

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A hipoxia-indukált faktor (HIF) jelátviteli útvonal
aktivációjának szerepe a billentyű intersticiális sejtek
oszteogén differenciálódásában és kalcifikációjában**

Csiki Dávid Máté

Témavezető: Dr. Jeney Viktória



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Sejt-és Immunbiológia Doktori Iskola

Debrecen, 2023

A hipoxia-indukált faktor (HIF) jelátviteli útvonal aktivációjának szerepe a billentyű intersticiális sejtek oszteogén differenciálódásában és kalcifikációjában

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

Írta: Csiki Dávid Máté okleveles biomérnök

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

Témavezető: Dr. Jeney Viktória, MTA doktora

Az értekezés bírálói:

Dr. Gyetvai Ágnes, PhD

Dr. Bencsik Péter, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Dr. Balogh István, MTA doktora

tagok: Dr. Gyetvai Ágnes, PhD

Dr. Bencsik Péter, PhD

Dr. Pázmándi Kitti, PhD

Dr. Sárközy Márta, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet
„A”épület tanterme, 2023. december 19. 13 óra

Bevezetés

Az érrendszert érintő ektópiás kalcifikációt hosszú időn keresztül az öregedéssel együtt járó passzív, degeneratív folyamatnak tekintették. Mára viszont számos kutatási eredménynek köszönhetően világossá vált, hogy a kalcifikáció az érfalban lokalizálódó sejtek által aktívan szabályozott folyamat, mely foszfátban és kalciumban gazdag hidroxiapatit kristályok lerakódásához vezet az érfalban. Jelenlegi ismereteink alapján a kalcifikáció kialakulásának elsődleges oka a kalcifikációt gátló inhibitorok (pl. pirofoszfát, mátrix Gla protein, fetuin-A) és a kalcifikációért felelős induktorok (pl. foszfát, kalcium, inflammatórikus citokinek) közötti egyensúly megbomlása. Megjelenési formája szerint három fő típust különböztetünk meg: az intima, a média és a billentyű kalcifikációt. Az intima kalcifikáció a közepes méretű artériákban, ateroszklerotikus plakkokkal asszociálva, pontszerűen; ezzel szemben a média kalcifikáció az erek teljes keresztmetszetében jelenik meg, mely során az erek rugalmatlanná válnak, majd balkamrai hipertrófia és végül szívelégtelenség alakul ki. A média kalcifikáció leggyakrabban a krónikus vesebetegségben szenvedő betegeket érinti.

Az aorta sztenózis, másnéven az aorta billentyű szűkülete az egyik leggyakoribb szívbillentyű betegség a fejlett országokban, melyet a szívbillentyű kalcifikációja okoz. Kialakulásában és progressziójában számos rizikófaktor játszik szerepet. A betegséget okozhatja veleszületett genetikai rendellenesség, az aorta billentyűket érő túlzott mechanikai stressz (pl. magas vérnyomás), továbbá különböző metabolikus rendellenességgel (pl. diabétesz) és egyéb súlyos betegséggel (pl. krónikus veseelégtelenség) társulva is előfordulhat.

A végstádiumú krónikus veseelégtelenségben (CKD) szenvedő betegek körében a szívbillentyű kalcifikáció az egyik leggyakoribb, mortalitásért felelős kardiovaszkuláris szövődmény. A szívbillentyű kalcifikáció patomechanizmusa nagy hasonlóságot mutat a vaszkuláris kalcifikációval. Számos kutatási eredmény bizonyítja, hogy a CKD betegben jelenlevő hiperfoszfatémia és hiperkalcinémia a vaszkuláris kalcifikáción túl, a szívbillentyű kalcifikáció legfőbb induktorai is, melyek a szívbillentyűket felépítő szívbillentyű intersticiális sejtek oszteogén irányú differenciálódását és kalcifikációját indukálják.

