

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

TÓTH ANDREA

**A HIF-1 ÚTVONAL AKTIVÁCIÓ SZEREPE A VASZKULÁRIS
KALCIFIKÁCIÓ PATOMECHANIZMUSÁBAN**

DEBRECENI EGYETEM

**MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI
ISKOLA**

Debrecen, 2023

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

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

Tartalom

1. Rövidítések jegyzéke	5
2. Bevezetés	7
3. Irodalmi áttekintés	8
3.1 Vaszkuláris kalcifikáció	8
3.2 A vaszkuláris simaizomsejtek szerepe a kalcifikációban	9
3.3 A vaszkuláris kalcifikáció induktorai és inhibitorai	11
3.4 A foszfát szerepe krónikus vesebetegség-asszociált vaszkuláris kalcifikációban	14
3.5 A hipoxia és a HIF-1 útvonal aktivációja	15
3.6 A HIF-1 útvonal aktivációjának jelentősége vaszkuláris kórképekben	16
3.7 A hipoxia és a ROS képződés közötti kapcsolatrendszer	18
3.8 Hipoxia mimetikumok: új generációs terápiás lehetőségek a krónikus vesebetegség-asszociált anémia kezelésében	20
4. Célkitűzések	23
5. Anyagok és módszerek	25
5.1 Anyagok	25
5.2 Sejtenyésztes	25
5.3 Hipoxia kezelés	25
5.4 A kalcifikáció indukálása magas foszfáttal	25
5.5 Alizarin vörös festés	25
5.6 Az extracelluláris mátrix kalcium tartalmának meghatározása	26
5.7 A sejtek viabilitásának vizsgálata	26
5.8 Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (qRT-PCR)	26
5.9 Western blot analízis	27
5.10 VEGF szint meghatározása	28
5.11 Oszteokalcin szint meghatározása	28
5.12 ROS képződés vizsgálata	28
5.13 Géncsendesítés	28
5.14 Állatkísérletek	28
5.15 Az aorta kalcifikáció detektálása kalcium méréssel és Osteosense festéssel	29
5.16 A vesefunkció és az anémia laboratóriumi paramétereinek meghatározása	29
5.17 Ex vivo aorta szövettenyésztés modell	30
5.18 Hisztológia	30
5.19 Statisztikai analízis	30

6. Eredmények	31
6.1 A hipoxia fokozza a vaszkuláris simaizomsejtek oszteokondrogén irányú differenciálódását	31
6.2 A hipoxia fokozza a vaszkuláris simaizomsejtek extracelluláris mátrix mineralizációját	33
6.3 A hipoxia a HIF-1 útvonal aktivációján keresztül fokozza a vaszkuláris simaizomsejtek oszteokondrogén differenciálódását	34
6.4 A ROS szerepe a vaszkuláris simaizomsejtek HIF-1 aktivációjában	35
6.5 A ROS szerepe a vaszkuláris simaizomsejtek oszteokondrogén differenciálódásában és az extracelluláris mátrix kalcifikációjában	37
6.6 Daprodustat fokozza a HIF-1 útvonal aktivációját	39
6.7 A Daprodustat fokozza a vaszkuláris simaizomsejtek foszfáttal indukált kalcifikációját és ex vivo egér aorta szövettényészetben	41
6.8 A Daprodustat sikeresen korrigálja az anémiát, emellett fokozza az aorta kalcifikációt krónikus vesebeteg egérmodellben	43
6.9 A Daprodustat pro-kalcifikációs hatásában a HIF-1 útvonal kritikus szerepet játszik	45
7. Diskusszió	47
8. Konklúziók	52
9. Összefoglalás	53
10. Summary	54
11. Köszönetnyilvánítás	55
12. Irodalomjegyzék	56
13. Publikációs lista	66
14. Tárgyszavak	69

1. Rövidítések jegyzéke

ALP: alkalikus foszfatáz

ATP: adenzin-trifoszfát

BMP-2: bone morphogenetic protein 2

BP: bipiridil

CC: kobalt-klorid

Chet: chetomin

CKD: krónikus vesebetegség

COPD: krónikus obstruktív tüdőbetegség

DFO: deferoxamin

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DPD: Daprodustat

ECM: extracelluláris mátrix

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

ELISA: enzim kapcsolt immunoszorbens assay

EPO: eritropoietin

ESA: eritropoézis stimuláló ágens

FBS: főtális borjú szérum

FGF-23: fibroblaszt növekedési faktor 23

GAPDH: gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz

Glut-1: glükóz transzporter 1

HAoSMC: humán aorta simaizomsejt

HBSS: Hanks' Balanced Salt Solution

HIF-1 α : hipoxia indukáló faktor 1 alfa

HIF-2 α : hipoxia indukáló faktor 2 alfa

IL-1 β : interleukin-1 béta

KDIGO: Kidney Disease: Improving Global Outcomes

LDL: alacsony denzitású lipoprotein

MGP: mátrix Gla protein
MMP-9: mátrix metalloproteináz 9
MSX2: Msh homeobox 2
MTB: mangán-TBAP-klorid
NAC: N-acetil-cisztein
Nox: NADP(H)-oxidáz
OCN: oszteokalcin
OSA: obstruktív alvási apnea
PBS: foszfáttal pufferolt sóoldat
PHD: prolil-hidroxiláz
Pi: inorganikus foszfát
Pit-1/2: nátrium-foszfát-ko-transzporter 1/2
rhEPO: rekombináns eritropoetin
ROS: reaktív oxigén formák
Rot: rotenone
Runx2: runt-related transzkripció faktor 2
SDS: nátrium-dodecil-szulfát
SM-22 α : simaizom protein 22 alfa
Sox9: Sry-boksz transzkripció faktor 9
SP: nátrium-piruvát
TNF- α : tumor nekrosis faktor 1 alfa
VEGF: vaszkuláris endotéliális növekedési faktor
VSMC: vaszkuláris simaizomsejt
 α -SMA: alfa simaizom aktin

2. Bevezetés

A vaszkuláris kalcifikáció az érfalban megtalálható, kalciumban és foszfátban gazdag lerakódás, amelyet korábban passzív, az öregedéssel együtt járó folyamatnak írtak le. Az utóbbi két évtized aktív kutatásának köszönhetően azonban fény derült arra, hogy a vaszkuláris kalcifikációnak több formája létezik és egy aktív, elsősorban a vaszkuláris simaizomsejtek részvételével zajló szabályozott folyamat. A vaszkuláris kalcifikáció számos betegség patológiájával hozható összefüggésbe, mint például az ateroszklerózissal, a diabétesszel és a krónikus veseelégtelenséggel. A krónikus vesebetegségben (CKD) szenvedő betegek magas mortalitásához jelentős mértékben hozzájárul a vaszkuláris kalcifikáció.

A vaszkuláris kalcifikáció induktorainak és inhibitorainak, valamint molekuláris mechanizmusának feltárása egy napjainkban is aktívan kutatott tudományterület. Az egyik nemrég feltárt tényező az érfali hipoxia. A média rétegben található érfali simaizomsejtek oxigén és tápanyagellátása a lumen irányából valósul meg. Patológiás érfal megvastagodás következtében azonban a vaszkuláris simaizomsejtek hipoxiássá válnak.

Csökkent oxigén tenzió esetén az eukarióta sejtekben működő, a homeosztázis szabályozásában részt vevő hipoxia-indukáló faktor 1 (HIF-1) aktiválódik, melynek elsődleges szerepe a túlélés biztosítása oxigénhiányos környezetben. A HIF-1 útvonal aktivációja azonban a homeosztázis fenntartása mellett patológiás folyamatok beindításában is szerepet játszhat.

A HIF-1 útvonal aktivációja egyben terápiás célpont is. A CKD-ban szenvedő betegek anémiájának kezelésre alkalmazott új generációs gyógyszerek, mint például a Daprodustat (DPD) a prolil-hidroxiláz enzimek gátlásán keresztül aktiválják a HIF-1 útvonalat és az eritropoézist.

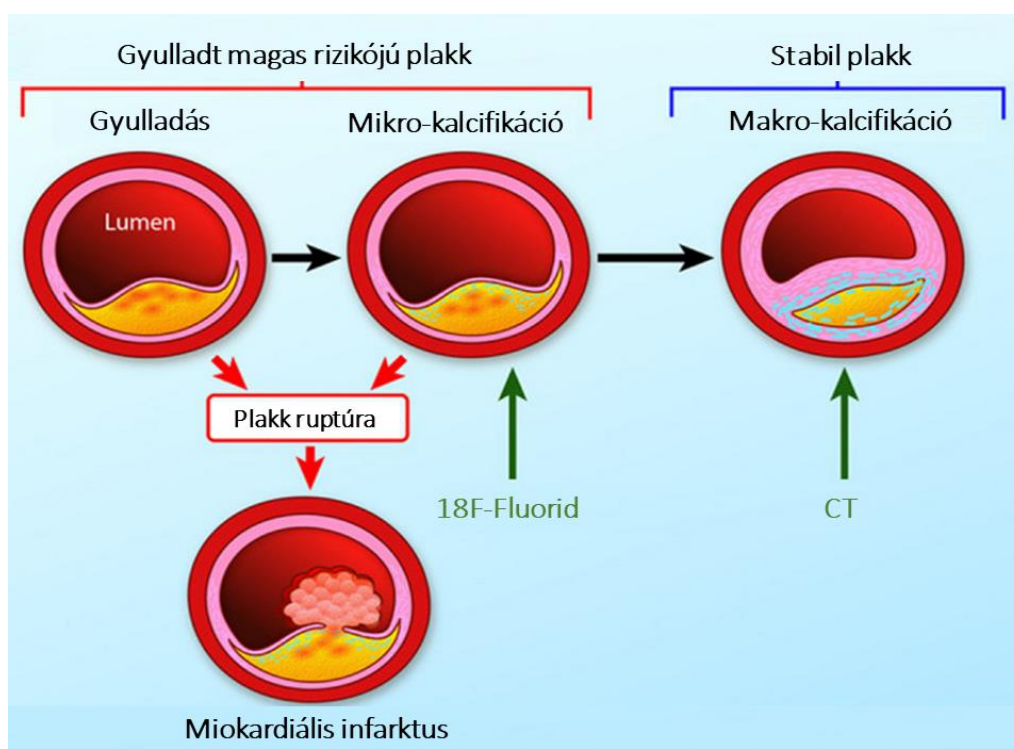
Az érfali hipoxia jelentős etiopatogenetikai tényező az érrelmeszesedésben, azonban a vaszkuláris kalcifikációra kifejtett hatása kevésbé ismert. Ezért munkám során a hipoxia és a DPD hatását vizsgáltam vaszkuláris simaizomsejtek oszteokondrogén transz-differenciálódására. A DPD pro-kalcifikációs hatását az *in vitro* módszeren kívül *ex vivo* aorta szövettenyészetben és adeninnel indukált veseelégtelen egerekben is vizsgáltam.

3. Irodalmi áttekintés

3.1 Vaszkuláris kalcifikáció

A vaszkuláris kalcifikáció a lágyyszöveti, úgynevezett ektópiás kalcifikáció leggyakoribb formája, melynek során kalciumban és foszfátban gazdag hidroxiapatit rakódik le az érfalban. A hidroxiapatit lerakódás az erek intima vagy a média rétegeiben következhet be, ennek megfelelően megkülönböztetünk intima- és média kalcifikációt. Az intima kalcifikáció a közepes méretű artériákban, ateroszklerotikus plakkokkal asszociálva, pontszerűen; ezzel szemben a média kalcifikáció az erek teljes keresztmetszetében jelenik meg [1].

Az intima kalcifikációban a plakk belsejébe infiltrálódó immunsejtek által termelt citokinek és növekedési faktorok játszanak szerepet. Az intima kalcifikációnak több megjelenési formája van és ismert, hogy a kalcifikáció megjelenési formától függően befolyásolja a plakk progresszióját [2].



1. ábra A gyulladás, a mikrokalcifikáció és makrokalcifikáció közötti kapcsolat. A magas rizikójú ruptúrára hajlamos plakkokat a nagyméretű nekrotikus mag, a vékony fibrózus sapka és az intenzív gyulladás és mikrokalcifikáció jelenléte jellemzi. Ezzel szemben a vastagabb fibrózus sapka és a makrokalcifikáció inkább a stabil plakkok jellemzője [3].

A mikrokalcifikáció már az érlelmeszesedés kezdeti stádiumában, az intima megvastagodása során megfigyelhető. Az érlelmeszesedés előrehaladtával a calcifikációs nodulusok száma és mérete is nő, itt megkülönböztethető makrokalcifikáció, illetve lemezes calcifikáció [2]. Korábbi vizsgálatok szerint a stabil plakkokban főleg lemezes calcifikáció, míg az instabil plakkokban mikrokalcifikáció figyelhető meg (1. ábra) [2,3].

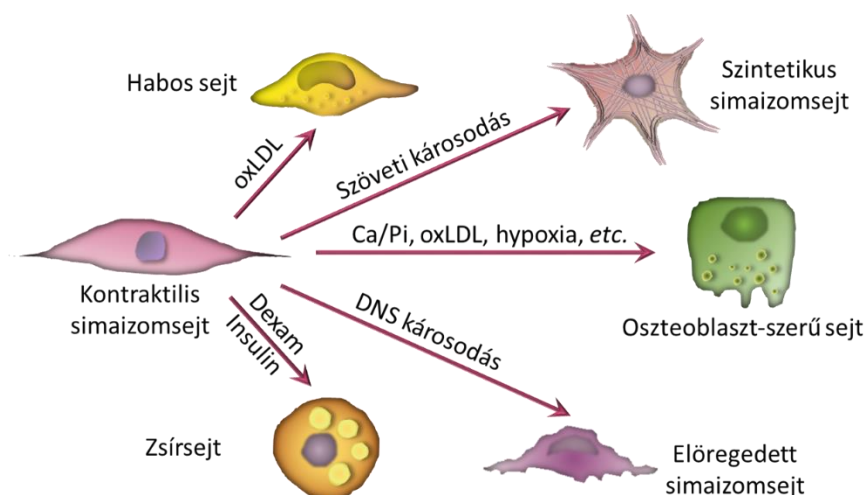
A média calcifikáció leggyakrabban a CKD-ban szenvedő, illetve a 2-es típusú diabéteszes betegeket érinti. A média calcifikáció következtében az erek rugalmatlanná válnak, a pulzushullám terjedési sebessége és a szisztolés nyomás fokozódik, majd balkamrai hipertrófia és végül szívelégtelenség alakul ki [4]. Végstádiumú vesebetegségben szenvedő betegektől, valamint CKD állatmodellekből származó aorta mintákban az érfal strukturális felépítésének megváltozását, fokozott kalcium depozíciót, hidroxipatit kristályok jelenlétét és csökkent elasztin szintet figyeltek meg [5]. Az intima és a média calcifikáció előfordulhat együttesen is CKD-asszociált ateroszklerózisban [1]. A vaszkuláris calcifikáció legsúlyosabb formája az úgynevezett calcifilaxis, mely kizárólag 5-ös stádiumú CKD-s betegeket érint, melynek során az arteriolák meszesedése, valamint a bőr nekrozisa és fekélyesedése figyelhető meg [6].

A CKD-ban szenvedő betegekben az érrendszer érintettségének következtében jelentősen nagyobb a kardiovaszkuláris események bekövetkezésének kockázata, mint az átlagos populációban [1]. Egy friss tanulmány becslése szerint a krónikus vesebetegség prevalenciája világszerte mintegy 13.4%, azaz a CKD globális népegészségügyi problémának tekinthető [7].

3.2 A vaszkuláris simaizomsejtek szerepe a calcifikációban

A vaszkuláris simaizomsejtek nem véglegesen differenciálódott sejtek, nagyfokú plaszticitással rendelkeznek, így különböző stimulusok hatására fenotípus változáson mennek keresztül (2. ábra) [8].

Egészséges artériákban a vaszkuláris simaizomsejtek kontraktilis fenotípussal rendelkeznek, mely fenotípus fő markerei az alfa-simaizom aktin (α -SMA), a simaizom miozin nehéz lánc, valamint a simaizom protein 22 alfa (SM-22 α) [9]. Szöveti károsodás, valamint stressz hatására a vaszkuláris simaizomsejtek úgynevezett szintetikus sejtekké differenciálódnak, melyek fő funkciója az extracelluláris mátrix stabilizálása és a szövet regenerációja és az érlelmeszesedéses plakkot borító fibrózus sapka létrehozása [9,10]. A szövetkárosodás helyreállítását követően a szintetikus érfali simaizomsejtek újra felveszik jellegzetes, kontraktilis fenotípusukat.



2. ábra A vaszkuláris simaizomsejtek lehetséges fenotípus változásai. Az érlelmeszesedéses lézióban azonosított vaszkuláris simaizomsejt fenotípusok és a differenciálódásukat kiváltó induktorok [8].

A kontraktilis érfali simaizomsejtek oxidált alacsony denzitású lipoprotein (LDL) hatására a makrofágokból képződő habos sejtekhez hasonló sejtekké alakulnak, amelyek jellegzetessége a szkevendzser receptorok kifejezése és további oxidált LDL felvétele [11]. Sejt-eredet nyomkövetéses vizsgálatok során kimutatták, hogy az érlelmeszesedéses plakkból található habos sejtek jelentős hányada simaizomsejt eredetű.

Adipogén stimulus hatására, mint például dexametazon vagy inzulin, a vaszkuláris simaizomsejtek képesek adipocita irányba is differenciálódni, mely során adipocita-specifikus transzkripciós faktorokat, mint például peroxiszóma proliferátor által aktivált gamma receptort (PPAR γ), és fehérjéket (adipszin, leptin) expresszálnak [8,12].

A sejtöregedés egy visszafordíthatatlan folyamat, amelynek oka a proliferációs potenciál csökkenése. Az öregedő sejtek osztódás helyett gyulladásos citokineket és különböző növekedési faktorokat, valamint proteázokat termelnek. A sejtöregedéshez vezethet a túlzott oxidatív stressz és a DNS károsodás. Tanulmányok kimutatták, hogy a vaszkuláris simaizomsejtek öregedése fokozza a kalcifikációs hajlamot és az oszteoblaszt-specifikus markerek, a Runt-related transzkripciós faktor (Runx2), alkalikus foszfatáz (ALP), I-es típusú kollagén expresszióját [13].

Az érfali simaizomsejtek vaszkuláris kalcifikáció szempontjából legjelentősebb fenotípus váltása az oszteokondrogén irányú differenciálódás. Az oszteoblaszt-szerű sejtek jellemzője a simaizomsejt markerek (α -SMA, SM-22 α) csökkent szintje, valamint az oszteoblaszt- és kondrocita specifikus fehérjék fokozott expressziója. A vaszkuláris simaizomsejtek

oszteokondrogén irányú differenciálódása nagymértékű hasonlóságot mutat az őssejtek oszteogenezisével; mindkét folyamat fő szabályozója a Runx2, az oszteogén irányú differenciálódás mester transzkripciós faktora. A Runx2 vaszkuláris kalcifikációban betöltött kulcsszerepét bizonyítja, hogy simaizomsejt-specifikus delécioja esetén a kalcifikáció elmarad [14]. A Runx2 mellett további transzkripciós faktorok, a SRY-Box transzkripciós faktor (Sox9), Msh Homeobox 2 (Msx2) és az osterix is aktiválódik és szerepet játszik a vaszkuláris simaizomsejtek oszteokondrogén differenciálódásának szabályozásában. Az oszteokondrogén transzkripciós faktorok aktiválódása fokozza az oszteoblaszt-specifikus fehérjék, oszteokalcin (OCN) és ALP expresszióját [15,16]. Egy friss összefoglaló cikkben részletesen bemutatták a plakokban lokalizálódó simaizomsejteket és megállapították, hogy a vaszkuláris simaizomsejtek különböző stimulusokra bekövetkező fenotípus váltása részlegesen ugyan, de visszafordítható és terápiás céllal módosítható [17–19]. Ez alól kivételt képezhetnek a lipidekkel feltöltött habos sejtté differenciálódott érfali simaizomsejtek, melyek proinflammatorikus mediátorok kifejezését követően apoptózison mennek keresztül [17].

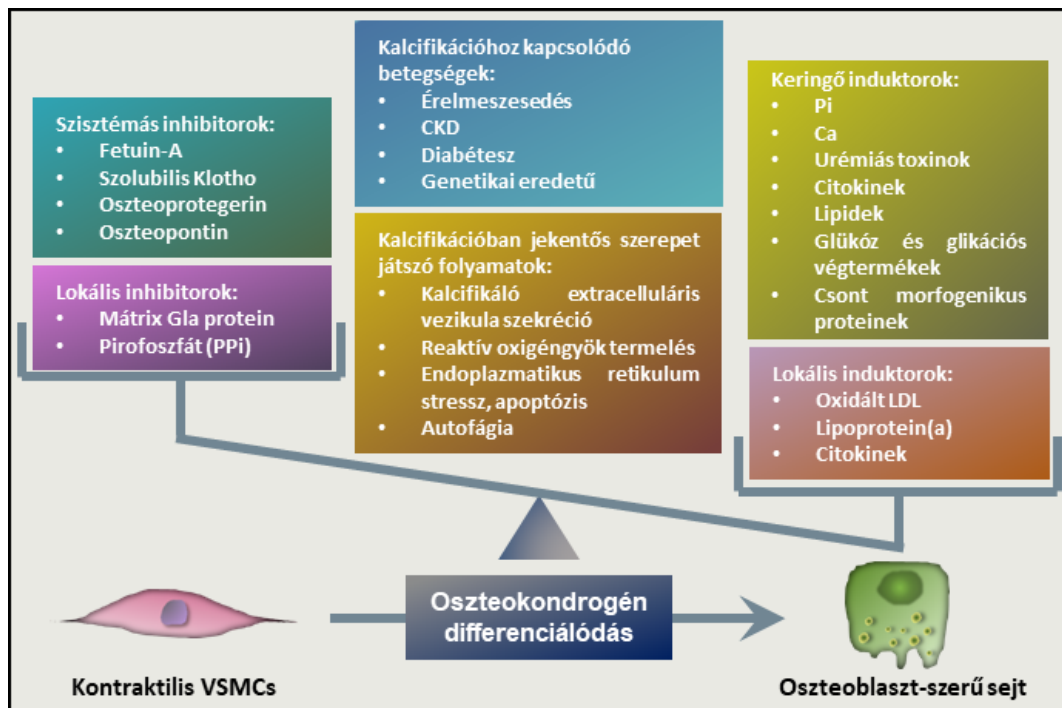
3.3 A vaszkuláris kalcifikáció induktorai és inhibitorai

Az elmúlt évtizedek kutatási eredményei jelentős áttörést hoztak a vaszkuláris kalcifikáció patomechanizmusának megértésében. A kalcifikációval járó betegségek tanulmányozása során a kalcifikációban szerepet játszó folyamatokat, valamint kalcifikációs induktorokat és inhibitorokat azonosítottak (3. ábra) [20].

Fiziológiás körülmények között keringő és lokális inhibitorok akadályozzák meg a hidroxipatit gócképződést, illetve gócnövekedést a lágyszövetekben. Ezen inhibitorok közé tartozik a fetuin-A, melynek hiánya fokozott vaszkuláris- és lágyszöveti kalcifikációt idéz elő fetuin-A deficiens egerekben [17]. A szolubilis Klotho és a fibroblaszt növekedési faktor-23 (FGF-23) szoros interakcióban felelős a foszfát szint szabályozásáért azáltal, hogy kontroll alatt tartja a vese proximális tubulusain keresztül megvalósuló foszfát reszorpciót. Klotho hiányában az FGF-23 nem képes szabályozni a foszfát homeosztázist, mely a vaszkuláris simaizomsejtek kalcifikációjához vezethet [23].

Egy további szolubilis inhibitor az oszteoprotegerin (OPG), mely a nukleáris faktor kappa-B ligandumhoz (RANKL) kötődve, gátolja a RANK-RANKL interakciót [24]. Az oszteopontin (OPN) egy mineralizált szövetekben található extracelluláris fehérje, mely negatív töltésű

foszfoszerin oldalláncainak köszönhetően erősen köti és meggátolja a hidroxipatit precipitációját [25].



