

# Uloga Gla-bogatog proteina u vaskularnoj kalcifikaciji

---

**Turina, Sara**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:527616>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-07**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI  
SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE

Sara Turina

**ULOGA GLA-BOGATOG PROTEINA U VASKULARNOJ KALCIFIKACIJI**

Diplomski rad

Rijeka, 2021. godina

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI  
SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE

Sara Turina

**ULOGA GLA-BOGATOG PROTEINA U VASKULARNOJ KALCIFIKACIJI**

Diplomski rad

Rijeka, 2021. godina

Mentor rada: doc. dr. sc. Tanja Ćelić, dr. med.

Diplomski rad ocijenjen je dana .06.2021. godine na Medicinskom fakultetu

Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. izv. prof. dr. sc. Josip Španjol, dr. med. (predsjednik Povjerenstva)

2. prof. dr. sc. Sanja Zoričić Cvek, dr. med.

3. izv. prof. dr. sc. Kristina Pilipović, dr. med.

Rad sadrži 42 stranice, 7 slika i 60 literaturnih navoda.

## **ZAHVALA**

Željela bih se prije svega zahvaliti svojoj mentorici doc.dr.sc. Tanji Ćelić, na izuzetnoj susretljivosti, korektnom i stručnom vođenju kroz izradu diplomskog rada te na svim korisnim savjetima i osobnom primjeru kakav mentor treba biti.

Zahvaljujem se prijateljima, kolegicama i kolegama koji su uvijek bili uz mene i uljepšali moje studentske dane.

Na kraju veliko hvala mojim roditeljima, bratu i ostatku obitelji na bezuvjetnoj potpori i razumijevanju tijekom mog studiranja.

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. GLA-BOGATI PROTEIN .....	2
1.1.1. GENI.....	3
1.1.2. IZOFORME PROTEINA.....	3
1.1.3. MOLEKULARNA EVOLUCIJA .....	5
1.1.4. EKSPRESIJA GENA .....	7
1.1.5. REGULACIJA EKSPRESIJE GENA GLA-BOGATOG PROTEINA .....	9
1.2. VASKULARNA KALCIFIKACIJA .....	10
1.2.1. ČIMBENICI KOJI POTIČU PROCES VASKULARNE KALCIFIKACIJE MIŠIĆNICE KRVNE ŽILE .....	11
1.2.2. PORIJEKLO STANICA S OSTEOHONDRALNOM TRANSFORMACIJOM U KRVNIM ŽILAMA ...	12
2. SVRHA RADA.....	13
3. PREGLED LITERATURE NA ZADANU TEMU .....	14
3.1. ŠTO SE ZNA O GLA-BOGATOM PROTEINU VEZANO ZA VASKULARNU KALCIFIKACIJU? .	14
3.1.1. GLA-BOGATI PROTEIN INHIBIRA FOSFATOM INDUCIRANU VSMCs KALCIFIKACIJU PUTEM SMAD OVISNE BMP SIGNALIZACIJE .....	16
3.1.2. POVEZANOST GLA-BOGATOG PROTEINA I CIRKULIRAJUĆIH ČESTICA KALCIPROTEINA I IZVANSTANIČNIH VEZIKULA .....	18
3.1.3. MJESTA TKIVNIH NAKUPLJANJA GLA-BOGATOG PROTEINA .....	19
3.2. GDJE JE JOŠ ULOGA GLA-BOGATOG PROTEINA?.....	23
3.2.1. GLA-BOGATI PROTEIN I ANTIINFLAMATORNA ULOGA .....	23
3.2.2. GLA-BOGATI PROTEIN I OSTEOGENEZA .....	24
3.2.3. GLA-BOGATI PROTEIN I KRONIČNA BOLEST BUBREGA .....	26
4. RASPRAVA.....	28
5. ZAKLJUČAK.....	31
6. SAŽETAK.....	32
7. SUMMARY.....	33
8. LITERATURA .....	34
9. ŽIVOTOPIS.....	42

## POPIS SKRAĆENICA I AKRONIMA

$\alpha$ -klotho – engl.  *$\alpha$ -klotho* –  $\alpha$ -klotho

$\alpha$ SM-22 – engl.  *$\alpha$  smooth muscle-22* –  $\alpha$  glatki mišić 22

$\alpha$ SMA – engl.  *$\alpha$  smooth muscle actin* –  $\alpha$  aktin glatkih mišića

ApoE – engl. *apolipoprotein E* – apolipoprotein E

BCP – engl. *basic calcium phosphate* – osnovni kalcijev fosfat

BMP-2 – engl. *bone morphogenetic protein 2* – koštani morfogogenetski protein 2

BMP-7 – engl. *bone morphogenetic protein 7* – koštani morfogogenetski protein 7

bp – engl. *base pair* – parova baza

cGRP – engl.  *$\gamma$ -carboxylated GRP* – karboksilirani GRP

CKD-MBD – engl. *chronic kidney disease-mineral and bone disorder* – kronična bubrežna bolest i poremećaj minerala kostiju

CPP – engl. *calciprotein particle* – čestica kalcipteina

ECM – engl. *extracellular matrix* – izvanstanični matriks

EV – engl. *extracellular vesicles* – izvanstanične vezikule

FGF-23 – engl. *fibroblast growth factor 23* – čimbenik rasta fibroblasta-23

GGCX – engl. *gamma-glutamyl carboxylase* – gama glutamil karboksilaza

GRP – engl. *Gla-rich protein* – Gla-bogati protein

IL1- $\beta$  – engl. *interleukin 1  $\beta$*  – interleukin 1-  $\beta$

MGP – engl. *matrix Gla protein* – matriks Gla protein

mRNA – engl. *messenger ribonucleic acid* – glasnička ribonukleinska kiselina

MSC – engl. *mesenchymal stem cells* – pluripotentne matične stanice

NF- $\kappa$ B – engl. *nuclear factor kappa B* – nuklearni faktor kappa B

PCR – engl. *polymerase chain reaction* – polimerazna lančana reakcija

PGE2 – engl. *prostaglandin E2* – prostaglandin E2

PPi – engl. *inorganic pyrophosphate* – anorganski pirofosfat

qPCR – engl. *quantitative PCR* – kvantitativna polimerazna lančana reakcija

Runx2 – engl. *runt-related transcription factor 2* – runt povezan transkripcijski faktor 2

TGF- $\beta$  – engl. *transforming growth factor -  $\beta$*  – transformirajući faktor rasta  $\beta$

TNF- $\alpha$  – engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$*  – tumorski faktor nekroze- $\alpha$

ucGRP – engl. *undercarboxylated GRP* – nekarboksilirani GRP

UCMA – engl. *unique cartilage matrix-associated protein* – jedinstveni protein povezan s matricom hrskavice

VC – engl. *vascular calcification* – vaskularna kalcifikacija

VICs – engl. *valvular interstitial cells* – valvularne intersticijske stanice

VKDP – engl. *vitamin K-dependent protein* – protein ovisan o vitaminu K

VSMCs – engl. *vascular smooth muscle cells* – vaskularne glatke mišićne stanice



## 1. UVOD

Vaskularna kalcifikacija (engl. *vascular calcification, VC*) označava taloženje minerala u tunici mediji ili intimi krvne žile i povezana je s povećanim kardiovaskularnim morbiditetom i mortalitetom. Dugo vremena smatrana pasivnim procesom kao posljedicom starenja organizma i klinički je značajna kod ateroskleroze, kronične bubrežne bolesti i dijabetesa (1,2). Čimbenici koji sudjeluju u mehanizmu njezina nastanka su: osteoplastična diferencijacija vaskularnih glatkih mišićnih stanica (engl. *vascular smooth muscle cells, VSMCs*) otpuštanje kalcificiranih izvanstaničnih vezikula (engl. *extracellular vesicles, EV*) remodelacija izvanstaničnog matriksa (engl. *extracellular matrix, ECM*) i disfunkcija endotela. Međutim, otkriveno je kako je vaskularna kalcifikacija aktivni proces gdje je važna uloga inhibitora kalcifikacije koji djeluju tako da sprječavaju osteogenu diferencijaciju VSMCs, otpuštanje mineraliziranih izvanstaničnih vezikula i remodelaciju ECM-a (2,3). Pokazalo se da postoji nekoliko molekula koje funkcioniraju kao inhibitori kalcifikacije, kao što su matriks Gla protein (engl. *matrix Gla protein, MGP*), fetuin-A i osteopontin. Otkriće novog Gla-bogatog proteina (engl. *Gla-rich protein, GRP*) 2008. godine, značajno je pridonijelo boljem razumijevanju nastanka vaskularne kalcifikacije (1,2,3).

U ovom preglednom radu prikazani su dostupni podaci o GRP-u, pružajući čitatelju jasni uvid u relevantna znanstvena otkrića na temu uloge GRP-a u vaskularnoj kalcifikaciji (1,3).

## 1.1. GLA-BOGATI PROTEIN

Gla-bogati protein (GRP) je najnovije otkriveni član obitelji proteina ovisnih o vitaminu K (engl. *vitamin K-dependent protein, VKDP*). GRP je prvi puta identificiran u kalcificiranoj hrskavici jadranske jesetre (*Acipenser naccarii*). Mali je protein molekularne mase 10,2kDa koji sadrži 16  $\gamma$ -karboksigliutaminskih kiselinskih (Gla) ostataka u svom slijedu od 74 Gla ostataka. Zbog velikog broja Gla ostataka koje sadrži je i dobio ime Gla-bogati protein i do danas je protein s najvećim udjelom Gla ostataka u odnosu na njegovu veličinu svih poznatih proteina, što ukazuje na posebnost istog (4). Za bolje razumijevanje sadržaja, važna je uloga vitamina K. Vitamin K je kofaktor za enzim gama glutamil karboksilazu (engl. *gamma-glutamyl carboxylase, GGCX*). Da bi bio biološki aktivan, GRP mora proći  $\gamma$ -karboksilaciju. Glutaminska kiselina (Glu) se uz pomoć GGCX i vitamina K pretvara do ostataka  $\gamma$ -glutaminske kiseline (Gla) (5,6). Potpuno  $\gamma$ -karboksilirani GRP sadrži 15 Gla ostataka u čovjeka (4). Gla-bogati protein se smatra da djeluje kao negativni regulator osteogene diferencijacije tako što inhibira ekspresiju osteogenih gena i smanjuje diferencijaciju glatkih mišićnih stanica u stanice slične osteoblastima (1). Gla-bogati protein ima izvanrednu sposobnost vezanja kalcija zbog toga što sadrži velik broj GRP ostataka (4). Smatra se da ima ulogu modulatora kalcija za dostupnost ECM-a i inhibitora kalcifikacije u kardiovaskularnom sustavu (4,7). Shodno tome, potvrđeno je da je nekarboksilirani (uc)GRP (engl. *undercarboxylated GRP, ucGRP*) povezan sa patološkim nakupljanjem mineralnih depozita zbog toga što nekarboksilirani GRP nema sposobnost inhibicije kalcifikacije (3). Iako i  $\gamma$ -karboksilirani (engl.  *$\gamma$ -carboxylated GRP, cGRP*) i ucGRP oblici proteina imaju sposobnost vezanja za minerale, samo cGRP može inhibirati vaskularnu kalcifikaciju (1). Druga studija, koja je provedena u isto vrijeme kada je otkriven GRP, izvijestila je o identifikaciji novog gena za koji se smatralo da je prisutan tokom ranog razvoja i da je visoko specifičan za distalne hondrocite (8). Gen je imenovan

kao UCMA - jedinstveni protein povezan s matriksom hrskavice (engl. *unique cartilage matrix-associated protein, UCMA*). Kasnije je preimenovan u gornju zonu proteina povezanih s pločicom rasta i hrskavicom „*upper zone of growth plate and cartilage matrix associated protein*“ (8,9).

