

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

**A HIF-1 útvonal aktiváció szerepe a vaszkuláris  
kalcifikáció patomechanizmusában**

Tóth Andrea

Témavezető: Dr. Jeney Viktória



**DEBRECENI EGYETEM**

**Molekuláris Sejt-és Immunbiológia Doktori Iskola**

Debrecen, 2023

# A HIF-1 útvonal aktiváció szerepe a vaszkuláris kalcifikáció patomechanizmusában

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

Írta: Tóth Andrea okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai doktori iskolája  
keretében

Témavezető: Dr. Jeney Viktória, PhD

Az értekezés bírálói:

Dr. Bay Péter, MTA doktora

Dr. Pomozi Viola, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Dr. Szondy Zsuzsanna, MTA doktora

tagok: Dr. Bay Péter, MTA doktora

Dr. Pomozi Viola, PhD

Dr. Cervenák László, PhD

Dr. Sarang Zsolt, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A”  
épület tanterme, 2023. június 28. 13 óra

## Bevezetés

A vaszkuláris kalcifikáció az érfalban megtalálható, kalciumban és foszfátban gazdag lerakódás, melyet korábban passzív, az öregedéssel együtt járó folyamatnak írtak le. Napjainkra azonban bizonyossá vált, hogy a kalcifikáció egy aktív, az érfali simaizomsejtek részvételével zajló folyamat. A hidroxipapatit lerakódás az erek intima, vagy a média rétegeiben következhet be. Az intima kalcifikáció a közepes méretű artériákban, ateroszklerotikus plakkokkal asszociálva, pontszerűen; ezzel szemben a média kalcifikáció az erek teljes keresztmetszetében jelenik meg. A média kalcifikáció leggyakrabban a krónikus vesebetegségben szenvedő, illetve a 2-es típusú diabéteszes betegeket érinti. A média kalcifikáció következtében az erek rugalmatlanná válnak, majd balkamrai hipertrófia és végül szívelégtelenség alakul ki. A krónikus vesebetegségben szenvedő betegekben az érrendszer érintettségének következtében jelentősen nagyobb a kardiovaszkuláris események bekövetkezésének kockázata, mint az átlagos normál vesefunkciójú populációban.

Az érfali simaizomsejtek nem véglegesen differenciálódott sejtek, nagyfokú plaszticitással rendelkeznek, így különböző stimulusok hatására fenotípus változáson mennek keresztül. Az érfali simaizomsejtek vaszkuláris kalcifikáció szempontjából legjelentősebb fenotípus váltása az oszteokondrogén irányú differenciálódás. Az érfali simaizomsejtek oszteokondrogén differenciálódása nagymértékű hasonlóságot mutat az őssejtek oszteogenezisével; mindkét folyamat fő szabályozója a Runx2, az oszteogén irányú differenciálódás mester transzkripciós faktora.

A kalcifikációval járó betegségek tanulmányozása során a kalcifikációban szerepet játszó folyamatokat, valamint kalcifikációs induktorokat és inhibitorokat azonosítottak. Fiziológias körülmények között keringő (fetuín-A) és lokális inhibitorok (mátrix Gla protein, pirofoszfát) akadályozzák meg a hidroxipapatit gócképződést, illetve gócnövekedést a lágy szövetekben. Amennyiben a keringő (foszfát, Ca) és lokális induktorok (oxidált LDL, proinflammatorikus citokinek) mennyisége megnő a szisztémás és lokális inhibitorokhoz képest, bekövetkezik az érfali simaizomsejtek oszteokondrogén irányú differenciálódása. Az inorganikus foszfát az érfali simaizomsejtek oszteokondrogén irányú differenciálódásának legjobban karakterizált, és krónikus vesebetegségben szenvedő betegekben legrelevánsabb induktora. A vaszkuláris kalcifikációval összefüggésben egy újonnan feltárt tényező az érfali hipoxia. A hipoxia az az állapot, amikor az oxigén tenziója alacsonyabb, mint az adott szervre/szövetre/sejtre jellemző

normális oxigén szint. Az oxigén szöveti diffúziós távolsága mintegy 200-250  $\mu\text{m}$ , mely lehetővé teszi, hogy az oxigén az érfalat borító endotél egysejtrétegen keresztül eljusson a média réteg simaizom sejtjeihez. Patológias érfal megvastagodás következtében a média rétegben lévő az érfali simaizomsejtek hipoxiássá válnak. A hipoxia jelenlétét mind humán plakkokban, mind érlemeszesedéses állatmodellekben kialakuló léziókban kimutatták, és bizonyították a hipoxia kóroki szerepét az érlemeszesedéses plakk progressziójában is. Az érlemeszesedés mellett a hipoxia jelentős szerepet játszik a krónikus vesebetegség és a végstádiumú veseelégtelenség patogenezisében is.

