

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Mátrix mineralizáció és reszorpció az érfalban: a ferril-hemoglobin és a kén-hidrogén hatása a vaszkuláris kalcifikáció patomechanizmusára

Zavaczki Erzsébet

Témavezető:

Prof. Dr. Balla József



DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2020

TARTALOMJEGYZÉK

1.	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	5
2.	BEVEZETÉS.....	7
3.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	8
3.1.	Arterioszklerózis	8
3.1.1.	Ateroszklerózis	8
3.1.2.	Mönckeberg-féle mediaszklerózis	8
3.1.3.	Arteriolszklerózis.....	9
3.2.	A vaszkuláris kalcifikáció	9
3.3.	Simaizomsejtek kalcifikációja és oszteoblasztos differenciációja	10
3.4.	Oszteoklasztok kialakulása és szerepe az érlemezésben	11
3.4.1.	Az oszteoklasztok differenciációja	11
3.4.2.	Oszteoklasztok az érfalban	12
3.4.3.	Az oszteoklaszt-differenciáció gátlása	13
3.5.	A ferril-hemoglobin jelenléte az ateroszklerotikus plakkokban.....	14
3.6.	A H ₂ S képződése és biológiai funkciója az érrendszerben	15
4.	CÉLKITŰZÉSEK	18
5.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	19
5.1.	Engedélyek	19
5.2.	Betegek.....	19
5.3.	Sejttenyésztés és reagensek	19
5.4.	In vitro oszteoklasztogenezis.....	20
5.5.	Csontvelő eredetű mononukleáris sejtek izolálása	20
5.6.	Tartarát-rezisztens savas foszfatáz (TRAP) festés	20
5.7.	Csontreszorpciós vizsgálat	20
5.8.	Hem-oxigenáz aktivitás mérése.....	20

5.9.	Immunhisztokémia	21
5.10.	Hemoglobin preparálás.....	21
5.11.	Keresztkötött hemoglobinok detektálása Western blottal	21
5.12.	Human carotis minták spektrum analízise.....	22
5.13.	Sejt proliferáció vizsgálata	22
5.14.	Immunfluoreszcens festés	22
5.15.	Citoplazma és sejtmag fehérje extrakció	23
5.16.	Rekombináns egér 6×His-RANKL expresszió	23
5.17.	In vitro RANK-RANKL interakció vizsgálata.....	23
5.18.	Kalcifikáció indukálása	24
5.19.	Kalcium depozíció mérése	24
5.19.1.	Kalcium depozíció mennyiségi meghatározása kolorimetriás módszerrel	24
5.19.2.	Alizarin Red festés	24
5.20.	Alkalikus- foszfatáz aktivitás mérése	24
5.21.	Intracelluláris foszfát mérése.....	25
5.22.	Oszteokalcin mérés.....	25
5.23.	Plazma H ₂ S koncentráció meghatározása	25
5.24.	Perifériás Mononukleáris sejtek (PBMC) szeparálása	25
5.25.	Cisztationin γ-liáz aktivitás mérése	25
5.26.	Kvantitatív polimeráz láncreakció.....	26
5.27.	Western blot	26
5.28.	siRNS transzfekció	27
5.29.	Statisztika	27
6.	EREDMÉNYEK	28
6.1.	A FHb gátolja az oszteoklasztogenezist és az OC-k csontreszorpciós aktivitását	28
6.2.	A FHb csökkenti a RANKL-indukálta OC-specifikus gének expresszióját	31

6.3.	A FHb oszteoklasztogenezist gátló hatása nem HO-1 mediálta folyamat.	32
6.4.	A FHb gátolja a RANK-RANKL interakciót.....	35
6.5.	A FHb gátolja a RANKL-indukálta OC-differenciáció szignalizációját	38
6.6.	A bevértést tartalmazó kalcifikált léziókban Hb oxidációs folyamatok zajlanak.....	40
6.7.	A FHb jelenléte összefüggésben van az OLC sejtek hiányával a bevértett kalcifikált léziókban	40
6.8.	A H ₂ S dózis-függően csökkenti a HAoSMC sejtek mineralizációját	42
6.9.	A H ₂ S gátolja a HAoSMC sejtek oszteoblasztos differenciációját	42
6.10.	Az endogén H ₂ S képződése gátolja a HAoSMC sejtek kalcifikációját és oszteoblasztos differenciációját.....	45
6.11.	Végstádiumú vesebetegek csökkent plazma H ₂ S szintje csökkent CSE-aktivitással társul	47
7.	DISZKUSSZIÓ	49
8.	ÖSSZEFOGLALÁS.....	54
9.	SUMMARY	55
10.	TÁRGYSZAVAK/KEYWORDS	56
11.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	57
12.	IRODALOMJEGYZÉK.....	58
13.	PUBLIKÁCIÓS LISTA	70
14.	FÜGGELÉK.....	72

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ALP: alkalikus-foszfátáz

BMDM: csontvelő eredetű mononukleáris sejtek

BSA: bovine serum albumin

CatK: katepszin K

CBS: cisztationin- β -szintáz

CKD: Chronic Kidney Disease; Krónikus vesebetegség

CTR: kalcitonin receptor

CSE: cisztationin- γ -liáz

DC-STAMP: dentritikus sejt-specifikus transzmembrán fehérje

DMEM: Dulbecco-féle módosított sejttenyésztő médium

DMSO: dimetil-szulfoxid

DTT: ditiotritol

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

FHb: ferril-hemoglobin

GAPDH: Glicerinaldehid 3-foszfát-dehidrogenáz

HAoSMC: human aorta simaizomsejtek

Hb: hemoglobin

HBSS: Hank-féle sóoldat

HO-1: hem-oxigenáz-1

IPTG: izopropil β -D-1-tiogalaktopiranozid

JNK: c-Jun N-terminalis kináz

M-CSF-1: makrofág/monocita kolóniastimuláló faktor-1

MetHb: methemoglobin

MST: 3-merkaptopiruvát-szulfurtranszferáz

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid

NFATc1: aktivált T-sejtek nukleáris faktora, citoplazma 1

NF κ B: kappa-B nukleáris faktor

OC: oszteoklaszt
OCN: oszteokalcin
OLC: osteoklaszt-szerű sejt
OPG: oszteoprotegerin
PBMC: perifériás mononukleáris sejt
PBS: foszfát-pufferelt sóoldat
PFA: paraformaldehid
Pi: inorganikus foszfát
Pit-1: nátrium-dependens foszfát kotranszporter
PPG: DL-propargilglicin
RANK: NF κ B aktivátor receptor
RANKL: NF κ B aktivátor receptor ligand
Runx2: Runt-related transcription factor 2
TRAF6: tumor nekrozis faktor (TNF)-receptor asszociált faktor 6
TRAP: tartarát-rezisztens savas foszfatáz
TRIS: trisz-(hidroximetil)-aminometán
VSMC: vaszkuláris simaizomsejt

2. BEVEZETÉS

A vaszkuláris kalcifikáció független rizikófaktorként szerepet játszik számos kardiovaszkuláris megbetegedés kialakulásában. A vaszkuláris simaizomsejtek oszteoblaszt-irányú transzdifferentiációja összefügg a vaszkuláris kalcifikáció patogenezisével, melynek során a sejtek elveszítik kontraktilis jellegüket, ezzel párhuzamosan oszteoblaszt-specifikus fehérjéket expresszálnak és az extracelluláris térben hidroxipapatit kristályokat akkumulálnak.

Az oszteoklasztok csontreszorpcióra specializált makrofág-eredetű sejtek. A kalcifikált aterómákban oszteoklaszt-szerű sejtek találhatóak, melyek jelenléte egyfajta kompenzációs mechanizmust jelezhet a kalcium depozícióval szemben. A kalcifikált ateroszklerotikus plakkokban található oszteoklaszt-szerű sejtek funkcióvesztése a vaszkuláris kalcifikáció folyamatának kedvez.

A vaszkuláris kalcifikáció megjelenése az érfalban két ellentétes folyamatnak, a simaizomsejtekből differentiálódott oszteoblaszt-szerű sejtek matrix mineralizációjának és a makrofágokból differentiálódott oszteoklaszt-szerű sejtek matrix reszorpciójának az eredménye. Munkánk során azt vizsgáltuk, hogy milyen faktorok képesek befolyásolni az oszteoblaszt-szerű és az oszteoklaszt-szerű sejtek aktivitását, ezáltal hatást gyakorolni a vaszkuláris kalcifikáció kialakulására.

Az ateroszklerotikus plakkok bevérvése gyakori jelenség, melynek során a sejtekből kiszabaduló hemoglobin a plakkok oxidatív környezetében ferril-hemoglobinná oxidálódik. Munkánk során megvizsgáltuk, hogy az oxidált hemoglobin befolyásolja-e az oszteoklasztok kialakulását és mátrix-reszorpció aktivitását a kalcifikált ateroszklerotikus plakkokban. Eredményeink alapján elmondható, hogy a bevérvett kalcifikált plakkokban képződő ferril-hemoglobin gátolja az oszteoklaszt-szerű sejtek kialakulását, ezáltal befolyásolja a kalcium eltávolítását a mineralizált ateroszklerotikus plakkokból.

A kén-hidrogén fontos funkciókkal rendelkező gáz-molekula, melyet a vaszkuláris simaizomsejtek endogén módon a cisztationin- γ -liáz enzim segítségével termelnek. Munkánk során megvizsgáltuk a kén-hidrogén szerepét a vaszkuláris simaizomsejtek oszteoblasztos transzformációjára és mineralizációjára. Megállapítottuk, hogy a kén-hidrogén a vaszkuláris simaizomsejtek kalcifikációjának és oszteoblasztos differentiációjának egy lehetséges inhibitora, és ez a mechanizmus hozzájárulhat a krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegekben – akiknél a kén-hidrogén plazma koncentrációja alacsony – a vaszkuláris kalcifikáció folyamatának felgyorsulásához.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. *Arterioszklerózis*

A kardiovaszkuláris megbetegedések világszerte a vezető halálokok közé tartoznak [1]. Az arterioszklerózisnak három fajtája különíthető el: (1) intima ateroszklerózis, (2) Mönckeberg-féle media kalcifikáció és (3) arterioloszklerózis [2].

3.1.1. *Ateroszklerózis*

Az intima ateroszklerózis a nagyméretű erek intima részének megnagyobbodásával járó, az erek lumenét csökkentő patológiai elváltozás. Rizikófaktorai lehetnek genetikai eredetűek (familiális hiperkoleszteronémia), életmódbeliek (elhízás, dohányzás, egészségtelen táplálkozás, mozgásszegény életmód) és egyéb társbetegségek (magas vérnyomás, cukorbetegség). Sary és munkatársai az intimaszklerózist további alosztályokra bontotta szövettani és morfológiai szempontokat figyelembe véve [3–5]. Az I. típus az erek újszülött- és kisgyermekkorban jelentkező adaptív megvastagodása, amely a vér áramlásának következtében kialakuló stressz hatására jön létre. Ezt a típust kisméretű lipid depozitumok jellemzik, melyek csak elektronmikroszkóppal láthatóak. A II. típus (fatty streak) gyermekkorra jellemző típus, megjelenése a plazma koleszterin szintjével arányos, jellemzően lipid cseppeket tartalmazó makrofágokból (habos sejtek) és T-limfocitákból épül fel, melyek az intima felszíne alatt húzódó hosszanti sárgás színű csíkként rajzolódnak ki. A III. típust köztes aterómának, vagy preaterómának is nevezik. Jellemzően fiatal felnőttekben fordul elő leggyakrabban. A habos sejteken túlmenően extracelluláris lipid felhalmozódás figyelhető meg. A IV. típust (ateróma) további extracelluláris lipid akkumuláció következtében kialakuló összefüggő lipid mag jellemzi. Az V. típusú lézióban fibrózus szövet jelenik meg és további alosztályokra osztható: Va típus (fibroateróma, lipid túlsúllyal), Vb típus (VII. típus) (fibroateróma kalcifikációval) és Vc típus (VIII. típus) (fibrózus plakk, csökkent lipid tartalommal). A VI. típust komplikált lézióknak definiálják, mivel könnyen manifesztálódik akut- vagy krónikus klinikai tünetekben, jellemzője a felszíni endotel sejtréteg sérülése, hematóma, bevérzés, trombus képződés.

3.1.2. *Mönckeberg-féle mediaszklerózis*

A Mönckeberg-féle mediaszklerózis a nagy- és közepes erek tunica media szövettani rétegét érintő elváltozás, melyben a simaizomsejtek oszteoblaszt-irányú differenciációjának következtében ektópiás kalcifikáció figyelhető meg [6]. A tunica media kalcifikációja nem jár az

érlumen csökkenésével, ugyanakkor a szövet a kalcifikáció következtében elveszíti rugalmasságát. Rizikótényezői a veseelégtelenség, cukorbetegség, valamint a kalcium- és foszfát-metabolizmus zavara.

3.1.3. *Arteriolszklerózis*

Az arteriolszklerózis a kisméretű ereket és arteriolákat érintő elváltozás, mely az érlumen csökkenésével és az érfal rugalmasságának elvesztésével járó folyamat [7].

3.2. *A vaszkuláris kalcifikáció*

A vaszkuláris kalcifikáció, független rizikótényezőként, szerepet játszik számos érrendszeri megbetegedés patogenezisében, úgymint az ateroszklerotikus plakk kialakulása [8–10], miokardiális infarktus [11, 12], koszorúér betegség [13, 14] és megemelkedett ischemiás epizódok perifériás érbetegségekben [15]. A koszorúerek kalcifikációja növeli a hirtelen szívhalál esélyét [16, 17]. A dializált betegek artéria kalcifikációja szoros összefüggésben van a magas vérnyomással, mely hozzájárul a szív- és érrendszeri ischemiás betegségek és a bal kamra hipertrófia kialakulásához [18–20].

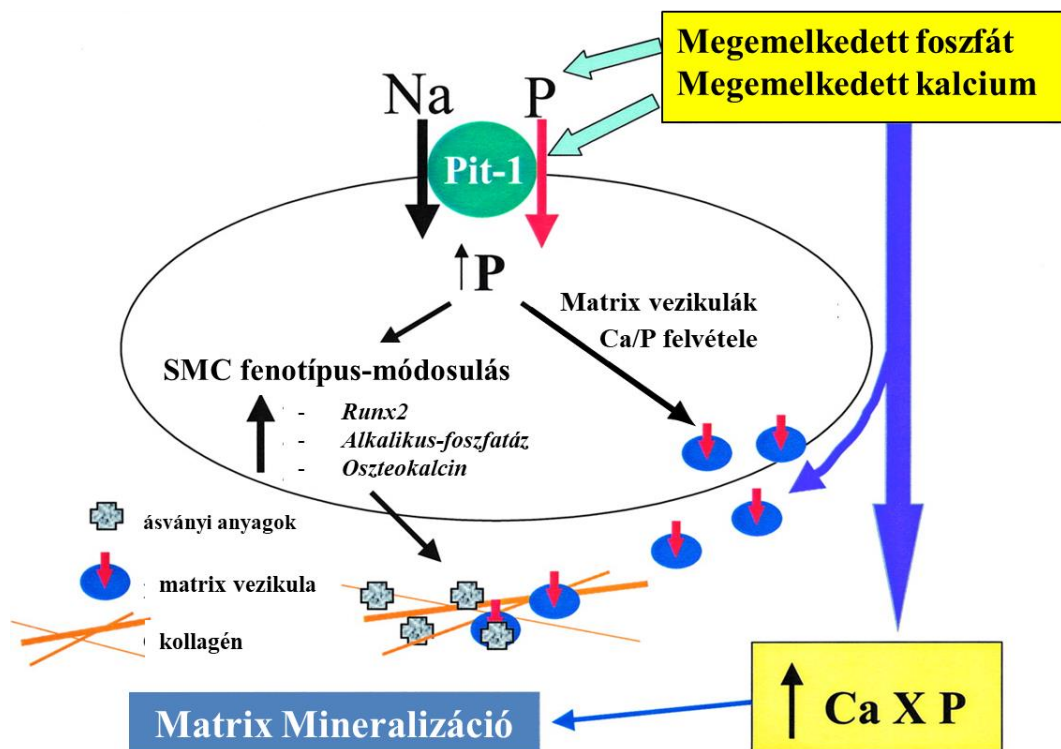
A vaszkuláris kalcifikációnak két eltérő megjelenési formája van: (1) az intima kalcifikáció, mely az ateroszklerotikus plakkok megjelenéséhez köthető, valamint (2) a media kalcifikáció, mely a tunica media diffúz kalcifikációjával jellemezhető, elsősorban a belső elasztikus lamina szintjében, és nem mindig társul ateroszklerózissal. A vaszkuláris kalcifikáció ez utóbbi megjelenési formája igen gyakran fordul elő hemodializált betegekben, továbbá a kalcifilaxis - mely diffúz arteriola kalcifikációt és bőr nekrozist mutató tünetegyüttes - kialakulása is majdnem kizárólag 5. stádiumú krónikus vesebetegségben (chronic kidney disease; CKD) szenvedő betegekben fordul elő, és kiemelkedően magas halálozási arányt mutat.

A megemelkedett foszfát (Pi) szintet sokáig a lágy szövetek mineralizációjának egyik jelentős prognosztikus markerének tekintették. Ez az emelkedett Pi szint gyakran látható végstádiumú vesebetegségben szenvedő betegeknél, ahol a Pi homeosztázis zavart szenved, mivel a vese képtelen exkretálni a foszfátot. A CKD betegekben a vaszkuláris kalcifikáció kialakulása szorosan összefügg az ásványi anyagok metabolizmusának zavarával, melyet a serum Pi szint megemelkedése és hiperkalcemia jellemez [21, 22]. A vaszkuláris kalcifikáció a kardiovaszkuláris megbetegedések független rizikófaktoraként meghatározó kockázati tényező a hemodializált betegek halálozásában [23, 24].

3.3. *Simaizomsejtek kalcifikációja és oszteoblasztos differenciációja*

A vaszkuláris kalcifikáció kialakulásában az ásványi anyagok metabolizmusának zavara nagyon fontos rizikófaktornak tekinthető. A magas extracelluláris Pi szint nagyban hozzájárul a vaszkuláris kalcifikáció kialakulásához [25–29]. Korábbi tanulmányokban igazolták, hogy a megemelkedett Pi szint vaszkuláris simaizomsejtek (vascular smooth muscle cell; VSMC) kalcifikációját és oszteokondrogenikus fenotípus-váltását indukálja [30, 31]. A Pi felvétele a nátrium-dependens foszfát kotranszporter Pit-1 csatornafehérjén keresztül elengedhetetlen feltétele a VSMC-k kalcifikációjához és fenotípus váltásához [32]. Ellentétben a korábbi elméletekkel, egyre elfogadottabb az a nézet, hogy a vaszkuláris kalcifikáció egy szabályozott folyamat, melyben a VSMC-k oszteoblasztszerű sejtek fenotípusát veszik fel. Ezt az elgondolást az is alátámasztja, hogy ezen sejtekben megemelkedik a Runt-related transcription factor 2 (Runx2) expressziója, mely egy oszteoblaszt-specifikus transzkripciós faktor. A Runx2-nek kulcsszerepe van az oszteoblaszt differenciációban, a csont mátrix fehérjék expressziójának szabályozásában, következésképpen a csont mineralizációban [33]. Az alkalikus foszfatáz (ALP; a korai oszteogenezis fontos enzime) és az oszteokalcin (OCN; az egyik fő nem-kollagén fehérje a csontmátrixban) expressziójának emelkedése szintén megfigyelhető a VSMC-k magas extracelluláris Pi szintre adott válaszában (1. ábra) [34, 35].

A VSMC-k apoptózisa, amely mind az intimában az ateroszklerotikus plakkok esetében, mind pedig a mediában CKD esetében látható, szintén hozzájárul a vaszkuláris kalcifikáció kialakulásához. Az apoptotikus VSMC-k kalcifikációs magként is funkcionálhatnak, illetve aktívan koncentrálnak a kalciumot és a foszfátot a hidroxipatit képzéshez [36, 37].



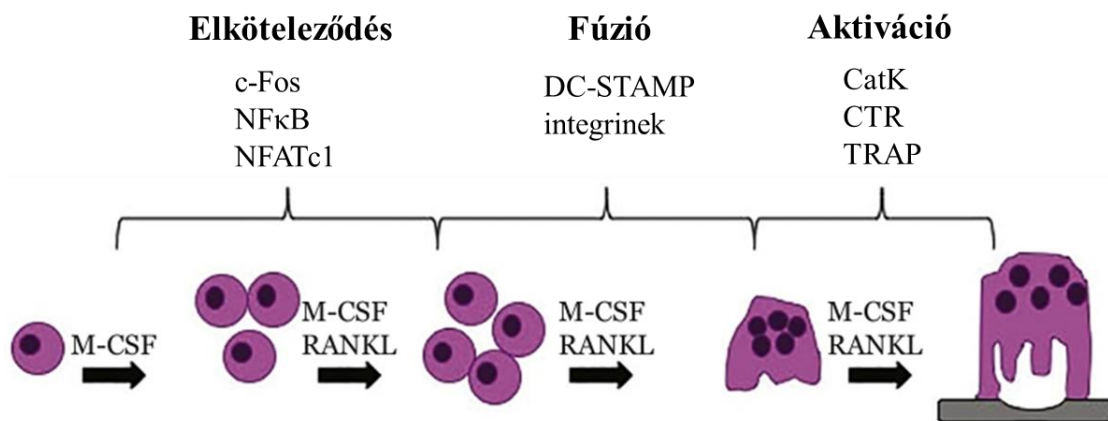
1. ábra: A magas foszfát és kalcium szint hatása a vaszkuláris simaizomsejtek mátrix-mineralizációjára. A magas extracelluláris foszfát és kalcium szint két útvonalon képes indukálni a vaszkuláris mátrix minerlizációt. Elsőként a kalcium (Ca) és a Pi megemeli a Pit-1 aktivitását növelve a Pi felvételét a simaizomsejtekbe illetve a mátrix vezikulákba. A megemelkedett intracelluláris Pi szint a simaizomsejtek fenotípus-váltását okozza, mely magában foglalja az oszteoblaszt-specifikus gének expresszióját (Runx2, oszteoklacin, alkalikus foszfataz), és a mineralizált extracelluláris mátrix képzését. Továbbá a mátrix vezikulákban is megemelkedik a Pi felvétele. A kalcium és Pi indukálta mátrix mineralizáció másik módja, hogy a megemelkedett kalcium és/vagy Pi megemelkedett $\text{Ca} \times \text{Pi}$ ion termékeket képez, ezáltal termodinamikai reakciók révén hozzájárul a hidroxipatit kristályok növekedéséhez az extracelluláris térben. (Forrás: Cecilia M. Giachelli, *Vascular calcification mechanisms*. JASN 2004; 15:2959-2964 [38].)

3.4. Oszteoklasztok kialakulása és szerepe az érelmeszesedésben

3.4.1. Az oszteoklasztok differenciációja

Az oszteoklasztok (osteoclast; OC) sokmagvú óriássejtek, melyek a monocita/makrofág vonal eredetű, csontreszorpcióra specializálódott sejtek [39]. A makrofágok OC-irányú differenciációjához egyaránt szükséges a makrofág/monocita kolóniastimuláló faktor 1 (macrophage/monocyte colony stimulating factor-1; M-CSF-1) és a kappa-B nukleáris faktor aktivátor receptor ligand (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand; RANKL) (2. ábra) [40]. A RANKL és a kappa-B nukleáris faktor aktivátor receptor (receptor activator of nuclear

factor kappa-B; RANK) interakciója révén további gének aktiválódnak, többek között a tumor nekrosis faktor (TNF)-receptor asszociált faktor 6 (TRAF6) [41], a c-Jun N-terminális kináz (JNK) [42], a p38 [43], a kappa B nukleáris faktor (NFκB) [44], a c-Fos [45] és az aktivált T-sejt nukleáris faktor, citoplazma 1 (nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1; NFATc1) [46]. Az NFATc1 kulcsszerepet játszik az OC-ok érésében az OC-specifikus gének expressziójának szabályozása útján, mint például a dentritikus sejt-specifikus transzmembrán fehérje (dentritic cell-specific transmembrane protein; DC-STAMP), a tartarát-rezisztens savas foszfatáz (TRAP), a katepszin K (CatK) és a kalcitonin receptor (CTR) [47–51].



2. ábra: Oszteoklasztok differenciációja. Az oszteoklaszt irányú differenciáció első lépése az elköteleződés: a makrofágokban M-CSF és RANKL hatására az oszteoklasztogenezisben szerepetjátszó szignálutvonalak aktiválódnak (TRAF-6, NFκB, c-Fos, NFATc1). Ezt követően DC-STAMP és egyéb integrinek segítségével sejtfúziók révén sokmagvú preoszteoklasztok alakulnak ki. Az aktivációs lépésben érett oszteoklasztokra jellemző génexpressziós mintázattal (CatK, CTR, TRAP) és ezáltal csontreszorpciós aktivitással rendelkező sokmagvú óriássejtek alakulnak ki. (Forrás: Huntley R et al., *Bone morphogenetic proteins: Their role in regulating osteoclast differentiation. Bone Reports*, 05 May 2019, 10:100207 [52].)

3.4.2. Oszteoklasztok az érfalban

A vaszkuláris kalcifikáció patogenezise egy aktív, szabályozott folyamat, mely sok hasonlóságot mutat a csontképzés folyamatával [53, 54]. Hozzávetőlegesen a kalcifikált erek és billentyűk egyötöde tartalmaz csontszövetet [55]. A csontban az oszteoblasztok extracelluláris mineralizációja és az OC-k csont-reszorpciója egy szinkronizált folyamat, mely egyensúlyt eredményez a csontszövet anabolizmusa és katabolizmusa között [56–58]. Az oszteoblaszt-oszteoklaszt aktivitások egyensúlyának megbomlása patológiás elváltozásokhoz vezethet, mint például oszteoporózis vagy oszteopetrózis [59, 60].

Az ateroszklerotikus plakkok kalcifikált régióinak környezetében oszteoklaszt-szerű (osteoclast-like cell; OLC) sejtek jelennek meg [61]. A funkcionálisan aktív OLC-k jelentőségét a vaszkuláris kalcifikációban számos esetben bizonyították. Karbon-anhidráz II enzim-deficiens (mely nélkülözhetetlen az OLC sejtek csontreszorpciós aktivitásához) egerekben nagymértékű arteriális kalcifikációt figyeltek meg [62]. További bizonyíték, hogy az M-CSF hiánya, mely szükséges az OLC kialakulásához, szintén vaszkuláris kalcifikációhoz vezet egerekben, vélhetően a nem megfelelő OLC képződés következtében [63]. Ezek a megfigyelések alapján elmondható, hogy a működő OLC sejtek nélkülözhetetlenek az érrendszerben a mineralizált depozitumok reszorpciójához, illetve az OLC sejtek funkcióvesztése a vaszkuláris kalcifikáció folyamatát segíti elő.

