

Pirofoszfát sók, mint lehetséges meszesedést megelőző gyógyszerek *in vivo* tesztelése



TDK dolgozat

Szerző: Kutás Adriána

Konzulensek: Dr. Pomozi Viola, Dr. Mucsi Zoltán

**Miskolc
2024**

Absztrakt

A lágyszöveti meszesedés társadalmunk jelentős részét érintő egészségügyi probléma. A kalcifikáció egy fiziológiai folyamat, amely kulcsfontosságú a csont - és fogképződés során, azonban a lágy szöveteket érintő ektópiás meszesedés egy patológiás folyamat. Az ektópiás meszesedés leggyakrabban a bőrön, vesékben, ízületekben, valamint a kardiovaszkuláris szövetekben jelentkezik. Kialakulhat öregedéskor, cukorbetegség esetén, illetve egyes genetikai betegségek következtében. Utóbbiak, mint modellbetegségek lehetőséget nyújtanak a jelenség vizsgálatára. A kalcifikáció természetes gátlószere a pirofoszfát (PP_i), amelynek szintje számos meszesedési tünetekkel járó betegségben csökken. Kutatócsoportunk az utóbbi években különböző pirofoszfát sók felszívódását és funkcionális hatását vizsgálta egy meszesedési betegség egér modelljében.

Dolgozatomban négyféle PP_i só farmakokinetikai sajátosságait és az $Abcc6^{-/-}$ egér modellen végzett in vivo funkcionális tesztek eredményeit mutatok be, amelyek során jobban megismertük a PP_i sók tulajdonságait, valamint eredményeink elősegíthetik humán klinikai vizsgálatok és terápiás kezelések indítását is

Igazolás

Alulírott Kutás Adriána igazolom, és a büntetőjogi felelősségem tudatában kijelentem, hogy a leadott TDK dolgozat a saját munkám.



Kutás Adriána

Alulírott Dr. Pomozi Viola (TTK Enzimológiai Intézet), mint külső témavezető nyilatkozom, hogy Kutás Adriána, „**Pirofoszfát sók, mint lehetséges meszesedést megelőző gyógyszerek in vivo tesztelése**” című dolgozatában ismertetett munkát a hallgató a szakmai irányításommal végezte, amely szakmai tartalma alapján beadható.



Dr. Pomozi Viola

Alulírott Dr. Mucsi Zoltán (ME Kémia Intézet), mint belső témavezető nyilatkozom, hogy Kutás Adriána, „**Pirofoszfát sók, mint lehetséges meszesedést megelőző gyógyszerek in vivo tesztelése**” című dolgozatában ismertetett munkát a hallgató a szakmai irányításommal végezte, amely szakmai tartalma alapján beadható.



Dr. Mucsi Zoltán

Tartalom

Absztrakt	
Bevezetés.....	1
Irodalmi áttekintés.....	2
Lágyszöveti meszesedés molekuláris mechanizmusa	2
Egér modellek.....	3
Pirofoszfát felszívódása	4
Pirofoszfátsók bemutatása	6
$\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$	6
$\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$	7
Monolizin- $\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$	7
Monoarginin- $\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$	8
Célkitűzés	10
Módszertan	11
Pirofoszforsav-sók szintézise	11
$\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$	11
Mono(L)-lizin-pirofoszfát.....	11
Mono(L)-arginin-pirofoszfát.....	12
Egérkísérletek	12
Hatóanyag szervezetbe juttatása	12
Meszesedés indukálása fagyasztásos sérüléssel.....	13
Szerzői hozzájárulás	17
Előzetes eredmények	18
Eredmények.....	19
A szájon át beadható hatékony dózis meghatározása	19
Különböző pirofoszfát sók meszesedést gátló hatásának vizsgálata <i>in vivo</i>	20
Konklúzió	23
Jövőbeli tervek	24
Irodalomjegyzék.....	25

Bevezetés

A meszesedés során egy olyan fiziológiai folyamatról beszélünk, amely kulcsfontosságú a gerincesek megfelelő fejlődéséhez. A folyamat elengedhetetlen a csont- és fogképződésnél. A kalcifikációs jelenségek legfőbb alkotói a kalcium és foszfát kristályok, amelyek leginkább hidroxipapatit $[Ca_5(PO_4)_3OH]$ formában fordulnak elő. Amennyiben a kalcifikáció a lágy szöveteket érinti, egy patológiás folyamat áll fent, amelyet ektópikus meszesedésnek hívunk. Ennek három fajtáját különböztethetjük meg (metasztatikus, disztrófiás, kalcinózis). Az alábbi dolgozat a disztrófiás megjelenési formát dolgozza fel, amely az igénybe vett, nekrotikus szövetek esetében jellemző. A legérintettebb területek a bőr, vese, ízületek, kardiovaszkuláris szövetek. Tünetei közé tartozik a fájdalom, funkcióvesztés és súlyos esetben akár halálhoz is vezethet. Kiváltója lehet az öregedés, cukorbetegség, illetve genetikai betegségek (pl: PXE, GACI). Ezeket az ektópiás meszesedés modellbetegségeinek is tekintik.

A Pseudoxanthoma elasticum (PXE; OMIM 264800) egy olyan ritka, örökletes rendellenesség, amely a bőr, szem és a szív- és érrendszer rugalmas rostjait érintő ektópikus mineralizációval jellemezhető. A PXE-t az ABC- transzporter családba tartozó *ABCC6* gén mutációi okozzák[1], [2]. Az *ABCC6* fehérje egy transzmembrán transzporter, amely elsősorban a hepatocitákban (speciális sejtek, melyek a májat alkotják) expresszálódik.[3]

A csecsemőkori generalizált artériás meszesedés (GACI; OMIM 208000) szintén egy ritka genetikai betegség, amely a lágy szövetek súlyos meszesedésével jár, az érintett betegek sokszor csak néhány hónapos korukig élnek. A betegséget az *ENPP1* gén mutációi okozzák [4].

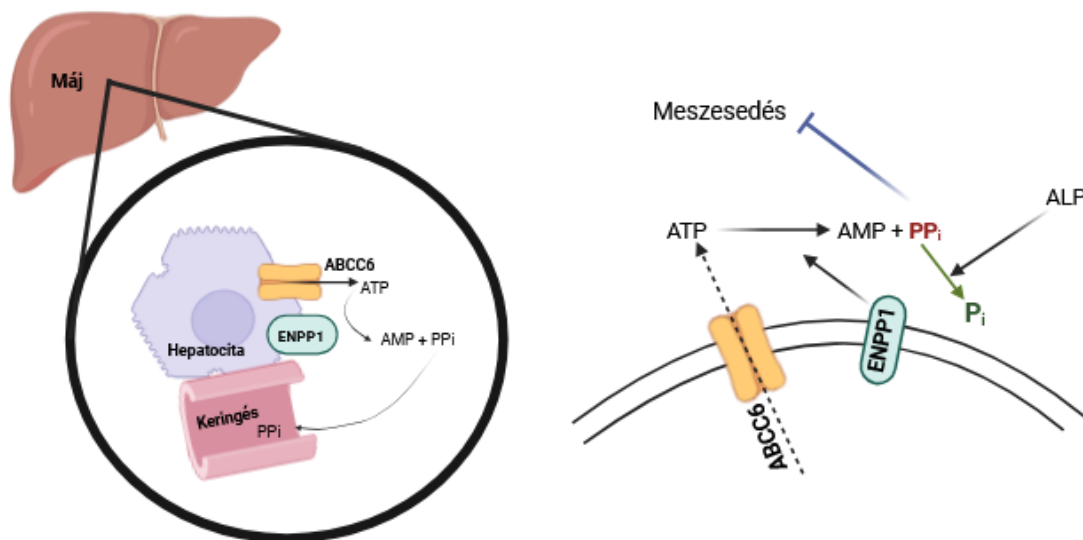
Az *ABCC6* fehérje egy transzmembrán transzporter, amely megkönnyíti az ATP felszabadulását[5]. Az *ENPP1* pedig egy olyan membránhoz kötött ektonukleotid pirofoszfataáz/foszfodiészteráz, amely hatékonyan hidrolizálja az ATP-t a keringésben megjelenő PP_i előállításához. Mindkét betegség esetén az *ABCC6*, illetve az *ENPP1* fehérjéket kódoló gének mutációi miatt kevesebb PP_i termelődik, és ezért kalcifikáció jelenik meg a szövetekben. Adódik a hipotézis, hogy a pirofoszfát pótlásával megelőzhető lehet a kalcifikáció megjelenése azon betegségek esetében, melyeknél a meszesedés kialakulása az alacsonyabb PP_i -szinthez köthető. Jelen dolgozatban négyféle PP_i sóval végzett preklinikai vizsgálataink eredményeit mutatom be, amelyek során PP_i meszesedést megelőző hatását tanulmányoztuk egér modellben.