A megfelelő oxigén szint biztosítása nélkülözhetetlen a celluláris és szisztémás homeosztázis fenntartásában. A hipoxiára adott válasz központi eleme a hipoxia-indukált faktor 1 (HIF-1) útvonal. Krónikus vesebetegségben szenvedő betegek veséjében kimutatták a HIF-1 indukcióját, melyet összefüggésbe hoztak a krónikus vesebetegség progressziójával, valamint Mokas és munkatársai kimutatták a HIF-1 $\alpha$  fokozott expresszióját krónikus vesebeteg patkányok aortájában, valamint azt, hogy a magas inorganikus foszfát (Pi) stabilizálja a HIF-1 $\alpha$ -t érfali simaizomsejtekben. További *in vitro* kísérletekben bizonyították, hogy a hipoxia fokozza a z érfali simaizomsejtek foszfáttal indukált kalcifikációját.

A hipoxia hatása a reaktív oxigén gyökök (ROS) képződésére a mai napig ellentmondásokkal teli tudományterület; egyes munkákban a hipoxia hatására csökkenő, míg másokban emelkedő ROS termelődést írtak le. A túlzott ROS képződés szerepet játszik a vaszkuláris kalcifikáció patofiziológiájában. Emelkedett ROS képződést detektáltak humán kalcifikált aorta billentyűkben, valamint az érfali simaizomsejtek oszteokondrogén irányú differenciálódása során. A ROS képződés vaszkuláris kalcifikációban betöltött jelentős szerepére utal az is, hogy az érfali simaizomsejtek oszteokondrogén irányú differenciálódása antioxidánsokkal gátolható.

A krónikus vesebetegség gyakran társul más betegségekkel, melyek közül leggyakoribbak a kardiovaszkuláris betegségek és az anémia. Az anémia jelentősen növeli a betegek mortalitását és morbiditását. A krónikus vesebetegségben szenvedő betegekre jellemző anémia háttérében több tényező áll; a csökkent eritropoetin (EPO) képződés, a dialízis során fellépő vérveszteség, valamint a vas csökkent gasztrointesztinális felszívódása a fennálló krónikus gyulladás miatt, mely gyakori nem-dializált és dializált betegekben is.

Ezen folyamatok abszolút vashiányhoz vezetnek, ezért az anémia kezelésében elsődleges szempont a megfelelő hemoglobin és hematokrit értékek visszaállítása. Az anémia kezelésének lehetséges alternatívái az eritropoézis stimuláló ágensek (ESA) adminisztrációja és vértranszfúzió. Az ESA fokozza az EPO szintézist, növeli a hemoglobin szintet és, azonban számos

tanulmány kimutatta, hogy az emelt dózisú ESA növeli a kardiovaszkuláris események bekövetkezésének kockázatát, ezért alternatív terápiás lehetőségek kifejlesztésére volt szükség. Felmerült a a prolil-hidroxiláz (PHD) enzim inhibitorok használata, melyek a PHD enzim gátlásán keresztül aktiválják a HIF-1 útvonalat, ez által fokozzák az eritropoetin szintézist, és a vas mobilizációját a csontvelőben.

A klinikai vizsgálatok alapján a GlaxoSmithKline által kifejlesztett prolil-hidroxiláz inhibitor, a kis molekulásúlyú Daprodustat (GSK1278863) tűnt a legígéretesebbnek, melyet 2020-ban Japánban törzskönyveztek krónikus veseelégtelen betegek anémiájának kezelésére. A DPD hatását nem-dializált és dialízisre szoruló krónikus vesebetegségben szenvedő betegekben vizsgálták különböző dózisokban és megállapították, hogy a DPD jól tolerálható volt, nagymértékben növelte a hemoglobin szintet, jelentősen csökkentette a hepcidin szintet, növelte az EPO szintet és indukálta a nem EPO-függő eritropoézist is, így a Daprodustat igen ígéretesnek tűnik és felválthatja az ESA kezelést a betegek körében. Egy hosszabb idejű klinikai tesztelés során kimutatták, hogy akár már 10 mg napi dózis elegendő a hemoglobin célérték eléréséhez.

## Célkitűzések

Munkám során a következő hipotéziseket fogalmaztuk meg:

1. **Hipotézis:** a hipoxia a HIF-1 aktivációján keresztül fokozza az érfali simaizomsejtek oszteokondrogén irányú differenciálódását *in vitro*.
2. **Hipotézis:** a hipoxia a ROS képződés fokozásán keresztül fokozza az érfali simaizomsejtek oszteokondrogén irányú differenciálódását *in vitro*.
3. **Hipotézis:** a hipoxia ROS-függő módon fokozza az egér aorta kalcifikációját *ex vivo*.
4. **Hipotézis:** A DPD a HIF-1 aktivációján keresztül fokozza a humán aorta simaizomsejtek oszteokondrogén irányú differenciálódását *in vitro*.
5. **Hipotézis:** A DPD fokozza az egér aorta kalcifikációját *ex vivo* és *in vivo*.

