban. Az emberi testben megközelítőleg 2-3 g cink található, melynek 57%-a a vázizomban, 29%-a a csontban, a fennmaradó rész pedig a szívben, májban, vesében és a plazmában található. A cinknek fontos szerepe van számos biokémia folyamat optimális működésében. A cink kétértékű kation, mely képes a szervezetünkben található fehérjék közel 10%-ához kötődni, így hozzájárul a fehérjék strukturális stabilitáshoz, valamint elősegíti több, mint 300 enzim katalitikus aktivitásának működését. A cink részt vesz a krónikus gyulladásos folyamatok szabályozásában, mivel csökkenti a gyulladásos citokinek termelését. Szabályozza az oxidatív stressz folyamatát hozzájárulva az antioxidáns enzimek szintéziséhez.

A metallothioneinek kis méretű, ciszteinben gazdag, intracelluláris fehérjék, melyek szelektíven és nagy affinitással kötik a nehézfémionokat, köztük a cinket is, és jelentős antioxidáns funkcióval rendelkeznek. A metallothioneinek védik a biológiai struktúrákat és az RNS-t az oxidatív hatásokkal szemben. A cink a metallothionein fehérjéről gyorsan leválik és újabb metallothionein szintézist indukál, így a metallothioneinek mennyisége a szövetben stabilizálódik.

2.4.2. A cink hiány és következményei

A cinknek központi szerepe van számos fiziológiás és patofiziológiás folyamat kialakulásában, úgy, mint a membrán „repair” mechanizmusok, oxidatív stressz, gyulladás és anyagcsere folyamatok. A fejlődő országokban a cink-hiány olyan jelentős, hogy ez az ötödik vezető ok, amely szerepet játszik különböző betegségek kialakulásában, és megközelítőleg világszerte 2 milliárd embert érint. A cink-hiánynak csak az elmúlt néhány évtizedben tulajdonítottak nagy jelentőséget, amikor olyan betegségekkel hozták összefüggésbe, mint a növekedési retardáció, bőrelváltozások, hipogonadizmus és autoimmun betegségek. Az elmúlt évek kutatási eredményei alapján a cink hiánynak szerepe van a krónikus metabolikus megbetegedésekben is, mint a kardiovaszkuláris betegségek, valamint a 2. típusú *diabetes*. *In vitro* és *in vivo*

kísérletek eredményei igazolják, hogy a cinknek protektív szerepe van az érlelmeszesedési folyamatban, mely fő rizikó tényezője a szív-és érrendszeri megbetegedéseknek. A cink az ateroszklerotikus plakkok kialakulását szabályozza azáltal, hogy hozzájárul az endothél sejtek integritásának megőrzéséhez, valamint különböző redox jelátviteli folyamatokon keresztül a lipidperoxidációt is szabályozza.

2.5. A BGP-15, mint inzulin-szenzitiváló gyógyszerjelölt

A BGP-15 (*N'*-(2-hydroxy-3-(piperidin-1-yl)propoxy)-3-pyridine-carboximidamide), egy hidroximsav származék, melynek elsődleges funkciója a különböző citosztatikumok neuro-, nefro-, és mielotoxikus hatásainak csökkentése volt. Az elmúlt években számos kutatócsoport feltárta a BGP-15 jótékony hatásait, köztük az inzulin-szenzitivációt is és anti-inflammatorikus hatást is. A BGP-15 pontos hatásmechanizmusa és intracelluláris célpontjai nem ismertek, azonban a szerkezet egy jól ismert mechanizmusát, a hősokk protein expressziót befolyásolja. A BGP-15 inzulin-érzékenyítő hatását számos *diabetes* állatmodellen is bizonyították. A genetikailag inzulinrezisztens Goto Kakizaki patkány (normál testsúly, inzulinrezisztencia) esetén a BGP-15 dózisfüggő módon, szignifikánsan javította az inzulinrezisztenciát a metforminhoz és a rozigliatonhoz hasonlóan, melyek a klinikai gyakorlatban használt antidiabetikum gyógyszerek. New Zealand nyúl modellen vizsgálva a BGP-15 hatását azt az eredményt kapták, hogy a csak a koleszterin-dús diétán lévő csoportnál volt megfigyelhető az inzulinrezisztencia javulása. Humán klinikai vizsgálat bizonyította, hogy a BGP-15 javította az inzulinrezisztenciában szenvedő betegek inzulin-szenzitivitását, a glükóz felhasználását és az izomszövet glükóz hasznosulását is. Ezen kívül a BGP-15 védelmet nyújt a diabetes szövődményeként kialakult kardiomiopátia és retinopátiával szemben is.

3. CÉLKITŰZÉSEK

1. hipotézis: A CKD-ban szenvedő betegeknél az ásványi-, és csontanyagcsere zavar , valamint a *diabetes mellitus* a vaszkuláris kalcifikáció kialakulásának elsődleges kockázati tényezői. A CKD szövődményeként kialakult anémia kezelésében használt PHI-k folyamatos HIF aktiváció útján gyorsíthatják a kalcifikáció progresszióját CKD-s betegek esetén.
 - a. Vizsgáltuk, hogy a PHI (Roxadustat-FG4592) fokozza-e a VSMC-k magas Pi-indukált kalcifikációját és oszteoblaszt irányú transzddifferenciációját?
 - b. Vizsgáltuk, hogy a cink gátolja-e ezt a patológiás folyamatot?
 - c. Vizsgáltuk, hogy a metallothioneinnek, mint a cinket nagy affinitással kötő fehérjének szerepe van-e a cink vaszkuláris kalcifikációt gátló hatásának mechanizmusában?
 - d. Vizsgáltuk, hogy a hemodializált és *carotis* endarterectomia előtt álló betegek plazma cink koncentrációját, melyből következtetni lehet arra, hogy az alacsonyabb plazma cink koncentráció hozzájárulhat a kalcifikációs folyamat felgyorsulásához.
2. hipotézis: a BGP-15 potenciális antikalcifikációs hatásának vizsgálata a VSMC-k magas Pi indukált kalcifikációjában normál- és magas glükóz koncentrációk mellett.
 - a. Elsőként megnéztük, hogy a magas glükóz (11 mM) hogyan befolyásolja a humán aorta simaizomsejtek magas Pi-indukált oszteoblaszt irányú transzddifferenciációját.
 - b. Ezt követően tanulmányoztuk a BGP-15 hatását a simaizomsejtek magas Pi indukált kalcifikációjában normál (5.5 mM) -, és magas (11 mM) glükózkoncentráció mellett.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. *Sejtenyésztés és reagensek*

A kísérletekhez szükséges humán aorta simaizomsejteket (HAoSMC) a Cell Applications-től (San Diego, CA, United States, Cat.: 354-05a) és a Lonza-tól (Allendale, NJ, United States Cat.: CC-2571) rendeltük. A donorok kiválasztásánál fő szempont volt, hogy nem szenvedett ismert kardiovaszkuláris megbetegedésben, *diabetes mellitus*-ban, nem dohányzott, és a kaukázusi populációból származott. A kísérletek során használt reagensek/vegyszerek – amennyiben máshogy nem jelöltük - a Sigma (St. Luis, MO, USA) cégtől kerültek beszerzésre. A sejteket normál glükóz koncentrációjú (5,5 mmol/L) DMEM-ben tenyésztettük, melyet 10% foetális borjúsérummal (fetal bovine serum, FBS, Life Technologies, Vienna, Austria), 100 U/ml penicillin-el, 100 µg/ml streptomycinnel és neomycinnel egészítettünk ki (növekedési médium). A magas glükóz koncentrációjú (11 mmol/L) médiummal történő sejtkezeléshez a normál glükózkoncentrációjú (5.5 mmol/L) növekedési médiumot egészítettük ki 1000 mg/L glükózzal. A kísérletekhez 5-7 passzázs számú konfluens sejteket használtunk és kétnaponta cseréltük a tápfolyadékot. A magas Pi- indukált kalcifikációhoz a sejteket kalcifikáló médiumban tenyésztettük 10 napig, mely során a növekedési médiumot (normál és/vagy magas glükóz koncentrációjú) egészítettük ki 3 mmol/L inorganikus Pi-vel ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7.4). A cink kalcifikációt gátló hatásának vizsgálatához deionizált vízben oldott $\text{ZnCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ használtunk különböző koncentrációban (15-30 µmol/L) és ezzel egészítettük ki a kalcifikáló médiumot. A PHI mineralizációra kifejtett hatásának vizsgálatához FG4592-t (Selleckchem, Houston, United States) használtunk 5 és 20 µmol/L koncentrációban. A BGP-15 kalcifikációra gyakorolt gátló hatásának vizsgálatához a kalcifikáló médiumot egészítettük ki deionizált vízben oldott BGP-15-el különböző koncentrációban (15-200 µmol/L).