3. ábra A vaszkuláris kalcifikáció mechanizmusa, induktorok és inhibitorok. A kalcifikációs induktorok és inhibitorok egyensúlyának megbomlása kulcsfontosságú a vaszkuláris kalcifikáció patomechanizmusában. Amennyiben a keringő induktorok (Pi, Ca stb.) szintje megnő a szisztémás és lokális kalcifikációs inhibitorokkal szemben, bekövetkezik a vaszkuláris simaizomsejtek oszteokondrogén irányú fenotípus váltása. A vaszkuláris kalcifikáció háttérében álló mechanizmusok az extracelluláris vezikula szekréció, ROS termelődés, endoplazmatikus retikulum stressz és az apoptózis [20].

A mátrix Gla protein (MGP) egy K-vitamin függő kalcifikációs inhibitor, mely a kalcifikált érfali simaizomsejtekben található. Az MGP a hidroxipatit kristályhoz kötődve meggátolja annak további növekedését, valamint gátolja a csont morfogénikus protein 2 (BMP-2) jelátviteli útvonal aktiválódását. Az MGP fontosságát mutatja, hogy MGP deficiens egerekben jelentős mértékű kalcifikációt mutattak ki [23,26]. Egy további jól karakterizált kalcifikációs inhibitor a pirofoszfát. A pirofoszfát az ATP/UTP hidrolízise során képződik, mely reakciót az ekto-nukleotid pirofoszfataáz 1 (ENPP1) enzim katalizálja [27]. A pirofoszfát képződésében szerepet játszó fehérjék mutációja ritka lágyyszöveti kalcifikációs betegségekből nyilvánul meg, mint például a pseudoxantóma elasztikum (PXE) vagy a csecsemőkori artériás kalcifikáció (GACI) [28,29]. Tanulmányok igazolták, hogy CKD-ban szenvedő betegekben jelentősen csökkent a plazma pirofoszfát szint, amely összefüggésben állhat a fokozott vaszkuláris kalcifikációval [30].

Az inhibitorok mellett számos keringő és lokális kalcifikációs induktort ismerünk. Az inorganikus foszfát (Pi) a vaszkuláris simaizomsejtek oszteokondrogén irányú differenciálódásának legjobban karakterizált és CKD-ban szenvedő betegekben legrelevánsabb induktora, így a Pi szerepét a következő fejezetben fogjuk részletesen bemutatni.

A kalcium számos fiziológias folyamatban játszik szerepet, többek között jelátviteli folyamatokban, izomkontrakcióban és a véralvadásban. A szérumban található kalcium ionizált formában van jelen, szintjét szorosan szabályozza a D-vitamin, a paratiroid hormon és a kalcitonin. Történetileg a kalciumot azonosították először a miokardális infarktus és a koronária artéria kalcifikáció fő rizikófaktoraként, ezenkívül hozzájárul a stabil érelmeszesedések plakk kialakulásához [31]. Tehát a Pi mellett az emelkedett szérum kalcium szint is kulcsszerepet játszik a vaszkuláris kalcifikáció kialakulásában, hiszen számos tanulmány eredménye szoros kapcsolatot mutat az emelkedett kalcium szint és a hidroxipatit kristályok jelenléte, valamint a kardiovaszkuláris diszfunkció és mortalitás között [32].

Krónikus veseelégtelenségben az emelkedett Pi mellett jelentős kalcifikációs hatást tulajdonítanak egyes urémiás toxinoknak, mint például az indoxil-szulfátnak. Az urémiás körülmények az érfali simaizomsejtek abnormális sejtosztódásához, migrációjához, öregedéséhez, valamint kalcifikációjához vezetnek [33,34]. A CKD mellett a diabétesz is jelentős rizikófaktor a vaszkuláris kalcifikációnak, mely nagymértékben hozzájárul a diabéteszes betegek magas kardiovaszkuláris mortalitásához. A diabéteszes betegek elhízással, hiperglikémiával és diszlipidémiával jellemezhetőek [35]. A diabéteszes betegekben előrehaladott koronária artéria kalcifikáció és carotid artéria kalcifikáció figyelhető meg [35]. Tanulmányok igazolták, hogy az emelkedett glükóz szint, valamint az előrehaladott glikációs végtermékek fokozzák a vaszkuláris simaizomsejtek oszteokondrogén irányú differenciálódását [8,36,37].

A gyulladás az ateroszklerózis régóta ismert jellemzője, mely jelentős pro-kalcifikációs hatással is bír. A gyulladás pro-inflammatórikus citokinek, tumor nekrosis faktor alfa (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β) és onkosztatin M képződésével jár, amely citokinekről kimutatták, hogy fokozzák a vaszkuláris simaizomsejtek kalcifikációját [38–40]. Az IL-1 gyulladásos útvonal kalcifikációban betöltött szerepét bizonyítja, hogy a kalcifikáció gátolható IL-1 receptor ellen termeltetett monoklonális antitesttel (Canakinumab) hiperkoleszterinémiás egérmodellben [41]. A pro-inflammatórikus citokinek mellett az oxidált LDL-ről is kimutatták, hogy vaszkuláris simaizomsejtekben fokozza az oszteogén irányú differenciálódást. Továbbá a lipoprotein(a) is indukálja az érelmeszesedések plakk kalcifikációját, valamint szintje pozitív korrelációt mutat a koronária artéria kalcifikációval

[23,42,43]. Ezen kívül kimutatták, hogy az oxidált foszfolipidek ellen termelt monoklonális antitest csökkentette a lipoprotein(a) által indukált oszteogén irányú differenciációt [44].

A csont morfogénikus proteinek heterodimer transzmembrán receptorokhoz kötődve aktiválják a jelátviteli útvonalat a Smad 1/5/8 foszforilációján és nukleáris transzlokációján keresztül. A csont morfogénikus fehérjék legismertebb tagja a BMP-2, mely szerepe jól ismert a vaszkuláris kalcifikáció patomechanizmusában; a vaszkuláris simaizomsejtek oszteokondrogenikus differenciálódása során [45]. A BMP-2 fokozza a sejtek foszfát felvételét, amely a Runx2 aktivációján keresztül fokozza az oszteoblaszt-specifikus fehérjék expresszióját (ALP, OCN, Msx2, osterix), mely a vaszkuláris simaizomsejtek mineralizációjához vezet [46]. A BMP-2 mellett a BMP-4 jelenlétét is kimutatták kalcifikált érlelmeszesedéses léziókban [23,46–48].

3.4 A foszfát szerepe krónikus vesebetegség-asszociált vaszkuláris kalcifikációban

Normál körülmények között a vese a szérumban foszfát-szint fő szabályozója, a szűrte foszfát 80-90%-a visszaszívódik a proximális tubulusokban nátrium/foszfát ko-transzporterek segítségével. Normál körülmények között a szűrte foszfát 15%-a vizelettel ürül a szervezetből [49]. Krónikus vesebetegség során a vese elégtelen működésének következtében csökken a foszfát kiválasztás, így megnő a szérumban foszfát szint és hiperfoszfatémia alakul ki. A foszfát nagyon fontos szerepet játszik mind a celluláris mind a szisztémás homeosztázisban [50]. A foszfát szükséges az ATP szintézishez, jelátviteli folyamatokhoz, nukleinsav szintézishez, továbbá a csont egyik fő alkotóeleme [51]. Az emelkedett foszfát szint jelentős rizikófaktor a kardiovaszkuláris események bekövetkezésének krónikus vesebetegségben szenvedő betegekben, valamint a magas foszfát szint hajlamossá teszi ezeket a betegeket a vaszkuláris kalcifikáció kialakulására [51]. Az emberi szervezetben a szérumban fiziológiás foszfát szintje 2,5-4,5 mg/dl között van [27]. A szérumban foszfát szint korrelál a koronária artéria kalcifikáció kialakulásával egészséges, normál foszfát szintű egyéneknél is [50]. A foszfát szint normál tartományon belüli 1 mg/dl-es növekedése is jelentősen növeli a kardiovaszkuláris betegségek incidenciáját és prevalenciáját [50].

A táplálékkal bevitt foszfát az enterocitákban abszorbeálódik a nátrium-függő foszfát ko-transzporterekkel keresztül (Pit-1/Pit-2) [51]. A foszfát dózis-és időfüggő módon fokozza a Pit-1 expresszióját egér és patkány simaizomsejtekben, melynek hatására megemelkedik az intracelluláris P_i szint [51,52]. A magas intracelluláris P_i hatására emelkedik az oszteokondrogén transzkripciós faktorok (Runx2, Msx2, Sox9, osterix) expressziója, és fokozódik az általuk szabályozott csontképződésben szerepet játszó fehérjék (ALP, OCN)

kifejeződése és csökken a kontraktilis simaizomsejt markerek (α -SMA, SM22 α) expressziója [16,51–53]. A Pit-1 csendesítése csökkenti a Pi-indukált kalcifikációt vaszkuláris simaizomsejtekben, mely további bizonyíték a Pit-1 kalcifikációban betöltött kulcsszerepére [51].

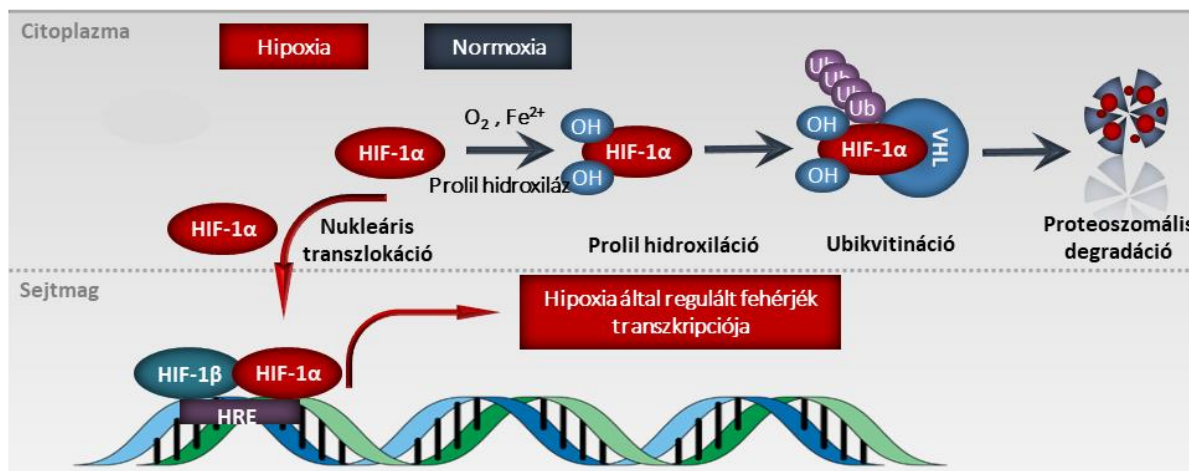
Korábbi tanulmányok alacsony Pit-2 expresszióról számoltak be vaszkuláris simaizomsejtekben, azonban később igazolták, hogy vaszkuláris simaizomsejt-specifikus Pit-1 deficiens egerekben a Pit-2 expressziója jelentősen megnő. Pit-1 deficiens egerekben a Pit-2 expressziójának változtatása befolyásolja a simaizomsejtek Pi felvételét és a kalcifikációt. A Pit-2 expresszió csökkentése (knock-down) a foszfát-indukált kalcifikáció gátlását okozza, ugyanakkor a Pit-2 overexpressziója esetén fokozódik a Pi felvétel és a kalcifikáció [54]. Tehát a Pit-2-nek nagyon fontos kompenzatórikus szerepe van a Pit-1 csökkent szintje vagy hiánya esetén, ezzel bizonyítva, hogy a Pit-2 is jelentős szerepet játszik a Pi transzportban és a Pi-mediált kalcifikációban vaszkuláris simaizomsejtekben [54]. Ezzel ellentmondóan Yamada és munkatársai azt mutatták ki, hogy Pit-2 deficiens egerekben fokozódik a kalcifikáció krónikus vesebetegségben szenvedő-indukált egérmodellben, ami a Pit-1/Pit-2 rendszer további komplexitására utal [55].

Az intracelluláris Pi vezikuláris transzportfolyamatok révén kerül ki a sejtből és az extracelluláris mátrixban halmozódik fel (mátrix vezikula 100-500 nm), vagy különböző testfolyadékokban (szérum, vizelet, cerebrospinális folyadék) van jelen exoszómák (50-150 nm) formájában [19,51]. Mátrix vezikulának eredendően a csontsejtek által szekretált, Pi-ban és kalciumban gazdag partikulákat nevezzük, amelyek jelenlétét a csontképződés során mutatták ki elsőként. A későbbiekben kalcifikáló mátrix vezikulák jelenlétét írták le érlelmeszesedéses plakk belsejében, aorták média rétegében, valamint kalcifikált humán aorta billentyűkben [57–59]. Hasonlóan a csonthoz, valószínű, hogy a mátrix vezikulák a kalcifikáció nukleációs helyeként funkcionálnak és a hidroxipatit kristályokkal együtt fokozzák a kalcifikációt [51,60].

3.5 A hipoxia és a HIF-1 útvonal aktivációja

A hipoxia az az állapot, amikor az oxigén tenziója alacsonyabb, mint az adott szervre/szövetre/sejtre jellemző normális oxigén szint. 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. A HIF-1 egy heterodimer

transzkripció faktor, amely egy oxigén érzékeny alfa (HIF-1 α) és egy konstitutívan expresszáldó béta alegységből (HIF-1 β) áll (4. ábra) [61,62].



4. ábra A HIF-1 útvonal működése. Normoxiás körülmények között a HIF-1 α hidroxilálódik, ubikvitinálódik és proteoszómálisan degradálódik. Ezzel szemben hipoxiás környezetben a HIF-1 α hidroxilációja elmarad, a fehérje stabilizálódik és transz-lokálódik a sejtmagba, ahol heterodimert képez a béta alegységgel. A HIF-1 komplex a célgének promóter régiójában található hipoxia válaszadó elemhez kötődve aktiválja ezen gének transzkripcióját.

Fiziológiás körülmények között a HIF-1 α alegysége folyamatosan termelődik, prolin-hidroxiláz (PHD) enzimek által hidroxilálódik, majd ubikvitinációt követően proteoszómálisan degradálódik [63]. A PHD enzimek oxigén, vas és alfa-ketoglutarát függő hidroxilázok, melyek csökkent oxigén tenzió mellett nem képesek a HIF-1 α hidroxilációjára. Így hipoxiás körülmények között a HIF-1 α stabilizálódik, majd nukleáris transzlokációját követően heterodimert képez a béta alegységgel. A transzkripció komplex a p300 adapter fehérjével kiegészülve a HIF-1 célgének promóter régiójában található hipoxia válaszadó elemhez (HRE) kötődik, és iniciálja transzkripciójukat [64,65].

Meg kell említenünk, hogy a HIF még 2 másik alfa alegységgel rendelkezik (HIF-2 α és HIF-3 α), azonban a hipoxiára adott celluláris szabályzásban a HIF-1 α és HIF-2 α szerepe ismert [66,67]. A HIF-1 α és a HIF-2 α struktúráisan hasonló felépítésűek és koordináltan szabályozzák számos célgén expresszióját. Az eritropoézis szabályzásában elsősorban a HIF-2 α vesz részt, mely főként a vese peritubuláris intersticiális sejtjeiben expresszáldik [68,69].

3.6 A HIF-1 útvonal aktivációjának jelentősége vaszkuláris kórképekben

Az oxigén szöveti diffúziós távolsága mintegy 200-250 μm , mely lehetővé teszi, hogy az oxigén az érfalat borító endotél egysejtrétegen keresztül eljusson a média réteg simaizom

sejtjeihez. Ez megakadályozza az oxigén eljutását a média rétegbe, mely így hipoxiássá válik. A hipoxia jelenlétét mind humán plakkokban, mind érlemeszesedéses állatmodellekben kimutatták [70,71].

A hipoxiának jelentős szerepe van az érlemeszesedéses plakk progressziójában [64,66,67]. Hipoxia hatására az anyagcsere anaerob irányba tolódik el, melyet a sejtek glükóz felvételének és felhasználásának emelkedése, valamint a laktát és további savas anyagcsere termékek képződésének fokozódása jellemez [73,74]. Az anaerob glikolízis fokozódásának célja az oxidatív foszforiláció csökkent ATP termelésének kompenzálása a hipoxiás környezetben.

A hipoxia a habos sejtek képződését is befolyásolja. Hipoxiás környezetben a makrofágokban fokozódik a zsírsav szintézis, a lipid cseppek, trigliceridek és szterolok akkumulációja, ezzel egyidejűleg csökken a zsírsavak béta oxidációjában résztvevő enzimek expressziója [75]. A hipoxia gyulladásos folyamatokat is indukál a plakk belsejében, melynek hatására emelkedik a pro-inflammatorikus citokinek (IL-1 β , TNF- α , IL-8) és a sejtadhéziós molekulák vaszkuláris sejtadhéziós molekula (VCAM-1) és intercelluláris adhéziós molekula (ICAM-1) expressziója [76].

A hipoxia a plakk stabilitását is befolyásolja. Számos tanulmány beszámolt a proteolitikus aktivitással rendelkező mátrix metalloproteinázok (MMP-k) szerepéről az érlemeszesedéses plakk progressziójában [76]. Nakano és munkatársai kimutatták, hogy a krónikus hipoxia fokozza az érlemeszesedést és az MMP-9 aktivitását apolipoprotein E deficiens egerek aortájában. Kimutatták, hogy a hipoxia által indukált oxidatív stressz fokozza az extracelluláris mátrix (ECM) bontását, melyben az MMP-9 enzim játszik szerepet [77].

A hipoxia egyik további, jól ismert hatása az angiogenezis indukálása. Hipoxia hatására a plakkba a vasa vasorum irányából benövő új erek struktúrája nem megfelelő, szivárognak és törékenyek, mely a plakk bevérvzéséhez vezet. Egyre több adat utal arra, hogy a plakk hemorrágia fontos eleme a plakk progressziójának, és szerepet játszik az érlemeszesedéssel összefüggő akut kardiovaszkuláris események kiváltásában [78–80].

Az érlemeszesedés mellett a hipoxia jelentős szerepet játszik a krónikus vesebetegség és a végstádiumú veseelégtelenség patogenezisében is [81–83]. Amint a vesekárosodás meghalad egy küszöbértéket, a tubulointerstícium hipoxiássá, majd fibrotikussá válik, mely a peritubuláris sejtek elvesztéséhez és iszkémiás sérüléshez vezet [84,85]. Krónikus vesebetegségben szenvedő betegek veséjében kimutatták a HIF-1 indukcióját, melyet összefüggésbe hoztak a CKD progressziójával [86].

A HIF-1 útvonal krónikus vesebetegség-asszociált kalcifikációban betöltött szerepét elsőként Mokas és munkatársai vizsgálták [83]. Kimutatták a HIF-1 α fokozott expresszióját

CKD-s patkányok aortájában, valamint azt, hogy a magas Pi stabilizálja a HIF-1 α -t vaszkuláris simaizomsejtekben [83]. További *in vitro* kísérletekben bizonyították, hogy a hipoxia fokozza a vaszkuláris simaizomsejtek foszfáttal indukált kalcifikációját [83]. A HIF-1 α Pi-tal indukált kalcifikációban betöltött kulcsszerepét bizonyítja a kalcifikáció elmaradása simaizom targetált HIF-1 α deficiens egerek aortájából izolált vaszkuláris simaizomsejtekben [83]. Összességében ezek az eredmények nagy előrelépést jelentenek a HIF-1 α és a CKD-asszociált vaszkuláris kalcifikáció kapcsolatának megértésében, és felvetik a lehetőségét a HIF-1 útvonal terápiás célpontként való alkalmazásának a CKD-ban szenvedő betegeket érintő kalcifikáció megelőzésében.

Szöveti hipoxia egyéb betegségekben is megfigyelhető, mint például az obstruktív alvási apnea (OSA)-ban, illetve krónikus obstruktív tüdőbetegségben (COPD) szenvedő betegekben. Az OSA egy alváshoz kötött légzési rendellenesség, melynek során a nem folyamatos kilégzés miatt intermittáló (szakaszos) hipoxia alakul ki, mely fokozza a vaszkuláris simaizomsejtek proliferációját, a HIF-1 függő gének, mint például a vaszkuláris endotéliális növekedési faktor (VEGF) és az nukleáris faktor kappa B (NF- κ B) kifejeződését, valamint a reaktív oxigén formák (ROS) képződését [72]. Az OSA-ban szenvedő betegekben fokozott a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásának kockázata, az ateroszklerózis, a koronária artéria kalcifikáció és az abdominális aorta kalcifikációja [72,87]. Ezzel szemben a COPD nem csupán egy légzési megbetegedés, hanem egy szisztémás betegség is. A COPD-ben szenvedő betegekben magasabb a pro-inflammatorikus citokinek szintje, továbbá kardiovaszkuláris betegség, diabétesz, osteoporózis és vesekárosodás figyelhető meg [88]. Komputertomográfiás (CT) vizsgálattal igazolták, hogy a COPD-s betegekben a vér alacsony oxigenizációja és a koronária artéria kalcifikáció között szoros összefüggés lehet [88]. A COPD betegek magas halálozásért a kardiovaszkuláris események okolhatók.

3.7 A hipoxia és a ROS képződés közötti kapcsolatrendszer

Fiziológiai körülmények között, redox reakciókban ROS képződik, melyek, mint intracelluláris szignálok különböző jelátviteli folyamatokban vesznek részt. Ugyanakkor a magas koncentrációban termelődő ROS felborítja a ROS képződés és eliminálás egyensúlyát, mely oxidatív stresszhez vezet. A túlzott ROS képződés a biomolekulák strukturális és funkcionális változásához vezet és végeredményben szövetkárosodást eredményezhet. Számos sejtbiokémiai folyamat képes szuperoxid termelésre, melyek közül a vaszkuláris kalcifikációval a mitokondriális és a NAD(P)H-oxidázok (Nox) által mediált ROS képződést hozták összefüggésbe. A mitokondrium az intracelluláris ROS képződés egyik fő organeluma. Az

elektron transzport lánc működése során az elektronok az I-es, III-as és IV-es komplexeken keresztül transzportálódnak protonok kilépése mellett. Az így képződő elektrokémiai grádiens felhasználásával történik az ATP képződése ADP-ből és Pi-ből, mely közben az oxigén 95%-a redox reakcióban vízzé alakul. Azonban főleg az I-es és III-as komplexeken elektron szivárgás következhet be, mely azt eredményezi, hogy az oxigénből szuperoxid anion képződik, ami oxidatív stresszt indukál. Az intracelluláris ROS másik jelentős forrása a Nox enzimek által katalizált reakció. A Nox izoenzimek feladata az elektron transzfer NADH-ról vagy NADPH-ról molekuláris oxigénre, amelynek során szuperoxid vagy hidrogén-peroxid képződik [89].

A hipoxia hatása a ROS képződésre a mai napig ellentmondásokkal teli tudományterület; egyes munkákban a hipoxia hatására csökkenő, míg másokban emelkedő ROS termelődést írtak le. A tartós hipoxia pulmonáris hipertenzióhoz vezet a tüdőben. Hipoxia hatására a tüdő ereiben vazokonstrikció következik be, melynek hátterében az emelkedett intracelluláris kalcium szint és a fokozott mitokondriális ROS termelődés áll [90]. A hosszantartó hipoxia fokozott ROS termelődéshez vezet a pulmonáris artéria simaizomsejtjeiben (PASMC) és endotélsejtjeiben is [91]. A hipoxiás pulmonáris hipertenzió vizsgálata során ellentmondásba ütköző eredmények születtek; Mehta és társai csökkent, míg Waypa és munkatársai, valamint számos további kutatás eredménye fokozott ROS képződésről számolt be PASMC-ben és koronária artéria simaizomsejtjeiben [92,93]. Waypa és munkatársai voltak az elsők, akik megvizsgálták a hipoxia ROS termelődésre gyakorolt hatását szubcelluláris kompartmentekben. Kimutatták, hogy hipoxiás körülmények között a mitokondrium membrán közti tere a ROS forrása, míg a mitokondrium mátrixában csökkent ROS képződést tapasztaltak patkány tüdőből izolált PASMC-ben [93]. A hipoxiában a csökkent ROS képződés hátterében adaptációs mechanizmus is állhat, melynek során a HIF-1 aktiváció eredményeként fokozódik az antioxidáns gének expressziója [94].