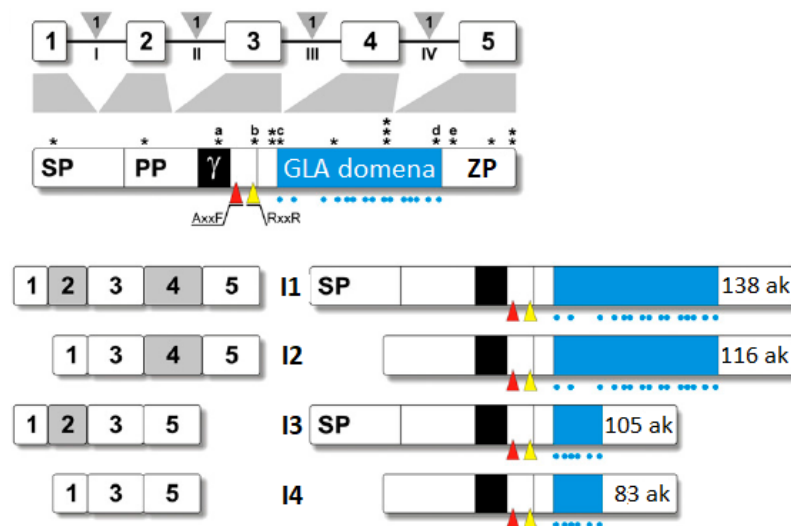
### **1.1.1. GENI**

Istraživanja pokazuju da su GRP geni kralježnjaka organizirani u 5 kodirajućih egzona odvojeni sekvencama introna faze 1 i kodiraju prepropeptid od oko 135 aminokiselina (2). Nakon uklanjanja transmembranskog signala, koji je kodiran egzonom 2, proGRP se uz pomoć furin-slične proteaze (na mjestu RXXR) cijepa na propeptid (38-39 aminokiselina) i zreli peptid (67-74 aminokiseline), kojeg karakterizira gusta nakupina Gla ostataka. Postojanje 16 Gla ostataka u jesetre, odnosno 15 u čovjeka, čini GRP kao protein sa najvećim udjelom Gla ostataka do danas identificiranih (4). Većina Gla ostataka se nalazi u egzonu 4, čija je struktura očuvan tijekom evolucije kralježnjaka (4). GRP je tijekom evolucije dobro očuvan što potvrđuje visoki stupanj sličnosti u sekvencama u jesetre i čovjeka (4). Preostale važne karakteristike GRP strukture gena su: 1) AXXF motif - mjesto za proteolitičko cijepanje 2) mjesto prijavanja za g-glutamil karboksilazu u propeptidu 3) nekoliko ostataka tirozina koju su djelomice sulfatirani te 4) domena oligomerizacije sa spiralnom zavojnicom u zreлом peptidu (slika 1.) (8,9).

### **1.1.2. IZOFORME PROTEINA**

Na temelju analize mišjeg nukleotida otkriveno je da postoje četiri različite izoforme GRP mRNA. Prva izoforma je nazvana GRP-F1 koji kodira protein od 138 aminokiselina. Preostale tri otkrivene izoforme su nazvana GRP-F2, GRP-F3 i GRP-F4. Oni kodiraju proteine sa 116, 105 i 83 aminokiselina. Razlikuju se po prisutnosti ili odsutnosti egzona 2, egzona 4 ili oba (10). S obzirom da su razlike u veličini izoforma proteina i mRNA male

tj. 66 parova baza (engl. *base pair, bp*) za egzon 2 i 99 bp za egzon 4, nisu otkrivene u prethodnim studijama uz pomoć Northern i Western blot analiza (10). Dobiveni rezultati u prethodnim studijama dokazuju da gen GRP kodira četiri izoforme proteina. Koekspresija netopivih i topivih izoformi se može modificirati i na taj način sudjelovati u regulaciji hondrocita. Potrebna su daljna istraživanja funkcije GRP ali je dokazano da novi VKD protein i njegovo parakrino djelovanje sudjeluju u regulaciji izvanstaničnog kalcija. Nadalje, oštećenje izoformi proteina može biti povezana s bolestima skeletnog sustava (slika 1.) (8-10).



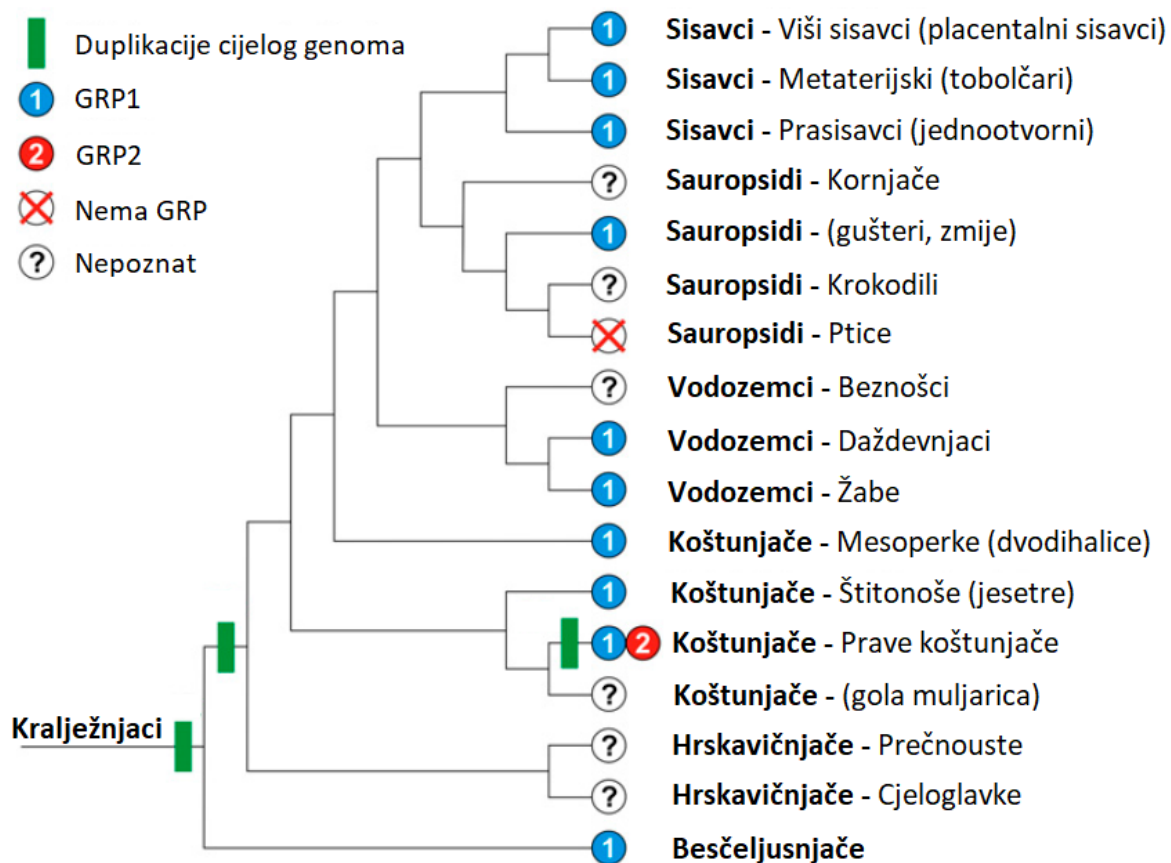
**Slika 1: Shematski prikaz strukture gena i proteina GRP**

GRP geni kralježnjaka organizirani su u 5 kodirajućih egzona odvojeni intronima faze-1. Dolje lijevo su 4 izoforme proteina, a dolje desno struktura peptida. Dužina svakog peptida označena je u bijelim kućicama. SP – signalni peptid, PP - propeptid, ZP – zreli peptid, I – izoforma, ak- aminokiselina,  $\gamma$ - y-glutamil karboksilazu, AXXF i RXXR - mjesta za proteolitičko cijepanje. Preuzeto i prilagođeno prema: Cancela ML, Conceição N, Laizé V. *Gla-Rich Protein, a New Player in Tissue Calcification?*. *Advances in Nutrition*. 2012 Mar 1;3(2):174-81 (2).

### **1.1.3. MOLEKULARNA EVOLUCIJA**

Istraživanjem molekularne evolucije GRP-a otkriveno je njegovo nepostojanje u nekralježnjaka i ekspresija u većini kralježnjaka uključujući sisavce, vodozemce, gmazove, koštane ribe i ribe bez čeljusti.

Iz seta GRP sekvenci dobiveno je ukupno 47 zrelih proteina pomoću proteolitičkog cijepanja na konzerviranom furin-sličnom mjestu. U skladu s općeprihvaćenom taksonomijom kralježnjaka, GRP sekvence su razvrstane u glavne taksonomske skupine (tj. sisavci, vodozemci, gmazovi, koštane ribe i ribe bez čeljusti). Sekvence koštanih riba su razdijeljene u dvije odvojene skupine s obzirom na prisustvo GRP2 izoforme. Od inicijalnih 47 zrelih proteina, njih 38 je označeno kao GRP1, a preostalih 9 kao GRP2 (jedinствeno za izoforme koštanih riba) (4). Nadalje, nadovezujući se na prethodni rad, Cancela i suradnici su istraživali molekularnu evoluciju. Iako je GRP gen identificiran kod većine kralježnjaka GRP gen nije otkriven u ptica i krokodila (slika 2.) (2).



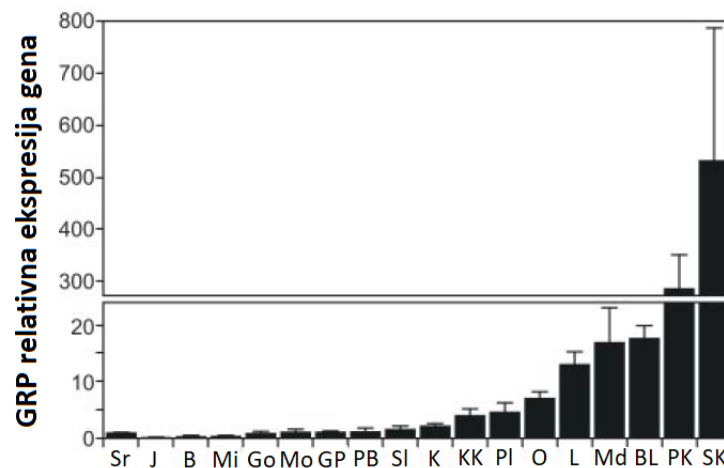
**Slika 2: Dijagramski prikaz skupine kralježnjaka i pojava GRP oblika**

*Preuzeto i prilagođeno prema: Cancela ML, Conceição N, Laizé V. Gla-Rich Protein, a New Player in Tissue Calcification?. Advances in Nutrition. 2012 Mar 1;3(2):174-81. (2)*

Odsutstvo GRP gena u nekih kralježnjaka se može opravdati nedostatkom istraživanja, a njihovo nepostojanje u ptica koje imaju praktički cjelokupan genom je diskutabilan. Pomoću dubinske analize genomskog aspekta oko GRP lokusa u par genoma kralježnjaka ustanovljeno je da je GRP gen odsutan u genomu ptica, dok je taj isti GRP gen očuvan u riba tijekom evolucije kralježnjaka (2).