Irodalmi áttekintés

Lágyszöveti meszesedés molekuláris mechanizmusa

A pirofoszfát az ektópiás meszesedés ismert szabályozója. A szervezet PP_i szintjét befolyásolja egyrészt a PP_i keletkezése, másrészt a PP_i lebontása. A PP_i keletkezésében két fő mechanizmust azonosítottak. Megállapították, hogy az ABCC6 fehérje működésének következtében az ATP felszabadulása a májból a PP_i fő forrása a keringésben. [6] Amennyiben az ABCC6 gén meghibásodik, kevesebb ATP jut ki a hepatocitákból, csökken a PP_i mennyisége. Ennek a csökkenésnek a mértéke közel 60%. Kérdéses, hogy az érintett szövetekben (pl fibroblaszt / érrendszer simaizom sejtjei) van-e lokális hatása is az ABCC6-nak. Egyes eredmények arra utalnak, hogy a PXE patogenezisében helyi sejtek is részt vehetnek.

A keringésben lévő ATP-ből az ENPP1 enzim PP_i -t hasít (1. ábra), ezzel biztosítva a szükséges pirofoszfát szintet. Az *ENPP1* gén mutációi felelősek a generalizált artériás meszesedésért (GACI), amely egy súlyosabb rendellenesség. Ennek oka, hogy ez az egyetlen PP_i -t hasító enzimet kódoló gén, meghibásodásakor tehát egyáltalán nem keletkezik PP_i a szervezetben. A két rendellenesség közt megfigyelhetők átfedő fenotípusok [7], [8].



1. ábra PP_i előállítása, bomlása, hiányának következményei

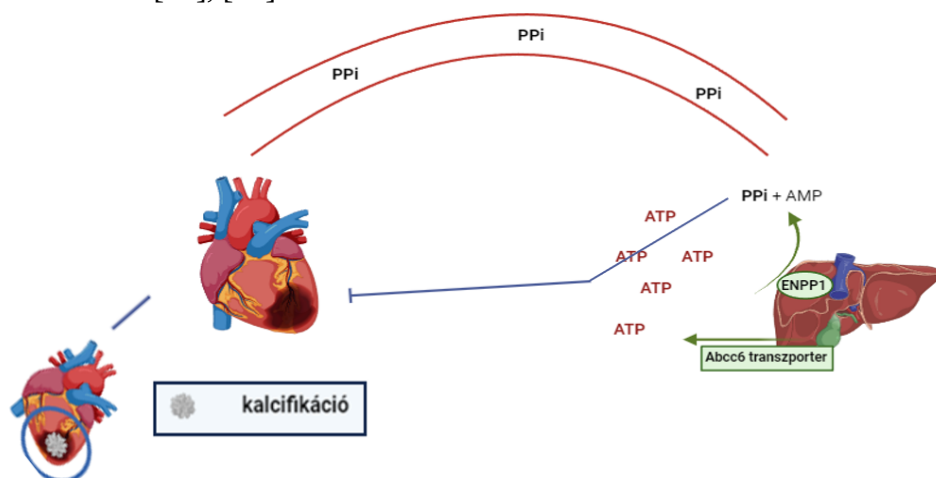
A szervezetben lévő PP_i -t az alkalikus foszfatáz (ALP) enzimek hasítják, amely reakció során két szervetlen foszfát molekula keletkezik. Az alkalikus foszfatázok a sejtmembrán külső rétegén elhelyezkedő izoenzimek egy csoportja. Az extracelluláris térben található szerves foszfátszterek hidrolízisét katalizálják. Az ALP csökkenő koncentrációban megtalálható különböző szervekben, például a placentában, a bélnyálkahártyában, a vesében, a csontban és a májban. A szérumban lévő ALP több mint 80%-a a májból és a csontból származik, kisebb mértékben a bélből [9].

Egér modellek

A humán betegségek kutatásánál állatmodellek segítik az adott betegség jobb megismerését és az esetleges gyógymódok tesztelését. Az egerek az egyik leggyakrabban használt modellszervezetek az orvosbiológiai kutatásokban, és alapvető betekintést nyújtanak az emberi betegségek megértéséhez. Az egerek és az emberek közötti genetikai, fiziológiai és anatómiai hasonlóságoknak köszönhetően az egérmodellek nagyon hasznos eszközei a különféle humán betegségek vizsgálatának.

Abcc6^{-/-}

Abcc6 knockout (KO) egérmodell: A génmódosított *Abcc6*^{-/-} egerek a humán PXE betegekhez hasonló tüneteket mutatnak. Kalcifikációs elváltozásokat produkálnak a bőrben és az artériák elasztikus rostjaiban, vesében. Az első tünetek 5-6 hetes korban jelentkeznek, a bajusz szőrtüszők meszesedésével[10], [11]. A PXE betegekhez hasonlóan, az *Abcc6*^{-/-} egerekben is jelentkezik bizonyos gyulladásos citokinek (IL-6, IL-12, IL-17A) emelkedett szintje[12]. Továbbá egerekben is kimutatták a PXE betegek jellemző alacsony pirofoszfát szintet [13]. Az *Abcc6* KO egerek ideális modellállatok a PXE-ben kialakuló spontán (krónikus) meszesedési folyamatok vizsgálatára. Ezen kívül leírták, hogy a viszonylag lassan (hónapok) alatt kialakuló krónikus meszesedés mellett bizonyos szöveti sérülés hatására is kiváltható egy akut meszesedés ebben az egértörzsben. Ilyen akut meszesedést eredményez például a fagyasztásos sérülés[14](2. ábra). A kutatócsoportban rutinszerűen alkalmazzák ezt a módszert, amikor az egerek szívének rövid és részleges megfagyasztásával indukálják a szívizom meszesedését. Ezzel az eljárással már 3-4 napon belül látható az indukált meszesedés, tehát ez egy gyors és hatékony módja a meszesedés vizsgálatának, és akár esetleges meszesedést gátló gyógyszerek tesztelésének[15], [16].



2. ábra Meszesedés kialakulása

***Enpp1*-/-**

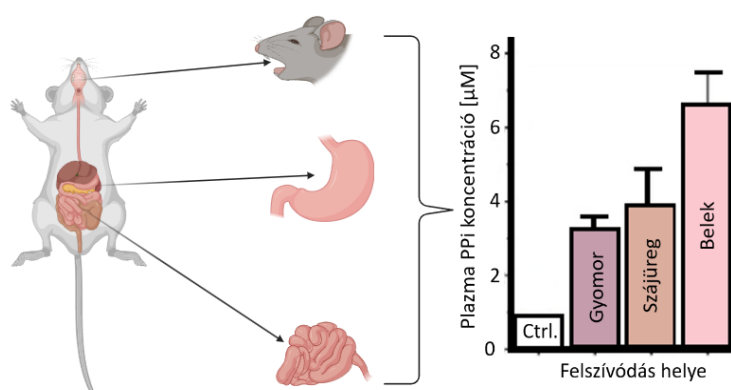
Enpp1 knockout egérmodell: Létezik egy olyan egértörzs, amelyben az *Enpp1* fehérjét kódoló gén pontmutációja következtében egy rövidebb, így az ATP hasítására képtelen fehérje jön létre [17] Ezeknél az egereknél a GACI betegekhez hasonlóan már nagyon hamar jelentkeznek az ektópikus meszesedési tünetek. Az ízületekben is erőteljes mészlagerakódás figyelhető meg, pár hónapos korukra az állatok ujjainak ízületei annyira meszesek, hogy nem tudják rendesen behajlítani az ujjukat, ezért “*tiptoe walking*” (*ttw*), azaz lábujjhegyen járó egereknek is szokták őket nevezni [18] A plazma pirofoszfát szintje az *Enpp1*-/- egerekben is nagyon alacsony, ugyanúgy, mint GACI betegekben [15].

Pirofoszfát felszívódása

Az 1960-as években állapították meg először a PP_i ektópikus mineralizációt gátló hatását, amely a képződő hidroxipatit kristályok növekedését blokkolja [19]. A kutatás célja a kalcium-foszfát kristályok jellemzőinek vizsgálata volt. Az egyik fontos felfedezés az volt, hogy a plazma és vizelet kis mennyiségben szervesen pirofoszfátot tartalmaz, ami jelentősen gátolja a kalcium-foszfát kristályok kicsapódását *in vitro*. Ez azt sugallta, hogy a pirofoszfát fontos élettani szabályozója lehet a meszesedésnek [20]. Ezt követően különböző állatkísérletekben kimutatták, hogy a PP_i hatékonyan ellensúlyozza a kalcifikációt, miután intraperitoneális injekció formájában rendszeresen kezelték az állatokat: patkányokon végzett kísérleteknél sikerült megakadályozni az érlemeszesedést, *Abcc6*-/- egereknél pedig a PXE kalcifikációs jelenségeit gátolták [21], [22] Az injekciós kezelés azonban hosszú távon nem optimális, előnyösebb a szájon át történő alkalmazás. A pirofoszfátról sokáig azt gondolták, hogy szájon át alkalmazva sajnos nem szívódik fel, mert a belekben lévő mikróbák alkalikus foszfatáz aktivitásának következtében még a bélrendszerben lebomlik, és foszfát formájában kiürül. Az utóbbi években azonban sikerült kidolgozni egy olyan módszert, amely a keringésben lévő pirofoszfát sokkal érzékenyebb és precízebb mérését teszi lehetővé [5] Ezt a módszert alkalmazva a TTK kutatócsoportja igazolta, hogy a szájon át bejuttatott PP_i kis mértékben ugyan (<1%), de felszívódik mind egér, mind humán szervezetben. [15].

