DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Nagy Annamária

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

Debreceni Egyetem

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2023

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

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

Nagy Annamária

Témavezető: Prof. Dr. Balla József



Debreceni Egyetem

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2023

TARTALOMJEGYZÉK

R	ÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
1.	BEVEZETÉS	6
2.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
	2.1. Vaszkuláris kalcifikáció	7
	2.2. Vaszkuláris simaizomsejtek kalcifikációja és osztaoblaszt irányú	
	transzdifferenciációja	8
	2.3. A prolil-hidroxiláz inhibitorok hatásai a CKD-s betegek anémiájának terápiájában	10
	2.4. A cink-hiány szerepe a kardiovaszkuláris-, és egyéb betegségek patogenezisében	12
	2.4.1. A cink élettani hatásai	12
	2.4.2. A cink hiány és következményei	13
	2.5. A BGP-15, mint inzulin-szenzitizáló gyógyszerjelölt	. 14
3.	CÉLKITŰZÉSEK	15
4.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	. 16
	4.1. Sejttenyésztés és reagensek	. 16
	4.2. Kalcium depozíció mérése	. 16
	4.2.1. Alizarin Red festés	. 16
	4.2.2. Kalcium depozíció kvantálása kolorimetriás módszerrel	. 17
	4.2.3. Extracelluláris kalcium depozitumok fluoreszcens festése	. 17
	4.3. Intracelluláris Pi mérése	. 17
	4.4. RNS izolálás és kvantitatív polimeráz láncreakció	. 17
	4.5. Teljes sejtlizátum és sejtmag szeparálás	. 18
	4.6. Western blot	. 18
	4.7. Metallotionein 1 és metallotionein 2 siRNS transzfekció	. 19
	4.8. Humán minták	. 19
	4.9. Plazma cink koncentráció meghatározása induktív csatolású plazma atomemissziós spektrometriával (ICP-AES)	20
	4.10. Immunfluoreszcens festés	20
	4.11. Extracelluláris vezikulum izolálás	20
	4.12. Statisztikai elemzés	21
5.	EREDMÉNYEK	22
	5.1. A cink dózisfüggően gátolja a VSMC-k Pi-indukált mineralizációját	22
	5.2. A PHI fokozza a VSMC-k magas Pi-indukált kalcifikációját, melyet a cink gátol	23

5.3. A PHI (FG4592) csökkenti a simaizomsejt-specifikus gének expresszióját23
5.4. A PHI fokozza az oszteogén markerek expresszióját, melyet a cink gátol
5.5. A PHI hatása a Runx2 Ser451 foszforilációjára25
5.6. A piruvát dehidrogenáz kináz- 4 (PDK- 4) szerepe a vaszkuláris kalcifikációban 26
5.7. A cink a metallotionein fehérjétől függetlenül gátolja a vaszkuláris kalcifikációt 27
5.8. A CKD szenvedő betegek és a carotis műtét előtt álló betegek plazma cink koncentrációja alacsony
5.9. A magas glükóz fokozza a VSMC sejtek magas Pi-mediált extracelluláris mátrix kalcium depozícióját és Pi felvételét
5.10. A BGP-15 csökkenti a magas Pi-indukált mineralizációját normál-és magas glükóz koncentráció esetén
5.11. A BGP-15 gátolja a simaizomsejt-specifikus markerek Pi-mediált csökkenését normál- és magas glükóz körülmények között is
5.12. A BGP-15 gátolja a Pi-indukált oszteokondrogenikus markerek expresszióját normál- és magas glükózkoncentráció mellett egyaránt
 5.12. A BGP-15 gátolja a Pi-indukált oszteokondrogenikus markerek expresszióját normál- és magas glükózkoncentráció mellett egyaránt
 5.12. A BGP-15 gátolja a Pi-indukált oszteokondrogenikus markerek expresszióját normál- és magas glükózkoncentráció mellett egyaránt
 5.12. A BGP-15 gátolja a Pi-indukált oszteokondrogenikus markerek expresszióját normál- és magas glükózkoncentráció mellett egyaránt
 5.12. A BGP-15 gátolja a Pi-indukált oszteokondrogenikus markerek expresszióját normál- és magas glükózkoncentráció mellett egyaránt. 35 5.13. A BGP-15 gátolja az oszteokondrogenikus fehérjék Pi-indukált nukleáris transzlokációját. 37 5.14. A BGP-15 gátolja a VSMC-k Pi indukált PDK-4 expresszióját és befolyásolja az extracelluláris vezikulumok fehérje összetételét. 39 6. DISZKUSSZIÓ. 41 7. ÖSSZEFOGLALÁS
 5.12. A BGP-15 gátolja a Pi-indukált oszteokondrogenikus markerek expresszióját normál- és magas glükózkoncentráció mellett egyaránt. 35 5.13. A BGP-15 gátolja az oszteokondrogenikus fehérjék Pi-indukált nukleáris transzlokációját. 37 5.14. A BGP-15 gátolja a VSMC-k Pi indukált PDK-4 expresszióját és befolyásolja az extracelluláris vezikulumok fehérje összetételét. 39 6. DISZKUSSZIÓ. 41 7. ÖSSZEFOGLALÁS 47 8. SUMMARY.
5.12. A BGP-15 gátolja a Pi-indukált oszteokondrogenikus markerek expresszióját normál- és magas glükózkoncentráció mellett egyaránt. 35 5.13. A BGP-15 gátolja az oszteokondrogenikus fehérjék Pi-indukált nukleáris transzlokációját. 37 5.14. A BGP-15 gátolja a VSMC-k Pi indukált PDK-4 expresszióját és befolyásolja az extracelluláris vezikulumok fehérje összetételét. 39 6. DISZKUSSZIÓ 41 7. ÖSSZEFOGLALÁS 47 8. SUMMARY 48 IRODALOMJEGYZÉK 49
5.12. A BGP-15 gátolja a Pi-indukált oszteokondrogenikus markerek expresszióját normál- és magas glükózkoncentráció mellett egyaránt. 35 5.13. A BGP-15 gátolja az oszteokondrogenikus fehérjék Pi-indukált nukleáris transzlokációját. 37 5.14. A BGP-15 gátolja a VSMC-k Pi indukált PDK-4 expresszióját és befolyásolja az extracelluláris vezikulumok fehérje összetételét. 39 6. DISZKUSSZIÓ 41 7. ÖSSZEFOGLALÁS 47 8. SUMMARY 48 IRODALOMJEGYZÉK 49 TÁRGYSZAVAK/KEYWORDS 62
5.12. A BGP-15 gátolja a Pi-indukált oszteokondrogenikus markerek expresszióját normál- és magas glükózkoncentráció mellett egyaránt. 35 5.13. A BGP-15 gátolja az oszteokondrogenikus fehérjék Pi-indukált nukleáris 37 5.14. A BGP-15 gátolja a VSMC-k Pi indukált PDK-4 expresszióját és befolyásolja az 39 6. DISZKUSSZIÓ 41 7. ÖSSZEFOGLALÁS 47 8. SUMMARY 48 IRODALOMJEGYZÉK 49 TÁRGYSZAVAK/KEYWORDS 62 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 63

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ALP: alkalikus-foszfatáz
BSA: bovine serum albumin
CKD: Chronic Kidney Disease; Krónikus vesebetegség
DMEM: Dulbecco-féle módosított sejttenyésztő médium
DMSO: dimetil-szulfoxid
EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav
GAPDH: glicerinaldehid 3-foszfát-dehidrogenáz
HAoSMC: humán aorta simaizomsejtek
OCN: oszteokalcin
Osx: Sp7/Osterix
PBS: foszfát-pufferelt sóoldat
PFA: paraformaldehid
Pi: inorganikus foszfát
Pit-1: nátrium-dependens foszfát kotranszporter
Runx-2: Runt-related transcirption factor 2
TRIS: trisz-(hidroximetil)-aminometán
VSMC: vaszkuláris simaizomsejt
PHI: prolil-hidroxiláz inhibitor
HIF: hipoxia indukálta faktor
Hsp70: hősokk fehérje 70
Hsp90: hősokk fehérje 90
EPO: eritropoietin
LDL: alacsony sűrűségű lipoprotein
ESRD: End-stage renal disease; végstádiumú veseelégtelenség
BMP-2: Bone Morphogenetic Protein 2
Msx2: Msh Homeobox 2
ACTA-2: Smooth muscle alpha-actin 2
TAGLN: transzgelin
MGP: Mátrix-Gla protein

Ppi: pirofoszfát
EV: extracelluláris vezikula
CREB: cAMP-response Element Binding Protein
GSH: glutation
SOD: szuperoxid dizmutáz
KLF-5: Krueppel-like faktor 5
ZnCl₂: cink-klorid
VHL: von Hippel-Lindau fehérje

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 jelentkeznek, 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 hidroxiapatit 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 transzdifferenciációja. 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 transzdifferenciációjára. 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 [1]. 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 érelmeszesedés (atherosclerosis), a CKD, a diabetes mellitus, és számos kardiovaszkuláris megbetegedés patogenezisében úgy, mint a miokardiális infarktus [2, 3, 4], és koszorúér betegség [5]. A vaszkuláris kalcifikáció hosszú évek alatt progresszívan kialakuló betegség, amely nagy hasonlóságot mutat a csontképzés mechanizmusával, mivel az érfalban található kalcifikált léziók olyan sejttípusokat is tartalmaznak, amelyek oszteoblaszt-, és oszteoklaszt- szerű potenciállal rendelkeznek [6]. 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 ásványianyagcserezavar áll, mely a vaszkuláris simaizomsejtek (vascular smooth muscle cell, VSMC) oszteoblaszt irányú transzdifferenciációját eredményezi [7, 8]. Kialakulásának kockázatát számos tényező [9] növeli úgy, mint a magas vérnyomás, a diszlipidémia, az elhízás, a glükóz metabolizmus zavara, de az oxidatív stressz, az anémia, a mikroinflammáció, mint nemtradicionális faktorok [10] is szerepet játszanak kialakulásában. A vaszkuláris kalcifikációnak két megjelenési formája van: (1) az intima kalcifikáció, amely az érfal tunica intima rétegében az ateroszkelrotikus 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 [11]. A CKD-s és hemodializált betegeknél a media kalcifikáció elsőrendű kóroki tünetként jelentkezik és megközelítőlég húszszorosára növeli a karidovaszkuláris mortalitás és morbiditás kockázat [12]. 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 [13].

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 [14]. Az I-es típusú cukorbetegek megközelítőleg 30%-ánál, míg a IIes típus cukorbetegek 50%-ánál alakul ki vesebetegség [15], melynek progressziója során a patológiás glükóz homeosztázishoz egy emelkedett plazma Pi szint is társul, mely fokozott rizikótényezőként szerepet játszik a vaszkulopátia kialakulásában [16].

2.2. Vaszkuláris simaizomsejtek kalcifikációja és osztaoblaszt irányú transzdifferenciációja

Végstádiumú veseelégtelenségben (end-stage renal disease, ESRD) a vaszkuláris kalcifikáció fő induktora a tartósan magas szérum Pi szint, mivel a vesefunkciók csökkenésének következtében csökken a Pi elimináció [17]. Korábbi tanulmányok eredményei azt mutatják, hogy az emelkedett extracelluláris Pi szint a VSMC-k oszteoblaszt irányú fenotípus-váltását és kalcifikációját idézi elő [18]. Az extracelluláris Pi sejtbe történő bejutása elsősorban egy membrán transzporteren, a Pit-1 nátrium-dependens foszfát kotranszporteren keresztül megy végbe [19]. A megemelkedett intracelluláris Pi koncentráció indukálja az oszteogén differenciáció markereinek (BMP-2 [bone morphogenic protein-2], Runx-2 [Run-related transciption 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 [20]. A vaszkuláris kalcifikáció folyamatának egyik mester regulátora a Runx-2, mely transzkripciós faktorként részt vesz az oszteoblaszt differenciálódásban, és szabályozza a csont mátrix fehérjék expresszióját [21]. Fontosságát bizonyítja, hogy CKD-ban szenvedő betegek szövettani mintáját vizsgálva fokozott Runx-2 expresszió figyelhető meg a kalcifikált artériákban [22]. Az emelkedett Runx-2 expresszió szabályozza azon gének expresszióját, melyek az oszteoblaszt fenotípus jellegzetes markerei. Az alkalikus foszfatáz (alkaline phosphatase, ALP) az oszteoblaszt irányú transzdifferenciáció korai fázisában aktiválódó hidroláz enzim, mely az extracelluláris mátrix kalcium depozitumainak kialakulását gátló pirofoszfát szintjét csökkenti [23]. 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 [24]. Az oszteogenezisben és a VSMC-k mineralizációjaban fontos szerepe van az oszteokalcinnak (osteocalcin, OC), mely egy K-vitamin-függő nem kollagén típusú extracelluláris mátrix fehérje [25]. Az OC poszttranszlációs γ-karboxiláció eredményeként képes nagy affinitással kötődni a kalciumhoz és a hidroxiapatithoz [26].