#### 1.1.4. EKSPRESIJA GENA

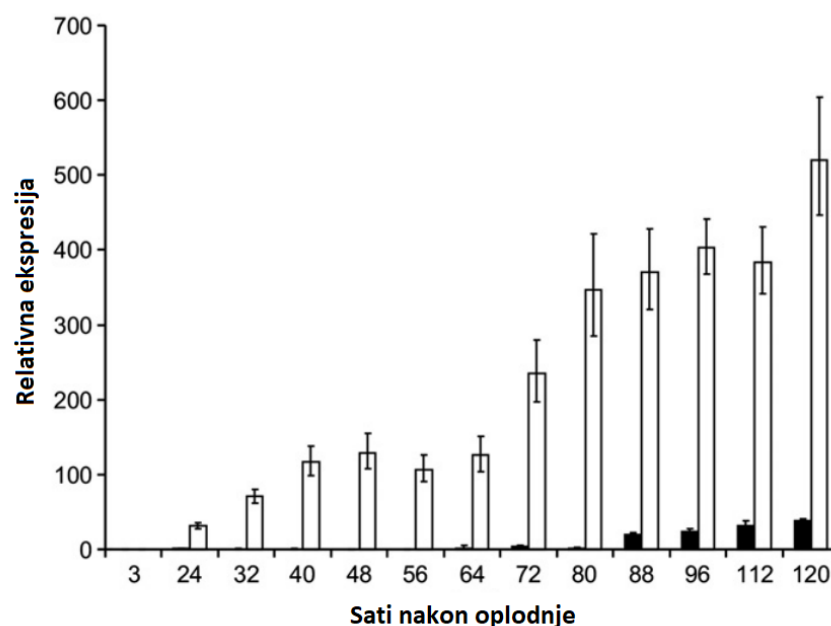
Razina ekspresije GRP gena utvrđena je u tkivima nekoliko vrsta kralježnjaka tijekom razvoja. Razina ekspresije GRP gena istraživana je u 18 različitih vrsta tkiva odraslih jesetri. Ekspresija GRP gena bila je otkrivena u svim analiziranim tkivima sa najvećim nivoom u hrskavičnom tkivu (mandibula, lubanja, branhijalni lukovi, prednji i stražnji kralješci). Stražnji kralješci su od navedenih pokazali najveću razinu ekspresije GRP gena (4). Raspodjela GRP ekspresije u različitim tkivima prikazana je na slici 3.



**Slika 3: Raspodjela GRP u tkivima**

*Sr*-srce, *J*-jetra, *B*-bubrezi, *Mi*-mišić, *Go*-gonade, *Mo*-mozak, *GP*-ganoidna ploča, *PB*-prednji bubrezi, *SI*-slezena, *K*-kralježnica, *KK*-ključna kost, *PI*-ploča, *O*-operkulum, *L*-lubanja, *Md*-mandibula, *BL*-branhijalni lukovi, *PK*-prednji kralješci, *SK*-stražnji kralješci. Preuzeto i prilagođeno prema: Viegas CS, Simes DC, Laizé V, Williamson MK, Price PA, Cancela ML. *Gla-rich Protein (GRP), A New Vitamin K-dependent Protein Identified from Sturgeon Cartilage and Highly Conserved in Vertebrates. Journal of Biological Chemistry. 2008 Dec;283(52):36655-64 (4).*

Istraživanja su pokazala da se ekspresija dvaju gena razlikuje. Geni ucmaa i ucmaab od zebrića (engl. *zebrafish*) su analizirani pomoću kvantitativne polimerazne lančane reakcije (engl. *quantitative PCR, qPCR*) glasnike ribonukleinske kiseline (engl. *messenger ribonucleic acid, mRNA*) koji su prikupljeni u 13 različitim vremenskim razdobljima između 3 i 120 sati nakon oplodnje. Ucmaa mRNA je otkrivena pri 24 sata nakon oplodnje i imala je 2 porasta. Prvi porast se detektira između 24 i 40 sata nakon oplodnje, a drugi nakon 64 sata nakon oplodnje. Znatnije količine ekspresije ucmaab mRNA uočene su od 88 sata nakon oplodnje. Ustvrdili su da su razine ekspresije ucmaab značajno niže od razina ucmaa u svim fazama razvoja do 120 sata nakon oplodnje (slika 4.) (11).



**Slika 4: qPCR analiza vremenske ekspresije ucmaa (prazni stupci) i ucmaab (crni stupci) u zebriću „zebrafish“** Preuzeto i prilagođeno prema: Neacsu CD, Grosch M, Tejada M, Winterpacht A, Paulsson M, Wagener R, et al. Ucmaa (*Grp-2*) is required for zebrafish skeletal development. Evidence for a functional role of its glutamate  $\gamma$ -carboxylation. *Matrix Biology*. 2011 Sep;30(7-8):369-78 (11).



### 1.1.5. REGULACIJA EKSPRESIJE GENA GLA-BOGATOG PROTEINA

Podaci o regulaciji GRP gena su oskudni (2). Identificiran je ucma gen čija je ekspresija bila prikrivena tijekom dediferencijacije uzrokovane retinoičnom kiselinom (2,9). Ekspresija GRP gena je otkrivena u hrskavičnom tkivu jesetre, štakora i miševa (4,8,9). Gen GRP se opisuje kao novi „*marker of the resting zone of cartilage*“ i već je korišten u ranijim analizama fenotipa transgenih miševa (12,13). Nadalje, GRP gen je otkriven i u odraslog štakora, točnije trabekularnoj kosti i u obje vrste koštanih stanica, osteoblastima i osteocitima (4). Navedeni gen nije jedinstven za hrskavicu premda se najviše izražava u hrskavici (10). Obrasci ekspresije odgovorni su za određene varijacije u njihovoj ekspresiji. Drugim riječima, otkrivena su sva 4 transkripta u pojedinim hondrocitima. Proučavane su 4 izoforme GRP-a u ranoj hondrogenezi s *in vitro* modelom embrionalnih mišjih mezenhimalnih stanica te u diferenciranim embrionalnim hondrocitima u jednoslojnoj kulturi. Otkriveno je da su se 4 transkripta prikazala tijekom hondrogeneze *in vitro*. Mada su 4 transkripta iskazana tijekom hondrogeneze, kinetika njihove pojavnosti je jedinstvena čime je zaključeno da je svaka izoforma posebno regulirana. Nadalje, pokazalo se da se ekspresija GRP gena smanjuje nakon izlaganja koštanom morfogenetskom proteinu 2 (engl. *bone morphogenetic protein-2, BMP-2*) i transformirajućem faktoru rasta  $\beta 1$  (engl. *transforming growth factor- $\beta 1$ , TGF- $\beta 1$* ) (2,10). Navedeno sugerira da su ova dva pripadnika TGF- $\beta$  "superobitelji" u stanju modulirati GRP ekspresiju *in vitro* (10). Dobiveni rezultati, ukazuju da je ekspresija GRP gena regulirana tijekom diferencijacije hondrocita (10).

## 1.2. VASKULARNA KALCIFIKACIJA

Postoje tri različite lokalizacije na kojima se najčešće razvijaju vaskularne kalcifikacije. Uzroci su dijelom različiti, ali stanični i molekularni procesi koji u tome imaju ključnu ulogu vrlo su slični. To su kalcifikacija tunike intime (endotela), kalcifikacija tunike medije (mišićnice) te kalcifikacija srčanih zalistaka. Patogeneza i priroda ateroskleroze je potpuno različita u srednjim i velikim arterijama vjerojatno zbog različitog embrionalnog porijekla glatkih mišićnih stanica u srednjem sloju stijenke arterija (14). U velikim krvnim žilama je češća kalcifikacija medije, a simptomi su povezani s gubitkom elastičnosti stijenke, odnosno „otvrdnućem“ stijenke arterije te razvojem hipertenzije i aneurizme (15,16). U srednje velikim arterijama, glatke mišićne stanice iz medije migriraju u subintimalni sloj arterije, doprinose nestabilnosti aterosklerotskog plaka i kalcifikaciji, te rupturi i trombozi (17). U aterosklerozi proces se razvija primarno u intimi krvne žile. Disfunkcija endotela potiče stvaranje adhezijskih molekula što dovodi do vezanja monocita i njihovu migraciju u subendotelni prostor. Tu se pretvaraju u makrofage, nakupljaju se oksidirani lipoproteini te nastaju pjenušave stanice. Nadalje, u to područje migriraju glatke mišićne stanice iz medije uz stvaranje gustog izvanstaničnog matriksa i tako nastaje plak s fibroznom kapom. Intima zadebljava što postepeno, kako plak raste, dovodi do suženja lumena arterije. U plaku se razvijaju fokalna žarišta vaskularne kalcifikacije i s obzirom na broj i veličinu kalcificiranih područja plak je nestabilan te može doći do rupture plaka. Time započinje tromboza što može naglo okludirati lumen žile ili može embolizirati uz loš ishod i povećan rizik od akutnog ishemijskog događaja, infarkta miokarda i moždanog udara (17).

### **1.2.1. ČIMBENICI KOJI POTIČU PROCES VASKULARNE KALCIFIKACIJE MIŠIĆNICE KRVNE ŽILE**

Glatke mišićne stanice predstavljaju glavni izvor stanica koje prolaze osteohondrogenu diferencijaciju i doprinose aterosklerotskoj kalcifikaciji intime. U kalcifikaciji intime, stanice nalik na osteoblaste nalazimo u subendotelnom sloju intime i njihovo porijeklo se vezuje za glatke mišićne stanice no pretpostavka je da potječu i od cirkulirajućih mezenhimalnih stanica. Kalcifikacija medije je rezultat promjene fenotipa glatkih mišićnih stanica u smjeru osteohondralne transformacije (18,19). VSMCs mogu reagirati na promjene u lokalnom okolišu, kao na primjer na promjene razine kalcija i fosfora kako u cirkulaciji tako i u samim stanicama. Glatke mišićne stanice imaju svoje endogene mehanizme koji sprječavaju stvaranje kalcijevog hidroksiapatita što znači da ispoljavaju i sadrže proteine koji inhibiraju vaskularnu kalcifikaciju no uslijed promjene fenotipa koji dodatno podržavaju podražaji koji dolaze iz promijenjenog okoliša, to se mijenja. U kalcifikaciji medije dominiraju promjene fenotipa glatkih mišićnih stanica u smjeru osteohondralnog fenotipa, razgradnja i promjene strukture inače dobro strukturiranog izvanstaničnog matriksa te nakupljanje izvanstaničnih vezikula (20). Ove vezikule u izvanstaničnom matriksu nalazimo i u kalcifikaciji intime i u kalcifikaciji medije. Vezikule u intimi izlučuju kalcificirajuće glatke mišićne stanice i makrofazi, kao rezultat stresa zbog upale, a u mediji ih također izlučuju kalcificirajuće glatke mišićne stanice ali kao posljedica poremećaja ravnoteže minerala u cirkulaciji. Uslijed toga raste razina unutarstaničnog i izvanstaničnog kalcija i fosfora. Tako vezikule predstavljaju početnu jezgru kalcifikacije u izvanstaničnom matriksu oko koje se proces dalje razvija. Vezikule su glavni generator kalcifikacije jer osiguravaju kalcijev hidroksiapatit i njegovo taloženje u izvanstaničnom matriksu (21). S obzirom da su u cirkulaciji prisutne stalne fiziološke razine kalcija i fosfora, mora postojati sustav koji će u fiziološkim uvjetima sprječavati stvaranje

kalcijevog hidroksiapatita, a time i njegovo taloženje na neskletnim mjestima. Znači, fiziološka razina kalcija i fosfora ne mogu potaknuti promjenu fenotipa glatkih mišićnih stanica te ispoljavanje osteogenih markera. Razlog tome su postojanje endogenih i cirkulirajućih inhibitora moguće kalcifikacije, kao što su matriks Gla protein (MGP), anorganski pirofosfat (engl. *inorganic pyrophosphate, PPI*), fetuin-A, osteopontin, osteoprotegerin i koštani morfogenetski protein – 7 (engl. *bone morphogenetic protein – 7, BMP-7*) (22). Fiziološka razina kalcija u krvi je ključni signalni medijator za regulaciju kontrakcije i funkcije VSMCs (23,24).