4.2. *Kalcium depozíció mérése*

4.2.1. *Alizarin Red festés*

A 24 lyukú tenyésztőedényben kezelt sejteket foszfát pufferrel mostuk (phosphate buffer saline, PBS, pH 7.4), majd 4% paraformaldehid (PFA) oldatban fixáltuk 10 percig szobahőmérsékleten. A sejteket a fixálást követően PBS-sel mostuk, majd 2% Alizarin Red S festékben inkubáltuk 10 percig. Az inkubációs idő lejártával desztillált vízzel mostuk. A festést követően az extracelluláris mátrix kalcium depozitumai pirosan festődtek.

4.2.2. *Kalcium depozíció kvantálása kolorimetriás módszerrel*

A sejteket 24 lyukú tenyésztőedényben tenyésztettük, majd mostuk PBS-sel (pH 7.4) és 0.6 mol/L HCl-al dekalifikáltuk 37 °C- on 30 percig és mértük a felülúszó kalcium tartalmát QuantiCrom Calcium Assay Kit (Gentaur, Brussels, Belgium) segítségével. A dekalifikációt

követően a sejteket szolubilizáltuk 0.1 mol/L NaOH-ot (nátrium-hidroxid) és 0,1% nátrium-dodecil-szulfát-ot (SDS) tartalmazó oldattal és mértük a fehérje tartalmukat BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, United States) segítségével. Az extracelluláris mátrix kalcium tartalmát a sejt fehérje tartalmára normalizáltuk és μg kalcium/mg fehérje-ként határoztuk meg.

4.2.3. Extracelluláris kalcium depozitumok fluoreszcens festése

A sejteket 24 lyukú tenyésztőedényben kezeltük 10 napig, majd átpasszáltuk fedőlemezt tartalmazó tenyésztőedénybe és további 16 órán át tartottuk növekedési médiumban (normális és magas cukor koncentrációjú) és kalcifikáló médiumban önmagában és $50\mu\text{mol/l}$ (normál glükóz) vagy $150\mu\text{mol/L}$ (magas glükóz) BGP-15 jelenlétében. A kezelőoldatokba 1:100 hígítási arányba tettünk OsteoSense 680EX Fluorescent Imaging Agent (PerkinElmer, Waltham, MA, United States) fluorszcens festéket és 24 órán át 37°C -on inkubáltuk a sejteket. A sejtmagokat Hoechst festékkel festettük meg. A minták kértékelését Leica SP8 konfokális mikroszkóppal és Leica Application Sofwre X (Leica, Manneheim, Germany) segítségével végeztük.

4.3. Intracelluláris Pi mérése

Az intracelluláris Pi koncentráció meghatározása kolorimetriás módszerrel történt a QuantiCrom™ Phosphate Assay Kit (Gentaur) segítségével. A sejteket 12 lyukú tenyésztőedénybe tenyésztettük, majd kétszer mostuk PBS-sel (pH 7.4), és szolubilizáló pufferrel (1% Triton-X 100, 0,5% Igepal CA-630, proteáz inhibitor, 150 mmol/l NaCl, 5 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Tris) lizáltuk. A sejtek intraceluláris Pi koncentrációját a fehérje tartalomra normalizáltuk és μmol Pi/mg fehérje-ként határoztuk meg.

4.4. RNS izolálás és kvantitatív polimeráz láncreakció

A sejteket 24 lyukú tenyésztőedényben tenyésztettük és TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, United States) reagenssel totál RNS-t izoláltunk. A totál RNS-t High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, United States) segítségével reverz transzkripció során írtuk át cDNS-sé. A kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakcióhoz az alábbi fluoreszcensen jelölt TaqMan próbákat (Thermo Scientific, United States) használtunk: BMP-2 (Hs00154192_m1), Msx-2 (Hs00741177_m1), PDK-4 (Hs01037712_m1), α -actin/ACTA2 (Hs00426895_g1), Sp7 (Hs01866874_s1), KLF-5 (Hs001561745_m1), TAGLN/SM22 α (Hs0103877_g1), MT1a (Hs00831826_s1), MT21a (Hs02379661_g1), GAPDH (Hs02786624_g1), RNA45S5 (Hs05627131_Gh). A polimeráz láncreakció kivitelezéséhez és detektálásához iCycler iQ Real-Time PCR rendszert használtunk (Bio-Rad, Hercules, CA, United States). A célgének relatív mRNS expresszióját RNA45S5 és GAPDH mRNS expressziójára normalizáltuk.

4.5. Teljes sejtlizátum és sejtmag szeparálás

A 24 lyukú tenyésztőedényben kezelt sejteket PBS-sel (pH 7.4) mostuk, majd szolubilizáltuk RIPA pufferrel (50 mmol/L Tris [pH 7,5], 150 mmol/L NaCl, 1% Igepal CA-630, 1% SDC, 0,1% SDS, proteáz-, és foszfatáz inhibitor). A sejteket 20 percig szolubilizáltuk jégen. A lizátumokat 14,000 x g-n, 4°C-on centrifugáltuk 20 percig. A centrifugálás után legyűjtöttük a felülúszót, mely tartalmazta a teljes sejtlizátumot.

A sejtmagszeparáláshoz a sejteket PBS-sel (pH 7.4) mostuk, majd szolubilizáltuk hideg hipotóniás oldatban (20 mmol/l HEPES, 250 mmol/L szukróz, 10 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl₂, proteáz-, és foszfatáz inhibitor). A lizátumot 1ml-es fecskendővel szuszpendáltuk 30-szor, majd jégen inkubáltuk 20 percig. Az inkubációs idő lejárta után a lizátumokat centrifugáltuk 15,000 x g-n, 4°C-on 15 percig. A felülúszó eltávolítása során ezt a folyamatot ismételtük négyszer. A kapott pelletet RIPA pufferbe (kiegészítve proteáz-, és foszfatáz inhibitorral) oldottuk be és 16,000 x g-n, 4°C-on centrifugáltuk 15 percig. A teljes sejtlizátum és a sejtmag preparátum fehérje tartalmát BCA protein assay kit (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, United States) segítségével határoztuk meg.

4.6. Western blot

A Runx-2, a foszfo-Runx-2 (Ser451), az Msx-2 és az Osx fehérjék nukleáris transzlokációjának vizsgálatához sejtmag frakciót, míg a többi vizsgált fehérje expressziós mintázatának meghatározásához teljes sejtlizátumot 10 vagy 12%-os Tris-glicin SDS gél elektroforézissel választottunk el. Az elektroforézist követően a mintákat 0,22 µm PVDF membránra (Advansta Inc., Menlo Park, CA, United States) vagy 0,45 µm nitrocellulóz membránra (GE Healthcare, Chicago, IL, United States) transzferáltuk. Az aspecifikus antitestkötőhelyeket 5% BSA-val (bovine serum albumin) vagy 5% tejporral blokkoltuk szobahőmérsékleten 1 órán át. A blokkolást követően a membránokat 1 éjszakán át 4°C-on billegőn inkubáltuk az alábbi elsődleges antitesteket használva: Runx-2 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, United States, Cat.: 12556 [1:1000]), Runx-2 (Ser451) (Bioss Antibodies Inc., Woburn, MA, United States, Cat.:bs-5685R [1:500]), Metalloionin (Abcam, Cambridge, United Kingdom; Cat.: ab12228 [1:1000]), PDK-4 (Abcam, Cat.: ab88063 [1:1000]), Msx-2 (Novus Biologics, Centennial, Colorado, US, Cat: NPB1-85445), Annexin A2 (Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA, Cat: #8235), MGP (Novus Biologicals, Bio-Techne Ltd., Abingdon, United Kingdom, Cat.: NBP2-45844), Hsp90 (Cell signalling; Cat.: 4874S [1:5000]), Lamin B1 (Proteintech, Manchester, United Kingdom Cat.: 66095-I-Ig [1:5000]), Az antigén – antitest komplexeket kemilumineszcenciával detektáltuk (Advansta, Menlo Park, CA, United States). Teljes sejtlizátum esetén a célfehérjék expressziós

változását GAPDH-ra vagy Hsp90-re normalizátuk, míg sejtmag esetén Lamin B1 fehérjére. A kapott kemilumineszcens jelek mennyiségi vizsgálatát Image J szoftverrel végeztük.

