

Lo stress ossidativo è ridotto in pazienti con ADPKD trattati con tolvaptan

Articoli originali

Matteo Rigato¹, Gianni Carraro¹, Irene Cirella¹, Silvia Dian¹, Valentina Di Vico¹, Verdiana Ravarotto¹, Giovanni Bertoldi¹, Lorenzo A Calò¹

1 UOC Nefrologia, Dialisi e Trapianto, Dipartimento di Medicina, Università di Padova, Padova, Italia



Lorenzo A Calò

Corrispondenza a:

Prof Lorenzo A Calò
UOC Nefrologia, Dialisi e Trapianto,
Dipartimento di Medicina,
Università di Padova,
35128 Padova
Tel 049 8213071
e-mail: renzcalo@unipd.it

ABSTRACT

La malattia renale policistica autosomica dominante (ADPKD) è la malattia renale monogenica più frequente e causa ipertensione arteriosa e malattia renale progressiva, entrambe legate allo stress ossidativo (OxSt). Il tolvaptan è una opzione di trattamento nota in ADPKD ma i meccanismi molecolari coinvolti non sono stati completamente chiariti. Questo studio valuta lo OxSt in 9 soggetti per gruppo attraverso: l'espressione proteica di p22^{phox}, lo stato della fosforilazione di MYPT-1 (Western blot) e l'eme ossigenasi-1 (HO-1) (ELISA).

L'espressione proteica di p22^{phox} era ridotta nei pazienti ADPKD trattati con tolvaptan e nei soggetti di controllo rispetto ai pazienti ADPKD non trattati: 0.86 ± 0.15 d.u. $p=0.015$; 0.53 ± 0.11 , $p<0.001$; 1.42 ± 0.11 . Lo stesso si riscontrava per la fosforilazione di MYPT-1: 0.68 ± 0.09 , $p=0.013$, 0.47 ± 0.13 , $p<0.001$, 0.96 ± 0.28 mentre HO-1 dei pazienti non trattati era ridotta sia rispetto ai controlli che ai pazienti trattati: 1.97 ± 1.22 , ng/mL, 2.08 ± 0.79 , $p=0.012$, 5.33 ± 3.34 , $p=0.012$.

I pazienti ADPKD trattati con tolvaptan presentano una riduzione dello OxSt che potrebbe contribuire a rallentare la perdita di funzione renale.

PAROLE CHIAVE: tolvaptan, ADPKD, stress ossidativo, Rho chinasi

Introduzione

La malattia renale policistica autosomica dominante (ADPKD) è un disordine genetico caratterizzato dalla comparsa di multiple cisti renali e in altri organi, come il fegato, e colpisce 12,5 milioni di persone in tutto il mondo; si riscontra nel 10% dei pazienti affetti da insufficienza renale allo stadio terminale. L'ADPKD è caratterizzata dal progressivo sviluppo e crescita delle cisti con sovertimento del parenchima renale, associato ad ipertensione, dolore addominale, sanguinamento delle cisti con macroematuria, nefrolitiasi, infezioni delle cisti [1].

La ADPKD è causata da mutazioni nei geni PKD1 (75-78% dei casi) o PKD2 (15%). PKD1, situato sul cromosoma 16 (16p13.3) codifica per la policistina-1 (PC1), una glicoproteina multidominio che viene scissa in un sito proteolitico del recettore accoppiato alla proteina G. PKD2, localizzato sul cromosoma 4 (4q21), codifica per la policistina-2 (PC2), una proteina appartenente alla famiglia dei canali cationici regolati dal calcio. Gli studi ora supportano un ruolo inibitorio di PC1 e PC2 sulla cistogenesi [2]. La perdita di PC1 o PC2 è infatti associata a basse concentrazioni di calcio intracellulare, che determina un aumento dell'attività dell'adenilciclasi e ridotta attività della fosfodiesterasi 1, ed eccessive concentrazioni di AMP ciclico (cAMP) e conseguente cistogenesi attraverso l'attivazione delle vie di proliferazione e secrezione [2].