### **1.2.2. PORIJEKLO STANICA S OSTEOHONDRALNOM TRANSFORMACIJOM U KRVNIM ŽILAMA**

Razlikuju se dva različita procesa osifikacije odnosno stvaranja kosti, intramembranska i enhondralna osifikacija. Tijekom procesa intramembranske osifikacije, osteoblasti stvaraju i izlučuju kalcijev hidroksiapatit koji se veže na proteine izvanstaničnog matriksa te osteoid mineralizira. Enhondralna osifikacija uključuje prvo stvaranje hrskavice, zatim fazu hipertrofičnih hondrocita, prodiranja krvnih žila uz naseljavanje osteoblasta koji stvaraju i izlučuju kolagen tipa I i ostale elemente izvanstaničnog matriksa te kalcijev hidroksiapatit što opet dovodi do mineralizacije okolnog koštanog matriksa (25). Kalcifikacija aterosklerotskog plaka u intimi uključuje enhondralna osifikacije te nije rijetko da se u aterosklerotskim lezijama nađu hondrociti i hrskavica. U kalcifikaciji medije više je zastupljeno intramembransko stvaranje kosti (25). Međutim, još uvijek nije u cijelosti jasan mehanizam indukcije i propagacije patološke kalcifikacije. Dakle, vaskularna kalcifikacija je posredovana staničnim promjenama koje ukazuju na osteogenu transformaciju i vode ka razvoju, ne samo kalcifikacije, već i elemenata prave kosti. Stanice u stijenci krvnih žila koje sudjeluju u tome su endotelne stanice, glatke mišićne stanice, te stanice nalik na fibroblaste i periciti u adventiciji. Istraživanja pokazuju

promjene fenotipa tih stanica te one stječu karakteristike stanica nalik na osteoblaste, hondroците i miofibroblaste no mehanizam koji potiče tu staničnu transformaciju nije još uvijek potpuno jasan (20). Također, porijeklo tih stanica nalik na osteoblaste nije do kraja razjašnjeno. Jedna mogućnost jesu same stanice krvnih žila, za koje je dokazano da imaju mogućnost promjene, i stvaraju uvjete za kalcifikaciju kao reakciju na promijenjene vanjske uvjete. To možda ukazuje da stanice krvnih žila imaju potencijal mezenhimalnih stanica koje pod određenim utjecajem diferenciraju u stanice različitog fenotipa pa tako i u osteoblaste. Kao drugi izvor stanica koje u stijenci žile reguliraju već opisane procese jesu subpopulacija monocita u cirkulaciji koji imaju isti mezenhimalni potencijal. Također opisana je i migracija pericita iz adventicije u srednji mišićni sloj žile kao stanice koje podržavaju kalcifikaciju (26). Osteoblasti kao stanice koštanog tkiva koje stvaraju koštani matriks i reguliraju mineralizaciju novostvorenog matriksa, diferenciraju se iz pluripotentnih mezenhimalnih matičnih stanica (engl. *mesenchymal stem cells, MSC*). Stanice u stijenci krvnih žila nakon promjene fenotipa pokazuju ekspresiju istih transkripcijskih faktora kao i mezenhimalne matične stanice koje diferenciraju u osteoblaste. Ostaje još uvijek i pitanje da li se potpuno diferencirana stanica krvne žile mijenja u osteoblastni fenotip ili se te stanice prvo de-diferenciraju u mezenhimalne matične stanice, a onda se one diferenciraju u stanice osteogene loze (25).

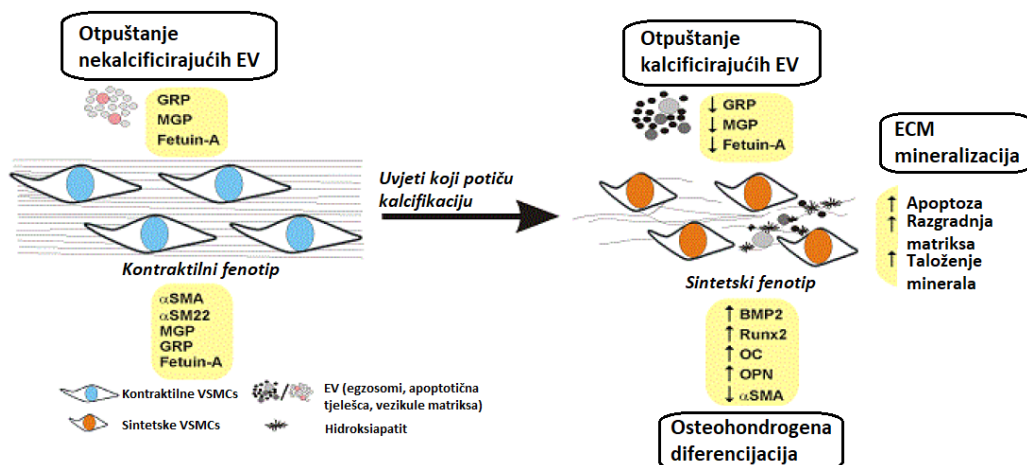
## **2. SVRHA RADA**

Svrha rada je prikazati nova znanstvena istraživanja i saznanja o Gla bogatom proteinu i njegovoj ulozi u vaskularnoj kalcifikaciji.

### 3. PREGLED LITERATURE NA ZADANU TEMU

#### 3.1. ŠTO SE ZNA O GLA-BOGATOM PROTEINU VEZANO ZA VASKULARNU KALCIFIKACIJU?

Ključnu ulogu u vaskularnoj kalcifikaciji imaju vaskularne glatke mišićne stanice, VSMCs. To su glatke mišićne stanice koje se nalaze u krvnim žilama i važne su za optimalno održavanje krvnog tlaka (27,28). Sudjeluju u procesu vaskularne kalcifikacije jer imaju sposobnost diferencijacije u osteoblastične vaskularne glatke mišićne stanice i nakupljanja kalcificiranih izvanstaničnih vezikula bilo u intimu ili mediju krvne žile (29). Proces otpuštanja kalcificiranih izvanstaničnih vezikula je sličan osteogenezi (30). Dolazi do poremećaja ravnoteže u VSMCs. U fiziološkim uvjetima VSMCs pomoću  $\alpha$  glatkog mišića aktina (engl.  *$\alpha$  smooth muscle actin,  $\alpha$ SMA*) i  $\alpha$  glatkog mišića 22 (engl.  *$\alpha$  smooth muscle-22,  $\alpha$ SM-22*) i otpuštanja izvanstaničnih vezikula bogatih inhibitorima mineralizacije (MGP, GRP) održavaju normalnu kontraktibilnost krvne žile. Međutim, VSMCs mogu promijeniti svoj fenotip iz kontraktalnog u sintetski u uvjetima poput oksidativnog stresa, uremije, nedostatka vitamina K i starenja te dolazi do promjena u strukturi VSMCs, gubitka aktina glatkih mišićnih stanica, remodelacije izvanstaničnog matriksa i porasta ekspresije gena BMP-2, runt povezanog transkripcijskog faktora 2 (engl. *runt-related transcription factor 2, Runx2*), osteokalcina i osteopontina koji su važni u procesu osteogeneze (slika 5.) (3).



**Slika 5: Predloženi mehanizam za vaskularnu kalcifikaciju**

U fiziološkim uvjetima VSMCs održavaju kontraktilni fenotip pomoću ekspresije proteina ( $\alpha$ SM-22,  $\alpha$ SMA), proizvodnje inhibitora mineralizacije (MGP, GRP), unosom fetuina-A i oslobađanjem izvanstaničnih vezikula (EV) napunjenih inhibitorima mineralizacije. U uvjetima koji potiču kalcifikaciju, poput uremije, upale i oksidativnog stresa, nedostatka vitamina K, disfunkcije endotela i starenja, VSMCs smanjuju ekspresiju kontraktilnih gena i povećavaju ekspresiju nekoliko osteogenih markera (BMP-2, Runx2, osteokalcin, osteopontin) i dolazi do pretvorbe u sintetski fenotip. Navedeni događaji kulminiraju na osteohondrogenoj diferencijaciji VSMCs i oslobađanju kalcificirajućih izvanstaničnih vezikula, koje imaju manje inhibitora mineralizacije. Povećanje proteina povezanih s kostima i taloženje kalcificirajućih EV dovodi do mineralizacije i razgradnje ECM i povećane apoptoze stanica. *Preuzeto i prilagođeno prema: Viegas CS, Simes DC. Glarich Protein (GRP): A New Player In The Burden Of Vascular Calcification. J Cardiovasc Dis Diagn [Internet]. 13.05.2016. [citirano: 22.3.2021]; 2016;4(4). Dostupno na: <https://www.hilarispublisher.com/open-access/glarich-protein-grp-a-new-player-in-the-burden-of-vascular-calcification-2329-9517-1000245.pdf> (3).*

Tijekom demineralizacije izvanstaničnog matriksa u jesetre otkriveno je da je Gladomena u stanju vezati se za kristale kalcija (8). GRP ima ulogu modulacije kalcija u izvanstaničnom matriksu; inhibitora osteogene diferencijacije VSCMs (4,7,9). Gladomena se povezuje na kalcijeve ione ili kristale bilo vezivanjem za kristale hidroksiapatita koji je glavna komponentna u mineraliziranom izvanstaničnom matriksu ili vezanjem za koagulacijske faktore na površinu membranskih anionskih fosfolipida. Navedena svojstva dokazana su kod MGP-a i osteokalcina koji pripadaju VKDPs skupini i povezana su s regulacijom mineralizacije i vaskularne ektopične kalcifikacije. Istraživanja su pokazala da su izvanstanične vezikule koje su otpuštene iz normalnih VSMCs bogate s MGP-om, GRP-om i fetuinom-A, dok izvanstanične vezikule koje su promijenjene zbog kalcifikacije imaju veću količinu kalcija i manju GRP-a i MGP-a (1,3,4). Istraživanja su pokazala da i ucGRP i cGRP oblici GRP-a imaju sposobnost vezanja za minerale kalcija i fosfata te su prisutni u zdravim tkivima, ali se nakupljaju i u patološkim stanjima kao što je vaskularna kalcifikacija. Važno je naglasiti da iako oba oblika GRP-a imaju sposobnost vezanja za minerale, samo cGRP može inhibirati vaskularnu kalcifikaciju (1).

### **3.1.1. GLA-BOGATI PROTEIN INHIBIRA FOSFATOM INDUCIRANU VSMCs KALCIFIKACIJU PUTEM SMAD OVISNE BMP SIGNALIZACIJE**

GRP je novi inhibitor mineralizacije, koji je prvi put zabilježen u hrskavicama, a kasnije u krvožilnom sustavu (1,4,7,8). Miševi s nedostatkom GRP-a nisu razvili jasan fenotip (31). Međutim *in vitro* studije su otkrile da GRP regulira diferencijaciju hondrocita i osteoblasta (9,10,32). Imunohistokemijskom analizom ekspresije GRP-a pokazalo se da je prisutan na mjestima VC. Štoviše, kada se doda egzogeno, GRP inhibira kalcifikaciju prstenova aorte *in vitro* (1,7,9). Osteo/hondrogena pretvorba se ubrzava u odsutnosti GRP-a i to rezultira pojačanom kalcifikacijom. Također, je dokazano da visoke koncentracije fosfata, što je čest nalaz u pacijenata s kroničnom bolesti bubrega, induciraju pojačanu regulaciju GRP-a u



VSMCs (33). Pokazano je da GRP inhibira sazrijevanje hondrocita prema hipertrofičnim stanicama i osteogenu diferencijaciju osteoblasta (29). GRP je prisutan u niskim razinama u kalcificiranim aortnim zaliscima. Nakon egzogenog dodatka GRP inhibira kalcifikaciju aortnih prstenova uzgajanih u mediju za kalcifikaciju, što je popraćeno povećanjem ekspresije  $\alpha$ SMA i smanjenjem ekspresije osteopontina (1). BMP-2 snažan je induktor kalcifikacije i regulator osteo / hondrogene diferencijacije VSMCs, za koje se zna da uzrokuju dotok fosfata u stanice (34). BMP-2 djeluje tako da veže svoje receptore na površini stanice koji pretvaraju signal u citoplazmi fosforilirajući SMAD-ove ograničene za put (SMAD1 i SMAD5) za BMP (35). To dovodi do heterodimerizacije SMAD-ova ograničenih za put sa SMAD4, zajedničkog medijatora SMAD-a i translokaciju kompleksa u jezgru, gdje se izravno veže za DNA (36). Kao rezultat, dolazi do promjena u ekspresiji gena, poput pojačane regulacije Runx2, osteokalcina i alkalne fosfataze. Uz to se pokazalo da BMP-2 inducira nakupljanje  $\beta$ -katenina. Dokazano je da  $\beta$ -katenin aktivira ekspresiju Runx2 u kontekstu fosfatom-inducirane VSMCs kalcifikacije (37,38). Štoviše, GRP komunicira s BMP-SMAD signalnim putem vezivanjem za BMP-2 te inhibira BMP-2 / -4 signal i SMAD1/5/8 fosforilaciju s dorsomorfinom i na taj način smanjuje kalcifikaciju VSMCs i osteo / hondrogenu ekspresiju gena (39). Na temelju znanstvenih opažanja, prikazan je model kako GRP inhibira vaskularnu kalcifikaciju. Kada su VSMCs izložene povišenim koncentracijama fosfata u izvanstaničnoj okolini, kao što je u pacijenata s kroničnom bolesti bubrega, osteo / hondrogena diferencijacija (što dokazuje povećana ekspresija Runx2,  $\beta$ -katenina, osteokalcina, osteopontina i alkalne fosfataze) pokreće se pojačanom BMP-2-SMAD signalizacijom. Istraživanja pokazuju da GRP svojim djelovanjem inhibira učinak povećanih koncentracija fosfata i na taj način smanjuje kalcifikaciju stijenke krvne žile (39).

