EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Gyulladásos szöveti mediátorok vazomotorikus hatásai Csató Viktória Témavezető: Prof. Dr. Papp Zoltán



DEBRECENI EGYETEM LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA Debrecen, 2015

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	. 5
2. Bevezetés	. 6
3. Irodalmi áttekintés	.7
3.1. Reaktív oxigén vegyületek	. 7
3.2. A hidrogén-peroxid, mint reaktív vegyület	. 8
3.3. A hidrogén-peroxid, mint vazoaktív anyag	. 8
3.4. Mieloperoxidáz: struktúra és funkció	10
3.5. A mieloperoxidáz által katalizált reakció	10
3.6. A mieloperoxidáz és a hidrogén-peroxid szerepe kardiovaszkuláris	
kórfolyamatokban	11
4. Célkitűzések	14
5. Anyagok és módszerek	15
5.1. Preparátumok előkészítése	15
5.2. Az érttmérő vizsgálata izolált mikroereken	15
5.3. Izometrikus kontrakciómérés	17
5.4. A hidrogén-peroxid érátmérőre gyakorolt hatásainak vizsgálata	18
5.5 A mieloperoxidáz érátmérőre gyakorolt hatásainak vizsgálata	20
5.6. Izometrikus kontrakció vizsgálata baziláris artériákon	21
5.7. Az intracelluláris Ca ²⁺ koncentráció és az érátmérő párhuzamos vizsgálata	21
5.8. A mieloperoxidáz klorinációs aktivitásának vizsgálata L-metionin jelenlétében	22
5.9. Immunhisztokémia	22

	5.10. Statisztika	23
6. 1	Eredmények	24
	6.1. A hidrogén-peroxid által kiváltott vaszkuláris hatások	24
	6.2. A hidrogén-peroxid által kiváltott vazokonstrikció endotélium-függő folyamat	26
	6.3. A hidrogén-peroxid által kiváltott endoteliális szignalizáció ciklooxigenáz aktiváció	ot
	eredményez	26
	6.4. Hidrogén-peroxid által kiváltott érátmérő változások szelektív és nem szelektív	
	ciklooxigenáz gátlószerek jelenlétében	27
	6.5. A hidrogén-peroxid által aktivált vazokonstrikcióhoz vezető effektor mechanizmus	28
	6.6. A hidrogén-peroxid növeli a vaszkuláris simaizomsejtek Ca ²⁺ érzékenységét	31
	6.7. A mieloperoxidáz fokozza a hidrogén-peroxid által kiváltott vazokonstrikciót	32
	6.8. A mieloperoxidáz vaszkuláris hatásai hipoklórossav közvetítésével valósulnak meg	
	vázizom arteriolákon	33
	6.9. Hidrogén-peroxid által kiváltott vazodilatáció mieloperoxidáz és L-Metionin	
	jelenlétében	36
	6.10. A mieloperoxidáz által kiváltott vazokonstrikció mechanizmusa vázizom	
	areriolákon	36
	6.11. A vaszkuláris ciklooxigenáz expresszió vizsgálata vázizom arteriolákon	39
	6.12. A mieloperoxidáz által kiváltott vazokonstrikció Ca ²⁺ érzékenyítés révén valósul	
	meg	40
	6.13. A hidrogén-peroxid és a mieloperoxidáz hatásmechanizmusa vázizom arteriolákon	1 41
7. I	Megbeszélés	44
	7.1. A hidrogén-peroxid által kiváltott vaszkuláris hatások vizsgálata	44

7.2. A mieloperoxidáz hatása a hidrogén-peroxid által kiváltott érválaszokra	
8. Az értekezésben szereplő új tudományos eredmények	51
9. Összefoglalás	52
10. Summary	53
11. Irodalomjegyzék	54
12. Tárgyszavak	66
13. Keywords	66
14. Köszönetnyilvánítás	67
15. Függelék	

1. Rövidítések jegyzéke

- 1. AA arachidonsav
- 2. APF nonfluoreszcens szubsztrát
- 3. COX ciklooxigenáz enzim
- 4. EDHF endotélium-függő hiperpolarizáló faktor
- 5. H₂O₂ hidrogén-peroxid
- 6. HOCl hipoklórossav
- 7. L-met L-metionin
- 8. MPO mieloperoxidáz
- 9. NO nitrogén-monoxid
- 10. TXA2 tromboxán A2

2. Bevezetés

Számos gyakori - a társadalom nagy hányadát érintő - betegség valójában közös okokra vezethető vissza. A magas vérnyomás, az iszkémiás szívbetegség, a stroke és a perifériás érszűkület valójában mind érbetegség, éppen ezért kulcsfontosságú feladat az érfalban lejátszódó élettani és patológiás folyamatok részletes megértése. Egy adott ér aktuális átmérőjét rendkívül sok tényező befolyásolja és ennek megfelelően jó néhány molekuláris jelátviteli útvonal eredő hatása érvényesül. Az egyik ilyen tényező az ereket érintő gyulladásos folyamat.