A VSMC-k oszteoblaszt irányú fenotípus váltását fokozó tényezők mellett fiziológiásan megtalálhatóak a kalcifikációt gátló endogén inhibitorok is (Fetuin-A, Osteopontin, MGP [Matrix-Gla protein], pirofoszfát [piroPi]). Abban az esetben, ha ezeknek a fehérjéknek a homeosztázisa zavart szenved a vaszkuláris kalcifikáció folyamata felgyorsul.

Az elmúlt néhány év kutatási eredményei az mutatják, hogy a vaszkulatúra sejtjei által szekretált extracelluláris vezikulumoknak (EV) kiemelkedő szerepük van a kardiovaszkuláris rendszer fiziológiás és patofiziológiás folyamataiban is [27]. 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 (1-4µm). A cirkuláló EV-k képesek fehérjéket, lipideket és aminosavakat szállítani, mellyel részt vesznek az intracelluláris jelátviteli folyamatok szabályozásában [28]. A VSMC-k által szekretált EV-k fontos szerepet játszanak a vaszkuláris kalcifikáció korai szakaszában [29]. A VSMC-k fiziológiás körülmények között is szekretálnak extracelluláris EV-ket, melyek nem tartalmaznak hidroxiapatit kristályokat, viszont megtalálható bennük a Fetuin-A és az MGP fehérje, melyek a kalcifikáció jellegzetes inhibitorai [30].



1. ábra: A vaszkuláris kalcifikáció mechanizmusa krónikus veseelégtelenségben. Normál esetben a mezenchimális őssejtek zsírsejtekké, oszteoblasztokká, kondrocitákká és vaszkuláris simaizomsejtekké (VSMC) differenciálódnak. Krónikus vesebetegség, cukorbetegség, öregedés, gyulladás során ezek a VSMC-k dedifferenciálódnatnak, vagy oszteo/kondrocitaszerű sejtekké alakulhatnak át a Runx-2 és az MSX2 transzkripciós faktorok expressziójának fokozódása következtében. Ezek a transzkripciós faktorok nélkülözhetetlenek a normál csontfejlődéshez, így a VSMC-ben megfigyelhető fokozott expressziójuk fenotípus-váltást idéz elő. Ezek az osteo/kondrocita-szerű VSMC-k ezután a csontképződéshez hasonló folyamat során elmeszesednek. A sejtek kollagént és nem kollagén fehérjéket halmoznak fel a *tunica intima*ban vagy a *media*ban, valamint kalciumot és foszfort építenek be a mátrix vezikulákba hogy beindítsák a mineralizációt és végül hidroxiapatitot szekretáljanak.

A legtöbb CKD-s betegben megfigyelhető pozitív kalcium,-és foszfor egyensúly egyaránt hozzájárul a sejttranszformációhoz és a mátrix vezikulumok képződéséhez. Végső soron a keringésben található inhibitorok (fetuin-A, pirofoszfát, mátrix Gla fehérje, osteopontin) is szabályozzák a mineralizáció folyamatát (Forrás: *Moe SM, Chen NX. Mechanisms of vascular calcification in chronic kidney disease. J Am Soc Nephrol. 2008;19(2); 213-6* [31]).

Kutatócsoportunk leírta, hogy a hem a hem-oxigenáz/ferritin rendszer aktiválásán keresztül gátolja a VSMC-k oszteoblaszt irányú transzformációját. Ez a gátló mechanizmus a H-ferritin ferroxidáz aktivitásának tulajdonítható [32]. Emellett kutatócsoportunk elsőként írta le, hogy a kén-hidrogén egy potenciális inhibitora a VSMC-k foszfát indukált kalcifikációjának, és a CKD-ban a csökkent cisztation gamma-liáz aktivitás eredményeként csökken a plazma kén-hidrogén szint, mely hozzájárul a vaszkuláris kalcifikáció felgyorsulásához [33].

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

CKD-ban a vaszkuláris kalcifikáció mellett az egyik legjelentősebb szövődmény az anémia [34], mivel a vérképzés folyamata alapvető károsodást szenved, valamint nagymértékben csökken vagy megszűnik az endogén EPO termelés [35]. Az anémia kezelésében elsősorban rekombináns EPO-t, vagy eritropoézis stimuláló gyógyszert alkalmaznak, melyek hatékonysága nagy variabilitást mutat és gyakran súlyos szövődményeket eredményeznek [36,37]. A CKD-asszociált anémia kezelésében egyre szélesebb körben ismertek a PHI-k (Roxadustat, Vadadustat), melyek a HIF prolil-hidroxiláz domén (PHD) fehérjéket gátolják. [38]. A vérképződés szabályozásában fontos szerepet játszó EPO, valamint az EPO receptor szintézisét, a vas abszorpcióban és transzportban, valamint a hem szintézisben részt vevő fehérjéket is szabályozzák [39,40]. 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 aktiválja a célgéneket [41]. Normoxiában a prolil-hidroxiláz enzimek (PHD1, PHD2, PHD3 izoformák) hidroxilálják a HIF fehérjéket [42], majd a VHL fehérje protein komplex ubikvitinálja és végül proteoszómálisan degradálódik, mely hatással van a HIF által szabályozott gének aktivációjára is [43]. A HIF prolil-hidroxiláz enzim működését gátló PHIk lehetővé teszik, hogy a HIF-ek és a szabályozásuk alatt álló gének normoxiás körülmények között is aktívak legyenek [44]. Állatkísérletes és humán klinikai tanulmányokban leírták, hogy a PHD enzim PHI általi gátlása fokozta az endogén EPO termelést [45].



2. ábra: A HIF-1a szabályozása normoxiában és hipoxiában. Normoxia során a HIF-1a folyamatosan szintetizálódik és lebomlik. HIF-1a alegység az O₂-függő hidroxilezési reakciók szabályozzák, amelyeket a Prolil Hidroxiláz Domain fehérje (PHD) katalizál, ami elősegíti a Von Hippel-Lindau (VHL) fehérje kötődését, mely a HIF-1a ubikvitinációját és ezt követő lebomlását eredményezi a proteoszómán keresztül. Hipoxiás körülmények között a HIF-1a-val való interakciót blokkoló fehérjék lebomlanak, így képes lesz dimert képezni a konstitutívan expresszálódó HIF-1 β -val. A HIF-1a ezáltal stabilizálódik, a sejtmagba transzlokálódik, odavonzza az olyan transzkripciós ko-aktiváló fehérjéket,mint a p300 és a CREB-kötő fehérje (CBP), így szerkezetileg képes lesz a DNS konszenzusos szekvenciához kötődni, és aktiválja a célgéneket (Forrás: *Bruno RB Pires, Andrey LM, Gerson MF, Carolina P, Rafael CMC Silva, Eliana A. The Hypoxia-Inducible Factor-1a Signaling Pathway and its Relation to Cancer and Immunology. American Journal of Immunology 2014, 10 (4): 215.224 [47]).*

Számos PHI ismert (Roxadustat, Vadadustat, Enarodustat), melyek közül a Roxadustat (FG4592) került az elmúlt évek klinikai tanulmányainak középpontjába. A Roxadustat egy orálisan alkalmazható gyógyszer, mely PHI-ként gátolja a PHD enzim aktivitását, ezáltal emeli a HIF transzkripciós aktivitását [48]. Ennek eredményeként a Roxadustat dózis függő módon emeli a kezelt betegek hemoglobin szintjét és szignifikánsan csökkenti a hepcidin szintet [49]. 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 [50].

A PHI-k vizsgálatával egyidőben számos tanulmány bizonyította, hogy a HIF fehérjéknek szerepük van a vaszkuláris kalcifikációban is [47]. Ennek vizsgálata azért is fontos, mivel CKDban a hiperfoszfatémia önmagában is a vaszkuláris kalcifikáció elsődleges induktora, így a PHIk alkalmazása potenciálisan fokozhatja a vaszkuláris kalcifikáció folyamatát. A hipoxia és a vaszkuláris kalcifikáció direkt kapcsolata és molekuláris mechanizmusa még nem ismert. A hipoxia fő mester regulátora a HIF-1α, mely fokozza a glikolízist és csökkenti az oxidatív foszforilációt, mellyel elősegíti a sejtek adaptációját a hipoxiás környezethez. A piruvátdehidrogenáz kináz 1-4 (PDK 1-4) a glükóz metabolizmus mitokondriális regulátorai, melyek csökkentik a PDH aktivitást [51], ezáltal gátolják a piruvát \rightarrow acetil-CoA átalakulást. A PDK-4 és a HIF-1 α expressziója emelkedik nemcsak hipoxia során, hanem a vaszkuláris simaizmok mineralizációja során is [47]. Ismert, hogy a HIF-1 α képes a PDK-4 promóteréhez kötődni, így hatással van a PDK-4 által szabályozott gének expressziójára is [52].

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/differenciácóban, és számos biokémiai folyamatban [53]. 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 [54]. 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 [55]. 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 [56].

A metallotioneinek kis méretű, ciszteinben gazdag, intracelluláris fehérjék, melyek szelektíven és nagy affinitással kötik a nehézfémionokat, köztük a cinket is, és emellett jelentős antioxidáns funkcióval rendelkeznek [57]. A metallotioneinek védik a biológiai struktúrákat és az RNS-t az oxidatív hatásokkal szemben. A cink a metallotionein fehérjéről gyorsan leválik és újabb metallotionein szintézist indukál, így a metallotioneinek mennyisége a szövetben stabilizálódik [58]. A cink mobilizációja két cink traszporter családon keresztül történik: az egyik az ZnT/SLC30A a másik pedig a ZiP/SLC39A. A ZnT/SLC30A a citoplazmából szállítja a cinket az extraelluláris mátrixba, valamint a különböző sejtorganellumokba, míg a ZiP/SLC39A a citoplazmába szállítja a cinket az intracelluláris térből [59]. A szervezetünkben található cink mennyiség 95%-a intracellulárisan található meg, tehát az extracelluláris cink mennyisége csekély. A cirkuláló cink nagy része albuminhoz, transzferrinhez és α2-mikroglobulinhoz kötődik, emellett a különböző cink transzporterekhez kötődve biztosítják a sejtek megfelelő cink homeosztázisát [60].



3. ábra: Összefoglaló a cink kulcsfontosságú szabályozó szerepeiről a szív- és érrendszeri betegségekben. A cink mobilizációját az extra,-és intracelluláris tér között a ZnT és ZiP cink transzporter fehérjecsalád tagjai végzik. A metallotionein egy intracelluláris fehérje, szelektíven és nagy affinitással köti a cinket. A cink jelentős antioxidáns hatással rendelkezik, mivel gátolja a Fenton-reakció kialakulását, fokozza a MT és a GSH szintézist és emeli a SOD aktivitását. Anti-inflammatórikus hatása is fontos, mivel csökkenti az oxidatív stresszt, csökkenti a pro-inflammatórikus fehérjék szintézisét és fokozza az immunrendszer védekezőképességét. Cink hiány esetén többek között a vaszkulatúra sejtjeiben ezek a biokémiai folyamatok zavart szenvednek, így megnő a kardiovaszkuláris megbetegedések kockázata [61].