A közelmúltban az érrendszert érintő kalcifikációval összefüggésben egy újonnan feltárt tényező a szöveti hipoxia. A megfelelő oxigén szint biztosítása nélkülözhetetlen a celluláris és szisztémás homeosztázis fenntartásában. A hipoxiára adott válasz központi eleme a hipoxia-indukált faktor (HIF) jelátviteli útvonal. Krónikus vesebetegségben szenvedő betegek veséjében kimutatták a HIF-1 indukcióját, melyet összefüggésbe hoztak a krónikus vesebetegség progressziójával, valamint Mooka és munkatársai kimutatták a HIF-1 α fokozott

expresszióját krónikus vesebeteg patkányok aortájában, valamint azt, hogy az emelkedett inorganikus foszfát (Pi) stabilizálja a HIF-1 α -t érfali simaizomsejtekben. További *in vitro* kísérletekben bizonyították, hogy a hipoxia fokozza az érfali simaizomsejtek foszfáttal indukált kalcifikációját.

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

A krónikus vesebetegség gyakran társul más betegségekkel, melyek közül leggyakoribb az anémia. Az anémia jelentősen növeli a betegek mortalitását és morbiditását. Az anémia kezelésének egyik lehetséges alternatívája az eritropoézis stimuláló ágensek (ESA) adminisztrációja. Az ESA fokozza az EPO szintézist, növeli a hemoglobin szintet, azonban számos tanulmány kimutatta, hogy az emelt dózisu ESA növeli a kardiovaszkuláris események bekövetkezésének kockázatát, ezért alternatív terápiai lehetőségek kifejlesztésére volt szükség. Felmerült a prolil-hidroxiláz (PHD) enzim inhibitorok használata, melyek a PHD enzim gátlásán keresztül aktiválják a HIF-1 útvonalat, ezáltal fokozzák az eritropoetin szintézist. A klinikai vizsgálatok alapján a GlaxoSmithKline által kifejlesztett prolil-hidroxiláz inhibitor, a kis molekulásúlyú Daprodustat (GSK1278863) tűnt a legígéretesebbnek, melyet 2020-ban Japánban törzskönyveztek krónikus veseelégtelen betegek anémiájának kezelésére.

Anyagok és módszerek

- Kísérleteinkben humán valvuláris intersticiális sejtekkel (VIC) és humán aorta simaizomsejtekkel (HAoSMC) dolgoztunk, amelyeket sejttenyésztő inkubátorban, 21% O₂ tartalom mellett 37 °C-on és 5% CO₂ jelenlétében tenyésztettük. Hipoxiás kezelés során a sejteket moduláris inkubátor kamrába helyeztük, melyen hipoxiás gázkeveréket (1% O₂, 5% CO₂ és 94% N₂) áramoltattunk. Számos kísérletben alkalmaztunk hipoxia mimetikumokat, kobalt-kloridot (200 μmol/L), deferoxamint (DFO, 40 μmol/L), Daprodustatot (DPD, 20 μmol/L), valamint HIF-1 inhibitoraként chetomint (12 nmol/L). A kalcifikáció indukálásához szervesetlen foszfáttal (Pi, 1,5-2,5 mmol/L, pH 7,4) és kalciummal (Ca, 0,3 mmol/L CaCl₂) kiegészített tápfolyadékot használtunk.
- Alizarin vörös (AV) festéssel detektáltuk az extracelluláris mátrixban felhalmozódó kalcium depozitumokat. Ehhez a sejteket paraformaldehid oldattal fixáltuk, majd AV oldattal festettük. Az eredmény fényképes dokumentálását követően az AV festést kvantáltuk, melynek során a bekötődött AV festéket hexadecilpiridinium klorid oldatban feloldottuk, és 562 nm-en fotometráltuk.
- A kalcifikált sejtek extracelluláris mátrixának kalcium tartalmának meghatározásához a sejteket dekalcináltuk 30 percig szobahőmérsékleten. A sósavas felülúszó kalcium tartalmát QuantiChrom Calcium Assay kit-tel határoztuk.
- A sejtek életképességét MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólium-bromid) módszerrel határoztuk meg. A kezelt sejtek életképességét a kezeletlen sejtek életképességéhez viszonyítva, százalékban adtuk meg.
- A sejtek fehérje expressziójának vizsgálatát Western blot analízissel végeztük, mely során a teljes sejtlizátumokat 7,5-10%-os SDS poliakrilamid gélen választottuk el, majd nitrocellulóz membránra blottoltuk, blokkoltuk tejpor oldattal és az elsődleges antitesttel inkubáltuk egy éjszakán át 4 °C-on. Másnap a membránokat 1 órán keresztül torma-peroxidázzal konjugált anti-nyúl vagy anti-egér másodlagos antitesttel inkubáltuk, majd a detektáláshoz kemilumineszcens Western ECL reagenst használtunk és az eredményt röntgen filmen, illetve digitálisan rögzítettük.
- Géncsendesítést rövid interferáló RNS (siRNS) konstrukciókkal végeztünk. A transzfekciót Lipofectamine® RNAiMAX reagenssel végeztük.
- A ROS képződés vizsgálatához a sejteket a kezelés végén 5-(és-6)-klorometil-2',7'-diklorodihidrofluoreszcein diacetát, acetyl észtet (CM-H₂DCFDA) inkubáltuk 30 percig. A sejteket az inkubáció után HBSS-el mostuk és a fluoreszcencia intenzitást mértük (488 nm