4.7. *Metallotionein 1 és metallotionein 2 siRNS transzfekció*

A sejteket 24 lyukú tenyésztőedénybe tenyésztettük 60-70%-os konfluenciáig. majd Oligofectamin Reagent (Thermo Scientific, Waltham, MA, United States) segítségével transzfektáltuk a sejtekbe a MT1a és MT2a (Ambion, Cat.: 4392420; Id: s194620, Cat.: 4392420; ID: s194629) specifikus kis interferáló RNS-t, valamint a negatív kontroll siRNS-t. Az siRNS – oligofektamin komplexet Opti-MEM (szérum-mentes) (Gibco, Thermo Scientific, Waltham, MA, United States) médiumban adtuk a sejtekhez 5 órán át. Az inkubációs idő eltelte után a sejtekhez növekedési médiumot adtunk 16 órán át, majd a következő transzfekcióig növekedési médiumban és kalcifikáló médiumban önmagában vagy 100 μ mol/L ZnCl₂ jelenlétében tenyésztettük a sejteket. A transzfekciót háromnaponta végeztük el, majd a transzfekció hatékonyságát valós idejű polimeráz láncreakcióval és Western blot segítségével vizsgáltuk meg.

4.8. *Humán minták*

A vérplazma cink koncentrációjának vizsgálatához három csoportot határoztunk meg:

- **kontroll csoport** (n=18, átlagéletkor: 46 év, N/F= 7/11): olyan egészséges felnőttek, akiknek nem volt magas vérnyomása, diszlipidémiája és máj vagy vesebetegsége;
- **hemodializált, 5. stádiumú krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegek** (n=28, átlagéletkor: 55 év, N/F= 15/13)
- **carotis endarterectomia műtét előtt álló betegek** (n=15, átlagéletkor: 72 év, N/F= 6/9)

A vizsgálathoz szükséges engedélyt a DE OEC RKEB/IKEB 3712-2012 számon a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Etikai Bizottsága adott ki. A vizsgálatban részt vevő betegek részletes tájékoztatást kaptak és a beleegyező nyilatkozatot aláírták. A tanulmány megfelel az 1975 évi Helsinkai Nyilatkozat etikai irányelveivel. A plazma cink koncentráció meghatározásához citrátos csőbe történt a mintavétel. A vizsgálatba bevont betegek nem részesültek cink szupplementációban.

4.9. *Plazma cink koncentráció meghatározása induktív csatolású plazma atomemissziós spektrometriával (ICP-AES)*

A 5 ml plazma mintát emésztettünk 10-10 ml Carlo Elba salétromsavban (65% m/m), vízfürdőben, atmoszférikus környezetben. Az emésztés leállítása 2-2 ml analitikai tisztaságú 30% (m/m) hidrogén-peroxiddal (Reanal, Hungary) történt. A kapott mintákat 10 ml deionizált vízbe oldottuk. A láng atomabszorpciós spektrométer (FAAS) beállításai az alábbiak voltak:

üregkatódlámpa: cink katódlámpa: 10Ma, hullámhossz: 213.9 nm, réségő: 10cm, acetilén: 1L/perc, levegő: 5L/perc (3 bar), megfigyelési magasság: 10 mm.

4.10. Immunfluoreszcens festés

A sejteket 24 lyukú tenyésztőedényben tenyésztettük növekedési médiumban (normál és magas glükóz koncentrációjú), kalcifikáló médiumban önmagában és 50 $\mu\text{mol/}$ vagy 150 $\mu\text{mol/}$ BGP-15-el kiegészítve 10 napig. A sejteket fedőlemezt tartalmazó tenyésztőedénybe passzáltuk és további 16 órán át tenyésztettük a különböző kezelőoldatokban. A sejtkezelést követően a sejteket PBS-sel (pH 7.4) mostuk, majd fixáltuk 4%-os paraformaldehid oldattal 15 percig. A fixálást követően mostunk kétszer PBS-sel és permeabilizáltuk a sejteket 0,5% Triton X-100 oldattal. A permeabilizálás után a sejteket PBS-sel mostuk és 10% normál kecskeszérumot, 2% BSA-t tartalmazó PBS-T (PBS kiegészítve 0,05% Tween-20) oldatban blokkoltuk 60 percig szobahőmérsékleten. A blokkolást követően a mintákat 16 órán át, 4°C-on inkubáltuk az 1% BSA-t és a KLF-5 fehérje ellenes antitestet 1:250 hígítási arányban (Thermo Scientific, Waltham, MA, United States, Cat.: 701885) tartalmazó oldatban. A PBS-sel történő mosási lépést követően a mintákra Alexa Fluor 568 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States) fluoroforral konjugált kecskében termeltetett nyúl ellenes IgG antitestet tettünk 1:500 hígítási arányban 60 percig szobahőmérsékleten billegtetve. A sejtmagot Hoechst festékkel festettük meg. A minták kiértékelését Leica SP8 konfokális mikroszkóppal és Leica Application Software X (Leica, Mannheim, Germany) segítségével végeztük.

4.11. Extracelluláris vezikulum izolálás

A kalcifikáció során kialakuló EV-k vizsgálatához VSMC-ket normál,-és magas glükóz koncentrációjú növekedési médiumban tenyésztettünk önmagában valamint 3 mmol/L Pi-vel kiegészítve 10 napig. A kalcifikáló tápfolyadékot kiegészítettük normál glükóz esetén 50 $\mu\text{mol/L}$ BGP-15-el, míg magas glükóznál 150 $\mu\text{mol/L}$ BGP-15-el. A kezelés időtartama alatt a tápfolyadékok FBS tartalmát fokozatosan csökkentettük: első 5 napban 5% FBS-sel, a következő 3 napban 3% FBS-sel és az utolsó 2 napban 1% FBS-sel egészítettük ki a tápfolyadékot. Az EV izolálás előtti napon szérum-mentes médiumban tartottuk a sejteket. A sejttenyészet felülúszóját 400 x g-n centrifugáltuk 5 percig szobahőmérsékleten, mellyel eltávolítottuk a sejttörmelékeket. A kapott felülúszót eltávolítottuk és további 5 percig centrifugáltuk szobahőmérsékleten 2000 x g-n 5 percig. A felülúszókat Amicon Ultra MWCO 3000 csövekbe tettük és a gyártó előírásai alapján tömörítettük a mintákat, majd tízszeres mennyiségű PBS (pH 7.4) oldatba hígítottuk és a tömörítési lépéseket megismételtük. A minták fehérje tartalmát BCA protein assay kit (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, United States) segítségével határoztuk meg.