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 különböző anyagcsere folyamatok. A fejlődő országokban a cink-hiány olyan jelentős, hogy ez az ötödik vezető ok, amely szerepet játszik különböző betegségek kialakulásában [62], 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 [63]. 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 kísérleti eredmények igazolják, hogy a cinknek protektív szerepe van az érelmeszesedési folyamatban, mely fő rizikó tényezője a szív-és érrendszeri megbetegedéseknek [64]. 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 [65].

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

A BGP-15 (*N'*-(2-hydroxy-3-(piperidin-1-yl)propoxy)-3-pyridine-carboximidamide), egy hidroximsav származék, melynek elsődleges funkciója a különböző citosztatkiumok neuro-, nefro-, és mielotoxikus hatásainak csökkentése volt. Az elmúlt években számos kutatócsoport feltárta a BGP-15 jótékony hatásait, köztük az inzulin-szenzitizációt is és anti-inflammatórikus hatást is. [66]. A BGP-15 pontos hatásmechanizmusa és intracelluláris célpontjai nem ismertek, azonban a szervezet egy jól ismert mechanizmusát, a hősokk protein expressziót befolyásolja. Jellemzője, hogy nem önmagában vált ki stresszfehérje szintézist, hanem ko-indukcióval, vagyis fokozza különböző stimulusok által kiváltott stresszválaszt. A BGP-15 jótékony hatásai az alábbi mechanizmusokon alapul [67]:

- gátolja a hősokk faktor 1 (HSF-1) acetilációját, ezáltal emelkedik a hősokk fehérjék expressziója (HSP)
- blokkolja a JNK gyulladásos citokint, amely az inzulin receptort foszforilálja; így fokozódik az inzulisszenzitivitás
- a BGP-15 gátolja a poli (adenozin 5'-difoszfát)–ribóz] polimeráz 1 (PARP-1) enzim működését, mellyel csökken a mitokondriális ROS képződés; ezáltal védi a sejtet az oxidatív stressz-szel és a sejthalállal szemben.
- emeli az AKT inzulin jelátvitelben fontos szerepet játszó fehérje expresszióját, mely fokozott glükóz felvételt eredményez.

A BGP-15 inzulinérzékenyítő 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 [68]. New Zealand nyúl modellen vizsgálva a BGP-15 hatását azt az eredményt kapták, hogy csak a koleszterin-dús diétán lévő csoportnál volt megfigyelhető az inzulinrezisztencia javulása [69]. Humán klinikai vizsgálat bizonyította, hogy a BGP-15 javította az inzulinrezisztenciába szenvedő betegek inzulin-szenzitivitását, a glükóz felhasználását és az izomszövet glükóz hasznosulását is [70]. Ezen kívül a BGP-15 védelmet nyújt a diabetes szövődményeként kialakult kardiomiopátia [71] és retinopátiával [72] szemben is.

3. CÉLKITŰZÉSEK

- 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.
 - Vizsgáltuk, hogy a PHI (Roxadustat-FG4592) fokozza-e a VSMC-k magas Pi indukált kalcifikációját és oszteoblaszt irányú transzdifferenciációját?.
 - Vizsgáltuk, hogy a cink gátolja-e ezt a patológiás folyamatot?
 - Vizsgáltuk, hogy a metallotioneinnek, mint a cinket nagy affinitással kötő fehérjének szerepe van-e a cink vaszkuláris kalcifikációt gátló hatásának mechanizmusában?
 - 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.
- hipotézis: a BGP-15 potenciális antikalcifikációs hatásának vizsgálata a VSMC-k magas Pi indukált kalcifikációjában normál- és magas glükóz koncentrációk mellett.
 - Elsőként megnéztük, hogy a magas glükóz (11 mM) hogyan befolyásolja a humán aorta simaizomsejtek magas Pi indukált oszteoblaszt irányú transzdifferenciációját.
 - 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. Sejttenyésztés 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 (Allandale, 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 glükózkoncentrációjú (5,5 mmol/L) DMEM-ben tenyésztettük, melyet 10% foetális borjúszérummal (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 glükózkoncentrációjú (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 glükózkoncentrációjú) egészítettük ki 3 mmol/L inorganikus Pi-vel (Na2HPO4/NaH2PO4 pH 7.4). A cink kalcifikációt gátló hatásának vizsgálatához deionizált vízben oldott ZnCl₂ x 6H₂O használtunk különböző koncentrációban (15-30 µmol/L) és ezzel egészítettük ki a kalcifikáló médiumot. A 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 (50-200 µmol/L). A kísérletek során a tápfolyadékot kétnaponta cseréltük a sejtkultúrákon.

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 dekalcifikáltuk 37°C- on 30 percig és mértük a felülúszó kalcium tartalmát QuantiCrom Calcium Assay Kit (Gentaur, Brussels, Belgium) segítségével. A dekalcifikációt 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 fehérjeként 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 (normál és magas glükózkoncentrációjú) és kalcifikáló médiumban önmagában és 50µmol/l (normál glükóz) vagy 150µmol/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 Appliccation Sofwre X (Leica, Manneheim, Germany) segítségével végeztük.

4.3. Intracelluláris Pi mérése

Az intracelluláris Pi koncentráció meghatározása kolorimetriás módszerrel történt a QuantiCromTM 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-két 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/SM22α (Hs0103877_g1), MT1a (Hs00831826_s1), MT21a (Hs02379661_g1), GAPDH (Hs02786624_g1), RNA45S5 (Hs05627131_Gh). A polimeráz láncrekació 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 pufferel (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 inhibítor). 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 (Ser 451), az Msx-2 és az Osx fehérjék nukleáris transzlokalizációjának vizsgálatához sejtmag frakciót, míg a többi vizsgált fehérje expressziós mintázatának meghatározásához teljes sejtlizátumot 10 vagy 12%-os Tris-glicin SDS gél elektroforézissel választottuk 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 egy 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]), Metallotionein (Abcam, Cambridge, United Kingdom; Cat.: ab12228 [1:1000]), PDK-4 (Abcam, Cat.: ab88063

[1:1000]), Msx-2 (Novus Biologiccals, Centennial, Colorado, US, Cat: NPB1-85445), Annexxin A2 (Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA, Cat: #8235), MGP (Novus Biologicals, Bio-Techne Ltd., Abringdon, 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, míg sejtmag esetén Lamin B1 fehérjére normalizátuk. 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 siRNSt. 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 100µmol/L ZnCl_{2-dal} kiegészítve 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 megfele az 1975 évi Helsinki 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 glükózkoncentrációjú), kalcifikáló médiumban önmagában és 50 µmol/ vagy 150 µmol/ 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 sejteke 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 a Leica Appliccation Sofwre X (Leica, Manneheim, Germany) segítségével végeztük.

4.11. Extracelluláris vezikulum izolálás

A kalcifikáció során kialakuló EV-k vizsgálatához VSMC-ket normál,-és magas glükózkoncetrációjú növekedési médiumban tenyésztettünk önmagában valamint 3 mmol/L Pivel kiegészítve 10 napig. A kalcifikáló tápfolyadékot kiegészítettük normál glükóz esetén 50 µmol/L BGP-15-el, míg magas glükóznál 150 µmol/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±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 transzdifferenciációját. [73,74]. 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 glükózkoncentrációjú növekedési médium kiegészítve 3mM inorganikus Pi-vel) önmagában vagy különböző koncentrációjú (15-30µM) ZnCl₂ hozzáadásával. A magas Pi-t tartalmazó médiumban tenyésztett sejteknél az extracelluláris kalcium depozíció mennyisége nőtt, melyet a cink dózisfüggően gátolt (4.A-B). 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 kotranszporteren keresztül valósul meg [75]. Az intracelluláris Pi koncentrációt mérve azt kaptuk, hogy a kalcifikáló médiumban tenyésztett sejtek Pi felvétele jelentősen nőtt, melyet 15 µmol/L koncentrációjú cink szignifikánsan gátolt (4.C).



4. ábra: A cink dózisfüggően gátolja a VSMC-k magas Pi-indukált mineralizációját. A VSMC-het kalcifikáló médiumban tenyésztettük önmagában vagy 15, 20, 25 és $30\mu/L$ ZnCl₂ hozzáadásával (A-C). Az extracelluláris mátrix kalcium depozitumait Alizarin Red festéssel vizualizáltuk, melyek reprezentatív képei, valamint mikroszkópos képei három független kísérlet eredményeiből láthatóak (A). Az extracelluláris mátrix dekalcinálását követő kalcium tartalom mérésének átlaga látható három független kísérlet alapján (B). A VSMC-k intracelluláris Pi koncentrációját teljes sejtlizátumból mértük (C) (*saját eredmények*).

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 transzdifferenciációját [47], így a PHI, a HIF stabilizáció útján, potenciálisan fokozza a VSMC-k mineralizációját. A VSMC-ket kalcifikáló médiumban tenyésztettünk önmagában vagy 5 és 20 μmol/L FG4592 jelenlétében, melyet kiegészítettünk 30 μmol/L ZnCl₂-dal 10 napig. Az extracelluláris mátrix kalcium tartalmát, valamint a Pi felvételt mérve elmondható, hogy az FG4592 dózisfüggő módon fokozza a mineralizációt a Pi-indukált kalcifikációhoz képest, melyet a 30 μmol/L ZnCl₂ szignifikánsan gátolt (5.A-C).



5. ábra: A PHI (FG4592) fokozza a VSMC-k mineralizációját, melyet a cink gátol. A VSMC-ket kalcifikáló médiumban tenyésztettük kiegészítve 5 és 20 μM FG4592-vel önmagában vagy 30 μmol/L ZnCl₂ hozzáadásával 10 napig. Az extracelluláris mátrix kalcium depozitumait Alizarin Red festéssel tettük láthatóvá (A). A dekalcifikált extracelluláris mátrix kalcium tartalma látható három független kísérlet és mérés átlaga alapján (B). A VSMC-k intracelluláris Pi koncentrációját teljes sejt lizátumból határoztuk meg és három független mérés átlagát ábrázoltuk (**C**) (*saját eredmények*).

5.3. A PHI (FG4592) csökkenti a simaizomsejt-specifikus gének expresszióját

A VSMC-k kalcifikációjának egyik fő jellegzetessége, hogy a sejtek elveszítik sejt-specifikus markereiket [76]. A hipoxia a HIF-1α-án keresztül a VSMC-ken fenotipikus változást idéz elő [77]. Ezért megvizsgáltuk, hogy a PHI által fokozott 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 µmol/L FG4592-vel és kiegészítettük 30 µmol/L ZnCl₂-dal., majd nyomon követtük a kalcifikáció folyamatát 10 napig. A VSMC-k Pi-indukált kalcifikációja során az ACTA-2 (6.A) és a TAGLN (6.B) 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 felerősítik, additív módon csökkentve az ACTA-2 és TGLN gének expresszióját, mely cinkkel kompenzálható.



6. ábra A PHI csökkenti a simaizomsejt-specifikus markerek expresszióját, melyet a cink kompenzál. VSMCket tenyésztettünk növekedési,- és kalcifikáló médiumban növekvő koncentrációjú (5 és 20 μ mol/L) FG4592-vel kiegészítve önmagában és 30 μ mol/L ZnCl₂ hozzáadásával 10 napig. ACTA-2 (**A**) és TAGLN (**B**) mRNS szinteket mértünk qRT-PCR-rel. A kapott eredményeket 3 független kísérlet átlagaként±szórás ábrázoltunk (*saját eredmények*).

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

Az általunk optimalizált *in vitro* kalcifikációs modellen megvizsgáltuk, hogy a PHI 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 μmol/L koncentrációban szignifikánsan gátolt (7.A-C). Kísérleteink során megfigyeltük, hogy a PHI önmagában (magas Pi nélkül) nem befolyásolja a BMP-2, az Msx-2 és az Osx mRNS szintjét.