A kalcifikáló erekben a RANKL és az M-CSF egyaránt expresszálódik [64, 65]. Érelmeszesedéses plakkokban a csontképződés egy gyakori jelenség, melyet a VSMC-k, oszteoblasztok és OLC-k jelenléte jellemez [66]. Az OLC-k infiltrálódó makrofágokból differenciálódnak és elsősorban a koleszterol kristályok és a mineralizáció környékén figyelhetőek meg [67]. Az OLC-k kialakulása az érrendszerben függ a RANKL-tól, melyet különféle sejttípusok, úgymint VSMC-k és endotél sejtek is nagy mennyiségben szekretálnak [68–70]. Doherty és munkatársai kimutatták, hogy az artériában található kalcium depozitumok kedvezhetnek a hematopoetikus sejtekből történő OLC sejtek kialakulásának, mely ellensúlyozhatja a kalcifikációt ateroszklerózisban [71]. Ezt a hipotézist az is alátámasztja, hogy a Runx2 – a VSMC-oszteoblaszt transzformáció fő transzkripciós faktora – közvetlenül kötődik a RANKL promoteréhez és aktiválja annak expresszióját, így a Runx2 több ponton is szabályozza a mineralizációt. Egyrészt aktiválja VSMC-k oszteoblaszt irányú transzformációját, ezáltal az extracelluláris kalcium felhalmozódását, másrészt elősegíti az OLC-k képződését, melyek részt vesznek a mineralizált depozitumok reszorpciójában [72]. Az artériák mélyebb szöveti rétegeiben az OLC-k képesek a depozitumok bontására, ezáltal csökkentik a kalcifikáció mértékét és ellensúlyozzák a VSMC-kból származó oszteoblasztok aktivitását [67]. Az egyensúly felbomlása a VSMC-kból származó oszteoblasztok csontképzése és az OLC-k csontreszorpciója között patológiás kalcifikációs folyamatokhoz vezet az érfalban.

3.4.3. Az oszteoklaszt-differenciáció gátlása

A RANK expressziója, valamint a RANK-RANKL interakciója nélkülözhetetlen az OC-k differenciációjához [56, 70, 73]. Ezt támasztja alá az a megfigyelés, RANK-/- egerekben nem differenciálódnak OC-k [74]. Az oszteoprotegerin (OPG) egy szolubilis RANKL receptor, melynek szerepe van a csont-reszorpció szabályozásában azáltal, hogy gátolja az OC-k

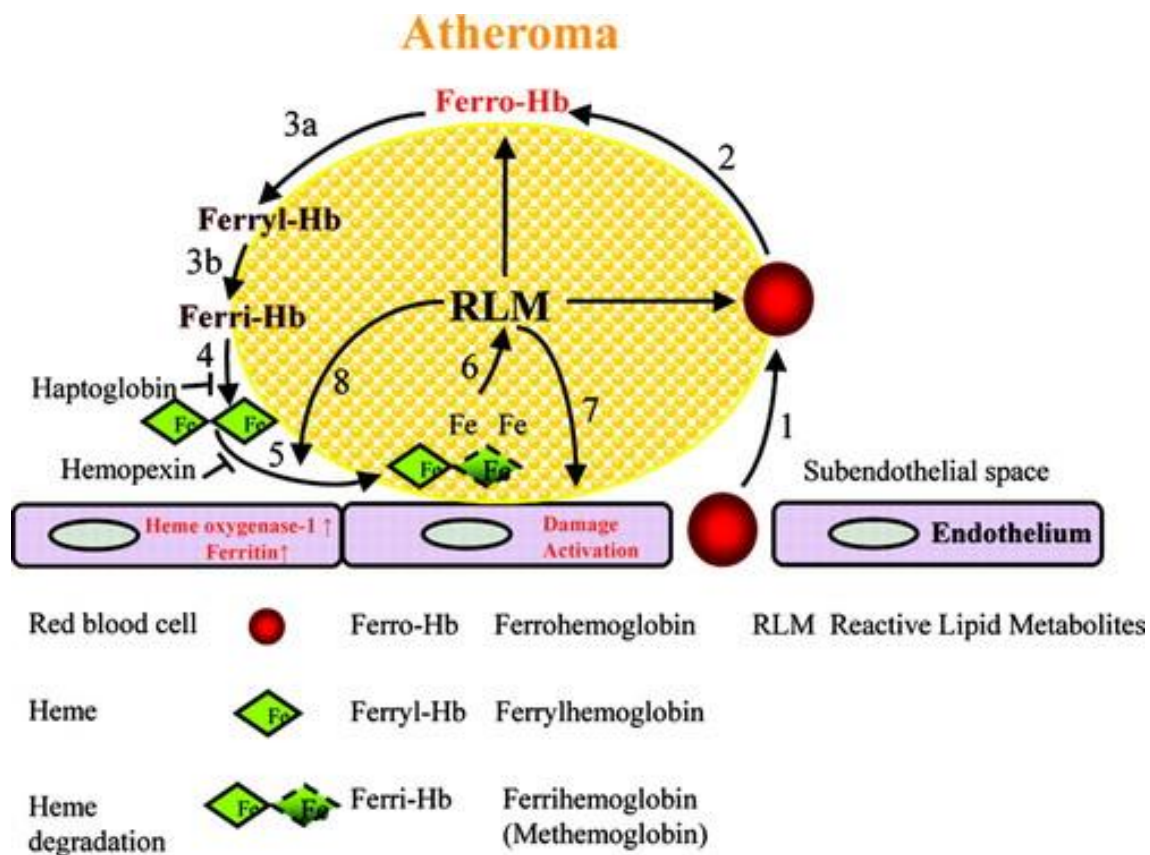
működését [75]. Az OPG dimerként verseng a RANK receptorral a RANKL-kötésért, így módon gátolja a RANK-RANKL interakciót [76].

Az NFATc1 oszteoklasztogenezisben betöltött kulcsszerepére világítanak rá azok a tanulmányok, melyek NFATc1-deficiens egerek sérült OC differenciációját írják le [77]. Továbbá, az NFATc1-deficiens embrionális őssejtek nem képesek OC sejtekké differenciálódni RANKL hatására [78].

Zwerina és munkatársai már korábban leírták, hogy a hem gátolja az oszteoklasztogenezist és az OC-specifikus markerek (TRAP, CTR és DC-STAMP) expresszióját azáltal, hogy indukálja a hem-oxigenáz-1-et (HO-1), a hem katabolizmus legfontosabb enzimét [79]. A HO-1 negatív szabályozó szerepét a OC-k differenciációjában más tanulmányok is alátámasztják [80, 81].

3.5. A ferril-hemoglobin jelenléte az ateroszklerotikus plakkokban

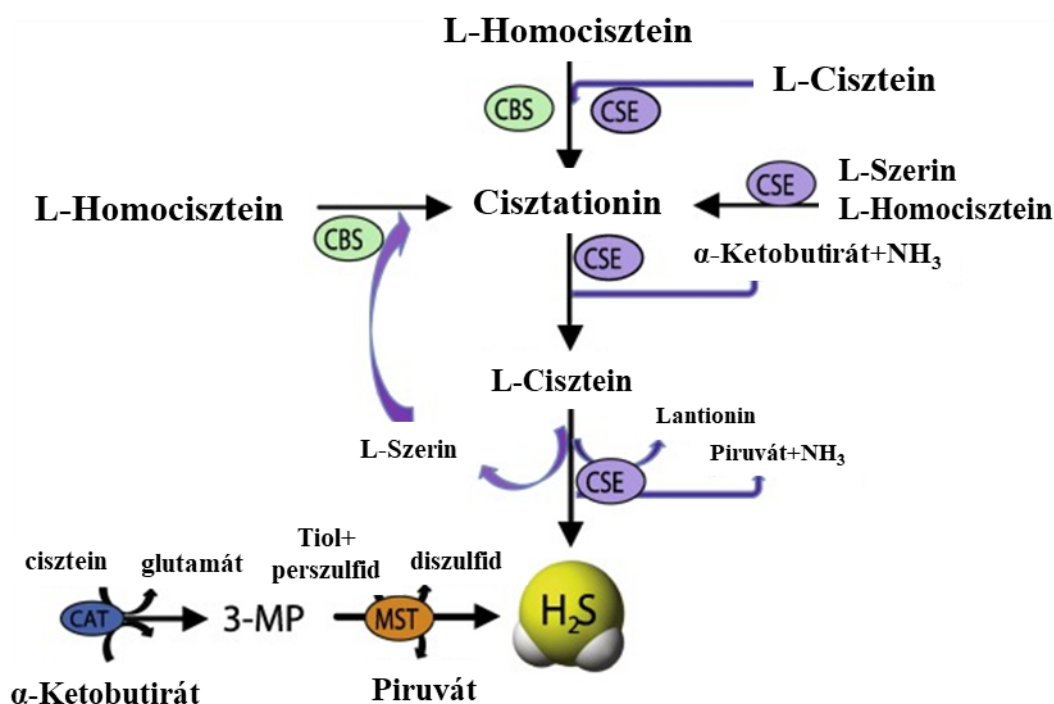
Az ateroszklerotikus léziók sérülése révén gyakran alakul ki plakkon belüli hematóma vagy hemorrhagia (3. ábra). Mi több, a vörösvértesetek képesek a plakkba penetrálni a vasa vasorum felől is a neovaszkularizáció során megjelenő, újonnan képződött erek sérülései révén is [5, 82]. Ezen bevérzett komplikált plakkokat erősen oxidáló milieu jellemzik, mintegy „halál zónát” képezve a vörösvértestek számára [83]. Az eritrociták ezen halál-zónában lépve szétesnek, a kiszabaduló hemoglobin (Hb) gyors oxidáción megy keresztül, mely során methemoglobin (MetHb, Fe^{3+}) és ferril-hemoglobin (FHb, $\text{Fe}^{4+}=\text{O}^{2-}$) képződik. A Hb oxidációját hem felszabadulás is kíséri [84]. Kutatócsoportunk korábban igazolta, hogy a bevérzett komplikált léziókban MetHb és FHb található [85], a FHb pedig potenciális pro-inflammatorikus mediátor az endotél sejtekben, indukálja azok morfológiai változásait [86], fokozza az endotel-réteg permeabilitását és növeli a monociták adhézióját [87]. Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy az oxidált Hb formáknak jelentős szerepe van az ateroszklerózis patogenezisében.



3. ábra: A vörösvértestek-mediálta aterogenezis progressiója. Eritrociták infiltrálódnak az aterómába (1), melyek az ateróma lipidek hatására lizálódnak és kiszabadul a ferrohemoglobin (Ferro-Hb)(2). A ferrohemoglobin ferril-hemoglobinná (Ferryl-Hb) (3a) és ferrihemoglobinná (Ferri-Hb) oxidálódik (3b). A ferrihemoglobinnál a hem-kiszabadul (4), melyet az ateróma lipidek felvesznek (5). Az ateróma lipidek oxidációja fokozódik (6) és az oxidáció során keletkező reaktív lipid termékek endotélium károsodást és aktivációt okoz (7). Az ateróma lipid és hem indukálja a HO-1 és ferritin expresszióját (8). (Forrás: Nagy Emőke, et al. *Red Cells, Hemoglobin, Heme, Iron, and Atherogenesis* *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010 Jul;30(7):1347-53 [85].)

3.6. A H_2S képződése és biológiai funkciója az érrendszerben

A kén-hidrogént (H_2S) kezdetben toxikus gáznak tekintették, bár nemrégiben felismerték, hogy a szén-monoxid és a nitrogén-monoxid mellett a harmadik endogén gáz-transzmitter [88]. Emlősökben a H_2S három enzim, a cisztationin- β -szintáz (CBS), a cisztationin- γ -liáz (CSE) és a 3-merkaptopiruvát-szulfurtranszferáz (MST) segítségével képződhet a transzszulfurációs útvonalon, homociszteint, cisztationint és L-ciszteint használva szubsztrátként (4. ábra).



4. ábra: Endogén kénhidrogén képződés transzszulfurációs útvonalon. A H₂S enzimatisz szintézisében 3 enzim vesz részt: a cisztationin-β-szintáz (CBS), a cisztationin-γ-liáz (CSE) és a 3-merkaptopiruvát-szulfurtranszferáz (MST), melyek L-Homociszteint, Cisztationint és L-Ciszteint használva szubsztrátként képesek H₂S-t előállítani. (Forrás: Gopi K. Kolluru et al. *Hydrogen sulfide chemical biology: Pathophysiological roles and detection*. *Nitric Oxide* (35) :5-20 [89].)

Korábbi irodalmi adatok alapján a perifériás rendszerben a H₂S koncentrációja 30-50 μmol/L [90], későbbiekben az egyre pontosabb mérési módszereknek köszönhetően kimutatták, hogy a human plazmában a szabad H₂S/HS⁻ szintje 300-500 nmol/L, míg a kötött szulfid formák (Fe-S proteinek, perszulfidok) 2-4 μmol/L koncentrációban van jelen [89, 91]. Kimutatták, hogy az aortában 20-100-szor nagyobb a H₂S koncentrációja, mint más szövetekben [92]. Az érrendszerben a H₂S a simizomsejtek CSE enzim aktivitása révén képződik [93]. A H₂S-nek számos fiziológiai hatása van az érrendszerben: (1) dilatálja az ereket azáltal, hogy nyitja a simaizomsejtekben az adenosin-5'-trifoszfát-szenzitív K⁺ csatornákat [94], (2) kardioprotektív hatású az iszkémia/reperfúzió okozta károsodás és a miokardiális infarktus ellen [95] és (3) sérülést követően megóvjaa a mitokondriumok szerkezetét és funkcióját [96]. Különböző artériás és pulmonáris hipertenziós állatmodellben H₂S-deficienciát figyeltek meg [97, 98]. Exogén H₂S javította az iszkémia/reperfúzió sérülés következtében kialakult miokardiális diszfunkciót [99, 100]. Egyre több bizonyíték támasztja alá, hogy a H₂S-nek közvetlen ateroszklerózist gátló hatása van. A H₂S magas koncentrációban apoptózist indukál [101, 102], csökkenti a VSMC-k endotelin-indukálta proliferációját [103] és befolyásolja az érrendszerben történő gyulladásos

folymatokat [104]. Mi több, a H₂S gátolja az alacsony sűrűségű lipoprotein és az ateróma plakk lipidek oxidációját [105]. Érdekes megfigyelés továbbá az, hogy az ateroszklerózis progressziója szignifikánsan alacsonyabb a Down-szindrómában szenvedő egyéneknél, ami feltehetően a nagyobb mennyiségben termelődő H₂S hatásának tulajdonítható [106]. CKD-ban betöltött funkcióját tekintve, a CKD 5. stádiumú betegeknél a plazma H₂S szintje alacsonyabb, mint az egészséges embereknél [107].

További bizonyíték a H₂S érbetegségeiben betöltött jótékony hatására, hogy a kalcifilaxis sikeresen kezelhető intravénás sodium-tioszulfát terápiával [108, 109], melynek háttérében az áll, hogy a sodium-tioszulfát emeli a CSE enzim expresszióját és ezáltal növeli a H₂S biogenezisét [110]. Továbbá azt is megfigyelték, hogy a H₂S csökkenti a patkányokban a nikotin és D3 vitamin-indukálta vaszkuláris kalcifikációt [111]. Ugyanakkor a H₂S protektív hatásának a mechanizmusát és a CSE-nek a CKD-ben megjelenő vaszkuláris kalcifikációban betöltött szerepét még nem vizsgálták.

4. CÉLKITŰZÉSEK

A vaszkuláris kalcifikáció progresszióját két folyamat határozza meg: a simaizomsejtekből differenciálódott oszteoblaszt-szerű sejtek extracelluláris mátrix-képzése és a makrofágokból differenciálódott oszteoklaszt-szerű sejtek mátrix reszorpciója. Vizsgálataink középpontjában azon faktorok megismerése állt, melyek hatással vannak ezekre a folyamatokra.

1. Célul tűztük ki annak a kérdésnek a tisztázását, hogy a bevértet atheroscleroticus lemegekben nagy mennyiségben jelenlévő különböző oxidáltságú Hb formák vajon hogyan befolyásolják az OLC sejtek vaszkuláris kalcifikációt kompenzáló hatását.

- Megvizsgáltuk, hogy a különböző Hb formák hogyan hatnak az OLC sejtek differenciálódására és csontreszorpció aktivitására.
- Ismert, hogy a HO-1 enzim gátolja az oszteoklasztogenezist. Feltételeztük, hogy az oxidált hemoglobinok HO-1 indukáló-képességük révén befolyásolják az oszteoklaszt-differenciációt, így HO-1 géncsökkentett illetve HO-1^{-/-} knock-out sejteken vizsgáltuk, hogy mi a HO-1 szerepe az oxidált Hb formák oszteoklasztogenezisre gyakorolt hatásában.
- Másik lehetséges mechanizmusként megvizsgáltuk, hogyan befolyásolja az oxidált Hb a közvetlen RANK-RANKL interakciót, mely az OC-irányú differenciáció nélkülözhetetlen lépése. Továbbá azt is vizsgáltuk, hogy az oxidált Hb az oszteoklasztogenezis mely jelátviteli útvonalán fejti ki hatását.
- Bevértet atheroscleroticus plakkokban vizsgáltuk, hogyan befolyásolja a FHb jelenléte az OC-k differenciációját.

2. Célunk volt annak megismerése, hogy az emberi szervezetben harmadik gáztranszmitterként számított H₂S hogyan befolyásolja a vaszkuláris kalcifikációt.

- Megvizsgáltuk, hogy az exogén eredetű H₂S-nek milyen hatása van a HAoSMC-k oszteoblasztos differenciációjára és extracelluláris mátrix képzésére.
- Az endogén H₂S-termelő enzim aktivitásának gátlásával tanulmányoztuk, hogy milyen hatása van az endogén H₂S szint csökkenése a HAoSMC-k oszteoblaszt-irányú transzformációjára.
- Célul tűztük ki annak feltárását, hogy mely enzim hiányában alakul ki a végstádiumú veseelégtelenségben szenvedő betegekre jellemző alacsony H₂S szint.

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. Engedélyek

Munkánk során a human arteria carotis mintákat carotis endarterektómián átesett betegektől gyűjtöttünk, melyeket a Debreceni Egyetem Sebészeti Intézete bocsátotta rendelkezésünkre. A minta gyűjtése a Magyar Kormány Egészségügyi Tudományos Tanácsának Tudományos és Kutatás Etikai Bizottsága jóváhagyásával, a DE OEC RKEB/IKEB 3712-2012 regisztrációs számú engedélyével készült.

Vizsgálatainkhoz egészséges és 5. stádiumú veseelégtelenségen szenvedő betegektől gyűjtöttünk vérmintákat, melyhez engedélyt a Nr. DEOEC RKEB/IKEB 3287A-2010 számon a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Etikai Bizottsága adott ki. Írásos beleegyező nyilatkozatot minden résztvevő aláírt. A tanulmány megfelel az 1975 évi Helsinki Nyilatkozat etikai irányelveivel.

5.2. Betegek

A kontrollok egészségügyi dolgozók közül kerültek ki, akik nem rendelkeztek olyan ismert betegségekkel, mint hipertenzió, dislipidemia, máj- és veseműködési zavarok (n=23, átlag életkor 53 év, 9 nő és 14 férfi). A beteg csoportba 5. stádiumú CKD betegek tartoztak, akik hemodialízis kezelésben részesülnek dialízis központunkban (n=21, átlag életkor 61 év, 13 nő és 8 férfi). A betegek hetente 3 alkalommal 4 órás kezelésen vettek részt, mely során High-Flux Dialyser FX 60 és FX 600 készüléken (Fresenius, Fresenius AG. Hamburg, Németország) kapták a kezeléseket. A Kt/V arány $1,25 \pm 0,3$ volt. Folátot (3mg/nap) és i.v. vasat (Ferrlecit, Aventis Pharma, Dagenham, UK) (62,5mg minden második héten) kaptak a betegek a HD kezelés kezdetétől. Hemoglobin értéküktől függően rHu-EPO-t is kaptak.

5.3. Sejtenyésztés és reagensek

Human Aorta Simaizomsejtek (HAoSMC) a Cambrex Bioscience-től (Wokingham, UK), az egér RAW264.7 makrofágok az ATCC-től (Manassas, VA, US) szereztük be. Kísérleteinkhez használt vegyszereket, ha másként nem jelöltük, a Sigma (St. Luis, MO, USA) cégtől szereztük be. A sejteket 10% FBS (Gibco, Thermo Scientific, Waltham, MA, US) tartalmú DMEM-ben (Dulbecco's Modified Eagle Medium) tenyésztettük, mely 100 U/ml penicillin, 100 µg/mL streptomycin és neomycin, továbbá 1 mmol/L Sodium pyruvate hozzáadásával egészítettünk ki

(növekedési médium). A hem 20 mM NaOH-ban oldottuk, a H₂S donoroként deionizált vízben oldott NaHS használtunk.

5.4. *In vitro* oszteoklasztogenezis

RAW264.7 makrofágokat tenyésztettünk 24 lyukú tenyésztőedényben növekedési médiumban vagy 50 ng/mL RANKL (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Németország) jelenlétében (oszteoklasztogénikus médium). Kétnaponta cseréltük a tenyésztőközegeket.

5.5. *Csontvelő eredetű mononukleáris sejtek izolálása*

Csontvelői eredetű mononukleáris sejteket (BMDMs) vad típusú és hem-oxigenáz-1 deficiens egerek femur és tibia csontjából izoláltunk Madaan és munkatársai szerint [112]. Az izolált BMDM sejteket 5 napig tenyésztettük RANKL (100 ng/mL) és M-CSF (50 ng/mL) tartalmú médiumban önmagában vagy 10 µmol/L Fhb jelenlétében.

5.6. *Tartarát-rezisztens savas foszfatáz (TRAP) festés*

RAW264.7 sejteket oszteoklasztogénikus médiumban tenyésztettünk 5 napig, majd az OC-irányú differenciációt TRAP festéssel vizsgáltuk Leukocyte Acid Phosphatase kit segítségével a gyártó ajánlása szerint. TRAP pozitív sokmagvú sejteket (több mint 3 sejtmag/sejt) oszteoklasztoknak tekintjük. Az OC-k területét Image J software-rel határoztuk meg.

5.7. *Csontreszorpciós vizsgálat*

Az OC-k csontreszorpciós aktivitásának méréséhez a RAW 264.7 sejteket hidroxipatit bevonatú Corning OsteoAssay Surface Plate-en tenyésztettük 6 napig növekedési médiumban vagy oszteoklasztogénikus médiumban. Ezt követően a sejteket eltávolítottuk 5%-os fehérítő oldattal, kétszer mostuk a tenyésztőedény Ca/P bevonatú alját deionizált vízzel, majd teljes száradást követően Image J software segítségével mértük meg a kialakult OC-k által lebontott területek nagyságát.

5.8. *Hem-oxigenáz aktivitás mérése*

6 lyukú tenyésztőedényben kezeltünk RAW264.7 sejteket kontroll médiumban vagy oszteoklasztogénikus médiumban önmagában vagy hem (50 µmol/L) illetve Fhb (10 µmol/L) jelenlétében. A tenyészeteket kétszer mostuk HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) oldattal,

sejtkaparó segítségével összegyűjtöttük a sejteket, majd a sejtszuszpenziót centrifugáltuk ($2000 \times g$, 15 perc, $4^{\circ}C$). A sejteket reszuszpendáltuk 300 μ l kalium-foszfát pufferben (100 mmol/L [pH 7.4]) mely 2 mmol/L $MgCl_2$ -ot is tartalmazott. A mintákat háromszor lefagyasztottuk-felolvasztottuk, szonikáltuk, végül centrifugáltuk ($18.000 \times g$, 10 perc $4^{\circ}C$). A mikroszóma frakciót tartalmazó felülúszót használtuk a HO aktivitás meghatározásához, Balla G és munkatársai munkája alapján [113]. A HO enzim aktivitását a képződött bilirubin/mg fehérje/60 perc egységben fejeztük ki.

5.9. Immunhisztokémia

Az arteria carotis mintákat 4%-os formaldehid oldatban fixáltuk 1-3 napig. A kalcifikált mintákat ezt követően 1 mol/L EDTA/Tris pufferrel dekalcináltuk. 5 μ m vastagságú paraffinba ágyazott mintákat xylen oldattal deparaffinizáltuk, majd etanollal rehidratáltuk, végül desztillált vízzel mostuk. Immunhisztokémiához a mintákat Dako EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent-ben (Dako Glostrup, Denmark) inkubáltuk 5 percig. Ezt követően a mintákat EnVisionTM FLEX pufferrel mostuk. A sorozat metszeteket TRAcP (Roche, Mannheim, Germany) vagy katepszin K (Abcam, Cambridge, UK) vagy CD68 (Roche) vagy FHb ellenes antitesttel inkubáltuk ultraview univerzális DAB detektáló kitet alkalmazva. Az immunfestések intenzitását DFC 420 kamerával felszerelt Leica DM2500 fénymikroszkóppal detektáltuk.

5.10. Hemoglobin preparálás

A hemoglobin preparálást egészséges önkéntesektől származó heparinnal alvadásgátolt vérből végeztük DEAE Sepharose CL-6B oszlopon, ioncserélő kromatográfiával. MetHb előállításához a Hb preparátumot hem csoportra nézve 1,5-szeres moláris mennyiségű $K_3Fe(CN)_6$ -dal inkubáltuk 30 percig $25^{\circ}C$ -on. FHb előállításához a Hb preparátumot hem-csoportra nézve 10-szeres moláris mennyiségű H_2O_2 oldattal inkubáltuk 60 percig $37^{\circ}C$ -on. Ezt követően a különböző redox állapotú Hb preparátumokat dializáltuk fiziológiás sóoldat ellenében, majd Amicon Ultra filteres centrifugacsőben töményítettük. A minták tisztaságát ProteoSilver Plus Silver Staining Kit segítségével ezüst-festéssel ellenőriztük. A minták koncentrációját Winterbourn egyenletei alapján határoztuk meg [114].