Studi preclinici hanno dimostrato il ruolo del signaling di cAMP mediato da arginina-vasopressina come fattore determinante nell'ADPKD della proliferazione cistica e secrezione di liquidi. In modelli murini la soppressione di vasopressina, l'antagonismo del recettore V2 della vasopressina o il silenziamento della vasopressina hanno determinato un miglioramento del processo di aumento di volume delle cisti [3].

Tolvaptan, un'antagonista del recettore V2 della vasopressina, si è dimostrato efficace nel rallentare l'aumento del volume renale totale ed è ora una consolidata opzione di trattamento per i pazienti con ADPKD [4].

Lo stress ossidativo (OxSt), l'infiammazione e la disfunzione endoteliale hanno un ruolo chiave nell'induzione di aterogenesi, malnutrizione e anemia nei pazienti con malattia renale cronica; OxSt è uno dei principali fattori che contribuiscono alla progressione della malattia renale cronica (CKD) [5,6]. I pazienti con CKD hanno infatti un aumento di OxSt legato alla riduzione di antiossidanti e alla ridotta biodisponibilità dell'ossido nitrico (NO) [7–9].

Nell'ADPKD l'anomalia di PC1 o PC2 è stata associata ad una riduzione mediata dallo OxSt della biodisponibilità di NO con conseguente disfunzione endoteliale, insorgenza di ipertensione arteriosa e rimodellamento cardiovascolare che contribuiscono alla progressione dell'ADPKD e della CKD [10]. L'associazione tra ADPKD e disfunzione endoteliale conseguente all'aumentato stress ossidativo è stata confermata [11] e markers di disfunzione endoteliale e di stress ossidativo sono risultati elevati in pazienti con ADPKD con funzione renale moderatamente ridotta ed associati al declino dell'eGFR [12]. Il sistema RhoA/Rho chinasi (ROCK) [10] svolge un ruolo chiave nell'induzione del signaling dello OxSt [5,13,14] e l'attivazione di questa pathway porta al rimodellamento cardiovascolare e renale, essenzialmente attraverso l'induzione di OxSt e la riduzione della biodisponibilità di NO [5,13–15].

L'impatto di OxSt e l'effetto di tolvaptan su OxSt nell'ADPKD sono stati valutati in modelli animali o nell'uomo attraverso la determinazione di marcatori biochimici correlati a OxSt e all'infiammazione [10–12] mentre non sono disponibili studi che valutino nell'uomo a livello molecolare sia l'espressione di proteine strettamente legate allo OxSt e al suo signaling che l'effetto di tolvaptan sulla loro espressione.

A tal fine, utilizzando un approccio biologico molecolare, abbiamo valutato in questo studio, *ex vivo* in pazienti con ADPKD trattati con tolvaptan, lo stato dello OxSt in termini di: espressione proteica

nelle cellule mononucleate di p22^{phox}, subunità della NADPH ossidasi, chiave nel trasferimento dell'elettrone per generare anione superossido [16]; stato di fosforilazione di MYPT-1, marker dell'attività della pathway RhoA/ROCK [13–15]; livelli di HO-1, proteina indotta e protettiva verso lo OxSt [17]. Questo gruppo di pazienti è stato confrontato con un gruppo ADPKD con funzionalità renale normale non trattati e con un gruppo di soggetti sani.

Pazienti e Metodi

Pazienti

Sono stati arruolati in questo studio nove pazienti ADPKD della nostra coorte, 5 femmine e 4 maschi, età media 46 ±5 anni, in trattamento con tolvaptan, seguiti presso il nostro ambulatorio dedicato. Nove pazienti ADPKD non trattati, 7 femmine e 2 maschi, età media 34 ±11 anni, con funzione renale normale (eGFR >80 mL/min/1,73m²), e nove soggetti sani, 5 maschi e 4 femmine, età media 31 ±5 anni, sono stati utilizzati come gruppi di controllo.

Tutti i partecipanti hanno fornito il consenso informato allo studio che ha richiesto solo un campione di sangue ottenuto al momento dell'esecuzione dei loro test di controllo biochimici normalmente programmati.