### **3.1.2. POVEZANOST GLA-BOGATOG PROTEINA I CIRKULIRAJUĆIH ČESTICA KALCIPROTEINA I IZVANSTANIČNIH VEZIKULA**

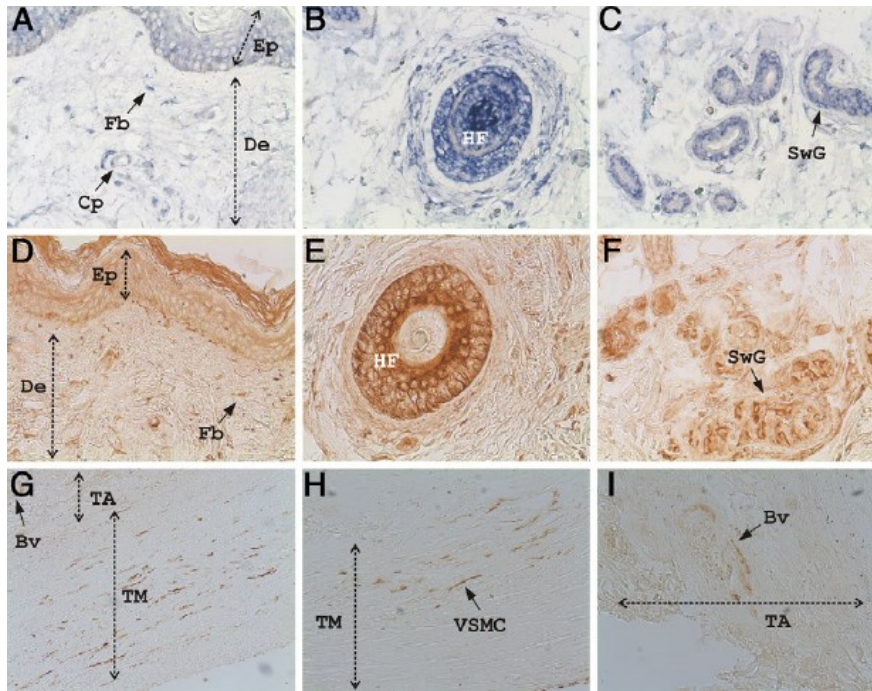
Uz poznate kardiovaskularne čimbenike rizika, poremećaji u metabolizmu minerala poput povišenog kalcija i fosfata također pridonose vaskularnoj kalcifikaciji i povećanoj kardiovaskularnoj smrtnosti u pacijenata s kroničnom bolesti bubrega (40, 41).

Štoviše, čak i u zdravim uvjetima, serum jest blizu prezasićenja s obzirom na kalcij i fosfat i moraju postojati inhibitori za sprječavanje ektopične kalcifikacije. Otkriće fetuinsko mineralnog kompleksa poznatog kao čestica kalciproteina (engl. *calcioprotein particle*, *CPP*) koja se sastoji od minerala kalcija i fosfata, fetuina-A i proteina koji reguliraju kalcij (poput GRP-a), ističe mogući mehanizam kojim se sprječava ektopična mineralizacija (42,43). Inhibicija stvaranja mineralnih kristala presudan je korak za sprečavanje štetnih učinaka kristala kalcija i ektopične kalcifikacije, bilo u cirkulirajućim CPP-ima ili u EV-ima (44,45). Mjesta nukleacije minerala unutar izvanstaničnih vezikula blokirana su u prisutnosti inhibitora mineralizacije kao što su GRP, MGP i fetuin-A (1,46,47). Čini se da navedeni postupak dijeli ista osnovna načela kao i formiranje i sazrijevanje mineralnih kristala u česticama kalciproteina seruma. Istraživanja pokazuju da čestice kalciproteina i izvanstanične vezikule s nižom razinom GRP-a i fetuina-A potiču kalcifikaciju VSMCs inducirajući osteohondrogenu diferencijaciju i upalu, što sugerira na patogeni učinak CPP-a i EV-a. Zapravo, nekoliko studija sugerira da kalcijevi i fosfatni ioni možda sami po sebi nisu izravni posrednici stanične toksičnosti. Pravi krivac mogao bi biti kalcij-fosfatni nanokristal, čiji nastanak ovisi o aktivnosti inhibitora mineralizacije (48). Zanimljivo, iako čestice kalciproteina sklone kalcifikaciji i izvanstanične vezikule induciraju VSMCs osteohondrogenu diferencijaciju i proupalni odgovor, smatra se da bi mogle funkcionirati i kao transportni mehanizmi za isporuku cirkulirajućih inhibitora mineralizacije u VSMCs u fiziološkim uvjetima. Rezultati pokazuju da uklanjanje izvanstaničnih vezikula

prepunjenih s GRP-om i fetuinom-A iz kontrolnog seruma potiče VC, što sugerira na fiziološku funkciju zaštite krvožilnog sustava. CPP i EV su odrednice VC u pacijenata s kroničnom bolesti bubrega, s kapacitetom modulacije VSMCs kroz diferencijaciju i upalu, što dovodi do povećanog taloženja minerala. Navedeno implicira način djelovanja GRP-a kao sistemskog inhibitora kalcifikacije i protuupalnog proteina (48).

### **3.1.3. MJESTA TKIVNIH NAKUPLJANJA GLA-BOGATOG PROTEINA**

Otkriveno je da se GRP izražava u jesetre samo u hrskavičnim stanicama, dok je u štakora otkriven i u koštanim stanicama (4). Daljnim analizama, zapaženo je da se GRP nalazi i u drugim tkivima osim kosti i hrskavice. Pomoću *in situ* hibridizacije GRP mRNA je otkriven u koži vanjskog uha štakora i to u epidermisu i dermisu. U dermisu je detektiran u fibroblastima, žlijezdama lojnicama i znojnicama i u folikulu dlake. U krvnim žilama se GRP otkriva u VSMCs tunice intime i nešto manje u tunici mediji. Također je GRP otkriven u hondrocitima (7). Otkrivanjem razina GRP-a u koži i vaskularnom tkivu štakora postavilo se pitanje da li se GRP na sličan način taloži i u ljudskome tkivu. U ljudskoj koži se GRP nakuplja u epidermisu i dermisu te slično kao i u štakora se nakuplja u fibroblastima, žlijezdama znojnicama i folikulu dlake. U nekalcificiranim krvnim žilama, se GRP nakuplja u tunici mediji VSMCs i malim krvnim žilama tunice adventicije (slika 6.)(7).

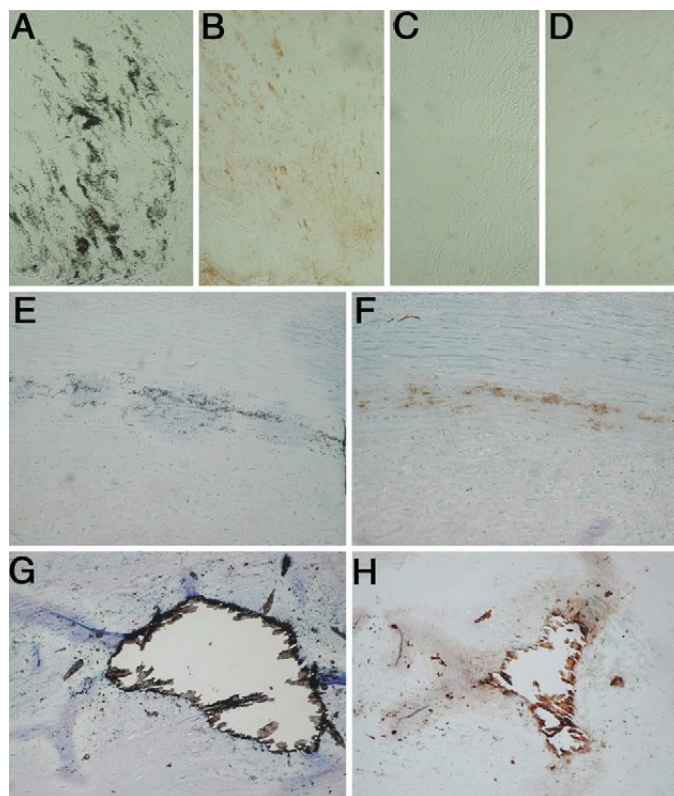


**Slika 6: GRP je prisutan u ljudskoj koži (A – F) i vaskularnom sustavu (G – I)**

A – C: Mjesta GRP ekspresija određena *in situ* hibridizacijom antisens sondama obilježenim digoksinom (plavo) u zdravoj ljudskoj koži. D – F: Mjesta GRP nakupljanja određena su imunohistokemijom s primarnim antitijelom CTerm-GRP i kozjim anti-zečjim IgG-om konjugiranim s peroksidazom kao sekundarnim antitijelom (smeđe), u zdravoj ljudskoj koži. D – F prikazuju uzastopne dijelove A – C. Ljudski GRP otkriven je u koži u epidermisu (*Ep*) i dermisu (*De*, A i D), malim kapilarama (*Cp*, A) i u fibroblastima (*Fb*), folikulu dlake (*HF*), znojnoj žlijezdi (*SwG*) (B, C, E, F). G – I: Akumulacija GRP u nekalcificiranim ljudskim karotidama koja pokazuje GRP u vaskularnim glatkim mišićima stanice (VSMC) smještene u tunici mediji (*TM*, G i H), te u malim krvnim žilama (*Bv*) tunice adventicije (*TA*, G i I). *Preuzeto i prilagođeno prema: Viegas CS, Cavaco S, Neves PL, Ferreira A, João A, Williamson MK, et al. Gla-Rich Protein Is a Novel Vitamin K-Dependent Protein Present in Serum That Accumulates at Sites of Pathological Calcifications. The American Journal of Pathology. 2009 Dec;175(6):2288-98. (7)*

Nadalje potvrđeno je da se GRP nakuplja na mjestima ektopične kalcifikacije u ljudskom vaskularnom sustavu i koži. Otkriveno je da GRP u jesetre *in vivo* ima sposobnost vezanja kalcija jer je GRP pronađen u mineraliziranim bronhijalnim lukovima (4). Imunohistokemijom uzoraka kože i krvnih žila pacijenata sa dermatomiozitom sa kalcinozom otkriveno je da se GRP kolokalizira na mjestima taloženja minerala kod navedenog patološkog stanja (7).

Kronična bubrežna bolest je visoko rizičan čimbenik za nastanak vaskularne kalcifikacije (47). Shodno tome, proučavalo se nakupljanje GRP-a u skupini bolesnika s kroničnom bubrežnom bolesti i na uzorcima vaskularnog tkiva s ektopičnim kalcifikacijama koji su prikupljeni *post mortem*. Dobiveni rezultati pokazali su da se GRP nakuplja na mjestima kalcifikacije bilo razasutih ili uznapredovalih lezija. Nadalje, GRP je nađen i u VSMCs i EM, međutim nije pronađen u područjima gdje nije došlo do mineralizacije. Na *post mortem* uzorcima GRP je kolokaliziran na mjestima razasutih i uznapredovalih kalcifikacija (slika 7.) (7).