Chandel és munkatársai elsőként mutatták ki, hogy a mitokondriális eredetű ROS a transzkripciós aktivációban is részt vesz, többek között a HIF-1 α aktivációjához vezet [95,96]. Hipoxiás körülmények között a NAD(P)H-oxidázok feltehetően szinergista módon játszanak szerepet a ROS képződésben a mitokondriummal, aktiválva a hipoxiára adott celluláris választ [97]. A túlzott ROS képződés szerepet játszik a vaszkuláris kalcifikáció patofiziológiájában. Emelkedett ROS képződést detektáltak humán kalcifikált aorta billentyűkben, valamint vaszkuláris simaizomsejtek oszteokondrogén irányú differenciálódása során [98–100]. A ROS képződés vaszkuláris kalcifikációban betöltött jelentős szerepére utal az is, hogy a vaszkuláris simaizomsejtek oszteokondrogén irányú differenciálódása antioxidánsokkal gátolható [98–100].

3.8 Hipoxia mimetikumok: új generációs terápiás lehetőségek a krónikus vesebetegség-asszociált anémia kezelésében

A krónikus vesebetegség gyakran társul más betegségekkel, melyek közül leggyakoribbak a kardiovaszkuláris betegségek és az anémia. Az anémia jelentősen növeli a CKD-ban szenvedő betegek mortalitását és morbiditását, a kórházban töltött időt, valamint nagymértékben csökkenti az életminőséget. A CKD-ban 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 CKD betegeknél is [101].

Ezen folyamatok abszolút vashiányhoz vezetnek, ezért a krónikus vesebetegség-asszociált anémia kezelésében elsődleges szempont a megfelelő hemoglobin és hematokrit értékek visszaállítása. Az anémia kezelésének lehetséges alternatívái az eritropoézis stimuláló ágensek (ESA) adminisztrációja és vér transzfúzió. Az ESA fokozza az EPO szintézist, növeli a hemoglobin szintet és korrigálja az anémiát, azonban számos tanulmány kimutatta, hogy az emelt dóziszú ESA növeli a kardiovaszkuláris események bekövetkezésének kockázatát [101]. Az ESA alkalmazásának bevezetése előtt a vér transzfúzió volt a legelterjedtebb terápia az anémia kezelésére. Egy 2012-es adat szerint a nem dializált CKD betegek mintegy 20%-a, akik az ESA-t nem tolerálják jól vér transzfúzióban részesültek a 2012-es KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) előírásoknak megfelelően [102].

Egy ígéretes kezelésnek tűnt a rekombináns eritropoetin (rhEPO) alkalmazása, amelyet rutinszerűen kezdtek alkalmazni CKD-ban szenvedő betegeknél, hogy csökkentsék a transzfúziós igényt. A CHOIR tanulmányban több, mint 1000 egyén bevonásával vizsgálták az epoetin-alfa hatását, és kimutatták, hogy a heti epoetin-alfa adminisztráció a hemoglobin szint növelése mellett jelentősen fokozta a kardiovaszkuláris rizikót és toxicitást [103].

Az ESA alkalmazása során fokozott kardiovaszkuláris rizikót és fokozott trombus képződést tapasztaltak CKD-ban szenvedő betegeknél ezért alternatív terápiás lehetőségek kifejlesztésére volt szükség. Ezért a legfrissebb, 2021-es KDIGO előírásokban már a PHD enzim inhibitorok kerültek a középpontba, amelyek a PHD enzim gátlásán keresztül aktiválják a HIF-1 útvonalat [104,105]. Ezek az inhibitorok a HIF-1 komplex aktiválásán keresztül fokozzák az eritropoetin szintézist a CKD-ban szenvedő betegeknél valamint fokozzák a vas mobilizációját a csontvelőben [105]. Mivel ezeket az inhibitorokat orálisan alkalmazzák, ez a dializált betegek számára is nagy könnyebbséget jelent [105]. Egy, aggodalomra okot adó mellékhatása lehet a hosszantartó alkalmazásnak, a tumor képződés [106]. Jelenleg négy olyan

inhibitor áll rendelkezésre anémiában szenvedő CKD betegek részére, amelyekkel klinikai vizsgálatokat végeztek: a Roxadustat, a Vadadustat, a Daprodustat és a Molidustat [105].

A Roxadustat esetén több, mint száz egyén bevonásával végzett vizsgálat során kimutatták, hogy napi alkalmazás mellett nőtt az átlagos hemoglobin szint a placebo kapott csoporthoz képest [105]. Fázis 2 vizsgálatok során dializált betegekben 7 héten belül a Roxadustat több, mint 2 mg/dl-rel növelte a betegekben mért átlagos hemoglobin szintet [107].

A Vadadustat fázis 2 vizsgálata során krónikus vesebetegségben szenvedő betegekben alkalmazták 300, illetve 400 mg-os napi dózisban 28 napon keresztül és a hemoglobin szint jelentős emelkedését és a ferritin szint csökkenését tapasztalták, mely azt jelenti, hogy a vas mobilizálódott a raktárakból [105]. Valamint végeztek egy vizsgálatot 93 nem dializált CKD-ban szenvedő beteg bevonásával és az eredmények arra utalnak, hogy a Vadadustat sikeresen növelte az EPO szintet [105]. Végeztek egy tanulmányt 210 nem dializált CKD beteg bevonásával is, akik korábban ESA kezelésben részesültek az anémia korrigálására. A tanulmány eredményei szerint a Vadadustat-kezelt csoport esetében mintegy 54,9%-kal emelkedett a hemoglobin szint [108].

A Bayer Healthcare által kifejlesztett Molidustat CKD állatmodellben történő alkalmazása során a Molidustat csökkentette a vérnyomást, valamint korrigálta az EPO szintet is [109]. Ezt követően megvizsgálták a Molidustat hatását CKD-ban szenvedő betegekben a DIALOGUE tanulmányban. A Molidustat hatását megvizsgálták nem-dializált és ESA kezelésben nem részesült CKD-ban szenvedő betegekben, valamint darpoetin, illetve epoetin alfa kezelésen átesett CKD-ban szenvedő betegekben is. Az eredmények azt mutatják, hogy a Molidustat eredményesen elérte és tartotta a kívánt hemoglobin szintet az ESA-ról történő váltás után [110].

A GlaxoSmithKline által kifejlesztett prolil-hidroxiláz inhibitor a kis molekulásúlyú Daprodustat (GSK1278863) [111]. A DPD hatását nem-dializált és dialízisre szoruló CKD-ban szenvedő betegekben vizsgálták különböző dózisokban 28 napon keresztül [111]. A DPD jól tolerálható volt és nagymértékben növelte a hemoglobin szintet. Emellett 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 CKD-ban szenvedő betegek körében. Egy hosszabb idejű klinikai tesztelés során kimutatták, hogy akár 10 mg napi dózis elegendő a hemoglobin célérték eléréséhez [111]. A GlaxoSmithKline 2020-ban bejelentette, hogy Japánban a sikeres klinika eredmények hatására engedélyezik a DPD alkalmazását CKD-ban szenvedő betegekben. Azonban a lehetséges kardiovaszkuláris kimenetelt, mely az ESA és rekombináns EPO alkalmazása során is felmerült, egyetlen

tanulmány sem vizsgálta, viszont az ASCEND-D tanulmányban, mintegy 2964 egyén bevonásával (2016 novemberétől 2018 augusztusáig 35 ország 431 centrumából gyűjtött randomizált beteg) nyomon követték mind a hemoglobinszintek változását mind a kardiovaszkuláris események bekövetkezését DPD-vel történő kezelésben részesülő CKD betegekben. A tanulmány során a DPD-vel való kezelésben részesült egyének 25,2%-ánál következett be valamilyen kardiovaszkuláris esemény. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a DPD is fokozhatja a kardiovaszkuláris rizikót [112].

4. Célkitűzések

Az irodalomban fellelhető információk alapján a következő hipotéziseket és célkitűzéseket állítottuk fel:

- 1. Hipotézis:** a hipoxia a HIF-1 aktivációján keresztül fokozza a vaszkuláris simaizomsejtek oszteokondrogén irányú differenciálódását *in vitro*.

Célkitűzések:

- A hipoxia és hipoxia mimetikumok hatásának vizsgálata humán aorta vaszkuláris simaizomsejtek HIF-1 aktivációjára.
- A hipoxia hatásának vizsgálata humán aorta vaszkuláris simaizomsejtek oszteokondrogén differenciálódására.
- A HIF-1 útvonal gátlás hatásának vizsgálata humán aorta vaszkuláris simaizomsejtek hipoxia által indukált oszteokondrogén differenciálódására.

- 2. Hipotézis:** a hipoxia a ROS képződés fokozásán keresztül fokozza a vaszkuláris simaizomsejtek oszteokondrogén irányú differenciálódását *in vitro*.

Célkitűzések:

- A hipoxia hatásának vizsgálata humán aorta vaszkuláris simaizomsejtek ROS termelésére.
- A ROS termelés gátlás hatásának vizsgálata humán aorta vaszkuláris simaizomsejtek hipoxia által indukált oszteokondrogén irányú differenciálódására.
- A ROS képződés és a HIF-1 α aktiváció közötti interakció vizsgálata humán aorta vaszkuláris simaizomsejtekben.

- 3. Hipotézis:** a hipoxia ROS-függő módon fokozza az egér aorta kalcifikációját *ex vivo*.

Célkitűzések:

- A hipoxia hatásának vizsgálata egér aorta kalcifikációra *ex vivo* szövettenyészetben.
- A HIF-1 útvonal, illetve a ROS termelés gátlás hatásának vizsgálata hipoxia által indukált egér aorta kalcifikációra *ex vivo* szövettenyészetben.

- 4. Hipotézis:** A prolil-hidroxiláz inhibitor DPD a HIF-1 aktivációján keresztül fokozza a humán aorta vaszkuláris simaizomsejtek oszteokondrogén irányú differenciálódását *in vitro*.

Célkitűzések:

- A DPD hatásának vizsgálata humán aorta vaszkuláris simaizomsejtek a HIF-1 útvonal aktivációjára.
- A DPD hatásának vizsgálata humán aorta vaszkuláris simaizomsejtek magas foszfáttal indukált oszteokondrogén differenciálódására.
- A HIF-1 útvonal gátlás hatásának vizsgálata humán aorta vaszkuláris simaizomsejtek magas foszfáttal és DPD-vel indukált oszteokondrogén irányú differenciálódására.

5. Hipotézis: A DPD fokozza az egér aorta kalcifikációját *ex vivo* és *in vivo*.

Célkitűzések:

- A DPD hatásának vizsgálata egér aorta magas foszfáttal indukált kalcifikációjára *ex vivo* szövettenyészetben.
- A DPD hatásának vizsgálata az aorta kalcifikációjára krónikus vesebeteg egérmodellben *in vivo*.

5. Anyagok és módszerek

5.1 Anyagok

Kísérleteink során a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) termékeit használtuk, amennyiben ettől eltérően nem jelöltük.

5.2 Sejttenyésztés

Kísérleteinkben humán aorta simaizomsejtekkel (HAoSMC, Cell Applications Inc, San Diego, CA, USA) dolgoztunk, amelyeket DMEM tápfolyadékban tenyésztettünk 10% főtális borjú szérummal (FBS) (10270-106, Gibco, Grand Island, NY, USA), 1% nátrium-piruváttal, 1% L-glutaminnal és 1% antibiotikus, antimikotikus reagenssel kiegészítve, 5% CO₂ jelenlétében 37 °C-on. A kísérletekhez felhasznált sejteket a konfluens (>90%) állapot eléréséig tenyésztettük 5-ös és 8-as passzázs szám között.

5.3 Hipoxia kezelés

A sejtek számára a hipoxiás környezetet úgynevezett moduláris inkubátor kamrában biztosítottuk, amely kamrába előre elkészített gázkeveréket (5% O₂, 5% CO₂ és 94% N₂, Messer Hungarogáz) injektáltunk 1 dl/perc áramlási sebességgel. A normoxiás állapot biztosításához 21% O₂, 5% CO₂ és 74% N₂ (Messer Hungarogáz) tartalmú gázkeverékben tartottuk a sejteket. Számos kísérletben alkalmaztunk hipoxia mimetikumokat, kobalt-kloridot (200 µmol/L), deferoxamint (DFO, 20 µmol/L), 2,2'-bipiridilt (100 µmol/L), illetve alkalmaztunk egy HIF-1 inhibitor, a chetomint (6 nmol/L, Tocris, Bristol, Egyesült Királyság).

5.4 A kalcifikáció indukálása magas foszfáttal

A kalcifikáció indukáláshoz szervesen foszfáttal (Pi, 1,5-2,5 mmol/L, pH 7,4) kiegészített 2% FBS tartalmú DMEM tápfolyadékot használtunk. Kísérleteink egy részében a kalcifikáló médiumot kalciummal (Ca, 0,6 mmol/L CaCl₂) is kiegészítettük.

5.5 Alizarin vörös festés

A kalcifikációt alizarin vörös festéssel detektáltuk. A kísérlet végeztével a 96 lyukú lemezen tenyésztett sejtekről eltávolítottuk a tápfolyadékot, PBS-sel mostuk, majd 4%-os paraformaldehiddel fixáltuk. A fixálást követően a sejteket újból átmostuk PBS-sel majd a sejtekhez 2%-os alizarin vörös (pH 4,2) oldatot adtunk. Tíz perc múlva a festéket eltávolítottuk, majd a lemezt desztillált vízzel mostuk. A lemez fényképezése után a sejtekhez 100 µl hexadecilpiridinium-klorid oldatot (100 mmol/L) adtunk, mely feloldja a bekötődött festéket,

így a mérés kvantálhatóvá tehető. A minták abszorbanciáját 562 nm-es hullámhosszon mértük le mikrolemez olvasóval (BioTek TS 800).

5.6 Az extracelluláris mátrix kalcium tartalmának meghatározása

A sejteket 96 lyukú lemezen tenyésztettük és kezeltük. A kezelés végén a sejtekről eltávolítottuk a tápfolyadékot, PBS-sel mostuk, és 0,6 mol/L-es koncentrációjú sósavval dekalcináltuk az extracelluláris mátrixot 30 percig szobahőmérsékleten. A sósavas felülúszó kalcium tartalmát QuantiChrom Calcium Assay kit-tel (Gentaur, Kampenhout, Belgium) határoztuk meg a gyártó által megadott instrukciókat követve. A dekalcinálást követően a sejteket újra átmostuk PBS-sel majd lizáltuk 0,1% NaOH és 0,1% SDS tartalmú pufferben. A lizátum fehérje koncentrációját BCA Protein Assay kit-tel (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) határoztuk meg és a kalcium tartalmat a fehérjetartalomra normalizálva adtuk meg.

5.7 A sejtek viabilitásának vizsgálata

A sejtek életképességének vizsgálatához a sejteket 96 lyukú sejtenyésző lemezen tenyésztettük. A kezelés végén eltávolítottuk a tápfolyadékot, majd 100 µl MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólium-bromid) reagenst adtunk hozzájuk. Ezután a sejteket minimum 3 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk. Az inkubáció végeztével az MTT-oldatot eltávolítottuk és a képződött formazán kristályokat 100 µL dimetil-szulfoxidban oldottuk fel és meghatároztuk az egyes minták abszorbanciáját 577 nm-en mikrolemez olvasóval. A kezelt sejtek életképességét a kezeletlen sejtek életképességéhez viszonyítva, százalékban adtuk meg.

5.8 Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (qRT-PCR)

A sejteket 6 lyukú lemezen tenyésztettük. Az RNS izolálásához a sejteket a kezelés végén Trizol (RNA-STAT60, Tel-Test B Labs, Friendswood, TX, USA) reagenssel lizáltuk. A minták RNS tartalmát a gyártó protokollját követve nyertük ki. Az RNS minták koncentrációját és tisztaságát a 260 és 280 nm-en mért abszorbanciájuk aránya alapján határoztuk meg. Az abszorbanciákat NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) spektrofotométer segítségével határoztuk meg. A koncentráció meghatározása után a mintákból 2 µg RNS-t írtunk át cDNS-sé, melyhez High Capacity cDNA RT kitet (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) használtunk. A PCR reakciót valós idejű qPCR készülékkel (CFX96 Real-Time System, Bio-Rad Inc., Hercules, CA, USA) végeztük. A target gének amplifikációja során iTaq Universal Probes Supermix master mixet (Bio-Rad, Inc.) és

validált FAM fluorofórral konjugált TaqMan próbát és a hozzá előre megtervezett primereket használtuk. Vizsgálataink során VEGFA (Hs.00900055), GLUT1 (Hs. 00892681), RUNX2 (Hs.535845), SOX9 (Hs1001343), MSX2 (Hs00741177), ALP (Hs00768162), OCN (Hs01587814) és GAPDH (Hs02758991), valamint ciklofilin A (Hs0414521) gének expresszióját vizsgáltuk.

5.9 Western blot analízis

A sejteket 6 lyukú sejtenyészti lemezen tenyésztettük. A sejteket 120 µL 2x Laemmli lízis pufferben lizáltuk. A kapott lizátumot 5 percig 95 °C-on denaturáltuk, szonikáltuk (2x5 másodperc) majd újabb 5 percig denaturáltuk. Mintánként azonos mennyiségű fehérjét 7,5-10%-os SDS poliakrilamid gélen választottuk el Bio-Rad Mini Protean készülékkel 100 V feszültség alkalmazása mellett. A mintákat nitrocellulóz membránra blottoltuk (10600002, GE Healthcare, Amersham, Germany) 12 V feszültségen, 45 percen át fűszárítással blottolóval (Bio-Rad Inc, Hercules, CA, USA). A membránt 6%-os tejpor oldattal blokkoltuk 1 órán keresztül szobahőmérsékleten, majd a membránhoz adtuk az elsődleges antitestet 5%-os tejpor oldatban. Az elsődleges antitesteket; az anti-HIF-1 α antitestet (GTX127309, GeneTex, Irvine, CA, USA) 0,5 µg/ml, az anti-HIF-2 α antitestet (#7096, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) 2,5 µg/ml, és az anti-Glut-1 antitestet (GTX1309, GeneTex) 0,5 µg/ml, az anti-Runx2 antitestet (20700-1-AP; Proteintech, Rosemont, IL) 0,2 µg/ml, az anti-Sox9 antitestet (ab184547; Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság) 1 µg/ml, az anti-ALP antitestet (sc-30203; Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, TX, USA) koncentrációban alkalmaztuk. A membránt az elsődleges antissal egy éjszakán keresztül 4 °C-on billegítettük, majd a membránt TBS-T-vel (Tris-sel puffertolt fízológias sóoldat mely 0,1% Tween 20 detergenst tartalmaz) 3-szor mostuk gyorsan és 3-szor 10-15 percig. Ezt követően a membránokat 1 órán keresztül torma peroxidázzal konjugált anti-nyúl (NA934, Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA) és anti-egér (NA931, Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA) másodlagos antissal inkubáltuk szobahőmérsékleten. Az inkubálást követően a membránokat újból TBS-T-vel mostuk 3-szor gyorsan, majd 3-szor 10-15 percen át, majd Western ECL reagenssel (Bio-Rad Inc., Hercules, CA, USA) hívtuk elő. Az eredményt röntgen filmen, illetve digitálisan rögzítettük (LI-COR, Lincoln, NE, USA). A sávok intenzitását a készülék szoftverébe épített analízis szoftver, illetve a GelQuant szoftver segítségével határoztuk meg. Detektálást követően a membránokat újrajelöltük anti- β -aktin antissal (sc-47778; Santa Cruz Biotechnology, Inc), melyet 0,5 µg/ml koncentrációban alkalmaztunk.

5.10 VEGF szint meghatározása

A sejteket 96 lyukú sejtenyésző lemezen tenyésztettük. A kezelés végeztével a felülúszót összegyűjtöttük, majd a sejtek által szekretált VEGF mennyiségét ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) módszerrel határoztuk meg a gyártói előírásoknak megfelelően.

5.11 Oszteokalcin szint meghatározása

A sejteket 6 lyukú lemezen tenyésztettük, majd a kezelés végén a sejtekről eltávolítottuk a tápoldatot, DPBS-sel mostuk, majd 100 µl EDTA-t (0,5 mol/L, pH 6,9) adtunk hozzá. Az oszteokalcin koncentrációját az EDTA-s felülúszóból ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) módszerrel határoztuk meg a gyártó által előírtaknak megfelelően.

5.12 ROS képződés vizsgálata

A sejteket 96 lyukú sejtenyésző lemezen tenyésztettük. A kezelés után a sejteket PBS pufferrel mostuk és 5-(és-6)-klorometil-2',7'-diklorodihidrofluoreszcein diacetát, acetyl észtet (CM-H₂DCFDA) adtunk (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) hozzájuk (10 µmol/L, 30 perc, 37°C-on). 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. Általános gyökfogóként az N-acetyl-cisztint (NAC, 5 mmol/L), szuperoxid-dizmutáz mimetik-ként Mn(III)-tetrakis (4-benzolsav) porfirin kloridot (MTB, 50 µmol/L, Santa Cruz Biotechnology Inc, Dallas, TX, USA), hidrogén-peroxid megkötésére nátrium-piruvátot (SP, 5 mmol/L), Nox1/4 enzim gátlására GKT137831-et (20 µmol/L, MedChemExpress, NJ, USA) és a mitokondriális elektron transzport gátlására rotenont (5 µmol/L) alkalmaztunk.

5.13 Géncsendesítés

A HIF-1α génexpresszió csökkentéséhez HIF-1α targetált Silencer® select (#AM16708, Thermo Fisher Scientific) siRNS-t alkalmaztunk. A módszer kontrolljaként negatív kontroll siRNS-t használtunk (#4390843, Thermo Fisher Scientific). A sejtek transzfektálásához pedig Lipofectamine® RNAiMAX reagenst (13778075, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) használtunk a gyártó protokolljának megfelelően.

5.14 Állatkísérletek

Az állatkísérleteket az egyetemi és nemzetközi etikai szabályoknak megfelelően végeztük, a kísérletek elvégzéséhez érvényes etikai engedéllyel rendelkezünk. A hipoxia hatásának vizsgálatához 8-10 hetes, nőstény és hím C57BL/6 egereket (n=24) használtunk, amelyeket

véletlenszerűen négy csoportra osztottunk: kontroll, 12, 24 és 48 órás kezelés. Azon egereket, melyek a hipoxiás csoportba kerültek, megfelelő mennyiségű vízzel és élelemmel ellátott ketrecekben tartottuk, amelyeket áttetsző akril kamrákba helyeztünk. Ebbe az akril kamrába előre elkészített gázkeveréket (10% O₂ nitrogénben, Messer Hungarogáz) adagoltunk 5-10 L/perc áramlási sebességgel. A normoxiás csoportban lévő egerek a fentebb említett körülmények között, szintén előre elkészített gázkeveréket (21% O₂, 79% N₂, Messer Hungarogáz) kaptak 5-10 L/perc áramlási sebességgel. A kísérlet végeztével az egereket szén-dioxiddal altattuk, perfundáltuk 5 ml steril hideg DPBS-sel, majd kinyertük az aortát és a tüdőt, melyeket folyékony nitrogénben gyorsfagyasztottunk és felhasználásig -80 °C-on tároltunk. A DPD hatásának vizsgálata során 8-12 hetes C57BL/6 egereket (n=25) öt csoportra osztottunk: kontroll, CKD, CKD+DPD 5mg/kg/nap, CKD+DPD 10 mg/kg/nap, CKD+DPD 15 mg/kg/nap. A krónikus veseelégtelenséget adenin tartalmú diétával váltottuk ki, melynek során az egerek 6 hétig 0,2% adenin és 0,7% foszfát tartalmú, majd a 7. héttől 0,2% adenin és 1,8% foszfát tartalmú rágcsáló tápot kaptak (Ssniff, Soest, Németország). A DPD-t (MedChemExpress, Princeton, NJ, USA) a 7. héttől naponta orálisan, 1% metilcellulózban szuszpendálva adagoltuk, míg a DPD kezelésben nem részesülő egerek azonos térfogatú vivőanyagot kaptak.