5.11. Keresztkötött hemoglobinok detektálása Western blottal

Egészséges kontroll, kalcifikált aterómát vagy bevérzett kalcifikált aterómát tartalmazó arteria carotis mintákat 12%-os SDS gélen elektroforetizáltunk. Korábbi munkánk alapján a hemoglobin

dimereket, tetramereket és polimereket HRP-vel jelölt anti-human Hb poliklonális antitesttel (Abcam, 1:15000) mutattuk ki [85].

5.12. *Human carotis minták spektrum analízise*

Egészséges carotis, kalcifikált aterómát, valamint bevérzett kalcifikált aterómát tartalmazó carotis mintákat folyékony nitrogénben történő fagyasztást követően porítottuk, majd foszfát-pufferelt sóoldatban (phosphate buffered saline, PBS, pH 7,4) szonikálással homogenizáltuk. A mintákat 12000×g sebességen 20 percig centrifugáltuk, majd a felülúszót Beckman DU-800 spektrofotométeren 500-700nm hullámhossz tartományban fotometráltuk.

5.13. *Sejt proliferáció vizsgálata*

A RAW264.7 sejteket 24 lyukú tenyésztőedényben tenyésztettünk kontroll médiumban vagy oszteoklasztogénikus médiumban önmagában vagy FHb jelenlétében (10 µmol/L) 1-4 napig. Az élő sejtek mennyiségét MTT-vizsgálattal határoztuk meg. Ehhez a tenyészetet mostuk PBS-sel, majd 0,5 mg/mL MTT ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid) oldattal inkubáltuk 3 órán át 37°C-on. Az élő sejtek a vízzoldékony MTT-t vízben nem oldódó formázán kristállyá alakítják, melyek DMSO-ban visszaoldva, fotometriásan 570nm-en mérhető.

5.14. *Immunfluoreszcens festés*

A RAW264.7 sejteket 24 lyukú tenyésztő edényben fedőlemezen tenyésztettünk kontroll médiumban vagy oszteoklasztogénikus médiumban önmagában vagy 10 µmol/L FHb jelenlétében. A kezelést követően a sejteket PBS-sel mostuk, majd fixáltuk 4%-os paraformaldehid oldattal (pH 7,4, PBS-ben) 15 percig. PBS-sel történő mosást követően 5% kecskeszérumot és 0,3% Triton X-100-at tartalmazó PBS-ben szobahőmérsékleten blokkoltuk a mintákat 60 percig. Ezt követően a mintákat 16 órán át inkubáltuk 1:250 hígítási faktorú NFATc1 (Novus Biologicals, Littleton, CO, US) ellenes antitest oldattal, amely 1% BSA-t és 0,3% Triton X-100-at tartalmazott. A másodlagos antitest Alexa Fluor® 488 (Thermo Scientific) fluoroforral konjugált kecskében termeltetett anti-egér IgG volt, melyet 1:500 hígításban alkalmaztunk. A sejtmagokat Hoechst festékekkel festettük. A nukleáris transzlokációt TCS SP8 STED mikroszkóppal Leica Application Software X (Leica, Mannheim, Germany) segítségével vizsgáltuk.

5.15. Citoplazma és sejtmag fehérje extrakció

A 6 lyukú tenyésztő edényben kezelt sejteket háromszor mostuk PBS-sel és 10 mM HEPES pH 7.9, 50 mM NaCl, 0,5 M Szukróz, 0,5% Triton X-100, és proteáz gátlókat tartalmazó pufferben lizáltuk, 10 percig jégen inkubáltuk, majd ezt követően 1000×g sebességen 5 percig centrifugáltuk. A felülúszó tartalmazza a citoplazma fehérje frakciót. A sejtmagfehérjét tartalmazó pelletet háromszor mostuk mosó pufferrel (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0,1% NP-40 és proteáz inhibitorok), majd szolubilizáltuk magfehérje extrakciós pufferrel (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0,5% Sodium deoxycholate, 0,1% SDS, és proteáz inhibitorok).

5.16. Rekombináns egér 6×His-RANKL expresszió

A rekombináns, N-terminális végén 6×His tagelt egér RANKL-ot *E.coli* Rosetta 2 sejtekben termeltettünk. C57BL egerek tüdő szövetéből RNS-t szeparáltunk, reverz transzkripcióval cDNS-t állítottunk elő, majd ezt pTriex-4 Neo vektorba klónoztuk. *E.coli* Rosetta 2 sejteket 100 µg/ml karbenicillint tartalmazó Luria-Bertani médiumban tenyésztettük (30°C, 250rpm), míg a sejt-denzitás elérte OD600=0,5 értéket. A protein expressziót 1 mM Izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG) hozzáadásával indukáltuk, majd a tenyészeteket 3 órán át, 30°C, 250 rpm-en rázattuk. A sejteket centrifugálással összegyűjtöttük (3990×g, 15 min), majd lizáltuk hideg lízis pufferben (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 1% TritonX-100, proteáz inhibitorok és 1 mg/ml lizozim, pH 8.0). A rekombináns RANKL fehérjét Protino Ni-TED 150 oszlopon, a gyártó utasításai alapján tisztítottuk meg, ezután Pierce™ High Capacity Endotoxin Removal Resin (Thermo Scientific) segítségével endotoxin-mentesítettük. A rekombináns fehérje minőségi analízisét Coomassie festéssel és Western blottal végeztük.

5.17. In vitro RANK-RANKL interakció vizsgálata

A Fhb RANK-RANKL interakciót gátló hatásának vizsgálatához RAW264.7 sejtekből RANK fehérjét tisztítottunk immunoprecipitációval, melynek során a sejteket lizáltuk hideg lízis pufferben (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 2× proteáz inhibitor és 1% Triton X-100), jégen inkubáltuk 10 percig, majd centrifugáltuk (14000×g 10 min 4°C). A felülúszót 4°C-on 15 µg RANK antitesttel billettettük 16 órán át. Ezt követően az antigen-antitest komplexeket protein A/G mágneses gyöngyökkel (Thermo Scientific) billettettük szobahőmérsékleten 60 percen át. Ezt követően a gyöngyöket háromszor mostuk detergenset tartalmazó hideg puffer oldattal (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0,05% Igepal CA630 és proteáz inhibitorok), majd háromszor detergenset nem tartalmazó pufferrel (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl) és

koinkubáltuk 1µg RANKL-dal vagy 1µg RANKL és 10µM Fhb elegyével szobahőmérsékleten 60 percig. A gyöngyöket ezután mostuk háromszor 50 mM Tris pH 7.5 és 150 mM NaCl tartalmazó pufferrel és a mintákat eluáltuk redukáló ágens nélküli 2×SDS minta-pufferrel 50°C-on 10 percig. A RANK-RANKL interakció vizsgálatához az eluátumokat 100 mM ditiotreitollal (DTT) egészítettük ki, 95°C-on 10 percig denaturáltuk, majd immunoblottal analizáltuk RANK és His-tag elleni antitestekkel.

5.18. Kalcifikáció indukálása

Konfluens HAoSMC sejteket kalcifikáló médiumban tenyésztettünk, melyhez a növekedési médiumot 3 mmol/L szervetlen foszfáttal ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7.4) egészítettük ki. Kísérleteink során a sejtenyésztő médiumokat kétnaponta friss médiumra cseréltük.

5.19. Kalcium depozíció mérése

5.19.1. Kalcium depozíció mennyiségi meghatározása kolorimetriás módszerrel

A 48 lyukú tenyésztőedényben kezelt sejteket kétszer mostuk PBS-sel és dekalcifikáltuk 0,6N sósav oldattal. A minták kalcium tartalmát QuantiChrome Calcium Assay Kit (Gentaur, Hayward, CA, US) segítségével határoztuk meg a gyártó utasításai szerint. Ezt követően a sejteket 0,1 mol/L NaOH (nátrium-hidroxid) és 0,1% SDS (Nátrium-dodecil-szulfát) elegyével szolubilizáltuk, fehérje tartalmukat BCA protein assay kit (Thermo Scientific) segítségével határoztuk meg. A minták kalcium tartalmát fehérjetartalomra normalizáltuk.

5.19.2. Alizarin Red festés

A 48 lyukú tenyésztőedényben kezelt sejteket kétszer mostuk PBS-sel, majd 4% paraformaldehid (PFA) oldatban fixáltuk. PBS-sel történő mosást követően 2% Alizarin Red S oldattal inkubáltuk 5 percig. Ezt követően háromszor mostuk desztillált vízzel.

5.20. Alkalikus- foszfatáz aktivitás mérése

HAoSMC sejteket 6 lyukú tenyésztőedényben kezeltünk, majd kétszer mostuk PBS-sel, szolubilizáltuk 1% Triton X-100 és 0,9% NaCl tartalmú oldatban. 130µl Alkaline Phosphatase Yellow Liquid Substrate oldathoz 50µg proteintartalmú mintát adtunk, és a p-nitrofenol képződés kinetikáját 37°C-on 30 percig 405nm-en detektáltuk. A kinetikus görbe maximális meredekségét használtuk az aktivitás számításához.

5.21. Intracelluláris foszfát mérése

A sejtek szervesen foszfát tartalmát QuantiChrome Phosphate Assay Kit (Gentaur) segítségével határoztuk meg. A tenyészeteket kétszer mostuk PBS-sel, ezt követően szolubilizáltuk 1% Triton X-100 oldattal. A foszfáttartalmat a minták fehérjetartalmára normalizáltuk.

5.22. Oszteokalcin mérés

A tenyészetek oszteokalcin tartalmának méréséhez az extracelluláris matrixot 0,5 mol/L EDTA-ban (pH 6.9) oldottuk, ezt követően Osteocalcin Assay Kit (Bender MedSystems, Vienna, Austria) segítségével a sejtenyészetek fehérjetartalmára normalizálva határoztuk meg az értékeket.

5.23. Plazma H_2S koncentráció meghatározása

A CKD betegektől és egészséges kontroll személyektől származó vérmintákat centrifugáltuk (3000×g 3 perc), majd 40 µl plazmamintát adtunk az 50 µl 1% cink-acetátot, 40 µl 30 mmol/L $FeCl_3$ -ot [1,2 mol/L HCl-ban oldva] és 50 µl 20 mmol/L N,N-dimetil-p-fenilendiamin dihidrokloridot [7,2 mol/L HCl-ban oldva] tartalmazó reakcióelegyhez. A fehérje-mentesítést 70 µl 10% triklórecetsav hozzáadásával végeztük. Ezt követően a reakcióelegyet centrifugáltuk (3000×g 30 perc), majd a felülúszó abszorbanciáját 670 nm hullámhosszon mértük, a H_2S koncentrációját kalibrációs görbe alapján határoztuk meg.

5.24. Perifériás Mononukleáris sejtek (PBMC) szeparálása

Perifériás mononukleáris sejteket egészséges kontroll és HD-kezelt betegek véréből Histopaque 1077 segítségével gradiens centrifugálással izoláltunk. CSE aktivitás méréséhez a sejtsuszpenziót 100 mmol/L kálium-foszfát pufferben (pH 7.4) ultraszonikáltuk vagy a CSE fehérje-szintű expresszió vizsgálatához 1% Triton X-100 oldatban proteáz inhibitorok jelenlétében szolubilizáltuk vagy a CSE mRNS mennyiségi meghatározásához TriReagent segítségével tártuk fel a sejteket és további felhasználásig -70°C-on tároltuk.

5.25. Cisztationin γ -liáz aktivitás mérése

A CSE aktivitás mérését Stipanuk módszere alapján végeztük [115]. A human PBMC sejtek CSE aktivitását cisztationin lebontás és cisztein képződés útján mértük. A sejtlizátumokat 60 percig 37°C-on inkubáltuk 2 mmol/L cisztationin, 0,25 mmol/L pyridoxal 5'-foszfát és 100

mmol/L Tris-HCl jelenlétében. Ezt követően savas ninhidrin reagenst adtunk az elegyhez és 5 percig forraltuk. A minták szobahőre történő lehűlése után a cisztationin és cisztein tartalmakat 455 és 560 nm-en mért abszorbancia értékek segítségével határoztuk meg.

5.26. *Kvantitatív polimeráz láncreakció*

Totál RNS izolációja TriReagent (Zymo Research, Irvine, CA, US) segítségével történt, a minták reverz-transzkripcióját High Capacity cDNA kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) segítségével végeztük. A CKD betegek és kontroll csoport perifériás mononukleáris sejteiből QIAamp® RNA Blood Mini kittel (Qiagen, Hilden, Germany) preparáltunk RNS mintákat. Fluoreszcens jelölésű TaqMan próbákat (Thermo Scientific) használtunk a CTR (Mm00432282_m1), DC-STAMP (Mm04209236_m1), NFATc1 (Mm00479445_m1), HO-1 (Mm00516005_m1), RANK (Mm00437132_m1) és β -Actin (Mm00607939_s1) expressziójának vizsgálatához, melynek során a 20 μ l reakcióelegy 10 μ l cDNS-ből és 10 μ l Master Mix-ből (Thermo Scientific) állt, mely 1 μ l TaqMan Assayt tartalmazott. A Runx2, Pit-1 és CSE gének kvantálása iQ SYBR Green Supermix-szel (Bio-Rad) történt a következő primerek felhasználásával: Runx2 forward 5'-ATGGCGGGTAACGATGAAAAT-3' és reverse 5'-ACGGCGGGGAAGACTGTG-3', Pit-1 forward 5'-GCCAAAGTGAGCGAAACCATCC-3' és reverse 5'-CCACACAGCAGAACCAAACATAGC-3', valamint CSE forward: 5'-GCCTTCATAATAGACTTCGTTTC-3' és reverse: 5'-GCAGCCCAGGATAAATAACC-3'. A detektálást iCycler iQ Real Time PCR rendszerrel (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) végeztük.

5.27. *Western blot*

Az NFATc1 és NF κ B nukleáris transzlokáció kimutatásához sejtmag- illetve citoplazma-fehérje extraktumokat, az egyéb fehérje expressziós szintjének meghatározásához teljes sejtlizátumokat 12%-os SDS-PAGE elektroforézissel választottuk el. Az oszteokalcin kimutatásához az extracelluláris matrixot 0.5 mol/L EDTA oldattal (pH 6.9) oldottuk, majd a mintákat 16,5% Tris-Tricin/Peptid-PAGE gélre vittük fel. Az elektroforézist követően nitrocellulóz membránra blottoltuk a mintákat, 5% tejporral vagy 5% BSA-val (bovine serum albumin) szobahőmérsékleten blokkoltuk 1 órán át, majd az 1. táblázat adatai szerint 4°C-on, 16 órán át billegtetve inkubáltuk. Az antigen-antitest komplexeket kemilumineszcenciával tettük láthatóvá (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Detektálást követően a membránokat újra

jelöltük GAPDH-ra, HSP-90-re vagy Lamin B1-re. A kemilumineszcencia kvantálását Image J software-rel végeztük.

Antitest	Gyártó	Hígítás	Antitest	Gyártó	Hígítás
anti-HO-1	Proteintech	1:2000	anti-TRAF6	Proteintech	1:1000
anti-CTR	Proteintech	1:1000	anti-RANK	Santa Cruz	1:250
anti-DC-STAMP	Sigma	1:1000	anti-RANKL	Abcam	1:100
anti-NFATc1	Novus	1:500	anti-NFκB	Cell Signaling	1:500
anti-c-Fos	Cell Signaling	1:1000	anti-CSE	Sigma	1:100
anti-p-38	Cell Signaling	1:1000	anti-Osteocalcin	Santa Cruz	1:200
anti-foszfo-p38	Cell Signaling	1:1000	anti-GAPDH	Proteintech	1:3000
anti-JNK	Cell Signaling	1:1000	anti-HSP90	Cell Signaling	1:1000
anti-foszfo-JNK	Cell Signaling	1:1000	anti-Lamin B1	Proteintech	1:2000

Táblázat: Western blot során alkalmazott antitestek

5.28. *siRNS transzfecció*

HO-1 és CSE-specifikus siRNS-eket, valamint negatív control siRNS-ek (Ambion, Austin, TX, US) transzfeccióját a sejtekbe Oligofectamin Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, US) segítségével végeztük, a gyártó utasításai szerint. A sejteket antibiotikum-mentes DMEM-ben tenyésztettük 6 óráig, majd az siRNS-oligofektamin komplexet szérum-mentes OptiMEM (Gibco, Thermo Scientific) médiumban adtuk a sejtekhez és 16 órán át inkubáltuk. Ezt követően a sejtekhez friss normál növekedési médiumot adtunk, mellyel további 8 óráig inkubáltuk.

5.29. *Statisztika*

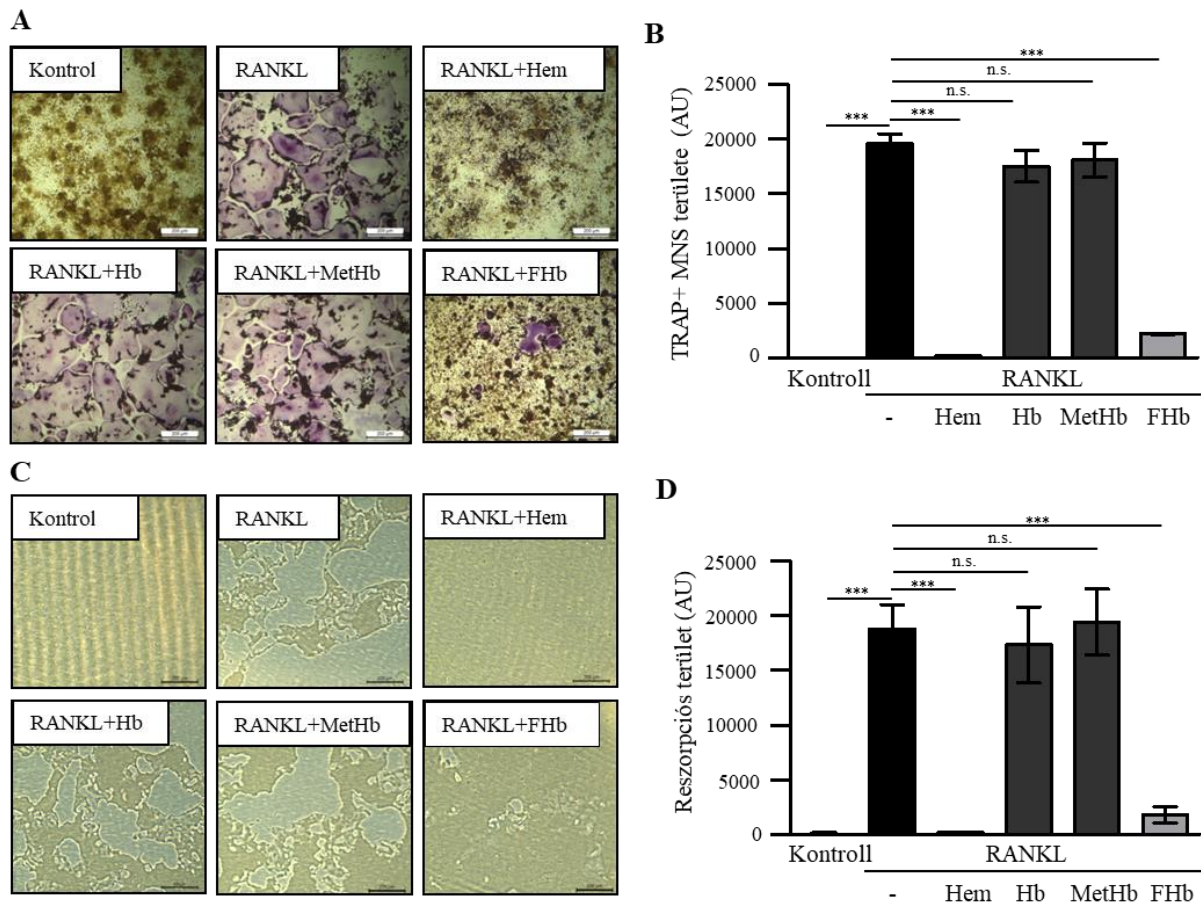
A statisztikai analízist GraphPad Prism 5 szoftverrel végeztük. Az eredményeket átlaga±standard hibaként ábrázoltuk. Az eredmények statisztikai elemzéséhez egyszempontos Anova *posthoc* Bonferroni vagy Newmann-Keuls próbát vagy *t*-tesztet használtunk. A $p < 0.05$ szignifikancia szintet *, a $p < 0.01$ szignifikancia szintet ** és a $p < 0.001$ szignifikancia szintet *** jelöli.

6. EREDMÉNYEK

6.1. A FHb gátolja az oszteoklasztogenezist és az OC-k csontreszorpciós aktivitását

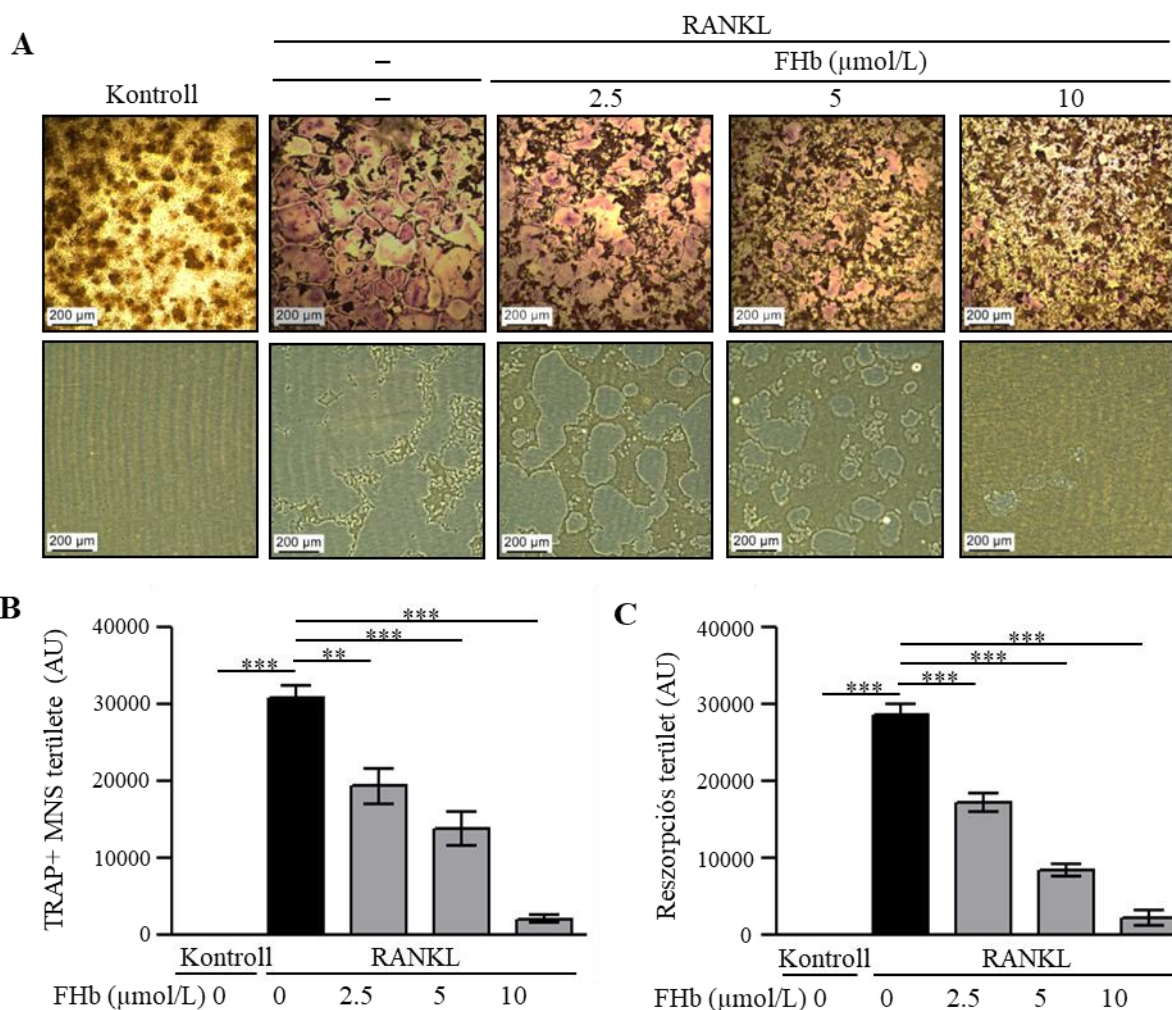
A makrofágok RANKL hatására képesek oszteoklasztokká differenciálódni [73, 116]. Munkánk során azt vizsgáltuk, hogy a különböző hemoglobin-formáknak milyen hatása van a RANKL-indukálta oszteoklasztogenezisre. Ehhez egér makrofág RAW264.7 sejteket tenyésztettünk 50 ng/ml RANKL-tartalmú OC-differenciáló médiumban önmagában, vagy Hb, MetHb vagy FHb jelenlétében.

Elsőként TRAP festéssel vizsgáltuk meg a különböző Hb-formák hatását az oszteoklasztogenezisre (5.A-B ábra). Kísérleteinkben a hemet (50 $\mu\text{mol/L}$), mint RANKL-indukálta oszteoklasztogenezis gátlószert, az oszteoklasztosodás gátlásának pozitív kontrolljaként alkalmaztuk. RANKL-indukálta OC differenciációt szignifikánsan gátolta a hem (50 $\mu\text{mol/L}$) és a FHb (10 $\mu\text{mol/L}$ hem-csoport), ellenben a Hb (10 $\mu\text{mol/L}$ hem-csoport) és a MetHb (10 $\mu\text{mol/L}$ hem-csoport) nem volt képes gátolni az OC képződést. Az oszteoklasztogenezis kvantálásához Image J software segítségével megmértük a TRAP-pozitív sejtek területét, melyen látható a hem és FHb OC-képzést gátló hatása, mely Hb és MetHb esetében elmarad. Ezt követően azt vizsgáltuk, hogy a FHb gátolja-e az OC-k csont-reszorpciós aktivitását (5.C-D ábra). Megfigyeléseink azt mutatják, hogy a FHb és a hem szignifikánsan csökkenti az OC-k csont-reszorpciós képességét, míg a Hb és MetHb esetében ez a hatás nem figyelhető meg.