Ezt követően egereken tesztelték az emésztőrendszer különböző területein történő felszívódás mértékét. Ehhez a PP_i -t közvetlenül a szájüregbe, gyomorba, valamint a vékonybélbe juttatták. A PP_i minden vizsgált területről felszívódott (**3. ábra**). A vizsgálatokat *Abcc6*-/-, illetve *Enpp1*-/- egér modelleken is sikeresen elvégezték [23]. Az *Abcc6*-/- egerek a PXE betegek, míg az *Enpp1*-/- egerek a GACI betegek tüneteit rekonstruálják. Az egér kísérleteket követően egészséges önkéntesek bevonásával a szájon át beadott tetrasodium-pirofoszfát (Na_4PP_i) só

emberekben történő felszívódását is igazolták. Az elfogyasztott Na_4PP_i mennyisége az egészségügyi Világszervezet (WHO) által közzétett maximálisan tolerálható napi bevitel 13-33%-a volt. Ez a dózis jelentősen megemelte a plazma PP_i szintet, káros mellékhatások megjelenése nélkül. Ezek az eredmények lehetővé teszik a további vizsgálatokat az orálisan alkalmazott PP_i terápiás kezelés felé.



3. ábra PP_i felszívódása egerekben

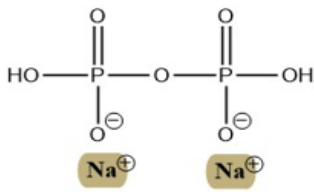
Az első kísérletekben alkalmazott $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ elég magas ion terhelést jelent a szervezetnek, a túl sok nátrium rizikófaktor többek között a magas vérnyomás és szívelégtelenség kialakulásához. Ezért a nátrium mennyiségének csökkentése érdekében a további vizsgálatokat $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ vegyülettel végeztük, ezzel felére csökkentve a nátrium terhelést. A mellékhatások minimalizálása miatt célszerű lenne nátrium mentes alternatívák bevonása is. Egy olyan sóforma, amely stabilabb, tovább marad a keringésben, és/vagy jobban felszívódik, lehetővé tenné a kisebb dózis alkalmazását.

Pirofoszfátsók bemutatása

Vizsgálataink során 4 pirofoszfát sóforma hatékonyságát teszteltük. A kereskedelmi forgalomban kapható $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PPi}$ mellett a Pyrogenyx cég előállított további három pirofoszfát sóformát, amelyet egy együttműködés keretében a rendelkezésünkre bocsátott, és mi elvégeztük a PPi sók felszívódási és *in vivo* funkcionális vizsgálatát.

$\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$

A dinátrium-pirofoszfát vagy nátriumsav-pirofoszfát egy szervesetlen vegyület, amelynek kémiai képlete $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$. Nátrium-kationokból (Na^+) és dihidrogén-pirofoszfát anionokból ($\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7^{2-}$) áll. Fehér, vízben oldódó, szilárd anyag, amely puffer- és kelátképző anyagként szolgál, számos alkalmazása van az élelmiszeriparban. Vízből kristályosítva hexahidrátot képez, de szobahőmérséklet felett dehidratálódik. A pirofoszfát egy többértékű anion, amely többértékű Lewis-bázisként működik, ezért nagy affinitással rendelkezik a többértékű kationokhoz (pl. a Ca^{2+}). [24], [25]

Fizikai tulajdonságok	
$\text{Na}_2\text{H}_2\text{PPi}$ 	
Olvadáspont:	>600°C
Molekula tömeg	221,94 g/mol
Sűrűség:	1,1-1,3 g/cm ³
Megjelenés:	fehér por
Szag:	szagtalan

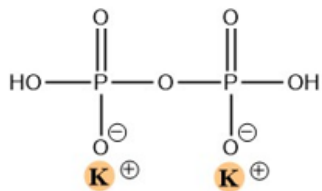
Na-ion és a kalcifikáció kapcsolata

A nátrium alapvető tápanyag, amely részt vesz a normál sejthomeosztázis fenntartásában, a folyadék- és elektrolit-egyensúly, valamint a vérnyomás szabályozásában [26].

A nátriumion létfontosságú szerepet játszik a csontok mineralizációjában és a sejtek tapadásában, és 0,5-1 tömegszázalékban van jelen a biológiai apatitokban. [27]

K₂H₂P₂O₇

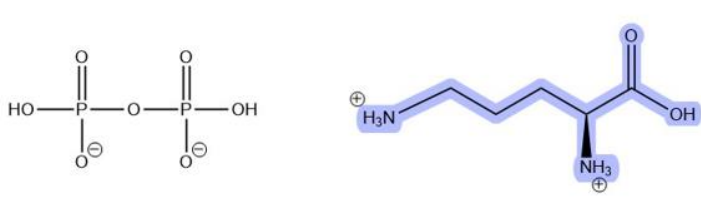
A csökkent étrendi káliumbevitelt összefüggésbe hozták olyan szív- és érrendszeri betegségekkel, mint a magas vérnyomás és a véletlen stroke, bár a mögöttes molekuláris mechanizmusok még mindig nagyrészt ismeretlenek. Egereken kimutatták, hogy a csökkentett étrendi kálium (0,3%) elősegíti az érlemeződést és növeli az aorta merevségét, összehasonlítva a normál (0,7%) káliummal táplált egerekkel. Ezzel szemben a megnövelt étrendi kálium (2,1%) mérsékelte az érlemeződést és az aorta merevségét. Ezek alapján a K₂H₂PPi sóforma - a pirofoszfát előnyös hatásai mellett - a kálium tartalom miatt különösen ígéretes terápiás szer lehet[28].

Fizikai tulajdonságok	
K₂H₂PPi 	
Molekula tömeg	254,1558 g/mol
Megjelenés:	fehér por
Szag:	szagtalan

Monolizin-H₂P₂O₇

Ezen sóforma esetében egy aminosavval helyettesítjük a nátriumot. A központban ebben az esetben is a PP_i van, viszont önmagában az L-Lizin is rendelkezik meszesedés gátló hatással, amely fokozhatja a vegyület hatékonyságát. A lizint az emlősök nem tudják szintetizálni. A lizin fő szerepe a fehérjeszintézisben való részvétel. A katabolizmusa elsősorban a májban zajlik. Az L-lizin egy bázikus aminosav, amelyet egy aminocsoport jelenléte jellemez a 4 szénatomos alifás oldallánc [-(CH₂)⁴NH₃⁺] végén. Ez a szerkezet a lizint viszonylag reaktív komponenssé teszi különböző kémiai reakciókban. [29]

A BioMed Research International az étrendi lizin és az artériás meszesedés kapcsolatát vizsgáló nemzetközi tanulmányában kimutatta, hogy az L-lizin javítja a vaszkuláris meszesedést adenin-indukált urémiás patkányokban. Az étrendi L-lizin megemelte a plazma alanint, prolint, arginint és homoarginint [29].

Fizikai tulajdonságok	
Monolisin-H₂PPi 	
Molekula tömeg	323,15 g/mol
Megjelenés:	fehér por
Szag:	szagtalan

Monoarginin-H₂P₂O₇

Az L-arginin egy aminosav, amely természetesen megtalálható a vörös húspanban, baromfiban, halban és tejtermékekben. A fehérjék előállításához szükséges. Az L-arginin fontos szerepet játszik a szervezet anyagcseréjében. A fehérjék és más nagy biológiai jelentőségű molekulák, köztük a nitrogén-monoxid, az ornitin, a poliaminok, az agmatin, a prolin, a glutamát, a kreatin, a dimetil-arginin és a karbamid szintézisének prekursora. A nitrogén-monoxid hatására az erek szélesebbre nyílnak a jobb véráramlás érdekében. Emellett serkenti a növekedési hormon, az inzulin és más anyagok felszabadulását is a szervezetben [30], [31]

A nitrogén-monoxid (NO) egy többfunkciós hírvivő molekula, L-argininből a nitrogén-monoxid szintázoknak (NOS) nevezett enzimek csoportja szintetizálja. A NO szerepet játszik többek között az értágulat, a gyulladás és a csontanyagcsere szabályozásában. Az alkalikus foszfatáz (ALP) szükséges a csontok és porcok mineralizációjához. Korábban egy *in vivo* patkánymodellben beszámoltak arról, hogy az NO a patkány csonttörések gyógyulásának fontos szabályozója. Ez a tanulmány az NO-nak az alkalikus foszfatáz (ALP) aktivitására gyakorolt hatását vizsgálta. A patkány combcsonttörés során NOS-t expresszáltak szinkronban az ALP aktivitással. A NOS szisztémás gátlása rontotta a törések gyógyulását, míg a NO-val történő kiegészítés fokozta a törések gyógyulását. Ez a tanulmány első alkalommal szolgáltatott bizonyítékot arra vonatkozóan, hogy az NO részben az ALP-aktivitás szabályozásával modulálhatja a törések gyógyulását. Ebből adódóan az arginin jelenléte mellett a NO révén NOS szintetizálódik, amely csökkenti az ALP aktivitását. Mivel az ALP bontja a meszesedést gátlásáért felelős PPI-t, az arginin indirekt módon az ALP aktivitás csökkentése révén hozzájárulhat a meszesedés gátlásához is [32]

Az *in vitro* elemzések kimutatták, hogy az alanin és a prolin gátolja a tenyésztett vaszkuláris simaizomsejtek apoptózisát, és hogy az arginin és a homoarginin gyengíti az ásványi kicsapódásokat túltelített kalcium/foszfát oldatban [33]

Fizikai tulajdonságok	
Monoarginin-H₂PPi	
Molekula tömeg	350,16 g/mol
Megjelenés:	fehér por
Szag:	szagtalan

Célkitűzés

Kutatócsoportunk meszesedési rendellenességek egér modelljeivel foglalkozik, és egyik kutatási területünk az ektópikus meszesedés molekuláris hátterének vizsgálata, ezen belül a pirofoszfát kezelés, mint esetleges meszesedést gátló terápia preklinikai tesztelése.