7. ábra: A PHI fokozza az oszteogén gének expresszióját, melyet a cink gátol. VSMC-ket tenyésztettünk növekedési médiumban önmagában vagy 5 és 20 μmol/L PHI jelenlétében és kalcifikáló médiumban önmagában vagy 5 és 20μmol/L PHI mellett, 30 μmol/L ZnCl₂-dal kiegészítve 10 napig és az oszteogén markereket qRT-PCR-rel vizsgáltuk. A BMP-2 (A), az Msx-2 (B) és az Sp7/Osterix (C) gének relatív expresszióját RNA45S5 mRNS szintre normalizáltuk és kapott eredményeket 3 független kísérlet átlagaként±szórás ábrázoltunk (*saját eredmények*).

5.5. A PHI hatása a Runx2 Ser451 foszforilációjára.

A Runx-2 transzkripciós faktor a vaszkuláris kalcifikáció patogenezisének az egyik fő szabályozó fehérjéje. Az oszteogén gének Runx-2 függő transzaktivációját a Runx-2 Ser451 foszforilációja szabályozza [78, 79, 80]. A Runx-2 nukleáris transzlokációját és foszforiláltsági állapotát Western blot segítségével vizsgáltuk, melynek során a VSMC-kből sejtmagot szeparáltunk. Kimutattuk, hogy az általunk beállított *in vitro* kalcifikációs környezetben (magas Pi önmagában vagy PHI-vel kiegészítve) a Runx-2 nukleáris transzlokácója a növekedési médiumában tenyésztett sejtekhez képest nem változott (8.A). A Runx-2 Ser451 foszforilációt vizsgálva kimutattuk, hogy magas Pi és PHI együttes jelenlétében a Ser451 defoszforilálódik, mely folyamatot a cink 30 μmol/L koncentrációban szignifikánsan gátolt (8.B).



8. ábra: PHI hatása a Runx-2 foszforilációjára. VSMC-ket tenyésztettünk növekedési médiumban és kalcifikáló médiumban önmagában vagy 5 és 20 μmol/L PHI jelenlétében 30 μmol/L ZnCl₂-dal kiegészítve 10 napig. A Runx2 nukleáris transzlokációját (**A**) és a Ser451 foszforilációját (**B**) Western blot segítségével vizsgáltuk sejtmag extraktumból. A diagramok három független kísérlet Runx2 és Runx2 Ser451 specifikus sávok Lamin B1 fehérjére normalizált denzitásainak átlagát±szorás ábrázolják (*saját eredmények*).

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 [81,82,83]. A VSMC sejtekben magas Pi hatására a PDK-4 mRNS szintje megemelkedett, melyet a PHI tovább fokozott (9.A). 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 (9.B) A kapott eredmények alapján elmondható, hogy cink transzkripciós,- és poszt-transzlációs szinten is gátolja a VSMC-k Pi és Pi+PHI indukált PDK-4 expressziót.



9. ábra: A PDK-4 szerepe a VSMC-k kalcifikációjában. A VSMC-ket növekedési médiumban és kalcifikáló médiumban tenyésztettük önmagában vagy 5 és 20 μmol/L PHI jelenlétében 30 μmol/L ZnCl₂-dal kiegészítve 10 napig. A PDK-4 mRNS szintjét qRT-PCR-rel vizsgáltuk és RNA45S5 mRNS szintre normalizáltuk és három független kísérlet eredményének átlagát±szórás mutatja a diagram (A). A PDK-4 fehérje expresszióját Western blot segítségével vizsgáltuk és HSP-90-re normalizáltuk (**B**). (*saját eredmények*)

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) [84] és központi szerepük van az antioxidáns folyamatokban is [85]. 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 metallotioneinnek. A VSMC-ket kalcifikáló médiumba tenyésztettük önmagában vagy 30 µmol/L ZnCl₂-dal kiegészítve 10 napig, majd qRT-PCR-rel vizsgáltuk a metallotionein 1a és 2a expresszióját. Mivel a 30 µmol/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 [86,87], így azt feltételeztük, hogy *in vitro* kalcifikációs modellünkben is hasonló funkciója van. Ennek vizsgálatához a további kísérleteinkben 100 µmol/L koncentrációjú ZnCl₂-dal egészítettük ki a kalcifikáló médiumot, amely a kontrollokhoz képest szignifikánsan emelte a metallotionein 1a és 2a mRNS szintet (10.A-B). Ezt követően metallotionein 1a és 2a specifikus siRNS-sel csendesítettük a MT1 és MT2

expresszióját, melynek hatékonyságát Western blot segítségével ellenőriztük (10.C). A géncsendesítéssel egyidőben a sejteket kalcifikáló médiumban tenyésztettük önmagában vagy 100 µmol/L ZnCl₂-dal kiegészítve 10 napig, majd mértük az extracelluláris mátrix kalcium koncentrációját. Kimutattuk, hogy a metallotionein gén csendesítése mellett is a cink gátolja a VSMC sejtek magas Pi-mediált mineralizációját (10.D).



10. ábra: A cink vaszkuláris kalcifikációt gátló hatása a metallotioneintől független. VSMC sejtet kezeltünk magas foszfát tartalmú médiummal önmagában és 100 μ mol/L ZnCl₂ jelenlétében. A metallotionein 1a (A) és 2a (B) relatív expresszióját qRT-PCR-rel vizsgáltuk és RNS45S5 mRNS szintre normalizáltuk. A sejteket MT 1a/2a specifikus siRNS-sel transzfektáltuk és kalcifikáló médiumban önmagában és 100 μ mol/L ZnCl₂-dal kiegészítve tenyésztettük 10 napig. A géncsendesítés hatékonyságát immunoblottal vizsgáltuk (C). A MT1a/2a géncsendesített sejtek extracelluláris mátrix kalcium tartalmát vizsgáltuk. (D). A kapott eredményeket három független kísérlet átlagaként±szórás ábrázoltuk (*saját eredmények*).

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 [88]. 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 kontoll csoporté (11.). 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 [89, 90]. 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 (12.A) és Pi felvétele (12.B) megemelkedett a kontrollhoz képest, melyet a magas glükóz szignifikánsan fokozott.



12. ábra: A magas glükóz fokozza a VSMC sejtek Pi-mediált extracelluláris mátrix kalcium depozícióját és Pi felvételét. VSMC sejteket tenyésztettünk normál glükóz (5,5 mM) és magas glükóz (11 mM) tartalmú növekedési médiumban önmagában vagy 3 mmol/L Pi-vel kiegészítve 10 napig. A szolubilizált extracelluláris mátrix kalcium koncentrációját (A) és az intracelluláris Pi szintet (B) három független kísérlet átlagaként±szórás ábrázoltuk (*saját eredmények*).

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 µM BGP-15, magas glükóz: 50-200 µM BGP-15) jelenlétében. Az extracelluláris mátrixban található kalcium depozitumokat Alizarin Red festéssel detektáltuk, mely azt mutatta, hogy a BGP-15 normál-és magas glükózkoncentráció mellett is dózisfüggő módon szignifikánsan csökkentette a magas Pi-indukált mineralizációt (13.A). 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 (13.B-C). Az Alizarin Red festés megerősítéseként a depozitumokat fluoreszcensen jelöltük és konfokális mikroszkóppal tettük láthatóvá (13.D) Mivel a VSMC sejtek Pi-indukált kalcifikációjában meghatározó lépés a Pi sejtekbe történő felvétele [75], megvizsgáltuk az intracelluláris Pi koncentráció változásait. Kimutattuk, hogy a kalcifikáló médiumban tenyésztett sejtek intracelluláris Pi tartalma

magasabb, mint a kontroll sejteké (13.E), melyet a magas glükóz tovább fokozott (13.F). 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 µmol/L BGP-15 szignifikánsan nem csökkentette a Pi felvételt és a kalcium depozitumok mennyiségét, így a további kísérletekben ezt a koncentrációt nem alkalmaztuk.





13. ábra: A BGP-15 csökkenti a magas Pi-indukált mineralizációját normál- és magas glükózkoncentráció esetén. VSMC sejteket tenyésztettünk normál glükóz (5,5 mM) és magas glükóz (11 mM) tartalmú médiumban önmagában vagy 3 mM Pi-vel kiegészítve és hozzáadtunk normál glükóz esetén 15-100 μ M BGP-15-öt, míg magas glükóznál (11 mM) 25-200 μ M BGP-15-öt 10 napon át. Az extracelluláris mátrix kalcium minőségi meghatározásához Alizarin Red festést (A), valamint fluoreszcens festést végeztünk OsteoSense 680 segítségével (D). Az extracelluláris mátrix szolubilizálását követően a kalcium mennyiségi meghatározását végeztük el (B,C). Az intracelluláris Pi koncentrációját teljes sejtlizátumból mértük (E,F). Az eredmények három egymástól független kísérlet átlagaként±standard hiba ábrázoltuk (*saját eredmények*).

5.11. A BGP-15 gátolja a simaizomsejt-specifikus markerek Pi-mediált csökkenését normálés 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) [91]. Kimutattuk, hogy VSMC-ben normál glükóz (5,5 mM) és magas Pi (3 mM) hatására csökken TGLN és ACTA-2 expressziója (14.A-D), mely csökkenés magas glükóz (11 mM) esetén jelentősebb volt (14.E-H). A BGP-15 mindkét glükózkoncentráció esetén kompenzálta a TGLN és az ACTA-2 expresszió csökkenését.





14. ábra: A BGP-15 gátolja a simaizomsejt-specifikus markerek Pi-mediált csökkenését normál- és magas glükóz körülmények között is. VSMC sejteket tenyésztettünk normál glükóz (5,5 mM) és magas glükóz (11 mM) tartalmú médiumban önmagában vagy 3 mM Pi-vel kiegészítve és hozzáadtunk normál glükóz esetén 15-100 μM BGP-15-öt, míg magas glükóznál (11 mM) 50-200 μM BGP-15-öt 10 napon át. A TAGLN és az ACTA-2 mRNS relatív expressziójátt qRT-PCR-rel vizsgáltuk (A,C,E,G) és RNA45S5-re normalizáltuk, majd immunoblottal néztük meg az TAGLN és ACTA-2 fehérjék expressziós változását, melyet GAPDH-ra normalizátunk (B,D,F,H). A kapott eredményeket három független kísérlet átlagából±szórás kaptuk.

5.12. A BGP-15 gátolja a Pi-indukált oszteokondrogenikus markerek expresszióját normálés 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 [92]. Kimutattuk, hogy Pi hatására a KLF-5 mRNS expresszió szignifikánsan fokozódott, a kontroll sejtekhez képest, 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 (15.A-B). Az MSX-2 transzkripciós regulátorként fontos szerepet tölt be a HAoSMC sejtek oszteoblaszt irányú tranzíciójában. Kimutattuk, hogy magas foszfát hatására normál glükózkoncentráció 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 (15.C-D). 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 (15.E-F). Az oszteoblaszt differenciáció és csontképződés jellegzetes transzkripciós faktora az Osx [93], melynek mRNS expressziója magas Pi hatására növekedett és a magas glükóz ezt a növekedést fokozta (15.G-H).





15. ábra: A BGP-15 gátolja a Pi-indukált oszteokondrogenikus markerek expresszióját normál-és magas glükózkoncentráció mellett egyaránt. VSMC sejteket tenyésztettünk normál glükóz (5,5 mM) és magas glükóz (11 mM) tartalmú médiumban önmagában vagy 3 mM Pi-vel kiegészítve és hozzáadtunk normál glükóz esetén 15-100 μM BGP-15-öt, míg magas glükóznál (11 mM) 50-200 μM BGP-15-öt 10 napon át. qRT-PCR-el vizsgáltuk a KLF-5 (A-B), a BMP-2 (C-D) és az Osx (E-F) mRNS expressziót és RNA45S mRNS szintre normalizáltuk. Az eredmények három egymástól független kísérlet átlagát±szórás mutatják (*saját eredmények*).