5. ábra: A FHb gátolja az oszteoklasztogenezist és az oszteoklasztok csontreszorpciós aktivitását *in vitro*. (A) RAW264.7 sejteket tenyésztettünk kontroll növekedési médiumban vagy oszteoklasztogénikus médiumban (50 ng/ml RANKL-dal kiegészített kontroll médium) önmagában, vagy hem (50 $\mu\text{mol/L}$), Hb (10 $\mu\text{mol/L}$ hem-csoport), MetHb (10 $\mu\text{mol/L}$ hem-csoport) vagy FHb (10 $\mu\text{mol/L}$ hem-csoport) jelenlétében 5 napig. Az ábra a tartarát-rezisztens savas foszfatáz (TRAP) festés 3 független kísérletből származó reprezentatív mikroszkópikus képeit (100 $\times$ nagyítás) mutatja. (B) Kezeléscsoportonként 10 mikroszkópikus látómező területén található TRAP-pozitív multinukleáris sejtek területét határoztuk meg, az eredményeket átlag $\pm$ standard hibaként ábrázoltuk. (C) RAW264.7 sejteket hidroxiapatit-bevonatú 96-lyukú tenyésztőedényben kezeltük kontroll médiumban vagy 50 ng/mL RANKL-tartalmú médiumban önmagában vagy hem (50 $\mu\text{mol/L}$), Hb (10 $\mu\text{mol/L}$ hem-csoport), MetHb (10 $\mu\text{mol/L}$ hem-csoport) vagy FHb (10 $\mu\text{mol/L}$ hem-csoport) jelenlétében 6 napig. A reszorbeált területek reprezentatív mikroszkópos képei (100 $\times$ nagyítás) láthatóak. (D) 10 mikroszkópikus látótérből származó reszorbeált részek területét határoztuk meg, a diagram az eredmények átlagát $\pm$ standard hiba mutatja (*saját eredmények*).

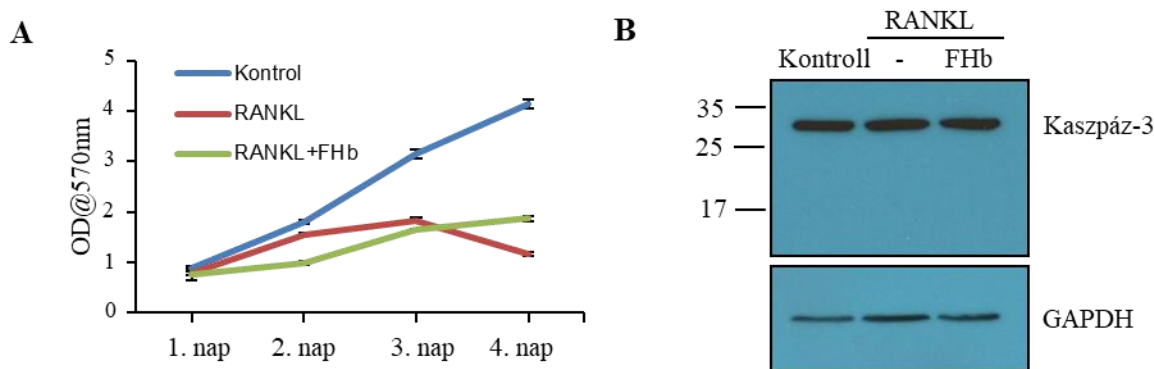
Ezek után megvizsgáltuk, hogy a FHb koncentrációja és oszteoklasztogenezist gátló hatása között van-e összefüggés (6. ábra). TRAP-festéssel megmutattuk, hogy a FHb OC képződést gátló hatása dózis-függő, már 2,5 $\mu\text{mol/L}$ koncentrációban szignifikánsan képes gátolni az OC-k kialakulását, melyet TRAP-festéssel és csontreszorpciós vizsgálattal is kimutattuk.



6. ábra: A FHb dózis-függő módon gátolja az oszteoklasztok kialakulását és csontreszorpció aktivitását. (A) RAW264.7 sejteket tenyésztettünk kontroll növekedési médiumban vagy 50 ng/mL RANKL-tartalmú oszteoklasztogénikus médiumban önmagában vagy növekvő dózisú FHb (2.5, 5, és 10 μmol/L hem-csoport) jelenlétében 5 napig 24 lyukú tenyésztőedényben tartarát-rezisztens savas foszfátáz (TRAP) festéshez (felső panelsor), vagy 96 lyukú hidroxipatit bevonatú tenyésztőedényben csontreszorpció vizsgálatához (alsó panelsor). 3 független kísérlet reprezentatív mikroszkopikus képei (100× nagyítás) láthatóak. 10 mikroszkopikus látótérben található TRAP-pozitív sejtek (B) vagy reszorpció zónák (C) területeit mértük. A diagramok 3 független kísérlet eredményeinek átlagát±standard hiba mutatják (*saját eredmények*).

Megvizsgáltuk, hogy a FHb citotoxikus-hatás miatt képes-e gátolni az OC differenciációt. 4 napig tenyésztettünk RAW264.7 sejteket RANKL-dal önmagában vagy FHb jelenlétében, majd MTT analízissel különböző időpontokban (1-4 napig) vizsgáltuk a sejtproliferációt és viabilitást. Eredményeink azt mutatják, hogy a kontroll kezelt sejtekhez viszonyítva RANKL hatására csökken a RAW264.7 sejtek proliferációja, akárcsak a RANKL+FHb-nal egyidejűleg kezelt sejtek esetében is, viszont a FHb-nak nem volt proliferatív hatása a sejtekre a RANKL-dal

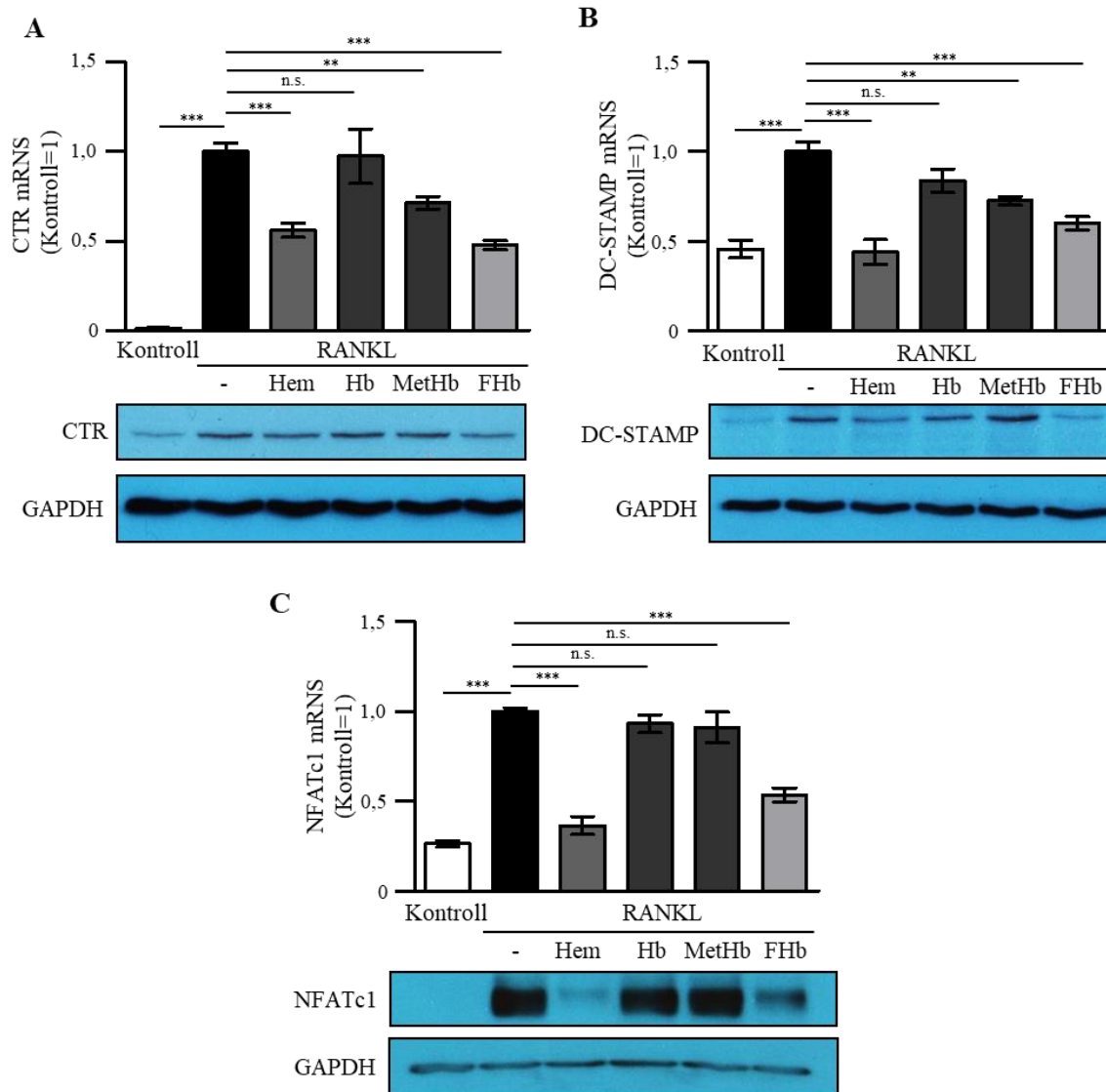
önmagában kezelt sejtekhez viszonyítva (7.A ábra). Ezt követően megnéztük, hogy a csökkent proliferáció összefüggésbe hozható-e apoptotikus sejthalál jelenségével. Immunoblot segítségével hasított kaszpáz-3 fehérjét vizsgáltunk, mely hatékonyan jelzi az apoptotikus sejthalált. Bizonyítottuk, hogy az oszteoklasztogenezis során nem okoz sejthalált a RANKL kezelés FHb-nal kiegészülve (7.B ábra).



7. ábra: A FHb nem okoz sejtproliferációt és apoptotikus sejthalált. RAW264.7 sejteket 4 napig tenyésztettünk kontroll médiumban vagy oszteoklasztogénikus médiumban (50 ng/mL RANKL-dal kiegészített kontroll médium) önmagában vagy FHb (10 μ mol/L hem-csoport) jelenlétében. (A) A sejtproliferációt és viabilitást MTT-analízis segítségével mértük a különböző időpontokban (1.-4. nap). (B) Immunoblottal vizsgáltuk a hasított Kaszpáz-3 mennyiségét (*saját eredmények*).

6.2. A FHb csökkenti a RANKL-indukálta OC-specifikus gének expresszióját

A makrofágok OC-irányú differenciációjának feltétele a fehérje-expressziós mintázat változása [117], ezért megvizsgáltuk, hogy a különböző Hb formáknak milyen hatása van az OC-specifikus fehérjék (CTR, DC-STAMP és NFATc1) expressziójára mind RNS, mind fehérje szinten. A RANKL szignifikánsan indukálta a CTR (8.A ábra) és a DC-STAMP (8.B ábra) expresszióját a RAW264.7 sejtekben, melyet a FHb és a hem jelentősen, míg a MetHb kisebb mértékben csökkentette. A Hb nem volt képes gátolni a RANKL hatására megemelkedett CTR és DC-STAMP expresszióját. A RANKL-indukálta NFATc1 szint emelkedését csökkentette a FHb és a hem, míg a Hb és MetHb nem volt képes gátolni a fehérje megemelkedett expresszióját (8.C ábra).

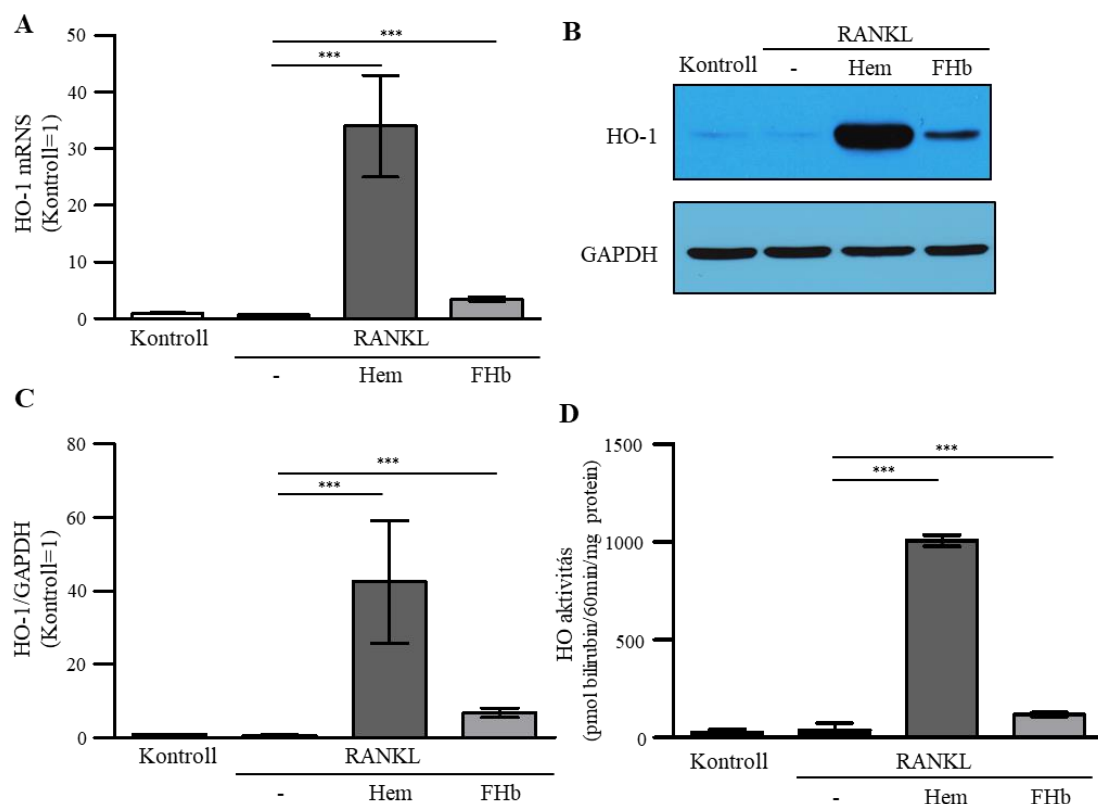


8. ábra: A FHb csökkenti a RANKL-hatására megemelkedett OC-specifikus gének expresszióját. RAW264.7 sejteket tenyésztettünk kontroll növekedési médiumban vagy oszteoklasztogénikus médiumban (50 ng/ml RANKL-dal kiegészített kontroll médium) önmagában, vagy hem (50 μ mol/L), Hb (10 μ mol/L hem-csoport), MetHb (10 μ mol/L hem-csoport) vagy FHb (10 μ mol/L hem-csoport) jelenlétében. CTR (A), DC-STAMP (B) és NFATc1 (C) gén-expressziót vizsgáltunk qRT-PCR és immunoblot segítségével CTR esetében 5 napig, DC-STAMP esetében 4 napig, NFATc1 esetében 3 napig tartó kezelést követően. A qRT-PCR eredményeket β -aktinra, míg az immunoblottokat GAPDH-ra normalizáltuk. A diagramok 3 független kísérlet eredményeinek az átlagát $\pm$ standard hiba mutatják. (A CTR és DC-STAMP immunoblottok társszerző eredményei.)

6.3. A FHb oszteoklasztogenezist gátló hatása nem HO-1 mediálta folyamat.

Kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy a FHb HO-1-et indukál endotél sejtekben [87], továbbá ismeretes, hogy *in vitro* a hem, a HO-1 indukcióján keresztül, gátolja az oszteoklasztogenezist [79]. Ezért megvizsgáltuk, hogy a FHb OC-képződést gátló hatása

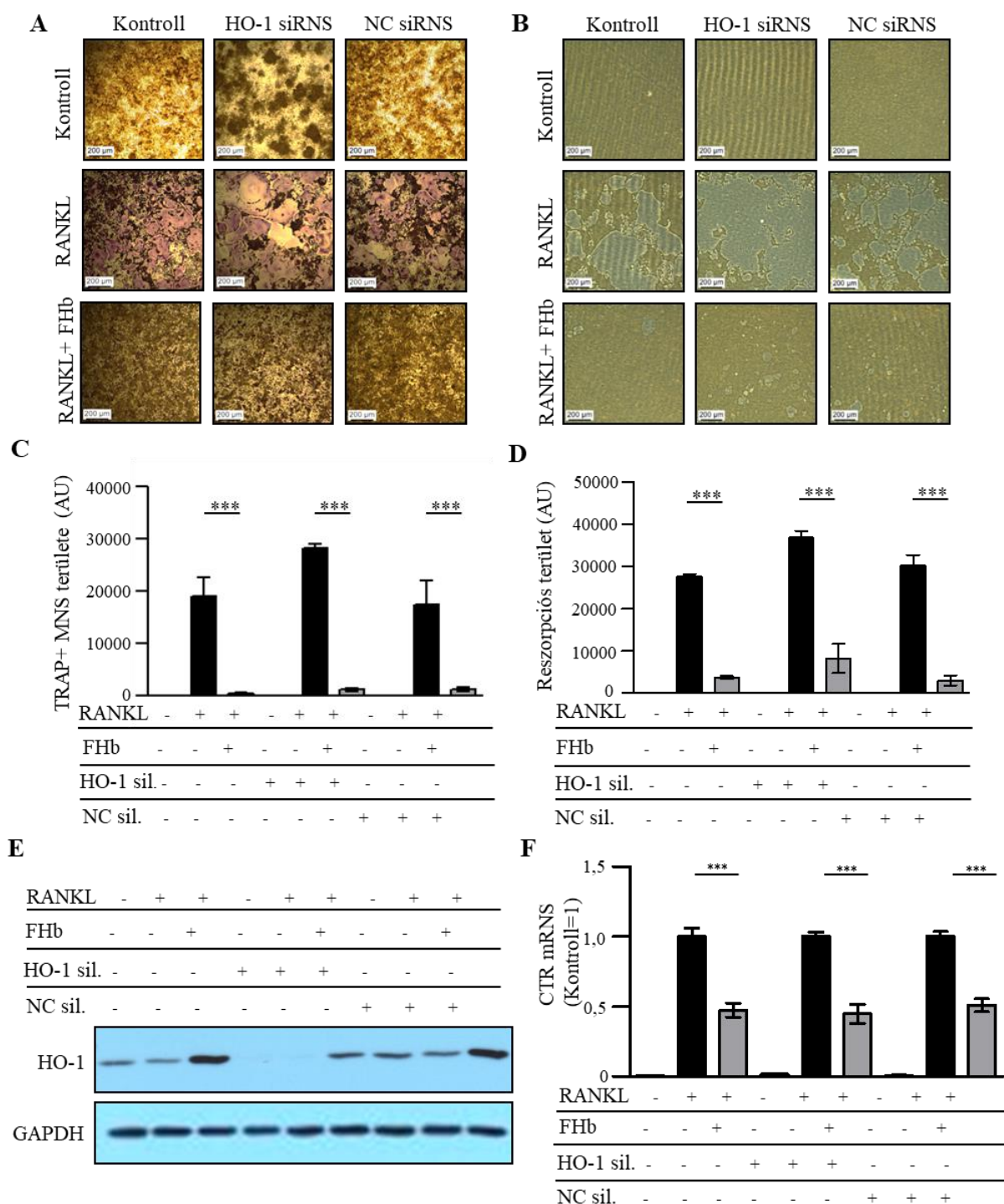
összefüggésben van-e a HO-1-indukáló hatásával. Ahogy a 9. ábrán látható, a FHb, hasonlóan a hemhez, HO-1 expressziót indukál RAW264.7 sejtekben, amely RNS, fehérje, valamint a HO enzim aktivitás fokozódásán is kimutatható.



9. ábra: A FHb fokozza a HO-1 expresszióját RAW264.7 sejtekben. RAW264.7 sejteket tenyésztettünk kontroll növekedési médiumban vagy oszteoklasztogénikus médiumban (50 ng/ml RANKL-dal kiegészített kontroll médium) önmagában, vagy hem (50 μ mol/L) vagy FHb (10 μ mol/L hem-csoport) jelenlétében 5 napig. (A) qRT-PCR segítségével β -aktinra normalizált HO-1 mRNS szinteket határoztunk meg. Az eredmények 3 független kísérlet átlagát $\pm$ standard hiba mutatják. (B-C) HO-1 fehérje expressziót Western blottal határoztuk meg, a denzitometrálassal kapott sáv-intenzitás értékeket GAPDH-ra normalizáltuk. Az ábrán 3 független kísérlet reprezentatív képe látható. (D) HO enzim aktivitást mértünk, a diagram 3 független kísérlet eredményeinek átlagát $\pm$ standard hiba ábrázolja (*saját eredmények*).

Ezt követően HO-1-specifikus siRNS-sel csendesítettük a HO-1 expresszióját és azt vizsgáltuk, hogy a HO-1 csendesítése hatással van-e a RANKL-indukálta oszteoklasztogenezisre FHb jelenlétében. Kimutattuk, hogy a FHb HO-1-csendesített sejtekben is gátolja az OC-k kialakulását, melyet TRAP-festéssel (10.A,C ábra) és csontreszorpciós analízissel (10.B,D ábra) is bizonyítottunk. A HO-1 gén csendesítésének hatékonyságát immunoblottal követtük nyomon (10.E ábra). Megfigyelésünk további megerősítéseként, mRNS szinten vizsgáltuk a HO-1-

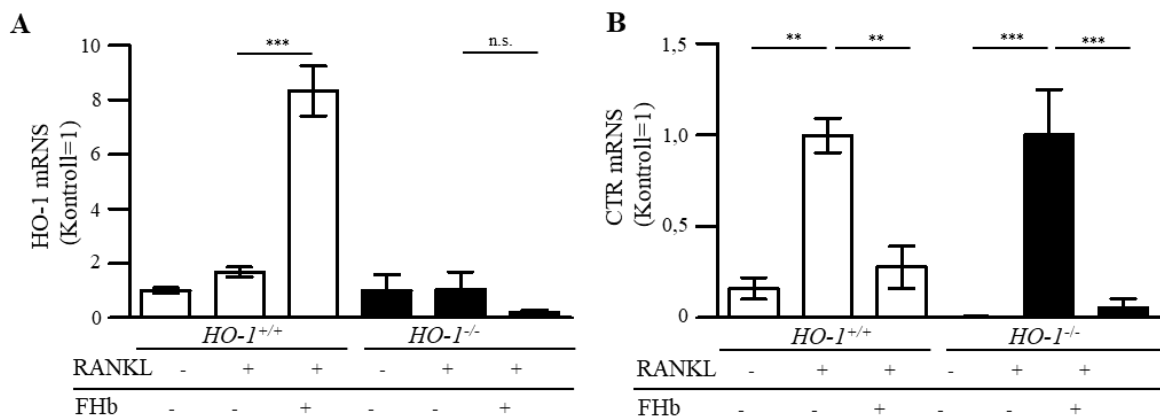
csendesített sejtekben a CTR expressziójának változását RANKL kezelés hatására. Kimutattuk, hogy a FHb a HO-1 expresszió mértékétől függetlenül csökkenti a RANKL-mediálta CTR mRNS indukcióját (10.F ábra).



10. ábra: A FHb gátolja a HO-1 gén-csendesített RAW264.7 sejtek oszteoklasztogenezisét. RAW264.7 sejteket transzfektáltunk HO-1 vagy Negatív Kontroll (NK) siRNS-sel, ezt követően kontroll növekedési médiumban vagy oszteoklasztogénikus médiumban (50 ng/mL RANKL-dal kiegészített kontroll médium) tenyésztettük önmagában vagy FHb (10 μ mol/L hem-csoport) jelenlétében. TRAP-festéssel (A) vagy csontreszorpció analízissel (B) vizsgáltuk az OC-

képződést a vad típusú, HO-1 csendesített és NK siRNS-sel transzfektált sejteken. A TRAP-pozitív sejtek (C) és reszorbeált zónák (D) területét határoztuk meg 10 mikroszkópos látómezőben. Az eredmények 3 független kísérlet átlagát±standard hiba mutatják. (E) HO-1 fehérje expressziót immunoblottal vizsgáltuk, és GAPDH-ra normalizáltuk. 3 független kísérlet reprezentatív ábrája látható. (F) CTR mRNS szinteket qRT-PCR segítségével mértük és β-aktinra normalizáltuk. Az eredmények 3 független kísérlet átlagát±standard hiba (saját eredmények).

Fenti eredményeinket vad típusú ($HO-1^{+/+}$) és HO-1 knock out ($HO-1^{-/-}$) egerekből származó BMDM sejteken is megerősítettük. Kimutattuk, hogy a FHb szignifikánsan indukálja a HO-1 mRNS expresszióját a $HO-1^{+/+}$ BMDM sejtekben; míg a $HO-1^{-/-}$ egerekből származó BMDM sejtekben nem emelkedett meg a HO-1 mRNS szintje FHb hatására (11.A ábra), ugyanakkor a FHb gátolta a RANKL-indukálta CTR expresszióját mind a $HO-1^{+/+}$ mind pedig a $HO-1^{-/-}$ BMDM sejtek esetében (11.B ábra). Eredményeink azt mutatják, hogy a FHb oszteoklasztogenezist gátló hatása, a hemtől eltérően, a HO-1 expressziójától független mechanizmussal valósul meg.

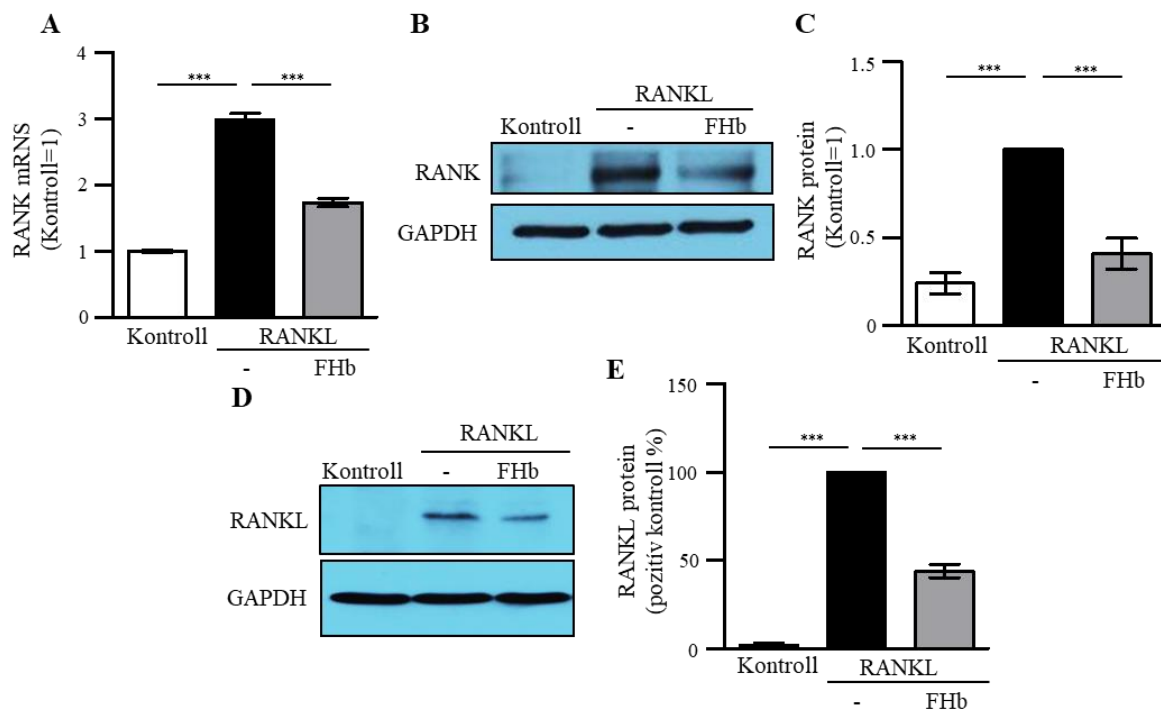


11. ábra: A FHb gátolja a $HO-1^{-/-}$ BMDM sejtek oszteoklaszt-irányú differenciációját. (A) Csontvelő-eredetű makrofágokat (BMDM) izoláltunk vad típusú ($HO-1^{+/+}$) és HO-1 knock out ($HO-1^{-/-}$) egerekből. A sejteket 5 napig tenyésztettük 50 ng/mL M-CSF tartalmú tápfolyadékban vagy oszteoklasztogénikus médiumban (50 ng/mL M-CSF+100 ng/mL RANKL) önmagában vagy 10 μmol/L FHb (hem-csoportra nézve) jelenlétében. A HO-1 (A) és CTR (B) mRNS szinteket qRT-PCR-rel mértük, és β-aktinra normalizáltuk. A diagramokon látható eredmények 3 független kísérlet átlagát±standard hiba (társszerző eredményei).