4.12. Statisztikai elemzés

A mérések során kapott adatok kiértékelést GraphPad Prism 5 szoftverrel végeztük. Az eredményeket átlag $\pm$ standrad hibaként ábrázoltuk. A statisztikai analízishez egyszempontos ANOVA *posthoc* Bonferroni próbát használtunk (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

5. EREDMÉNYEK

5.1. *A cink dózisfüggően gátolja a VSMC-k Pi- indukált mineralizációját*

Szakirodalmi adatok alapján, a cink gátolja a vaszkuláris simaizomsejtek magas Pi-indukált oszteoblaszt irányú transzdifferentiációját. Ezek alapján vizsgáltuk a cink mineralizációra gyakorolt gátló hatását *in vitro* az általunk optimalizált kalcifikációs modellen. A VSMC-ket 10 napig tenyésztettük kalcifikáló médiumban (normál glükóz koncentrációjú növekedési médium kiegészítve 3mM inorganikus Pi-vel) önmagában vagy különböző koncentrációjú (15-30 μ M) ZnCl₂ hozzáadásával. A magas Pi-t tartalmazó médiumban tenyésztett sejteknél az extracelluláris kalcium depozíció mennyisége nőtt, melyet a cink dózisfüggően gátolt. Ezt Alizarin Red festéssel – mely az extracelluláris kalcium depozitumokat festi – és az extracelluláris mátrix kalcium tartalmának mérésével igazoltuk. A VSMC-k kalcifikációja során nagy szerepe van az aktív Pi felvételnek, mely a III-as típusú nátrium-Pi kotranszporterrel keresztül valósul meg. Az intracelluláris Pi koncentrációt mérve azt kaptuk, hogy a kalcifikáló médiumban tenyésztett sejtek Pi felvétele jelentősen nőtt, melyet 15 μ mol/L koncentrációjú cink szignifikánsan gátolt.

5.2. *A PHI fokozza a VSMC-k magas Pi-indukált kalcifikációját, melyet a cink gátol*

A hipoxia jelentősen befolyásolja a VSMC-k kalcifikációját és oszteokondrogén irányú transzdifferentiációját, így a PHI, a HIF stabilizáció útján, potenciálisan fokozza a VSMC mineralizációját. A VSMC-ket kalcifikáló médiumban tenyésztettünk önmagában vagy 5 és 20 μ mol/L FG4592 jelenlétében, melyet kiegészítettünk 30 μ mol/L ZnCl₂-al 10 napig. Az extracelluláris mátrix kalcium tartalmát mérve elmondható, hogy az FG4592 dózisfüggő módon fokozza a mineralizációt a Pi-indukált kalcifikációhoz képest, melyet a 30 μ mol/L ZnCl₂ szignifikánsan gátolt.

5.3. *A PHI (FG4592) csökkenti a simaizom-sejt-specifikus gének expresszióját*

A VSMC-k kalcifikációjának egyik fő jellegzetessége, hogy a sejtek elveszítik sejt-specifikus markereiket, A hipoxia a HIF-1 α -án keresztül a VSMC-ken fenotipikus változást idéz elő. Ezért megvizsgáltuk, hogy a PHI által indukált Pi-mediált kalcifikáció során a VSMC-kben hogyan változik a simaizom alfa-aktin (ACTA-2) és a transzgelin (TAGLN) gének expressziója. A sejteket növekedési,- és kalcifikáló médiumban tenyésztettük önmagában vagy 5 és 20 μ mol/L FG4592-vel és kiegészítettük 30 μ mol/L ZnCl₂-dal, majd nyomon követtük a kalcifikáció folyamatát 10 napig. A VSMC-k Pi-indukált kalcifikációja során az ACTA-2 és a TAGLN gének expressziója csökken. Ezt a hatást a PHI szignifikánsan fokozza dózisfüggő módon, önmagában is. A cink gátolta a vizsgált simaizom specifikus markerek expressziójának csökkenését. Ezen eredmények alapján elmondható, hogy a magas Pi és a PHI egymás hatását

felelőssítik, additív módon csökkentve az ACTA-2 és TGLN gének expresszióját, mely cinkkel kompenzálható.

5.4. A PHI fokozza az oszteogén markerek expresszióját, melyet a cink gátol.

Az általunk optimalizált *in vitro* kalcifikációs modellen megvizsgáltuk, hogy a PHI-k hogyan befolyásolja a kalcifikációban fontos szerepet játszó gének expresszióját. Vizsgálataink során a vaszkuláris kalcifikáció patomechanizmusában fontos szerepet játszó BMP-2 (Bone Morphogenetic Protein-2), Msx-2 (Msh homeobox 2) és az Osx gének expressziós mintázatait vizsgáltuk. A kapott eredmények alapján megállapítható, hogy a PHI dózisfüggő módon fokozza a vizsgált gének expresszióját a Pi-vel kezelt sejtekhez képest, melyet a cink 30 $\mu\text{mol/L}$ koncentrációban szignifikánsan gátolt. Kísérleteink során megfigyeltük, hogy a PHI önmagában (magas Pi nélkül) nem befolyásolja a BMP-2, az Msx-2 és az Osx mRNS szintjét.

5.5. A PHI hatása a Runx2 Ser451 foszforilációjára

A Runx-2 transzkripció faktor a vaszkuláris kalcifikáció patogenezisének az egyik fő szabályozó fehérjeje. Az oszteogén gének Runx-2 függő transzaktivációját a Runx-2 Ser451 foszforilációja szabályozza. A Runx-2 nukleáris transzlokációját és foszforiláltsági állapotát Western blot segítségével vizsgáltuk, melynek során a VSMC-kból sejtmagot szeparáltunk. Kimutattuk, hogy az általunk beállított *in vitro* kalcifikációs környezetben (magas Pi önmagában vagy PHI-vel kiegészítve) a Runx-2 nukleáris transzlokációja a növekedési médiumában tenyésztett sejtekhez képest nem változott. A Runx-2 Ser451 foszforilációt vizsgálva kimutattuk, hogy magas Pi és PHI együttes jelenlétében a Ser451 defoszforilálódik, mely folyamatot a cink 30 $\mu\text{mol/L}$ koncentrációban szignifikánsan gátolt.

5.6. A piruvát dehidrogenáz kináz- 4 (PDK- 4) szerepe a vaszkuláris kalcifikációban

A PDK-4 mitokondriális enzimnek a glükóz,- és zsírsav metabolizmus szabályozásán túl a vaszkuláris kalcifikáció folyamatában is központi szerepe van. A VSMC sejtekben magas Pi hatására a PDK-4 mRNS szintje megemelkedett, melyet a PHI tovább fokozott. Magas Pi hatására a PDK-4 fehérje expressziója emelkedett, mely a PHI által fokozódott. A cink mind a Pi, mind a Pi+PHI esetén szignifikánsan csökkentette a PDK-4 expresszióját. A kapott eredmények alapján elmondható, hogy cink transzkripció,- és poszt-transzlációs szinten is gátolja a VSMC-k Pi és Pi+PHI indukált PDK-4 expressziót.

5.7. A cink a metallotionein fehérjétől függetlenül gátolja a vaszkuláris kalcifikációt

A metallotioneinek kis molekulatömegű fehérjék, melyek szelektíven képesek kötni a különböző nehézfémionokat (cink, réz, kadmium) és központi szerepük van az antioxidáns folyamatokban is. Mivel a vaszkuláris kalcifikációt összefüggésbe hozták a szabad gyökök képződésével és az oxidatív stresszel, így megvizsgáltuk, hogy a cink kalcifikációt gátló

hatásában szerepe van-e a metallotioneinek. A VSMC-ket kalcifikáló médiumba tenyésztettük önmagában vagy 30 $\mu\text{mol/L}$ ZnCl_2 -vel kiegészítve 10 napig, majd qRT-PCR-rel vizsgáltuk a metallotionein 1 és 2 expresszióját. Mivel a 30 $\mu\text{mol/L}$ koncentrációjú cink csak enyhén magasabb, mint a fiziológiás tartomány felső határa, így a metallotionein 1a és 2a mRNS szintje nem változott a kontrollhoz képest. Ismert, hogy a metallotionein protektív fehérjeként jelen van az atheroszklerotikus plakkokban, így azt feltételeztük, hogy *in vitro* kalcifikációs modellünkben is hasonló funkciója van. Ennek vizsgálatához a további kísérleteinkben 100 $\mu\text{mol/L}$ koncentrációjú ZnCl_2 -dal egészítettük ki a kalcifikáló médiumot, amely a kontrollhoz képest szignifikánsan emelte a metallotionein 1a és 2a mRNS szintet. Ezt követően metallotionein 1a és 2a specifikus siRNS-sel csendesítettük a MT1 és MT2 expresszióját, melynek hatékonyságát Western blot segítségével ellenőriztük. A géncsökkentéssel egyidőben a sejteket kalcifikáló médiumban tenyésztettük önmagában vagy 100 $\mu\text{mol/L}$ ZnCl_2 -dal kiegészítve 10 napig, majd mértük az extracelluláris mátrix kalcium koncentrációját. Kimutattuk, hogy a metallotionein gén csendesítése mellett is gátolja a cink a VSMC sejtek magas Pi-mediált mineralizációját.