gerjesztés/533 nm emisszió) 30 percenként 4 órán át. Néhány kísérletünkben alkalmaztunk N-acetil cisztein (NAC, 1 mmol/L) antioxidánst is.

- A krónikus veseelégtelen (CKD) egérmodellen végzett vizsgálatainkat a “Hipoxia szerepe a vaszkuláris kalcifikációban” című 3/2018/DEMÁB számon nyilvántartott etikai engedélyben leírtak szerint végeztük. A kísérletekben 15 darab C57BL/6 egeret (8-12 hetes, hím) használtunk fel. A CKD indukálásához eltérő foszfát és adenin tartalmú, kétfázisú diétát alkalmaztunk, a DPD-t pedig 1% metilcellulózban szuszpendáltuk és naponta orálisan adagoltuk a kétfázisú diéta második szakaszában.
- Az egerek plazma, urea és kreatinin szintjeit Cobas® c502 készülékkel határoztuk meg. A hematológiai paramétereiket citráttal antikoagulált vérből Siemens Advia-2120i automatával határoztuk meg.
- A lágyszöveti kalcifikáció kimutatására OsteoSense festéket és IVIS Spectrum In Vivo Imaging készüléket használtunk.
- Az egér szív vizsgálatához a szövetdarabokat 10%-os formalinban fixáltuk, majd paraffinba ágyasztuk, majd a 4 µm vastagságú metszeteken hematoxilin-eozin és von Kossa festést végeztünk.

Célkitűzés

A rendelkezésünkre álló legfrissebb szakirodalmi adatok alapján az alábbi hipotéziseket fogalmaztuk meg.

I. Hipotézis: A magas foszfát és kalcium, mint kettős oszteogén stimulus a HIF jelátviteli útvonal aktivációján keresztül indukálja a szívbillentyű intersticiális sejtek oszteogén irányú differenciálódását és kalcifikációját *in vitro*.

II. Hipotézis: A hipoxia a HIF jelátviteli útvonal aktivációján keresztül fokozza a VIC-ek OM-indukált oszteogén irányú differenciálódását és kalcifikációját *in vitro*.

III. Hipotézis: A hipoxia az emelkedett reaktív oxigén gyökök termelődésén keresztül fokozza a VIC-ek oszteogén irányú differenciálódását és kalcifikációját *in vitro*.

IV. Hipotézis: a CKD-asszociált anémia kezelésére alkalmazott prolil-hidroxiláz inhibitor, a DPD fokozza a szívbillentyű kalcifikációt *in vivo*.

V. Hipotézis: A hipoxia szinergista módon fokozza humán aorta simaizomsejtek (HAoSMC) magas foszfáttal indukált kalcifikációját.