6.4. A FHb gátolja a RANK-RANKL interakciót

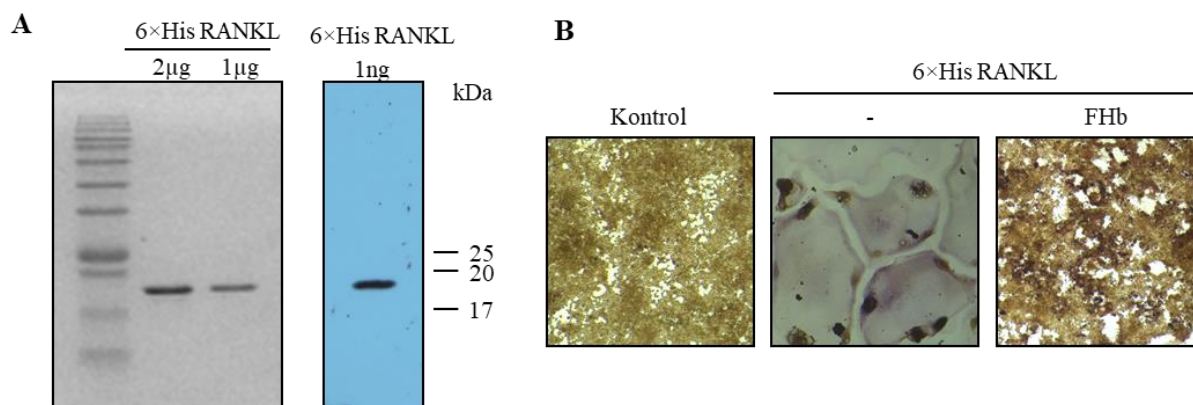
Az OC-k kialakulásának feltétele a RANKL kötődése a RANK receptorhoz [118], a RANKL pedig közvetlenül indukálja a RANK expresszióját [119]. Ahhoz, hogy feltárjuk milyen molekuláris mechanizmus mentén gátolja a FHb az OC kialakulását, megvizsgáltuk, hogy a FHb

befolyásolja-e a RANKL-indukálta RANK expressziót. Kimutattuk, hogy a FHb szignifikánsan csökkenti a RANKL hatására bekövetkezett RANK expressziót mind mRNS, mind fehérje szinten (12.A-C ábra). Immunoblottal vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a FHb csökkenti a sejt-asszociált RANKL mennyiségét. Eredményeink azt bizonyítják, hogy az exogén RANKL sejt-asszociációja jelentősen lecsökken amennyiben az oszteoklasztogenikus médium FHb-t is tartalmazott (12.D-E ábra).



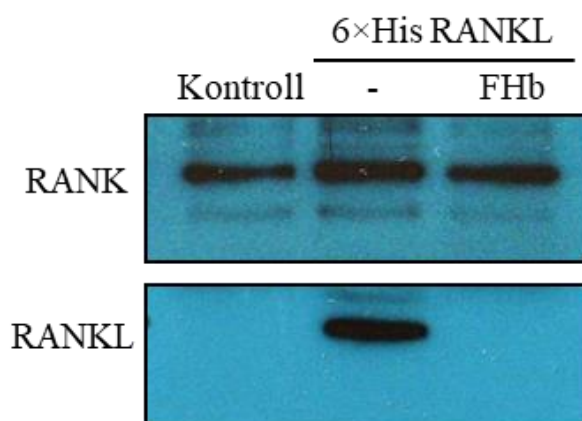
12. ábra: A FHb gátolja a RANK-RANKL interakciót. RAW264.7 sejteket 3 vagy 5 napig tenyésztettünk kontroll növekedési médiumban vagy oszteoklasztogenikus médiumban (50 ng/ml RANKL-dal kiegészített kontroll médium) önmagában, vagy FHb (10 μ mol/L hem-csoport) jelenlétében. (A) RANK mRNS szinteket mértünk 3 napig tartó kezelést követően qRT-PCR-ral, az eredményeket β -aktinra normalizáltuk. A diagramon 3 független kísérlet átlaga $\pm$ standard hiba látható. (B) RANK fehérje expresszióját immunoblottal vizsgáltuk 3 napos kezelést követően. 4 független kísérlet reprezentatív ábrája látható. (C) GAPDH-ra normalizált RANK immunoblottok denzitometriás analízise látható, mely 4 független kísérlet átlga $\pm$ standard hiba. (D) Sejt-asszociált RANKL mennyiségét vizsgáltuk 5 napig tartó kezelést követően RANKL-specifikus immunoblot segítségével, és GAPDH-ra normalizáltuk. (E) A RANKL immunoblottok denzitometriás analízise látható, mely 3 független kísérlet átlaga $\pm$ standard hiba (saját eredmények).

Fenti eredményeink megerősítése céljából laboratóriumunkban N-terminális 6 $\times$ His taggel ellátott egér RANKL-ot állítottunk elő (13.A ábra), mely hatékonyan indukálja a RAW264.7 sejtek OC-irányú differenciációját (13.B ábra).



13. ábra: A Rekombináns 6×His RANKL indukálja az OC differenciációt. *E. coli* Rosetta 2 baktériumban expresszáltattunk rekombináns 6×His RANKL-ot. (A) Az expresszáltatott és tisztított fehérje tisztaságát Coomassie-festéssel (bal panel) és immunoblottal (jobb panel) ellenőriztük. (B) RAW264.7 sejteket 5 napig tenyésztettünk kontroll növekedési médiumban vagy oszteogénikus médiumban (6×His RANKL-dal kiegészített kontroll médium) önmagában vagy FHb (10µmol/L hem csoport) jelenlétében. TRAP-festéssel igazoltuk a rekombináns 6×His RANKL biológiai aktivitását (*társszerző eredményei*).

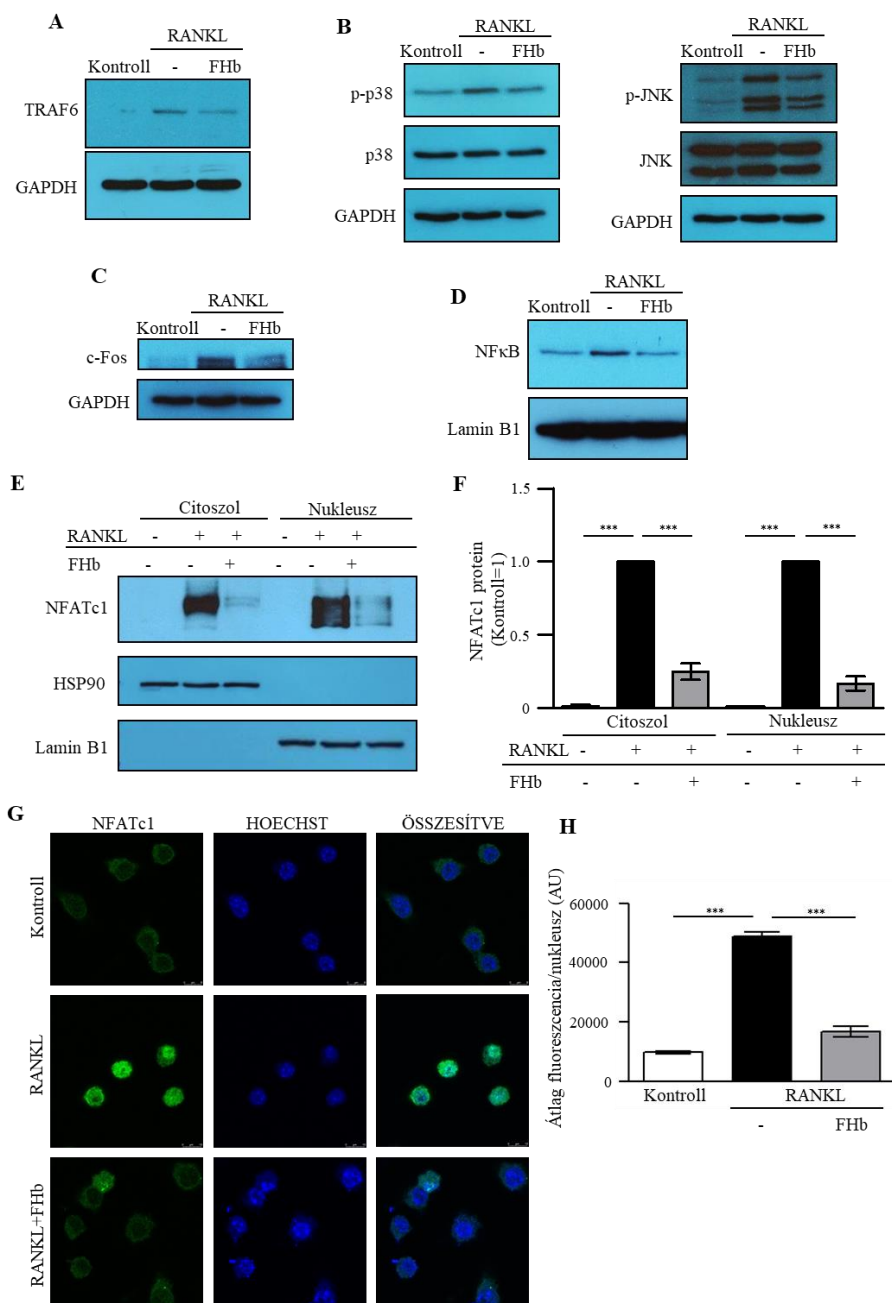
Kémcső kísérletünk során RAW264.7 sejtekből immunoprecipitációval RANK fehérjét tisztítottunk, melyet RANKL-6×His (1µg) jelenlétében önmagában vagy FHb hozzáadásával inkubáltuk, majd immunoblottal vizsgáltuk a rekombináns RANKL asszociációját a RANK fehérjéhez. Vizsgálataink megerősítették azt az *in vitro* megfigyelésünket, hogy a FHb gátolja a RANK-RANKL interakciót (14. ábra). Eredményeink azt bizonyítják, hogy a FHb a közvetlen RANK-RANKL kapcsolat gátlásával csökkenti a RANK expresszióját és gátolja a RAW264.7 sejtek oszteoklasztos differenciációját.



14. ábra: A FHb gátolja a közvetlen RANK-RANKL interakciót. RAW264.7 sejtlyúzátumból RANK fehérjét immunprecipitáltunk, majd 60 percig ko-inkubáltuk 6×His RANKL-dal (1µg) FHb (10µmol/L) jelenlétében vagy anélkül. A RANK-RANKL interakciót immunoblottal vizsgáltuk. Az ábra 3 független kísérletből származó reprezentatív immunoblot (*társszerző eredménye*).

6.5. *A FHb gátolja a RANKL-indukálta OC-differenciáció szignalizációját*

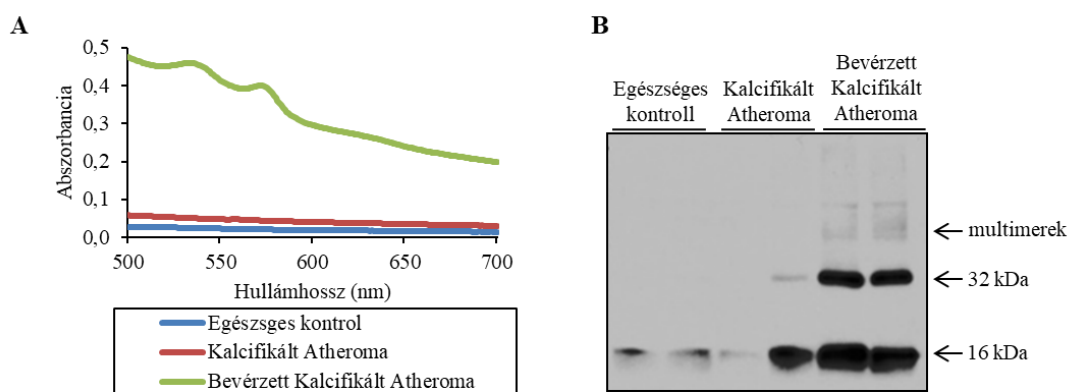
A RANK-RANKL interakció számos jelátviteli útvonalat indít be, mely a makrofágok OC-irányú differenciációjához vezet [120]. Többek között ilyen a TRAF6, amely különböző downstream szignalizációs útvoanalakat aktivál, úgymint NF κ B, JNK, p38, c-Fos és NFATc1, melyek kulcsszerepet játszanak az oszteoklasztogenezis folyamatában. Munkánk során kimutattuk, hogy a RANKL indukálja a TRAF6 expresszióját (15.A ábra), a p38 és JNK aktivációját (15.B ábra), a c-Fos expresszióját (15.C ábra), valamint az NF κ B és NFATc1 nukleáris transzlokációját (15.D-H ábra). FHb-kezelés hatására ugyanakkor csökkent a TRAF6 és c-Fos indukciója, a p38 és JNK foszforilációja, valamint az NF κ B és NFATc1 nukleáris transzlokációja. Eredményeink megerősítik azt a hipotézisünket, hogy a FHb gátolja a RANK-RANKL interakcióját, ezáltal pedig a RANK downstream szignalizációját.



15. ábra: A FHb gátolja az OC differenciációban szerepet játszó szignálútvonlatokat. RAW264.7 sejteket tenyésztettünk 24 lyukú tenyésztőedényben (immunfluoreszcens festéshez) vagy 6 lyukú tenyésztőedényben (immunoblot vizsgálathoz) kontroll médiumban vagy oszteoklasztogénikus médiumban FHb (10 μ mol/L hem csoport) jelenlétében vagy anélkül. (A) TRAF-6 expressziót vizsgáltunk immunoblottal 2 nap elteltével. (B) p38 és JNK foszforilációt 40 perc kezelést követően vizsgáltunk, melyeket p38-ra, JNK-ra és GAPDH-ra normalizáltunk. (C) c-Fos aktivációt 40 perc kezelést követően vizsgáltunk, és normalizáltuk GAPDH-ra. (D) Az NFκB nukleáris transzlokációt magextraktumból 40 perc kezelést követően vizsgáltuk, és az immunoblotot Lamin B1-re normalizáltuk. (E,F) Az NFATc1 expresszióját és nukleáris transzlokációját immunoblottal vizsgáltuk, és HSP90-re (citoszol protein) illetve Lamin B1-re (magprotein) normalizáltuk. (G,H) Az NFATc1 expresszióját és nukleáris transzlokációját immunfluoreszcens festéssel 24 óra kezelést követően vizsgáltuk. Az eredmények három egymástól független kísérlet átlagaként $\pm$ standard hiba ábrázoltuk (társszerzővel közösen elért eredmények).

6.6. A bevérzést tartalmazó kalcifikált léziókban Hb oxidációs folyamatok zajlanak

Korábbi tanulmányainkban kimutattuk, hogy a bevérzett komplikált ateroszklerotikus plakkokban oxidált hemoglobin-formák vannak jelen [85], melyet jelen vizsgálatainkkal is alátámasztottunk. Spektrofotometriás elemzéssel kimutattuk, hogy a bevérzett komplikált léziókat tartalmazó érmintákban oxidált Hb található, míg az egészséges érmintákban vagy bevérzés nélküli kalcifikált léziókban nem mutatható ki oxidált Hb (16.A ábra). Az egészséges kontroll érmintákhoz vagy kalcifikált ateroszklerotikus plakkokhoz viszonyítva, a bevérzett komplikált plakkokban jelentős mértékben van jelen keresztkötött Hb dimer, tetramer és multimer, amely alátámasztja, hogy a bevérzett plakkokban nagymértékű Hb oxidációs folyamatok zajlanak (16.B ábra).

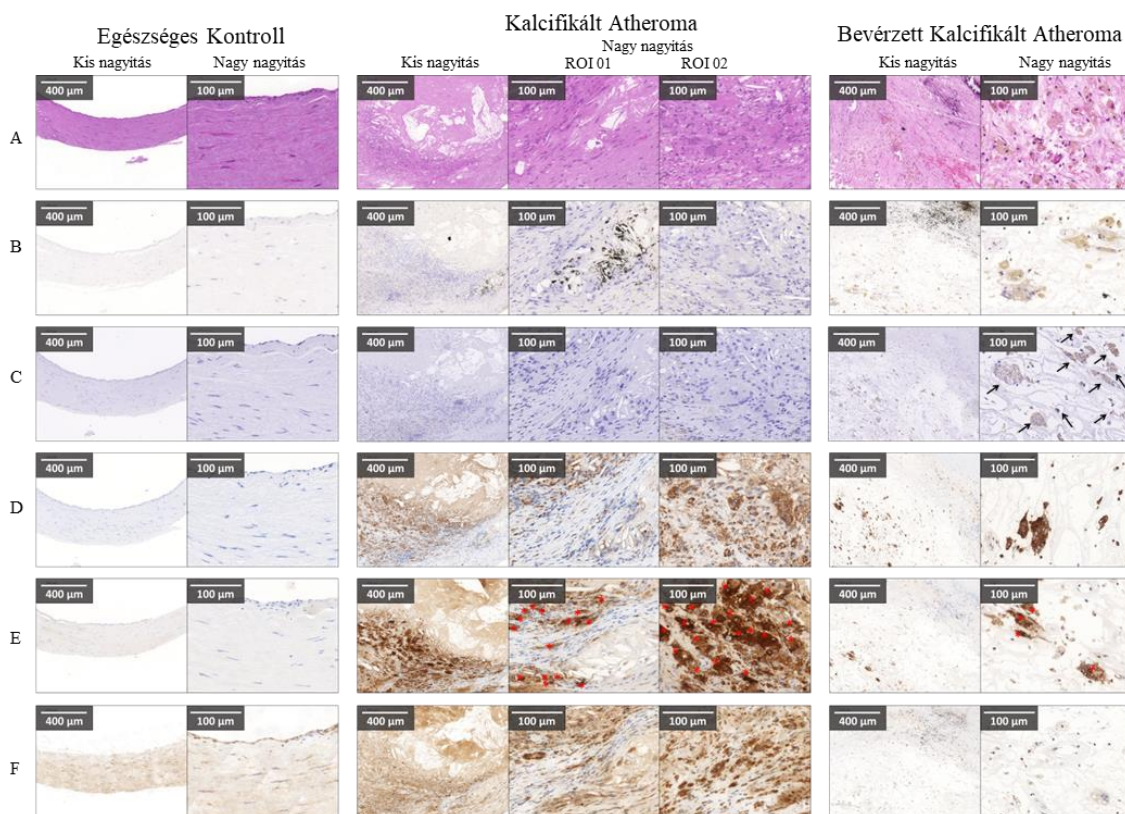


16. ábra: A bevérzett kalcifikált arteriákban FHb található. (A) Egészséges Arteria carotisból, kalcifikált aterómából és bevérzett kalcifikált aterómából származó human szövetminták reprezentatív spektrum analízise látható. Az oxidált Hb spektrofotometriás meghatározását 500nm és 700nm hullámhossz között végeztük. (B) A reprezentatív immunoblot a Hb oxidációját mutatja két egészséges artéria, 2 kalcifikált aterómát és 2 bevérzett kalcifikált aterómát tartalmazó human érmintában (20 µg/sáv) (társszerző eredményei).

6.7. A FHb jelenléte összefüggésben van az OLC sejtek hiányával a bevérzett kalcifikált léziókban

Ezt követően azt vizsgáltuk, hogy a FHb jelenléte befolyásolja-e az OLC sejtek kialakulását bevérzett kalcifikált plakkokban az egészséges carotis mintákhoz és kalcifikált aterómákhoz képest (17. ábra). A Ca depozitumok jelenlétét Von Kossa festéssel vizsgáltuk, amely kiterjedt extracelluláris kalcium felhalmozódást mutatott ki a kalcifikált plakkokban és a bevérzett kalcifikált plakkokban (B sor). A bevérzett kalcifikált plakkokban jelentős mennyiségű FHb

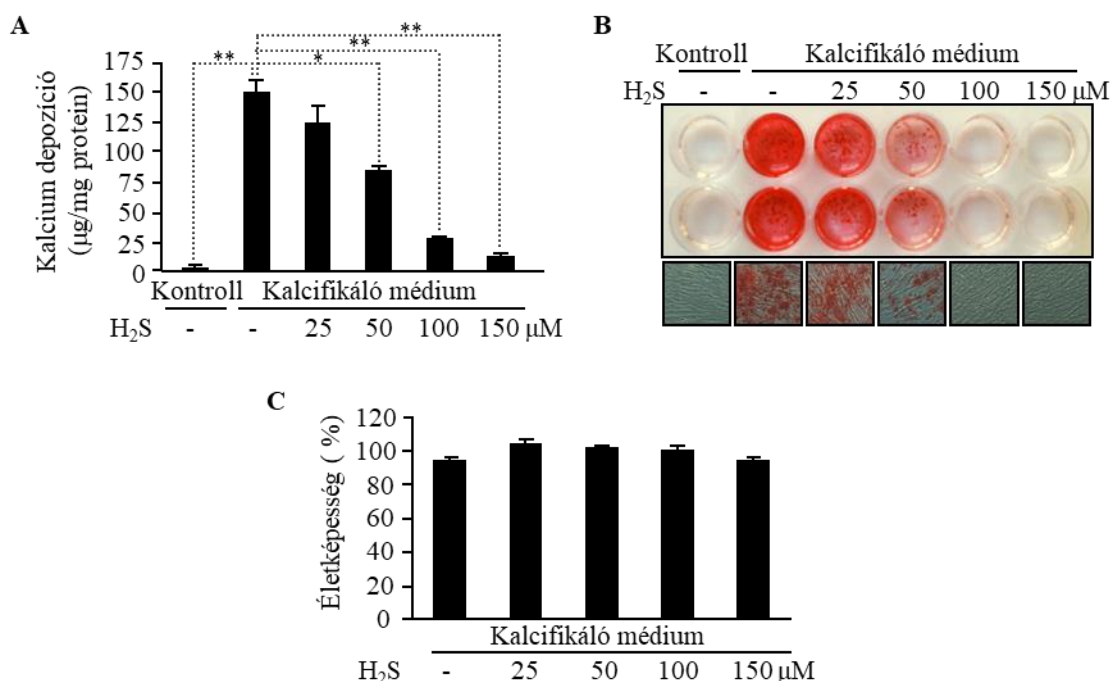
mutatható ki, míg az egészséges és kalcifikált plakkok esetében nem figyelhető meg pozitív festődés (C sor). A kalcifikált plakkokban kimutatható nagyszámú CD68-pozitív multinukleáris óriássejtek száma a bevérzett kalcifikált plakkokban jelentősen lecsökkent, illetve ezen sejtek az egészséges carotis mintákban egyáltalán nem figyelhetőek meg (D sor). A sokmagvú, OC karakterű óriássejtek jelenlétét TRAP festéssel (E sor) és CatK festéssel (F sor) mutattuk ki. A kalcifikált plakkokban, a kalcifikált területek környezetében számos TRAP- és CatK-pozitív OLC sejtet azonosítottunk, mely alátámasztja az OLC sejtek jelenlétét kalcifikált erekben. Ezzel ellentétében, a bevérzett kalcifikált plakkok esetében az OLC sejtek száma elenyésző, a kiterjedt plakk-kalcifikáció ellenére is. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az OLC sejtek jelenléte a bevérzett kalcifikált aterómákban szignifikánsan kevesebb a bevérzés nélküli kalcifikált plakkokhoz viszonyítva, a bevérzett kalcifikált plakkokban pedig jelentős mennyiségű Fhb van jelen.



17. ábra: A Fhb-t tartalmazó plakkokban lecsökken az OLC sejtek száma. Egészséges carotis artériák (balra), kalcifikált plakkok (középen) és bevérzett kalcifikált léziók (jobbra) hisztológiai mintázat analízise látható. A szövetek alapvető hisztológiai felépítésének és sejtjes elemeinek vizsgálatához H&E festést alkalmaztunk, mellyel extravaszkuláris vörösvértestek láthatóak a bevérzett kalcifikált aterómában (A sor). A kalcium depozíciót Von Kossa-festéssel igazoltuk (B sor). A Fhb jelenlétét immunhisztokémiai módszerrel mutattuk ki (C sor). CD68 pozitív multinukleáris óriássejteket (D sor) OLC sejteknek minősítettük OC-specifikus markerek: TRAP (E sor) és Katepszin K (F sor) immunhisztokémiai festődése alapján (társszerző eredménye).

6.8. A H₂S dózis-függően csökkenti a HAoSMC sejtek mineralizációját

A vaszkuláris kalcifikáció vizsgálatához egy olyan *in vitro* modellt hoztunk létre, melyben a HAoSMC-eket 7 napon át kalcifikáló médiumban (normál növekedési médium 3 mM Pi-vel kiegészítve) tenyésztettünk önmagában vagy H₂S jelenlétében. Pi hatására az extracelluláris Ca depozíció fokozódott, melyet a H₂S koncentráció-függő módon gátolt (18.A ábra). Szignifikáns gátlást 50 μ mol/L NaHS koncentrációnál tapasztaltunk. A H₂S kalcifikációt gátló hatásnak további megerősítéséhez Alizarin Red festést is végeztünk (18.B ábra). A kalcifikáló médiumban tenyésztett sejtek esetében vörösen festődő kalcium depozitumokat figyelhettünk meg, míg H₂S hatására az extracelluláris kalcium felhalmozódás lecsökkent. A H₂S kezelés a sejtek életképességét nem befolyásolta (18.C ábra).