5.8. A CKD szenvedő betegek és a carotis műtét előtt álló betegek plazma cink koncentrációja alacsony

Ismert, hogy az 5. stádiumú CKD-ban szenvedő betegekben a plazma cink koncentrációja alacsony, amely hozzájárulhat a vaszkuláris kalcifikáció progressziójához. Induktív csatolású plazma atomemissziós spektrometriával vizsgáltuk a hemodializált betegek, a carotis endarterectomia műtét előtt álló betegek és a kontroll csoport plazma cink koncentrációját. Kimutattuk, hogy a két betegcsoport plazma cink koncentrációja szignifikánsan alacsonyabb, mint a kontroll csoporté. A kapott eredmények alapján elmondható, hogy a fiziológiástól alacsonyabb cink koncentráció potenciális rizikó faktor lehet a vaszkuláris megbetegedésekben.

5.9. A magas glükóz fokozza a VSMC sejtek magas Pi-mediált extracelluláris mátrix kalcium depozícióját és Pi felvételét.

Ismert, hogy a *diabetes mellitus*, a hiperglikémia és a glükóz metabolizmus zavara fokozza a vaszkuláris kalcifikációt. Az általunk optimalizált *in vitro* kalcifikációs modellben megvizsgáltuk, hogyan befolyásolja a magas glükóz (11 mM) a VSMC sejtek Pi-indukált mineralizációját. Kimutattuk, hogy a normál glükóz (5,5 mM) és magas Pi koncentrációjú médiumban tenyésztett sejtek extracelluláris kalcium tartalma és Pi felvétele megemelkedett a kontrollhoz képest, melyet a magas glükóz szignifikánsan fokozott.

5.10. A BGP-15 csökkenti a magas Pi-indukált mineralizációját normál-és magas glükóz koncentráció esetén.

Annak vizsgálatára, hogy a BGP-15 milyen hatással van a VSMC sejtek Pi-indukált kalcifikációjára, a sejteket 10 napig tenyésztettük normál glükóz (5,5 mM) vagy magas glükóz (11 mM) koncentrációjú növekedési médiumban önmagában vagy 3 mmol/L Pi és BGP-15 (normál glükóz: 15-100 μ M BGP-15, magas glükóz: 50-200 μ M BGP-15) jelenlétében. Az extracelluláris mátrixban található kalcium depozitumokat Alizarin Red festéssel detektáltuk, mely azt mutatta, hogy a BGP-15 normál-és magas glükóz koncentráció mellett is dózisfüggő módon szignifikánsan csökkentette a magas Pi indukált mineralizációt. A kalcium mennyiségi meghatározásához az extracelluláris mátrix kalcium tartalmát mértük. A magas Pi hatására normál glükóz mellett szignifikánsan emelkedett kalcium koncentrációt figyeltünk meg, mely magas glükóz hatására tovább fokozódott. A BGP-15 mindkét glükózkoncentráció mellett csökkentette az extracelluláris mátrix kalcium tartalmát. Mivel a VSMC sejtek Pi-indukált kalcifikációjában meghatározó lépés a Pi sejtekbe történő felvétele, megvizsgáltuk az intracelluláris Pi koncentráció változásait. Kimutattuk, hogy a kalcifikáló médiumban tenyésztett sejtek intracelluláris Pi tartalma magasabb, mint a kontroll sejteké, melyet a magas glükóz tovább fokozott. A BGP-15 dózisfüggő módon csökkentette a Pi felvételt normál-, és magas glükózkoncentráció mellett is. Mivel a magas glükózt, és magas Pi-t tartalmazó médiumban tenyésztett sejtekben a 25 μ mol/L BGP-15 szignifikánsan nem csökkentette a Pi felvételt és a kalcium depozitumok mennyiségét, így a további kísérletekben ezt a koncentrációt nem alkalmaztuk.

5.11. A BGP-15 gátolja a simaizomsejt-specifikus markerek Pi-mediált csökkenését normál- és magas glükóz körülmények között is.

A VSMC sejtek kalcifikációjának és oszteokondrogenikus tranzíciójának jellegzetessége, hogy a sejtek elveszítik olyan simaizomsejt-specifikus markereiket, mint a traszgelin (TGLN) és a simaizom α -aktin (ACTA-2). Kimutattuk, hogy VSMC-ben normál glükóz (5,5 mM) és magas Pi (3 mM) hatására csökken TGLN és ACTA-2 expressziója, mely csökkenés magas glükóz (11 mM) esetén jelentősebb volt. A BGP-15 mindkét glükóz koncentráció esetén kompenzálta a TGLN és az ACTA-2 expresszió csökkenését.

5.12. A BGP-15 gátolja a Pi-indukált oszteokondrogenikus markerek expresszióját normál-és magas glükózkoncentráció mellett egyaránt.

A VSMC-k kalcifikációja során a simaizomsejt-specifikus markerek csökkenésével egyidőben az oszteoblaszt specifikus markerek expressziója emelkedik. Annak vizsgálatára, hogy a BGP-15 milyen molekuláris mechanizmuson keresztül fejti ki gátló hatását a VSMC-k mineralizációja megvizsgáltuk az oszteokondrogenikus transzformációban szerepet játszó gének

(KLF-5, MSX-2, BMP-2, Osx) expressziós mintázatát. A KLF-5 transzkripciós faktornak kiemelkedő szerepe van a VSMC-k mineralizációjának kezdeti fázisában. Kimutattuk, hogy Pi hatására a KLF-5 mRNS expresszió szignifikánsan fokozódott, mint a kontroll sejteké, melyet a BGP-15 dózisfüggő módon csökkentett. A magas glükóz fokozta a Pi-indukált KLF-5 mRNS expressziót a normál glükózhoz képest, melyet a BGP-15 szintén dózisfüggően csökkentett. Az MSX-2 transzkripciós regulátorként fontos szerepet tölt be a VSMC sejtek oszteoblaszt irányú tranzíciójában. Kimutattuk, hogy magas foszfát hatására normál glükóz koncentráció mellett az MSX-2 mRNS expressziója kétszeresére emelkedett, míg magas glükóz mellett több mint háromszorosára a kontrollhoz képest. A BGP-15 mindkét esetben dózisfüggő módon fejtette ki gátló hatását. A VSMC sejtek Pi-indukált mineralizációjában fontos szerepet játszó BMP-2 mRNS expresszióját vizsgálva kimutattuk, hogy magas Pi hatására a kontrollhoz képest közel háromszorosára, míg Pi és magas glükóz esetén több mint négyszeresére nőtt, melyet a BGP-15 dózisfüggően csökkentett. Az oszteoblaszt differenciáció és csontképződés jellegzetes transzkripciós faktora az Osx, melynek mRNS expressziója magas Pi hatására növekedett és a magas glükóz ezt a növekedést fokozta.

5.13. A BGP-15 gátolja az oszteokondrogenikus fehérjék Pi-indukált nukleáris transzlokációját.

A VSMC sejtek oszteoblaszt irányú transzdifferentiációjának jellegzetessége a KLF-5, az Msx-2, és az Osx fehérjék a sejtmagi transzlokációja. Western blot segítségével kimutattuk, hogy a KLF-5, az Msx-2 és az Osx fehérjék Pi hatására a sejtmagba transzlokálódnak, melyet a BGP-15 dózisfüggően gátolt. A KLF-5 transzkripciós faktor nukleáris transzlokációját immunfestéssel is igazoltuk.