5.15 Az aorta kalcifikáció detektálása kalcium méréssel és Osteosense festéssel

Az aorta kalcifikációját osteosense festéssel vizsgáltuk. A C57BL/6 egereket (n=15) három csoportba osztottuk: kontroll, CKD és CKD+DPD 15mg/kg/nap. Az egereket a kísérlet végeztével izofluránnal (Baxter, Deerfield, IL, USA) elaltattuk, majd egyedenként 2 nmol OsteoSense festéket (OsteoSense 680 EX, PerkinElmer, MA, USA) injektáltunk az egerekbe retro-orbitálisan. 24 óra elteltével az egerek életét szén-dioxid-dal kioltottuk, majd az aortát izoláltuk, megtisztítottuk és az aorták fluoreszencia intenzitását IVIS Spectrum In Vivo Imaging műszerrel (PerkinElmer, MA, USA) határoztuk meg. A képalkotás és mérés után az aorták kalcium tartalmát is meghatároztuk. Ehhez az aortákat felnyitottuk, majd apró darabokra vágtuk és 50 µl 0,6 mol/L koncentrációjú sósavban 24 órán keresztül dekalcináltuk. A sósavas felülúszó kalcium tartalmát a fentebb említett módon QuantiChrom kalcium assay kit-tel határoztuk meg, és a Ca tartalmat fehérje tartalomra normalizálva adtuk meg.

5.16 A vesefunkció és az anémia laboratóriumi paramétereinek meghatározása

A vesefunkció és a hematológiai paraméterek meghatározását Na₃-citráttal antikoagulált vérplazmából végeztük el. Az urea és kreatinin szinteket Cobas® c502 készülékkel (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), a hematológiai paramétereket Siemens Advia-2120i

hematológiai analizátorral (Tarrytown, NY, USA) határoztuk meg 800 Mouse C57BL programmal.

5.17 *Ex vivo* aorta szövettényészet modell

Az aorta szövettényésztése során C57BL/6 egerek (n=53) aortáját aszeptikus körülmények között izoláltuk, majd a sejttényésztés során is alkalmazott, emellett 2,5 µg/ml fungizonnal (Merck, Darmstadt, Németország) kiegészített DMEM tápfolyadékban tartottuk normoxiás és hipoxiás körülmények között, illetve egyes kísérletekben DPD jelenlétében. A tápfolyadékot minden második napon cseréltük. Pozitív kontrollként oszteogén médiumban kezeltük az aortákat, melyet 2,5 mmol/L inorganikus foszfáttal, egyes kísérletekben a foszfáton kívül 0,6 mmol/L kalciummal egészítettünk ki. Egyes csoportokban N-acetil-ciszteint (NAC) és chetomint is alkalmaztunk a hipoxiás kezelés mellett. A kísérlet végén az aortákat megmostuk DPBS-ben, longitudinálisan felnyitottuk, apró darabokra vágtuk és 25 µl 0,6 mol/L sósavval 24 órán keresztül dekalcináltuk. A sósavas felülúszóból meghatároztuk a kalcium tartalmat, amit az aorta nedves tömegére normalizáltunk.

5.18 Hisztológia

Az aorta gyűrűket a kísérlet végeztével 10%-os neutrális formalinban fixáltuk, majd paraffinba ágyztuk és 4 µm vastagságú metszeteket készítettünk. Deparaffinálást követően von Kossa festést és hematoxin-eozin (H&E) festést végeztünk a gyártó leírása alapján (ab150687; Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság).

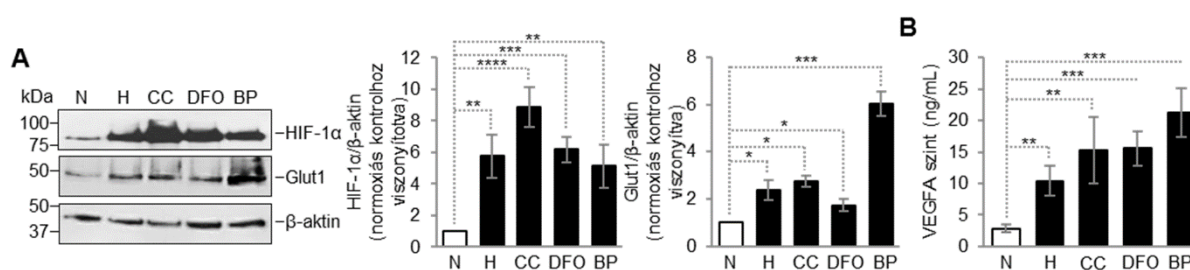
5.19 Statisztikai analízis

A statisztikai analízist a GraphPad Prism szoftver (8.01, San Diego, CA, USA) segítségével végeztük. Minden *in vitro* kísérletet legalább háromszor ismételtünk meg. A normál eloszlás vizsgálatára Shapiro-Wilk tesztet használtunk, majd a P értékek meghatározásához parametrikus tesztek alkalmaztunk. Két csoport szignifikancia szintjének meghatározásához kétfarkú Student-féle t próbát, három, vagy annál több csoport összehasonlítása során ANOVA tesztet, majd Tukey-féle poszt-hoc analízist végeztünk. A $p \leq 0,05$ értéket szignifikánsnak tekintettük.

6. Eredmények

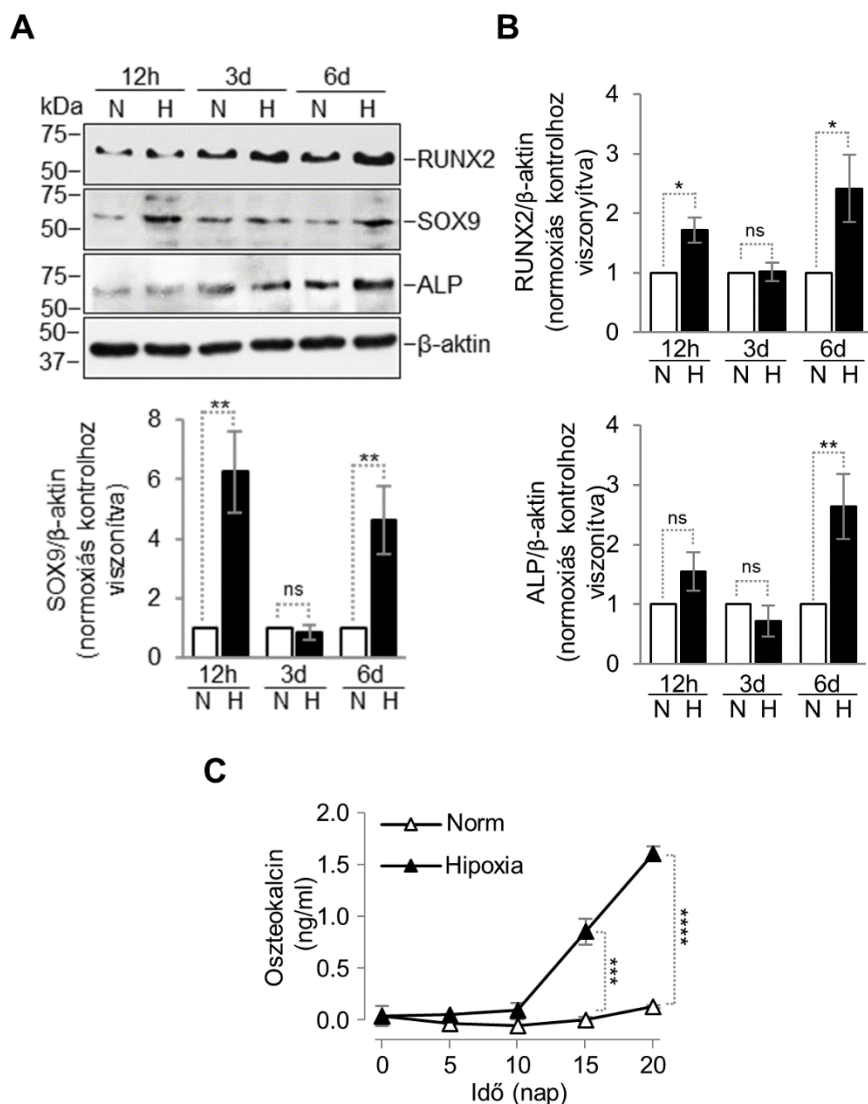
6.1 A hipoxia fokozza a vaszkuláris simaizomsejtek oszteokondrogén irányú differenciálódását

Elsőként megvizsgáltuk a HIF-1 útvonal aktivációját humán aorta vaszkuláris simaizomsejtekben hipoxiás körülmények között, valamint hipoxia mimetikumok (kobalt-klorid, deferoxamin és 2,2'-bipiridil) jelenlétében és megállapítottuk, hogy a hipoxia és a hipoxia mimetikumok nagymértékben fokozták a HIF-1 útvonal aktivációját. A hipoxia mimetikumok közül a kobalt-klorid idézte elő a legjelentősebb HIF-1 aktivációt. Ezt követően meghatároztuk a HIF-1 α szabályzása alatt álló célfehérjék, a glükóz transzporter 1 (Glut1) és a VEGFA fehérjék expresszióját és eredményeink azt mutatják, hogy mind a hipoxia, mind a hipoxia mimetikumok fokozták a Glut1 és VEGFA expresszióját (5. ábra, A és B).



5. ábra A HIF-1 útvonal hipoxia és hipoxia mimetikumok általi aktivációja humán aorta vaszkuláris simaizomsejtekben. A sejteket normoxiás (21% O₂) és hipoxiás (5% O₂) körülmények között tartottuk, valamint hipoxia mimetikumokat (CC: kobalt-klorid, 200 μ mol/L; DFO: deferoxamin, 20 μ mol/L, BP: bipiridil, 100 μ mol/L) alkalmaztunk. (A) Reprezentatív HIF-1 α , Glut1 és β -aktin Western blottok 12 órás kezelést követően teljes sejt lizátumból. HIF-1 α és Glut1 β -aktinra normalizált fehérje expressziója. Az oszlopdiagrammokon feltüntetett átlag $\pm$ SD minimum 3 független kísérlet eredményéből származik. (B) Szekretált VEGFA expresszió 48 órás kezelést követően (n=6). * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,005, **** p<0,001 normoxiás kontrollhoz viszonyítva.

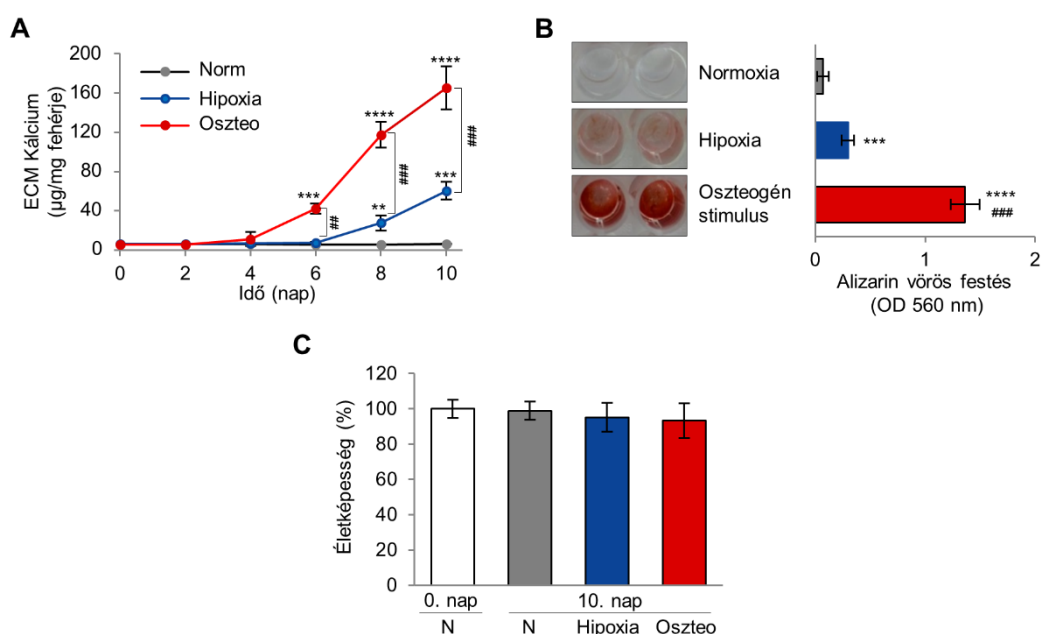
Ezután megvizsgáltuk az oszteokondrogenikus markerek, Runx2, Sox9 és ALP fehérje expresszióját és eredményeink arra utalnak, hogy a hipoxia fokozza a vaszkuláris simaizomsejtek oszteokondrogén irányú differenciálódását (6. ábra, A és B). Továbbá megvizsgáltuk a csontban található kalcium kötő fehérje, az oszteokalcin szintjét és megállapítottuk, hogy hipoxiás kezelés hatására az oszteokalcin szint időfüggő növekedést mutat humán aorta vaszkuláris simaizomsejtekben (6. ábra, C).



6. ábra. A hipoxia fokozza az oszteokondrogenikus markerek expresszióját vaszkuláris simaizomsejtekben. A sejteket normoxiás (21% O₂) és hipoxiás (5% O₂) körülmények között tartottuk. (A) Reprezentatív Runx2, Sox9, ALP és β-aktin Western blottok 12 órás, 3 és 6 napos kezelést követően teljes sejtlizátumból. Runx2, Sox9 és ALP β-aktinra normalizált fehérje expressziója. (C) Az oszteokalcin időfüggő felhalmozódása az extracelluláris mátrixban. Az eredmények (átlag ± SD) minimum 3 független kísérlet eredményéből származnak. * p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,005, **** p<0,001 normoxiás kontrolhoz viszonyítva, ns= nem szignifikáns

6.2 A hipoxia fokozza a vaszkuláris simaizomsejtek extracelluláris mátrix mineralizációját

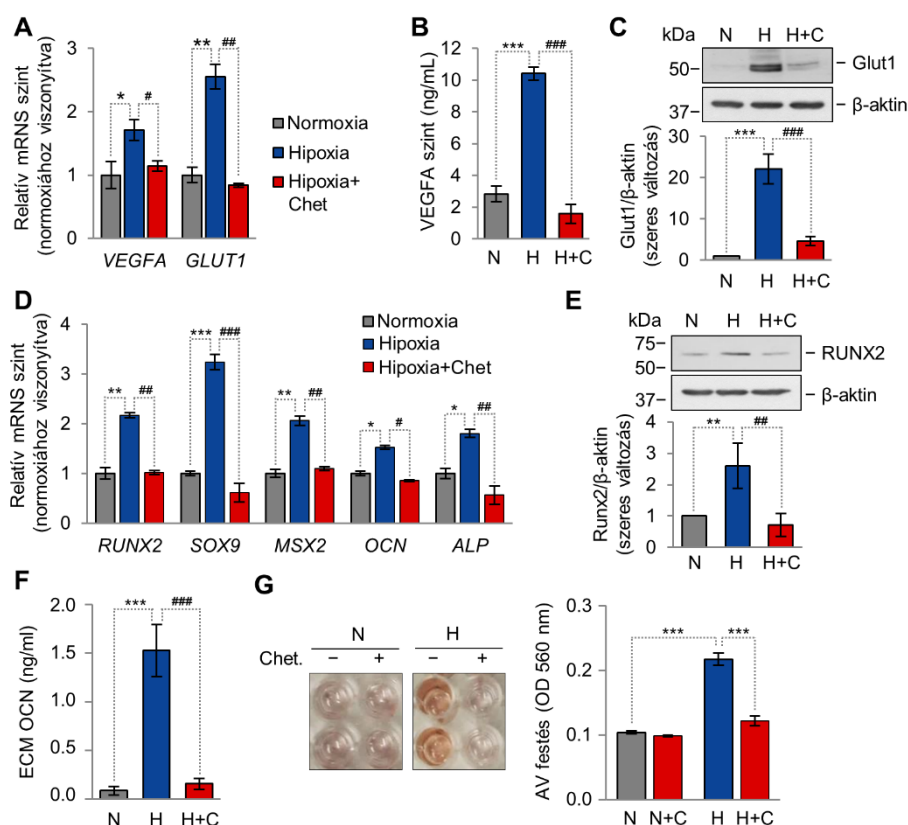
Ezután megvizsgáltuk a hipoxia ECM kalcifikációjára gyakorolt hatását humán aorta vaszkuláris simaizomsejtekben, valamint pozitív kontrollként oszteogén stimulust is alkalmaztunk. Eredményeink azt mutatták, hogy a hipoxiás kezelés időfüggő módon fokozza az ECM kalcifikációját vaszkuláris simaizomsejtekben. A kalcifikáció mértéke kisebb, de összemérhető az oszteogén stimulussal kiváltott kalcifikációval (7. ábra, A és B). Emellett megvizsgáltuk a hipoxia és az oszteogén stimulus hatását a sejtek életképességére, és megállapítottuk, hogy egyik kezelés sem csökkentette a sejtek viabilitását a 10 napos kezelést követően (7. ábra, C).



7. ábra A hipoxia indukálja a vaszkuláris simaizomsejtek extracelluláris mátrix mineralizációját. A vaszkuláris simaizomsejteket normoxiás és hipoxiás körülmények között tartottuk, valamint oszteogén médiummal (0,6 mmol/L Ca és 2,5 mmol/L Pi) kezeltük. (A) A Ca felhalmozódás időfüggése az extracelluláris mátrixban. (B) Reprezentatív alizarin vörös festés és annak kvantifikálása (10. nap). (C) A sejtek életképessége (10. nap). Az eredmények (átlag ± SD) 3 független kísérletből származnak. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$ normoxiás kontrolhoz viszonyítva, míg # $p < 0,01$, ### $p < 0,005$ a hipoxia és az oszteogén csoport összehasonlításában.

6.3 A hipoxia a HIF-1 útvonal aktivációján keresztül fokozza a vaszkuláris simaizomsejtek oszteokondrogén differenciálódását

Következő kísérletünkben a HIF-1 útvonal szerepét vizsgáltuk a vaszkuláris simaizomsejtek hipoxia-indukált oszteokondrogén irányú differenciálódásában. Ennek során a HIF-1 transzkripció aktivitását gátló chetomint alkalmazva meghatároztuk a VEGFA és Glut1 mRNS, valamint fehérje expresszióját. Megállapítottuk, hogy a chetomin gátolta a VEGFA és Glut1 expressziójának hipoxia által előidézett emelkedését (8. ábra, A-C).

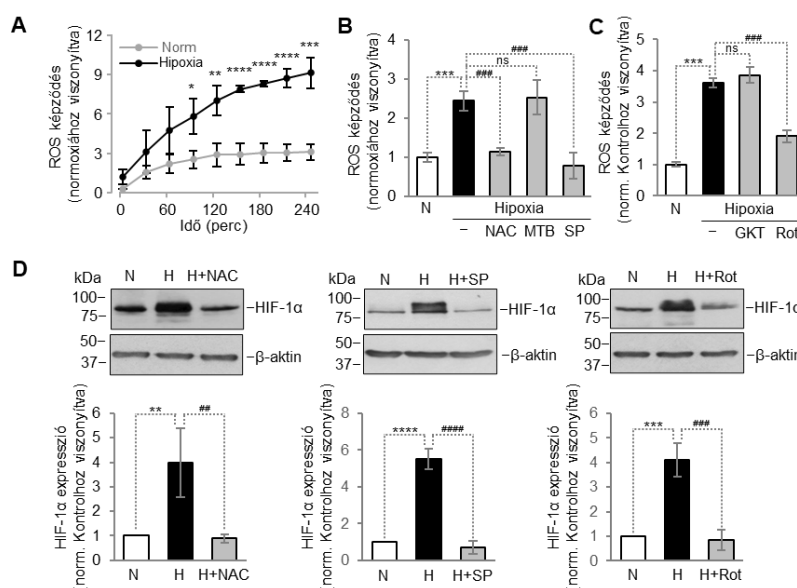


8. ábra A hipoxia a HIF-1 útvonal aktivációján keresztül fokozza a vaszkuláris simaizomsejtek oszteokondrogenikus differenciációját. A sejteket normoxiás és hipoxiás körülmények között tartottuk chetomin (6 nmol/L) jelenlétében. (A) VEGFA és Glut1 relatív mRNS szintje 6 órás kezelést követően. (B) VEGFA szint vizsgálata 48 órás kezelés után. (C) Glut1 Western blot 12 órás kezelést követően, amelyet β-aktin antitesttel újra jelöltünk. (D) Oszteokondrogenikus markerek relatív mRNS szintjei 6 órás kezelést követően, amelyeket GAPDH-ra normalizáltunk. (E) Runx2 fehérje expressziójának vizsgálata 12 órás kezelés után, amelyet β-aktinra normalizáltunk. (F) Oszteokalcin szint 15 napos kezelést követően. (G) Reprezentatív alizarin vörös festés és annak denzitometrája. Az eredmények (átlag ± SD) 3 független kísérletből származnak. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$ normoxiás kontrolhoz viszonyítva, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,005$ hipoxia és hipoxia+chetomin csoportok között.

Ezt követően megvizsgáltuk a chetomin hatását az oszteokondrogenikus markerek mRNS expressziójára és azt tapasztaltuk, hogy a chetomin teljes mértékben meggátolta az oszteokondrogén markerek (Runx2, Sox9, Msx2, OCN, ALP) mRNS szintjének hipoxia általi fokozódását (8. ábra, D). Kimutattuk továbbá, hogy chetomin jelenlétében elmarad a Runx2 és az oszteokalcin fehérjék expressziójának hipoxia által előidézett fokozódása (8. ábra, E, F), valamint a vaszkuláris simaizomsejtek hipoxia által indukált kalcifikációja is (8. ábra, G).

6.4 A ROS szerepe a vaszkuláris simaizomsejtek HIF-1 aktivációjában

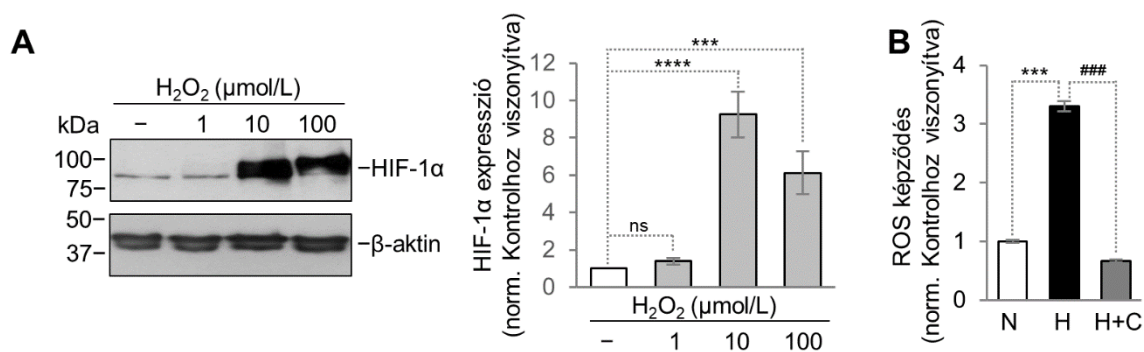
Következő kísérleteinkben a hipoxia és a ROS képződés kapcsolatát vizsgáltuk a vaszkuláris simaizomsejtek hipoxia-mediált oszteokondrogén irányú átprogramozódása során. Elsőként a humán aorta vaszkuláris simaizomsejtek ROS termelését mértük meg normoxiás és hipoxiás (5% O₂) körülmények között, valamint antioxidánsokkal történő kezelést követően. Megállapítottuk, hogy hipoxia hatására fokozódik a vaszkuláris simaizomsejtek ROS termelése (9. ábra, A).



9. ábra A ROS képződés szerepe a HIF-1α hipoxia általi stabilizációjában. A sejteket normoxiás és hipoxiás (5% O₂) körülmények között tartottuk és különféle antioxidánsokkal (NAC (N-acetil-cisztein): 1 mmol/L, MTB (MnTBAP-klorid): 50 μmol/L, SP (nátrium-piruvát): 5 mmol/L, GKT: 20 μmol/L, Rot (rotenon: 5 μmol/L) kezeltük 4 órán keresztül. (A-C) Intracelluláris ROS termelődés vizsgálata. (D) HIF-1α Western blottok 12 órás kezelést követően NAC, SP és Rot jelenlétében β-aktinra normalizálva. Eredményeink (átlag ± SD) 3 független kísérlet eredményéből származnak. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,005, **** p<0,001 normoxiás kontrolhoz viszonyítva, # p<0,05, ## p<0,01, ### p<0,005 hipoxiás kezeléshez hasonlítva.