Valutazioni biologico-molecolari

Sono state isolate le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) da 20 mL di sangue anticoagulato con acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) usando Lympholyte-H (Cedarlane, Burlington, Canada). L'espressione proteica di p22^{phox} e lo stato di fosforilazione di MYPT-1 sono stati valutati mediante l'analisi Western blot, come precedentemente riportato [8,9].

Espressione proteica di p22^{phox} e lo stato di fosforilazione di MYPT-1

In breve, l'estratto proteico totale è stato ottenuto per lisi delle cellule mononucleate usando il tampone buffer Tris HCl 20 mmol/L, NaCl 150 mmol/L, EDTA 5.0 mmol/L, Niaproof 1.5%, Na₃VO₄ 1.0 mmol/L, SDS 0.1%, PMSF 0.5 mmol/L con l'aggiunta di un cocktail di inibitori delle Proteasi (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) e di un cocktail Phosphatase Inhibitor (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA).

La concentrazione proteica è stata misurata con bicinchoninic acid assay (BCA Protein Assay; Pierce). Le proteine sono state separate usando SDS-PAGE in Tris pH 8.3. Il trasferimento delle proteine sulle membrane di nitrocellulosa è stato effettuato con Hoefer TE 22 Mini Tank Transfer Unit (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) con l'uso del seguente tampone di trasferimento: 39 mmol/L glycine, 48 mmol/L Tris base, 0.037% SDS (electrophoresis grade), e 20% metanolo. Le membrane sono state incubate per tutta la notte con un anticorpo policlonale primario per l'individuazione di una specifica proteina: anti-p22^{phox} (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA), antiphospho-MYPT (Cell Signaling technology, Danvers, Massachusetts, USA), and anti-MYPT (Cell Signaling technology, Danvers, Massachusetts, USA).

Sono stati poi utilizzati anticorpi secondari HRP-conjugated (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden) e le proteine immunoreattive sono state visualizzate con metodo chemiluminescente usando SuperSignal WestPico Chemiluminescent Substrate (Pierce).

La fosforilazione di MYPT-1 è stata valutata attraverso un'analisi densitometrica semiquantitativa usando il software NIH image. Il rapporto tra phospho-MYPT-1 and MYPT-1 è stato usato come indice della fosforilazione di MYPT-1.

Livello della proteina HO-1

Il livello della proteina HO-1 è stato misurato utilizzando un kit Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) disponibile in commercio (IMMUNOSET® HO-1 human, ELISA development set, Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA). In breve, seguendo le istruzioni del produttore, 100 mg del campione sono stati messi in piastre ed incubati con l'anticorpo HO-1 di cattura. Dopo opportuni lavaggi, un anticorpo rilevatore per HO-1 è stato aggiunto e quindi incubato con streptavidina coniugata alla horseradish peroxidase. Infine, dopo un ulteriore lavaggio la piastra è stata incubata con substrato TMB substrate e bloccata con HCl 1N e letta a 450 nm su un Enight™ Multimode Plate Reader (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA). I valori sono stati espressi in ng/mL.

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, California, USA). I dati sono stati espressi come media \pm deviazione standard. L'ANOVA è stata utilizzata per confrontare le variabili quantitative tra gruppi ed il test t di Student per dati appaiati. Valori del 5% o meno ($p < 0,05$) sono stati considerati significativi.

Risultati

La funzione renale come creatinemia ed eGFR dei pazienti ADPKD trattati con tolvaptan era: $126,3 \pm 13,3$ $\mu\text{mol/L}$ e $53,8 \pm 4,6$ ml/min/ $1,73$ m² rispettivamente. La creatinemia e l'eGFR dei pazienti con ADPKD non trattati erano rispettivamente $78,67 \pm 11,98$ $\mu\text{mol/L}$ e $91,44 \pm 14,07$ ml/min/ $1,73$ m².