Korábbi kísérleti eredmények alapján a dinátrium-pirofoszfát sóforma hatékonyan megelőzte az ektópikus meszesedés kialakulását egérben, és a csoport tesztelte további három pirofoszfát sóforma felszívódását szájon át történő beadás után.

Dolgozatomban ezeknek a sóformáknak az *in vivo* meszesedést gátló hatását vizsgáltam egerekben.

Célkitűzéseim az alábbiak voltak:

- A szájon át történő kezeléshez használható hatékony dózis meghatározása
- A négyféle pirofoszfát sóforma meszesedést megelőző hatásának megállapítása

Módszertan

Pirofoszforsav-sók szintézise

A vizsgálataink során négy különböző pirofoszfát sóformát használtunk: a kereskedelmi forgalomban kapható $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ sót (Sigma Aldrich, 71501-100G), illetve három másik PP_i - származékot, amelyeket a Pyrogenyx amerikai partnercégünk állított elő az alábbiak szerint:

A sóképzési reakciókhoz a Sigma Aldrich cégtől származó technikai minőségű pirofoszforsav lett felhasználva. A szilárd pirofoszforsavat viszkózus folyadékréteg borította, amelyet közvetlenül a reakciólombikba helyezés előtt egy Kimwipe-pal eltávolítottak. A sók tisztasága a NMR segítségével került meghatározásra. Az egyetlen kimutatható szennyeződés a foszfát volt. Magasabb polifoszfát szennyeződés nem volt észlelhető jelentős mennyiségben a sókban. A Karl Fischer titrálást, az elemi mikroanalízist és az ICP-OES méréseket a Robertson Microlit analitikai labor végezte (Ledgewood, NJ).

A szintézisek menete az alábbi protokoll szerint ment végbe:

$\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$

A pirofoszforsavat tartalmazó lombikot jégfürdőn hűtötték, majd előhűtött 1N KOH- al kezelték. Az elegyet 20 percig kevertették, amíg a szilárd pirofoszforsav feloldódott. Ezt követően lassan metanolt adtak hozzá, amíg csapadék nem képződött. A lombikot egy éjszakán át 4°C-on tárolták. A kapott szilárd anyagot vákuumszűréssel egy üvegfrites szűrőn összegyűjtötték, majd hideg metanol(70%-os)/DI vízzel, majd acetonnal átmosták. Ezt követően nagyvákuumban szárították. Így fehér, szilárd végterméket (98,6 %-os tisztaság) kaptak [34].

Mono(L)-lizin-pirofoszfát

A pirofoszforsavat tartalmazó lombikot jégfürdőn hűtötték, majd (L)-lizin oldatával kezelték DI vízben. Az elegyet 20 percig kevertették, amíg a szilárd pirofoszforsav feloldódott. Ezt követően $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ vegyülethez hasonlóan jártak el. A szintézis során fehér, szilárd végtermék (97,1 %-os tisztaság) képződött[34].

Mono(L)-arginin-pirofoszfát

A pirofoszforsavat tartalmazó lombikot ebben az esetben is jégfürdőn hűtötték, ezt (L)-lizin oldatával való kezelés követte DI vízben. Az elegyet a pirofoszforsav feloldódásáig kevertették, majd acetont adtak hozzá csapadékképződésig. Ezt vákuumszűrés és átmosás követte. Az előállított szilárd anyagot ismét hűtötték, majd metanollal újra elvégezték az említett eljárásokat. A folyamatok végén fehér szilárd anyag keletkezett (99,6%-os tisztaság)[34].

Egérkísérletek

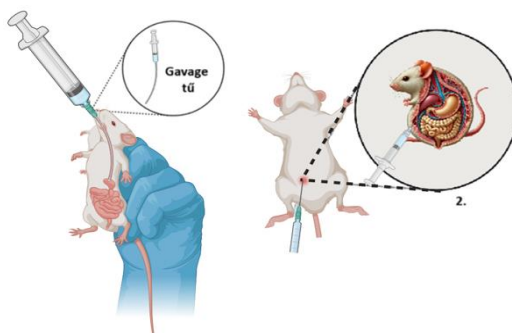
Az egérkísérletek elvégzéséhez szükséges engedélyt az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács megadta. (*Engedély száma: PE/EA/748-2/2021.*)

Hatóanyag szervezetbe juttatása

A gyógyszereket leginkább *per os* formában alkalmazzák humán betegek esetén. Ez egy egyszerű és kényelmes módszer. A felszívódás viszont függ a tápcsatorna aktuális állapotától és működésétől, valamint az emésztőnedvek pH-jától.

Állatkísérleteknél a hatóanyag orális úton történő szervezetbe juttatása történhet ivóvízhez vagy táplálékba keveréssel, vagy gyomorszondával (gavage). Az utóbbi technika egy ún. gavage tű segítségével valósítható meg, melyet a **4. ábra** szemléltet. A módszer lehetővé teszi a hatóanyag pontos mennyiségének beadását, közvetlenül a gyomorba. A gyomorban a lipidoldékony, nem ionizált molekulák felszívódása valósul meg. A hatóanyag a gyomorból a vékonybélbe áramlik.

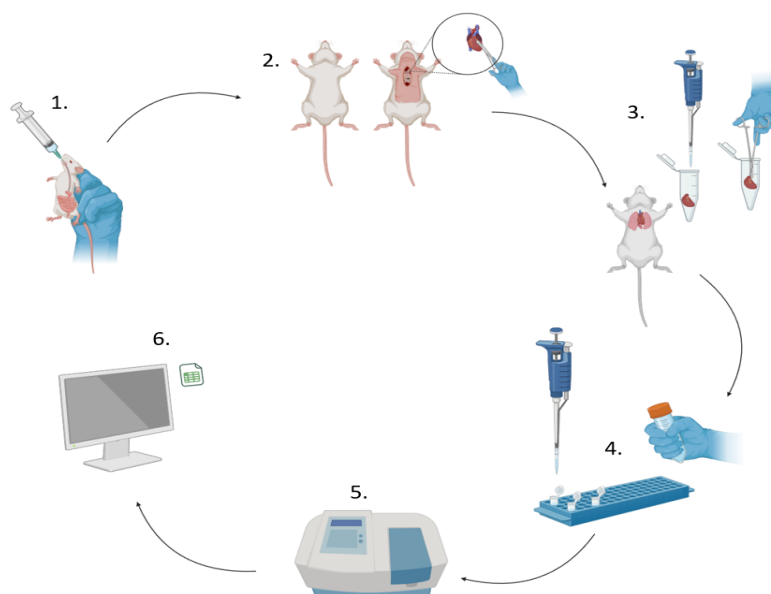
Egy másik beadási módszer a hatóanyag hasüregbe (intraperitoneális üreg) injektlása. A fizikai kellemetlenség miatt humán alkalmazásra kevésbé preferált, azonban általában sokkal hatékonyabb felszívódást eredményez. Én a kísérletek során a gavage és az intraperitoneális injekció technikákat alkalmaztam.



4. ábra *Hatóanyag beadásának módszerei*

Meszesedés indukálása fagyasztásos sérüléssel

Korábbi TDK kutatásom során vizsgáltam, hogy az *Abcc6*^{-/-} egerek neme és életkora befolyásolja-e az akut meszesedés mértékét. Eredményeim azt mutatták, hogy nincs szignifikáns különbség a hím és nőstény, illetve a fiatal és idős egerek akut meszesedése között, de érdekes módon megfigyelhető volt a modell optimalizálásakor, hogy a nőstényeknél a szórás mértéke lényegesen magasabb volt, mint a hímeknél[35]. Ezen eredményekre alapozva jelenlegi vizsgálataimat hím egereken végeztem.