Ezt követően a képződött ROS típusát és keletkezésének helyét vizsgáltuk, ezért különböző antioxidánsok jelenlétében megvizsgáltuk a ROS képződés mértékét. Az glutation prekursoraként ismert antioxidáns N-acetil-cisztein (NAC), a hidrogén-peroxid fogó nátrium-piruvát és az elektron transzportlánc I-es komplexének működését gátló rotenon hatékonyan gátolta a hipoxiás körülmények között tartott vaszkuláris simaizomsejtek ROS képződését, mely arra utal, hogy a hipoxia hatására képződő ROS mitokondriális eredetű hidrogén-peroxid (9. ábra, B-C). Ezt követően a ROS termelődést gátló antioxidánsok jelenlétében megvizsgáltuk a vaszkuláris simaizomsejtek HIF-1 α expresszióját. Megállapítottuk, hogy a ROS képződés csökkenésével párhuzamosan az antioxidánsok csökkentették a vaszkuláris simaizomsejtek HIF-1 α expresszióját (9. ábra, D).

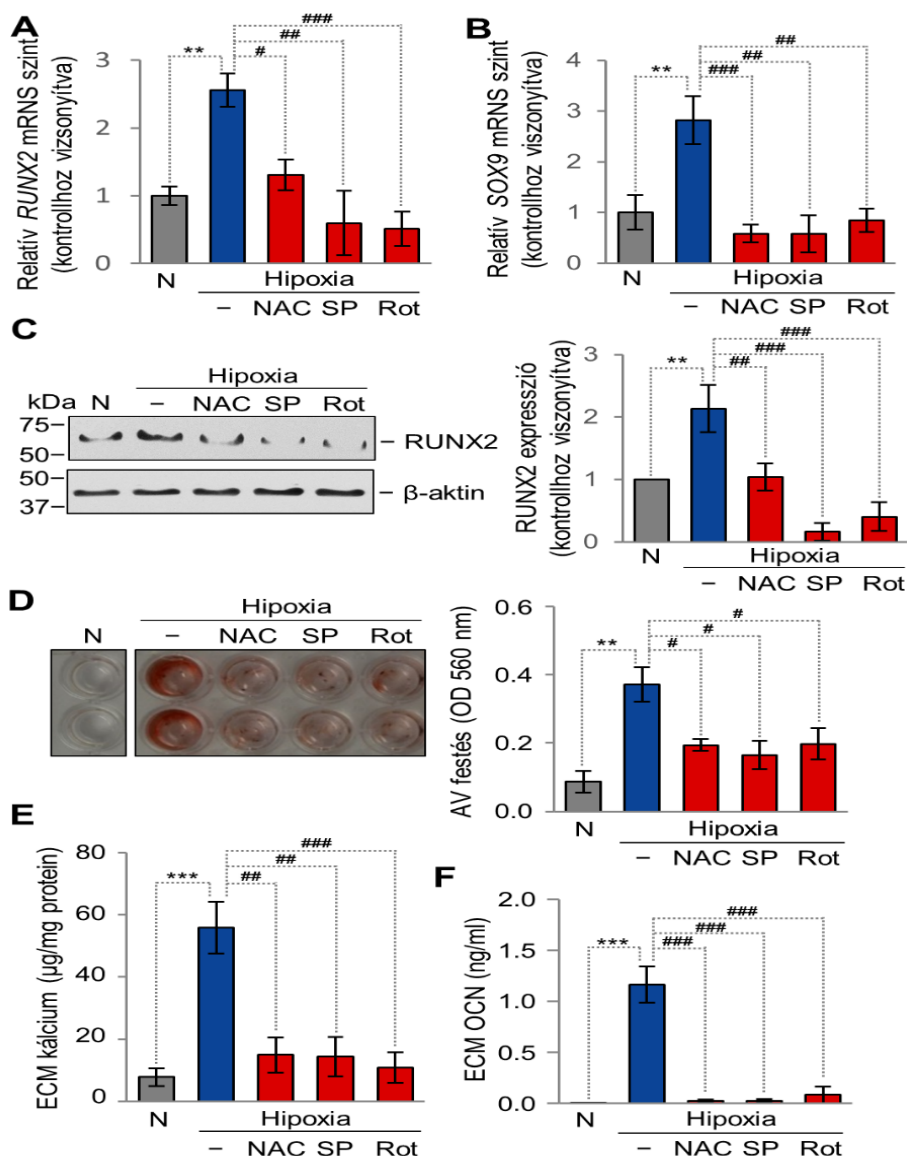
A ROS képződés és a HIF-1 α közti interakció jól ismert, azonban a szakirodalomban számos ellentmondás található az exogén ROS és a HIF-1 α expressziója, valamint transzkripció aktivitása között. A ROS képződés és HIF-1 α közötti lehetséges interakció feltárása céljából a vaszkuláris simaizomsejteket hidrogén-peroxiddal kezeltük és megvizsgáltuk a sejtek HIF-1 α expresszióját. Megállapítottuk, hogy a hidrogén-peroxid dózisfüggő módon fokozta a sejtek HIF-1 α expresszióját (10. ábra, A). Ezt követően megvizsgáltuk a HIF-1 gátló chetomin hatását a ROS képződésre hipoxiás körülmények között és kimutattuk, hogy a chetomin gátolta a ROS termelődést (10. ábra, B).



10. ábra A ROS képződés és a HIF-1 α aktiváció közötti interakció. A sejteket hidrogén-peroxiddal (1-100 μ mol/L) kezeltük, valamint hipoxiás körülmények között tartottuk chetomin (C) (6 nmol/L) mellett. (A) HIF-1 α Western blot és kvantálása 30 perces kezelést követően β -aktinra normalizálva. (B) intracelluláris ROS termelődés vizsgálata. Eredményeink (átlag $\pm$ SD) 3 független kísérlet eredményéből származnak. *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$ normoxiás kontrolhoz viszonyítva, ### $p < 0,005$ hipoxiás kezeléshez hasonlítva, ns= nem szignifikáns

6.5 A ROS szerepe a vaszkuláris simaizomsejtek oszteokondrogén differenciálódásában és az extracelluláris mátrix kalcifikációjában

A továbbiakban a Runx2 és Sox9 expressziójának, valamint az ECM kalcifikációjának ROS függését vizsgáltuk humán aorta vaszkuláris simaizomsejtekben.

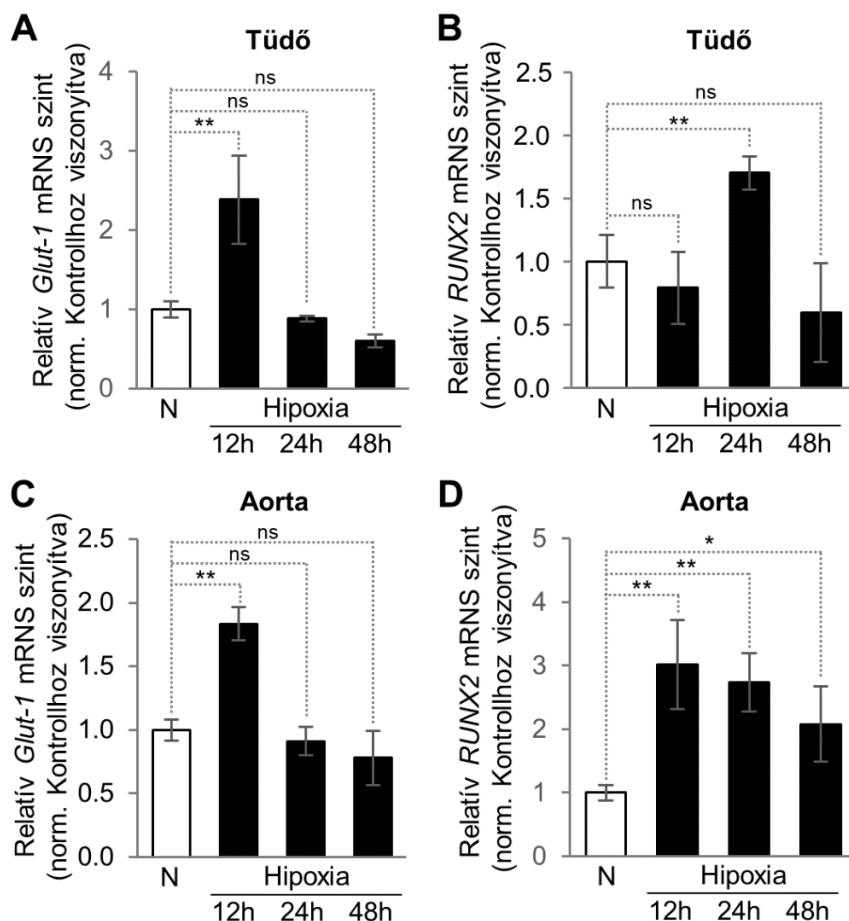


11. ábra A ROS szerepe a vaszkuláris simaizomsejtek hipoxia-mediált oszteokondrogenikus differenciálódásában és kalcifikációjában. A sejteket normoxiás és hipoxiás (5% O₂) körülmények között tartottuk antioxiánsok (NAC (N-acetil-cisztein: 1 mmol/L, SP (nátrium-piruvát): 5 mmol/L, Rot (rotenon): 5 µmol/L) jelenlétében. (A-B) Runx2 és Sox9 relatív mRNS expressziója 6 órás kezelés után. (C) Runx2 Western blot 12 órás kezelést követően β-aktinra normalizálva. (D) Reprerzentatív alizarin vörös festés 10 napos kezelést követően. (E-F) Extracelluláris mátrix kalcium és oszteokalcin tartalma. Az eredmények (átlag ± SD) 3 független kísérlet eredményéből származnak. ** p<0,01, *** p<0,005 normoxiás kontrollhoz képest, # p<0,05, ## p<0,01, ### p<0,005 hipoxiás kezeléshez hasonlítva.

Megállapítottuk, hogy a Runx2 és Sox9 mRNS expressziójának hipoxia általi fokozódása antioxidánsok jelenlétében elmarad (11. ábra, A-B).

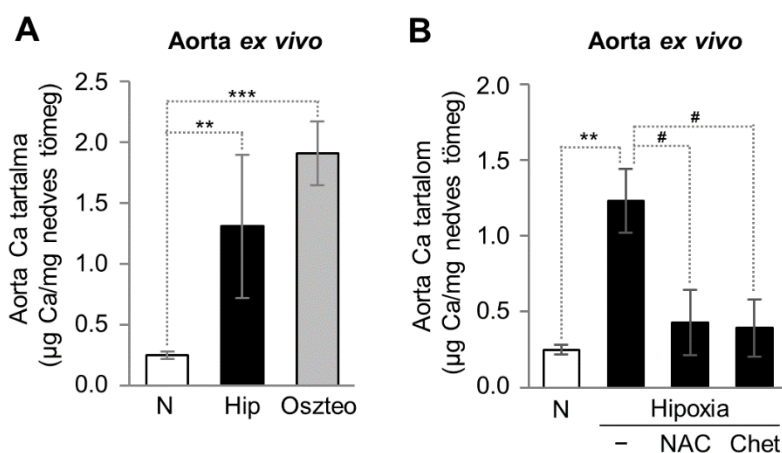
Ezen kívül megvizsgáltuk a Runx2 fehérje expresszióját és megállapítottuk, hogy antioxidánsok jelenlétében csökkent a Runx2 expressziójának hipoxia általi növekedése (11. ábra, C). Továbbá meghatároztuk az antioxidánsok hatását a vaszkuláris simaizomsejtek hipoxia-indukált kalcifikációjára. Kimutattuk, hogy az antioxidánsok jelenlétében az ECM kalcifikációja, kalcium tartalma és oszteokalcin szintje is nagymértékben csökkent vaszkuláris simaizomsejtekben (11. ábra, D-F).

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 (12. ábra, A-B). Ezzel párhuzamosan az aortákban is jelentősen nőtt a Glut-1 és Runx2 mRNS szintje (12. ábra, C-D).



12. ábra A hipoxia fokozza az oszteokondrogenikus átprogramozódást az egerek tüdejében és aortájában. C57BL/6 egereket (n=6/csoport) normoxiás és hipoxiás (10% O₂) körülmények között tartottunk 12, 24 és 48 óráig. (A-B) Glut-1 és Runx2 mRNS szintje tüdőben és (C-D) aortában. * p<0,05, ** p<0,01

A hipoxia kalcifikációra kifejtett hatását *ex vivo* aorta szövetkultúra modellben vizsgáltuk tovább. Ehhez elsőként aszeptikus körülmények között eltávolítottuk a C57BL/6 egerek aortáját, majd a kötőszövettől 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. Továbbá, oszteogén stimulus jelenlétében a különbség még jelentősebb, közel tízszeresére nőtt a kalcifikáció mértéke normoxiás körülményekhez képest (13. ábra, A).



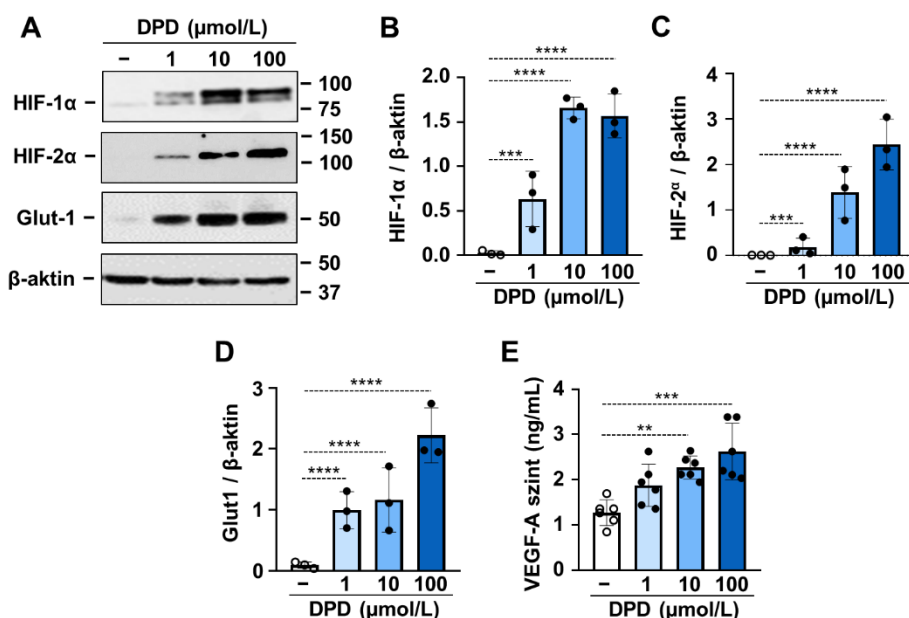
13. ábra A hipoxia ROS-függő módon fokozza az aorta kalcifikációját *ex vivo* körülmények között. C57BL/6 egerekből izolált aorta darabokat (n=5/csoport) 6 napig tartottuk normoxiás és hipoxiás körülmények között normál tápfolyadékban, illetve oszteogén tápfolyadékban (0,6 mmol/L Ca és 2,5 mmol/L Pi). Egy szeparált kísérletben a hipoxiában tartott aortákhoz NAC-t (N-acetil-cisztein) (5 mmol/L) illetve chetomint (Chet) (6 nmol/L) adtunk. (A-B) Az aorta minták kalcium tartalma. ** p<0,01, *** p<0,005 normoxiás kontrolhoz képest és # p<0,05 hipoxiás kezeléshez hasonlítva.

Ezt követően megvizsgáltuk a ROS képződés és HIF-1 aktiváció szerepét az aorta *ex vivo* körülmények között hipoxiával indukált kalcifikációjában. Kimutattuk, hogy a NAC és a chetomin is gátolta az aorta kalcium tartalmának hipoxia általi emelkedését (13. ábra, B).

6.6 Daprodustat fokozza a HIF-1 útvonal aktivációját

A CKD-asszociált anémia kezelésére prolil-hidroxiláz inhibitorokat fejlesztettek ki. A klinikai eredmények alapján az egyik legígéretesebb szernek a GlaxoSmithKline által előállított

Daprodustat (DPD) bizonyult, és Japánban a DPD bevezetésre került a klinikai gyakorlatba CKD-ban szenvedő betegek anémiájának kezelésére. Azt követően, hogy bemutattuk a hipoxia és a HIF-1 aktiváció fontosságát a vaszkuláris kalcifikáció patomechanizmusában, megvizsgáltuk a DPD lehetséges kalcifikációt fokozó hatását.

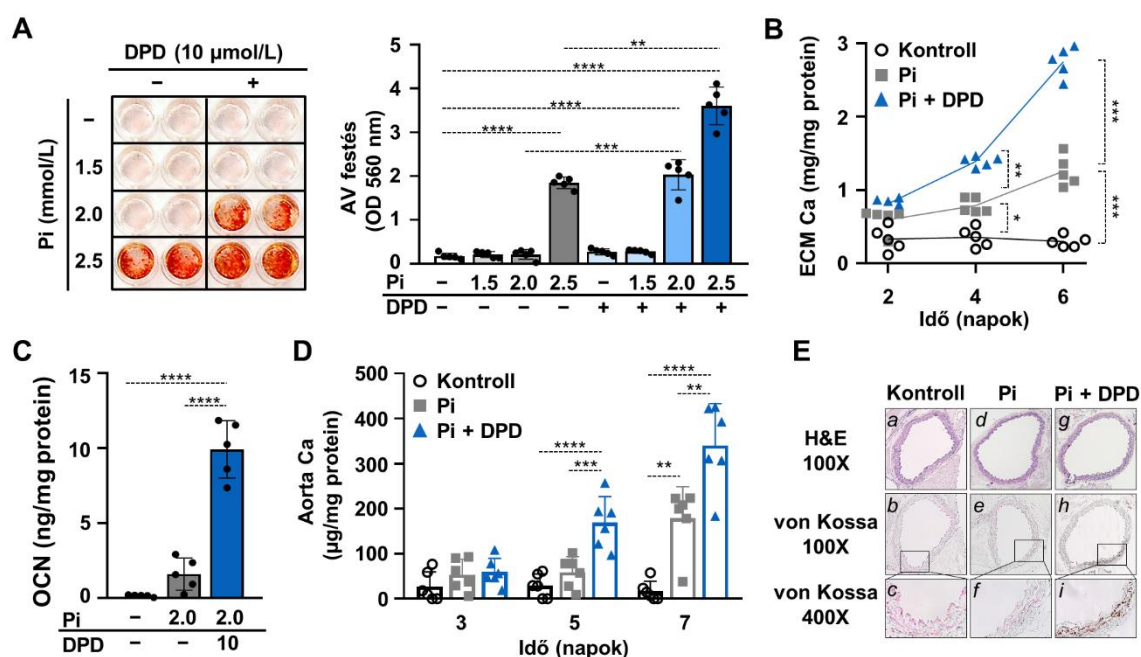


14. ábra A DPD fokozza a HIF-1 útvonal aktivációját. A vaszkuláris simaizomsejteket 1-100 μmol/L DPD (Daprodustat) jelenlétében kezeltünk 24 órán keresztül. (A-D) HIF-1α, HIF-2α és Glut1 Western blottok β-aktinra normalizálva (n=3). (E) Szekretált VEGF-A szint. ** p<0,01, *** p<0,005, **** p<0,001

Elsőként a DPD HIF-1 útvonal aktivációjára kifejtett hatását teszteltük, és megállapítottuk, hogy a DPD dóziszfüggő módon fokozza a HIF-1α, a HIF-2α, Glut1 és VEGF-A expresszióját (14. ábra, A-E).

6.7 A Daprodustat fokozza a vaszkuláris simaizomsejtek foszfáttal indukált kalcifikációját és ex vivo egér aorta szövettenyészetben

Ahogy az előző ábrán láthatjuk 10 $\mu\text{mol/L}$ DPD már elegendő a HIF-1 útvonal aktivációjához, ezért a további kísérleteinkben ezt a dózist alkalmaztuk. A DPD kalcifikációra kifejtett hatását különböző Pi szintek mellett tanulmányoztuk. A kalcifikációs kísérletünk eredménye azt mutatta, hogy a Pi-ot önmagában alkalmazva csak az általunk alkalmazott legmagasabb (2,5 mmol/L) koncentrációban fokozta a kalcifikációt, ugyanakkor a DPD érzékenyítette a sejteket a Pi-indukált kalcifikációra, és a Pi+DPD-vel kezelt sejtek esetén a kalcifikáció indukciójához már 2,0 mmol/L Pi elegendő volt 6 napon át tartó kezelést követően (15. ábra, A). A Pi és Pi+DPD által indukált kalcifikáció időbeliségét vizsgálva megállapítottuk, hogy a DPD felgyorsítja a Pi által indukált kalcifikációt vaszkuláris simaizomsejtekben (15. ábra, B).

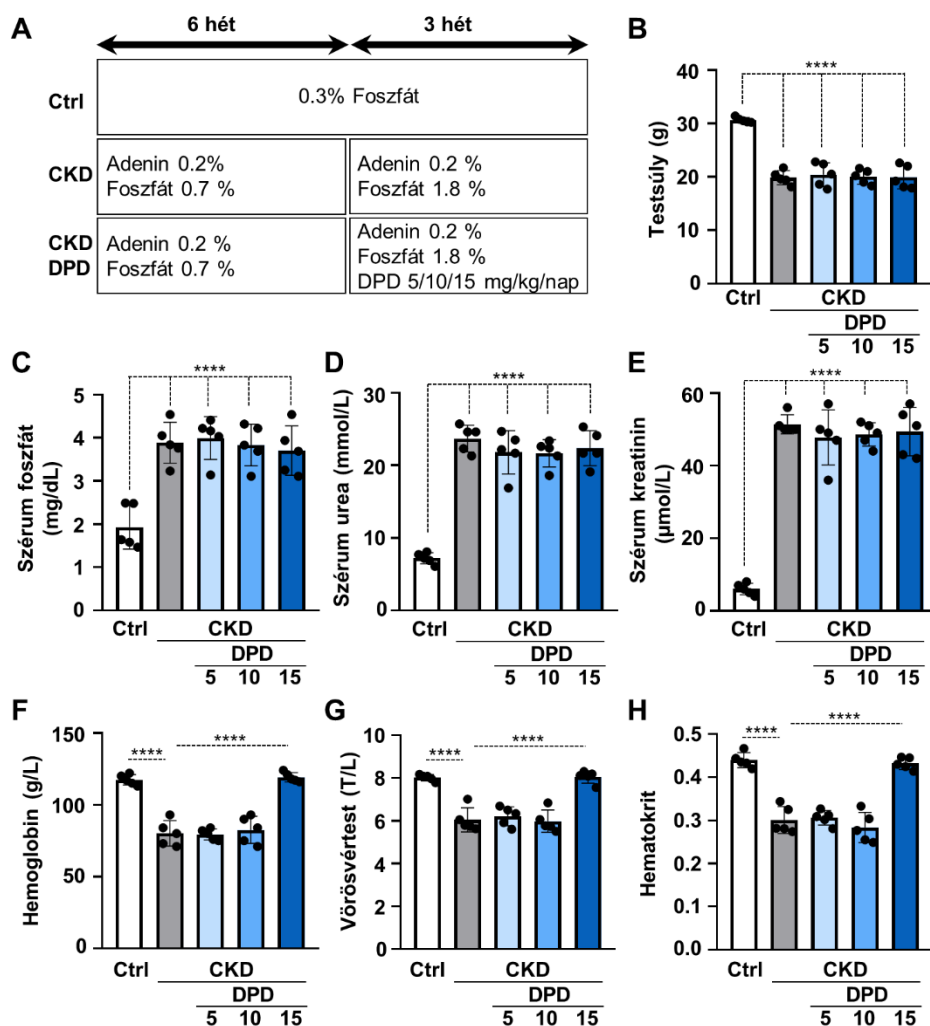


15. ábra A DPD fokozza a vaszkuláris simaizomsejtek foszfát-indukált extracelluláris mátrix kalcifikációját. (A-C) A sejteket 1,5-2,5 mmol/L Pi koncentráció jelenlétében tartottuk DPD (10 $\mu\text{mol/L}$) jelenlétében vagy hiányában 6 napon keresztül. (D-E) Az egér aorta darabokat (n=5) kontroll, magas Pi (2 mmol/L) és Pi+DPD (10 $\mu\text{mol/L}$) körülmények között tartottuk. (A) Reprezentatív alizarin vörös festés és kvantifikálása. (B-C) Az extracelluláris mátrix kalcium és oszteokalcin tartalma. (D) Aorta kalcium tartalma (E) Hematoxinil-eozin és Von Kossa festés (n=5). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$

Továbbá, a DPD jelentősen fokozta az extracelluláris mátrix OCN tartalmának Pi által indukált emelkedését (15. *ábra*, C). Ezt követően a DPD hatását *ex vivo* egér aorta szövettényészetben vizsgáltuk tovább. A steril körülmények között izolált aorta darabokat kontroll, illetve emelt Pi tartalmú tápfolyadékban tartottuk DPD hiányában vagy jelenlétében. Az aorták kalcium tartalmát 3, 5, illetve 7 napos kezelést követően határoztuk meg. A kalcium akkumulációja a Pi-tal kezelt aortákban a hetedik napon mutatott emelkedést a kontrollhoz viszonyítva, ugyanakkor a Pi+DPD-vel kezelt aorták kalcium szintje már a kezelés ötödik napján emelkedett volt (15. *ábra*, D). A kalcium mérés eredményét hisztológiai vizsgálattal erősítettük meg. Hematoxin-eozin és von Kossa festéseket végeztünk a kezelt aorta metszeteken. A kontroll és magas Pi-tal kezelt aortákban kalcifikációt nem tapasztaltunk, ugyanakkor a Pi+DPD-vel kezelt aortákban von Kossa pozitivitást detektáltunk (15. *ábra*, E).