Espressione proteica di p22^{phox}

Come mostrato in Figura 1 A l'espressione proteica di p22^{phox} era significativamente più elevata nei pazienti con ADPKD non trattati rispetto ai pazienti con ADPKD trattati con tolvaptan e ai soggetti sani: $1,42 \pm 0,11$ d.u. vs $0,86 \pm 0,15$, $p=0,015$, vs $0,53 \pm 0,11$, $p<0,001$, rispettivamente.

Stato di fosforilazione MYPT-1

Lo stato di fosforilazione di MYPT-1 era significativamente più elevata nei pazienti con ADPKD non trattati rispetto sia ai pazienti con ADPKD trattati con tolvaptan che ai soggetti sani: $0,96 \pm 0,28$ d.u. vs $0,68 \pm 0,09$, $p=0,013$ e vs $0,47 \pm 0,13$, $p<0,001$, rispettivamente (Figura 1 B).

Livello della proteina HO-1

La Figura 2 mostra che HO-1 era significativamente ridotto nei pazienti con ADPKD non trattati rispetto ai soggetti sani ed ai pazienti con ADPKD trattati con tolvaptan: $1,97 \pm 1,22$; $2,08 \pm 0,79$, $p=0,012$, $5,33 \pm 3,4$ ng/ml, $p=0,012$.

Discussione

Il nostro studio mostra, a livello biologico-molecolare, che nei pazienti con ADPKD vi è un'attivazione dello OxSt e che il trattamento con tolvaptan si associa non solo alla riduzione di proteine strettamente coinvolte nel signaling dello OxSt, nell'infiammazione e nel rimodellamento cardiovascolare-renale ma anche all'induzione di meccanismi di difesa/protezione verso lo OxSt. Infatti, lo OxSt come espressione proteica di p22^{phox} e stato della fosforilazione di MYPT-1 è significativamente più elevato nei pazienti con ADPKD non trattati, mentre è significativamente ridotto nei pazienti con ADPKD trattati con tolvaptan. Inoltre, il livello di HO-1 dei pazienti con ADPKD trattati con tolvaptan è significativamente più elevato rispetto ai pazienti con ADPKD non trattati.