5. ábra Szívfagyasztásos eljárás folyamata

Az **5. ábra** által szemléltetett szívfagyasztásos műtét elvégzéséhez az *Abcc6*^{-/-} egereket elaltattuk (30 mg/kg tiletamin/zolazepam, 12,5 mg/kg xilazin és 3 mg/kg butorfanol). Előzetes felszívódási eredményeink alapján a pirofoszfáttal kezelt egerek a hatóanyagot 10 perccel a fagyasztásos sérülés elvégzése előtt kapták. A beavatkozás részletes leírása a BSc szakdolgozatomban olvasható [35]. Az eljárásakor az altatott állat hasa középvonalban felnyitásra került. A máj bal lebenyét óvatosan oldalra toltuk, hogy a dobogó szív láthatóvá váljon a rekeszizmon keresztül. Egy tompa, folyékony nitrogénben előhűtött acélrudat 10 másodpercig a rekeszizomra nyomtunk, ezzel megfagyasztva a szívizom egy kis területét. Ezután a hasüreget összezártuk. A szívizomsérülést követően további három napon át az egerek napi egyszer PPI-sót kaptak gavage formájában. A szívfagyasztást követő 5. napon az egereket nyaki diszlokációval (cervical dislocation) termináltuk. Feltárás után a szíveket eltávolítottuk, majd a további vizsgálat típusától függően vagy előhűtött 2-metil-bután oldatban fagyasztottuk

le és a metszetek készítéséig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk, vagy átmostuk foszfát-pufferelt sóoldattal és súlyuk lemérése után a kalcium tartalom meghatározásáig $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

A szívizom meszesedésének meghatározása

A) A meszesedés detektálása immunhisztokémiai (IHC) módszerrel

A szívizom sérülésének és az esetlegesen kialakuló meszesedés vizsgálatának céljából a fagyasztott szívmintákból metszeteket készítettünk, azokat Alizarin Red S festékekkel megfestettük és mikroszkóppal analizáltuk az alábbiak szerint:

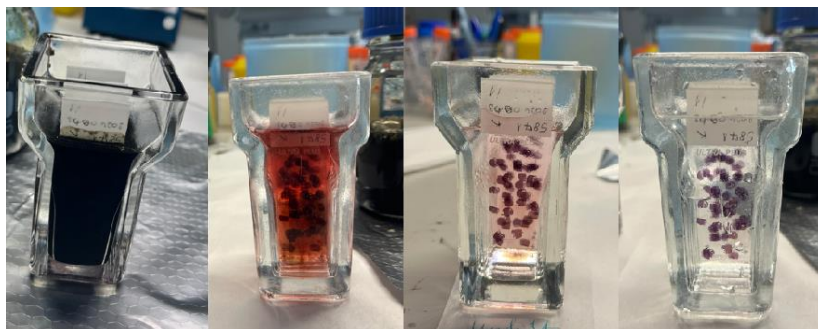


6. ábra IHC mérések folyamata

A **6. ábra** szerint első lépésben a $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra állított cryomicrotom készülékben $10\text{ }\mu\text{m}$ vastagságú metszeteket készítettünk a fagyasztott szívminták azon részéből, ahol a sérülést okoztuk. A metszeteket tárgylemezre helyeztük, majd 5 percre hideg metanolban fixáltuk. Az 5 perc letelte után szobahőmérsékleten PBS-ben mostuk a mintákat.

Második lépésben megfestettük a mintákat Alizarin Red S festékekkel, amely a szövetekben lévő kalciumhoz kötődve vörösre festi a meszes területeket. Az Alizarin Red S festék oldatának elkészítéséhez 4 g Alizarin Red S festékeport mértünk ki. Ezt felhígítottuk 200 ml desztillált vízzel, majd homogenizáltuk. Ahhoz, hogy a szövet megfestése megfelelő legyen, az oldat pH-ját $4,1$ - $4,3$ közé szükséges beállítani. Kezdetben $2,22$ volt a téglavörös színű oldat pH-ja, majd $0,5\%$ -os ammónium-hidroxid fokozatos adagolásával $4,11$ -re állítottuk. Ekkor az oldat színe mocsárzöldre változott. Alizarin alkalmazásakor a tárgylemezeket $0,5$ - 5 perc közötti időtartamra szükséges a festékbe helyezni. Esetünkben ez 3 percre tartott, ez idő alatt a minták erőteljes lila színt vettek fel. Majd mintáimat addig mostam desztillált vízben, amíg a víz

áttetszővé nem vált. Ez 3x-os átlósítást jelentett. Az egyes áttátások során bekövetkezett változásokat a **7. ábra** szemlélteti.



7. ábra Szövetminták megfestése, és átlósítása

A harmadik lépésben leittattuk a fentmaradt folyadékot a tárgylemezekről, hogy felületük teljesen száraz legyen a lefedéskor. A fedőlemezre DPX beágyazó médiumot pipettáztunk (Sigma Aldrich, 06522-100ML), majd lefedtük a szövetmintákat.

Utolsó lépésben mikroszkópos képalkotást végeztünk. A metszetekről C PLAN 4x/0.1 objektívvel ellátott Leica DMLS mikroszkóppal készítettünk képeket. A felvételek CCD kamerával lettek elkészítve NIS (Nikon, Imaging source) program (5.21.02 verzió) használatával. Ez a módszer azonban nem teszi lehetővé a kalcium mértékének pontos meghatározását, emiatt kvantitatív vizsgálatokat is végeztünk.

B) A szívizom kalcium tartalmának kvantifikálása kolorimetriás módszerrel

Az akut meszesedés során kialakult hidroxipatit kristály Ca^{2+} tartalmának kvantitatív méréséhez a szívekhez 200 μl 0,15 N HCl oldatot pipettáztunk, a szövetet sebészeti olló segítségével felaprítottuk, majd 48 órán keresztül 25 °C-on inkubáltuk a kalcium kioldódása céljából. 48 óra elteltével a Stanbio Calcium Liquicolor kit segítségével határoztuk meg a minták Ca^{2+} tartalmát: mixer oldatot készítettünk Total Calcium Base Reagent (Cat.No.0152) és Total Calcium Color Reagent (Cat.No.0151) reagensekből, 1:1 arányban. Elkészítettük a kalibrációs sort (0; 2,5; 5; 10; 20 μl) Total Calcium Standard (10mg/dl) (Cat.No.0153) hozzáadásával az 1 ml reagenshez. A szívizom mintákat 1300g-n 10 percig centrifugáltuk majd a felülúszókból 10-10 μl -t mértünk 1-1 ml mixeroldathoz. Az oldatok OCDC indikátort tartalmaznak. Ez egy olyan kalcium kelátor, amely a karbonsav oldalláncával köti meg a kalciumot komplexképzés közben. A reakciót lila szín jelzi, a szín intenzitása egyenesen arányos a minta kalcium tartalmával. A mintaelőkészítést követően spektrometriás mérést végeztünk, ahol a minták abszorbanciáját a lila színből adódóan 550 nm-en kvantifikáltuk. A

kalibrációs sorozat tagjaira egyenest illesztettem, amely alapján meghatároztam mintáim pontos kalcium tartalmát. Statisztikai analízis

A statisztikai elemzéshez a Prism 6 programot használtam. A mintákon kétmintás t-próbát végeztem. A diagramokon feltüntetett hibasávok a standard szórást, a csillagok pedig szignifikanciát és annak megbízhatósági fokát jelölik: $p < 0,05$: *,

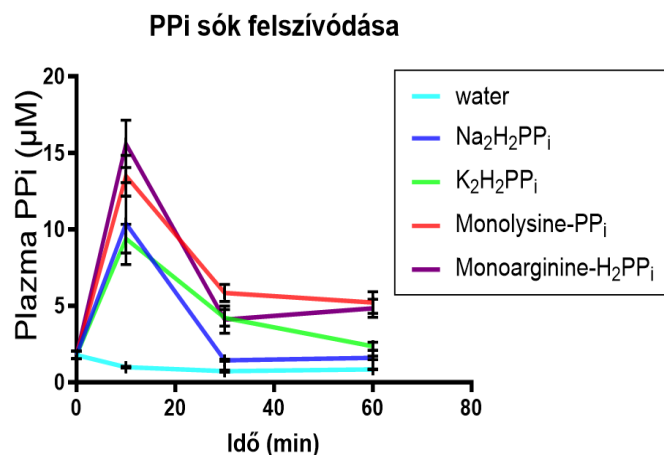
Szerzői hozzájárulás

Alulírott Kutás Adriána nyilatkozom, hogy a benyújtott „*Pirofoszfát sók, mint lehetséges meszesedést megelőző gyógyszerek in vivo tesztelése*” című dolgozatomban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

- Az egerek farkán lévő jelölést én készítettem, súlyukat lemértem, majd dokumentáltam
- Az altatási folyamatokban részben vettem részt
- A PPI-sókat én adtam be gavage módszerrel az egereknek
- A szívfagyasztási műtétnél részben vettem részt, ugyanis magát a fagyasztást csak erre képzett operátor végezheti el, aki tudásáról és pszichológiai állapotáról rendszeresen vizsgát tesz.
- A sebvarrási folyamatokat én végeztem.
- A feltérési folyamatokat, és a szívek eltávolítását saját kezűleg láttam el
- A kalciumméréshez szükséges eljárásokat magam végeztem, majd a spektrofotometriás mérést és az ehhez tartozó oldatok elkészítését is én láttam el
- Az IHC méréshez a mintákat én készítettem elő, illetve az alizarin festéket is
- Minden dokumentációs folyamat és a kiértékelések teljes mértékben hozzám köthetőek