6.8 A Daprodustat sikeresen korrigálja az anémiát, emellett fokozza az aorta kalcifikációt krónikus vesebeteg egérmodellben

A DPD vaszkuláris simaizomsejtekben történő vizsgálatát követően beállítottunk egy *in vivo* CKD egérmodellt, mely során C57BL/6 egerekben veseelégtelenséget indukáltunk.

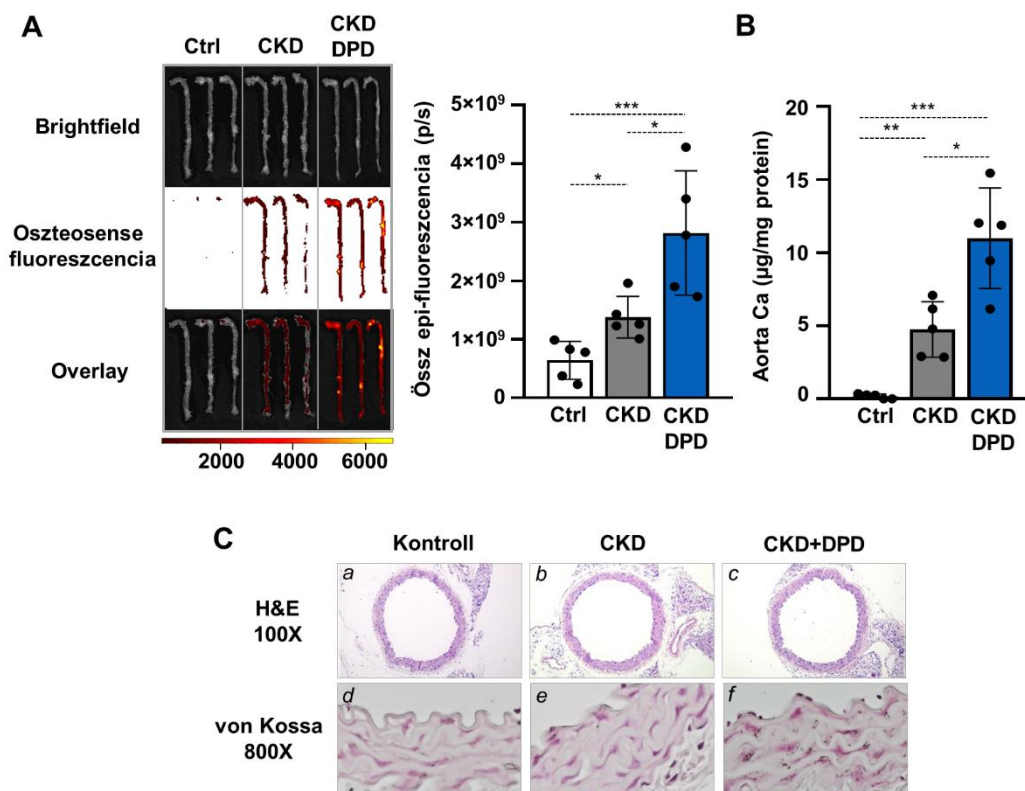


16. ábra A DPD vesefunkcióra és anémiára gyakorolt hatása CKD egér modellben. (A) A C57BL/6 egerek (n=25) a CKD indukálása során 6 héten át adenin+normál Pi tartalmú tápot, majd a 7. héttől adenin+1,8% Pi tartalmú tápot kaptak, majd a DPD kezelt csoport 5,10 és 15 mg/kg/nap dózisú DPD-t kapott orálisan. (B) Testsúly mérés eredménye. (C-E) Szérum foszfát, urea és kreatinin szint. (F-H) Teljes vér hemoglobin koncentrációja, vörösvértest száma és hematokrit értéke. Az eredményeket átlag ± SD értékben adtuk meg. *p<0,01, *** p<0,005, **** p<0,001

A diéta első hat hetes periódusa során 0,2% adenin és normál (0,7%) Pi tartalmú táppal, az azt követő 3 héten 0,2% adenin és emelt (1,8%) Pi tartalmú táppal idéztük elő a krónikus

vesebetegséget. DPD kezelés során irodalmi adatok alapján három különböző dózist választottunk ki (5, 10 és 15 mg/kg/nap) (16. *ábra*, A). A kezelés során hétről hétre nyomon követtük az egerek testsúlyának változását, hiszen krónikus vesebetegségben ismert a csonttömeg csökkenése. A testsúlymérés eredményei alapján kimutattuk, hogy a CKD egerek súlya nagymértékű csökkenést mutatott DPD jelenlétében is (16. *ábra*, B). Ezt követően a CKD klinikai paramétereinek változását határoztuk meg DPD jelenlétében, illetve hiányában. Megállapítottuk, hogy DPD kezeléstől függetlenül a szérum foszfát, urea és kreatinin szintje fokozódott (16. *ábra*, C-E). Továbbá megvizsgáltuk a DPD hatását a hematológiai paraméterek tekintetében CKD kezelés jelenlétében. Eredményeink alapján azt állapítottuk meg, hogy az alacsonyabb dózisban (5 és 10 mg/kg/nap) alkalmazott DPD nem, azonban a legmagasabb dózisú DPD sikeresen korrigálta a hemoglobin, a vörösvértest szám és a hematokrit CKD által indukált csökkenését (16. *ábra*, F-H).

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 az előző kísérletnél részletezett módon. A DPD-vel nem kezelt egerek azonos térfogatú 1% metil-cellulóz vivőanyagot kaptak. A kísérlet végén az izofluránnal 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 CKD egerek aortájában mért fluoreszcencia intenzitás lényegesen nagyobb volt a kontrollhoz viszonyítva ($6,414 \times 10^8 \pm 3,2153 \times 10^8$ vs. $1,378 \times 10^9 \pm 0,35801 \times 10^9$). Az osteosense festék felhalmozódása még jelentősebb volt a DPD kezelést kapó krónikus vesebetegség egerekből származó aortákban, mint a vivőanyagot kapó krónikus vesebeteg egerek aortájában ($2,818 \times 10^9 \pm 1,06114 \times 10^9$) (17. *ábra*, A). Az aortákat a fluoreszcencia intenzitás mérést követően dekalcináltuk, és meghatároztuk a sósavas felülúszók kalcium tartalmát. A CKD egerek aortájának kalcium tartalma jelentősen meghaladta a kontroll állatok aortájának kalcium tartalmát, s a DPD kezelés hatására a kalcium tartalom további fokozódását figyeltük meg (17. *ábra*, B). A kalcifikáció kimutatására az aorta metszeteken von Kossa festést végeztünk, mely csak a DPD-vel kezelt CKD egerekből származó aorta mintákon mutatott pozitivitást (17. *ábra*, C).

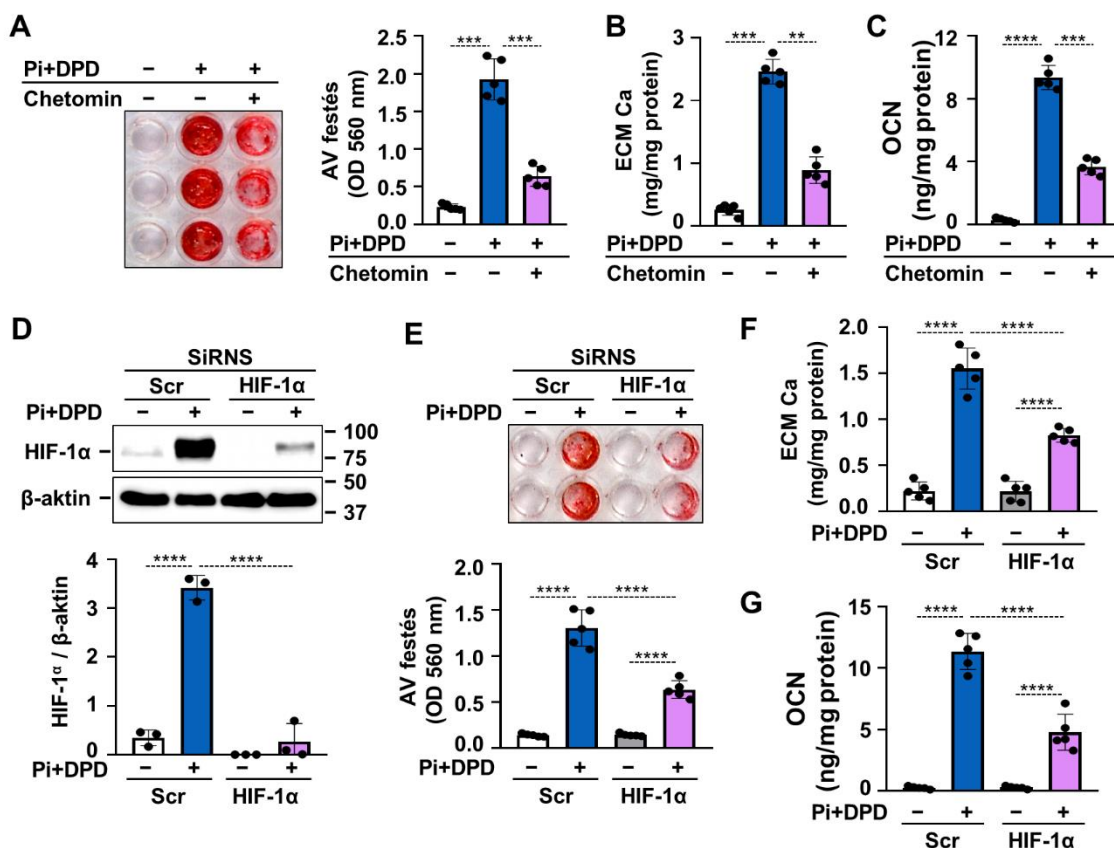


17. ábra A DPD fokozza a krónikus vesebetegség által indukált aorta kalcifikációt *in vivo*. (A) A 16-os ábra A részének leírása alapján a C57BL/6 egerekben (n=15) CKD-t indukáltunk, majd a DPD kezelt egerek (n=5) 15mg/kg/nap DPD-t, a vesebeteg csoport (n=5) pedig azonos térfogatú metilcellulózt kapott. Osteosense festés és kvantifikálása foton/másodpercben (p/s) kifejezve. (B) Az aorták kalcium tartalma. (C) Hematoxilin-eozin és von Kossa festés. Nagyítás: 100x, 800x. Az eredményeket átlag ±SD értékekben adtuk meg. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$

6.9 A Daprodustat pro-kalcifikációs hatásában a HIF-1 útvonal kritikus szerepet játszik

A DPD egy prolin hidroxiláz gátló hipoxia mimetikum, mely hatását a HIF-1 α stabilizálásán keresztül fejti ki. A további kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy a DPD kalcifikációt fokozó hatásába szerepet játszik-e a HIF-1 útvonal aktivációja és a HIF-1 α . Elsőként HIF-1 gátló chetomint alkalmaztunk, és megállapítottuk, hogy a chetomin csökkentette a vaszkuláris simaizomsejtek kalcifikációját, valamint az ECM kalcium és oszteokalcin tartalmát (18. ábra, A-C). Ezt követően a HIF-1 α szerepét vizsgáltuk. A HIF-1 α knock-down sejteket siRNS technikával hoztuk létre (18. ábra, D), majd vizsgáltuk a sejtek kalcifikációs képességét. Megállapítottuk, hogy a HIF-1 α gén csendesített sejtek kalcifikációs

képessége elmarad a kontroll sejtekhez képest, melyet Alizarin vörös festéssel, kalcium méréssel és oszteokalcin szint méréssel igazoltunk (18. ábra, E-G).



18. ábra A DPD HIF-1 függő módon fokozza a kalcifikációt. A vaszkuláris simaizomsejteket chetominnal (12,5 nmol/L) előkezeltük (12 óra), majd a kalcifikációt Pi (2 mmol/L) + DPD-vel (10 μmol/L) indukáltuk. (A) Reprezentatív alizarin vörös festés és kvantifikálása (4. nap). (B-C) ECM kalcium (4. nap) és oszteokalcin szintje (6. nap). (D) HIF-1α Western blot β-aktinra normalizálva 24 órás kezelés után teljes sejtlizátumból (n=3). (E) Reprezentatív alizarin vörös festés és kvantifikálása (4. nap). (F-G) ECM kalcium és oszteokalcin tartalma (6. nap). ** p<0,01, *** p<0,005, **** p<0,001

7. Diszkusszió

Az ektópiás kalcifikáció legismertebb és legjobban tanulmányozott formája a vaszkuláris kalcifikáció. A kalcifikáció elhelyezkedése szerint megkülönböztetünk intima és média kalcifikációt. 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.

Az intima kalcifikáció fokális, az érlemezsedéses plakkok környezetében alakul ki. Az intima kalcifikáció az aortában és a nagy elasztikus artériákban jelenik meg, jellegzetessége a koleszterin és lipidek felhalmozódása az endotél sejtréteg alatt, valamint a gyulladás és a makrofágok akkumulációja [113]. Ezzel szemben a média kalcifikáció az aorta és a muszkuláris típusú erek teljes keresztmetszetére kiterjed, hátterében a felborult kalcium, foszfát és D vitamin metabolizmus áll. A kalcifikáció során megfigyelhető a vaszkuláris simaizomsejtek oszteokondrogén irányú differenciálódása, mely hasonlóságot mutat a fiziológiás csontképződéssel [113]. A média kalcifikáció számos betegség patológiájában ismert, mint például krónikus vesebetegségben és 2-es típusú diabéteszben [114].

A számos különbség mellett 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 lipidrég vastagsága ezt meghaladja, a plakk alatt elhelyezkedő simaizomsejtek hipoxiássá válnak [73]. A hipoxia az érlemezsedéses plakk progresszióját sokféle módon befolyásolja, azonban a kalcifikációra gyakorolt hatását mi vizsgáltuk elsőként.

A hipoxia krónikus vesebetegségben szenvedő betegekben is jelen van, mely elsőként a vesét érinti, de Mokas és munkatársai a HIF-1 α expressziójának fokozódását írták le az aorta média rétegben CKD patkánymodellben [83,115].

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 [87,88].

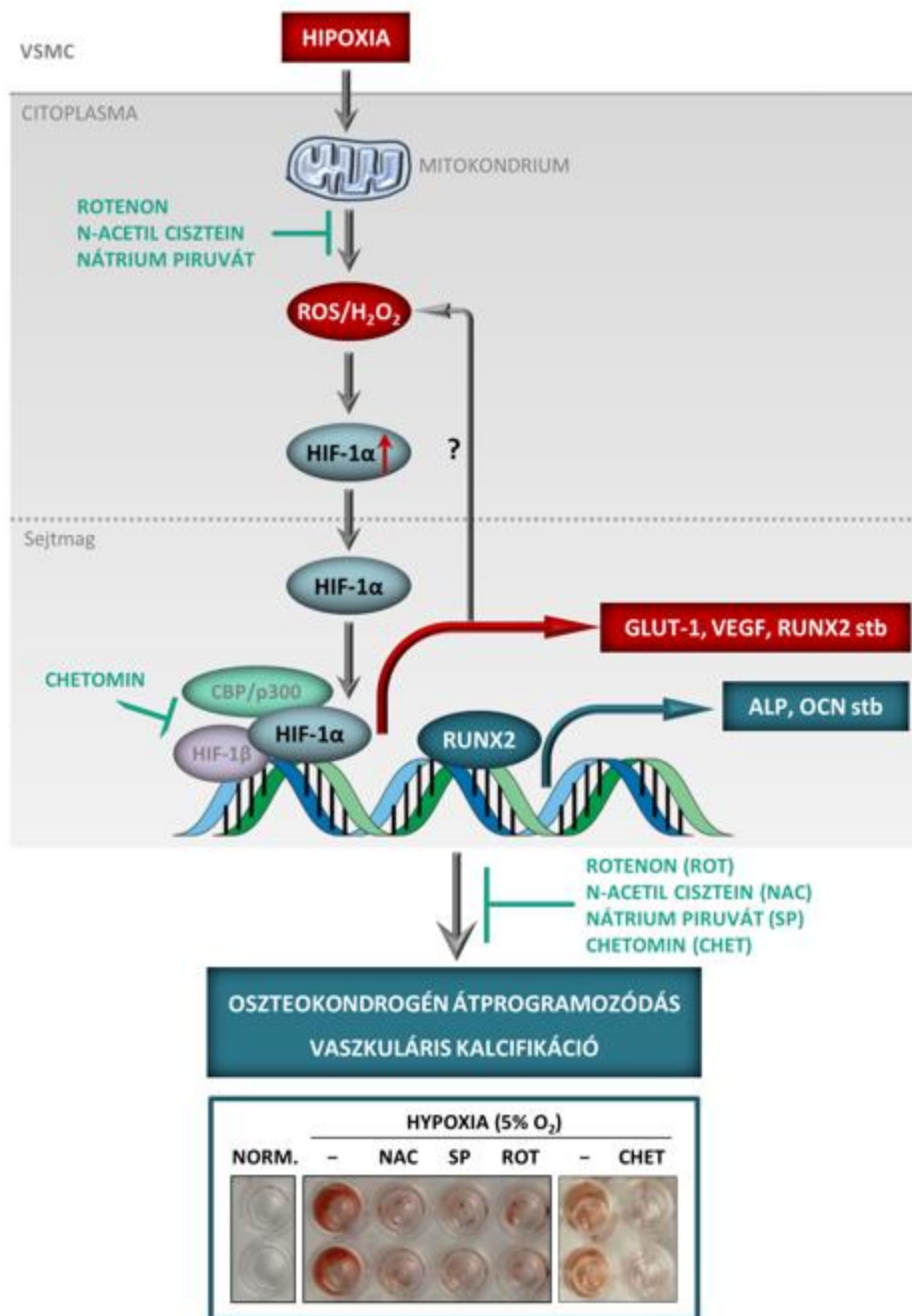
Ezekre a klinikai megfigyelésekre alapozva állítottuk fel hipotézisünket és munkánk során a hipoxia közvetlen hatását vizsgáltuk a vaszkuláris simaizomsejtek oszteokondrogén irányú differenciálódására és kalcifikációjára. Kimutattuk, hogy a hipoxia fokozza a vaszkuláris simaizomsejtek oszteokondrogén irányú differenciálódását és kalcifikációját (**6-7. ábra**) [116].

Kísérleteink során megállapítottuk, hogy a vaszkuláris simaizomsejtek hipoxia által indukált oszteokondrogén átprogramozódása HIF-1 függő (**8. ábra**). Ezzel összhangban Ruffenach és társai kimutatták, hogy HIF-1 α túltermelése esetén fokozódott, míg HIF-1 α hiányában csökkent a pulmonáris artéria simaizomsejtek kalcifikációja [117].

A hipoxia és ROS képződés közötti komplex kapcsolat megismerésével számos tanulmányban foglalkoztak, azonban egymásnak ellentmondó eredmények születtek. Egyes publikációkban a ROS képződés csökkenését, míg másokban annak fokozódását írták le hipoxiának kitett sejtekben [88,89]. Ismert, hogy a hipoxia érzékeléséhez és a hipoxiára adott válaszreakcióhoz elengedhetetlen a mitokondrium légzési láncának működése [118]. Hipoxiás körülmények között mitokondriális és NADPH-oxidáz eredetű ROS is termelődik. A fokozott ROS képződésnek kulcsszerepet tulajdonítanak vaszkuláris kalcifikációban és a vaszkuláris simaizomsejtek oszteogén irányú differenciálódásában [119,120].

Munkánk során megvizsgáltuk a ROS szerepét a vaszkuláris simaizomsejtek hipoxia által indukált oszteokondrogén irányú differenciálódásában és kalcifikációjában. A szakirodalmi ismeretek egy részével összhangban kimutattuk, hogy a hipoxia fokozza a ROS képződést simaizomsejtekben (**9-10. ábra**). Szelektív inhibitorok 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 α expresszióját (**11. ábra**). A ROS és HIF-1 rendszer közötti komplex interakciókat tovább tanulmányozva megállapítottuk, hogy a hidrogén peroxid stabilizálja a HIF-1 α -t simaizomsejtekben. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a hipoxia és a ROS képződés között egy pozitív visszacsatolás figyelhető meg, melyben a hipoxia fokozza a ROS képződést, az emelkedett ROS pedig aktiválja a HIF-1 útvonalat.

Az *in vitro* modell mellett megvizsgáltuk a hipoxia hatását *in vivo* egérmodellben is. Kimutattuk, hogy hipoxiás körülmények között emelkedett a Runx2 mRNS expressziója az egerek aortájában, mely arra utalhat, hogy a hipoxia fokozza az oszteogén irányú átprogramozódást egér aorta simaizomsejtekben (**12. ábra**). Továbbá, *ex vivo* aorta szövetkultúrában megvizsgáltuk 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 (**13. ábra**). Eredményeink azt sugallják, hogy a vaszkuláris simaizomsejtek hipoxia által indukált oszteogén irányú átprogramozódása és kalcifikációja ROS és HIF-1 függő, ezen megállapításainkat a **19. ábrán** foglaltuk össze.



19. ábra A vaszkuláris simaizomsejtek hipoxia által indukált oszteokondrogén átprogramozódásának és kalcifikációjának hátterében álló lehetséges mechanizmus [116]. A Vaszkuláris simaizomsejtek csökkent oxigén tenzió érzékelése után mitokondriális ROS-t termelnek, mely aktiválja a HIF-1 útvonalat. A HIF-1 útvonal aktivációja a HIF-1 szabályozása alatt álló gének és az oszteokondrogén irányú differenciáció marker génjeinek átíródásához vezet, melynek eredményeként a vaszkuláris simaizomsejtek oszteokondrogén átprogramozódáson mennek keresztül és kalcifikálnak, mely HIF-1 inhibitorral és antioxidánsokkal gátolható.

Az emelkedett foszfát szint a vaszkuláris kalcifikáció legismertebb induktora és kulcsszerepet játszik a CKD-asszociált vaszkuláris kalcifikáció kialakulásában [50]. 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 [101,121]. A CKD-asszociált 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 vesebetegségben szenvedő betegek esetében eleve megemelkedett [122].

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 [103]. A prolil-hidroxiláz inhibitorok a HIF-1 stabilizációjára gyakorolt hatásuk miatt hipoxia mimetikumoknak tekinthetők. Számos gyógyszerceég fejlesztett ki prolil-hidroxiláz inhibitorokat, azonban a klinikai vizsgálatok során a legígéretesebbnek a Daprodustat 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 a vaszkuláris simaizomsejtek magas foszfáttal indukált kalcifikációját (**14. ábra**). 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 [123]. 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 (**15. ábra**).