Eredmények

1. A kettős oszteogén stimulus hatása a szívbillentyű intersticiális sejtek oszteogén irányú differenciálódására, kalcifikációjára és a HIF jelátviteli útvonal aktivációjára

A kísérlet során a kalcifikációt magas foszfát (2,5 mmol/L) és magas kalcium (0,3 mmol/L) tartalmú oszteogén médiummal (OM) indukáltuk. Megállapítottuk, hogy az OM kezelés időfüggő módon növelte az oszteogén irányú differenciálódás markereinek (Runx2, ALP, Sox9) fehérje expresszióját és kalcifikációját. Ezt követően megvizsgáltuk a HIF jelátviteli útvonal szerepét a VIC-ek oszteokondrogén irányú differenciálódásában és kalcifikációjában, mely során megállapítottuk, hogy a OM kezelés a HIF-1 α , HIF-2 α , és a szabályzásuk alatt álló Glut-1 fehérjék fokozott expresszióját eredményezte. Ezt követően a HIF jelátviteli útvonal kalcifikációban betöltött szerepének bizonyítására targetált siHIF-1 α és siHIF-2 α géncsendesítést alkalmaztunk, amely a kalcifikáció teljes gátlásához vezetett. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az oszteogén stimulus hatására indukálódó HIF jelátviteli útvonal aktívan részt vesz a VIC-ek OM-indukált kalcifikációjában normoxiás körülmények között.

2. A hipoxia hatása a HIF jelátviteli útvonal aktivációjára, valamint az szívbillentyű intersticiális sejtek OM-indukált oszteogén irányú differenciálódására és kalcifikációjára

Elsőként megvizsgáltuk a HIF jelátviteli útvonal aktivációját szívbillentyű intersticiális sejtekben hipoxiás körülmények között, mely a vizsgált célfehérjék (HIF-1 α , HIF-2 α , Glut-1) fokozott expresszióját eredményezte. Ezt követően a sejteket oszteogén médiummal kezeltük normoxiás és hipoxiás körülmények között. Megállapítottuk, hogy a hipoxia fokozza a VIC-ek OM-indukált oszteogén irányú differenciálódását és az extracelluláris mátrix (ECM) kalcifikációját. Annak megállapítására, hogy a HIF jelátviteli útvonal szerepet játszik-e a hipoxia kalcifikációt fokozó hatásában, elsőként a HIF-1 inhibitor chetomint alkalmaztunk. Megállapítottuk, hogy chetomin hatékonyan gátolta a VIC-ek kalcifikációját. Ezt követően targetált HIF-1 α , illetve HIF-2 α siRNS-eket alkalmaztunk külön-külön, illetve együttesen, mely a HIF-1 α , illetve HIF-2 α expressziójának csökkentése a kalcifikáció részleges, míg mindkét HIF- α alegység expressziójának együttes csökkentése pedig a kalcifikáció teljes gátlását idézte elő. Ezt követően három különböző hipoxia mimetikum: a kobalt-klorid (CC), a deferoxamin (DFO) és a Daprodustat (DPD) hatását vizsgáltuk VIC-ek oszteogén tápfolyadékkal indukált kalcifikációjára, és megállapítottuk, hogy az általunk használt hipoxia mimetikumok mindegyike jelentősen fokozta a HIF-1 α , és a HIF-2 α fehérjék expresszióját, és

a VIC-ek extracelluláris mátrix kalcifikációját. Ezen eredmények alapján kijelenthetjük, hogy a hipoxia által indukált HIF jelátviteli útvonal kulcsszerepet játszik a VIC-ek OM-indukált kalcifikációjának hipoxia általi fokozódásában.