**Slika 7: GRP se nakuplja u ljudskom vaskularnom sustavu na mjestima patoloških kalcifikacija ljudskih arterija kod oba bolesnika s kroničnom bubrežnom bolesti (A - D) i na postmortalnim uzorcima (pM) (E - H).** Mjesta nakupljanja GRP-a utvrđena su imunohistokemijom koristeći primarno antitijelo CTerm-GRP i sekundarno antitijelo kozju konjugiranu peroksidazu. (smeđa) (B, D, F, H). Otkrivanje minerala postignuto je bojanjem uzastopnih presjeka sa srebrnim nitratom (A i C, odnosno E i G). U uzorcima kod kronične bubrežne bolesti, GRP se više nakuplja na mjestima koja pokazuju taloženje minerala (A i B), u usporedbi s nekalcificiranim područjima (C i D). U uzorcima post mortem, GRP je kolokaliziran mjestima razasutih (E i F) i uznapređovalih (G i H) kalcifikacija. *Preuzeto i prilagođeno prema: Viegas CS, Cavaco S, Neves PL, Ferreira A, João A, Williamson MK, et al. Gla-Rich Protein Is a Novel Vitamin K-Dependent Protein Present in Serum That Accumulates at Sites of Pathological Calcifications. The American Journal of Pathology. 2009 Dec;175(6):2288-98 (7)*

Nakupljanje GRP-a na mjestima patoloških mineralizacija, ukazuje da je GRP svakako povezan s procesom nastanka patoloških vaskularnih kalcifikacija (7). Nadalje, na *ex vivo* tkivu ljudske aorte istraživali su koliko stupanj  $\gamma$ -karboksilacije utječe na funkciju GRP-a. Proces kalcifikacije su učinili dodatkom kalcijeva fosfata. Rezultati su pokazali da 500 ng/ml cGRP rezultira značajnim smanjenjem kalcija, što nije slučaj kod 250 ng/ml cGRP. Uvjeti mineralizacije smanjili su  $\alpha$ -SMA i povećali ekspresiju osteopontina, dok je cGRP inhibirao osteohondrogenu diferencijaciju VSMCs indukcijom rasta  $\alpha$ -SMA i smanjenja osteopontina. S druge strane, ucGRP nije imao utjecaja na inhibiciju mineralizacije (3).

## **3.2. GDJE JE JOŠ ULOGA GLA-BOGATOG PROTEINA?**

### **3.2.1. GLA-BOGATI PROTEIN I ANTIINFLAMATORNA ULOGA**

Upala i kalcifikacija se često isprepliću u kroničnim upalnim bolestima poput ateroskleroze i osteoartritisu koji uključuju infiltraciju monocita i makrofaga (49,50). Štoviše, dokazano je da makrofazi otpuštaju kalcificirajuće izvanstanične vezikule koji mogu ubrzati vaskularnu kalcifikaciju (51,52). Istraživanja su pokazala da se GRP očituje u podskupinama ljudskih leukocita, koji se mogu osloboditi kao EV komponente u cirkulaciju ili periferna tiva. Primjetilo se da je GRP uključen u upalne mehanizme, djelujući kao egzogeno i endogeno protuupalno sredstvo u monocitnim THP-1 i THP-1 MoM stimuliranim stanicama. Iako  $\gamma$ -karboksilacija može biti aktivan proces u imunološkim stanicama, čini da  $\gamma$ -karboksilacija nije nužna za protuupalno djelovanje GRP (44). Naime, GRP je uključen u upalne procese kod artroze, zbog protuupalnog djelovanja na hondroците i sinoviocyte iako je njegovo sudjelovanje u upalnom odgovoru imunoloških stanica još uvijek neistraženo (45). Otkriveno je da GRP sudjeluje u proupalnim odgovorima makrofaga i monocita smanjenjem proizvodnje upalnih

medijatora kao što su interleukin 1- $\beta$  (engl. *interleukin 1- $\beta$ , IL1- $\beta$* ), nuklearni faktor kappa B (engl. *nuclear factor kappa B, NF- $\kappa$ B*), tumorski faktor nekroze  $\alpha$  (engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF $\alpha$* ) i prostaglandin E2 (engl. *prostaglandin E2, PGE-2*). Oslobođeni TNF $\alpha$  iz aktiviranih makrofaga djeluje na aterosklerozu kroz povećanje propusnosti endotela, poticanja diferencijacije makrofaga i stvaranje pjenastih stanica. Ispostavilo se da inhibicija TNF $\alpha$  u apolipoprotein E (engls. *apolipoprotein E, ApoE*) (- / -) miševa za 50% smanjuje veličinu lezije aorte (53). Pomoću THP-1 stanične linije makrofaga i monocita, dokazano je da je ekspresija regulirana prema upalnoj stimulaciji i hidroksiapatitom i lipopolisaharidom. Shodno tome, tretmani THP-1 makrofaga pročišćenim cGRP / ucGRP ili osnovnim kalcijevim fosfatom (engl. *basic calcium phosphate, BCP*) obloženim s cGRP / ucGRP, smanjili su razinu proizvodnje TNF $\alpha$  ili PGE-2. Dakle, prekomjerna ekspresija GRP sposobna je suzbiti upalni odgovor stanica THP-1, kada se stimulira hidroksiapatitom ili lipopolisaharidom (44). Nadalje, smatra se da osnovni kalcijev fosfat (BCP) ima direktnu ulogu u osteoartritisu potičući upalu sinovije i razgradnju hrskavice (54). Na temelju toga, otkriveno je da GRP smanjuje proupalni učinak BCP-a. Navedeno sugerira da GRP zbog svog protuupalnog djelovanja na monocite i makrofage sudjeluje u upalnim bolestima kao što su osteoartritis i vaskularna kalcifikacija (44,45).

### **3.2.2. GLA-BOGATI PROTEIN I OSTEOGENEZA**

GRP je prisutan u ploči rasta juvenilne i fetalne hrskavice, kao i u trabekularnoj kosti. U dugim kostima u razvoju, GRP gen se izražava u hondrocitima, osteocitima i osteoblastima trabekularne kosti. Otkriveno je da se GRP eksprimira u ranim fazama diferencijacije osteoblasta i da rekombinantni protein ometa diferencijaciju osteoblasta, što sugerira da GRP inhibira osteogenu diferencijaciju (9). GRP je predložen kao negativni regulator osteogene diferencijacije, smanjenjem diferencijacije glatkih mišićnih stanica u stanice



poput osteoblasta i inhibiranjem ekspresije osteogenih gena. Zapaženo je da cGRP inhibira kalcifikaciju i osteohondrogenu diferencijaciju pojačavajući ekspresiju  $\alpha$ -glatkog mišića aktina (engl.  *$\alpha$  smooth muscle actin,  $\alpha$ SMA*) i smanjujući ekspresiju osteopontina (1). Iako se pokazalo da GRP funkcionira kao negativni regulator osteogene diferencijacije, nedavni podaci sugeriraju da GRP reguliraju i runt povezan transkripcijski faktor 2 (Runx2) i osteriks potičući diferencijaciju osteoblasta i stvaranje nodula. Također se pokazalo da koštani morfogenetski protein-2 (BMP-2) smanjuje ekspresiju GRP-a u hondrogenim stanicama (32).

Nadalje, otkriveno je da je stvaranje mineraliziranih čvorova tijekom diferencijacije pojačano u osteoblastima koji prekomjerno izražavaju GRP i u stanicama kultiviranim u mediju koji sadrži izlučeni protein GRP. Izgleda da je ekspresija osteokalcina povećana u osteoblastima koji prekomjerno izražavaju GRP. Iako nije jasno, da li GRP izravno povećava ekspresiju osteokalcina, očito je da su osteoblasti koji prekomjerno izražavaju GRP zreliji od kontrolnih stanica; osteoblasti se brže diferenciraju od kontrolnih stanica, što je rezultat povećane ekspresije GRP-a. Shodno tome smatra se da je osteokalcin glavni marker u kasnoj fazi diferencijacije osteoblasta. Povećana ekspresija osteoprotegerina također dokazuje da su osteoblasti koji prekomjerno izražavaju GRP zreliji od kontrolnih stanica (32). Nadalje, dokazano se da je GRP potreban za razvoj skeleta u ribe zebrice. U prilog tome govori i činjenica da uklanjanje GRP-a rezultira zaostajanjem u rastu i poremećenim razvojem kostura. S druge strane, otkriveno je da je razvoj kostiju u miševa normalan bez obzira na nedostatak GRP-a i da GRP nije potreban za enhodralnu osifikaciju tijekom razvoja. Iako GRP nema presudnu ulogu za razvoj kostiju, rezultati pokazuju da je pojačano stvaranje kosti rezultat povećane ekspresije GRP-a i poticanja diferencijacije osteoblasta (32).

### 3.2.3. GLA-BOGATI PROTEIN I KRONIČNA BOLEST BUBREGA

U bolesnika s kroničnom bolesti bubrega razvija se opsežna i progresivna vaskularna kalcifikacija koja doprinosi visokom kardiovaskularnom morbiditetu i mortalitetu (55). Uz tradicionalne čimbenike rizika, većina bolesnika s kroničnom bolesti bubrega razvija i abnormalni metabolizam minerala, uz hormonalnu disregulaciju, definiranu kao kronična bubrežna bolest, poremećaj minerala i kostiju (engl. *chronic kidney disease-mineral and bone disorder, CKD-MBD*) (56). Istraživala se povezanost razine GRP-a u cirkulaciji s kroničnom bolesti bubrega i vaskularnom kalcifikacijom. Prikazana je snažna korelacija između procijenjene brzine glomerularne filtracije i GRP-a. Smanjenje procijenjene brzine glomerularne filtracije praćeno je smanjenjem razine GRP-a od 2. stadija kronične bolesti bubrega do 4. stadija, što ukazuje na GRP kao mogući rani marker povezan s bubrežnom disfunkcijom. Utvrđeno je da razina GRP-a u serumu odraslih dijabetičara progresivno opada od 2. stadija do 4. stadija kronične bolesti bubrega, korelirajući s biljezima vaskularne kalcifikacije, metabolizmom minerala i pulsnoг tlaka. Štoviše, niske razine GRP-a bile su snažno povezane s vaskularnom kalcifikacijom i pulsним tlakom, pružajući potporu hipotezi da se u ovoj populaciji smatra novim čimbenikom kardiovaskularnog rizika (57). Smanjenje razine GRP-a povezano je s povećanjem razine VC promotora; FGF-23 i kalcij-fosfat produkta, te smanjenja VC inhibitora;  $\alpha$ -Klotho, jasno pokazujući korelaciju između GRP-a i poremećaja regulacije metabolizma fosfata karakterističnog za CKD-MBD. Povezanost između visokih razina fosfata u serumu i kronične bolesti bubrega temelji se na ulozi fosfata kao poticaju za osteohondrogenu transformaciju VSMCs s kapacitetom kalcifikacije (57-59). Nadalje, dokazalo se da je GRP sastavni dio cirkulirajućih izvanstaničnih vezikula i čestica kalciproteina. Smanjena razina GRP-a u izvanstaničnim vezikulama i česticama kalciproteina u bolesnika s 5. stadijem kronične bolesti bubrega povezana je s povećanim potencijalom za induciranje kalcifikacije VSMCs

i povećanim sazrijevanjem minerala, promicanjem upale i osteohondrogene diferencijacije stanica (48). Potrebne su dodatne studije kako bi se razumjela složena interakcija i jasno odredili molekularni putevi koji vode do smanjene razine GRP-a u cirkulaciji, u situacijama povećane vaskularne kalcifikacije i smanjene funkcije bubrega (57).