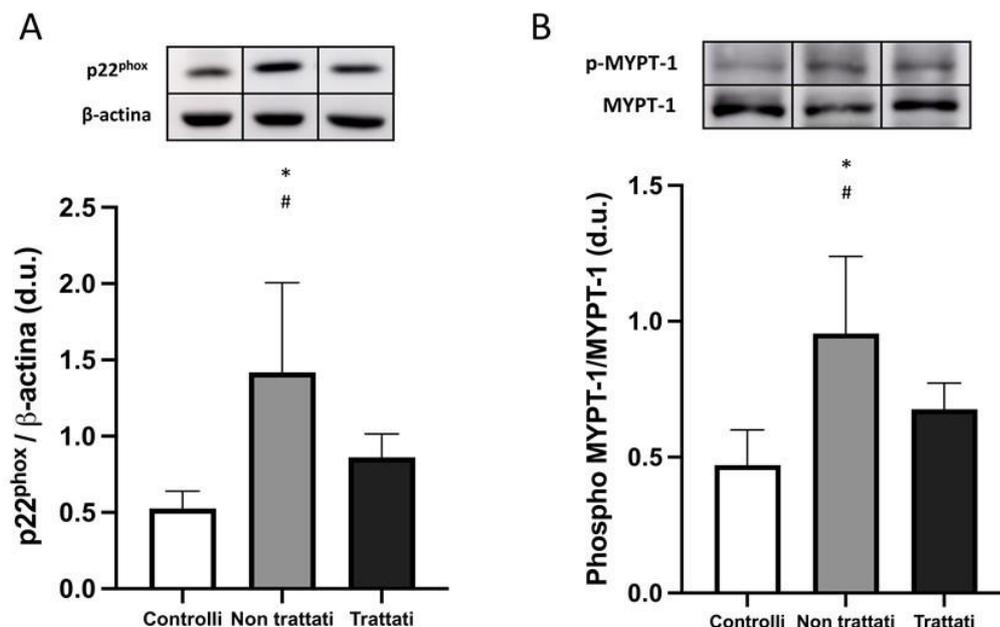


Figura 1: A) L'espressione proteica di p22^{phox} è significativamente aumentata nei pazienti ADPKD non trattati in confronto ai pazienti ADPKD trattati (#: p=0.015) ed ai oggetti di controllo(*: p<0.001). La parte alta della figura mostra i prodotti di un Western Blot rappresentativo di un soggetto di controllo, di un paziente ADPKD trattato e di un paziente non trattato. B) Lo stato di fosforilazione di MYPT-1 è significativamente aumentato nei pazienti ADPKD non trattati in confronto ai pazienti ADPKD trattati (#:p=0.013) ed ai soggetti di controllo (*: p<0.001). La parte alta della figura mostra i prodotti di un Western Blot rappresentativo di un soggetto di controllo, di un paziente ADPKD trattato e di un paziente non trattato.

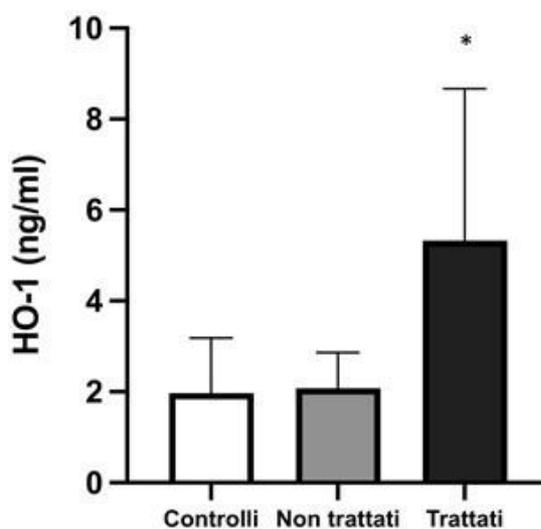


Figura 2: La concentrazione proteica di HO-1 è significativamente ridotta nei pazienti ADPKD non trattati in confronto sia ai controlli che ai pazienti ADPKD trattati con tolvaptan (*: p=0.012)

La p22^{phox} è una subunità della NADPH ossidasi presente sia nei leucociti che nella parete vascolare e funge da subunità essenziale del trasporto finale degli elettroni da NADPH all'eme e all'ossigeno molecolare per generare O₂⁻ [17]. Nei pazienti con ADPKD trattati con tolvaptan, la riduzione del livello della proteina p22^{phox} suggerisce non solo una riduzione dello OxSt, ma anche un'inibizione dell'attivazione leucocitaria, causa nota di OxSt nella CKD. Di conseguenza, questa riduzione dell'espressione proteica di p22^{phox} suggerisce un'inibizione dei meccanismi indotti dal signaling

dello OxSt noti come responsabili del rimodellamento vascolare e dell'aterogenesi [5,6].

La pathway RhoA/ROCK è un'altra signaling pathway fondamentale nei processi coinvolti nello OxSt [13–15]. La sua attivazione induce OxSt attraverso l'attivazione della NADPH ossidasi e l'attivazione di RhoA/ROCK è coinvolta nell'effetto vascolare dello OxSt [13–15]. È stato inoltre recentemente dimostrato che l'attivazione di RhoA/ROCK è indotta a seguito dell'inattivazione di PKD-1 tramite l'attivazione di proteine coinvolte nella cistogenesi [18–19], mentre l'inibizione di ROCK riduce l'attività di proteine coinvolte nella cistogenesi, che sono invece stimulate sia in cellule cistiche con PKD1 mutato che in campioni di tessuto renale cistico di pazienti con ADPKD [18–19].

L'eme ossigenasi-1 (HO-1) valutata in questo studio è l'isoforma inducibile di HO che è protettiva nei riguardi di processi ossidativi. HO-1 agisce sull'eme, producendo CO e biliverdina, che viene ulteriormente metabolizzata a bilirubina, un potente antiossidante essa stessa. Esistono tre diverse isoforme di HO: HO-1, HO-2 e HO-3. HO-1 ha un'espressione basale molto bassa ma aumenta rapidamente in presenza di stress ossidativo, mentre HO-2 e HO-3 sono costitutivamente espresse [20]. L'HO-1 media la produzione del vasodilatatore CO e contribuisce alla regolazione del tono vascolare e quindi della pressione arteriosa e della funzione endoteliale. Infine, HO-1 ha dimostrato a lungo termine di avere un effetto antinfiammatorio e antiproliferativo [17,21,22].