3. A ROS képződés szerepe a szívbillentyű intersticiális sejtek oszteogén irányú differenciálódásában és kalcifikációjában normoxiás és hipoxiás körülmények között

A sejteket oszteogén médiummal kezeltük normoxiás és hipoxiás körülmények között, majd megmértük az intracellulárisan képződő ROS mennyiségét. Megállapítottuk, hogy az OM fokozta a VIC-ek ROS termelését normoxiás illetve hipoxiás körülmények között is. Továbbá, kimutattuk, hogy a hipoxia a normoxiához viszonyítva fokozta a ROS termelődést mind kontroll, mind OM körülmények között. Ezt követően antioxidáns (N-acetil-cisztein) jelenlétében megvizsgáltuk a ROS képződésének mértékét és azt tapasztaltuk, hogy a NAC hatékonyan csökkentette a ROS termelődés OM-mel indukált, illetve hipoxia-általi fokozódását. Mivel a túlzott ROS képződés sejthalálhoz vezethet, ezért megvizsgáltuk a VIC-ek életképességét is. Az oszteogén stimulus normoxiás körülmények között enyhe, míg hipoxiás körülmények között fokozottabb sejtpusztulást idézett elő, melyet a NAC kezelés hatékonyan gátolt. Ezt követően megvizsgáltuk a NAC szívbillentyű intersticiális sejtek kalcifikációjára gyakorolt hatását, és azt tapasztaltuk, hogy a NAC a reaktív oxigén gyökök képződésének csökkentésén keresztül hatékonyan gátolta az OM-indukált kalcifikációt normoxiás és hipoxiás körülmények között egyaránt. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a hipoxia az emelkedett reaktív oxigén gyökök termelődésén keresztül fokozta a VIC-ek oszteogén irányú differenciálódását és kalcifikációját.

4. A DPD hatása a szívbillentyű intersticiális sejtek kalcifikációjára in vitro és in vivo CKD egérmodellben

Korábbi kísérleteink során megállapítottuk, hogy a CKD-asszociált anémia kezelésére alkalmazott kis molekulású prolil-hidroxiláz enzim inhibitor, a DPD jelentősen fokozza a VIC-ek OM-indukált kalcifikációját, ezért további vizsgálatot végeztünk a DPD kalcifikációt fokozó hatásmechanizmusának felderítésében. Ennek érdekében HIF-1 α és HIF-2 α géncsendesítést végeztünk, és megállapítottuk, hogy a HIF-1 α , illetve a HIF-2 α csökkent expressziója a kalcifikáció részleges gátlását eredményezte. Ezt követően beállítottunk egy *in vivo* egérmodellt, mely során C57BL/6 egerekben kétfázisú diétával veseelégtelenséget indukáltunk. A kísérletben a DPD-t az anémiát sikeresen korrigáló dózisban (15 mg/kg/nap)

adtuk az egereknek, és meghatároztuk a vesebetegség klinikai paramétereinek változását. Megállapítottuk, hogy DPD kezeléstől függetlenül a szérum foszfát, urea és kreatinin szintje fokozódott. Továbbá megvizsgáltuk a DPD hatását a hematológiai paraméterekre, és megállapítottuk, hogy a CKD által előidézett anémiát a DPD kezelés hatékonyan korrigálta. Ezt követően a DPD szív kalcifikációjára gyakorolt hatását vizsgáltuk, mely során hidroxipatit-specifikus OsteoSense™ festéket alkalmaztunk, melyet az analízis előtt 12 órával intravénásan juttattunk az egerekbe. A kalcifikációt közeli infravörös képalkotó technika segítségével detektáltuk, mely során a CKD-s egerek szívében magasabb fluoreszcencia intenzitást mértünk a kontroll egerekéhez viszonyítva, míg a DPD-vel kezelt egerek szívének fluoreszcencia intenzitása meghaladta a CKD-s egerekét is. Továbbá a szíveken szövettani vizsgálatként hematoxilin-eozin festést, valamint a kalcifikáció kimutatása céljából von Kossa és AV festést végeztünk. A von Kossa és AV festések alapján megállapítottuk, hogy a CKD+DPD csoportba tartozó egerek szívszövetein látható a legerősebb festődés, amely fokozott szívbillentyű kalcifikációra utal, míg a kontroll csoportba tartozó egerek szívében kalcifikáció egyáltalán nem volt detektálható. Ezek az eredmények összességében arra utalnak, hogy az általunk alkalmazott DPD dózis bár hatékonyan korrigálja a CKD-asszociált anémiát, de fokozza a szív kalcifikációját veseelégtelen egerekben.