Előzetes eredmények

A nátrium, kálium, monolizin és monoarginin mind a szervezetünkben előforduló természetes molekulák, ezért fiziológiás tartományban alkalmazva valószínűtlen a toxikus hatás fellépése. Viszont fontos kérdés, hogy képesek-e megfelelően felszívódni a szervezetben. A TTK kutatócsoportja 2022-ben tesztelte, hogy ezek a sóformák milyen kinetikával szívódnak fel és ürülnek ki a szervezetből [34]. Ehhez először egereken tesztelték az új PPi -sók felszívódását orális beadás mellett. Az állatokat 4 órán keresztül éhezítették, majd 39 mg/kg PPi ekvivalens dózisban kapták meg az egerek az adott sóformát. Vért vettek 10, 30 és 60 perc elteltével, és a mintákból megmérték a plazma PPi tartalmát. Az eredmények azt mutatták, hogy a $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ forma ugyanolyan jó felszívódást eredményezett, mint a korábban már alkalmazott $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$, a monoarginin- $\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ és a monolizin- $\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ pedig még magasabb plazma PPi koncentrációt és elnyújtottabb felszívódást eredményezett, mint a $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$. **(8. ábra)** A vizsgálatokat a $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ és $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ vegyületekkel embereken is elvégezték, a felszívódás hasonló eredményeket adott.



8. ábra PPi sók felszívódása egerekben

A kutatás konklúziója, hogy mivel mindhárom sóforma legalább olyan jól felszívódik, mint a $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PPi}$, alkalmasak lehetnek a $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PPi}$ helyettesítésére. Jelen kutatásomban tovább vizsgáltam ezeket a PPi sókat, hogy milyen mértékben képesek megakadályozni az ektópikus meszesedés kialakulását.

Eredmények

A szájon át beadható hatékony dózis meghatározása

Kísérleteimet *Abcc6*^{-/-} hím egereken végeztem, az ektópikus meszesedést a szívizom részleges fagyasztásával indukáltam.

Az akut meszesedést az alábbi kísérleti csoportokban vizsgáltam:

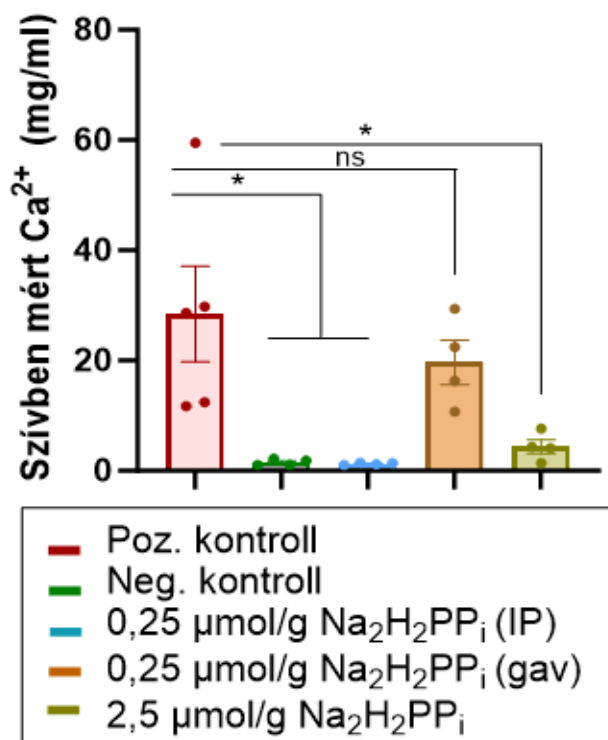
1. Pozitív kontroll: Szívfagyasztás elvégzése, nem kap PP_i kezelést
2. Negatív kontroll: Nem történik szívfagyasztás, nem kap PP_i kezelést
3. IP csoport: Szívfagyasztás elvégzése, $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PP}_i$ kezelés intraperitoneális injekció formájában, 0,25 $\mu\text{mol/g}$ dózisban
4. Alacsony gavage csoport: Szívfagyasztás elvégzése, $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PP}_i$ kezelés gavage formájában, 0,25 $\mu\text{mol/g}$ dózisban
5. Magas gavage csoport: Szívfagyasztás elvégzése, $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PP}_i$ kezelés gavage formájában, 2,5 $\mu\text{mol/g}$ dózisban

A csoport korábbi munkája alapján az már ismert volt, hogy a 0,25 $\mu\text{mol/g}$ dózisban, IP formában bejuttatott $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PP}_i$ hatékonyan gátolja a meszesedést. A szájon át alkalmazható dózisonál is ezt vettem alapul, azonban mivel a PP_i felszívódása a tápcsatornából alacsonyabb, mint a hasüregből, ezért egy magasabb (10-szeres) dózist is alkalmaztam.

Eredményeimet az **1. táblázat** és az **9. ábra** mutatja.

1. táblázat *Kontroll csoport és Na_2PP_i -vel kezelt (gavage, IP) egerek mérési eredményei*

Kezelési mód		Poz kontroll		Neg kontroll		0,25 umol/g Na ₂ PPi gavage		0,25 umol/g Na ₂ PPi IP	
Egérszám	Ca ²⁺ tartalom mg/ml	2561	28,6236	2565	1,8158	2566	22,4250	2631	1,3894
		2562	29,7537	2564	2,1478	2567	29,3486	2632	1,4320
		2563	11,7244	3155	1,0196	2511	10,6705	2931	1,1457
		5301	12,4100	3156	1,0478	1343	16,2817	2932	1,0574
		5341	59,5100	5342	2,1340	-	-	-	-
Szórás			19,3873		0,5631		8,0361		0,1829
Átlag			28,4043		1,6330		19,6815		1,2561



9. ábra Kvantitatív mérések eredményei (1. rész)

Az alacsonyabb dózisban alkalmazott, szájon át bejuttatott pirofoszfát valóban nem volt elegendő a meszesedés megakadályozásához, azonban a magasabb dózis hatékonyan megelőzte az akut meszesedés kialakulását, mellékhatások megjelenése nélkül. Ezért a továbbiakban a többi pirofoszfát sóformát is ebben a dózisban alkalmaztam.

Különböző pirofoszfát sók meszesedést gátló hatásának vizsgálata *in vivo*

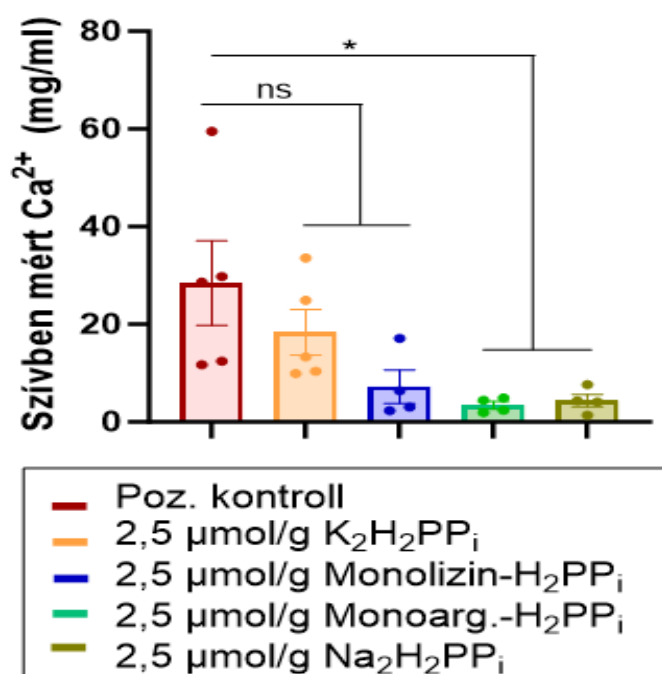
Az előző kísérlethez hasonlóan vizsgáltam az akut meszesedést további 3 csoportban:

1. $\text{K}_2\text{H}_2\text{PP}_i$ csoport: Szívfagyasztás elvégése, $\text{K}_2\text{H}_2\text{PP}_i$ kezelés gavage formájában, 2,5 $\mu\text{mol/g}$ dózisban
2. Liz- H_2PP_i csoport: Szívfagyasztás elvégése, Liz- H_2PP_i kezelés gavage formájában, 2,5 $\mu\text{mol/g}$ dózisban
3. Arg- H_2PP_i csoport: Szívfagyasztás elvégése, Arg- H_2PP_i kezelés gavage formájában, 2,5 $\mu\text{mol/g}$ dózisban

Eredményeimet a **2. táblázat** és a **10. ábra** mutatja.