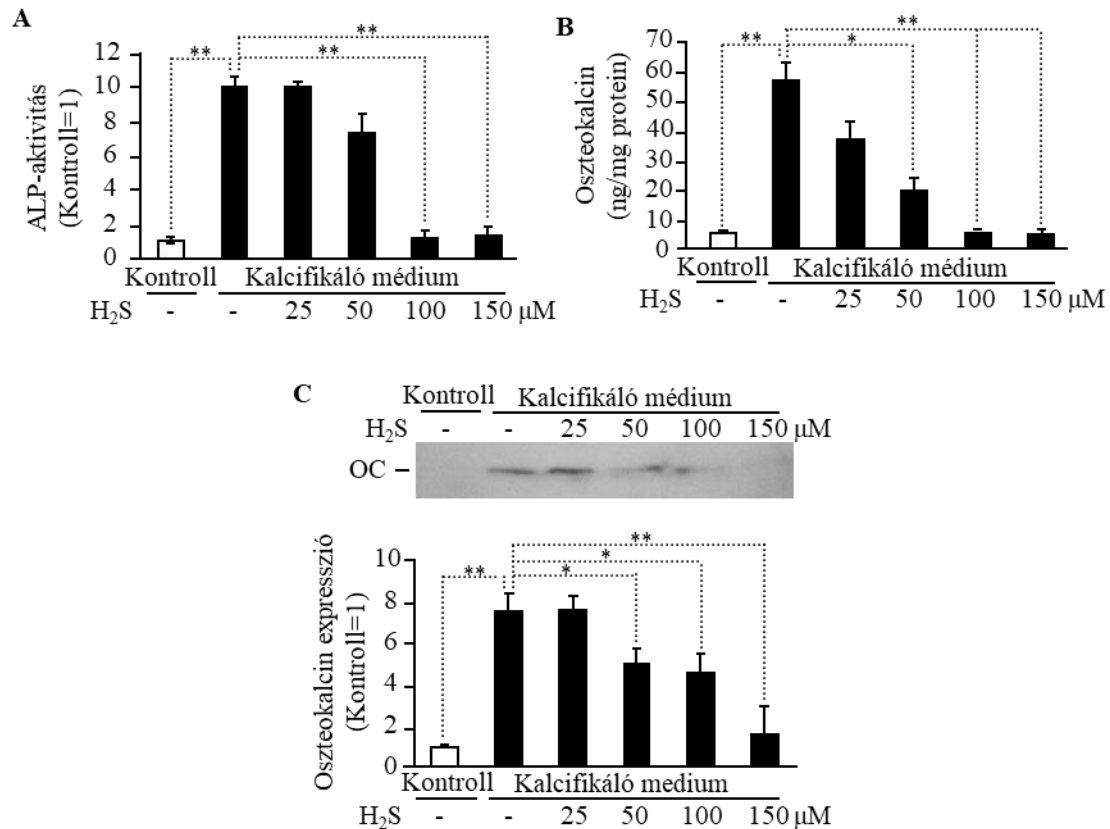


18. ábra: A H₂S dózis-függő módon gátolja a HAoSMC sejtek mineralizációját. HAoSMC sejteket 7 napig tenyésztettünk kontroll növekedési tenyésztőközegben vagy kalcifikáló médiumban önmagában, vagy 25, 50, 100 és 150 μ mol/L H₂S jelenlétében. (A) A kalcium tartalom mérés 3 független kísérlet átlagát $\pm$ szórást mutatja. (B) Alizarin Red festés reprezentatív ábrái (felső panel) és mikroszkópos képei ($\times 100$, alsó panel) láthatóak 3 független kísérletből. (C) Az MTT-analízis 2 független triplikátumban végzett kísérlet átlagát $\pm$ szórás mutatja (*saját eredmények*).

6.9. A H₂S gátolja a HAoSMC sejtek oszteoblasztos differenciációját

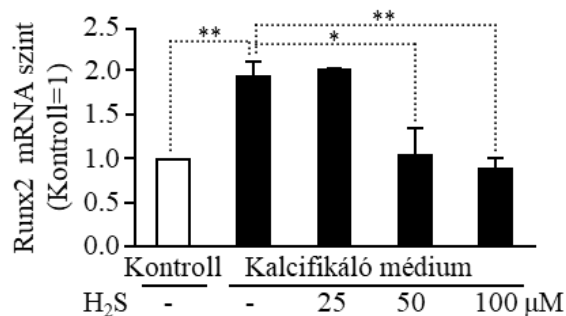
Az már ismeretes, hogy a vaszkuláris kalcifikáció *in vivo* nagymértékben hasonlít a csont mineralizációra, ezért megvizsgáltuk, hogy a H₂S gátolja-e a HAoSMC-k oszteoblaszt-szerű sejtekké történő tranzícióját. Vizsgálataink során elsőként a vaszkuláris kalcifikáció

patogenezisében kulcsszerepet játszó ALP (az oszteogenezis egyik fontos enzime) és OCN (a csontmátrixban nagy mennyiségben előforduló fehérje) expresszióját vizsgáltuk HAoSMC-ken H₂S jelenlétében. A sejteket kalcifikáló médiumban tenyésztve ~10-szeres ALP-aktivitás emelkedést tapasztaltunk a kontroll tenyészetekhez képest, melyet a H₂S dózis-függően gátolt (19.A ábra). Az ALP aktivitáshoz hasonlóan, Pi hatására jelentős mértékű OCN szekréciót mutattunk ki, melyet a H₂S dózis-függően gátolt (19.B, C ábra).



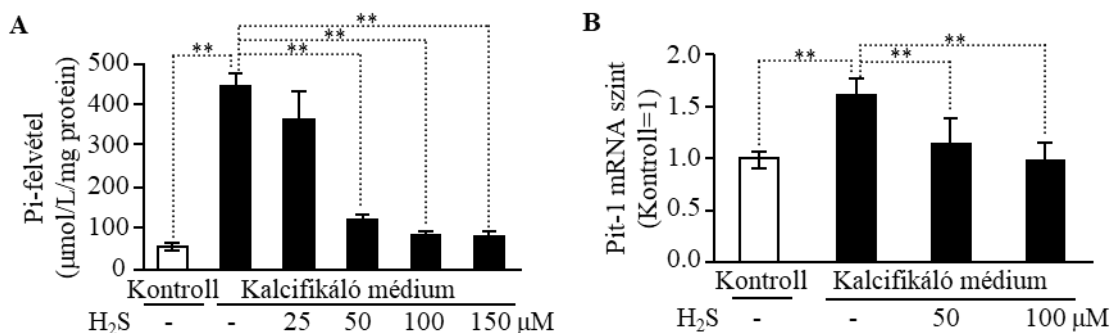
19. ábra: A H₂S gátolja a Pi-mediálta oszteoblaszt-specifikus fehérjék expresszióját HAoSMC sejtekben. HAoSMC sejteket 7 napig tenyésztettünk kontroll tápfolyadékban vagy kalcifikáló médiumban önmagában vagy emelkedő dózisu H₂S jelenlétében, majd teljes sejtlizátumból ALP-aktivitást (A), az extracelluláris matrix EDTA szolubilizátumából az OCN mennyiségét határoztuk meg ELISA (B) vagy Western blot (C) segítségével. A diagramokon látható eredmények 3 független kísérlet átlaga±szórás (saját eredmények).

Ezt követően a kalcifikáció mester regulátorának, a Runx2 transzkripciós faktornak az expresszióját vizsgáltuk *in vitro* modellünkben. Kimutattuk, hogy a Pi növelte a Runx2 mRNS szintjét a kontroll médiumban tenyésztett sejtekhez képest, melyet a H₂S már 50 μmol/l koncentrációban szignifikánsan gátolt (20. ábra).



20. ábra: A H₂S gátolja a Pi-mediálta Runx2 mRNS indukcióját HAoSMC sejtekben. HAoSMC sejteket tenyésztettünk kontroll tápfolyadékban vagy 3 mmol/L Pi-tartalmú kalcifikáló médiumban önmagában vagy H₂S jelenlétében (25, 50 és 100 µmol/L) 24 óráig. Runx2 mRNS szinteket mértünk qRT-PCR-al. A diagramot 3 független triplikátumban végzett kísérlet átlagaként±szórás ábrázoltuk (saját eredmények).

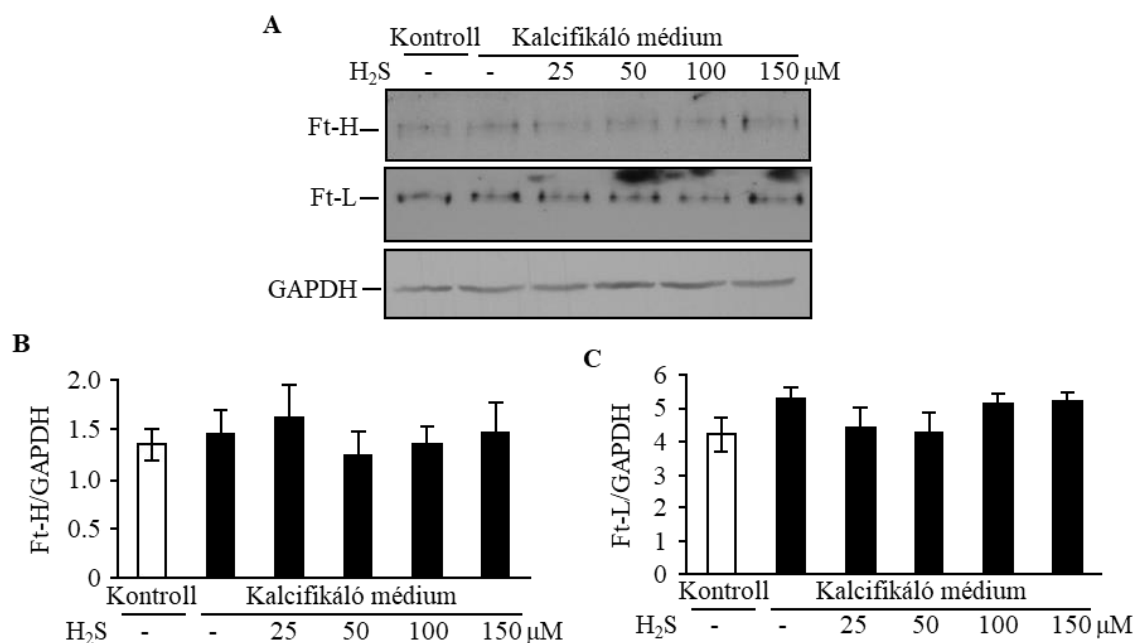
A Pi-indukált kalcifikációban fontos szerepet játszik a Pit-1nátrium-foszfát kotranszporterén keresztül történő Pi felvétel (21.A ábra). Kimutattuk, hogy a H₂S koncentráció-függő módon gátolja a sejtek Pi felvételét. Ezt követően vizsgáltuk a Pi felvételben kulcsszerepet játszó Pit-1 transzporter expresszióját. Pi hatására szignifikánsan fokozódott a Pit-1 expresszója a HAoSMC-kben, melyet a H₂S kezelés jelentősen gátolt (21.B ábra).



21. ábra: A H₂S gátolja a HAoSMC sejtek foszfát-felvételét. HAoSMC sejteket tenyésztettünk növekedési vagy kalcifikáló médiumban önmagában, vagy növekvő dózisú H₂S jelenlétében. (A) 4 napig tartó kezelést követően teljes sejtlizátumból intracelluláris foszfát mennyiséget határoztunk meg. (B) 2 napos kezelést követően Pit-1 mRNS mennyiséget határoztunk meg qRT-PCR-al. A diagramok 3 független kísérlet átlaga±szórás (saját eredmények).

Kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy a ferritin gátolja a HAoSMC-k Pi-mediálta kalcifikációját és oszteoblasztos differenciációját [121]. Ezért megvizsgáltuk, hogy a H₂S

befolyásolja-e a ferritin expresszióját HAoSMC-kben. Ahogy az 22. ábrán látható, a H- és L-ferritinek mennyisége nem változott H₂S hatására, így a H₂S nem a ferritinen keresztül fejti ki kalcifikációt gátló hatását.

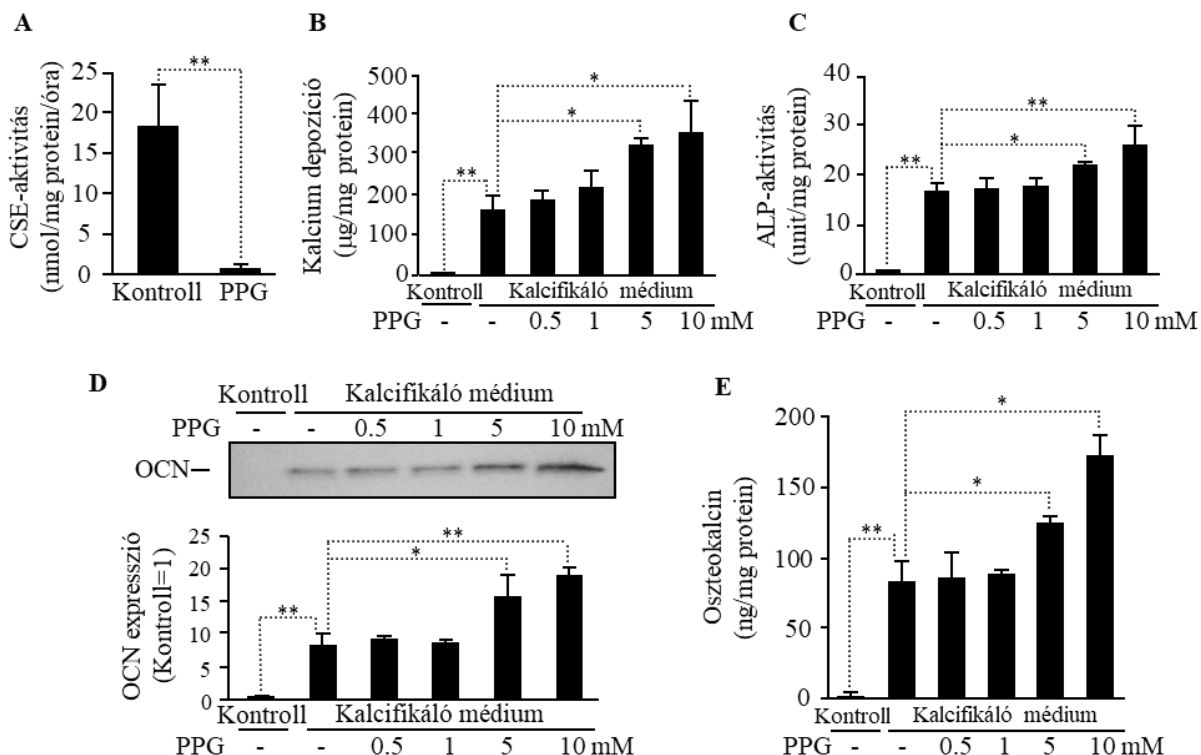


22. ábra: A H₂S nem befolyásolja a HAoSMC sejtekben a H- és L-ferritin expresszióját. HAoSMC sejteket tenyésztettünk normál médiumban vagy kalcifikáló médiumban önmagában vagy H₂S (25, 50, 100, 150 μmol/L) jelenlétében 24 óráig. (A) Teljes sejtizátumból Western blottal H- és L-ferritin szinteket vizsgáltunk. Az ábrán 3 független kísérletből származó reprezentatív immunoblotok láthatóak. (B, C) A diagramok 3 független kísérlet H- és L-ferritin-specifikus sávok GAPDH-ra vonatkoztatott denzitásainak átlagát±szórás mutatják (saját eredmények).

6.10. Az endogén H₂S képződése gátolja a HAoSMC sejtek kalcifikációját és oszteoblasztos differenciációját

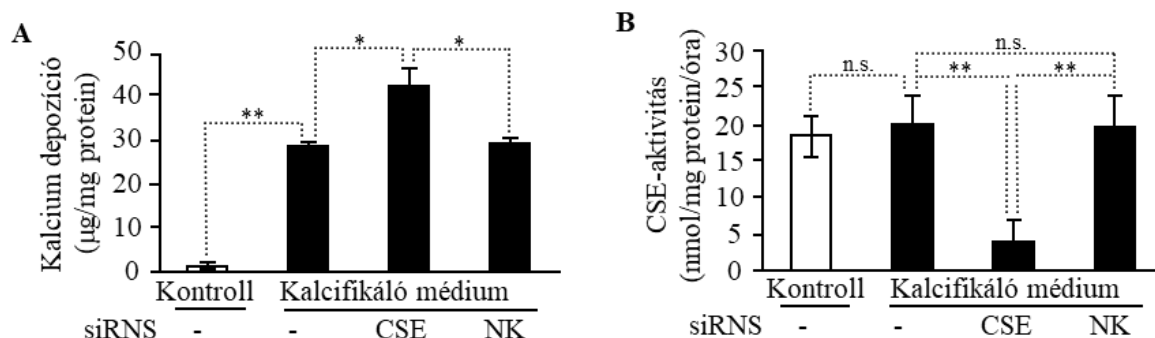
Az érrendszerben a simaizomsejtek H₂S termelése egy piridoxal-5'-foszfát-dependens enzim, a CSE által történik. Eddigi eredményeink alapján feltételeztük, hogy a CSE enzim gátlása fokozott kalcifikációhoz vezethet. A CSE aktivitását először egy jól ismert gátlószerrel, a DL-propargilglicin (PPG) segítségével gátoltuk. A PPG-vel kezelt sejtekben markáns CSE-aktivitás csökkenést tapasztaltunk (23.A ábra), melynek hatására kétszeresére emelkedett az extracelluláris mátrix kalcium tartalma a PPG-vel nem gátolt sejtekhez viszonyítva (23.B ábra). Ezen túlmenően, a PPG növelte az ALP aktivitást (23.C ábra) és az OCN expresszióját (23.D,E

ábra). Mindezek alapján megállapítható, hogy a CSE gátlása HAoSMC-kben a kalcifikáció fokozódásához vezet.



23. ábra: A DL-propargilglicin (PPG) hatására lecsökkent endogén H₂S képződése a HAoSMC sejtek fokozott kalcifikációját és oszteoblasztos differenciációját eredményezi. (A) HAoSMC sejtek CSE-aktivitását határoztuk meg PPG (10 mmol/L) jelenlétében vagy anélkül. (B-E) HAoSMC sejteket tenyésztettünk normál vagy kalcifikáló médiumban önmagában vagy növekvő dózisú PPG (0,5, 1, 5, 10 mmol/L) jelenlétében 7 napig. Extracelluláris kalcium depozíciót (B), ALP-aktivitást (C) és OCN expressziót (D,E) mértünk. Az eredmények 3 független, duplikátumban végzett kísérlet átlagát±szórás ábrázolják (*saját eredmények*).

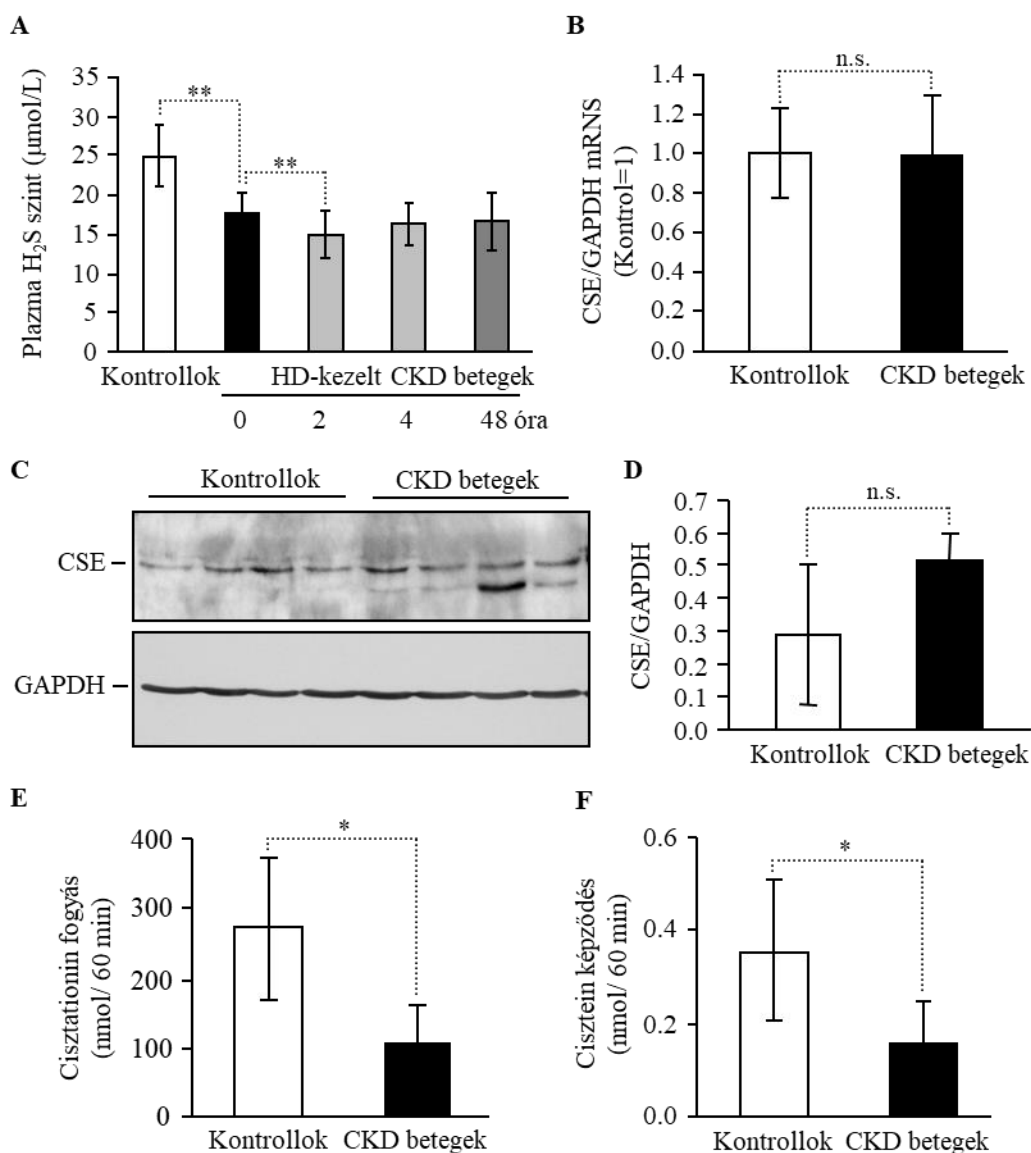
A CSE-aktivitás szerepét a kalcifikáció gátlásában a CSE gén siRNS-sel történő csendesítésével is bizonyítottuk. Ezen vizsgálataink megerősítették, hogy a CSE aktivitás gén-csengesítésével történő csökkentése a kalcifikáció fokozódásához vezet (24. ábra).



24. ábra: A cisztationin- γ -liáz expressziójának a csendesítése a HAoSMC sejtek mineralizációját fokozza. HAoSMC sejteket transzfektáltunk cisztationin- γ -liáz (CSE)- vagy negatív kontroll (NK)-specifikus siRNS-sel, majd kalcifikáló médiumban történő 4 napos kezelést követően kalcium depozíciót (A) mértünk. (B) A HAoSMC sejtek CSE-aktivitását mértük az siRNS transzfekciót követő 2. napon. A diagramok 3 független kísérlet eredményeinek átlagát $\pm$ szórás mutatják (saját eredmények).

6.11. Végstádiumú vesebetegek csökkent plazma H_2S szintje csökkent CSE-aktivitással társul

Perna és munkatársai korábban kimutatták, hogy a végstádiumú vesebetegek plazmájának H_2S szintje alacsonyabb a kontroll populációhoz képest, mely hemodialízis során tovább csökken [107]. Jelen eredményeink megerősítették ezt a megfigyelést (25.A ábra). Mivel az érrendszerben történő H_2S termelés legfontosabb enzime a CSE, ezért megvizsgáltuk a végstádiumú veseelégtelenségben szenvedő betegek és egészséges kontroll személyek perifériás mononukleáris sejtjeinek CSE expresszióját és aktivitását. CSE expressziójában sem mRNS sem fehérje szinten nem mutatkozott különbség a két mintavételi csoport között (25.B-D ábra). Ellenben a CSE aktivitását vizsgálva – melyet cisztationin fogyasztással és cistein képződéssel mértünk – a veseelégtelenségben szenvedő betegek mononukleáris sejtjei jelentős aktivitás csökkenést mutattak az egészséges kontrollokhoz viszonyítva (25.E-F ábra). Mindez alátámasztja azt az in vitro megfigyelésünket, miszerint a CSE- H_2S rendszernek fontos szerepe van a HAoSMC-kalcifikáció gátlásában.