5. A hipoxia hatása a humán aorta simaizomsejtek (HAoSMC) magas foszfáttal indukált kalcifikációjára

A vaszkuláris simaizomsejtek intima és média kalcifikáció során is kerülhetnek hipoxiás környezetbe, ezért utolsó kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy hogyan hat a hipoxia humán aorta simaizomsejtek (HAoSMC) OM-indukált kalcifikációjára. A HAoSMC-et különböző koncentrációjú foszfáttal (Pi, 1,5-2,5 mmol/L) kiegészített tápoldatban kezeltük normoxiás és hipoxiás körülmények között és megállapítottuk, hogy a hipoxia dózis és időfüggő módon fokozza a HAoSMC foszfát indukált kalcifikációját. Ezen eredmények együttesen megerősítik a hipoxia kalcifikációt fokozó hatását humán aorta simaizomsejtekben is.

Diszkusszió

A krónikus veseelégtelenség egy irreverzibilis és progresszív, beszűkült vesefunkcióval járó súlyos megbetegedés, melyben szenvedő betegek körében a mortalitásért főleg a szívbillentyű kalcifikáció felelős. A CKD betegekben az ásványi- és csontanyagcsere zavar következtében kialakult hiperfoszfátémia és hiperkalcémia a szívbillentyű kalcifikáció legfőbb induktorai, mely a aorta szívbillentyűket felépítő intersticiális sejtek oszteogén irányú differenciálódását és kalcifikációját idézik elő. A kísérletekben magas foszfát és kalcium tartalmú oszteogén tápfolyadékkal indukáltuk a VIC-ek oszteogén irányú differenciálódását, és megállapítottuk, hogy a kettős oszteogén stimulus időfüggő módon növelte az oszteogén specifikus markereinek (Runx2, ALP, Sox9) fehérje expresszióját és indukálta az VIC-ek kalcifikációját. A szöveti hipoxia számos betegség, mint például a CKD patomechanizmusában is fontos szerepet játszik. Elsőként Mokas és munkatársai mutatták ki, hogy CKD-ban a hipoxia nem csak a vesét érinti, hiszen a HIF-1 α expressziójának fokozódását írták le az aorta média rétegben is krónikus vesebeteg patkánymodellben. Mokas és munkatársai vizsgálták a hipoxia hatását az érfali simaizomsejtek magas foszfáttal indukált kalcifikációjában és arról számoltak be, hogy a magas foszfát a HIF-1 α stabilizációját idézi elő normoxiás körülmények között. Munkánk során hasonló mechanizmust figyeltünk meg a VIC-ek esetében is, hiszen a magas foszfát tartalmú oszteogén tápfolyadék a HIF jelátviteli útvonal aktivációját idézte elő normoxiában. Kimutattuk, hogy az OM-indukált HIF jelátviteli útvonal aktivációja fontos szerepet játszik VIC-ek kalcifikációjában, melynek legfőbb bizonyítéka, hogy a HIF-1 α és a HIF-2 α géncsendesítés hatására az OM-indukált kalcifikáció elmaradt.