## 4. RASPRAVA

U ovom preglednom radu prikazano je da GRP ima ulogu u održavanju ravnoteže kalcija u kardiovaskularnom sustavu zahvaljujući svom djelovanju kao inhibitor kalcifikacije zbog velikog afiniteta za minerale i sudjelovanje u procesu mineralizacije izvanstaničnih vezikula iz VSMCs (1). U histopatološki normalnoj ljudskoj aorti i aortalnim zaliscima, vaskularne glatke mišićne stanice i valvularne intersticijske stanice produciraju bazalnu količinu GRP-a. Međutim, s kalcifikacijom se povećava ekspresija gena i produkcija GRP-a. Imunohistokemijom su dobiveni rezultati kolokalizacije GRP-a u mineralnoj fazi. Analizom ekspresije gena otkrivena je pojačana regulacija zajedno sa osteokalcinom koji je jedan od inhibitora kalcifikacije što upućuje na korelaciju GRP-a sa osteoblastičnim valvularnim intersticijskim stanicama nakon miofibroblastične diferencijacije. Valvularne intersticijske stanice imaju veliku tendenciju diferencijacije u razne druge stanice kao što su miofibroblasti i stanice slične osteoblastima koje imaju veliki značaj u kalcifikaciji. Smatra se da su oštećenje endotela, upala i diferencijacija u stanice nalik osteoblastičnima povezani sa vaskularnom kalcifikacijom. Iako oba oblika cGRP i ucGRP imaju afinitet za vezanje kalcij-fosfatnog produkta i nalaze se u zdravim tkivima, povećana količina ucGRP-a se povezuje s patološkim stanjima. Nadalje, mjesto nakupljanja cGRP-a daje naslutiti da se cGRP više akumulira na mjestima kalcifikacije u svrhu kontrole ili ograničenja kalcifikacije (1). Korištenjem *ex vivo* modela ljudske krvne žile, dokazano je da cGRP sposoban inhibirati kalcifikaciju jednako dobro kao fetuin-A i cMGP. Iako i ucGRP u nekoj mjeri smanjuje kalcifikaciju, samo s cGRP je postignuta adekvatna inhibicija kalcifikacije. Navedeno sugerira da je  $\gamma$ -karboksilacija potrebna za inhibicijsku funkciju GRP-a u kalcifikaciji. Istraživanja su pokazala da vaskularnu kalcifikaciju obilježava smanjena ekspresija  $\alpha$ -SMA uz povećanje ekspresije osteopontina. Navedenome se suprotstavlja cGRP-u na način da povećava ekspresiju  $\alpha$ -SMA i smanjuje osteopontin što

upućuje na zaštitni učinak GRP-a na diferencijaciju VSMCs iz kontraktilne u osteohondrogeneru pod utjecajem kristala kalcij-fosfata. Uočeno je da visoki izvanstanični kalcij djeluje kao krucijalni okidač za VSMCs kalcifikaciju, tako što aktivira unutarstanične signalne puteve koji sudjeluju u sekreciji mineraliziranih komponenti izvanstaničnih vezikula (59). Smatra se da bi dodani egzogeni cGRP u VSMCs mogao djelovati kao kelator kalcija, smanjujući izvanstanični kalcij i smanjujući kalcifikaciju. Istraživanja pokazuju da GRP izravno veže kristale kalcij-fosfata in vitro i ometa sazrijevanje kristala. In vitro i ex vivo rezultati pokazuju da iako i cGRP i ucGRP imaju afinitet prema mineralima kalcija, cGRP je učinkovitiji inhibitor vaskularne kalcifikacije (1). U svrhu boljeg razumijevanje mehanizama koji uključuju GRP u vaskularnoj kalcifikaciji, dalje se istraživao odnos između GRP-a i MGP-a. Dobiveni rezultati snažno sugeriraju da je GRP dio većeg kompleksa koji sadrži MGP i fetuin-A koji djeluje na mjestima kalcifikacije. Vaskularna kalcifikacija je proces koji započinje taloženjem kalcijevog fosfata koji sadrži izvanstanične vezikule dobivene iz VSMCs, u izvanstanični matriks, stvarajući nidus kalcifikacije vrlo sličan mineralizaciji kostiju (1,60). Evidentirano je da u normalnim uvjetima, izvanstanične vezikule iz VSMCs ne kalcificiraju zbog postojanja inhibitora mineralizacije, kao što su cMGP i fetuin-A, koji djeluju blokirajući nukleaciju minerala (60). GRP je prisutan u nekalcificiranim izvanstaničnim vezikulama, a odsutan u izvanstaničnim vezikulama koji su ispunjeni kalcijem, što upućuje da je GRP važan inhibitor mineralizacije u procesu mineralizacije izvanstaničnih vezikula. Naime, važno je naglasiti da kompleks GRP-MGP-fetuin A snažno inhibira kalcifikaciju izvanstaničnih vezikula (1). Iako je GRP u fokusu ovog diplomskog rada, nekoliko je dokaza već ranije uputilo na blisku vezu između GRP, fetuin-A, i MGP. Istraživanja pokazuju da je proteinski kompleks koji sadrži GRP, fetuin-A i MGP prisutan na mjestima kalcifikacije aortnih zalistaka te da je GRP uključen u regulaciju mineralizacije izvanstaničnih vezikula

oslobođenih od VSMCs (1). Istraživanja su potvrdila prisutnost GRP u vaskularnom sustavu i da je ekspresija GRP-a značajno povećana u osteo / hondrogenim stanicama u aterosklerotskim plakovima ApoE - / - miševa, što implicira njegovu ulogu u vaskularnoj patologiji (53).

## 5. ZAKLJUČAK

U ovom radu prikazana je uloga GRP-a u vaskularnoj kalcifikaciji.

Rezultati istraživanja dokazuju sljedeće:

1. cGRP inhibira osteohondrogenu diferencijaciju vaskularnih glatkih mišićnih stanica,
2. stupanj  $\gamma$ -karboksilacije GRP-a važan je za njegovo djelovanje,
3. cGRP ima sličan kapacitet inhibicije kalcifikacije kao i MGP i fetuin-A.

Iako su mnoga pitanja još uvijek otvorena u vezi s njegovim molekularnim mehanizmom djelovanja, Gla-bogati protein se pokazao kao ključni čimbenik uključen u kardiovaskularnu kalcifikaciju, što predstavlja novi terapijski pristup kroničnim upalama i patologijama povezanim s vaskularnom kalcifikacijom.

## 6. SAŽETAK

Vaskularna kalcifikacija je složeni patološki proces koji uključuje međusobno djelovanje promotora i inhibitora kalcifikacije. Inhibitori igraju ključnu ulogu u prevenciji vaskularne kalcifikacije. Utvrđena je poveznica između vitamina K i vaskularne kalcifikacije. Najnovije otkriven vitamin K ovisni protein – Gla-bogati protein je do danas najgušći  $\gamma$ -karboksilirani protein jer sadrži najveći broj Gla- ostataka u odnosu na veličinu zrelog proteina. Njegova struktura je izvanredno očuvana tijekom evolucije kralježnjaka, ali očito izostaje u genomima ptica. Prvi puta je identificiran u jadranske jesetre, a u daljnim studijama je pronađen u tkivima miševa i ljudi. Ekspresija GRP-a je otkrivena u hrskavičnim i koštanim stanicama što upućuje na njegovu ulogu u hondrogenezi i osteogenezi. Kronične upalne bolesti su često povezane s kalcifikacijom te je dokazano da GRP djeluje i kao protuupalno sredstvo u monocitima i makrofagima. Iako su potrebna dodatna istraživanja za bolje razumijevanje molekularne funkcije GRP-a smatra se da GRP ima važnu ulogu u inhibiciji vaskularne kalcifikacije.

Ključne riječi: gla-bogati protein; vaskularna kalcifikacija; vaskularne glatke mišićne stanice



## 7. SUMMARY

Vascular calcification is a complex pathological process that involves the interaction of promoters and inhibitors of calcifications. Inhibitors play a key role in the prevention of vascular calcifications. A link between vitamin K and vascular calcification has been established. The latest discovery of vitamin K-dependent protein - Gla-rich protein is by far the densest  $\gamma$ -carboxylated protein because it contains the largest number of Gla residues relative to the size of the mature protein. Its structure has been remarkably preserved during vertebrate evolution, but it is apparently absent in the genomes of birds. It was first identified in Adriatic sturgeons, and in a further study it was found in the tissues of mice and humans. GRP expression has been detected in cartilage and bone cells suggesting its role in chondrogenesis and osteogenesis. Chronic inflammatory diseases are often associated with calcification and GRP has also been shown to act as an anti-inflammatory agent in monocytes and macrophages. Although further research is needed to better understand the molecular functions of GRP, it is believed that GRP plays an important role in inhibiting vascular calcifications.

Key words: gla rich protein; vascular calcification; vascular smooth muscle cells

## 8. LITERATURA

1. Viegas CS, Rafael MS, Enriquez JL, Teixeira A, Vitorino R, Luís IM, et al. Gla-Rich Protein Acts as a Calcification Inhibitor in the Human Cardiovascular System. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015 Feb;35(2):399-408.
2. Cancela ML, Conceição N, Laizé V. Gla-Rich Protein, a New Player in Tissue Calcification?. *Advances in Nutrition.* 2012 Mar 1;3(2):174-81.
3. Viegas CS, Simes DC. Gla-rich Protein (GRP): A New Player In The Burden Of Vascular Calcification. *J Cardiovasc Dis Diagn* [Internet]. 13.05.2016. [citirano: 22.3.2021]; 2016;4(4). Dostupno na: <https://www.hilarispublisher.com/open-access/glarich-protein-grp-a-new-player-in-the-burden-of-vascular-calcification-2329-9517-1000245.pdf>
4. Viegas CS, Simes DC, Laizé V, Williamson MK, Price PA, Cancela ML. Gla-rich Protein (GRP), A New Vitamin K-dependent Protein Identified from Sturgeon Cartilage and Highly Conserved in Vertebrates. *Journal of Biological Chemistry.* 2008 Dec;283(52):36655-64.
5. Tie J, Jin D, Straight DL, Stafford DW. Functional study of the vitamin K cycle in mammalian cells. *Blood.* 2011 Mar 10;117(10):2967-74.
6. Lanham S, Cagampang FR, Oreffo ROC. Maternal High Fat Diet Affects Offspring's Vitamin K-Dependent Proteins Expression Levels. *PLoS ONE.* 2015 Sep 18;10(9):e0138730.
7. Viegas CS, Cavaco S, Neves PL, Ferreira A, João A, Williamson MK, et al. Gla-Rich Protein Is a Novel Vitamin K-Dependent Protein Present in Serum That Accumulates at Sites of

Pathological Calcifications. *The American Journal of Pathology*. 2009 Dec;175(6):2288-98.

8. Tagariello A, Luther J, Streiter M, Didt-Koziel L, Wuelling M, Surmann-Schmitt C, et al. Ucma — A novel secreted factor represents a highly specific marker for distal chondrocytes. *Matrix Biology*. 2008 Jan;27(1):3-11.

9. Surmann-Schmitt C, Dietz U, Kireva T, Adam N, Park J, Tagariello A, et al. Ucma, a Novel Secreted Cartilage-specific Protein with Implications in Osteogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 2008 Mar;283(11):7082-93.

10. Le Jeune M, Tomavo N, Tian TV, Flourens A, Marchand N, Camuzeaux B, et al. Identification of four alternatively spliced transcripts of the Ucma/GRP gene, encoding a new Gla-containing protein ☆. *Experimental Cell Research*. 2010 Jan 15;316(2):203-15.

11. Neacsu CD, Grosch M, Tejada M, Winterpacht A, Paulsson M, Wagener R, et al. Ucmab (Grp-2) is required for zebrafish skeletal development. Evidence for a functional role of its glutamate  $\gamma$ -carboxylation. *Matrix Biology*. 2011 Sep;30(7-8):369-78.

12. Retting KN, Song B, Yoon BS, Lyons KM. BMP canonical Smad signaling through Smad1 and Smad5 is required for endochondral bone formation. *Development*. 2009 Apr 1;136(7):1093-104.