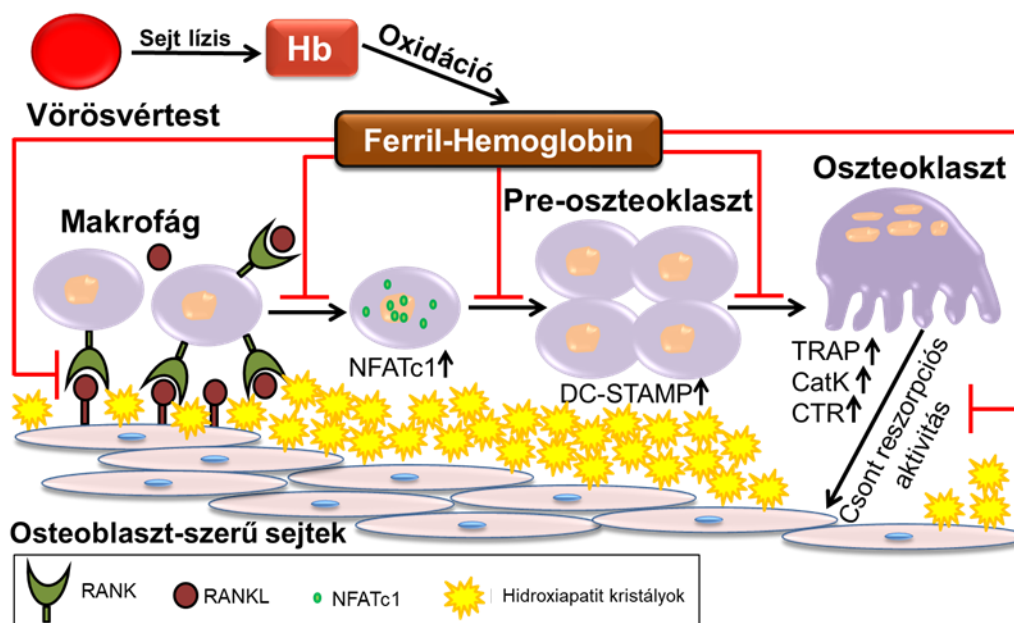
25. ábra: A végstádiumú vesebetegekben csökkent a plazma H_2S -szintje és a CSE-aktivitása. (A) Plazma kén-hidrogén szinteket mértünk egészséges kontroll személyektől ($n=23$) és végstádiumú vesebetegek (CKD) ($n=21$) esetében a hemodialízis (HD) kezelés különböző időpontjaiból származó vérmintákból. (B) Perifériás mononukleáris sejtekből származó mRNS-eket izoláltunk egészséges kontroll személyektől ($n=16$) és CKD betegektől ($n=14$). A CSE gén expresszióját qRT-PCR-al határoztuk meg. (C,D) Kontroll ($n=4$) és CKD beteg ($n=4$) egyénektől izoláltunk PBMC sejteket és western blottal fehérje szinten határoztuk meg a CSE expresszióját. A CSE mennyiségét GAPDH-ra normalizáltuk. (E,F) Kontroll ($n=10$) és CKD beteg ($n=10$) egyénektől izolált PBMC sejtek CSE aktivitását mértük cisztationin fogyás (E) és cisztein képződés (F) módszerével. A diagramok az eredmények átlagát $\pm$ szórás mutatják (társszerzőkkel közösen elért eredmények).

7. DISZKUSSZIÓ

Az OLC sejtek jelenléte az ateroszklerotikus plakkok kalcifikált régiói környékén ismert jelenség [61]. Az „oszteoklaszt-elmélet” szerint a megemelkedő oszteoblaszt-aktivitás és a csökkenő OC-aktivitás hozzájárul az intima kalcifikáció kialakulásához [122]. Ezért az OLC sejtek differenciációjában és aktivitásában bekövetkező bármilyen zavar az érfal kalcifikáció patogenitási faktorának tekinthető.

Vizsgálataink során igazoltuk az oszteoklaszt-elméletet, mivel erős CatK- és TRAP-festődést mutató OLC-ket figyeltünk meg a kalcifikált ateroszklerotikus léziók mineralizált területeinek környezetében. Ugyanakkor, ezen OLC-k száma rendkívüli módon lecsökkent a bevérzett kalcifikált plakkok esetében, melyekben jelentős mennyiségben figyelhetők meg az oxidált Hb-formák, így a FHb is. Ezen érdekes összefüggés alátámasztja azt a hipotézisünket, miszerint a FHb gátolja az OLC-k kialakulását a bevérzett kalcifikált szövetben, ami elégtelen mineralizált mátrix reszorpcióhoz vezet az érfalban. Ezen megfigyelésünket *in vitro* kísérleteink is alátámasztják (26. ábra).

Az OC-differenciáció fő szabályozó transzkripciós faktora az NFATc1 [78]. Az NFATc1 oszteoklasztogenezisben betöltött szerepét számos tanulmányban bizonyították. NFATc1-deficiens egerekben az elégtelen OC-irányú differenciáció következtében oszteopetrózis alakult ki [77]. NFATc1-deficiens embrionális őssejtek nem képesek oszteoklasztokká differenciálódni RANKL hatására [78]. Az oszteoklasztogenezis másik szabályozó fehérjéje a DC-STAMP, hiányában a sejt-sejt fúzió teljeséggel megszűnik, DC-STAMP knock-out egerekből szeparált OC-k egyetlen sejtmaggal rendelkeznek, az elégtelen OC-funkciónak köszönhetően oszteopetrózis jelenik meg [123]. A CTR egy receptor fehérje, mely a korai OC prekursor sejtekben még nincs jelen, viszont az OC-differenciáció későbbi szakaszában megnövekszik az expressziója, így az érett OC-k specifikus markerének tekinthető [124, 125]. Munkánk során kimutattuk, hogy a FHb, ellentétben a MetHb-nal és ferro-Hb-nal, gátolta az NFATc1 expresszióját. Továbbá, a FHb jelentősen, míg a MetHb csak kismértékben, a ferro-Hb pedig egyáltalán nem csökkentette egyéb oszteoklaszt-specifikus markerek, mint a CTR és a DC-STAMP expresszióját. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a FHb az oszteoklasztogenezisben kulcsfontosságú gének expressziójának csökkentése révén gátolja az OC-differenciációt. Vizsgálataink kimutatták, hogy a FHb gátló hatása dózis-függő, és már alacsony mikromoláris mennyiségnél is jelentkezik, hatásmechanizmusa pedig sejthaláltól független folyamat.

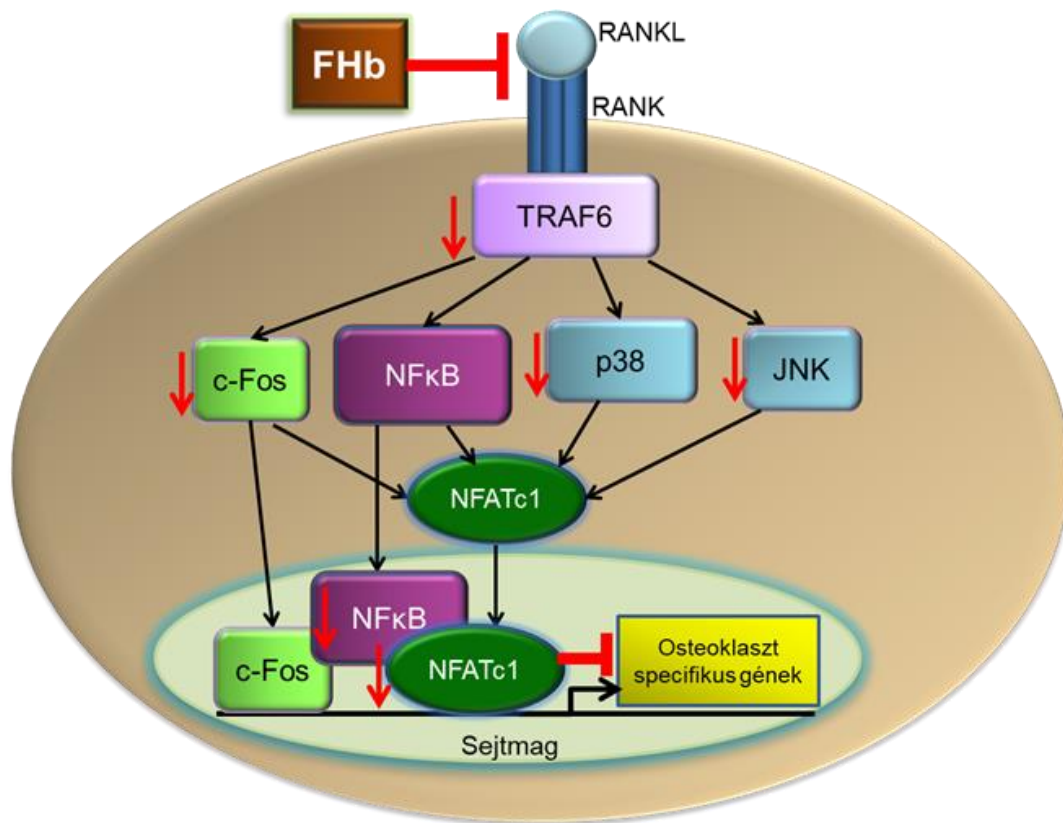


26. ábra: A ferril-hemoglobin gátolja a makrofágok oszteoklaszt-irányú differenciációját. A bevérzett kalcifikált léziókban nagymennyiségben jelenlévő FHb, gátolja az OC-ok kialakulását, és azáltal, hogy gátolja az OC-specifikus gének (NFATc1, DC-STAMP, TRAP, CatK és CTR) expresszióját végsősoron megakadályozza az OC-ok csontreszorpciós aktivitását. A vaszkuláris kalcifikáció során az érfal simaizomsejtjei egy oszteokondrogenikus átprogramozódáson mennek keresztül és RANKL-ot termelnek, mely elindítja a makrofágok OC-irányú differenciációját, mint egy kompenzációs mechanizmusként a kalcium kirakódás eltávolításához. A FHb jelenléte a bevérzett aterómákban egy olyan különleges mikrokörnyezetet teremt, melyben az OLC-mediálta kalcium depozitumok reszorpciója gátolt, ezáltal gátolva az endogén kalcium-reszorpciós képességet az érrendszerben.

Ahhoz, hogy megismerjük a RANKL és FHb hatására bekövetkező RANK szignalizációban történő változásokat, vizsgáltuk az oszteoklasztogenezisben kulcsfontosságú szerepet betöltő fehérjéket. Kimutattuk, hogy a FHb gátolja az oszteoklasztogenezis korai szignalizációs lépéseit: a MAPK- és NFκB-aktivációt, illetve a c-Fos és a TRAF-6 fokozott expresszióját. A FHb tehát gátolja a makrofágok oszteoklasztogenezis differenciációjának szignálútjait (27. ábra).

A HO-1 oszteoklasztogenezist gátló hatása már korábban ismert [79]. Munkánk során kimutattuk, hogy a FHb katalitikusan aktív HO-1 enzimet indukál, mely megfigyelés alapján feltételeztük, hogy a FHb hem csoportja felelős az OC-differenciáció gátlásért. Eredményeink azonban azt mutatják, hogy a FHb ugyan induktora a HO-1-nek, de oszteoklasztogenezist gátló hatása független a HO-1-től. Ezt a megfigyelést HO-1^{-/-} egér BMDM sejteken végzett eredményeink is megerősítik, és a FHb-mediálta OC kialakulás gátlásának egy HO enzim aktivitástól független módját valószínűsíti.

A RANK és RANKL interakciója nélkülözhetetlen az OC sejtek kialakulásához és a RANK expressziója is szükséges a mieloid-eredetű OC sejtek differenciációjához [70, 73, 126]. Eredményeink bizonyítják, hogy a FHb csökkenti a RANKL-indukálta RANK expresszióját RAW264.7 makrofágokban, potenciálisan csökkentve az oszteoklasztogenezisre „fogékony” sejtek számát. Eredményeink azt mutatják, hogy a FHb már az oszteoklasztogenezis iniciációs lépésénél, a RANK-RANKL kölcsönhatás kialakulásának gátlásával kifejti hatását. Eredményeink azt bizonyítják, hogy a FHb egy OPG-hez hasonló mechanizmus révén akadályozza az OC sejtek kialakulását, azáltal, hogy közvetlenül gátolja a RANK-RANKL kötődést. Ezen interakció pontos mechanizmusának a megismerése további vizsgálatokat igényel.



27. ábra A FHb gátolja az OC-differenciáció jelátviteli útjait. A FHb gátolja a RANK-RANKL interakciót, és blokkolja a RANK-tól kiinduló oszteoklasztogenikus szignál útjait (TRAF6, JNK, p38, c-Fos, és NFκB), így akadályozva meg az NFATc1 expresszióját és nukleáris transzlokációját, ezáltal az OC-specifikus gének expresszióját.

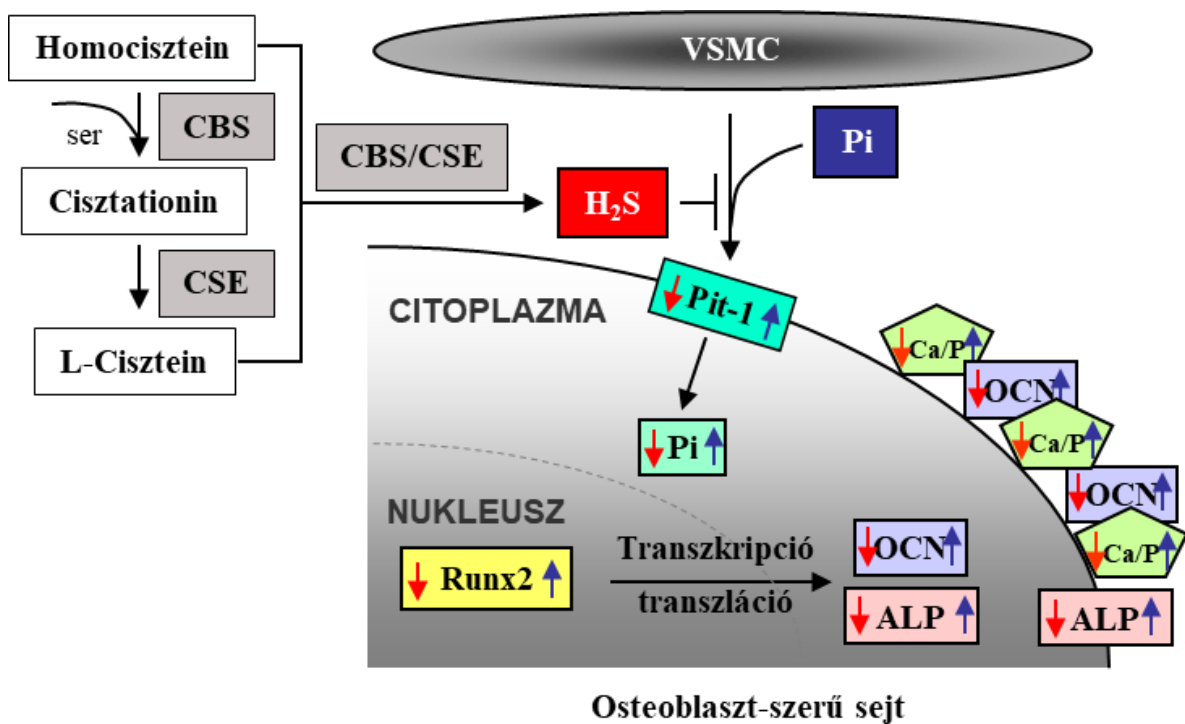
Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a megemelkedett extracelluláris foszfát indukálja a VSMC-k kalcifikációját, illetve azok oszteokondrogenikus fenotípus váltását [30, 31].

Bizonyított, hogy ez a változás nagymértékben szabályozott folyamat [27, 32, 33]. Az érrendszerben a H₂S-t a VSMC-k a CSE enzim segítségével termelik, és számos fontos szív-érrendszeri hatását ismerték meg: vazodilációs és anti-hipertenzív hatású [127], növeli a plazma fibrinolitikus aktivitását, gátolja a trombocita-aktivációt és aggregációt [128], pro-angiogenikus hatású [129] és kardioprotektív [130]. Munkánk során azt vizsgáltuk, hogy milyen szerepe lehet a H₂S-nek a HAoSMC kalcifikációban és a HAoSMC sejtek oszteoblaszt-szerű sejtekké történő átalakulásában. Eredményeink azt bizonyítják, hogy a H₂S dózis-függően csökkentette a VSMC-k Pi indukálta kalcium felhalmozódását az extracelluláris mátrixban. Egyre elfogadottabb az a tény, hogy a hiperfoszfatémia hatása a VSMC kalcifikációra egy Pit-1 mediálta folyamat, mely segíti a Pi bejutását a sejtekbe [32]. Éppen ezért megvizsgáltuk, hogy a H₂S megváltoztatja-e az intracelluláris Pi szinteket a HAoSMC sejtekben. Az extracelluláris magas Pi-nak kitett sejtekben megemelkedő intracelluláris Pi szinteket a H₂S jelentősen csökkentette. Megmutattuk, hogy a vaszkuláris sejtekbe történő Pi felvételt a H₂S azáltal gátolja, hogy csökkenti a Pit-1 expresszióját, így csökkenti az intracelluláris Pi szinteket, mely elengedhetetlen a HAoSMC sejtek oszteoblaszt-irányú differenciációjához. A Runx2 nélkülözhetetlen az oszteoblaszt differenciációhoz, a csont mátrix fehérjék expressziójához és következésképpen a mineralizációhoz [33]. Ezért megvizsgáltuk, hogy a H₂S-nek milyen hatása van a Runx2 expressziójára HAoSMC sejtekben. A Pi-indukálta Runx2 emelkedését csökkentette a H₂S. Továbbá a H₂S gátolta a HAoSMC oszteoblasztos transzformációjában szerepet játszó, Runx2 által szabályozott gének expresszióját. A H₂S dózis-függően gátolta a Pi-mediálta ALP és OCN expresszió-emelkedést, ezáltal a H₂S gátló hatása nem korlátozódott a kalcium akkumulációra. Korábbi tanulmányokban kimutatták, hogy a H₂S VSMC apoptózist indukál [102]. A H₂S 200 µmol/L koncentrációnál fejt ki pro-apoptotikus hatását. Munkánk során nem tapasztaltunk HAoSMC viabilitás változást Pi vagy H₂S hatására abban a tartományban, melyben vizsgálatainkat végeztük.

A H₂S a transzszulfurációs útvonal egy alternatív termékeként képződik, az érrendszerben főleg a VSMC-k CSE-katalizálta reakciójában képződik [93]. Azt már korábban kimutatták, hogy CKD-ben a vaszkuláris kalcifikáció igen gyakori jelenség [22]. Megvizsgáltuk, hogy a fokozott ektópiás kalcifikáció vajon az alacsonyabb H₂S szint következtében alakul-e ki. Eredményeink azt mutatják, hogy az 5. stádiumú CKD betegekben a plazma H₂S szintje lecsökkent, ezen felül a szintje tovább csökken hemodialízis hatására. Bebizonyítottuk, hogy a CSE enzim aktivitása alacsonyabb a hemodialízis kezelésen résztvevő CKD betegekből származó monocitákban, mint az egészséges egyénekből nyert sejtekben, anélkül hogy különbséget tapasztaltunk volna mRNS

vagy fehérje szintekben. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy CKD-ben a CSE poszttranszlációs módosuláson megy keresztül, mely további vizsgálatokat igényel.

A CSE számos szív-érrendszeri hatását bizonyították: a CSE-deficiencia az ApoE knock-out egerekben szignifikánsan növelte az ateroszklerózis kialakulását, illetve CSE-hiánya hipertenzióhoz vezet [131, 132]. Ahhoz, hogy bizonyítsuk a CSE szerepét a Pi-indukálta HAoSMC mineralizációban, csökkentettük az endogén H₂S képződését mind farmakológiai úton történő CSE aktivitás gátlásával, mind pedig géncsendesítéssel történő CSE expresszió csökkentésével. Azáltal, hogy redukáltuk a CSE-mediálta endogén H₂S képződését, szignifikáns emelkedést figyeltünk meg mind a HAoSMC kalcifikációjában, mind pedig ALP és OCN expressziójában. Megfigyeléseink alátámasztják a H₂S és a CSE nélkülözhetetlen szerepét az érrendszerben és azt bizonyítják, hogy az alacsony CSE-aktivitás és ennek következtében lecsökkent H₂S szint a CKD betegekben súlyosbítja a kardiovaszkuláris komplikációkat, melyek gyakran előfordulnak ebben a betegcsoportban (28. ábra).



28. ábra A H₂S biogenezeise és a HAoSMC sejtek Pi-indukálta oszteoblasztos transzformációjában betöltött szerepe. A H₂S a transzszulfurációs útvonal egy melléktermékeként képződik. A H₂S gátolja a HAoSMC-k oszteoblasztos átalakulásának összes lépését: a Pi-indukálta Pi felvételét, a Pit-1 upregulációját, a Runx2, ALP és OCN expresszióját, és a kalcium felhalmozódását. A kék nyilak a magas Pi hatását, míg a piros nyilak a H₂S hatását jelzik.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A vaszkuláris kalcifikáció kialakulása két ellentétes irányú folyamatnak: az oszteoblaszt-szerű sejtek megemelkedett mineralizációjának és az oszteoklaszt-szerű sejtek csökkent csontreszorpciójának az eredménye. Munkánk során azokat a tényezőket vizsgáltuk, amelyek hatással lehetnek ezekre a folyamatokra.

Az ateroszklerotikus plakkok bevérvése igen gyakori jelenség, melynek eredményeként a sejtekből kiszabaduló Hb az erős oxidatív környezetben FHb-ná oxidálódik. Azt vizsgáltuk vajon az oxidált Hb hatással van-e az OC-k kialakulására, ezáltal befolyásolva a kalcium eltávolítását a kalcifikált ateroszklerotikus léziókból. A FHb csökkentette a RANKL-indukálta csontreszorpciós aktivitást és gátolta az oszteoklaszt-specifikus gének expresszióját. Ezen túlmenően a FHb gátolta a RANK-ból kiinduló oszteoklasztogenezis jelátviteli útvonalait. Ezek a hatások hemoxigenáz 1 enzimtől függetlenek, melyet HO-1 gén knock-out RAW264.7 sejteken és egerekben is megmutattunk. A FHb verseng a RANK-kal a RANKL-kötésért, ami egy lehetséges mechanizmust mutat, melynek révén a FHb akadályozza az oszteoklaszt differenciációt. Kóros human carotis artériák esetében, az OLC-k nagy mennyiségben vannak jelen a kalcifikált plakkokban és a kalcium felhalmozódás környékén lokalizálódnak, míg a FHb felhalmozódást mutató bevérvett léziók esetében a kalcium akkumuláció ellenére is ezen sejtek száma lecsökkent. A FHb ezen hatásai azt bizonyítják, hogy a bevérvett aterómákban jelenlévő FHb egy olyan különleges mikrokörnyezetet teremt, melyben az OLC-mediálta kalcium depozíció eltávolítása akadályozott, ezáltal gátolt az érrendszer endogén kalcium reszorpciós képessége.

Munkánk során vizsgáltuk a H₂S lehetséges szerepét a Pi-indukálta HAoSMC oszteoblaszt irányú differenciációjában és mineralizációjában. Bizonyítottuk, hogy a H₂S, függetlenül annak exogén vagy endogén eredetétől, gátolja az oszteoblaszt-specifikus gének (ALP, OCN és Runx2) expressziójának emelkedését. A Pit-1-en keresztül történő Pi-felvétel gátlása elengedhetetlen része a HAoSMC sejtek H₂S hatására bekövetkező kalcifikációs és fenotípus-váltási folyamat jótékony befolyásolásához. Végstádiumú CKD betegekben a redukálódott CSE aktivitás csökkent H₂S szinthez vezet, mely megkönnyíti a kalcifikáció megjelenését az érrendszerben. Ezek az eredmények új stratégiát nyújtanak a vaszkuláris kalcifikáció kialakulásának gátlásához.

9. SUMMARY

The development of vascular calcification is the result of two opposite-sensed processes: the increased mineralization of the osteoblast-like cells and the decreased bone-resorption activity of the OCLs. In our study we investigated the possible factors that may affect these processes.

Intraplaque hemorrhage frequently occurs in atherosclerotic plaques resulting in cell-free hemoglobin, which is oxidized to FHb in the highly oxidative environment. We investigated whether oxidized hemoglobin alters osteoclast formation thereby affecting calcium removal from mineralized atherosclerotic lesions. FHb decreased bone resorption activity and inhibited OC-specific gene expression induced by RANKL. In addition, FHb inhibited osteoclastogenic signaling pathways downstream of RANK. These effects were independent of heme oxygenase-1 demonstrated by knocking down HO-1 gene in RAW264.7 cells and in mice. Importantly, FHb competed with RANK for RANKL binding suggesting possible mechanisms by which FHb impairs osteoclastic differentiation. In diseased human carotid arteries, OLCs were abundantly present in calcified plaques and co-localized with regions of calcium deposition, while the number of these cells were lower in hemorrhagic lesions exhibiting accumulation of FHb despite calcium deposition. This effect of FHb suggests that the presence of FHb in hemorrhagic atheromas might create a unique microenvironment where OLC-mediated resorption of calcium deposits is impaired that blocks the endogenous calcium resorption capability in the vasculature.

In our study we investigated the role that H₂S may play in Pi-induced osteoblastic transformation and mineralization of HAoSMC. We provide evidence that H₂S regardless of its exogenous or endogenous origin inhibits the up-regulation of osteoblast specific genes such as ALP, OCN and Runx2. The inhibition of Pi uptake through Pit-1, is essential for providing beneficial effects against calcification and phenotypic modulation of HAoSMC by H₂S. Reduced CSE activity leading to decreased H₂S levels in stage 5 CKD patients might facilitate calcification of vasculature. These results offer new strategies to prevent vascular calcification.

10. TÁRGYSZAVAK/KEYWORDS

vaszkuláris kalcifikáció, ateroszklerózis, kén-hidrogén, oszteoklaszt-differenciáció, hemoglobin oxidáció, ferril-hemoglobin, krónikus veseelégtelenség

vascular calcification, atherosclerosis, hydrogen sulfide, osteoclast-differentiation, hemoglobin oxidation, ferryl-hemoglobin, chronic kidney disease

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Dr. Balla József Professzor Úrnak a munkám során nyújtott szakmai segítségét, türelmét, továbbá, hogy kutatócsoportjának tagja lehettem.

Hálásan köszönöm Dr. Balla György Professzor Úrnak a támogatását, a kiváló ötleteket és együttgondolkodást.

Köszönettel tartozom a Vaszkuláris Biológiai Kutató Laboratórium minden jelenlegi és korábbi dolgozójának. Külön köszönöm a közös munka során nyújtott szakmai segítségét Dr. Jeney Viktóriának, Dr. Katkó Mónikának, Dr. Gáll Tamásnak, Nagy Annamáriának, Pethő Dávidnak és Dr. Oros Melindának. Köszönettel tartozom laboratóriumunk kiváló asszisztenseinek: Barna Erikának, Dr. Balázsne Szőnyi Anikónak, Fürtös Ibolyának és Tóth Juditnak.

Köszönet illeti laboratóriumunk kollaborációs partnereit: Prof. Dr. Anupam Agarwalt és Dr. Abolfazl Zarjou-t (Alabama Egyetem, USA), Prof. Dr. Méhes Gábort, Dr. Hendrik Zoltánt és Beke Líviát (Debreceni Egyetem, Patológiai Intézet) és Dr. Tóth Csaba Zsigmondot (Debreceni Egyetem, Sebészeti Intézet).

Végül, de nem utolsósorban köszönetemet fejezem ki a családomnak: férjemnek, Zsoltnak és kislányunknak, Dórának, szüleimnek és testvéreimnek, hogy türelmükkel és szeretetükkel támogatták a munkámat.