2. táblázat Hatóanyaggal kezelt (gavage) egerek mérési eredményei

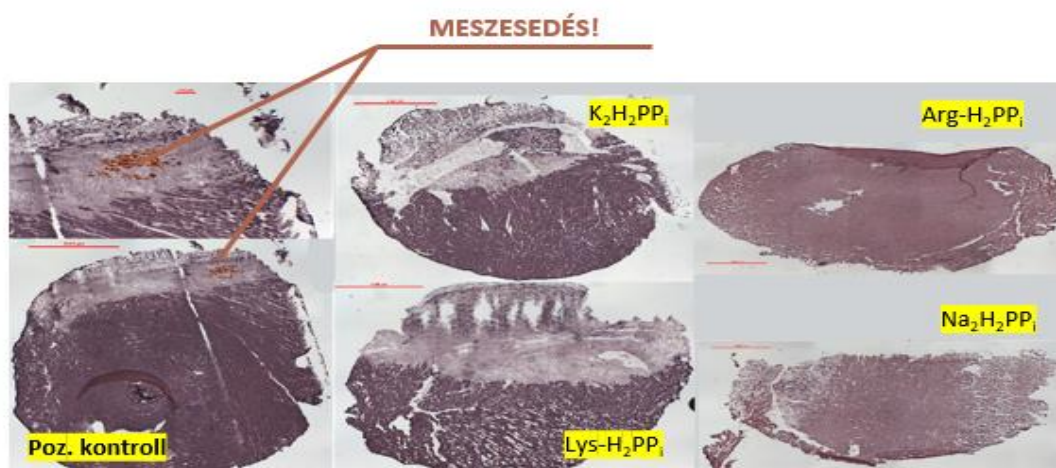
Kezelési mód		2,5 umol/g Na ₂ H ₂ PP _i gavage		2,5 umol/g K ₂ H ₂ PP _i gavage		2,5 umol/g LizH ₂ PP _i gavage		2,5 umol/g ArgH ₂ PP _i gavage	
Egér szám	Ca ²⁺ tartalom mg/ml	2641	4,1076	1341	33,5470	3152	6,3900	4014	4,9200
		2642	4,3118	1342	9,9050	4011	3,0100	4015	1,9100
		2644	7,6163	3158	10,3508	4012	17,1100	5403	2,3900
		5151	1,3638	3153	24,9100	5402	2,3000	5404	4,4000
		-	-	3983	13,2700	-	-	-	-
Szórás			2,5591		10,4293		6,8418		1,4777
Átlag			1,2561		18,3966		7,2025		3,4050



10. ábra Kvantitatív mérések eredményei (2. rész)

A kapott eredmények azt mutatják, hogy az Arg- H_2PP_i a $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PP}_i$ sóformához hasonlóan hatékonyan gátolta meszesedés kialakulását. A $\text{K}_2\text{H}_2\text{PP}_i$ és a Lizin- H_2PP_i esetében is látható csökkenés a meszesedés mértékében a pozitív kontrollhoz képest, azonban ez a változás nem szignifikáns.

A szívizomban kialakuló meszesedést Alizarin Red S festéssel is megvizsgáltuk (**11. ábra**).



11. ábra Szívmetszetek mikroszkópos képe

A pozitív kontroll mintán egyértelműen látszik a mészlerakódás (vörös foltok), azonban a kezelt egerekből kivett szív mintákban az általunk vizsgált metszeteken nem látható meszesedés. A vizsgálat során az egyes szívekről nagyságrendileg 50-70 metszet készült, melyek mindegyikét megfestettünk, majd mikroszkóp alatt vizsgáltuk. A pozitív kontroll esetében minden metszet meszesedést mutatott, míg a kezelt egerek szövetmintái egyikében sem volt megfigyelhető az erre utaló vörös szín. Ez a mérési módszer nagyon látványos, viszont pontos információt nem kapunk a kalcium tartalomról. A spektrofotometriás mérések viszont lehetővé tették az IHC mérések kiegészítését.

Konklúzió

A kísérletek során kapott eredményekből az alábbi következtetéseket vontuk le:

A $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PP}_i$ sóforma az IP beadás mellett 0,25 $\mu\text{mol/g}$ dózisban hatékonyan megakadályozza az akut meszesedés kialakulását, azonban szájon át történő alkalmazás esetén ennél nagyobb dózissra (2,5 $\mu\text{mol/g}$) van szükség a gátló hatás eléréséhez.

A szájon át beadott $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PP}_i$ és az ArgH_2PP_i hatékonyan gátolta az akut meszesedés kialakulását. A $\text{K}_2\text{H}_2\text{PP}_i$ és $\text{Li}_2\text{H}_2\text{PP}_i$ sóformák, annak ellenére, hogy korábbi eredmények alapján jó felszívódást mutattak szájon át való alkalmazáskor, nem csökkentették szignifikánsan a meszesedés mértékét.

Az immunhisztokémiai vizsgálatok során a pozitív kontroll minta esetében várakozásainknak megfelelően találtunk mészlérakódásokat. A pirofoszfáttal kezelt szívmetszeteken nem láttunk meszesedést, azonban elképzelhető, hogy a szív más területein előfordult mészlérakódás. Az IHC technika hátránya, hogy nem alkalmas a meszesedés kvantitatív meghatározására, ezért végeztünk kvantitatív meghatározást is.

Összességében az *in vivo* meszesedési eredmények alapján a $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PP}_i$ és az ArgH_2PP_i ígéretes terápiás szernek bizonyult.

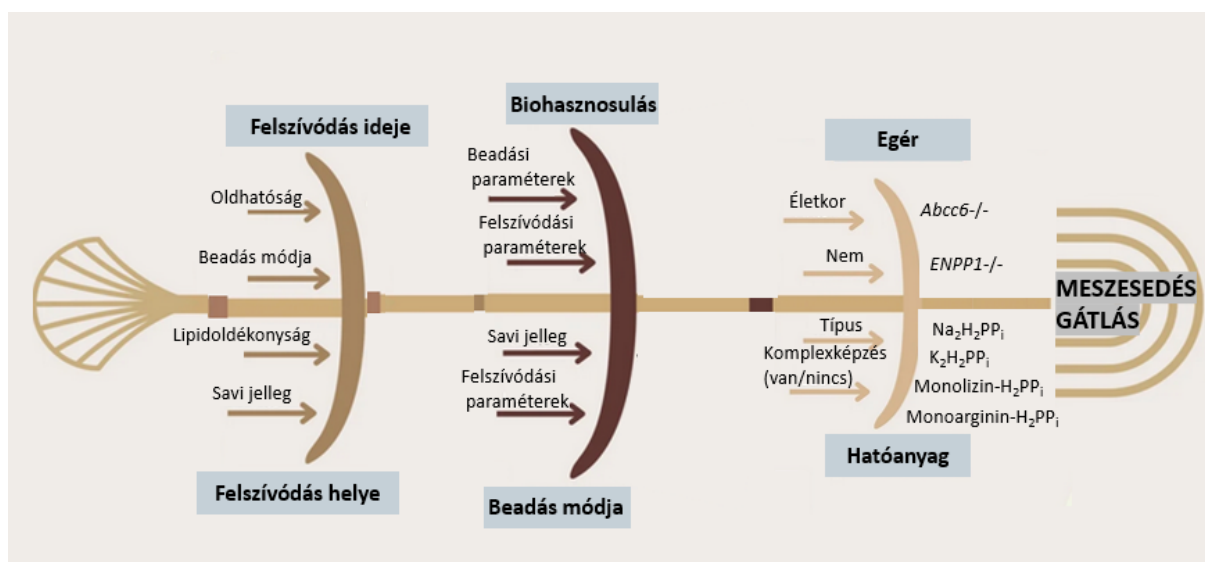
2024. januárjában elindult egy klinikai kipróbálás Franciaországban PXE betegek bevonásával, akik $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PP}_i$ terápiát kapnak (NCT04868578). Dolgozatom eredményei alapján az ArgH_2PP_i sóforma is ígéretesnek tűnik, és esetleg a jövőben szintén alkalmas lehet klinikai kipróbálás indítására, hiszen előnye, hogy ki tudnánk küszöbölni a szervezet felesleges nátrium terhelését.

Jövőbeli tervek

Tervezzük növelni a kísérleti elemszámot, ezáltal kisebb szórás mellett egyértelműbb eredményeket kaphatunk.

Tervezem elvégezni a négyféle pirofoszfát sóforma kémiai karakterizálását, amely magyarázatot adhat a felszívódásban és a funkcionális hatásban tapasztalt különbségekre.

A **12. ábra** egy ok- okozati, ún. halszáлка diagramot szemléltet. Ez a módszer segítséget nyújt az elérni kívánt célt befolyásoló tényezők rendszerezésében és áttekinthetővé tételében. Összefoglalja azon paramétereket, amelyek egyértelműen befolyásolják a mérések végeredményét. Az ábra 6 fő szegmenst emel ki, amelyek optimalizálása elengedhetetlen a későbbi klinikai alkalmazásokhoz. A közel jövőben a felszívódás és a beadás módjával kapcsolatok paramétereket kívánjuk meghatározni a kémiai karakterizálás keretein belül.