Ezt követően, a DPD hatását egy CKD egérmodellben *in vivo* körülmények között vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy a DPD 15 mg/kg/nap dózisban alkalmazva korrigálja a CKD-asszociált anémiát (**16. ábra**), de a krónikus vesebetegségre jellemző paramétereket (szérum kreatinin, urea) nem befolyásolja. Ugyanakkor vizsgálataink arra is fényt derítettek, hogy ebben a dózisban alkalmazva a DPD fokozza az aorta kalcifikációt (**17. ábra**).

A DPD, mint hipoxia mimetikum a HIF-1 útvonal aktiválásán keresztül fejti ki hatását, mely az EPO fokozott expresszióját idézi elő. A HIF-1 útvonal hipoxia általi aktivációja

fokozza a vaszkuláris 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 α géncsendesített sejtekben, mely feltételezésünk helyességét támasztja alá, és bizonyítja a HIF-1 útvonal szerepét a DPD pro-kalcifikációs hatásában **(18. ábra)**.

Mindezen eredményeket összegezve feltételezzük, hogy a DPD az anémia sikeres korrigálása mellett fokozhatja a CKD-asszociált vaszkuláris kalcifikációt és a kardiovaszkuláris események bekövetkezésének kockázatát krónikus vesebetegségben szenvedő betegekben. Egy tavaly megjelent, randomizált, fázis 3 vizsgálat eredményeit összefoglaló tanulmányban összehasonlították a CKD-asszociált anémia kezelésére korábban alkalmazott epoietin alfa és a DPD kardiovaszkuláris kimenetelre gyakorolt hatását olyan dializált CKD 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 szövődeményeket [112].

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

8. Konklúziók

Dolgozatom első részében a hipoxia által előidézett oszteokondrogén irányú differenciálódást vizsgáltuk humán aorta simaizomsejtekben *in vitro*, valamint *ex vivo* és *in vivo* körülmények között egerekben. Ehhez kapcsolódóan az alábbi megállapításokat fogalmaztuk meg:

- A hipoxia fokozza a vaszkuláris simaizomsejtek oszteokondrogén irányú differenciálódását és extracelluláris mátrix kalcifikációját.
- A hipoxia által előidézett oszteokondrogén irányú átprogramozódás HIF-1 függő.
- A hipoxia fokozza a mitokondriális eredetű ROS termelődését, mely ROS termelődés jelentős szerepet játszik a vaszkuláris simaizomsejtek hipoxia által indukált oszteokondrogén irányú differenciálódásában és kalcifikációjában.
- A hipoxia fokozza az aorta kalcifikációját egerekben *in vivo*.
- A hipoxia által előidézett kalcifikáció reaktív antioxidánsokkal és HIF-1 inhibitorral gátolható egér aortában *ex vivo* szövettenyészetben.

Dolgozatom második részében a krónikus vesebetegségben szenvedő betegek anémiájának korrigálására kifejlesztett hipoxia mimetikum, a Daprodustat hatását vizsgáltuk emelt inorganikus foszfát szint mellett humán aorta simaizomsejtekben *in vitro*, valamint *in vivo* egérkísérletekben. Ehhez kapcsolódóan az alábbi megállapításokat tettük:

- A DPD fokozza a vaszkuláris simaizomsejtek Pi által indukált kalcifikációját emelt Pi jelenlétében *in vitro* körülmények között, valamint időfüggő módon növeli az egér aorta kalcifikációját *ex vivo* szövettenyészetben.
- A DPD (15 mg/kg) korrigálja a CKD következtében kialakult anémiát *in vivo*, ezzel párhuzamosan fokozza a CKD által indukált aorta kalcifikációt *in vivo*.
- A DPD kalcifikációt fokozó hatásának hátterében a HIF-1 útvonal aktivációja áll.

9. Összefoglalás

A vaszkuláris kalcifikáció egy komplex, a vaszkuláris simaizomsejtek, valamint számos induktor és inhibitor közreműködésével zajló aktív folyamat, melynek során bekövetkezik a vaszkuláris simaizomsejtek oszteokondrogén irányú differenciálódása. A kalcifikációs mikrokörnyezet gyakran hipoxiássá válik, ezért munkánk során a hipoxia hatását vizsgáltuk vaszkuláris simaizomsejtek oszteokondrogén irányú differenciálódására. Kimutattuk, hogy a hipoxia fokozza a vaszkuláris simaizomsejtek hipoxia által indukált HIF-1 α és célfehérjéinek, valamint az oszteokondrogenikus markerek expresszióját és az extracelluláris mátrix kalcifikációját. Kimutattuk, hogy a hipoxia fokozza a vaszkuláris simaizomsejtek mitokondriális ROS termelődését. A HIF-1 útvonal chetominnal történő gátlása csökkenti a Vaszkuláris simaizomsejtek hipoxia által indukált oszteokondrogén irányú differenciálódását, az extracelluláris mátrix kalcifikációját és a ROS termelést. Megállapítottuk, hogy ROS szkevendzserek jelenlétében elmaradt a vaszkuláris simaizomsejtek hipoxia által indukált oszteokondrogén irányú átprogramozódása és extracelluláris mátrix kalcifikációja. *Ex vivo* szövettenyészetben tovább vizsgálódva kimutattuk, hogy a hipoxia fokozza az egér aorta kalcifikációját, mely ROS és HIF-1 inhibitorokkal gátolható. Eredményeink arra utalnak, hogy a hipoxia fokozza a vaszkuláris simaizomsejtek oszteokondrogén irányú differenciálódását, mely hatásban a HIF-1 útvonal aktivációja és a mitokondriális ROS termelődésének fokozódása játszik szerepet.

A krónikus vesebetegséghez gyakran társul anémia. A Daprodustat egy prolil-hidroxiláz enzim inhibitor, mely a krónikus vesebetegség-asszociált anémia kezelésére kifejlesztett újgenerációs szerek egyike. Korábbi tanulmányok kimutatták a HIF-1 aktiváció és a vaszkuláris kalcifikáció közötti kapcsolatot, ezért a DPD foszfáttal-indukált kalcifikációt fokozó hatását vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a DPD aktiválja a HIF-1 útvonalat és fokozza a Vaszkuláris simaizomsejtek magas foszfáttal indukált kalcifikációját. A HIF-1 útvonal farmakológiai vagy a HIF-1 α expressziójának csökkentése általi gátlása megakadályozza a DPD pro-kalcifikációs hatását. A DPD kalcifikációt fokozó hatását *ex vivo* egér aorta szövettenyészetben is kimutattuk. A DPD kalcifikációra gyakorolt hatását *in vivo* körülmények között is vizsgáltuk adeninnel indukált krónikus vesebetegség egérmodellben. Kimutattuk, hogy a DPD kezelés megelőzi az anémia kialakulását CKD egerekben, ugyanakkor fokozza az aorta kalcifikációt.

A HIF-1 útvonal aktiváció pro-kalcifikációs hatásának ismerete olyan klinikai tanulmányokat sürget, melyekben az új generációs hipoxia mimetikumok kardiovaszkuláris rizikóra gyakorolt hatása felmérhető.

10. Summary

Vascular calcification is a complex process mediated by the imbalance between calcification inducers and inhibitors leading to osteochondrogenic differentiation of vascular smooth muscle cells (VSMCs). The microenvironment of the calcified area is hypoxic, therefore we examined the effect of hypoxia on the osteochondrogenic differentiation of VSMCs. We determined that hypoxia increases the expression of HIF-1 α and its target proteins and the expression of osteochondrogenic markers in VSMCs. Then we showed that hypoxia elevated the mitochondrial ROS production in VSMCs. The inhibition of HIF-1 pathway by chetomin attenuated the hypoxia mediated osteochondrogenic differentiation, extracellular matrix calcification and ROS production of VSMCs. We showed that in the presence of ROS scavengers the hypoxia induced osteochondrogenic reprogramming and extracellular matrix calcification of VSMCs is diminished. Furthermore, *ex vivo* aorta organ culture experiments revealed that hypoxia accelerates the calcification of the mice aorta, which can be attenuated by ROS and HIF-1 inhibitors. Our results reveal that hypoxia increases osteochondrogenic differentiation of VSMCs, in which the activation of HIF-1 pathway and mitochondrial ROS production play critical roles.

Chronic kidney disease (CKD) is frequently associated by anemia. Daprodustat is a prolyl-hydroxylase enzyme inhibitor, which is one of the new generation drugs to treat CKD-associated anemia. Previous studies demonstrated a link between HIF-1 activation and vascular calcification, therefore we examined the pro-calcifying effect of DPD. We determined that DPD leads to the activation of HIF-1 pathway and increases phosphate-mediated calcification of VSMCs. Pharmacological inhibition of the HIF-1 pathway or decreased expression of HIF-1 α abolished the pro-calcifying effect of DPD. We also showed the pro-calcifying effect of DPD in *ex vivo* aorta organ culture model. We investigated the pro-calcifying effect of DPD *in vivo*, in an adenine-induced CKD mice model. We showed that the administration of DPD prevents CKD-associated anemia, but increases aortic calcification.

These results suggest the urge of clinical trials in which the cardiovascular risk of hypoxia mimetics could be evaluated.

11. 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 a jövőben kamatoztatni.

Köszönet *Dr. Paragh György* és *Dr. Papp Zoltán* professzor uraknak, hogy az általuk irányított intézményekben végezhettem munkámat.

Köszönöm a Vaszkuláris Pathofiziológiai Kutatócsoport 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.

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.

12. Irodalomjegyzék

1. Rogers, M.; Goettsch, C.; Aikawa, E. Medial and Intimal Calcification in Chronic Kidney Disease: Stressing the Contributions. *J. Am. Heart Assoc.* **2013**, *2*, doi:10.1161/JAHA.113.000481.
2. Jinnouchi, H.; Sato, Y.; Sakamoto, A.; Cornelissen, A.; Mori, M.; Kawakami, R.; Gadhoke, N. V.; Kolodgie, F.D.; Virmani, R.; Finn, A. V. Calcium Deposition within Coronary Atherosclerotic Lesion: Implications for Plaque Stability. *Atherosclerosis* **2020**, *306*, 85–95, doi:10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2020.05.017.
3. Wang, Y.; Osborne, M.T.; Tung, B.; Li, M.; Li, Y. Imaging Cardiovascular Calcification. *J. Am. Heart Assoc.* **2018**, *7*, doi:10.1161/JAHA.118.008564.
4. Lanzer, P.; Hannan, F.M.; Lanzer, J.D.; Janzen, J.; Raggi, P.; Furniss, D.; Schuchardt, M.; Thakker, R.; Fok, P.W.; Saez-Rodriguez, J.; et al. Medial Arterial Calcification: JACC State-of-the-Art Review. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2021**, *78*, 1145–1165, doi:10.1016/J.JACC.2021.06.049.
5. Lau, W.L.; Ix, J.H. Clinical Detection, Risk Factors, and Cardiovascular Consequences of Medial Arterial Calcification: A Pattern of Vascular Injury Associated with Aberrant Mineral Metabolism. *Semin. Nephrol.* **2013**, *33*, 93–105, doi:10.1016/J.SEMNEPHROL.2012.12.011.
6. Wu, M.; Rementer, C.; Giachelli, C.M. Vascular Calcification: An Update on Mechanisms and Challenges in Treatment. *Calcif. Tissue Int.* **2013**, *93*, 365, doi:10.1007/S00223-013-9712-Z.
7. Jankowski, J.; Floege, J.; Fliser, D.; Böhm, M.; Marx, N. Cardiovascular Disease in Chronic Kidney Disease: Pathophysiological Insights and Therapeutic Options. *Circulation* **2021**, *143*, 1157–1172, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.120.050686.
8. Durham, A.L.; Speer, M.Y.; Scatena, M.; Giachelli, C.M.; Shanahan, C.M.; et al. Role of Smooth Muscle Cells in Vascular Calcification: Implications in Atherosclerosis and Arterial Stiffness. *Cardiovasc. Res.* **2018**, *114*, 590–600, doi:10.1093/CVR/CMY010.
9. Basatemur, G.L.; Jørgensen, H.F.; Clarke, M.C.H.; Bennett, M.R.; Mallat, Z. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Nat. Rev. Cardiol.* **2019**, *16*, 727–744, doi:10.1038/s41569-019-0227-9.
10. Franco, C.; Ahmad, P.J.; Hou, G.; Wong, E.; Bendeck, M.P. Increased Cell and Matrix Accumulation during Atherogenesis in Mice with Vessel Wall-Specific Deletion of Discoidin Domain Receptor 1. *Circ. Res.* **2010**, *106*, 1775–1783, doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.213637.
11. Swirski, F.K.; Nahrendorf, M. Do Vascular Smooth Muscle Cells Differentiate to Macrophages in Atherosclerotic Lesions? *Circ. Res.* **2014**, *115*, 605–606.
12. Davies, J.D.; Carpenter, K.L.H.; Challis, I.R.; Figg, N.L.; McNair, R.; Proudfoot, D.; Weissberg, P.L.; Shanahan, C.M. Adipocytic Differentiation and Liver x Receptor Pathways Regulate the Accumulation of Triacylglycerols in Human Vascular Smooth Muscle Cells. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 3911–3919, doi:10.1074/jbc.M410075200.

13. Nakano-Kurimoto, R.; Ikeda, K.; Uraoka, M.; Nakagawa, Y.; Yutaka, K.; Koide, M.; Takahashi, T.; Matoba, S.; Yamada, H.; Okigaki, M.; et al. Replicative Senescence of Vascular Smooth Muscle Cells Enhances the Calcification through Initiating the Osteoblastic Transition. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2009**, *297*, doi:10.1152/AJPHEART.00455.2009.
14. Sun, Y.; Byon, C.H.; Yuan, K.; Chen, J.; Mao, X.; Heath, J.M.; Javed, A.; Zhang, K.; Anderson, P.G.; Chen, Y. Smooth Muscle Cell-Specific Runx2 Deficiency Inhibits Vascular Calcification. *Circ. Res.* **2012**, *111*, 543–552, doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.267237.
15. Lin, M.E.; Chen, T.; Leaf, E.M.; Speer, M.Y.; Giachelli, C.M. Runx2 Expression in Smooth Muscle Cells Is Required for Arterial Medial Calcification in Mice. *Am. J. Pathol.* **2015**, *185*, 1958–1969, doi:10.1016/J.AJPATH.2015.03.020.
16. Voelkl, J.; Lang, F.; Eckardt, K.-U.U.; Amann, K.; Kuro-o, M.; Pasch, A.; Pieske, B.; Alesutan, I. *Signaling Pathways Involved in Vascular Smooth Muscle Cell Calcification during Hyperphosphatemia*; 2019; Vol. 76, pp. 2077–2091;.
17. Grootaert, M.O.J.; Bennett, M.R. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis: Time for a Re-Assessment. *Cardiovasc. Res.* **2021**, *117*, 2326–2339, doi:10.1093/cvr/cvab046.
18. Pan, H.; Xue, C.; Auerbach, B.J.; Fan, J.; Bashore, A.C.; Cui, J.; Yang, D.Y.; Trignano, S.B.; Liu, W.; Shi, J.; et al. Single-Cell Genomics Reveals a Novel Cell State During Smooth Muscle Cell Phenotypic Switching and Potential Therapeutic Targets for Atherosclerosis in Mouse and Human. *Circulation* **2020**, *142*, 2060–2075, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.120.048378.
19. Turner, M.E.; Rowsell, T.S.; Lansing, A.P.; Jeronimo, P.S.; Lee, L.H.; Svajger, B.A.; Zelt, J.G.E.; Forster, C.M.; Petkovich, M.P.; Holden, R.M.; et al. Vascular Calcification Maladaptively Participates in Acute Phosphate Homeostasis. *Cardiovasc. Res.* **2022**, doi:10.1093/cvr/cvac162.
20. Tóth, A.; Balogh, E.; Jeney, V. Regulation of Vascular Calcification by Reactive Oxygen Species. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* **2020**, *9*, 1–24, doi:10.3390/ANTIOX9100963.
21. G, L.; P, D.; MD, M.; GJ, P.; E, L.; RR, B.; G, K. Spontaneous Calcification of Arteries and Cartilage in Mice Lacking Matrix GLA Protein. *Nature* **1997**, *386*, 78–81, doi:10.1038/386078A0.
22. Babler, A.; Schmitz, C.; Buescher, A.; Herrmann, M.; Gremse, F.; Gorgels, T.; Floege, J.; Jahnen-Dechent, W. Microvasculopathy and Soft Tissue Calcification in Mice Are Governed by Fetuin-A, Magnesium and Pyrophosphate. *PLoS One* **2020**, *15*, e0228938, doi:10.1371/journal.pone.0228938.
23. Lee, S.J.; Lee, I.-K.; Jeon, J.-H. Vascular Calcification-New Insights Into Its Mechanism. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21082685.
24. O'Neill, W.C.; Sigrist, M.K.; McIntyre, C.W. Plasma Pyrophosphate and Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease. *Nephrol. Dial. Transplant* **2010**, *25*, 187–191, doi:10.1093/NDT/GFP362.

25. Scatena, M.; Liaw, L.; Giachelli, C.M. Osteopontin: A Multifunctional Molecule Regulating Chronic Inflammation and Vascular Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2007**, *27*, 2302–2309, doi:10.1161/ATVBAHA.107.144824.
26. Luo, G.; Ducky, P.; McKee, M.D.; Pinero, G.J.; Loyer, E.; Behringer, R.R.; Karsenty, G. Spontaneous Calcification of Arteries and Cartilage in Mice Lacking Matrix GLA Protein. *Nature* **1997**, *386*, 78–81, doi:10.1038/386078a0.
27. Villa-Bellosta, R. Vascular Calcification: Key Roles of Phosphate and Pyrophosphate. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, doi:10.3390/IJMS222413536.
28. Li, Q.; Arányi, T.; Váradi, A.; Terry, S.F.; Uitto, J. Research Progress in Pseudoxanthoma Elasticum and Related Ectopic Mineralization Disorders. *J. Invest. Dermatol.* **2016**, *136*, 550–556, doi:10.1016/j.jid.2015.10.065.
29. Pomozi, V.; Julian, C.B.; Zoll, J.; Pham, K.; Kuo, S.; Tókési, N.; Martin, L.; Váradi, A.; Le Saux, O. Dietary Pyrophosphate Modulates Calcification in a Mouse Model of Pseudoxanthoma Elasticum: Implication for Treatment of Patients. *J. Invest. Dermatol.* **2019**, *139*, 1082–1088, doi:10.1016/j.jid.2018.10.040.
30. D, A.; S, G.; E, G.-P.; J, E.; R, V.-B. Role of Pyrophosphate in Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease. *Nefrologia* **2018**, *38*, 250–257, doi:10.1016/J.NEFRO.2017.07.005.
31. Block, G.A.; Klassen, P.S.; Lazarus, J.M.; Ofsthun, N.; Lowrie, E.G.; Chertow, G.M. Mineral Metabolism, Mortality, and Morbidity in Maintenance Hemodialysis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2004**, *15*, 2208–2218, doi:10.1097/01.ASN.0000133041.27682.A2.
32. Shanahan, C.M.; Crouthamel, M.H.; Kapustin, A.; Giachelli, C.M. Arterial Calcification in Chronic Kidney Disease: Key Roles for Calcium and Phosphate. *Circ. Res.* **2011**, *109*, 697–711, doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.234914.
33. Moradi, H.; Sica, D.A.; Kalantar-Zadeh, K. Cardiovascular Burden Associated with Uremic Toxins in Patients with Chronic Kidney Disease. *Am. J. Nephrol.* **2013**, *38*, 136–148, doi:10.1159/000351758.
34. S, Z.V.; S, M.; SM, H.K.; MM, S.; M, A. Vascular Calcification: An Important Understanding in Nephrology. *Vasc. Health Risk Manag.* **2020**, *16*, 167–180, doi:10.2147/VHRM.S242685.
35. Yahagi, K.; Kolodgie, F.D.; Lutter, C.; Mori, H.; Romero, M.E.; Finn, A. V.; Virmani, R. Pathology of Human Coronary and Carotid Artery Atherosclerosis and Vascular Calcification in Diabetes Mellitus. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2017**, *37*, 191–204, doi:10.1161/ATVBAHA.116.306256.
36. Tanikawa, T.; Okada, Y.; Tanikawa, R.; Tanaka, Y. Advanced Glycation End Products Induce Calcification of Vascular Smooth Muscle Cells through RAGE/P38 MAPK. *J. Vasc. Res.* **2009**, *46*, 572–580, doi:10.1159/000226225.
37. Zhu, Y.; Ma, W.Q.; Han, X.Q.; Wang, Y.; Wang, X.; Liu, N.F. Advanced Glycation End Products Accelerate Calcification in VSMCs through HIF-1 α /PDK4 Activation and Suppress Glucose Metabolism. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, doi:10.1038/S41598-018-31877-6.
38. Shioi, A.; Katagi, M.; Okuno, Y.; Mori, K.; Jono, S.; Koyama, H.; Nishizawa, Y. Induction of Bone-Type Alkaline Phosphatase in Human Vascular Smooth Muscle

- Cells: Roles of Tumor Necrosis Factor-Alpha and Oncostatin M Derived from Macrophages. *Circ. Res.* **2002**, 91, 9–16, doi:10.1161/01.RES.0000026421.61398.F2.
39. Shobeiri, N.; Bendeck, M.P. Interleukin-1 β Is a Key Biomarker and Mediator of Inflammatory Vascular Calcification. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2017**, 37, 179–180, doi:10.1161/ATVBAHA.116.308724.
 40. Ceneri, N.; Zhao, L.; Young, B.D.; Healy, A.; Coskun, S.; Vasavada, H.; Yarovsky, T.O.; Ike, K.; Pardi, R.; Qin, L.; et al. Rac2 Modulates Atherosclerotic Calcification by Regulating Macrophage Interleukin-1 β Production. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2017**, 37, 328–340, doi:10.1161/ATVBAHA.116.308507.
 41. Awan, Z.; Denis, M.; Roubtsova, A.; Essalmani, R.; Marcinkiewicz, J.; Awan, A.; Gram, H.; Seidah, N.G.; Genest, J. Reducing Vascular Calcification by Anti-IL-1 β Monoclonal Antibody in a Mouse Model of Familial Hypercholesterolemia. *Angiology* **2016**, 67, 157–167, doi:10.1177/0003319715583205.
 42. Grootaert, M.O.J.; Moulis, M.; Roth, L.; Martinet, W.; Vindis, C.; Bennett, M.R.; De Meyer, G.R.Y. Vascular Smooth Muscle Cell Death, Autophagy and Senescence in Atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* **2018**, 114, 622–634, doi:10.1093/CVR/CVY007.
 43. Sun, H.; Unoki, H.; Wang, X.; Liang, J.; Ichikawa, T.; Arai, Y.; Shiomi, M.; Marcovina, S.M.; Watanabe, T.; Fan, J. Lipoprotein(a) Enhances Advanced Atherosclerosis and Vascular Calcification in WHHL Transgenic Rabbits Expressing Human Apolipoprotein(A). *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 47486–47492, doi:10.1074/JBC.M205814200.
 44. Zheng, K.H.; Tsimikas, S.; Pawade, T.; Kroon, J.; Jenkins, W.S.A.; Doris, M.K.; White, A.C.; Timmers, N.K.L.M.; Hjortnaes, J.; Rogers, M.A.; et al. Lipoprotein(a) and Oxidized Phospholipids Promote Valve Calcification in Patients With Aortic Stenosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2019**, 73, 2150–2162, doi:10.1016/J.JACC.2019.01.070.
 45. Hruska, K.A.; Mathew, S.; Saab, G. Bone Morphogenetic Proteins in Vascular Calcification. *Circ. Res.* **2005**, 97, 105–114, doi:10.1161/01.RES.00000175571.53833.6C.
 46. Li, X.; Yang, H.-Y.; Giachelli, C.M. BMP-2 Promotes Phosphate Uptake, Phenotypic Modulation, and Calcification of Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Atherosclerosis* **2008**, 199, 271–277, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2007.11.031.
 47. Cai, J.; Pardali, E.; Sánchez-Duffhues, G.; ten Dijke, P. BMP Signaling in Vascular Diseases. *FEBS Lett.* **2012**, 586, 1993–2002, doi:10.1016/j.febslet.2012.04.030.
 48. Dhore, C.R.; Cleutjens, J.P.M.; Lutgens, E.; Cleutjens, K.B.J.M.; Geusens, P.P.M.; Kitslaar, P.J.E.H.M.; Tordoir, J.H.M.; Spronk, H.M.H.; Vermeer, C.; Daemen, M.J.A.P. Differential Expression of Bone Matrix Regulatory Proteins in Human Atherosclerotic Plaques. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2001**, 21, 1998–2003, doi:10.1161/HQ1201.100229.
 49. Masuda, M.; Miyazaki-Anzai, S.; Keenan, A.L.; Shiozaki, Y.; Okamura, K.; Chick, W.S.; Williams, K.; Zhao, X.; Rahman, S.M.; Tintut, Y.; et al. Activating Transcription Factor-4 Promotes Mineralization in Vascular Smooth Muscle Cells. *JCI insight* **2016**, 1, doi:10.1172/JCI.INSIGHT.88646.