A kutatás az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap GINOP-2.3.2-15-2016-00043 (IRONHEARTH) és EFOP-3.6.2-16-2017-00006 (LIVE LONGER) társfinanszírozásával valósult meg. A kutatást támogatta az Innovációs és Technológiai Minisztérium Tématerületi Kiválósági Programja (ED_18-1-2019-0028), a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap (OTKA) K112333 és K132828 valamint a Magyar Tudományos Akadémia (11003).

Munkámat szeretettel ajánlom gyermekemnek, Dórának!

12. 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] **Rabson SM.** Arteriosclerosis: Definitions. *American Journal of Clinical Pathology* 1954; 24; 472–3.
- [3] **Stary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, et al.** A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis- prone regions: A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 1992; 12; 120–34.
- [4] **Stary HC, Chandler AB, Glagov S, et al.** A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis: A report from the committee on vascular lesions of the council on arteriosclerosis, American Heart Association. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 1994; 14; 840–56.
- [5] **Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, et al.** A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis: A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1995; 15; 1512–31.
- [6] **RG M, GA F, JS C, et al.** Mönckeberg sclerosis revisited: a clarification of the histologic definition of Mönckeberg sclerosis. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 2008; 132.
- [7] **Kashgarian M.** Pathology of Small Blood Vessel Disease in Hypertension. *American Journal of Kidney Diseases* 1985; 5; A104–10.
- [8] **Block GA, Port FK.** Re-evaluation of risks associated with hyperphosphatemia and hyperparathyroidism in dialysis patients: Recommendations for a change in management. *American Journal of Kidney Diseases* 2000; 35; 1226–37.
- [9] **Rumberger JA, Simons DB, Fitzpatrick LA, et al.** Coronary artery calcium area by electron-beam computed tomography and coronary atherosclerotic plaque area: A histopathologic correlative study. *Circulation* 1995; 92; 2157–62.
- [10] **Sangiorgi G, Rumberger JA, Severson A, et al.** Arterial calcification and not lumen

stenosis is highly correlated with atherosclerotic plaque burden in humans: a histologic study of 723 coronary artery segments using nondecalcifying methodology. *Journal of the American College of Cardiology* 1998; 31; 126–33.

- [11] **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.
- [12] **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.
- [13] **Lehto S, Niskanen L, Suhonen M, et al.** Medial artery calcification: A neglected harbinger of cardiovascular complications in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1996; 16; 978–83.
- [14] **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.
- [15] **Niskanen LK, Suhonen M, Siitonen O, et al.** Aortic and lower limb artery calcification in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients and non-diabetic control subjects. A five year follow-up study. *Atherosclerosis* 1990; 84; 61–71.
- [16] **Burke AP, Taylor A, Farb A, et al.** Coronary calcification: Insights from sudden coronary death victims. *Zeitschrift Fur Kardiologie* 2000; 89.
- [17] **Taylor AJ, Burke AP, O'Malley PG, et al.** A comparison of the Framingham risk index, coronary artery calcification, and culprit plaque morphology in sudden cardiac death. *Circulation* 2000; 101; 1243–8.
- [18] **Guerin AP, Blacher J, Pannier B, et al.** Impact of aortic stiffness attenuation on survival of patients in end-stage renal failure. *Circulation* 2001; 103; 987–92.
- [19] **Blacher J, Guerin AP, Pannier B, et al.** Arterial calcifications, arterial stiffness, and cardiovascular risk in end-stage renal disease. *Hypertension*, vol. 38, Lippincott Williams and Wilkins; 2001 p.938–42, p. 938–42.
- [20] **London GM, Blacher J, Pannier B, et al.** Arterial wave reflections and survival in end-stage renal failure. *Hypertension* 2001; 38; 434–8.

- [21] **Shanahan CM, Crouthamel MH, Kapustin A, et al.** Arterial calcification in chronic kidney disease: Key roles for calcium and phosphate. *Circulation Research* 2011; 109; 697–711.
- [22] **Moe SM, Chen NX.** Mechanisms of vascular calcification in chronic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology* 2008; 19; 213–6.
- [23] **Burke SK.** Phosphate Is a Uremic Toxin. *Journal of Renal Nutrition* 2008; 18; 27–32.
- [24] **Block GA, Klassen PS, Lazarus JM, et al.** Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis. *Journal of the American Society of Nephrology* 2004; 15; 2208–18.
- [25] **Giachelli CM, Jono S, Shioi A, et al.** Vascular calcification and inorganic phosphate. *American Journal of Kidney Diseases* 2001; 38; S34–7.
- [26] **Giachelli CM.** Vascular calcification: In vitro evidence for the role of inorganic phosphate. *Journal of the American Society of Nephrology* 2003; 14.
- [27] **Jono S, McKee MD, Murry CE, et al.** Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circulation Research* 2000; 87.
- [28] **Shioi A, Nishizawa Y, Jono S, et al.** β -Glycerophosphate accelerates calcification in cultured bovine vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1995; 15; 2003–9.
- [29] **Lomashvili KA, Cobbs S, Hennigar RA, et al.** Phosphate-induced vascular calcification: Role of pyrophosphate and osteopontin. *Journal of the American Society of Nephrology* 2004; 15; 1392–401.
- [30] **Giachelli CM.** Ectopic calcification: Gathering hard facts about soft tissue mineralization. *American Journal of Pathology* 1999; 154; 671–5.
- [31] **Steitz SA, Speer MY, Curinga G, et al.** Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: Upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circulation Research* 2001; 89; 1147–54.
- [32] **Li X, Yang HY, Giachelli CM.** Role of the sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle cell calcification. *Circulation Research* 2006; 98; 905–12.
- [33] **Otto F, Thornell AP, Crompton T, et al.** Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial

- dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 1997; 89; 765–71.
- [34] **Lomashvili KA, Garg P, Narisawa S, et al.** Upregulation of alkaline phosphatase and pyrophosphate hydrolysis: Potential mechanism for uremic vascular calcification. *Kidney International* 2008; 73; 1024–30.
 - [35] **Tyson KL, Reynolds JL, McNair R, et al.** Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2003; 23; 489–94.
 - [36] **Clarke M, Bennett M.** The emerging role of vascular smooth muscle cell apoptosis in atherosclerosis and plaque stability. *American Journal of Nephrology* 2007; 26; 531–5.
 - [37] **Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, et al.** Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: Evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circulation Research* 2000; 87; 1055–62.
 - [38] **Giachelli CM.** Vascular calcification mechanisms. *Journal of the American Society of Nephrology* 2004; 15; 2959–64.
 - [39] **Hayashi S, Yamane T, Miyamoto A, et al.** Commitment and differentiation of stem cells to the osteoclast lineage. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire* 1998; 76; 911–22.
 - [40] **Karst M, Gorny G, Galvin RJS, et al.** Roles of stromal cell RANKL, OPG, and M-CSF expression in biphasic TGF- β regulation of osteoclast differentiation. *Journal of Cellular Physiology* 2004; 200; 99–106.
 - [41] **Armstrong AP, Tometsko ME, Glaccum M, et al.** A RANK/TRAF6-dependent signal transduction pathway is essential for osteoclast cytoskeletal organization and resorptive function. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277; 44347–56.
 - [42] **Lee K, Seo I, Choi MH, et al.** Roles of Mitogen-Activated Protein Kinases in Osteoclast Biology. *International Journal of Molecular Sciences* 2018; 19.
 - [43] **Li X, Udagawa N, Itoh K, et al.** p38 MAPK-mediated signals are required for inducing osteoclast differentiation but not for osteoclast function. *Endocrinology* 2002; 143; 3105–13.
 - [44] **Shiotani A, Takami M, Itoh K, et al.** Regulation of osteoclast differentiation and function by receptor activator of NF κ B ligand and osteoprotegerin. *The Anatomical*

Record 2002; 268; 137–46.

- [45] **Grigoriadis AE, Wang ZQ, Cecchini MG, et al.** c-Fos: A key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science* 1994; 266; 443–8.
- [46] **Kim JH, Kim N.** Regulation of NFATc1 in Osteoclast Differentiation. *Journal of Bone Metabolism* 2014; 21; 233–41.
- [47] **Kim K, Lee S-H, Ha Kim J, et al.** NFATc1 induces osteoclast fusion via up-regulation of Atp6v0d2 and the dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP). *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 2008; 22; 176–85.
- [48] **Yagi M, Ninomiya K, Fujita N, et al.** Induction of DC-STAMP by Alternative Activation and Downstream Signaling Mechanisms. *Journal of Bone and Mineral Research* 2007; 22; 992–1001.
- [49] **Ikeda F, Nishimura R, Matsubara T, et al.** Critical roles of c-Jun signaling in regulation of NFAT family and RANKL-regulated osteoclast differentiation. *Journal of Clinical Investigation* 2004; 114; 475–84.
- [50] **Matsumoto M, Kogawa M, Wada S, et al.** Essential Role of p38 Mitogen-activated Protein Kinase in Cathepsin K Gene Expression during Osteoclastogenesis through Association of NFATc1 and PU.1. *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279; 45969–79.
- [51] **Shen Z, Crotti TN, Flannery MR, et al.** A novel promoter regulates calcitonin receptor gene expression in human osteoclasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 2007; 1769; 659–67.
- [52] **Huntley R, Jensen E, Gopalakrishnan R, et al.** Bone morphogenetic proteins: Their role in regulating osteoclast differentiation. *Bone Reports* 2019; 10; 100207.
- [53] **Neven E, De Schutter TM, De Broe ME, et al.** Cell biological and physicochemical aspects of arterial calcification. *Kidney International* 2011; 79; 1166–77.
- [54] **Jeziorska M, McCollum C, Wooley DE.** Observations on bone formation and remodelling in advanced atherosclerotic lesions of human carotid arteries. *Virchows Archiv : An International Journal of Pathology* 1998; 433; 559–65.
- [55] **Vliegenthart R, Oudkerk M, Hofman A, et al.** Coronary Calcification Improves Cardiovascular Risk Prediction in the Elderly. *Circulation* 2005; 112; 572–7.
- [56] **Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL.** Osteoclast differentiation and activation. *Nature*

2003; 423; 337–42.

- [57] **Ducy P, Schinke T, Karsenty G.** The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science (New York, N.Y.)* 2000; 289; 1501–4.
- [58] **Teitelbaum SL.** Bone resorption by osteoclasts. *Science (New York, N.Y.)* 2000; 289; 1504–8.
- [59] **Rodan GA, Martin TJ.** Therapeutic approaches to bone diseases. *Science (New York, N.Y.)* 2000; 289; 1508–14.
- [60] **Feng X, McDonald JM.** Disorders of Bone Remodeling. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 2011; 6; 121–45.
- [61] **Doherty TM, Uzui H, Fitzpatrick LA, et al.** Rationale for the role of osteoclast-like cells in arterial calcification. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2002; 16; 577–82.
- [62] **Spicer SS, Lewis SE, Tashian RE, et al.** Mice carrying a CAR-2 null allele lack carbonic anhydrase II immunohistochemically and show vascular calcification. *The American Journal of Pathology* 1989; 134; 947–54.
- [63] **Qiao JH, Tripathi J, Mishra NK, et al.** Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteopetrotic mice. *The American Journal of Pathology* 1997; 150; 1687–99.
- [64] **Tseng W, Graham LS, Geng Y, et al.** PKA-induced Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL) Expression in Vascular Cells Mediates Osteoclastogenesis but Not Matrix Calcification. *Journal of Biological Chemistry* 2010; 285; 29925–31.
- [65] **Filonzi EL, Zoellner H, Stanton H, et al.** Cytokine regulation of granulocyte-macrophage colony stimulating factor and macrophage colony-stimulating factor production in human arterial smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 1993; 99; 241–52.
- [66] **Fittipaldi S, Vasuri F, Degiovanni A, et al.** The study of calcified atherosclerotic arteries: an alternative to evaluate the composition of a problematic tissue reveals new insight including metakaryotic cells. *BMC Clinical Pathology* 2016; 16; 12.
- [67] **Qiao J-H, Mishra V, Fishbein MC, et al.** Multinucleated giant cells in atherosclerotic plaques of human carotid arteries: Identification of osteoclast-like cells and their specific proteins in artery wall. *Experimental and Molecular Pathology* 2015; 99; 654–62.

- [68] **KIM H-H, SHIN HS, KWAK HJ, et al.** RANKL regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. *The FASEB Journal* 2003; 17; 2163–5.
- [69] **Ishida A, Fujita N, Kitazawa R, et al.** Transforming Growth Factor- β Induces Expression of Receptor Activator of NF- κ B Ligand in Vascular Endothelial Cells Derived from Bone. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277; 26217–24.
- [70] **Collin-Osdoby P, Osdoby P.** RANKL-Mediated Osteoclast Formation from Murine RAW 264.7 cells. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), vol. 816, 2012 p.187–202, p. 187–202.
- [71] **Doherty TM, Asotra K, Fitzpatrick LA, et al.** Calcification in atherosclerosis: bone biology and chronic inflammation at the arterial crossroads. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; 100; 11201–6.
- [72] **Byon CH, Sun Y, Chen J, et al.** Runx2-Upregulated Receptor Activator of Nuclear Factor B Ligand in Calcifying Smooth Muscle Cells Promotes Migration and Osteoclastic Differentiation of Macrophages. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2011; 31; 1387–96.
- [73] **Fujisaki K, Tanabe N, Suzuki N, et al.** Receptor activator of NF-kappaB ligand induces the expression of carbonic anhydrase II, cathepsin K, and matrix metalloproteinase-9 in osteoclast precursor RAW264.7 cells. *Life Sciences* 2007; 80; 1311–8.
- [74] **Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, et al.** RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes & Development* 1999; 13; 2412–24.
- [75] **Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al.** Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89; 309–19.
- [76] **Schneeweis LA, Willard D, Milla ME.** Functional Dissection of Osteoprotegerin and Its Interaction with Receptor Activator of NF- κ B Ligand. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280; 41155–64.
- [77] **Aliprantis AO, Ueki Y, Sulyanto R, et al.** NFATc1 in mice represses osteoprotegerin during osteoclastogenesis and dissociates systemic osteopenia from inflammation in cherubism. *The Journal of Clinical Investigation* 2008; 118; 3775–89.
- [78] **Takayanagi H, Kim S, Koga T, et al.** Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts.

Developmental Cell 2002; 3; 889–901.

- [79] **Zwerina J, Tzima S, Hayer S, et al.** Heme oxygenase 1 (HO-1) regulates osteoclastogenesis and bone resorption. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2005; 19; 2011–3.
- [80] **Sakamoto H, Sakai E, Fumimoto R, et al.** Deltamethrin inhibits osteoclast differentiation via regulation of heme oxygenase-1 and NFATc1. *Toxicology in Vitro* 2012; 26; 817–22.
- [81] **Lu S-H, Chen T-H, Chou T-C.** Magnolol Inhibits RANKL-Induced Osteoclast Differentiation of RAW 264.7 Macrophages through Heme Oxygenase-1-Dependent Inhibition of NFATc1 Expression. *Journal of Natural Products* 2015; 78; 61–8.
- [82] **Barger AC, Beeuwkes R, Lainey LL, et al.** Hypothesis: Vasa Vasorum and Neovascularization of Human Coronary Arteries: A Possible Role in the Pathophysiology of Atherosclerosis. *New England Journal of Medicine* 1984; 310; 175–7.
- [83] **Li W, Östblom M, Xu L-H, et al.** Cytocidal effects of atheromatous plaque components: the death zone revisited. *The FASEB Journal* 2006; 20; 2281–90.
- [84] **Bunn HF, Jandl JH.** Exchange of heme among hemoglobins and between hemoglobin and albumin. *The Journal of Biological Chemistry* 1968; 243; 465–75.
- [85] **Nagy E, Eaton JW, Jeney V, et al.** Red Cells, Hemoglobin, Heme, Iron, and Atherogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2010; 30; 1347–53.
- [86] **Silva G, Jeney V, Chora A, et al.** Oxidized hemoglobin is an endogenous proinflammatory agonist that targets vascular endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2009; 284; 29582–95.
- [87] **Potor L, Bányai E, Becs G, et al.** Atherogenesis may involve the prooxidant and proinflammatory effects of ferryl hemoglobin. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013; 2013; 676425.
- [88] **Wang R.** Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? . *The FASEB Journal* 2002; 16; 1792–8.
- [89] **Kolluru GK, Shen X, Bir SC, et al.** Hydrogen sulfide chemical biology: Pathophysiological roles and detection. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry* 2013; 35; 5–20.

- [90] **Doeller JE, Isbell TS, Benavides G, et al.** Polarographic measurement of hydrogen sulfide production and consumption by mammalian tissues. *Analytical Biochemistry* 2005; 341; 40–51.
- [91] **Olson KR.** Is hydrogen sulfide a circulating “gasotransmitter” in vertebrate blood? *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 2009; 1787; 856–63.
- [92] **Levitt MD, Abdel-Rehim MS, Furne J.** Free and acid-labile hydrogen sulfide concentrations in mouse tissues: Anomalously high free hydrogen sulfide in aortic tissue. *Antioxidants and Redox Signaling* 2011; 15; 373–8.
- [93] **Erickson PF, Maxwell IH, Su LJ, et al.** Sequence of cDNA for rat cystathionine γ -lyase and comparison of deduced amino acid sequence with related *Escherichia coli* enzymes. *Biochemical Journal* 1990; 269; 335–40.
- [94] **Cheng Y, Ndisang JF, Tang G, et al.** Hydrogen sulfide-induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2004; 287.
- [95] **Sivarajah A, McDonald MC, Thiernemann C.** The production of hydrogen sulfide limits myocardial ischemia and reperfusion injury and contributes to the cardioprotective effects of preconditioning with endotoxin, but not ischemia in the rat. *Shock* 2006; 26; 154–61.
- [96] **Elrod JW, Calvert JW, Morrison J, et al.** Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007; 104; 15560–5.
- [97] **Yan H, Du J, Tang C.** The possible role of hydrogen sulfide on the pathogenesis of spontaneous hypertension in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004; 313; 22–7.
- [98] **Zhang C, Du J, Bu D, et al.** The regulatory effect of hydrogen sulfide on hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003; 302; 810–6.
- [99] **Bian JS, Qian CY, Pan TT, et al.** Role of hydrogen sulfide in the cardioprotection caused by ischemic preconditioning in the rat heart and cardiac myocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2006; 316; 670–8.
- [100] **Zhu YZ, Zhong JW, Ho P, et al.** Hydrogen sulfide and its possible roles in myocardial

- ischemia in experimental rats. *Journal of Applied Physiology* 2007; 102; 261–8.
- [101] **Yang G, Sun X, Wang R.** Hydrogen sulfide-induced apoptosis of human aorta smooth muscle cells via the activation of mitogen-activated protein kinases and caspase-3. *The FASEB Journal* 2004; 18; 1782–4.
- [102] **Yang G, Wu L, Wang R.** Pro-apoptotic effect of endogenous H₂S on human aorta smooth muscle cells. *The FASEB Journal* 2006; 20; 553–5.
- [103] **Du J, Hui Y, Cheung Y, et al.** The possible role of hydrogen sulfide as a smooth muscle cell proliferation inhibitor in rat cultured cells. *Heart and Vessels* 2004; 19; 75–80.
- [104] **Jeong SO, Pae HO, Oh GS, et al.** Hydrogen sulfide potentiates interleukin-1 β -induced nitric oxide production via enhancement of extracellular signal-regulated kinase activation in rat vascular smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006; 345; 938–44.
- [105] **Jeney V, Komódi E, Nagy E, et al.** Suppression of hemin-mediated oxidation of low-density lipoprotein and subsequent endothelial reactions by hydrogen sulfide (H₂S). *Free Radical Biology and Medicine* 2009; 46; 616–23.
- [106] **Kamoun P, Belardinelli M-C, Chabli A, et al.** Endogenous hydrogen sulfide overproduction in Down syndrome. *American Journal of Medical Genetics* 2003; 116A; 310–1.
- [107] **Perna AF, Luciano MG, Ingrosso D, et al.** Hydrogen sulphide-generating pathways in haemodialysis patients: a study on relevant metabolites and transcriptional regulation of genes encoding for key enzymes. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24; 3756–63.
- [108] **Cicone JS, Petronis JB, Embert CD, et al.** Successful treatment of calciphylaxis with intravenous sodium thiosulfate. *American Journal of Kidney Diseases* 2004; 43; 1104–8.
- [109] **Hayden MR, Goldsmith DJA.** Sodium thiosulfate: New hope for the treatment of calciphylaxis. *Seminars in Dialysis* 2010; 23; 258–62.
- [110] **Sen U, Vacek TP, Hughes WM, et al.** Cardioprotective role of sodium thiosulfate on chronic heart failure by modulating endogenous H₂S generation. *Pharmacology* 2008; 82; 201–13.
- [111] **Wu SY, Pan CS, Geng B, et al.** Hydrogen sulfide ameliorates vascular calcification induced by vitamin D₃ plus nicotine in rats. *Acta Pharmacologica Sinica* 2006; 27; 299–306.

- [112] **Madaan A, Verma R, Singh AT, et al.** A stepwise procedure for isolation of murine bone marrow and generation of dendritic cells. *Journal of Biological Methods* 2014; 1; 1.
- [113] **Balla G, Jacob HS, Balla J, et al.** Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *The Journal of Biological Chemistry* 1992; 267; 18148–53.
- [114] **Winterbourn CC.** [26] Oxidative reactions of hemoglobin. *Methods in Enzymology* 1990; 186; 265–72.
- [115] **Stipanuk MH, Beck PW.** Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *The Biochemical Journal* 1982; 206; 267–77.
- [116] **J N, A N.** Factors that Affect the Osteoclastogenesis of RAW264.7 Cells. *Journal of Biochemistry and Analytical Studies* 2017; 2.
- [117] **Choi J, Choi SY, Lee SY, et al.** Caffeine enhances osteoclast differentiation and maturation through p38 MAP kinase/Mitf and DC-STAMP/CtsK and TRAP pathway. *Cellular Signalling* 2013; 25; 1222–7.
- [118] **Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, et al.** Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; 96; 3540–5.
- [119] **Park SY, Lee SW, Kim HY, et al.** Suppression of RANKL-induced osteoclast differentiation by cilostazol via SIRT1-induced RANK inhibition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 2015; 1852; 2137–44.
- [120] **Park JH, Lee NK, Lee SY.** Current understanding of RANK signaling in osteoclast differentiation and maturation. *Molecules and Cells* 2017; 40; 706–13.
- [121] **Zarjou A, Jeney V, Arosio P, et al.** Ferritin prevents calcification and osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells. *Journal of the American Society of Nephrology* 2009; 20; 1254–63.
- [122] **Quercioli A, Luciano Viviani G, Dallegri F, et al.** Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin pathway is a promising target to reduce atherosclerotic plaque calcification. *Critical Pathways in Cardiology* 2010; 9; 227–30.
- [123] **Yagi M, Miyamoto T, Sawatani Y, et al.** DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. *Journal of Experimental Medicine* 2005; 202;

345–51.

- [124] **Lee SK, Goldring SR, Lorenzo JA.** Expression of the calcitonin receptor in bone marrow cell cultures and in bone: A specific marker of the differentiated osteoclast that is regulated by calcitonin. *Endocrinology* 1995; 136; 4572–81.
- [125] **Quinn JMW, Morfis M, Lam MHC, et al.** Calcitonin receptor antibodies in the identification of osteoclasts. *Bone* 1999; 25; 1–8.
- [126] **Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL.** Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; 423; 337–42.
- [127] **Li L, Whiteman M, Guan YY, et al.** Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GYY4137): New insights into the biology of hydrogen sulfide. *Circulation* 2008; 117; 2351–60.
- [128] **Srivastava KC.** Evidence for the mechanism by which garlic inhibits platelet aggregation. *Prostaglandins, Leukotrienes and Medicine* 1986; 22; 313–21.
- [129] **Bir SC, Kolluru GK, McCarthy P, et al.** Hydrogen sulfide stimulates ischemic vascular remodeling through nitric oxide synthase and nitrite reduction activity regulating hypoxia-inducible factor-1 α and vascular endothelial growth factor-dependent angiogenesis. *Journal of the American Heart Association* 2012; 1.
- [130] **Lavu M, Bhushan S, Lefer DJ.** Hydrogen sulfide-mediated cardioprotection: Mechanisms and therapeutic potential. *Clinical Science* 2011; 120; 219–29.
- [131] **Mani S, Li H, Untereiner A, et al.** Decreased endogenous production of hydrogen sulfide accelerates atherosclerosis. *Circulation* 2013; 127; 2523–34.
- [132] **Yang G, Wu L, Jiang B, et al.** H₂S as a physiologic vasorelaxant: Hypertension in mice with deletion of cystathionine γ -lyase. *Science* 2008; 322; 587–90.

13. PUBLIKÁCIÓS LISTA



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

Nyilvántartási szám: DEENK/250/2020.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Zavaczki Erzsébet
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10020714

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Zavaczki, E.**, Gáll, T., Zarjou, A., Hendrik, Z., Potor, L., Tóth, C., Méhes, G., Gyetvai, Á., Agarwal, A., Balla, G., Balla, J.: Ferryl Hemoglobin Inhibits Osteoclastic Differentiation of Macrophages in Hemorrhaged Atherosclerotic Plaques.
Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2020, 1-17, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2020/3721383>
IF: 5.076 (2019)
2. **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. 80 (7), 731-739, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.2011.212>
IF: 6.606

További közlemények

3. 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: 3.367 (2019)
4. Oros, M., **Zavaczki, E.**, Vadász, C., Jeney, V., Tótsaki, Á., Lekli, I., Balla, G., Nagy, L., Balla, J.: Ethanol increases phosphate-mediated mineralization and osteoblastic transformation of vascular smooth muscle cells.
J. Cell. Mol. Med. 16 (9), 2219-2226, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1582-4934.2012.01533.x>
IF: 4.753





5. Katkó, M., **Zavaczki, E.**, Jeney, V., Paragh, G., Balla, J., Varga, Z.: Homocysteine metabolism in peripheral blood mononuclear cells: evidence for cystathionine beta-synthase activity in resting state.
Amino Acids. 43 (1), 317-326, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-011-1080-2>
IF: 3.914
6. 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. 25 (1), 164-172, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1359/jbmr.091002>
IF: 7.059
7. Molnár, Z., Emri, T., **Zavaczki, E.**, Pusztahelyi, T., Pócsi, I.: Effects of mutations in the GanB/RgsA G protein mediated signalling on the autolysis of *Aspergillus nidulans*.
J. Basic Microbiol. 46 (6), 495-503, 2006.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.200610174>
IF: 0.722

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 31,497

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
11,682**

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

Debrecen, 2020.08.28.



14. FÜGGELÉK