## Anyagok és módszerek

- Kísérleteinkben humán aorta simaizomsejtekkel (HAoSMC) dolgoztunk, amelyeket sejttenyésztő inkubátorban, 21% O<sub>2</sub> tartalom mellett 37 °C-on és 5% CO<sub>2</sub> jelenlétében tenyésztettük. Hipoxiás kezelés során a sejteket moduláris inkubátor kamrába helyeztük, melyen hipoxiás gázkeveréket (5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> és 94% N<sub>2</sub>) áramoltattunk. Számos kísérletben alkalmaztunk hipoxia mimetikumokat, kobalt-kloridot (200 µmol/L),

deferoxamint (DFO, 20  $\mu\text{mol/L}$ ), 2,2'-bipiridilt (100  $\mu\text{mol/L}$ ), Daprodustatot (DPD, 1-100  $\mu\text{mol/L}$ ). A kalcifikáció indukáláshoz szervesen foszfáttal ( $\text{P}_i$ , 1,5-2,5  $\text{mmol/L}$ , pH 7,4) kiegészített tápfolyadékot használtunk. Kísérleteink egy részében a kalcifikáló médiumot kalciummal ( $\text{Ca}$ , 0,6  $\text{mmol/L}$   $\text{CaCl}_2$ ) is kiegészítettük.

- Alizarin vörös (AR) festéssel detektáltuk az extracelluláris mátrixban felhalmozódó kalcium depozitumokat. Ennek során a sejteket paraformaldehid oldattal fixáltuk, majd AR oldattal festettük. Az eredmény fényképes dokumentálását követően az AR festést kvantáltuk, melynek során a bekötődött AR festéket hexadecylpyridinium klorid oldatban feloldottuk, és 562 nm-en fotometráltuk.
- A kalcifikált sejtek extracelluláris mátrixának kalcium tartalmának meghatározásához a sejteket dekalcináltuk 30 percig szobahőmérsékleten. A sósavas felülúszó kalcium tartalmát QuantiChrom Calcium Assay kit-tel határoztuk.
- A sejtek életképességét MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólium-bromid) módszerrel határoztuk meg. A kezelt sejtek életképességét a kezeletlen sejtek életképességéhez viszonyítva, százalékban adtuk meg.
- Az RNS izolálásához a sejteket Trizol reagenssel lizáltuk. A koncentráció meghatározása után a mintákból 1  $\mu\text{g}$  RNS-t írtunk át cDNS-sé, melyhez High Capacity cDNA RT kiten használtunk. A PCR reakciót valós idejű qPCR készülékkel végeztük. A target gének amplifikációja során iTaq Universal Probes Supermix master mixet és validált FAM fluorofórral konjugált TaqMan próbát és a hozzá előre megtervezett primereket használtuk. A relatív mRNS expressziókat a  $\Delta\Delta\text{Ct}$  módszerrel számítottuk ki, GAPDH-t vagy Ciklofilin A-t használva belső kontrollként.
- A sejtek fehérje expressziójának vizsgálatát Western blot analízissel végeztük, mely során a lizátumokat 7,5-10%-os SDS poliakrilamid gélen választottuk el, majd nitrocellulóz membránra blottoltuk, blokkoltuk tejpor oldattal és az elsődleges antitesttel inkubáltuk egy éjszakán át 4 °C-on. Másnap a membránokat 1 órán keresztül torma peroxidázzal konjugált anti-nyúl vagy anti-egér másodlagos antitesttel inkubáltuk, majd a detektáláshoz kemilumineszcens Western ECL reagenst használtunk és az eredményt röntgen filmen, illetve digitálisan rögzítettük.
- A vaszkuláris endotéliális növekedési faktor (VEGF) meghatározásához a kezelés végén összegyűjtöttük a felülúszót, majd a sejtek által szekretált VEGF mennyiségét ELISA módszerrel határoztuk meg a gyártói előírásoknak megfelelően.

- Az oszteokalcin szint meghatározásához a sejtek extracelluláris mátrixából EDTA-val kinyert oszteokalcin mennyiségét EISA módszerrel határoztuk meg a gyártó által előírtaknak megfelelően.
- A ROS képződés vizsgálatához a sejteket a kezelés végén 5-(és-6)-klorometil-2',7'-diklorodihidrofluoreszcein diacetát, acetyl észtert (CM-H<sub>2</sub>DCFDA) inkubáltuk 30 percig. A sejteket az inkubáció után HBSS-el mostuk és a fluoreszcencia intenzitást mértük (488 nm gerjesztés/533 nm emisszió) 30 percenként 4 órán át. Néhány kísérletünkben alkalmaztunk antioxidánsokat is.
- Géncsendesítést rövid interferáló RNS (siRNS) konstrukciókkal végeztünk. A transzfekciót Oligofectamin reagenssel, illetve Lipofectamine® RNAiMAX reagenssel végeztük.
- A hipoxiás kezelést és a krónikus veseelégtelen (CKD) egérmodellen végzett vizsgálatainkat a "Hipoxia szerepe a vaszkuláris kalcifikációban" című 3/2018/DEMÁB számon nyilvántartott etikai engedélyben leírtak szerint végeztük. A kísérletekben C57BL/6 egeret (8-12 hetes, hím) használtunk fel, melyeket a hipoxiás kezelés során 10% O<sub>2</sub> tartalmú kamrában tartottuk. A DPD-t 1% metilcellulózban szuszpendáltuk és naponta gyomorszondán keresztül adagoltuk.
- A CKD-s kísérletekben a plazma urea és kreatinin szinteket Cobas® c502 készülékkel határoztuk meg. A hematológiai paramétereket trinátrium-citráttal antikoagulált vérből Siemens Advia-2120i automatával határoztuk meg.
- Az aorta kalcifikáció érzékeny kimutatására OsteoSense festéket és IVIS Spectrum In Vivo Imaging készüléket használtunk.
- Az egér aorta gyűrűk hisztológiai vizsgálatához a szövetdarabokat 10%-os formalinban fixáltuk, majd paraffinba ágyaztuk. A hematoxin-eozin festést 5 µm vastag paraffinmentesített rehidratált metszeteken végeztük el. Az egér aorta gyűrűkön von Kossa festést is végeztünk.
- *Ex vivo* aorta szövettenyésztéses kísérleteinkben C57BL/6 egerek aszeptikus körülmények között eltávolított, 4-5 mm hosszúságúra darabolt aortáját használtuk.