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

A VSMC sejtek oszteoblaszt irányú transzdifferenciációjának jellegzetessége a KLF-5, az Msx-2, és az Osx fehérjék sejtmagi transzlokációja. Western blot segítségével kimutattuk, hogy a KLF-5 (16.A-B), az Msx-2 (13.C-D) és az Osx (16.E-F) fehérjék Pi hatására a sejtmagba transzlokálódnak, melyet a BGP-15 dózisfüggően gátolt. A KLF-5 transzkripciós faktor nukleáris transzlokációját immunfestéssel is igazoltuk (16.G).







16. ábra: A BGP-15 gátolja az oszteokondrogenikus fehérjék Pi-indukált nukleáris transzlokációját. VSMC sejteket tenyésztettünk normál glükóz (5,5 mM) és magas glükóz (11 mM) tartalmú médiumban önmagában vagy 3 mM Pi-vel kiegészítve és hozzáadtunk normál glükóz esetén 15-100 μM BGP-15-öt, míg magas glükóznál (11 mM) 50-200 μM BGP-15-öt 10 napon át. Immunoblottal vizsgáltuk a KLF-5 (A-B), Msx-2 (C-D) és az Osx (E-F) nukleáris transzlokációját és Lamin B1-re normalizáltuk. A KLF-5 fehérje nukleáris transzlokációját

immunfluoreszcens festéssel is igazoltuk (G). Az immunfluoreszcens festést megelőzően a VSMC sejteket kalcifikáló médiumban tenyésztettük önmagában vagy normál glükóz esetén 50 µM, míg magas glükóznál 150 µM BGP-15-el kiegészítve. A sejtmagokat Hoechst festékkel festettük.

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 [94] 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 (17.A-B), míg magas Pi és magas glükóz esetén háromszoros indukciót figyeltünk meg (17.C-D). Mindkét esetben a BGP-15 dózisfüggő módon gátolta a PDK-4 expressziót.

A VSMC sejtek mineralizációja során, a megemelkedett extracelluláris kalciumkoncentráció eredményeként fokozódik az extracelluláris vezikulumok (EV-k) szekréciója [95, 96]. Extracelluláris vezikulumot izoláltunk és Western Blot segítségével megvizsgáltuk a Mátrix 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 (14.E). Ezzel párhuzamosan az Annexin A2 fehérje a magas foszfát és/vagy magas glükóz hatására nőtt, melyet a BGP-15 a kontroll szinten tartott (17.F).





17. ábra: A BGP-15 gátolja a VSMC-k Pi indukált PDK-4 expresszióját és befolyásolja az extracelluláris vezikulumok fehérje összetételét. HAoSMC sejteket tenyésztettünk normál glükóz (5.5 mM) és magas glükóz (11 mM) tartalmú médiumban önmagában vagy 3 mM Pi-vel kiegészítve és hozzáadtunk normál glükóz esetén 15-100 μM BGP-15-öt, míg magas glükóznál (11 mM) 50-200 μM BGP-15-öt 10 napon át. A PDK-4 mRNS expressziót qRT-PCR-el vizsgáltuk és GAPDH mRNS szintre normalizátuk (A,C), majd a fehérje expressziót immunoblottal vizsgáltuk és GAPDH-ra normalizáltuk (B,D). Az extracelluláris vezikulák vizsgálatához a sejtkezelés során normál glükóz esetén 50 μM BGP-15-el, míg magas glükóz esetén 150 μM BGP-15-el egészítettük ki a kalcifikáló médiát. A sejtkezelést követően extracelluláris vezikulát izoláltunk és immunoblottal vizsgáltuk az MGP (E) és az Annexin A2 (F) fehérjék expresszióját.

6. DISZKUSSZIÓ

Krónikus veseelégtelenségben (CKD) a vaszkuláris kalcifikáció mellett az egyik legjelentősebb komplikáció az anémia [97]. Az anémia terápiájában elsősorban rekombináns eritropoetint (EPO) alkalmaznak, melynek alternatívája az egyre szélesebb körben alkalmazott hipoxia indukálható faktor (HIF) prolil-hidroxiláz inhibitor (PHI) gyógyszerek (Roxadustat-FG4592), melyek kiemelkedő terápiás potenciállal rendelkeznek [98, 98]. Szakirodalmi adatok alapján az aktív HIF fehérjék fokozzák a magas Pi-mediált vaszkuláris kalcifikáció progresszióját, amely jelentős rizikó faktor a CKD patogenezisében [100, 101, 102]. 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 transzdifferenciációját, mellyel igazoltuk, hogy a hipoxiás környezetben stabil HIF fehérjék felgyorsíjták a vaszkuláris kalcifikáció folyamatát [47, 103]. Hipoxiás körülményekben a HIF-1α dimerizálódik a citoszolban, majd a sejtmagba transzlokálódik, ahogy szabályozó fehérjeként a vaszkuláris kalcifikációban is fontos piruvát-dehidrogenáz kináz-4 fehérje expresszióját fokozza [104] Munkánk során 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 sejtspecifikus markereiket (smooth muscle 22 α , α actin), de ezzel egyidőben az oszteoblaszt specifikus gének expressziója megemelkedik [105]. 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 ateroszlerotikus plakkokban [106], és elősegíti a VSMC-k Pi-indukált kalcifikációját [105]. Emellett ismert, hogy hipoxia során az oszteoblasztokban [108], valamint a mikrovaszkuláris endothél sejtekben [109] 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 transzdifferenciációjához [110], azonban újabb kutatási eredmények alapján a Runx-2 poszt-

transzkripcionális módosulásai szabályozzák az oszteogén gének expresszióját [111, 112,]. A S451 (Serine 451) foszforilációja csökkenti a Runx-2 függő transzaktivációt, melyet munkánk során 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, valamint a reaktív oxidációs termékek (ROS) részt vesznek a vaszkuláris kalcifikáció patogenezisében, mely hatás cink szupplementációval hatékonyan csökkenthető *in vitro* [113, 114]. Ennek alapja, hogy a cink szupplementáció fokozza azoknak a fehérjéknek az expresszióját, amelyek a ROS semlegesítésében vesznek részt. Munkánk során kimutattuk, hogy a cink dózisfüggő módon csökkenti a PHI és/vagy magas Pi-indukált oszteobalszt irányú transzdifferenciációt 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 [115]. 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 transzdifferenciációját, mivel csökkenti a simaizomsejt-specifikus markerek expresszióját, az oszteogén gének, valamint a PDK-4 expresszióját emeli és szabályozza a Runx-2 foszforilációját. Ezt a patofiziológás folyamatot a cink képes gátolni (18. ábra)

42



18. ábra: A cink gátolja a HIF-PHI fokozott magas Pi-indukált oszteoblaszt irányú transzdifferenciációt VSMC sejtekben. A prolil-hidroxiláz inhibitor FG4592 fokozza a vaszkuláris kalcifikációt azáltal, hogy növeli a VMSC-k Pi felvételét, csökkenti a simaizomsejt specifikus markerek (ACTA-2, TAGLN) expresszióját, az osztoeogén gének (BMP-2 [Bone morphogenic protein-2], Msx-2 [Msh Homeobox 2], Osx) és PDK-4 (piruvát-dehidrogenáz kináz 4) expresszióját emeli és csökkenti a Runx-2 Ser451 foszforilációs szintjét, melynek eredményeként nő az extracelluláris mátrixban a kalcium depozitumok mennyisége. A cink gátolja a PHI által fokozott Pi-indukált kalcifikációját azáltal, hogy megtartja a VSMC-k fenotipusát, csökkenti a Pi felvételt és az oszteogén markerek valamint a PDK-4 expresszióját és foszforilálva tartja a Runx-2 Ser451-et, melynek eredményeként csökken az extracelluláris mátrixban található kalcium depozitumok mennyisége,

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 [116, 117], 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 [118, 119]. A *diabetes mellitus* terápiájában fontos szerepet játszhat egy új, inzulin-szenzitizáló gyógyszert-jelölt molekula, a

BGP-15 [68]. 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 [120, 121]. Kimutattuk, hogy a magas glükóz (11mM) fokozza a VSMC sejtek Pi-indukált oszteogén transzdifferenciációját és mineralizációját. A vaszkuláris simaizomsejtekre fiziológiás esetben kontraktilis fenotípus jellemző, melyet a nagy mennyiségben expresszálódó sejtspecifikus markerek úgy, mint az ACTA-2 és TAGLN bizonyítanak. Az olyan exogén tényezők, mint a magas extracelluláris szervetlen Pi és a hiperglikémia csökkentik a simaizomsejt-specifikus markerek expresszióját és a VSMC-k fenotipikus változását idézik elő, mely során oszteoblaszt-szerű sejtekké alakulnak [122]. 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 hiperfoszfatémia esetén.

A VSMC-k mineralizációja és oszteokondrogén transzdifferenciációja 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 expresszálódik az adenin-indukált urémiás patkányok kalcifikált aortájában [91]. Ezek az eredmények is bizonyítják, hogy a fokozott KLF-5 expresszió összefüggésbe hozható az érelmeszesedés progressziójával és egyéb kardiovaszkuláris megbetegedésekkel [123]. 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 váltásást a kalcifikáció korai szakaszában.

A BMP-2/Msx-2 útvonal aktiválódása nélkülözhetetlen az oszteobalszt irányú transzdifferenciálódás folyamatában. Az Msx-2 fokozza a vaszkuláris kalcifikációt [124], mely hatása a *diabetes* szövődményeként kialakult oszteokondrogén átprogramozás is igazolt [125]. A hiperglikémia emeli a BMP-2 expressziót, mely fokozza a VSMC-k kalcifikációját [121]. Emelkedett plazma BMP-2 szint figyelhető meg érelmeszesedés és koszorúér mineralizáció során a 2-es típusú *diabetes*ben szenvedő betegekben [126]. Ezekre az eredményekre alapozva elmondható, hogy a BMP-2/Msx-2 útvonal gátlása egy terápiás lehetőség lehet a magas glükóz 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 oszteoblaszt differenciációhoz és a csontképződéshez [127]. Fontosságát bizonyítja, hogy Sp7/Osterix gén csendesítését követően csökkent a VSMC-k kalcifikációja egerekben [128]. 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 [81]. A metabolikus megbetegedések közül az inzulinrezisztenciában és a hiperglikémiában is kiemelt szerepe van a PDK-4-nek [129]. Mivel a PDK-4 a *diabetes mellitus* és a vaszkuláris progresszióját is fokozza, így aktvitásának 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 szintéjre csökkentette az expressziót.

Ismert, hogy a VSMC-k által szekretált extracelluláris vezikulák részt vesznek a vaszkuláris kalcifikációban [130]. Az extracelluláris vezikulákba a kalcifikációt gátló (MGP) és fokozó (Annexin A2) fehérjék egyaránt megtalálhatóak, azonban ha ezek mennyiégének egyensúlya zavart szenved, a kalcifikáció folyamata felgyorsul [131]. Az MGP (Matrix Gla Protein) fehérjéről ismert, hogy gátolja az arteriális kalcifikációt és csökkent mennyiségben van jelen a vaszkuláris kalcifikáció során [132, 133]. Az Annexin A2 a vaszkuláris kalcifikáció során szekretálódó extracelluláris vezikulákban nagy mennyiségben megtalálható [134]. 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 transzdifferenciációt a cAMP aktivált protein kináz útvonalon keresztül [135], valamint a piruvát-dehidrogenáz kináz-4 gátlásán keresztül [136]. Ezek alapján fontosnak tartottuk a BGP-15 hatásást vizsgálni *in vitro* kalcifikációs modellünkben. Kísérleteink eredményei azt mutatják, hogy a BGP-15 nemcsak a magas Pi-indukált oszteokondrogén trnszformációt és mineralizációt gátolja, hanem a hiperglikémia által fokozott magas Pi-indukált kalcifikácós 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 osztogén gének expresszióját, csökkenti a prokalcifikációs-, és emeli az antikalcifikációs extracelluláris vezikulák szekrécióját normoglikémiában és hiperglikémiában egyaránt (19. ábra).