5.14. A BGP-15 gátolja a VSMC-k Pi-indukált PDK-4 expresszióját és befolyásolja az extracelluláris vezikulumok fehérje összetételét.

A VSMC sejtek kalcifikációjában fontos szerepe van a PDK-4 fehérjének. Ez alapján megvizsgáltuk, hogy magas Pi és/vagy magas glükóz hatására hogyan változik a PDK-4 expressziója és a BGP-15 milyen hatással van rá. Kimutattuk, hogy magas Pi hatására normál glükózkoncentráció mellett a PDK-4 mRNS szint és fehérje expresszió közel kétszeresére emelkedett a kontrollhoz képest, míg magas Pi és magas glükóz esetén háromszoros indukciót figyeltünk meg. Mindkét esetben a BGP-15 dózisfüggő módon gátolta a PDK-4 expressziót.

A VSMC sejtek mineralizációja során, a megemelkedett extracelluláris kalcium koncentráció eredményeként fokozódik az extracelluláris vezikulumok (EV-k) szekréciója. Extracelluláris vezikulumot izoláltunk és Western Blot segítségével megvizsgáltuk a MatriX Gla protein (endogén kalcifikációs inhibitor fehérje) és az Annexin A2 (kalcifikációt fokozó fehérje)

fehérjék jelenlétét az EV-ben. Kimutattuk, hogy magas Pi hatására az MGP fehérje mennyisége kevesebb, mint a kontroll sejtekben, és a magas glükóz hatására tovább csökkent a mennyisége. A BGP-15 hatására az MGP fehérje mennyisége a kontroll szintjén maradt alacsony-, és magas glükóz koncentráció esetén is. Ezzel párhuzamosan az Annexin A2 fehérje mennyisége a magas foszfát és/vagy magas glükóz hatására nőtt, melyet a BGP-15 a kontroll szinten tartott.

6. DISZKUSSZIÓ

Krónikus veseelégtelenségben (CKD) a vaszkuláris kalcifikáció mellett az egyik legjelentősebb komplikáció az anémia. Az anémia terápiájában elsősorban rekombináns eritropoetint (EPO) alkalmaznak, melynek alternatívája az egyre szélesebb körben alkalmazott hipoxia indukálható faktor (HIF) prolin-hidroxiláz inhibitor (PHI) gyógyszerek (Roxadustat-FG4592), melyek kiemelkedő terápiás potenciállal rendelkeznek. Szakirodalmi adatok alapján az aktív HIF fehérjék fokozzák a magas Pi-mediált vaszkuláris kalcifikáció progresszióját, amely jelentős rizikó faktor a CKD patogenezisében. Munkánk során elsőként a gyógyszer indukált hipoxia és a vaszkuláris kalcifikáció közötti kapcsolatot vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy a PHI fokozza a VSMC sejtek foszfát indukált oszteoblaszt irányú transzdifferentiációját, mellyel igazoltuk, hogy a hipoxiás környezetben stabilizált HIF fehérjék felgyorsítják a vaszkuláris kalcifikáció folyamatát. Hipoxiás körülményekben a HIF-1 α dimerizálódik a citoszolban, majd a sejtmagba transzlokálódik, ahogy szabályozó fehérjeként a vaszkuláris kalcifikációban is fontos piruvát-dehidrogenáz kináz-4 fehérje expresszióját fokozza. Bizonyítottuk, hogy a PHI általi HIF stabilizálás fokozza a PDK-4 expressziót a magas Pi-indukált simaizomsejt mineralizációban. A vaszkuláris simaizomsejtekben (VSMC) a magas Pi oszteokondrogenikus fenotípus váltást idéz elő, mely során a VSMC-k elveszítik sejt-specifikus markereiket (smooth muscle 22 α , α -actin), de ezzel egyidőben az oszteoblaszt specifikus gének expressziója megemelkedik. Eredményeink bizonyítják, hogy a magas extracelluláris Pi hatására az oszteogén gének expressziója nő, míg a simaizomsejt specifikus markerek expressziója csökken. Megfigyeltük, hogy a PHI önmagában is csökkenti a simaizom α -aktin és a transzgelin gének expresszióját fiziológiás Pi koncentráció mellett. A vaszkuláris simaizomsejtek oszteokondrogén transzformációja során kiemelt szerepe van azoknak a fehérjéknek, amelyek az *in vivo* csontosodási folyamatokat is szabályozzák. A BMP-2 fehérje nagy mennyiségben expresszálódik a kalcifikált ateroszklerotikus plakkokban, és elősegíti a VSMC-k Pi-indukált kalcifikációját. Emellett ismert, hogy hipoxia során az oszteoblasztokban, valamint a mikrovaszkuláris endothél sejtekben emelkedett BMP-2 expresszió figyelhető meg. Ezek alapján kimutattuk, hogy a PHI fokozza a VSMC-k magas extracelluláris Pi-mediált kalcifikációja során az oszteogén gének (BMP-2, Msx-2 és Osx) expresszióját.

A Runx-2 transzkripciós faktor nélkülözhetetlen a VSMC-k oszteoblaszt irányú transzdifferentiációjához, azonban újabb kutatási eredmények alapján a Runx-2 poszt-transzkripcionális módosulásai szabályozzák az oszteogén gének expresszióját. A Ser451 (Serine 451) foszforilációja csökkenti a Runx-2 függő transzaktivációt, melyet mi is bizonyítottunk. A VSMC sejtekben PHI és magas Pi hatására csökkent a Runx-2 S451

foszforilációja. Mivel önmagában magas Pi hatására nem csökkent a Runx-2 S451 foszforilációja, így valószínűsíthető, hogy ehhez a poszt-transzkripcionális módosuláshoz több kalcifikációt fokozó tényezők együttes jelenléte szükséges. Az oxidatív stressz és a reaktív oxidációs termékek (ROS) részt vesznek a vaszkuláris kalcifikáció patogenezisében, mely hatás cink szupplementációval hatékonyan csökkenthető *in vitro*. Munkánk során kimutattuk, hogy a cink dózisfüggő módon csökkenti a PHI és/vagy magas Pi-indukált oszteoblaszt irányú transzdifferentiációt VSMC sejtekben. A metallotionein fehérjék elsődleges funkciója, hogy képesek szelektíven kötni a nehézfémionokat (cink, kadmium), de mellette antioxidáns hatásuk is van. Eredményeink alapján VSMC sejtekben a cink kalcifikációt gátló hatása a metallotionein fehérjétől független mechanizmus eredménye. A cinknek fontos szerepe van a vaszkuláris megbetegedésekben, mivel a CKD-ban szenvedő betegeknél az alacsony plazma cink koncentráció mellett felgyorsul a VSMC sejtek kalcifikációja. Ezek alapján megvizsgáltuk a hemodializált CKD-s betegek valamint a *carotis arteria stenosis*-ban szenvedő betegek plazma cink koncentrációját, mely mindkét betegcsoportnál alacsonyabb volt, mint a kontroll csoporté. Ez a megfigyelés is alátámasztja a plazma cink koncentráció ellenőrzésének fontosságát azoknál a betegeknél, akiknél a vaszkuláris kalcifikáció, mint rizikótényező fenn áll. *In vitro* kísérleteink eredményei igazolják, hogy a PHI (FG4592) fokozza a VSMC sejtek magas Pi-indukált oszteogén transzdifferentiációját, mivel csökkenti a simaizomsejt-specifikus markerek expresszióját, az oszteogén gének, valamint a PDK-4 expresszióját emeli és szabályozza a Runx-2 foszforilációját. Ezt a patofiziológias folyamatot a cink képes gátolni. Összességében elmondható, hogy a CKD-s betegek anémiájának terápiájában alkalmazott PHI-k egyik potenciális mellékhatása a vaszkuláris kalcifikáció fokozása, mely ebben a betegcsoportban az ásványi anyagok nem megfelelő metabolizmusa miatt az egyik legjelentősebb komplikáció. A PHI-k ez irányú kedvezőtlen hatásai cink szupplementációval csökkenthetők, így a CKD-s betegeknél a hemoglobin és EPO szint monitorozása mellett a plazma cink koncentráció nyomon követése is szükséges.