## Eredmények

### *1. A hipoxia és a hipoxia mimetikum Daprodustat hatása a HIF-1 útvonal aktivációjára, valamint az érfali simaizomsejtek kalcifikációjára*

Elsőként megvizsgáltuk a HIF-1 útvonal aktivációját humán aorta simaizomsejtekben hipoxiás körülmények között, valamint hipoxia mimetikumok (kobalt-klorid, deferoxamin, 2,2'-bipiridil és DPD) jelenlétében és megállapítottuk, hogy a hipoxia és a hipoxia mimetikumok nagymértékben fokozták a HIF-1 útvonal aktivációját, valamint a HIF-1 $\alpha$  szabályozása alatt álló célfehérjék Glut-1 és VEGFA expresszióját. Ezután megvizsgáltuk az oszteokondrogenikus markerek, Runx2, Sox9 és ALP fehérje expresszióját és eredményeink arra utalnak, hogy a hipoxia fokozza az érfali simaizomsejtek oszteokondrogén irányú differenciálódását. Továbbá megvizsgáltuk a csontban található kalcium kötő fehérje, az oszteokalcin szintjét és megállapítottuk, hogy hipoxiás kezelés és DPD hatására az oszteokalcin szint nagymértékben nőtt humán aorta simaizomsejtekben. Megállapítottuk, hogy a hipoxia és a DPD fokozza az extracelluláris mátrix (ECM) kalcifikációját *in vitro* és *ex vivo*, továbbá a hipoxiás és DPD kezelés időfüggő módon fokozza az ECM kalcifikációját érfali simaizomsejtekben.

## ***2. A HIF-1 útvonal szerepe a hipoxia és DPD által indukált kalcifikációban***

Következő kísérleteinkben a HIF-1 útvonal szerepét vizsgáltuk az érfali simaizomsejtek hipoxia és DPD által indukált kalcifikációjában. Ennek során a HIF-1 transzkripció aktivitását gátló chetomint alkalmazva meghatároztuk a VEGFA és Glut1 mRNS, valamint fehérje expresszióját és megállapítottuk, hogy a chetomin gátolta a VEGFA és Glut-1 expressziójának hipoxia által előidézett emelkedését. Ezenkívül siRNS technikával HIF-1 $\alpha$  knock-down sejteket hoztuk létre, majd vizsgáltuk a sejtek kalcifikációs képességét DPD jelenlétében és megállapítottuk, hogy a HIF-1 $\alpha$  gén csendesített sejtek kalcifikációs képessége elmarad a kontroll sejtekhez képest, melyet Alizarin vörös festéssel, kalcium méréssel és oszteokalcin szint méréssel igazoltunk.

## ***3. A ROS képződés szerepe az érfali simaizomsejtek oszteokondrogén irányú differenciálódásában és kalcifikációjában***

Elsőként megvizsgáltuk a hipoxiás körülmények között tartott sejtek ROS termelődését és megállapítottuk, hogy hipoxiában fokozódott a ROS képződés érfali simaizomsejtekben.

Ezt követően a képződött a ROS keletkezésének helyét vizsgáltuk, ezért különböző antioxidánsok jelenlétében megvizsgáltuk a ROS képződésének mértékét. Az N-acetil-cisztein, a nátrium-piruvát és a rotenon hatékonyan gátolta a hipoxiás körülmények között tartott érfali

simaizomsejtek ROS képződését, mely arra utal, hogy a hipoxia hatására képződő ROS mitokondriális eredetű. Ezután antioxidánsok jelenlétében megvizsgáltuk az érfali simaizomsejtek HIF-1 $\alpha$  expresszióját és megállapítottuk, hogy a ROS képződés csökkenésével párhuzamosan az antioxidánsok csökkentették az érfali simaizomsejtek HIF-1 $\alpha$  expresszióját. A továbbiakban az oszteokondrogén irányú differenciáció és az ECM kalcifikációjának ROS függését vizsgáltuk humán aorta érfali simaizomsejtekben. Megállapítottuk, hogy a Runx2 és Sox9 mRNS expressziójának hipoxia általi fokozódása antioxidánsok jelenlétében elmarad. Továbbá meghatároztuk az antioxidánsok hatását az érfali simaizomsejtek hipoxia-indukált kalcifikációjára és kimutattuk, hogy az antioxidánsok jelenlétében az ECM kalcifikációja, kalcium tartalma és oszteokalcin szintje is nagymértékben csökkent érfali simaizomsejtekben.