Tolvaptan è un antagonista del recettore V2 dell'arginina-vasopressina ed il suo uso terapeutico è attualmente indicato per rallentare la progressione dello sviluppo di cisti e dell'insufficienza renale associata all'ADPKD [4]. È stato evidenziato in un modello animale che il trattamento cronico con tolvaptan riduceva significativamente la stimolazione delle subunità di NADPH ossidasi compresa la p22^{phox}, inibiva l'espressione e la fosforilazione di RhoA e la fosforilazione di MYPT-1 [23]. È stato anche dimostrato [24] che l'espressione proteica di NFκB delle cellule endoteliali vascolari era aumentata nell'ADPKD, indicando la presenza di uno stato infiammatorio. Inoltre, l'aumento di OxSt e dell'infiammazione probabilmente contribuisce alla diminuzione della biodisponibilità di NO, come mostrato dalla compromissione della dilatazione endotelio NO-dipendente nei pazienti ADPKD [11]. Infine, è stato anche dimostrato che nelle cellule mpkCCD e nella midollare esterna di reni di topo, il tolvaptan aumentava l'espressione genica e proteica di HO-1 [25].

Conclusioni

I risultati del nostro studio mostrano per la prima volta *ex vivo* nell'uomo che il trattamento con tolvaptan nei pazienti con ADPKD si associa ad una riduzione dello OxSt e ad un aumento di HO-1, protettivo verso OxSt. Sebbene ottenuti da una piccola coorte di pazienti, tuttavia in linea con la natura dell'approccio biologico molecolare dello studio, i nostri risultati supportano quelli ottenuti da studi *in vitro* o su modelli animali, e forniscono nei pazienti con ADPKD trattati con tolvaptan, un razionale meccanicistico per la protezione verso il peggioramento della funzione renale, il danno endoteliale e l'ipertensione arteriosa attraverso la riduzione di OxSt.