A vaszkuláris megbetegedések és a *diabetes mellitus* folyamatosan növekvő népegészségügyi gondot jelentenek világszerte. A *diabetes* egyik ismert szövődménye a vaszkuláris kalcifikáció, mely szükségessé teszi a két betegség közötti kapcsolat megismerését, a molekuláris mechanizmusok felderítését és találni egy olyan gyógyszer-jelölt molekulát, amellyel egyszerre kezelhető a hiperglikémia és a vaszkuláris kalcifikáció. A *diabetes mellitus* terápiájában fontos szerepet játszhat egy új, inzulin-szenzitizáló gyógyszer-jelölt molekula, a BGP-15. Korábbi tanulmányokban a BGP-15 hatását még nem vizsgálták a *diabetes mellitus* szövődményeként kialakult vaszkuláris megbetegedések patomechanizmusában.

Korábbi kutatási eredmények igazolják, hogy a magas glükóz fokozza a VSMC-k mineralizációs folyamatait. Kimutattuk, hogy a magas glükóz (11mM) fokozza a VSMC sejtek Pi-indukált oszteogén transzdifferentiációját és mineralizációját. A vaszkuláris simaizomsejtekre fiziológias esetben kontraktilis fenotípus jellemző, melyet a nagy mennyiségben expresszáldó sejt-specifikus markerek úgy, mint az ACTA-2 és TAGLN bizonyít. Az olyan exogén tényezők, mint a magas extracelluláris szerves Pi és a hiperglikémia csökkentik a simaizomsejt-specifikus markerek expresszióját és a VSMC-k fenotipikus változását idézik elő, mely során oszteoblast-szerű sejtekké alakulnak. Kimutattuk, hogy normál glükóz (5,5 mM) és magas Pi (3 mM) hatására csökkent az ACTA-2 és TAGLN expressziója, mely csökkenés magas glükóz (11 mM) és magas Pi (3 mM) esetén nagyobb mértékű volt. Kimutattuk, hogy a BGP-15 gátolja a simaizomsejt-specifikus markerek csökkenését mindkét glükózkoncentráció esetén. Ezek alapján elmondható, hogy a BGP-15 megelőzheti a VSMC-k fenotípus váltását hiperglikémia és/vagy hiperfoszfátémia esetén.

A VSMC-k mineralizációja és oszteokondrogén transzdifferentiációja során olyan oszteogén fehérjék aktiválódnak, mint a KLF-5, BMP-2, Msx-2 és Osx. A KLF-5-nek fontos szerepe van a magas Pi-indukált kalcifikáció folyamat kezdeti fázisában, és leírták, hogy nagy mennyiségben expresszáldik az adenin-indukált urémiás patkányok kalcifikált aortájában. Munkánk során igazoltuk, hogy magas Pi hatására emelkedett a KLF-5 expresszió és nukleáris transzlokáció, melyet a magas glükóz szignifikánsan fokozott. A BGP-15 csökkentette mind a magas Pi mind a magas Pi és magas glükóz-indukált KLF-5 expressziót és nukleáris transzlokációt, mely bizonyítja, hogy a BGP-15 meggátolja a VSMC-k fenotípus váltását a kalcifikáció korai szakaszában.

A BMP-2/Msx-2 útvonal aktiválódása nélkülözhetetlen az oszteoblast irányú transzdifferentiálódás folyamatában. Az Msx-2 fokozza a vaszkuláris kalcifikációt, mely hatása a *diabetes* szövődményeként kialakult oszteokondrogén átprogramozás is igazolt. A hiperglikémia emeli a BMP-2 expressziót, mely fokozza a VSMC-k kalcifikációját. Emelkedett plazma BMP-2 szint figyelhető meg érelmeszesedés és koszorúér mineralizáció során a 2-es típusú *diabetes*ben szenvedő betegekben. Ezekre az eredményekre alapozva elmondható, hogy a BMP-2/Msx-2 útvonal gátlása egy terápiás lehetőség lehet a magas glükóz és és/vagy magas Pi-indukált vaszkuláris kalcifikációban. Eredményeink azt mutatják, hogy a BGP-15 szignifikánsan gátolja a Pi által fokozott BMP-2 és Msx-2 expressziót normál-, és magas glükóz esetén is.

Az Sp7/Osterix a második legfontosabb transzkripciós faktor, mely nélkülözhetetlen az oszteoblast differenciációhoz és a csontképződéshez. Fontosságát bizonyítja, hogy Sp7/Osterix gén csendesítését követően csökkent a VSMC-k kalcifikációja egerekben.

Kimutattuk, hogy a BGP-15 gátolja a magas glükóz és/vagy magas Pi-mediált Osx expressziót és nukleáris transzlokációt.

A PDK-4 az autofágia gátlásán és a metabolizmus szabályozásán keresztül vesz részt a vaszkuláris kalcifikáció patogenezisében. Mivel a PDK-4 a *diabetes mellitus* és a vaszkuláris progresszióját is fokozza, így aktivitásának csökkentésével negatív hatásai is csökkenthetők lennének. *In vitro* kalcifikációs modellünkben a magas Pi hatására közel kétszeresére, míg magas glükóz és magas Pi hatására háromszorosára emelkedett a PDK-4 expresszió, azonban a BGP-15 mindkét esetben a kontroll szintjére csökkentette az expressziót.

Ismert, hogy a VSMC-k által szekretált extracelluláris vezikulák részt vesznek a vaszkuláris kalcifikációban. Az extracelluláris vezikulumokban a kalcifikációt gátló (MGP) és fokozó (Annexin A2) fehérjék egyaránt megtalálhatóak, azonban ha ezek mennyiségének egyensúlya zavart szenved a kalcifikáció folyamata felgyorsul. Az MGP (Matrix Gla Protein) fehérjéről ismert, hogy gátolja az arteriális kalcifikációt és csökkent mennyiségben van jelen a vaszkuláris kalcifikáció során. Az Annexin A2 a vaszkuláris kalcifikáció során szekretálódó extracelluláris vezikulákban nagy mennyiségben megtalálható. Az extracelluláris vezikulumokban található fehérjék közül az MGP-t és az Annexin A2-t vizsgálva azt kaptuk, hogy a magas Pi hatására csökkent az MGP mennyisége, míg az Annexin A2 mennyisége emelkedett. A BGP-15 a MGP expressziót a kontroll szinten tartotta, míg az Annexin A2 mennyiségét a kontroll szintjére csökkentette.

Korábbi tanulmányokban a különböző antidiabetikum gyógyszerek közül a Metformin hatását vizsgálták a vaszkuláris kalcifikációban. Kimutatták, hogy a metformin csökkenti a magas Pi -indukált oszteogén irányú transzdifferentiációt a cAMP aktivált protein kináz útvonalon keresztül, valamint a piruvát-dehidrogenáz kináz-4 gátlásán keresztül. Ezek alapján fontosnak tartottuk a BGP-15 hatását vizsgálni *in vitro* kalcifikációs modellünkben. Kísérleteink eredményei azt mutatják, hogy a BGP-15 nemcsak a magas Pi-indukált oszteokondrogén transzformációt és mineralizációt gátolja, hanem a hiperglikémia által fokozott magas Pi indukált kalcifikációs folyamatot is. Eredményeink bizonyítják, hogy a BGP-15 egy hatékony gyógyszer-jelölt lehet a *diabetes* szövődményeként kialakult vaszkuláris kalcifikációban, mivel gátolja a simaizomsejt specifikus markerek csökkenését, csökkenti az oszteogén gének expresszióját, csökkenti a prokalcifikációs-, és emeli az antikalcifikációs extracelluláris vezikulák szekrécióját normoglikémiában és hiperglikémiában egyaránt.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A vaszkuláris kalcifikáció elsődleges induktora a krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegeknek megfigyelhető ásványi,- és csontanyagcsere zavar. Pontos mechanizmusa még nem ismert, így nem áll a klinikusok rendelkezésére olyan gyógyszeres terápia, mellyel visszafordítható lenne ez a patofiziológias folyamat. Munkánk során azt vizsgáltuk, hogy milyen tényezők gyorsíthatják fel a vaszkuláris kalcifikációt, és milyen potenciális inhibitorok lehetnek, amelyek visszaszoríthatják ezt a folyamatot.