#### ***4. A hipoxia fokozza az egér aorták HIF-1 aktivációját és oszteogén irányú átprogramozódását, valamint kalcifikációját***

Ezt követően megvizsgáltuk a hipoxia hatását *in vivo*, egérmodellben is. Meghatároztuk a tüdő Glut-1 és Runx2 mRNS expresszióját és megállapítottuk, hogy a Glut-1 12 óra, míg a Runx2 24 óra elteltével mutatott szignifikáns emelkedést. Ezzel párhuzamosan az aortákban is jelentősen nőtt a Glut-1 és Runx2 mRNS szintje. A hipoxia kalcifikációra kifejtett hatását *ex vivo* aorta szövetkultúra modellben vizsgáltuk tovább. Ehhez aszeptikus körülmények között eltávolítottuk a C57BL/6 egerek aortáját, majd a megtisztított aorta darabokat normoxiás és hipoxiás körülmények között, valamint oszteogén tápfolyadékkal stimulálva tartottuk 6 napon keresztül. Kimutattuk, hogy a hipoxiás kezelés hatására több, mint hatszorosára nőtt az aorta kalcifikációja normoxiához viszonyítva.

#### ***5. A DPD sikeresen korrigálja az anémiát, emellett fokozza az aorta kalcifikációját krónikus veseelégtelen egérmodellben***

Beállítottunk egy *in vivo* egérmodellt, mely során C57BL/6 egerekben veseelégtelenséget indukáltunk. Ezt követően a vesebetegség klinikai paramétereinek változását határoztuk meg DPD jelenlétében, illetve hiányában. Megállapítottuk, hogy DPD kezeléstől függetlenül a szérum foszfát, urea és kreatinin szintje fokozódott. Továbbá megvizsgáltuk a DPD hatását a hematológiai paraméterekre, és megállapítottuk, hogy a legmagasabb dózisú DPD sikeresen korrigálta a hemoglobint, a vörösvértest szám és a hematokrit krónikus vesebetegség által indukált csökkenését. Következő kísérletünkben a DPD lehetséges kalcifikációt fokozó hatását vizsgáltuk meg. Ebben a kísérletben a DPD-t az anémiát sikeresen korrigáló dózisban (15

mg/kg/nap) adtuk. A kísérlet végén az elaltatott egerekbe retro-orbitálisan osteosense (2 nmol/egér) festéket injektáltunk, és 12 óra elteltével izoláltuk az aortát. A kalcifikációt közeli infravörös képalkotó technika segítségével detektáltuk IVIS készülékkel (Perkin Elmer). A veseelégtelen egerek aortájában mért fluoreszcencia intenzitás lényegesen nagyobb volt a kontrollhoz viszonyítva, azonban az osteosense festék felhalmozódása még jelentősebb volt a DPD kezelést kapó egerekből származó aortákban. A kalcifikáció kimutatására az aorta metszeteken von Kossa festést is végeztünk, mely csak a DPD-vel kezelt egerekből származó aorta mintákon mutatott pozitivitást.

## Diszkusszió

Az ektópiás kalcifikáció legismertebb és legjobban tanulmányozott formája a vaszkuláris kalcifikáció. A kalcifikáció során kalciumban és foszfátban gazdag hidroxipatit rakódik le az érfal intima és média rétegében, melynek következtében az erek rugalmassága csökken, és jelentősen megnő a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásának kockázata. A kalcifikáció során megfigyelhető az érfali simaizomsejtek oszteokondrogén irányú differenciálódása, mely hasonlóságot mutat a fiziológiás csontképződéssel. A média kalcifikáció számos betegség patológiájában ismert, mint például krónikus vesebetegségben és 2-es típusú diabéteszben.

Az intima és média kalcifikáció patomechanizmusában van egy közös pont, ami nem más, mint a hipoxia. Az erek média rétegében található simaizomsejtek az érlumen irányából diffúzió által jutnak oxigénhez. Az oxigén szöveti diffúziós távolsága limitált, és amennyiben az endotél sejtréteg alatt felhalmozódó lipidréteg vastagsága ezt meghaladja, a plakk alatt elhelyezkedő simaizomsejtek hipoxiássá válnak. A hipoxia az érlemezésedéssel plakk progresszióját sokféle módon befolyásolja, azonban a kalcifikációra gyakorolt hatását mi vizsgáltuk elsőként.