BIBLIOGRAFIA

1. Chapman AB, Devuyst O, Eckardt KU, et al. Autosomal-dominant polycystic kidney disease (ADPKD): Executive summary from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney Int* 2015; 88:17-27. <https://doi.org/10.1038/ki.2015.59>
2. Harris PC, Torres VE. Genetic mechanisms and signaling pathways in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Clin Invest* 2014; 124:2315-24. <https://doi.org/10.1172/JCI72272>
3. Wang X, Wu Y, Ward C.J, Harris PC, Torres VE. Vasopressin directly regulates cyst growth in polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19:102-08. <https://doi.org/10.1681/ASN.2007060688>
4. Gansevoort RT, Arici M, Benzing T, et al. Recommendations for the use of tolvaptan in autosomal dominant polycystic kidney disease: a position statement on behalf of the ERA-EDTA Working Groups on Inherited Kidney Disorders and European Renal Best Practice. *Nephrol Dial Transplant* 2016; 31:337-48. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfv456>
5. Ravarotto V, Simioni F, Pagnin E, Davis PA, Calò LA. Oxidative stress—Chronic kidney disease—Cardiovascular disease: A vicious circle. *Life Sci* 2018; 210:125-31. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.08.067>
6. Ravarotto V, Bertoldi G, Innico G, Gobbi L, Calò LA. The Pivotal Role of Oxidative Stress in the Pathophysiology of Cardiovascular-Renal Remodeling in Kidney Disease. *Antioxidants (Basel)* 2021; 10(7):1041. <https://doi.org/10.3390/antiox10071041>
7. Calò LA, Naso A, Carraro G, et al. Effect of haemodiafiltration with online regeneration of ultrafiltrate on oxidative stress in dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22:1413-19. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfl783>
8. Calò LA, Naso A, D'Angelo A, et al. Molecular biology-based assessment of vitamin E-coated dialyzer effects on oxidative stress, inflammation, and vascular remodeling. *Artif Organs* 2011; 35:E33-39. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2010.01125.x>
9. Calò LA, Vertolli U, Pagnin E, et al. Increased rho kinase activity in mononuclear cells of dialysis and stage 3-4 chronic kidney disease patients with left ventricular hypertrophy: Cardiovascular risk implications. *Life Sci* 2016; 148:80-85. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.02.019>
10. Andries A, Daenen K, Jouret F, et al. Oxidative stress in autosomal dominant polycystic kidney disease: player and/or early predictor for disease progression? *Pediatr Nephrol* 2019; 34:993-1008. <https://doi.org/10.1007/s00467-018-4004-5>
11. Raptis V, Georgianos PI, Sarafidis PA, et al. Elevated asymmetric dimethylarginine is associated with oxidant stress aggravation in patients with early stage autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Blood Press Res* 2013; 38:72-82. <https://doi.org/10.1159/000355756>
12. Klawitter J, Reed-Gitomer BY, McFann K, et al. Endothelial dysfunction and oxidative stress in polycystic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2014; 307:F1198-206. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00327.2014>
13. Calò LA, Pessina AC. RhoA/rho-kinase pathway: Much more than just a modulation of vascular tone. evidence from studies in humans. *J Hypertens* 2007; 25:259-64. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e328010d4d2>
14. Calò LA, Davis PA, Pagnin E, et al. Increased level of p63RhoGEF and RhoA/Rho kinase activity in hypertensive patients. *J Hypertens* 2014; 32:331-38. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000000075>
15. Seccia TM, Rigato M, Ravarotto V, Calò LA. ROCK (RhoA/Rho Kinase) in Cardiovascular-Renal Pathophysiology: A Review of New Advancements. *J Clin Med* 2020; 9:1328. <https://doi.org/10.3390/jcm9051328>
16. Ishikawa M, Kobayashi N, Sugiyama F, Onoda S, Ishimitsu T. Renoprotective effect of vasopressin v2 receptor antagonist tolvaptan in Dahl rats with end-stage heart failure. *Int Heart J* 2013; 54:98-106. <https://doi.org/10.1536/ihj.54.98>
17. Nowak KL, Wang W, Farmer-Bailey H et al. Vascular Dysfunction, Oxidative Stress, and Inflammation in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2018; 13:1493-501. <https://doi.org/10.2215/CJN.05850518>
18. Fujiki T, Ando F, Murakami K, et al. Tolvaptan activates the Nrf2/HO-1 antioxidant pathway through PERK phosphorylation. *Sci Rep* 2019; 9:9245. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45539-8>
19. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: Role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000; 86:494-501. <https://doi.org/10.1161/01.RES.86.5.494>
20. Immenschuh S, Ramadori G. Gene regulation of heme oxygenase-1 as a therapeutic target. *Biochem Pharmacol* 2000; 60:1121-28. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(00\)00443-3](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(00)00443-3)
21. Cai J, Song X, Wang W, et al. A RhoA-YAP-c-Myc signaling axis promotes the development of polycystic kidney disease. *Genes Dev* 2018; 32:781-93. <https://doi.org/10.1101/gad.315127.118>
22. Ma S, Guan KL. Polycystic kidney disease: a Hippo connection. *Genes Dev* 2018; 32:737-39. <https://doi.org/10.1101/gad.316570.118>

23. Nath KA. Heme oxygenase-1: a provenance for cytoprotective pathways in the kidney and other tissues. *Kidney Int* 2006; 70:432-43.
<https://doi.org/10.1038/sj.ki.5001565>
24. Nath KA, Vercellotti GM, Grande JP et al. Heme protein-induced chronic renal inflammation: suppressive effect of induced heme oxygenase-1. *Kidney Int* 2001; 59:106-17.
<https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.00471.x>
25. Kim YM, Pae HO, Park JE, et al. Heme oxygenase in the regulation of vascular biology: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2011; 14:137-67.
<https://doi.org/10.1089/ars.2010.3153>