19. ábra: A BGP-15 gátolja a magas glükóz és/vagy foszfát-indukált oszteobalszt irányú transzdifferenciációt VSMC sejtekben. A magas glükóz fokozza a VSMC sejtek magas Pi-indukált oszteoblaszt irányú transzdifferenciációját azáltal, hogy növeli a foszfátfelvételt, az oszteogén gének expresszióját és nukleáris transzlokációját fokozza, a simaizomsejt specifikus gének expresszióját csökkenti, a prokalcifikációs extracelluláris vezikulumok szekrécióját emeli, míg az antikalcifikációs EV-k szekrécióját csökkenti a normál glükózhoz képest. A BGP-15 normál-, és magas glükóz koncentráció esetén is gátolja a VSMC sejtek magas szervetlen Pi indukált oszteogén transzformációját.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A vaszkuláris kalcifikáció elsődleges induktora a krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegeknél megfigyelhető ásványi,- és csontanyagcsere zavar. Pontos mechanizmusa még nem ismert, így nem áll a klinikusok rendelkezésére olyan gyógyszeres terápia, mellyel visszafordítható lenne ez a patofiziológiás folyamat. Munkánk során azt vizsgáltuk, hogy milyen tényezők gyorsíthatják fel a vaszkuláris kalcifikáció, 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 maradtak. 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 hemodializálált 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 transzdifferenciáció 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 glükózkoncentráció mellett is.

Kutatási eredményeink összegzéseként elmondható, hogy a CKD-s betegeknél 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.

8. SUMMARY

The major inducer of vascular calcification is the disorder of mineral and bone metabolism in patients with chronic renal failure. Its exact mechanism is not clear yet, so there is no available drug therapy for clinicians to reverse this pathophysiological process. In our study we investigated the factors that may accelerate vascular calcification and the potential inhibitors that may inhibit this process.

In our research we investigated the possible role of zinc in the osteoblast transformation of VSMCs induced by high Pi and / or PHI. We demonstrate that PHI enhances Pi-mediated calcification of vascular smooth muscle cells as a result of continuous HIF activation which is inhibited by zinc in a dose-dependent manner. Zinc decreased the expression of osteoblast-specific genes (BMP-2, Msx-2, Sp7 / Osx), while the expression smooth muscle cell-specific markers (ACTA-2, TGLN) remained at the control level. We investigated the role of metallothionein as a primary zinc - binding protein in the mechanism of the inhibitory effect of zinc. We monitored the calcification process after the silencing of metallothionein gene in *vitro* and we found that the inhibitory effect of zinc on mineralization is independent metallotionenin. Decreased plasma zinc levels in patients undergoing hemodialysis and undergoing carotid surgery suggest that zinc may be of great importance in the prevention of vascular disease *in vivo*.

In addition to the dysregulated metabolism of minerals, hyperglycemia also plays role in the progression of vascular calcification. We have shown that high glucose (11 mM) increases Piinduced osteoblast transdifferentiation in vascular smooth muscle cells compared to normal glucose (5,5 mM). Examining the effect of BGP-15 in our optimized *in vitro* calcification model we found that BGP-15 reduced the expression of osteogenic genes (BMP-2, KLF-5, Msx-2, PDK-4) in a dose-dependent manner and the nuclear translocation of KLF-5, Msx-2, Osx proteins at both normal and high glucose concentrations.

The result of this study demonstrate that in addition to PHI treatment in patients with CKD zinc plasma levels and stage of vascular calcification should be closely monitored and zinc supplementation might be considered.

In addition to the antidiabetic effect of BGP-15, it may be a potential drug candidate for the treatment of diabetes-associated vascular disease.

IRODALOMJEGYZÉK

- [1.] Mahmood SS, Levy D, Vasan RS et al. The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: a historical perspective. *The Lancet* 2014; 383; 999–1008.
- [2.] Beadenkopf WG, Daoud AS, Love BM. Calcification in the coronary arteries and its relationship to arteriosclerosis and myocardial infarction. *The American Journal of Roentgenology, Radium Therapy, and Nuclear Medicine* 1964; 92; 865–71.
- [3.] Loecker TH, Schwartz RS, Cotta CW et al. Fluoroscopic coronary artery calcification and associated coronary disease in asymptomatic young men. *Journal of the American College of Cardiology* 1992; 19; 1167–72.
- [4.] Andrew LD, Mei YS, Marta S, Cecilia MG, Catherine MS. Role of smooth muscle cells in vascular calcification: implications in atherosclerosis and arterial stiffness. *Cardiovasc Res.* 2018; 114(4): 590–600.
- [5.] **Olson JC, Edmundowicz D, Becker DJ, et al.** Coronary calcium in adults with type 1 diabetes: A stronger correlate of clinical coronary artery disease in men than in women. *Diabetes* 2000; 49; 1571–8.
- [6.] Gérard ML, Alain PG, Sylvain J, Marchais FM, Bruno P, Hasan A. Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2003; 18; 9;1731– 1740,
- [7.] Ricardo VB. Vascular Calcification: Key Roles of Phosphate and Pyrophosphate. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22; 13536
- [8.] Yongjiang Q, Lihua L, Zhen S, Jia L, Wei Y, Zhongqun W. A multi-omics view of the complex mechanism of vascular calcification. *Biomed Pharmacother*. 2021, 135:111192.
- [9.] Kannel WB, Dawber TR, Kagan A, Revotskie N, Stokes J. 3rd Factors of risk in the development of coronary heart disease—six years follow-up experience. The Framingham study. Ann Intern Med. 1961;55:33–50
- [10.] Kendrick J, Chonchol MB. Nontraditional risk factors for cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2008;4:672–681
- [11.] Kerstin A. Media Calcification and Intima Calcification Are Distinct Entities in Chronic Kidney Disease. *CJASN* 2008, 3 (6) 1599-1605

- [12.] Go AS, Chertow GM, Fan DJ, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *New England Journal of Medicine*. 2004;351:1296-1305.
- [13.] Catherine MS, Matthew HC, Alexander K, Cecilia MG. Arterial calcification in chronic kidney disease: key roles for calcium and phosphate. *Circ Res* 2011; 109(6):697-711.
- [14.] Stabley JN, Towler DA. Arterial Calcification In Diabetes: Preclinical Models And Translational Implications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017; 37(2): 205– 217.
- [15.] Thomas M, Brownlee M, Susztak K, Sharma K, Jandeleit-Dahm KAM, Zoungas S, Rossing P, Groop PH, Cooper ME. Diabetic kidney disease. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2015, 1, 1–20.
- [16.] Russo D, Morrone LFP Imbriaco M, Pota A, Russo L, Scognamiglio B, Sorrentino R. Coronary Artery Calcification and Outcomes in Diabetic Patients with and without Chronic Kidney Disease. *Blood Purif.* 2013; 36; 17–20.
- [17.] Palumbo VD, Damiano G, Messina M, Fazzotta S, Lo Monte S, Lo Monte AI. Tertiary hyperparathyroidism: a review. *Clin Ter.* 2021; 172 (3):241-246.
- [18.] Giachelli CM. The emerging role of phosphate in vascular calcification. *Kidney Int.* 2009, 75, 890–897.
- [19.] Li Xi, Giachelli CM. Sodium-dependent phosphate cotransporters and vascular calcification. *Nephrology and Hypertension*. 2007; 16; 4.325-328.
- [20.] Maya F, Naywa S, Mohammad FK, Firas K, Eva H, Saida M, Aida H et al. Characterization and assessment of potential microRNAsinvolved in phosphateinduced aortic calcification. *J Cell Physiol*.2018; 233; 4056–4067.
- [21.] Toshihisa K. Runx2, an inducer of osteoblast and chondrocyte differentiation. *Histochem Cell Biol* 2018; 149 (4); 313-323.
- [22.] Moe SM, Duan D, Doehle BP, O'Neill KD, Chen NX. Uremia induces the osteoblast differentiation factor Cbfa1 in human blood vessels. *Kidney Int* 2003; 63 (3); 1003-1011.
- [23.] Bover J, Urena P, Aguilar A, Mazzaferro S, Benito S, Lopez-Baez V et al. Alkaline phosphatases in the complex chronic kidney disease-mineral and bone disorders. *Calcif Tissue Int.* 2018; 103; 111-124.

- [24.] Boström K, Watson KE, Horn S, Worthman C, Herman IM, Demer LL. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. J Clin Invest. 1993; 91; 1800–1809.
- [25.] Evrard S, Delanaye P, Kamel S, Cristol JP, Cavalier E. Vascular calcification: from pathophysiology to biomarkers. *Clin Chim Acta*. 2015; 438; 401–414.
- [26.] Belay T. Involvement of Vitamin K-Dependent Proteins in Vascular Calcification. J Cardiovasc Pharmacol Ther. 2019; 24(4); 323-333.
- [27.] Jansen F, Li Q, Pfeifer A, Werner N. Endothelial- and Immune Cell-Derived Extracellular Vesicles in the Regulation of Cardiovascular Health and Disease. *JACC Basic Transl Sci.* 2017; 2(6); 790-807.
- [28.] Loyer X, Vion AC, Tedgui A, Boulanger CM. Microvesicles as cell-cell messengers in cardiovascular diseases. *Circ Res.* 2014; 114(2); 345-53.
- [29.] Cui L, Houston DA, Farquharson C, MacRae VE. Characterisation of matrix vesicles in skeletal and soft tissue mineralisation. *Bone*. 2016; 87; 147-58.
- [30.] Kapustin AN, Shanahan CM. Calcium regulation of vascular smooth muscle cell derived matrix vesicles. *Trends Cardiovasc Med.* 2012; 22(5); 133-7.
- [31.] **Moe SM, Chen NX**. Mechanisms of vascular calcification in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19(2); 213-6.
- [32.] Zarjou A, Jeney V, Arosio P, Poli M, Zavaczki E, Balla G, Balla J. Ferritin ferroxidase activity: a potent inhibitor of osteogenesis. *J Bone Miner Res*; 2010; 25;164-72.
- [33.] Zavaczki E, Jeney V, Agarwal A, Zarjou A, Oros M, Katkó M, Varga Z, Balla G, Balla J. Hydrogen sulfide inhibits the calcification and osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells. *Kidney Int*, 2011; 80; 731-9.
- [34.] Levey AS, Atkins R, Coresh J, Cohen EP, Collins AJ, Eckardt KU et al. Chronic kidney disease as a global public health problem: approaches and initiatives – a position statement from kidney disease improving global outcomes. *Kidney Int.* 2007; 72; 247–259.
- [35.] Jodie LB, Herbert YL. Mechanisms of Anemia in CKD. J Am Soc Nephrol. 2012 23(10); 1631–1634.
- [36.] Singh AK, Szczech L, Tang KL, Barnhart H, Sapp S, Wolfson M, Reddan D. CHOIR Investigators: Correction of anemia with epoetin alfa in chronic kidney disease. N Engl J Med. 2006; 355; 2085–2098.

- [37.] Bennett CL, Becker PS, Kraut EH, Samaras AT, West DP. Intersecting guidelines: Administering erythropoiesis-stimulating agents to chronic kidney disease patients with cancer. *Semin Dial*. 2009; 22; 1–4.
- [38.] Władysław G, Dariusz Sz, Mirosław Ś. Whether Prolyl Hydroxylase Blocker— Roxadustat—In the Treatment of Anemia in Patients with Chronic Kidney Disease Is the Future?. *Int J Environ Res Public Health*. 2021; 18(4); 1612.
- [39.] Hong MS, Chih JW, Shuei LL. Physiology and pathophysiology of renal erythropoietin-producing cells. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2018; 955-963.
- [40.] Kaelin WG, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol. Cell.* 2008;30; 393–402.
- [41.] Gregg LS. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. *Sci STKE* 2007 9;2007; 407.
- [42.] Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2004; 5; 343–354.
- [43.] Fong, GH, Takeda K. Role and regulation of prolyl hydroxylase domain proteins. Cell Death Differ. 2008; 1;, 635–641.
- [44.] Bernhardt, WM, Wiesener MS, Scigalla P, Chou J, Schmieder RE, Gü V et al. Inhibition of prolyl hydroxylases increases erythropoietin production in ESRD. J. Am. Soc. Nephrol. 2010; 21; 2151–2156.
- [45.] Hsieh MM, Linde NS, Wynter A, Metzger M, Wong C, Langsetmo I et al. HIF– prolyl hydroxylase inhibition results in endogenous erythropoietininduction, erythrocytosis, and modest fetal hemoglobin expression in rhesus macaques. *Blood*. 2007;110; 2140–2147.
- [46.] Mokas S, Larivière R, Lamalice L, Gobeil S, Cornfield DN, Agharazii M et al. Hypoxia-inducible factor-1 plays a role in phosphate-inducedvascular smooth muscle cell calcification. *Kidney Int.* 2016; 90; 598–609.
- [47.] Bruno RB Pires, Andre LM, Gerson MF, Carolina P, Rafael CMC Silva, Eliana A. The Hypoxia-Inducible Factor-1α Signaling Pathway and its Relation to Cancer and Immunology. *American Journal of Immunology* 2014; 10 (4); 215.224
- [48.] Besarab A, Provenzano R, Hertel J, Zabaneh R, Klaus SJ, Lee T, Leong R, Hemmerich S, Yu KH, Neff TB. Randomized placebo-controlled dose-ranging and pharmacodynamics study of roxadustat (FG-4592) to treat anemia in

nondialysis-dependent chronic kidney disease (NDD-CKD) patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2015; 30(10);1665-73.