A hipoxia krónikus vesebetegségben is jelen van, mely elsőként a vesét érinti, de Moks és munkatársai a HIF-1 $\alpha$  expressziójának fokozódását írták le az aorta média rétegben krónikus vesebeteg patkánymodellben. A hipoxia és a kalcifikáció közötti lehetséges kapcsolatra utal néhány klinikai megfigyelés is, melyekben alvási apnoés betegekben abdominális aorta kalcifikációt, illetve krónikus obstruktív tüdőbetegségben szenvedő betegekben az alacsony véroxigén szint mellett emelkedett pulmonáris és koronária artéria kalcifikációt figyeltek meg.

Ezekre a klinikai megfigyelésekre alapozva állítottuk fel hipotézisünket és munkánk során a hipoxia közvetlen hatását vizsgáltuk az érfali simaizomsejtek oszteokondrogén irányú differenciálódására és kalcifikációjára. Kimutattuk, hogy a hipoxia fokozza az érfali simaizomsejtek oszteokondrogén irányú differenciálódását és kalcifikációját. Kísérleteink

során megállapítottuk, hogy az érfali simaizomsejtek hipoxia által indukált oszteokondrogén átprogramozódása HIF-1 függő. Ezzel összhangban Ruffenach és társai kimutatták, hogy HIF-1 $\alpha$  túltermelése esetén fokozódott, míg HIF-1 $\alpha$  hiányában csökkent a pulmonáris artéria simaizomsejtek kalcifikációja.

A hipoxia és ROS képződés közötti komplex kapcsolat megismerésével számos tanulmányban foglalkoztak. Egyes publikációkban a ROS képződés csökkenését, míg másokban annak fokozódását írták le hipoxiának kitett sejtekben. A fokozott ROS képződésnek kulcsszerepet tulajdonítanak vaszkuláris kalcifikációban és az érfali simaizomsejtek oszteogén irányú differenciálódásában.

Munkánk során megvizsgáltuk a ROS képződés szerepét az érfali simaizomsejtek hipoxia által indukált oszteokondrogén irányú differenciálódásában és kalcifikációjában. A szakirodalmi ismeretek egy részével összhangban kimutattuk, hogy a hipoxia fokozza a ROS képződést simaizomsejtekben. Antioxidánsok segítségével arra a következtetésre jutottunk, hogy a hipoxia által a simaizomsejtekben generált ROS mitokondriális eredetű. Ezen túlmenően megállapítottuk, hogy az antioxidánsok gátolják a sejtek hipoxia által indukált oszteokondrogén irányú differenciálódását és HIF-1 $\alpha$  expresszióját. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a hipoxia fokozza a ROS képződést, az emelkedett ROS pedig aktiválja a HIF-1 útvonalat.

*Ex vivo* aorta szövetkultúrában tovább vizsgálva a hipoxia által indukált kalcifikáció ROS- és HIF-1 függését, és megállapítottuk, hogy az aorták hipoxia által előidézett kalcifikációja gátolható mind antioxidánsokkal, mind HIF-1 inhibitorokkal. Eredményeink azt sugallják, hogy az érfali simaizomsejtek hipoxia által indukált oszteogén irányú átprogramozódása és kalcifikációja ROS és HIF-1 függő.

Az emelkedett foszfát szint a vaszkuláris kalcifikáció legismertebb induktora és kulcsszerepet játszik a krónikus vesebetegség-asszociált vaszkuláris kalcifikáció kialakulásában. A krónikus vesebetegség gyakran társul más betegségekkel, mint például anémiával. Az anémia kialakulásának hátterében a beszűkült vesefunkció következtében lecsökkent EPO szint és a krónikus gyulladás okozta vashiány áll. Az anémia kezelésének célpontja az EPO szint és a vörösvértest szám növelése, melyet ESA, valamint rhEPO alkalmazásával igyekeznek elérni, azonban számos tanulmányban leírták ezen gyógyszerek kardiovaszkuláris rizikót fokozó hatását, mely krónikus vesebetegek esetében eleve megemelkedett.

Alternatív terápiás lehetőségként merült fel az anémia kezelésre a HIF-1 útvonal aktivációja a prolil-hidroxiláz enzimek gátlásán keresztül, mely az EPO szintézis indukálásához