50. Cozzolino, M.; Ciceri, P.; Galassi, A.; Mangano, M.; Carugo, S.; Capelli, I.; Cianciolo, G. The Key Role of Phosphate on Vascular Calcification. *Toxins (Basel)*. **2019**, *11*, doi:10.3390/TOXINS11040213.
51. Shanahan, C.M.; Crouthamel, M.H.; Kapustin, A.; Giachelli, C.M. Arterial Calcification in Chronic Kidney Disease: Key Roles for Calcium and Phosphate. *Circ. Res.* **2011**, *109*, 697–711, doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.234914.
52. Villa-Bellosta, R.; Bogaert, Y.E.; Levi, M.; Sorribas, V. Characterization of Phosphate Transport in Rat Vascular Smooth Muscle Cells: Implications for Vascular Calcification. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2007**, *27*, 1030–1036, doi:10.1161/ATVBAHA.106.132266.
53. Chavkin, N.W.; Chia, J.J.; Crouthamel, M.H.; Giachelli, C.M. Phosphate Uptake-Independent Signaling Functions of the Type III Sodium-Dependent Phosphate Transporter, PiT-1, in Vascular Smooth Muscle Cells. *Exp. Cell Res.* **2015**, *333*, 39–48, doi:10.1016/J.YEXCR.2015.02.002.
54. Crouthamel, M.H.; Lau, W.L.; Leaf, E.M.; Chavkin, N.W.; Wallingford, M.C.; Peterson, D.F.; Li, X.; Liu, Y.; Chin, M.T.; Levi, M.; et al. Sodium-Dependent Phosphate Cotransporters and Phosphate-Induced Calcification of Vascular Smooth Muscle Cells: Redundant Roles for PiT-1 and PiT-2. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2013**, *33*, 2625–2632, doi:10.1161/ATVBAHA.113.302249.
55. Yamada, S.; Leaf, E.M.; Chia, J.J.; Cox, T.C.; Speer, M.Y.; Giachelli, C.M. PiT-2, a Type III Sodium-Dependent Phosphate Transporter, Protects against Vascular Calcification in Mice with Chronic Kidney Disease Fed a High Phosphate Diet. *Kidney Int.* **2018**, *94*, 716, doi:10.1016/J.KINT.2018.05.015.
56. Li, T.; Yu, H.; Zhang, D.; Feng, T.; Miao, M.; Li, J.; Liu, X. Matrix Vesicles as a Therapeutic Target for Vascular Calcification. *Front. cell Dev. Biol.* **2022**, *10*, doi:10.3389/FCELL.2022.825622.
57. Bakhshian Nik, A.; Hutcheson, J.D.; Aikawa, E. Extracellular Vesicles As Mediators of Cardiovascular Calcification. *Front. Cardiovasc. Med.* **2017**, *4*, doi:10.3389/FCVM.2017.00078.
58. Boulanger, C.M.; Loyer, X.; Rautou, P.E.; Amabile, N. Extracellular Vesicles in Coronary Artery Disease. *Nat. Rev. Cardiol.* **2017**, *14*, 259–272, doi:10.1038/NRCARDIO.2017.7.
59. Nakahara, T.; Dweck, M.R.; Narula, N.; Pisapia, D.; Narula, J.; Strauss, H.W. Coronary Artery Calcification: From Mechanism to Molecular Imaging. *JACC. Cardiovasc. Imaging* **2017**, *10*, 582–593, doi:10.1016/J.JCMG.2017.03.005.
60. Villa-Bellosta, R.; Millan, A.; Sorribas, V. Role of Calcium-Phosphate Deposition in Vascular Smooth Muscle Cell Calcification. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2011**, *300*, doi:10.1152/AJPCELL.00229.2010.
61. Semenza, G.L. Oxygen Sensing, Homeostasis, and Disease. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *365*, 537–547, doi:10.1056/NEJMRA1011165.
62. Semenza, G.L. Regulation of Mammalian O₂ Homeostasis by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1999**, *15*, 551–578, doi:10.1146/annurev.cellbio.15.1.551.

63. Semenza, G.L. HIF-1 and Mechanisms of Hypoxia Sensing. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2001**, *13*, 167–171, doi:10.1016/S0955-0674(00)00194-0.
64. Semenza, G.L. Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) Pathway. *Sci. STKE* **2007**, *2007*, doi:10.1126/STKE.4072007CM8.
65. Wang, G.L.; Jiang, B.H.; Rue, E.A.; Semenza, G.L. Hypoxia-Inducible Factor 1 Is a Basic-Helix-Loop-Helix-PAS Heterodimer Regulated by Cellular O₂ Tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 5510–5514, doi:10.1073/PNAS.92.12.5510.
66. Gonzalez, F.J.; Xie, C.; Jiang, C. The Role of Hypoxia-Inducible Factors in Metabolic Diseases. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2018**, *15*, 21–32, doi:10.1038/S41574-018-0096-Z.
67. Abe, H.; Semba, H.; Takeda, N. The Roles of Hypoxia Signaling in the Pathogenesis of Cardiovascular Diseases. *J. Atheroscler. Thromb.* **2017**, *24*, 884–894, doi:10.5551/JAT.RV17009.
68. Packer, M. Mechanisms Leading to Differential Hypoxia-Inducible Factor Signaling in the Diabetic Kidney: Modulation by SGLT2 Inhibitors and Hypoxia Mimetics. *Am. J. Kidney Dis.* **2021**, *77*, 280–286, doi:10.1053/J.AJKD.2020.04.016.
69. Hu, C.-J.; Wang, L.-Y.; Chodosh, L.A.; Keith, B.; Simon, M.C. Differential Roles of Hypoxia-Inducible Factor 1 α (HIF-1 α) and HIF-2 α in Hypoxic Gene Regulation. *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23*, 9361–9374, doi:10.1128/MCB.23.24.9361-9374.2003.
70. Björnheden, T.; Levin, M.; Evaldsson, M.; Wiklund, O. Evidence of Hypoxic Areas within the Arterial Wall in Vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **1999**, *19*, 870–876, doi:10.1161/01.ATV.19.4.870.
71. Parathath, S.; Yang, Y.; Mick, S.; Fisher, E.A. Hypoxia in Murine Atherosclerotic Plaques and Its Adverse Effects on Macrophages. *Trends Cardiovasc. Med.* **2013**, *23*, 80–84, doi:10.1016/J.TCM.2012.09.004.
72. Ferns, G.A.A.; Heikal, L. Hypoxia in Atherogenesis. *Angiology* **2017**, *68*, 472–493, doi:10.1177/0003319716662423.
73. Libby, P.; Folco, E. Tension in the Plaque: Hypoxia Modulates Metabolism in Atheroma. *Circ. Res.* **2011**, *109*, 1100–1102, doi:10.1161/RES.0B013E31823BDB84.
74. Folco, E.J.; Sheikine, Y.; Rocha, V.Z.; Christen, T.; Shvartz, E.; Sukhova, G.K.; Di Carli, M.F.; Libby, P. Hypoxia But Not Inflammation Augments Glucose Uptake in Human Macrophages: Implications for Imaging Atherosclerosis With 18Fluorine-Labeled 2-Deoxy-D-Glucose Positron Emission Tomography. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2011**, *58*, 603–614, doi:10.1016/J.JACC.2011.03.044.
75. Parathath, S.; Mick, S.L.; Feig, J.E.; Joaquin, V.; Grauer, L.; Habiels, D.M.; Gassmann, M.; Gardner, L.B.; Fisher, E.A. Hypoxia Is Present in Murine Atherosclerotic Plaques and Has Multiple Adverse Effects on Macrophage Lipid Metabolism. *Circ. Res.* **2011**, *109*, 1141–1152, doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.246363.
76. Marsch, E.; Sluimer, J.C.; Daemen, M.J.A.P. Hypoxia in Atherosclerosis and Inflammation. *Curr. Opin. Lipidol.* **2013**, *24*, 393–400, doi:10.1097/MOL.0B013E32836484A4.

77. Nakano, D.; Hayashi, T.; Tazawa, N.; Yamashita, C.; Inamoto, S.; Okuda, N.; Mori, T.; Sohmiya, K.; Kitaura, Y.; Okada, Y.; et al. Chronic Hypoxia Accelerates the Progression of Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Knockout Mice. *Hypertens. Res.* **2005**, *28*, 837–845, doi:10.1291/HYPRES.28.837.
78. Michel, J.B.; Virmani, R.; Arbustini, E.; Pasterkamp, G. Intraplaque Haemorrhages as the Trigger of Plaque Vulnerability. *Eur. Heart J.* **2011**, *32*, doi:10.1093/EURHEARTJ/EHR054.
79. Michel, J.B.; Martin-Ventura, J.L.; Nicoletti, A.; Ho-Tin-Noé, B. Pathology of Human Plaque Vulnerability: Mechanisms and Consequences of Intraplaque Haemorrhages. *Atherosclerosis* **2014**, *234*, 311–319, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.03.020.
80. Moreno, P.; Purushothaman, K.; Zias, E.; Sanz, J.; Fuster, V. Neovascularization in Human Atherosclerosis. *Curr. Mol. Med.* **2006**, *6*, 457–477, doi:10.2174/156652406778018635.
81. Hirakawa, Y.; Tanaka, T.; Nangaku, M. Renal Hypoxia in CKD; Pathophysiology and Detecting Methods. *Front. Physiol.* **2017**, *8*, doi:10.3389/FPHYS.2017.00099.
82. Wang, B.; Li, Z.-L.; Zhang, Y.-L.; Wen, Y.; Gao, Y.-M.; Liu, B.-C. Hypoxia and Chronic Kidney Disease. *EBioMedicine* **2022**, *77*, 103942, doi:10.1016/J.EBIOM.2022.103942.
83. Mokas, S.; Larivière, R.; Lamalice, L.; Gobeil, S.; Cornfield, D.N.; Agharazii, M.; Richard, D.E. Hypoxia-Inducible Factor-1 Plays a Role in Phosphate-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Calcification. *Kidney Int.* **2016**, *90*, 598–609, doi:10.1016/j.kint.2016.05.020.
84. Zhou, H.; Yang, M.; Jiang, Z.; Ding, J.; Di, J.; Cui, L. Renal Hypoxia: An Important Prognostic Marker in Patients with Chronic Kidney Disease. *Am. J. Nephrol.* **2018**, *48*, 46–55, doi:10.1159/000491551.
85. Hirakawa, Y.; Tanaka, T.; Nangaku, M. Renal Hypoxia in CKD; Pathophysiology and Detecting Methods. *Front. Physiol.* **2017**, *8*, 99, doi:10.3389/FPHYS.2017.00099/BIBTEX.
86. Gunaratnam, L.; Bonventre, J. V. HIF in Kidney Disease and Development. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2009**, *20*, 1877–1887.
87. Tachikawa, R.; Koyasu, S.; Matsumoto, T.; Hamada, S.; Azuma, M.; Murase, K.; Tanizawa, K.; Inouchi, M.; Oga, T.; Mishima, M.; et al. Obstructive Sleep Apnea and Abdominal Aortic Calcification: Is There an Association Independent of Comorbid Risk Factors? *Atherosclerosis* **2015**, *241*, 6–11, doi:10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2015.04.801.
88. Inoue, S.; Shibata, Y.; Kishi, H.; Hasegawa, H.; Nitobe, J.; Iwayama, T.; Yashiro, Y.; Nemoto, T.; Sato, K.; Nakano, H.; et al. Low Arterial Blood Oxygenation Is Associated with Calcification of the Coronary Arteries in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Respir. Investig.* **2015**, *53*, 111–116, doi:10.1016/J.RESINV.2015.01.002.
89. Kim, Y.W.; Byzova, T. V. Oxidative Stress in Angiogenesis and Vascular Disease. *Blood* **2014**, *123*, 625–631, doi:10.1182/BLOOD-2013-09-512749.
90. Dong, D.; Hao, Q.; Zhang, P.; Wang, T.; Han, F.; Liang, X.; Fei, Z. Endoplasmic

Reticulum Ca²⁺ Release Causes Rieske Iron–Sulfur Protein-Mediated Mitochondrial ROS Generation in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells. *Biosci. Rep.* **2019**, *39*, doi:10.1042/BSR20192414.

91. Chi, A.Y.; Waypa, G.B.; Mungai, P.T.; Schumacker, P.T. Prolonged Hypoxia Increases ROS Signaling and RhoA Activation in Pulmonary Artery Smooth Muscle and Endothelial Cells. *Antioxid. Redox Signal.* **2010**, *12*, 603–610, doi:10.1089/ARS.2009.2861.
92. Mehta, J.P.; Campian, J.L.; Guardiola, J.; Cabrera, J.A.; Weir, E.K.; Eaton, J.W. Generation of Oxidants by Hypoxic Human Pulmonary and Coronary Smooth-Muscle Cells. *Chest* **2008**, *133*, 1410–1414, doi:10.1378/CHEST.07-2984.
93. Waypa, G.B.; Marks, J.D.; Guzy, R.; Mungai, P.T.; Schriewer, J.; Dokic, D.; Schumacker, P.T. Hypoxia Triggers Subcellular Compartmental Redox Signaling in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circ. Res.* **2010**, *106*, 526–535, doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.206334.
94. Semenza, G.L. Hypoxia-Inducible Factor 1 and Cardiovascular Disease. *Annu. Rev. Physiol.* **2014**, *76*, 39, doi:10.1146/ANNUREV-PHYSIOL-021113-170322.
95. Chandel, N.S.; Maltepe, E.; Goldwasser, E.; Mathieu, C.E.; Simon, M.C.; Schumacker, P.T. Mitochondrial Reactive Oxygen Species Trigger Hypoxia-Induced. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 11715, doi:10.1073/PNAS.95.20.11715.
96. Hamanaka, R.B.; Chandel, N.S. Mitochondrial Reactive Oxygen Species Regulate Hypoxic Signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2009**, *21*, 894, doi:10.1016/J.CEB.2009.08.005.
97. Semenza, G.L. Hypoxia-Inducible Factor 1 and Cardiovascular Disease. *Annu. Rev. Physiol.* **2014**, *76*, 39–56, doi:10.1146/ANNUREV-PHYSIOL-021113-170322.
98. Liberman, M.; Bassi, E.; Martinatti, M.K.; Lario, F.C.; Wosniak, J.; Pomerantzeff, P.M.A.; Laurindo, F.R.M. Oxidant Generation Predominates around Calcifying Foci and Enhances Progression of Aortic Valve Calcification. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2008**, *28*, 463–470, doi:10.1161/ATVBAHA.107.156745.
99. Zhao, M.M.; Xu, M.J.; Cai, Y.; Zhao, G.; Guan, Y.; Kong, W.; Tang, C.; Wang, X. Mitochondrial Reactive Oxygen Species Promote P65 Nuclear Translocation Mediating High-Phosphate-Induced Vascular Calcification in Vitro and in Vivo. *Kidney Int.* **2011**, *79*, 1071–1079, doi:10.1038/KI.2011.18.
100. Byon, C.H.; Heath, J.M.; Chen, Y. Redox Signaling in Cardiovascular Pathophysiology: A Focus on Hydrogen Peroxide and Vascular Smooth Muscle Cells. *Redox Biol.* **2016**, *9*, 244, doi:10.1016/J.REDOX.2016.08.015.
101. Gafter-Gvili, A.; Schechter, A.; Rozen-Zvi, B. Iron Deficiency Anemia in Chronic Kidney Disease. *Acta Haematol.* **2019**, *142*, 44–50, doi:10.1159/000496492.
102. Fox, K.M.; Yee, J.; Cong, Z.; Brooks, J.M.; Petersen, J.; Lamerato, L.; Gandra, S.R. Transfusion Burden in Non-Dialysis Chronic Kidney Disease Patients with Persistent Anemia Treated in Routine Clinical Practice: A Retrospective Observational Study. *BMC Nephrol.* **2012**, *13*, doi:10.1186/1471-2369-13-5.
103. Singh, A.K.; Szczech, L.; Tang, K.L.; Barnhart, H.; Sapp, S.; Wolfson, M.; Reddan, D. Correction of Anemia with Epoetin Alfa in Chronic Kidney Disease A BS TR AC T.

104. Babitt, J.L.; Eisenga, M.F.; Haase, V.H.; Kshirsagar, A. V.; Levin, A.; Locatelli, F.; Małyszko, J.; Swinkels, D.W.; Tarng, D.C.; Cheung, M.; et al. Controversies in Optimal Anemia Management: Conclusions from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Conference. *Kidney Int.* **2021**, *99*, 1280–1295, doi:10.1016/J.KINT.2021.03.020.
105. Gupta, N.; Wish, J.B. Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylase Inhibitors: A Potential New Treatment for Anemia in Patients With CKD. *Am. J. Kidney Dis.* **2017**, *69*, 815–826, doi:10.1053/J.AJKD.2016.12.011.
106. Parfrey, P. Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylase Inhibitors for Anemia in CKD. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *385*, 2390–2391, doi:10.1056/NEJME2117100.
107. Besarab, A.; Chernyavskaya, E.; Motylev, I.; Shutov, E.; Kumbar, L.M.; Gurevich, K.; Chan, D.T.M.; Leong, R.; Poole, L.; Zhong, M.; et al. Roxadustat (FG-4592): Correction of Anemia in Incident Dialysis Patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2016**, *27*, 1225–1233, doi:10.1681/ASN.2015030241/-/DCSUPPLEMENTAL.
108. Pergola, P.E.; Spinowitz, B.S.; Hartman, C.S.; Maroni, B.J.; Haase, V.H. Vadadustat, a Novel Oral HIF Stabilizer, Provides Effective Anemia Treatment in Nondialysis-Dependent Chronic Kidney Disease. *Kidney Int.* **2016**, *90*, 1115–1122, doi:10.1016/J.KINT.2016.07.019.
109. Yamamoto, H.; Nobori, K.; Matsuda, Y.; Hayashi, Y.; Hayasaki, T.; Akizawa, T. Molidustat for Renal Anemia in Nondialysis Patients Previously Treated with Erythropoiesis-Stimulating Agents: A Randomized, Open-Label, Phase 3 Study. *Am. J. Nephrol.* **2021**, *52*, 884–893, doi:10.1159/000518072.
110. Macdougall, I.C.; Akizawa, T.; Berns, J.S.; Bernhardt, T.; Krueger, T. Effects of Molidustat in the Treatment of Anemia in CKD. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2019**, *14*, 28–39, doi:10.2215/CJN.02510218.
111. Brigandi, R.A.; Johnson, B.; Oei, C.; Westerman, M.; Olbina, G.; De Zoysa, J.; Roger, S.D.; Sahay, M.; Cross, N.; McMahon, L.; et al. A Novel Hypoxia-Inducible Factor-Prolyl Hydroxylase Inhibitor (GSK1278863) for Anemia in CKD: A 28-Day, Phase 2A Randomized Trial. *Am. J. Kidney Dis.* **2016**, *67*, 861–871, doi:10.1053/j.ajkd.2015.11.021.
112. Singh, A.K.; Carroll, K.; Perkovic, V.; Solomon, S.; Jha, V.; Johansen, K.L.; Lopes, R.D.; Macdougall, I.C.; Obrador, G.T.; Waikar, S.S.; et al. Daprodustat for the Treatment of Anemia in Patients Undergoing Dialysis. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *385*, 2325–2335, doi:10.1056/nejmoa2113379.
113. Amann, K. Media Calcification and Intima Calcification Are Distinct Entities in Chronic Kidney Disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2008**, *3*, 1599–1605, doi:10.2215/CJN.02120508.
114. Yamada, S.; Giachelli, C.M. Vascular Calcification in CKD-MBD: Roles for Phosphate, FGF23, and Klotho. *Bone* **2017**, *100*, 87–93, doi:10.1016/J.BONE.2016.11.012.
115. Gunaratnam, L.; Bonventre, J. V. HIF in Kidney Disease and Development. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2009**, *20*, 1877–1887, doi:10.1681/ASN.2008070804.

116. Balogh, E.; Tóth, A.; Méhes, G.; Trencsényi, G.; Paragh, G.; Jeney, V. Hypoxia Triggers Osteochondrogenic Differentiation of Vascular Smooth Muscle Cells in an HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor 1)-Dependent and Reactive Oxygen Species-Dependent Manner. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2019**, *39*, doi:10.1161/ATVBAHA.119.312509.
117. Ruffenach, G.; Chabot, S.; Tanguay, V.F.; Courboulain, A.; Boucherat, O.; Potus, F.; Meloche, J.; Pflieger, A.; Breuils-Bonnet, S.; Nadeau, V.; et al. Role for Runt-Related Transcription Factor 2 in Proliferative and Calcified Vascular Lesions in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2016**, *194*, 1273–1285, doi:10.1164/RCCM.201512-2380OC.
118. Fuhrmann, D.C.; Brüne, B. Mitochondrial Composition and Function under the Control of Hypoxia. *Redox Biol.* **2017**, *12*, 208–215, doi:10.1016/J.REDOX.2017.02.012.
119. Ruiz, S.; Pergola, P.E.; Zager, R.A.; Vaziri, N.D. Targeting the Transcription Factor Nrf2 to Ameliorate Oxidative Stress and Inflammation in Chronic Kidney Disease. *Kidney Int.* **2013**, *83*, 1029–1041, doi:10.1038/KI.2012.439.
120. Cui, L.; Li, Z.; Chang, X.; Cong, G.; Hao, L. Quercetin Attenuates Vascular Calcification by Inhibiting Oxidative Stress and Mitochondrial Fission. *Vascul. Pharmacol.* **2017**, *88*, 21–29, doi:10.1016/J.VPH.2016.11.006.
121. Batchelor, E.K.; Kapitsinou, P.; Pergola, P.E.; Kovesdy, C.P.; Jalal, D.I. Iron Deficiency in Chronic Kidney Disease: Updates on Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2020**, *31*, 456–468, doi:10.1681/ASN.2019020213.
122. Hanna, R.M.; Streja, E.; Kalantar-Zadeh, K. Burden of Anemia in Chronic Kidney Disease: Beyond Erythropoietin. *Adv. Ther.* **2021**, *38*, 52–75, doi:10.1007/S12325-020-01524-6.
123. Nagy, A.; Pethő, D.; Gáll, T.; Zivaczki, 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.* **2020**, *10*, doi:10.3389/FPHYS.2019.01584.

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/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





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 alapjául szolgáló közleményekre):
12,592**

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, 2022.07.01.



14. Tárgyszavak

vaszkuláris simaizomsejtek, hipoxia, ROSök, HIF-1 aktiváció, oszteokondrogén irányú differenciálódás, extracelluláris mátrix kalcifikáció, anémia, Daprodustat, krónikus vesebetegség, foszfát, aorta kalcifikáció, kardiovaszkuláris rizikó

vascular smooth muscle cells, hypoxia, reactive oxygen species, HIF-1 activation, osteochondrogenic differentiation, extracellular matrix calcification, anemia, Daprodustat, chronic kidney disease, phosphate, aortic calcification, cardiovascular risk