12. ábra Ok- okozati diagram

Irodalomjegyzék

- [1] O. Le Saux *et al.*, "Mutations in a gene encoding an ABC transporter cause pseudoxanthoma elasticum," *Nat Genet*, vol. 25, no. 2, pp. 223–227, Jun. 2000, doi: 10.1038/76102.
- [2] A. A. B. Bergen *et al.*, "Mutations in ABCC6 cause pseudoxanthoma elasticum," *Nat Genet*, vol. 25, no. 2, pp. 228–231, Jun. 2000, doi: 10.1038/76109.
- [3] V. Pomozi *et al.*, "ABCC6 is a basolateral plasma membrane protein," *Circ Res*, vol. 112, no. 11, May 2013, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.300194.
- [4] F. Rutsch *et al.*, "PC-1 nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency in idiopathic infantile arterial calcification," *Am J Pathol*, vol. 158, no. 2, pp. 543–554, 2001, doi: 10.1016/S0002-9440(10)63996-X.
- [5] R. S. Jansen *et al.*, "ABCC6 prevents ectopic mineralization seen in pseudoxanthoma elasticum by inducing cellular nucleotide release," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 110, no. 50, pp. 20206–20211, Dec. 2013, doi: 10.1073/PNAS.1319582110.
- [6] R. S. Jansen *et al.*, "ABCC6-mediated ATP secretion by the liver is the main source of the mineralization inhibitor inorganic pyrophosphate in the systemic circulation-brief report," *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 34, no. 9, pp. 1985–1989, 2014, doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304017.
- [7] Q. Li *et al.*, "Mutations in the ABCC6 gene as a cause of generalized arterial calcification of infancy: genotypic overlap with pseudoxanthoma elasticum," *J Invest Dermatol*, vol. 134, no. 3, pp. 658–665, 2014, doi: 10.1038/JID.2013.370.
- [8] Y. Nitschke *et al.*, "Generalized arterial calcification of infancy and pseudoxanthoma elasticum can be caused by mutations in either ENPP1 or ABCC6," *Am J Hum Genet*, vol. 90, no. 1, pp. 25–39, Jan. 2012, doi: 10.1016/J.AJHG.2011.11.020.
- [9] D. Lowe, T. Sanvictores, M. Zubair, and S. John, "Alkaline Phosphatase," *StatPearls*, Oct. 2023, Accessed: Nov. 13, 2024. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459201/>
- [10] T. G. M. F. Gorgels *et al.*, "Disruption of Abcc6 in the mouse: novel insight in the pathogenesis of pseudoxanthoma elasticum," *Hum Mol Genet*, vol. 14, no. 13, pp. 1763–1773, Jul. 2005, doi: 10.1093/HMG/DDI183.
- [11] J. F. Klement *et al.*, "Targeted ablation of the abcc6 gene results in ectopic mineralization of connective tissues," *Mol Cell Biol*, vol. 25, no. 18, pp. 8299–8310, Sep. 2005, doi: 10.1128/MCB.25.18.8299-8310.2005.
- [12] C. Brampton *et al.*, "ABCC6 deficiency promotes dyslipidemia and atherosclerosis," *Sci Rep*, vol. 11, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1038/S41598-021-82966-Y.
- [13] R. S. Jansen *et al.*, "ABCC6-mediated ATP secretion by the liver is the main source of the mineralization inhibitor inorganic pyrophosphate in the systemic circulation-brief report," *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 34, no. 9, pp. 1985–1989, 2014, doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304017.
- [14] Z. Aherrahrou *et al.*, "An alternative splice variant in Abcc6, the gene causing dystrophic calcification, leads to protein deficiency in C3H/He mice," *J Biol Chem*, vol. 283, no. 12, pp. 7608–7615, Mar. 2008, doi: 10.1074/JBC.M708290200.

- [15] D. Dedinszki *et al.*, “Oral administration of pyrophosphate inhibits connective tissue calcification,” *EMBO Mol Med*, vol. 9, no. 11, p. 1463, Nov. 2017, doi: 10.15252/EMMM.201707532.
- [16] V. Pomozi *et al.*, “Functional Rescue of ABCC6 Deficiency by 4-Phenylbutyrate Therapy Reduces Dystrophic Calcification in Abcc6-/- Mice,” *J Invest Dermatol*, vol. 137, no. 3, pp. 595–602, Mar. 2017, doi: 10.1016/J.JID.2016.10.035.
- [17] A. Okawa, I. Nakamura, S. Goto, H. Moriya, Y. Nakamura, and S. Ikegawa, “Mutation in Npps in a mouse model of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine,” *Nat Genet*, vol. 19, no. 3, pp. 271–273, 1998, doi: 10.1038/956.
- [18] Q. Li, H. Guo, D. W. Chou, A. Berndt, J. P. Sundberg, and J. Uitto, “Mutant Enpp1asj mice as a model for generalized arterial calcification of infancy,” *Dis Model Mech*, vol. 6, no. 5, pp. 1227–1235, Sep. 2013, doi: 10.1242/DMM.012765.
- [19] H. Fleisch and S. Bisaz, “Mechanism of calcification: inhibitory role of pyrophosphate,” *Nature*, vol. 195, no. 4844, p. 911, 1962, doi: 10.1038/195911A0.
- [20] H. Fleisch, R. G. G. Russell, and F. Straumann, “Effect of pyrophosphate on hydroxyapatite and its implications in calcium homeostasis,” *Nature*, vol. 212, no. 5065, pp. 901–903, 1966, doi: 10.1038/212901A0.
- [21] W. C. O’Neill, K. A. Lomashvili, H. H. Malluche, M. C. Faugere, and B. L. Riser, “Treatment with pyrophosphate inhibits uremic vascular calcification,” *Kidney Int*, vol. 79, no. 5, pp. 512–517, 2011, doi: 10.1038/KI.2010.461.
- [22] V. Pomozi *et al.*, “Pyrophosphate Supplementation Prevents Chronic and Acute Calcification in ABCC6-Deficient Mice,” *Am J Pathol*, vol. 187, no. 6, p. 1258, Jun. 2017, doi: 10.1016/J.AJP.2017.02.009.
- [23] Q. Jiang, M. Endo, F. Dibra, K. Wang, and J. Uitto, “Pseudoxanthoma elasticum is a metabolic disease,” *J Invest Dermatol*, vol. 129, no. 2, pp. 348–354, Feb. 2009, doi: 10.1038/JID.2008.212.
- [24] “Disodium Pyrophosphate | Na₂H₂P₂O₇ | CID 24451 - PubChem.” Accessed: Nov. 13, 2024. [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/24451>
- [25] K. L. Dionisio *et al.*, “Data Descriptor: The Chemical and Products Database, a resource for exposure-relevant data on chemicals in consumer products,” *Sci Data*, vol. 5, Jul. 2018, doi: 10.1038/SDATA.2018.125.
- [26] P. Strazzullo and C. Leclercq, “Sodium,” *Advances in Nutrition*, vol. 5, no. 2, p. 188, 2014, doi: 10.3945/AN.113.005215.
- [27] N. Ramesh, J. T. B. Ratnayake, and G. J. Dias, “Calcium-based ceramic biomaterials,” *Structural Biomaterials: Properties, Characteristics, and Selection*, pp. 333–394, Jan. 2021, doi: 10.1016/B978-0-12-818831-6.00011-2.
- [28] Y. Sun *et al.*, “Dietary potassium regulates vascular calcification and arterial stiffness,” *JCI Insight*, vol. 2, no. 19, Oct. 2017, doi: 10.1172/JCI.INSIGHT.94920.
- [29] D. Tomé and C. Bos, “Lysine Requirement through the Human Life Cycle,” *J Nutr*, vol. 137, no. 6, pp. 1642S–1645S, Jun. 2007, doi: 10.1093/JN/137.6.1642S.

- [30] N. E. Flynn, C. J. Meininger, T. E. Haynes, and G. Wu, "The metabolic basis of arginine nutrition and pharmacotherapy," *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 56, no. 9, pp. 427–438, 2002, doi: 10.1016/S0753-3322(02)00273-1.
- [31] G. Wu and S. M. Morris, "Arginine metabolism: Nitric oxide and beyond," *Biochemical Journal*, vol. 336, no. 1, pp. 1–17, Nov. 1998, doi: 10.1042/bj3360001.
- [32] H. Namkung-Matthai, A. Diwan, R. S. Mason, G. A. C. Murrell, and T. Diamond, "Nitric oxide regulates alkaline phosphatase activity in rat fracture callus explant cultures," *Redox Rep*, vol. 5, no. 2–3, pp. 126–127, 2000, doi: 10.1179/135100000101535438.
- [33] A. Shimomura *et al.*, "Dietary L-Lysine prevents arterial calcification in adenine-induced uremic rats," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 25, no. 9, pp. 1954–1965, Sep. 2014, doi: 10.1681/ASN.2013090967/-/DCSUPPLEMENTAL.
- [34] E. Kozák *et al.*, "Oral supplementation of inorganic pyrophosphate in pseudoxanthoma elasticum," *Exp Dermatol*, vol. 31, no. 4, pp. 548–555, Apr. 2022, doi: 10.1111/EXD.14498.
- [35] K. Adriána, "A lágyszöveti meszesedés vizsgálatára alkalmas egérmodell optimalizálása," 2023.