vezet. A prolil-hidroxiláz inhibitorok a HIF-1 stabilizációjára gyakorolt hatásuk miatt hipoxia mimetikumoknak tekinthetők. Számos gyógyszer cég fejlesztett ki prolil-hidroxiláz inhibitorokat, azonban a klinikai vizsgálatok során a legígéretesebbnek a DPD bizonyult, melynek alkalmazását 2020-ban engedélyezték Japánban. A prolil-hidroxiláz inhibitorok klinikai tesztelése során a kardiovaszkuláris rizikó tanulmányozására nem irányultak széleskörű vizsgálatok, ezért munkánk során azt a célt tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a DPD, mint hipoxia mimetikum hatását magas foszfáttal indukált kalcifikációra *in vitro*, *ex vivo* és *in vivo* modellekben. Munkánk során kimutattuk, hogy a DPD fokozza az érfali simaizomsejtek magas foszfáttal indukált kalcifikációját. Korábban egy másik prolil-hidroxiláz inhibitorral, Roxadustattal is végeztek hasonló *in vitro* kalcifikációs kísérletet, melyben a mi eredményünkkel összhangban azt találták, hogy a Roxadustat a DPD-hez hasonlóan fokozza a simaizomsejtek magas foszfáttal indukált kalcifikációját. A DPD hatását *ex vivo* aorta szervkultúra modellben is megvizsgáltuk, és hasonlóan az *in vitro* kalcifikációs modellünkben tapasztaltakhoz, megállapítottuk, hogy a DPD fokozza az aorták emelt foszfáttal indukált kalcifikációját. Ezt követően, a DPD hatását egy egérmodellben *in vivo* körülmények között vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy a DPD 15 mg/kg/nap dózisban alkalmazva korrigálja a krónikus vesebetegség-asszociált anémiát, de a vesebetegség paramétereit (szérum kreatinin, urea) nem befolyásolja. Ugyanakkor vizsgálataink arra is fényt derítettek, hogy ebben a dózisban alkalmazva a DPD fokozza az aorta kalcifikációt.

A HIF-1 útvonal hipoxia általi aktivációja fokozza az érfali simaizomsejtek kalcifikációját, ezért azt feltételeztük, hogy a DPD kalcifikációt fokozó hatásában a HIF-1 útvonal aktivációja jelentős szerepet játszik. A DPD kalcifikációt fokozó hatása elmaradt HIF-1 inhibitor jelenlétében vagy HIF-1 $\alpha$  géncsendesített sejtekben, mely feltételezésünk helyességét támasztja alá, és bizonyítja a HIF-1 útvonal szerepét a DPD pro-kalcifikációs hatásában.

Mindezen eredményeket összegezve feltételezzük, hogy a DPD az anémia sikeres korrigálása mellett fokozhatja a krónikus vesebetegséghez társuló vaszkuláris kalcifikációt és a kardiovaszkuláris események bekövetkezésének kockázatát krónikus vesebetegekben. Egy tavaly megjelent összefoglaló tanulmányban összehasonlították az epoietin alfa és a DPD kardiovaszkuláris kimenetelre gyakorolt hatását olyan dializált betegekben, akik 8-11,5 g/dl hemoglobin értékekkel rendelkeztek. A tanulmányban 2964 beteg vett részt, a betegek eredményeit 2,5 éven keresztül vizsgálták és megállapították, hogy a DPD-kezelt betegek 25,2%-ában míg az epoetin alfával kezelt betegek 26,7%-ában figyeltek meg súlyos kardiovaszkuláris szövődményeket.

Ezek ismeretében az új generációs hipoxia mimetikumok alkalmazása előtt mérlegelni kell a haszon/kockázat arányt az anémia súlyosságának és a beteg kardiovaszkuláris állapotának figyelembevételével.

### **Az értekezésben ismertetett új tudományos eredmények összefoglalása**

1. A hipoxia és a DPD is fokozza az érfali simaizomsejtek oszteokondrogén irányú differenciálódását és extracelluláris mátrix kalcifikációját.
2. A hipoxia és a DPD által előidézett oszteokondrogén irányú átprogramozódás is HIF-1 függő.
3. A hipoxia fokozza a mitokondriális eredetű ROS termelődését, mely ROS termelődés jelentős szerepet játszik az érfali simaizomsejtek hipoxia által indukált oszteokondrogén irányú differenciálódásában és kalcifikációjában.
4. A hipoxia és a Daprodustat is fokozza az aorta kalcifikációt *ex vivo* egér aorta szövettenyészetben.
5. A hipoxia által előidézett kalcifikáció antioxidánsokkal és HIF-1 inhibitorral gátolható *ex vivo* egér aorta szövettenyészetben.
6. A hipoxia indukálja az egér aorta oszteogén irányú átprogramozódását *in vivo*.
7. A DPD (15 mg/kg) korrigálja a krónikus vesebetegség következtében kialakult anémiát, ugyanakkor mellékhatása az aorta kalcifikáció fokozódása CKD egérmodellben.

## Saját publikációk jegyzéke



**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/356/2022.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Tóth Andrea

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Tóth, A.**, Csiki, D. M., Nagy, B. J., Balogh, E., Lente, G., Ababneh, H., Szőör, Á., Jeney, V.:  
Daprodustat Accelerates High Phosphate-Induced Calcification Through the Activation of  
HIF-1 Signaling.  
*Front. Pharmacol.* 13, 1-12, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2022.798053>  
IF: 5.988 (2021)
2. Balogh, E., **Tóth, A.**, Méhes, G., Trencsényi, G., Paragh, G., Jeney, V.: Hypoxia Triggers  
Osteochondrogenic Differentiation of Vascular Smooth Muscle Cells in an HIF-1 (Hypoxia-  
Inducible Factor 1)-Dependent and Reactive Oxygen Species-Dependent Manner.  
*Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 39 (6), 1088-1099, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.312509>  
IF: 6.604