A HIF jelátviteli útvonal további vizsgálatának céljából megvizsgáltuk a hipoxia VIC-ek OM-indukált kalcifikációra gyakorolt hatását. Megállapítottuk, hogy a hipoxia általi HIF jelátviteli útvonal aktiválódása jelentős mértékben növelte a hipoxia specifikus markerek (HIF-1 α , HIF-2 α , Glut-1) és az oszteogén markerek (Runx2, Sox9) fehérje expresszióját, továbbá szinergista módon fokozta a VIC-ek OM-indukált kalcifikációját. Korábban a hipoxia foszfát indukált kalcifikációt fokozó hatásáról számoltak be VSMC-k oszteogén differenciálódása során is, melyet a mi kutatócsoportunk is megerősített. A VIC-ek OM+hipoxia indukált kalcifikációjának hátterében továbbvizsgáltuk a HIF jelátviteli útvonal szerepét, mely során megállapítottuk, hogy a chetomin részlegesen gátolja a VIC-ek OM-indukált kalcifikációját, míg a célzott HIF-1 α vagy HIF-2 α géncsendesítést külön-külön alkalmazva a kalcifikáció csökkenését, együttes alkalmazásuk esetén pedig a kalcifikáció teljes gátlását tapasztaltuk. A hipoxia VIC-ek OM-indukált kalcifikációjában betöltött szerepének további vizsgálatához

különböző hipoxia mimetikumokat (CC, DFO, DPD) is alkalmaztunk. Az általunk alkalmazott mimetikumok mindegyike stabilizálta a HIF alfa alegységét és fokozták a VIC-ek OM-indukált kalcifikációját normoxiás körülmények között. Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy a hipoxia HIF-1 α és HIF-2 α függő módon fokozza a VIC-ek OM indukált kalcifikációját.

A túlzott ROS képződés általi oxidatív stressz számos betegségben, köztük a szívbillentyű kalcifikáció patomechanizmusában is szerepet játszik. Munkánk során kimutattuk, hogy hipoxia hatására fokozódik ROS képződés mind a kontroll, mind az oszteogén stimulussal kezelt sejtekben. Továbbá, hogy a hipoxia+OM stimuláció hatására jelentősen csökkent a sejtek életképessége is. A hipoxia általi fokozott ROS képződést és az életképesség csökkenését az általunk alkalmazott antioxidáns (NAC) hatékonyan gátolta.

A CKD gyakran társul anémiával. A CKD-asszociált anémia kezelésére szolgáló eritropoézist stimuláló ágensekkel kapcsolatban a közelmúltban végzett vizsgálatok során kiderült, hogy ezen gyógyszerek alkalmazása jelentősen megnöveli a szív és érrendszeri szövődmények kialakulásának kockázatát. Ezért egy új gyógyszer csoportot fejlesztettek ki, az úgynevezett prolil-hidroxiláz (PHD) inhibitorokat, melyek közül a legígéretesebb szer a Daprodustat (DPD), mely a prolil-hidroxiláz domén gátlásán keresztül a HIF-1 jelátviteli útvonal aktivációjához és az eritropoézis indukációjához vezet. Korábbi kísérleteink során kimutattuk, hogy a DPD fokozza a VIC-ek OM által indukált kalcifikációját. A DPD kalcifikációt fokozó mechanizmus vizsgálatához HIF-1 α , illetve a HIF-2 α géncsendesítést végeztünk, ami a kalcifikáció részleges gátlását eredményezte. Miután az *in vitro* kísérleti eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a DPD fokozza a VIC-ek OM-indukált kalcifikációját, megvizsgáltuk a DPD billentyű kalcifikációra kifejtett hatását *in vivo* CKD egérmodellben is. A CKD indukálását kétfázisú diétával valósítottuk meg, mely során a diéta második fázisában a DPD-t orálisan adagoltuk az egereknek. Megállapítottuk, hogy a CKD által előidézett anémiát a DPD kezelés hatékonyan korrigálta, míg a magas szérum urea, kreatinin és foszfát szintet nem befolyásolta, viszont fokozta a szív és a szívbillentyűk kalcifikációját. Korábbi kutatási eredményeink során a DPD hasonló kalcifikációt fokozó hatását tapasztaltuk aorta kalcifikációban. Összegezve elmondhatjuk, hogy a HIF jelátviteli útvonal hipoxia és hipoxia mimetikumok általi aktivációja HIF-1 α , HIF-2 α és ROS-függő módon fokozza VIC-ek OM-indukált kalcifikációját. Az új generációs PHD inhibitor DPD bár hatékonyan korrigálja a CKD-asszociált anémiát, ezzel párhuzamosan fokozza a szívszövet és szívbillentyűk kalcifikációját CKD egérmodellben. Annak megválaszolására, hogy ez a mechanizmus hozzájárul-e a CKD betegeket érintő súlyos kardiovaszkuláris események bekövetkezéséhez további vizsgálatokra van szükség.