- [49.] Groenendaal-van de MD, Adel MD, Noukens J, Rijnders S, Krebs-Brown A, Mateva L, Alexiev A, Schaddelee M. Effect of Moderate Hepatic Impairment on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Roxadustat, an Oral Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylase Inhibitor *Clin Drug Investig. 2016; 36(9);743-*751.
- [50.] Chen N, Hao C, Peng X, Lin H, Yin A, Hao L, Tao Y, Liang X, Liu Z, Xing C, Chen J, Luo L, Zuo L, Liao Y, Liu BC, Leong R, Wang C, Liu C, Neff T, Szczech L, Yu KPN. Roxadustat for Anemia in Patients with Kidney Disease Not Receiving Dialysis. *Engl J Med.* 2019;12; 381(11);1001-1010.
- [51.] Yi Z, Wen-QM, Xi Q, Han YW, Xin W, Nai FL. Advanced glycation end products accelerate calcification in VSMCs through HIF-1α/PDK4 activation and suppress glucose metabolism. *Sci Rep.* 2018; 8; 13730.
- [52.] Li J, Yang YL, Li LZ, Zhang L, Liu Q, Liu K, Li P, Liu B, Qi LW. Succinate accumulation impairs cardiac pyruvate dehydrogenase activity through GRP91dependent and independent signaling pathways: Therapeutic effects of ginsenoside Rb1. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2017; 1863(11);2835-2847.
- [53.] Berg JM, Shi Y. The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. *Science*. 1996 23; 271(5252);1081-5.
- [54.] King JC, Shames DM, Woodhouse LR. Zinc homeostasis in humans. J Nutr. 2000; 130(5S Suppl);1360S-6S.
- [55.] Valko M, Jomova K, Rhodes CJ, Kuča K, Musílek K. Redox- and non-redoxmetal-induced formation of free radicals and their role in human disease. Arch Toxicol. 2016 Jan; 90(1); 1-37.
- [56.] Olechnowicz J, Tinkov A, Skalny A, Joanna S. Zinc status is associated with inflammation, oxidative stress, lipid, and glucose metabolism. *J Physiol Sci.* 2018; 68(1); 19–31.
- [57.] Abdulkerim KB, Kemal Y, Rasim M. Zinc Metabolism and Metallothioneins. Biological Trace Element Research; 2018, 183; 22–31.
- [58.] Stefanidou M, Maravelias C, Dona A, Spiliopoulou M. Zinc: a multipurpose trace element. Arch Toxicol 2006; 80; 1–9.

- [59.] Hara T, Takeda TA, Takagishi T, Fukue K, Kambe T, Fukada T. Physiological roles of zinc transporters: molecular and genetic importance in zinc homeostasis. J Physiol Sci. 2017; 67(2); 283-301.
- [60.] Lonergan ZR, Skaar EP. Nutrient Zinc at the Host-Pathogen Interface. *Trends Biochem Sci.* 2019; 44(12);1041-1056.
- [61.] Sangyong C, Xian L, Zui P. Zinc deficiency and cellular oxidative stress: prognostic implicatioons in cardiovascular diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2018; 39, 1120-1132
- [62.] Inga W, Martina M, Lothar R. Zinc as a Gatekeeper of Immune Function. *Nutrients*. 2017; 9(12); 1286.
- [63.] Prasad AS. Impact of the discovery of human zinc deficiency on health. J Am Coll Nutr. 2009; 28(3);257-65.
- [64.] Anna C, Meika F, Samir S. Zinc Status and Risk of Cardiovascular Diseases and Type 2 Diabetes Mellitus - A Systematic Review of Prospective Cohort Studies. *Nutrients*. 2016; 8(11); 707.
- [65.] Little PJ, Bhattacharya R, Moreyra AE, Korichneva IL. Zinc and cardiovascular disease. *Nutrition*. 2010; 26(11-12);1050-7.
- [66.] Pethő Á, Kósa D, Haimhoffer Á, Fehér P, Ujhelyi Z, Sinka D, Fenyvesi F, Váradi J, Vecsernyés M, Gyöngyösi A, Lekli I, Szentesi P, Marton A, Gombos I, Dukic B, Vígh L, Bácskay I. Nicotinic Amidoxime Derivate BGP-15, Topical Dosage Formulation and Anti-Inflammatory Effect. Pharmaceutics. 2021; 13(12); 2037.
- [67.] Pethő Á, Kósa D, Haimhoffer Á, Fehér P, Ujhelyi Z, Sinka D, Vecsernyés M, Szilvássy Z, Juhász B, Csanádi Z, Vígh L, Bácskay I. Pharmacological Overview of the BGP-15 Chemical Agent as a New Drug Candidate for the Treatment of Symptoms of Metabolic Syndrome. *Molecules*. 2020; 25(2); 429.
- [68.] Literáti-Nagy B, Kulcsár E, Literáti-Nagy Z, Buday B, Tory K, Kolonics A, Fleming A, Mandl J, Korányi L, Péterfai É et al. Improvement of Insulin Sensitivity by a Novel Drug, BGP-15, in Insulin-resistant Patients: A Proof of Concept Randomized Double-blind Clinical Trial. *Horm. Metab. Res.* 2009, 41, 374–380.
- [69.] Literáti-Nagy B, Péterfai E, Kulcsár E, Literáti-Nagy Z, Buday B, Tory K, Mandl J, Sümegi B, Fleming A, Roth J, Korányi L. Beneficial effect of the

insulin sensitizer (HSP inducer) BGP-15 on olanzapine-induced metabolic disorders. *Brain Res Bull.* 2010; 83(6); 340-4.

- [70.] Literáti-Nagy B, Tory K, Peitl B, Bajza Á, Korányi L, Literáti-Nagy Z, Hooper P.L, Vígh L. Szilvássy Z. Improvement of Insulin Sensitivity by a Novel Drug Candidate, BGP-15, in Different Animal Studies. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* 2014; 12; 125–131.
- [71.] Bombicz M, Priksz D, Gesztelyi R, Kiss R, Hollos N, Varga B, Nemeth J, Tóth A, Papp Z, Szilvassy Z et al. The Drug Candidate BGP-15 Delays the Onset of Diastolic Dysfunction in the Goto-Kakizaki Rat Model of Diabetic Cardiomyopathy. *Molecules*. 2019; 24; 586.
- [72.] Wachal Z, Bombicz M, Priksz D, Hegedűs C, Kovács D., Szabó AM, Kiss R, Németh J, Juhász B, Szilvássy Z et al. Retinoprotection by BGP-15, a Hydroximic Acid Derivative, in a Type II Diabetic Rat Model Compared to Glibenclamide, Metformin, and Pioglitazone. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21; 2124.
- [73.] Shin MY, Kwun IS. Zinc restored the decrased vascular smooth muscle cell viability under atheroscelotic calcification conditions. *Prev. Nutr. Food Sci.* 2014; 19; 363-366.
- [74.] **Shin MY, Kwun IS.** Role of zinc for calcification inhibitor protein in vascular smooth muscle cell plaque formation. *J. Nutr. Health.* 2016; 49; 59-62.
- [75.] Li X, Yang Y, Giachelli. Role of the sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle cell calcification. *Circ. Res.* 2006; 98; 905-912.
- [76.] Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang HY, Haynes P, Aebersold R et al. Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ. Res.* 2001; 89; 1147–1154.
- [77.] Liu K, Fang C, Shen Y, Liu Z, Zhang M, Ma B et al. Hypoxiainduciblefactor 1a induces phenotype switch of human aortic vascular smoothmuscle cell through PI3K/AKT/AEG-1 signaling. *Oncotarget*. 2017; 8; 33343–33352.
- [78.] Wee HJ, Huang G, Shigesada K, Ito Y. Serine phosphorylation of RUNX2 with novel potential functions as negative regulatory mechanisms. *EMBO Rep 3*. 2002; 967–974.
- [79.] Ge C, Xiao G, Jiang D, Yang Q, Hatch NE, Roca H et al. Identification and functional characterization of ERK/MAPK phosphorylation sites in the Runx2 transcription factor. J. Biol. Chem. 2009; 284; 32533–32543.

- [80.] Li Y, Ge C, Franceschi RT. MAP kinase-dependent RUNX2 phosphorylation is necessary for epigenetic modification of chromatin during osteoblast differentiation. J. Cell. Physiol. 2017; 232; 2427–2435.
- [81.] Wu P, Sato J, Zhao Y, Jaskiewicz J, Popov MK, Harris AR. Starvation and diabetes increase the amount of pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 4 in rat heart. *Biochem. J.* 1998; 329; 197–201.
- [82.] Jeong SJ, Oh JY, Park CJ, Kim, JY, Kim HJ et al. Pyruvate dehydrogenase kinase 4 promotes vascular calcification via SMAD1/5/8 phosphorylation. *Sci. Rep.* 2015; 5; 16577.
- [83.] Zhu Y, Ma WQ, Han XQ, Wang, Y, Wang X, Liu NF. Advanced glycation end products accelerate calcification in VSMCs through HIF-1a/PDK4 activation and suppress glucose metabolism. *Sci. Rep.* 2018; 8;13730.
- [84.] Hamer DH. Metallothionein. Annu. Rev. Biochem. 1986; 55; 913–951.
- [85.] Viarengo A, Burlando B, Ceratto N, Panfoli I. Antioxidant role ofmetallothioneins: a comparative overview. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. 2000; 46; 407–417.
- [86.] Göbel H, van der Wal AC, Teeling P, van der Loos CM, Becker AE. Metallothionein in human atherosclerotic lesions: a scavenger mechanism for reactive oxygen species in the plaque? *Virchows Arch.* 2000; 437; 528–533.
- [87.] Daskalopoulou SS, Daskalopoulos ME, Theocharis S, Kavantzas N, Perrea D, Karandrea D et al. Metallothionein expression in the high-risk carotid atherosclerotic plaque. *Curr. Med. Res. Opin.* 2007; 23; 659–670.
- [88.] Voelkl J, Tuffaha R, Luong TTD, Zickler D, Masyout J, Feger M et al. Zinc inhibits phosphate-induced vascular calcification through TNFAIP3-mediated suppression of NF- kB. J. Am. Soc. Nephrol. 2018; 29; 1636–1648.
- [89.] Stabley JN, Towler DA. Arterial Calcification in Diabetes Mellitus. Arter. Thromb. Vasc. Biol. 2017; 37; 205–217.
- [90.] Chen NX, Duan D, O'Neill KD, Moe SM. High glucose increases the expression of Cbfa1 and BMP-2 and enhances the calcification of vascular smooth muscle cells. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2006; 21; 3435–3442.
- [91.] Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang HY, Haynes P, Aebersold R, Schinke T, Karsenty G, Giachelli CM. Smooth Muscle Cell Phenotypic Transition Associated With Calcification. *Circ. Res.* 2001; 89; 1147–1154.