### További közlemények

3. Chowdhury, A., Balogh, E., Ababneh, H., **Tóth, A.**, Jeney, V.: Activation of Nrf2/HO-1 Antioxidant  
Pathway by Heme Attenuates Calcification of Human Lens Epithelial Cells.  
*Pharmaceuticals (Basel)*. 15 (5), 1-13, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ph15050493>  
IF: 5.215 (2021)
4. Balogh, E., Chowdhury, A., Ababneh, H., Csiki, D. M., **Tóth, A.**, Jeney, V.: Heme-Mediated  
Activation of the Nrf2/HO-1 Axis Attenuates Calcification of Valve Interstitial Cells.  
*Biomedicines*. 9 (4), 1-17, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines9040427>  
IF: 4.757





5. Nyakundi, B. B., Erdei, J. Z., **Tóth, A.**, Balogh, E., Nagy, A., Nagy, B. J., Novák, L., Bognár, L., Paragh, G., Kappelmayer, J., Jeney, V.: Formation and Detection of Highly Oxidized Hemoglobin Forms in Biological Fluids during Hemolytic Conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2020, 1-13, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2020/8929020>  
IF: 6.543
6. **Tóth, A.**, Balogh, E., Jeney, V.: Regulation of Vascular Calcification by Reactive Oxygen Species. *Antioxidants*. 9 (10), 1-24, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/antiox9100963>  
IF: 6.312
7. Erdei, J. Z., **Tóth, A.**, Nagy, A., Nyakundi, B. B., Fejes, Z., Nagy, B. J., Novák, L., Bognár, L., Balogh, E., Paragh, G., Kappelmayer, J., Bácsi, A., Jeney, V.: The Role of Hemoglobin Oxidation Products in Triggering Inflammatory Response Upon Intraventricular Hemorrhage in Premature Infants. *Front. Immunol.* 11, 228, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2020.00228>  
IF: 7.561
8. Nyakundi, B. B., **Tóth, A.**, Balogh, E., Nagy, B. J., Erdei, J. Z., Ryffel, B., Paragh, G., Cordero, M. D., Jeney, V.: Oxidized hemoglobin forms contribute to NLRP3 inflammasome-driven IL1[beta] production upon intravascular hemolysis. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis. Dis.* 1865 (2), 464-475, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.10.030>  
IF: 4.352
9. Erdei, J. Z., **Tóth, A.**, Balogh, E., Nyakundi, B. B., Bányai, E., Ryffel, B., Paragh, G., Cordero, M. D., Jeney, V.: Induction Of NLRP3 Inflammasome Activation By Heme In Human Endothelial Cells. *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2018, 1-14, 2018.  
DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/4310816>  
IF: 4.868





**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

10. Balogh, E., **Tóth, A.**, Szilágyi-Tolnai, E., Bodó, T., Bányai, E., Szabó, D. J., Petrovski, G., Jeney, V.: Osteogenic differentiation of human lens epithelial cells might contribute to lens calcification.  
*Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis Dis.* 1862 (9), 1724-1731, 2016.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.06.012>  
IF: 5.476

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 57,676**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):  
12,592**

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

Debrecen, 2022.07.01.



## Köszönetnyilvánítás

Elsőként témavezetőmnek, *Dr. Jeney Viktóriának* tartozom hatalmas köszönettel a példaértékű szakmai irányításáért, tanácsaiért, segítségéért és türelméért, hiszen immáron 8 éve egyengeti utamat a kutatói pályán. Az elmúlt évek alatt bármikor fordulhattam hozzá útmutatásért, támogatásért, és nem utolsó sorban rengeteget tanultam, melyeket igyekszek meghálálni és kamatoztatni.

Köszönet *Dr. Paragh György* és *Dr. Papp Zoltán* professzor uraknak, hogy az általuk irányított intézményekben végezhettem munkám egy részét. Köszönöm a Vaszkuláris Pathofiziológiai Kutatócsoport volt és jelenlegi munkatársainak közreműködését és támogatását, kiemelve *Dr. Balogh Enikőt*, *Dr. Erdei Juditot*, *Dr. Benard Bogonko Nyakundit* és *Lente Grétát*, *Arpan Chowdhuryt* és *Haneen Ababneht* az évek alatt kialakult barátságunkért. Köszönettel tartozom *kollaborációs partnereinknek* és a publikációk *társszerzőinek* az értékes munkájukért és támogatásukért.

Végül szeretném megköszönni *családomnak és barátaimnak* a támogatást, valamint a biztatást. Külön szeretném kiemelni *szüleimet* az odaadó biztatásért és páromat, *Csiki Dávid Mátét*, aki PhD hallgató társamból vált életem szerelmévé, és az ő folyamatos támogatása nélkül ez a munka nem születhetett volna meg.

A munka a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap (NKFIH, K116024 és K131535), a Magyar Tudományos Akadémia 96050 számú, valamint az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával a GINOP-2.3.2-15-2016-00005 számú projektek és Új Nemzeti Kiválóság Program Doktori Hallgatói Ösztöndíjának (ÚNKP-20-2-II) támogatásával valósult meg.