Az értekezésben ismertetett új tudományos eredmények összefoglalása

1. A kettős oszteogén stimulus a HIF jelátviteli útvonal aktivációján keresztül indukálja a szívbillentyű intersticiális sejtek oszteogén irányú differenciálódását és kalcifikációját.
2. A hipoxia a HIF jelátviteli útvonal aktivációján keresztül HIF-1 α és HIF-2 α függő módon fokozza a VIC-ek OM-indukált oszteogén irányú differenciálódását és kalcifikációját.
3. A hipoxia az emelkedett reaktív oxigén gyökök termelődésén keresztül fokozza a VIC-ek OM-indukált oszteogén irányú differenciálódását és kalcifikációját, mely antioxidánsokkal hatékonyan gátolható.
4. A DPD hatékonyan korigálja a krónikus vesebetegség következtében kialakult anémiát, viszont a HIF jelátviteli útvonal aktivációján keresztül fokozza a szív és szívbillentyű kalcifikációját *in vivo* CKD egérmodellben.



Nyilvántartási szám: DEENK/332/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Csiki Dávid Máté

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Csiki, D. M.**, Ababneh, H., Tóth, A., Lente, G., Szőőr, Á., Tóth, A., Fillér, C., Juhász, T., Nagy, B. J., Balogh, E., Jeney, V.: Hypoxia-inducible factor activation promotes osteogenic transition of valve interstitial cells and accelerates aortic valve calcification in a mice model of chronic kidney disease.
Front. Cardiovasc. Med. 10, 1-15, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fcvm.2023.1168339>
IF: 3.6 (2022)
2. Tóth, A., **Csiki, D. M.**, Nagy, B. J., Balogh, E., Lente, G., Ababneh, H., Szőőr, 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: 5.6





További közlemények

3. Szabó, L., Balogh, N., Tóth, A., Angyal, Á., Gönczi, M., **Csiki, D. M.**, Tóth, C., Balatoni, I., Jeney, V., Csernoch, L., Dienes, B.: The mechanosensitive Piezo1 channels contribute to the arterial medial calcification.

Front. Physiol. 13, 1037230, 2022.

DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2022.1037230>

IF: 4

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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 17,957

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
9,2**

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, 2023.07.06.



Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megragadni az alkalmat, hogy kifejezzem hálás köszönetemet mindazoknak, akik a doktori disszertációm elkészítésében segítségemre voltak.

❖ Témavezetőmnek, Dr. Jeney Viktóriának, aki 4 évvel ezelőtt ismeretlenül is bizalmat szavazott nekem és ezáltal lehetőséget biztosított számomra a doktori disszertációm elkészítéséhez. Továbbá a hasznos szakmai tanácsaiért, támogatásáért, és a doktori disszertációm koordinálásáért.

❖ Munkatársamnak és egyben páromnak, Tóth Andreának a tudása megosztásáért, lelkiismeretes, pontos és precíz munkavégzéshez szükséges útmutatásaiért, az építő jellegű kritikáiért és támogatásáért.

❖ A Vaszkuláris Pathofiziológiai Kutatócsoport munkatársainak: Dr. Balogh Enikőnek, Dr. Benard Bogonko Nyakundinak, Dr. Erdei Juditnak, Arpan Chowdhurnak, Lente Grétának, és Haneen Ababnehnak a kísérletekben nyújtott segítségért.

❖ A kollaborációs partnereknek a közreműködésért.

❖ Végül, de nem utolsó sorban pedig édesanyámnak mondok hálás szívvel köszönetet a tanulmányaimban nyújtott önzetlen támogatásáért.