- [92.] Zhang J, Zheng B, Zhou P, Zhang R, He M, Yang Z, Wen J. Vascular calcification is coupled with phenotypic conversion of vascular smooth muscle cells through Klf5-mediated transactivation of the Runx2 promoter. *Biosci. Rep.* 2014; 34; 663–672.
- [93.] Shao JS, Cheng SL, Pingsterhaus JM, Charlton KN, Loewy AP. Towler, D.A. Msx2 promotes cardiovascular calcification by activating paracrine Wnt signals. J. *Clin. Investig.* 2005; 115; 1210–1220.
- [94.] Lee SJ, Jeong JY, Oh CJ, Park S, Kim JY, Kim HJ, Kim ND, Choi YK, Do JY, Go Y et al. Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4 Promotes Vascular Calcification via SMAD1/5/8 Phosphorylation. *Sci. Rep.* 2015; 5; 1–17.
- [95.] Kapustin AN, Chatrou ML, Drozdov I, Zheng Y, Davidson S, Soong D, Furmanik M, Sanchis P, de Rosales RTM, Alvarez-Hernandez D et al. Vascular Smooth Muscle Cell Calcification Is Mediated by Regulated Exosome Secretion. *Circ. Res.* 2015; 116; 1312–1323.
- [96.] Krohn JB, Hutcheson JD, Martínez ME, Aikawa E. Extracellular vesicles in cardiovascular calcification: Expanding current paradigms. J. Physiol. 2016, 594, 2895–2903
- [97.] Webster AC, Nagler EV, Morton RL, Masson P. Chronic kidney disease. *Lancet*. 2017; 389; 1238-1252.
- [98.] Carney EF. Therapy: PHD inhibitors correct anaemia in CKD. *Nat. Rev. Nephrol.* 2016; 12; 3.
- [99.] Gupta N, Wish JB. Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibitors: a potential new treatment for anemia in patients with CKD. *Am.J. Kidney Dis.* 2017; 69; 815–826.
- [100.] Sigrist MK, Taal MW, Bungay P, McIntyre CW. Progressivevascular calcification over 2 years is associated with arterial stiffening and increased mortality in patients with stages 4 and 5 chronic kidney disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2007; 2; 1241–1248.
- [101.] Collins AJ, Foley RN, Gilbertson DT, Chen SC. United States Renal data system public health surveillance of chronic kidney disease and end-stage renal disease. *Kidney Int. Suppl.* 2015; 5; 2–7.
- [102.] Schlieper G, Schurgers L, Brandenburg V, Reutelingsperger C, Floege J. Vascular calcification in chronic kidney disease: an update. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2016; 31; 31–39.

- [103.] Balogh E, Tóth A, Méhes G, Trencsényi G, Paragh G, Jeney V. Hypoxia triggers osteochondrogenic differentiation of vascular smooth muscle cells in an HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor 1)-dependent and reactive oxygen species– dependent manner. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2019; 39; 1088–1099.
- [104.] Zhu, Y, Ma WQ, Han XQ, Wang Y, Wang X, Liu NF. Advanced glycation end products accelerate calcification in VSMCs through HIF-1a/PDK4 activation and suppress glucose metabolism. *Sci. Rep.* 2018; 8; 13730.
- [105.] Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang HY, Haynes P, Aebersold R, Schinke T, Karsenty G, Giachelli CM. Smooth Muscle Cell Phenotypic Transition Associated With Calcification. *Circ. Res.* 2001; 89; 1147–1154.
- [106.] Boström K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM, Demer LL. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. J. Clin. Invest. 1993; 91; 1800–1809.
- [107.] Li X, Yang HY, Giachelli CM. BMP-2 promotes phosphate uptake, phenotypic modulation, and calcification of human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 2008; 199; 271–277.
- [108.] Tseng WP, Yang SN, Lai CH, Tang CH. Hypoxia induces BMP-2 expression via ILK, Akt, mTOR, and HIF-1 pathways in osteoblasts. J. Cell. Physiol 2010; 223; 810–818
- [109.] Bouletreau PJ, Warren SM, Spector JA, Peled ZM, Gerrets RP, Greenwald JA. Hypoxia and VEGF up-regulate BMP-2 mRNA and protein expression in microvascular endothelial cells: implications for fracture healing. *Plast. Reconstr. Surg.* 2002; 109; 2384–2397.
- [110.] Otto F, Thornell AP, Crompton T et al. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial 61 dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 1997; 89; 765–71.
- [111.] Wee HJ, Huang G, Shigesada K, Ito Y. Serine phosphorylation of RUNX2 with novel potential functions as negative regulatory mechanisms. *EMBO Rep* 3 2003; 967–974.
- [112.] Ge C, Xiao G, Jiang D, Yang Q, Hatch NE, Roca H et al. Identification and functional characterization of ERK/MAPK phosphorylation sites in the Runx2 transcription factor. J. Biol. Chem. 2009; 284; 32533–32543.
- [113.] Byon CH, Javed A, Dai Q, Kappes JC, Clemens TL, Darley UVM et al. Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the

osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling. *J. Biol. Chem.* 2008; 283; 15319–15327.

- [114.] Agharazii M, St-Louis R, Gautier BA, Ung RV, Mokas S, Larivière R et al. Inflammatory cytokines and reactive oxygen species as mediators of chronic kidney disease-related vascular calcification. Am. J. Hypertens. 2015; 28; 746–755.
- [115.] Voelkl J, Tuffaha R, Luong TTD, Zickler D, Masyout J, Feger M et al. Zinc inhibits phosphate-induced vascular calcification through TNFAIP3-mediated suppression of NF- kB. J. Am. Soc. Nephrol. 2018; 29; 1636–1648.
- [116.] Schurgin S, Rich S, Mazzone T. Increased Prevalence of Significant Coronary Artery Calcification in Patients with Diabetes. *Diabetes Care*. 2001; 24; 335–338.
- [117.] Everhart JE, Pettitt DJ, Knowler WC, Rose FA, Bennett PH. Medial arterial calcification and its association with mortality and complications of diabetes. *Diabetologia* 1988; 31; 16–23.
- [118.] Zavaczki E, Jeney V, Agarwal A, Zarjou A, Oros M, Katkó M, Varga Z, Balla G, Balla J. Hydrogen sulfide inhibits the calcification and osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells. *Kidney Int.* 2011; 80; 731–739.
- [119.] Zhou YB, Zhou H. Li L, Kang Y, Cao X Wu ZY, Ding L, Sethi G, Bian JS. Hydrogen Sulfide Prevents Elastin Loss and Attenuates Calcification Induced by High Glucose in Smooth Muscle Cells through Suppression of Stat3/Cathepsin S Signaling Pathway. Int. J. Mol. Sci. 2019; 20; 4202.
- [120.] Wang P, Zhou P, ChenW, Peng D. Combined effects of hyperphosphatemia and hyperglycemia on the calcification of cultured human aortic smooth muscle cells. *Exp. Ther. Med.* 2018; 17; 863–868.
- [121.] Chen NX, Duan D, O'Neill KD, Moe SM. High glucose increases the expression of Cbfa1 and BMP-2 and enhances the calcification of vascular smooth muscle cells. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2006; 21; 3435–3442.
- [122.] An XR, Li X, Wei W, Li XX, Xu M. Prostaglandin E1 Inhibited Diabetes-Induced Phenotypic Switching of Vascular Smooth Muscle Cells Through Activating Autophagy. *Cell. Physiol. Biochem.* 2018; 50; 745–756.
- [123.] Gong, C, Li L, Qin C, Wu W, Liu Q, Li Y, Gan L, Ou S. The Involvement of Notch1-RBP-Jk/Msx2 Signaling Pathway in Aortic Calcification of Diabetic Nephropathy Rats. J. Diabetes Res. 2017; 1–11.

- [124.] Li X, Yang HY, Giachelli CM. BMP-2 promotes phosphate uptake, phenotypic modulation, and calcification of human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2008; 199; 271–277.
- [125.] Cheng SL, Behrmann A, Shao JS, Ramachandran B, Krchma K, Arredondo, YB, Kovacs A, Mead M, Maxson R, Towler DA. Targeted Reduction of Vascular Msx1 and Msx2 Mitigates Arteriosclerotic Calcification and Aortic Stiffness in LDLR-Deficient Mice Fed Diabetogenic Diets. *Diabetes* 2014; 63; 4326–4337.
- [126.] Zhang M, Sara JD, Wang FL, Liu LP, Su LX, Zhe J, Wu X, Liu JH. Increased plasma BMP-2 levels are associated with atherosclerosis burden and coronary calcification in type 2 diabetic patients. *Cardiovasc. Diabetol.* 2015; 14; 1–9.
- [127.] Peng Y, Shi K, Wang L, Lu J, Li H, Pan S, Ma C. Characterization of Osterix Protein Stability and Physiological Role in Osteoblast Differentiation. *PLOS ONE* 2013; 8; e56451.
- [128.] Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrugghe B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 2002; 108: 17–29.
- [129.] Tao R, Xiong X, Harris RA, White MF, Dong XC. Genetic Inactivation of Pyruvate Dehydrogenase Kinases Improves Hepatic Insulin Resistance Induced Diabetes. *PLoS ONE* 2013; 8; e71997.
- [130.] Krohn JB, Hutcheson JD, Martínez ME, Aikawa E. Extracellular vesicles in cardiovascular calcification: Expanding current paradigms. J. Physiol. 2016; 594; 2895–2903.
- [131.] Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, McNair R, Schurgers LJ, Proudfoot D, Jahnen DW, Weissberg PL, Shanahan CM. Human Vascular Smooth Muscle Cells Undergo Vesicle-Mediated Calcification in Response to Changes in Extracellular Calcium and Phosphate Concentrations: A Potential Mechanism for Accelerated Vascular Calcification in ESRD. J.Am. Soc. Nephrol. 2004; 15; 2857– 2867.
- [132.] Epstein M. Matrix Gla-Protein (MGP) Not Only Inhibits Calcification in Large Arteries But Also May Be Renoprotective: Connecting the Dots. *EBioMedicine* 2016; 4; 16–17.
- [133.] Kapustin AN, Davies JD, Reynolds JL, McNair R, Jones GT, Sidibe A, Schurgers LJ, Skepper JN, Proudfoot D, Mayr M et al. Calcium Regulates Key

Components of Vascular Smooth Muscle Cell–Derived Matrix Vesicles to Enhance Mineralization. *Circ. Res.* 2011; 109; e1–e12.

- [134.] Chen NX, O'Neill KD, Chen X, Moe SM. Annexin-Mediated Matrix Vesicle Calcification in Vascular Smooth Muscle Cells. J. Bone Miner. Res. 2008; 23; 1798–1805.
- [135.] Lee J, Hong SW, Kim MJ, Kwon H, Park SE, Rhee EJ, Lee WY. Metformin, resveratrol, and exendin-4 inhibit high phosphate-induced vascular calcification via AMPK-RANKL signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2020; 530; 374–380.
- [136.] Ma WQ, Sun XJ, Wang Y, Zhu Y, Han XQ, Liu NF. Restoring mitochondrial biogenesis with metformin attenuates _- GP-induced phenotypic transformation of VSMCs into an osteogenic phenotype via inhibition of PDK4/oxidative stressmediated apoptosis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2019; 479; 39–53.

TÁRGYSZAVAK/KEYWORDS

vaszkuláris kalcifikáció, krónikus veseelégtelenség, cink, BGP-15, hiperglikémia, oszteoblaszt transzdifferenciáció, prolil-hidroxiláz inhibitor

vascular calcification, chronic kidney disease, zinc, BGP-15, hyperglycaemia, osteoblast transdifferentiation, prolyl- hydoxylase inhibitor

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 Agarvalt és Dr. Abolfazl Zarjou-t (Alabamai 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 testvéremnek, hogy szeretetükkel, türelmükkel és bíztatásukkal 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.

FÜGGELÉK



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

EBRECENI

Jelölt: Nagy Annamária Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

 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., Zavaczki, 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

 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., Póliska, S., Méhes, G., Toth, 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.