13. Wuelling M, Kaiser FJ, Buelens LA, Braunholz D, Shivdasani RA, Depping R, et al. Trps1, a regulator of chondrocyte proliferation and differentiation, interacts with the activator form of Gli3. *Developmental Biology*. 2009 Apr;328(1):40-53.

14. Bennett MR, Sinha S, Owens GK. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016 Feb 19;118(4):692-702.

15. Leto G, D'Onofrio L, Lucantoni F, Zampetti S, Campagna G, Foffi C, et al. Sclerostin is expressed in the atherosclerotic plaques of patients who undergoing carotid endarterectomy. *Diabetes Metab Res Rev.* 2019 Jan;35(1):e3069.
16. Krishna SM, Seto S, Jose RJ, Li J, Morton SK, Biros E, et al. Wnt Signaling Pathway Inhibitor Sclerostin Inhibits Angiotensin II-Induced Aortic Aneurysm and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017 Mar;37(3):553-66.
17. Kalampogias A, Siasos G, Oikonomou E, Tsalamandris S, Mourouzis K, Tsigkou V, et al. Basic Mechanisms in Atherosclerosis: The Role of Calcium. *MC.* 2016 Feb 8;12(2):103-13.
18. Naik V, Leaf EM, Hu JH, Yang H, Nguyen NB, Giachelli CM, et al. Sources of cells that contribute to atherosclerotic intimal calcification: an in vivo genetic fate mapping study. *Cardiovascular Research.* 2012 Jun 1;94(3):545-54.
19. Yahagi K, Kolodgie FD, Otsuka F, Finn AV, Davis HR, Joner M, et al. Pathophysiology of native coronary, vein graft, and in-stent atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol.* 2016 Feb;13(2):79-98.
20. Hortells L, Sosa C, Guillén N, Lucea S, Millán Á, Sorribas V. Identifying early pathogenic events during vascular calcification in uremic rats. *Kidney International.* 2017 Dec;92(6):1384-94.
21. New SEP, Aikawa E. Role of Extracellular Vesicles in De Novo Mineralization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013 Aug;33(8):1753-8.
22. Montezano AC, Zimmerman D, Yusuf H, Burger D, Chignalia AZ, Wadhera V, et al. Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation to an Osteogenic Phenotype Involves TRPM7 Modulation by Magnesium. *Hypertension.* 2010 Sep;56(3):453-62.

23. Byon CH, Chen Y. Molecular Mechanisms of Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease: The Link between Bone and the Vasculature. *Curr Osteoporos Rep*. 2015 Aug;13(4):206-15.
24. Kapustin AN, Davies JD, Reynolds JL, McNair R, Jones GT, Sidibe A, et al. Calcium Regulates Key Components of Vascular Smooth Muscle Cell-Derived Matrix Vesicles to Enhance Mineralization. *Circ Res* [Internet]. 24.06.2011. [citirano:12.06.2021.]; 109(1). Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21566214/>
25. Hortells L, Sur S, St. Hilaire C. Cell Phenotype Transitions in Cardiovascular Calcification. *Front Cardiovasc Med* [Internet]. 26.03.2018. [citirano: 12.06.2021. ]; 5:27. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29632866/>
26. Hruska KA, Mathew S, Saab G. Bone Morphogenetic Proteins in Vascular Calcification. *Circulation Research*. 2005 Jul 22;97(2):105-14.
27. Goodman WG, London G, Amann K, Block GA, Giachelli C, Hruska KA, et al. Vascular calcification in chronic kidney disease. *American Journal of Kidney Diseases* [Internet]. Ožujak 2004. [citirano:14.04.2021.]; 43(3):572-9. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14981617/>
28. Dart AM, Kingwell BA. Pulse pressure—a review of mechanisms and clinical relevance. *Journal of the American College of Cardiology*. 2001 Mar;37(4):975-84.
29. Leopold JA. Vascular calcification: Mechanisms of vascular smooth muscle cell calcification. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2015 May;25(4):267-74.
30. Tanimura A, McGregor DH, Anderson HC. Matrix Vesicles in Atherosclerotic Calcification. *Experimental Biology and Medicine*. 1983 Feb 1;172(2):173-7.

31. Eitzinger N, Surmann-Schmitt C, Bösl M, Schett G, Engelke K, Hess A, et al. Ucma is not necessary for normal development of the mouse skeleton. *Bone*. 2012 Mar;50(3):670-80.
32. Lee Y, Park S, Lee S, Boo Y, Choi J, Kim J. Ucma, a direct transcriptional target of Runx2 and Osterix, promotes osteoblast differentiation and nodule formation. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2015 Aug;23(8):1421-31.
33. Shanahan CM, Crouthamel MH, Kapustin A, Giachelli CM. Arterial Calcification in Chronic Kidney Disease: Key Roles for Calcium and Phosphate. *Circ Res*. 2011 Sep 2;109(6):697-711.
34. Li X, Yang H, Giachelli CM. BMP-2 promotes phosphate uptake, phenotypic modulation, and calcification of human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 2008 Aug;199(2):271-7.
35. Liu F, Hata A, Baker JC, Doody J, Cárcamo J, Harland RM, et al. A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator. *Nature*. 1996 Jun;381(6583):620-3.
36. Heldin C, Miyazono K, ten Dijke P. TGF- $\beta$  signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*. 1997 Dec;390(6659):465-71.
37. de Jesus Perez VA, Alastalo T, Wu JC, Axelrod JD, Cooke JP, Amieva M, et al. Bone morphogenetic protein 2 induces pulmonary angiogenesis via Wnt- $\beta$ -catenin and Wnt-RhoA-Rac1 pathways. *Journal of Cell Biology*. 2009 Jan 12;184(1):83-99.
38. Cai T, Sun D, Duan Y, Wen P, Dai C, Yang J, et al. WNT/ $\beta$ -catenin signaling promotes VSMCs to osteogenic transdifferentiation and calcification through directly modulating Runx2 gene expression. *Experimental Cell Research*. 2016 Jul;345(2):206-17.

39. Willems BA, Furmanik M, Caron MMJ, Chatrou MLL, Kusters DHM, Welting TJM, et al. Uca/GRP inhibits phosphate-induced vascular smooth muscle cell calcification via SMAD-dependent BMP signalling. *Sci Rep* [Internet]. Prosinac 2018. [citirano:14.06.2021]; 8(1):4961. Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-23353-y>
40. Palit S, Kendrick J. Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease: Role of Disordered Mineral Metabolism. *CPD*. 2014 Feb 12;20(37):5829-33.
41. Block G, Hulbert-Shearon T, Levin N, Port F. Association of serum phosphorus and calcium x phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: A national study. *American Journal of Kidney Diseases*. 1998 Apr;31(4):607-17.
42. Price PA, Lim JE. The Inhibition of Calcium Phosphate Precipitation by Fetuin Is Accompanied by the Formation of a Fetuin-Mineral Complex. *Journal of Biological Chemistry*. 2003 Jun;278(24):22144-52.
43. Holt SG, Smith ER. Fetuin-A-containing calciprotein particles in mineral trafficking and vascular disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2016 Oct;31(10):1583-7.
44. Viegas CSB, Costa RM, Santos L, Videira PA, Silva Z, Araújo N, et al. Gla-rich protein function as an anti-inflammatory agent in monocytes/macrophages: Implications for calcification-related chronic inflammatory diseases. *PLoS ONE*. 2017 May 18;12(5):e0177829.
45. Cavaco S, Viegas CSB, Rafael MS, Ramos A, Magalhães J, Blanco FJ, et al. Gla-rich protein is involved in the cross-talk between calcification and inflammation in osteoarthritis. *Cell Mol Life Sci*. 2016 Mar;73(5):1051-65.

46. Kapustin AN, Chatrou ML, Drozdov I, Zheng Y, Davidson SM, Soong D, et al. Vascular Smooth Muscle Cell Calcification Is Mediated by Regulated Exosome Secretion. *Circ Res*. 2015 Apr 10;116(8):1312-23.
47. Moe SM, Chen NX. Pathophysiology of Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease. *Circulation Research*. 2004 Sep 17;95(6):560-7.
48. Viegas CS, Santos L, Macedo AL, Matos AA, Silva AP, Neves PL, et al. Chronic Kidney Disease Circulating Calciprotein Particles and Extracellular Vesicles Promote Vascular Calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018 Mar;38(3):575-87.
49. Legein B, Temmerman L, Biessen EAL, Lutgens E. Inflammation and immune system interactions in atherosclerosis. *Cell Mol Life Sci*. 2013 Oct;70(20):3847-69.
50. Shirai T, Hilhorst M, Harrison DG, Goronzy JJ, Weyand CM. Macrophages in vascular inflammation – From atherosclerosis to vasculitis. *Autoimmunity*. 2015 Apr 3;48(3):139-51.
51. Ikeda K, Souma Y, Akakabe Y, Kitamura Y, Matsuo K, Shimoda Y, et al. Macrophages play a unique role in the plaque calcification by enhancing the osteogenic signals exerted by vascular smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012 Aug;425(1):39-44.
52. New SEP, Goettsch C, Aikawa M, Marchini JF, Shibasaki M, Yabusaki K, et al. Macrophage-Derived Matrix Vesicles. *Circ Res*. 2013 Jun 21;113(1):72-7.
53. Brånén L, Hovgaard L, Nitulescu M, Bengtsson E, Nilsson J, Jovinge S. Inhibition of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Reduces Atherosclerosis in Apolipoprotein E Knockout Mice. *ATVB*. 2004 Nov;24(11):2137-42.



54. Rosenthal AK. Crystals, inflammation, and osteoarthritis. *Current Opinion in Rheumatology*. 2011 Mar;23(2):170-3.
55. Schlieper G, Schurgers L, Brandenburg V, Reutelingsperger C, Floege J. Vascular calcification in chronic kidney disease: an update. *Nephrol Dial Transplant*. 2016 Jan;31(1):31-9.
56. Ketteler M, Block GA, Evenepoel P, Fukagawa M, Herzog CA, McCann L, et al. Executive summary of the 2017 KDIGO Chronic Kidney Disease–Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD) Guideline Update: what’s changed and why it matters. *Kidney International*. 2017 Jul;92(1):26-36.
57. Silva AP, Viegas CS, Mendes F, Macedo A, Guilherme P, Tavares N, et al. Gla-Rich Protein (GRP) as an Early and Novel Marker of Vascular Calcification and Kidney Dysfunction in Diabetic Patients with CKD: A Pilot Cross-Sectional Study. *JCM*. 2020 Feb 27;9(3):635.
58. Viegas C, Araújo N, Marreiros C, Simes D. The interplay between mineral metabolism, vascular calcification and inflammation in Chronic Kidney Disease (CKD): challenging old concepts with new facts. *Aging*. 2019 Jun 26;11(12):4274-99.
59. Cozzolino M, Ciceri P, Galassi A, Mangano M, Carugo S, Capelli I, et al. The Key Role of Phosphate on Vascular Calcification. *Toxins*. 2019 Apr 9;11(4):213.
60. Kapustin AN, Shanahan CM. Calcium Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell–Derived Matrix Vesicles. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2012 Jul;22(5):133-7.

## 9. ŽIVOTOPIS

Sara Turina rođena je 22.siječnja 1996.godine u Rijeci. Pohađala je Osnovnu školu „Gornja Vežica“, a srednjoškolsko obrazovanje stekla je u Gimnaziji „Andrija Mohorovičić“. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci upisuje 2015. godine, a diplomu stječe 2021. godine. Tijekom studija obnaša dužnost demonstratora na Katedri za anatomiju i to za hrvatske i strane studente, na hrvatskom i engleskom jeziku. Prva autorica je članka objavljenog u časopisu Medicina Fluminensis. Uz redovne studentske obveze znatan dio vremena posvetila je radu u CroMSIC-u (Međunarodna udruga studenata medicine Hrvatska) na poziciji lokalne, a zatim i nacionalne dužnosnice za profesionalne razmjene. Dodatna znanja i vještine stjecala je sudjelujući na radionicama, studentskim kongresima i znanstvenim skupovima.