Kutatásaink során vizsgáltuk a cink lehetséges szerepét a magas Pi és/vagy PHI-indukált VSMC oszteoblaszt irányú transzformációjában. Kimutattuk, hogy a PHI a folyamatos HIF aktiváció eredményeként fokozza a vaszkuláris simaizomsejtek Pi-mediált kalcifikációját, melyet a cink dózisfüggő módon gátolt. A cink hatására az oszteoblaszt specifikus gének expressziója (BMP-2, Msx-2, Sp7/Osx) csökkent, míg a simaizomsejtekre jellemző markerek (ACTA-2, TGLN) expressziója a kontroll szinten maradt. A metallotionein, mint elsődleges cink - kötő fehérje szerepét vizsgáltuk a cink gátló hatásának mechanizmusában. A metallotionein gén csendesítését követően nyomon követtük a kalcifikáció folyamatát *in vitro* és megállapítottuk, hogy a cink mineralizációt gátló hatása a metallotioneintől független folyamat eredménye. A hemodializált és *carotis* műtét előtt álló betegek csökkent plazma cink koncentrációja arra enged következtetni, hogy a cinknek nagy jelentősége lehet az érbetegségek megelőzésében *in vivo*.

Az ásványi anyagok diszregulált metabolizmusa mellett a hiperglikémiának is szerepe van a vaszkuláris kalcifikáció progressziójában. Munkánk során kimutattuk, hogy magas glükóz (11 mM) hatására a Pi-indukált oszteoblaszt irányú transzdifferentiáció fokozódik a vaszkuláris simaizomsejtekben a normál glükózhoz (5,5 mM) képest. Az általunk optimalizált *in vitro* kalcifikációs modellen a BGP-15 hatását vizsgálva azt az eredményt kaptuk, hogy a BGP-15 dózisfüggő módon csökkenti az oszteogén gének (BMP-2, KLF-5, Msx-2, PDK-4) expresszióját és a KLF-5, Msx-2, Osx fehérjék nukleáris transzlokációját normál-, és magas glükó koncentráció mellett is.

Kutatási eredményeink összegzéseként elmondható, hogy a CKD-s betegeknek alkalmazott PHI kezelés mellett kiemelt jelentősége van a vaszkuláris kalcifikáció nyomon követésének, a plazma cink koncentráció monitorozásának és az cink szupplementációnak. Emellett a BGP-15 antidiabetikus hatása mellett potenciális gyógyszer jelölt lehet a diabetes asszociált vaszkuláris megbetegedések terápiájában is.



**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/115/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

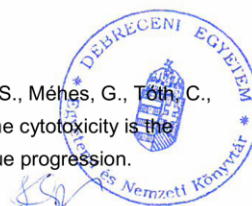
Jelölt: Nagy Annamária
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Nagy, A.**, Pethő, D., Gesztelyi, R., Juhász, B., Balla, G., Szilvássy, Z., Balla, J., Gáll, T.: BGP-15 Inhibits Hyperglycemia-Aggravated VSMC Calcification Induced by High Phosphate.
Int. J. Mol. Sci. 22 (17), 1-23, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22179263>
IF: 5.923 (2020)
2. **Nagy, A.**, Pethő, D., Gáll, T., Zavačzki, E., Nyitrai, M., Posta, J., Zarjou, A., Agarwal, A., Balla, G., Balla, J.: Zinc Inhibits HIF-Prolyl Hydroxylase Inhibitor-Aggravated VSMC Calcification Induced by High Phosphate.
Front. Physiol. 10, 1-15, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2019.01584>
IF: 4.566

További közlemények

3. Pethő, D., Gáll, T., Hendrik, Z., **Nagy, A.**, Beke, L., Gergely, P., Méhes, G., Tóth, C., Gram, M., Akerström, B., Balla, G., Balla, J.: Ferryl Hemoglobin and Heme Induce A1-Microglobulin in Hemorrhaged Atherosclerotic Lesions with Inhibitory Function against Hemoglobin and Lipid Oxidation.
Int. J. Mol. Sci. 22 (13), 1-20, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22136668>
IF: 5.923 (2020)
4. Pethő, D., Hendrik, Z., **Nagy, A.**, Beke, L., Patsalos, A., Nagy, L., Pólska, S., Méhes, G., Tóth, C., Potor, L., Eaton, J. W., Jacob, H. S., Balla, G., Balla, J., Gáll, T.: Heme cytotoxicity is the consequence of endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaque progression.
Sci. Rep. 11 (1), 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-89713-3>
IF: 4.379 (2020)





5. Gáll, T., Pethő, D., **Nagy, A.**, Balla, G., Balla, J.: Therapeutic Potential of Carbon Monoxide (CO) and Hydrogen Sulfide (H₂S) in Hemolytic and Hemorrhagic Vascular Disorders-Interaction between the Heme Oxygenase and H₂S-Producing Systems.
Int. J. Mol. Sci. 22 (1), 1-24, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22010047>
IF: 5.923
6. Gáll, T., Pethő, D., **Nagy, A.**, Hendrik, Z., Méhes, G., Potor, L., Gram, M., Akerström, B., Smith, A., Nagy, P., Balla, G., Balla, J.: Heme Induces Endoplasmic Reticulum Stress (HIER Stress) in Human Aortic Smooth Muscle Cells.
Front. Physiol. 9, 1-25, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2018.01595>
IF: 3.201

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 29,915

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
10,489**

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

Debrecen, 2022.03.16.



KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt köszönettel tartozom témavezetőmnek, Balla József Professzor Úrnak, aki lehetővé tette számomra, hogy PhD munkámat a Vaszkuláris Biológiai Kutató Laboratóriumban végezhessem. Hálával tartozom a tudományos munkám során nyújtott szakmai segítségéért, támogatásáért és türelméért.

Hálásan köszönöm Balla György Professzor Úrnak a támogatást, a kiváló ötleteket és hogy tudományos munkám során rávezetett az eredményes kutatómunkához szükséges gondolkodásra.

Köszönettel tartozom a Vaszkuláris Biológiai Kutató Laboratórium minden dolgozójának. Hálásan köszönöm Pethő Dávidnak, hogy kutatómunkámhoz szükséges alapvető módszereket megtanította és segítséget nyújtott a laboratóriumi kísérletek elvégzésében. Köszönet illeti Dr. Gáll Tamást a közös munka során nyújtott szakmai segítségéért, a publikációk valamint a disszertáció elkészítésében nyújtott segítségéért. Köszönöm Dr. Zavaczki Erzsébetnek a szakmai segítséget és a módszerek elsajátítását, mely segítette a kísérletes munkám. Köszönettel tartozom a laboratóriumban dolgozó asszisztenseknek: Tóth Juditnak és Fürtös Ibolyának.

Hálás köszönet illeti laboratóriumunk kollaborációs partnereit: Prof. Dr. Anupam Agarwalt és Dr. Abolfazl Zarjou-t (Alabama Egyetem, USA), Prof. Dr. Posta Józsefet (DE-TTK Földtudományi Intézet) és Dr. Tóth Csaba Zsigmondot (DE Sebészeti Intézet).

Végül, de nem utolsó sorban hálával tartozom családomnak: páromnak Bencének és kislányunknak Hédinek valamint szüleimnek és testéremnek, hogy szeretetükkel, türelmükkel és biztatásukkal végig kísérték munkámat.

Munkámat szeretett kislányomnak, Hédinek ajánlom!

A kutatómunkát támogató pályázatok: OTKA-K112333, OTKA-K132828, GINOP-2.3.2-15- 2016-00043 (IRONHEARTH), EFOP-3.6.2-16-2017-00006 (LIVE LONGER), EFOP-3.6.3-VEKOP16-2017-00009, ED_18-1-2019-0028, TKP2020-NKA-04, NKFIH-1150/6/2019.