A gyulladás a szervezet védekező mechanizmusa, amely különféle károsító hatásokkal szemben segít megőrizni a test integritását, épségét. A gyulladásos reakció szemmel látható jellemzőit már Celsus (1. század) is leírta: duzzanat (tumor), vöröses szín (rubor), fájdalom (dolor), melegség (calor)^(1, 2). Tudjuk, hogy a jelenségek hátterében részben helyi értágulat áll, de a gyulladás során az érátmérőt aktuálisan meghatározó összes tényezőt még korántsem ismerjük. Sok, a gyulladásban részt vevő anyagról, molekuláról leírták, hogy rendelkezik vazoaktív hatásokkal is (például hisztamin, tromboxánok, prosztaglandinok, szabad gyökök) és a nemzetközi szakirodalomban is egyre több publikáció jelenik meg ebben a témakörben ⁽³⁻⁶⁾. Az említett folyamatok hátterében álló mechanizmusok megértésének tehát nagy a klinikai jelentősége, ezért fontossá vált az olyan lokálisan ható gyulladásos mediátorok vazoaktív hatásainak feltérképezése is, mint amilyen a mieloperoxidáz (MPO) enzim. A MPO bonyolítja, vaszkuláris hatásainak elemzését hogy а szubsztrátjaként szereplő hidrogén-peroxid (H₂O₂) önmagában is rendelkezik érhatásokkal. Ezért a MPO által kiváltott hatásokat a H₂O₂-dal együtt célszerű értékelni.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Reaktív oxigén vegyületek

Reaktív oxigén származékok (ROS, reactive oxygen species) normál körülmények között is jelen vannak a biológiai rendszerekben és hozzájárulnak többek között a szervezet kórokozókkal szembeni védelméhez, valamint az értónus szabályozásához is (7). Patológiás körülmények között azonban termelődésük fokozott mértékű, és így oxidatív stresszt létrehozva különböző makromolekulák (lipidek, fehérjék, szénhidrátok) funkcionális és morfológiai károsodását okozzák ^(8, 9). A reaktív oxigén vegyületek káros hatásának kivédésére szervezetünk bonyolult védekező rendszerrel rendelkezik, amely antioxidáns hatású vitaminokat és enzimeket, valamint kéntartalmú aminosavakat egyaránt tartalmaz⁽¹⁰⁾. Az oxidatív stressz elleni védekező rendszer részét képezik továbbá azok az effektor molekulák, melyek a sérült szövetrészek javításában, illetve eltávolításában vesznek részt (hősokkfehérjék, DNS javító enzimek, stb.)⁽¹¹⁾. A szabad gyökökre jellemző, hogy az atomok külső elektronhéján párosítatlan elektron található. Mivel az elektronpályák akkor stabilak, ha az elektronok párokban helyezkednek el, a szabad gyökök igen reaktívak és általában rövid élettartamúak⁽¹²⁾. Reaktív vegyületek közé sorolunk olyan molekulákat is, melyek nem rendelkeznek ugyan párosítatlan elektronnal, viszont reaktivitásuk a szabad gyökökéhez hasonló, ilyen vegyület a H₂O₂ vagy a hipoklórossav (HOCl) ⁽¹³⁾. A reaktív vegyületek elsősorban a mitokondriumokban keletkeznek, az oxidatív foszforiláció és a celluláris aerob (14) metabolizmus folvamán Szabad gyököket termelnek mitokondriális а elektrontranszportlánc enzimei: a xantin-oxidáz, a NADPH-oxidáz, a citokróm p450, továbbá a nitrogén-monoxid-szintáz, ciklooxigenáz izoenzimek, a lipoxigenázok és a monooxigenázok is (14-16).

3.2. A hidrogén-peroxid, mint reaktív vegyület

A szuperoxid anion (O_2^{-}) legjelentősebb forrása a NADPH-oxidáz enzim ^(17, 18). A O_2^{-} az endotélsejtekben kis mértékben, konstitutívan termelődik ⁽¹⁹⁾, valamint kulcsszerepet játszik a fagocita sejtek baktériumölő hatásában ⁽²⁰⁾. A O_2^{-} alacsony pH-jú közegben spontán módon, magasabb pH mellett nagyrészt a szuperoxid dizmutáz (SOD) enzim által H₂O₂-dá és molekuláris oxigénné alakul ^(12, 21). A vaszkuláris szövetekben az endotélsejtek, a simaizomsejtek és a fibroblasztok is képesek H₂O₂-ot termelni, de mennyisége gyulladásos körülmények között a fehérvérsejt aktiváció következtében is jelentősen nő ⁽²²⁻²⁴⁾. A H₂O₂ nem rendelkezik párosítatlan elektronnal, viszont féléletideje sokkal hosszabb, stabilabb molekula, mely károsíthatja a DNS-t, valamint lipidperoxidációra is képes ⁽¹³⁾. Továbbá fontos megjegyeznünk, hogy adott körülmények között a H₂O₂ más reaktív vegyületekké is átalakulhat, így például vastartalmú anyagok jelenlétében a Fenton-reakció során hidroxilgyök, míg MPO hatására HOCl keletkezéséhez járul hozzá ^(2, 25). Az erekben jelenlévő H₂O₂ valós koncentrációjának becslése nehéz feladat, egyes szerzők szerint patológiás körülmények között akár közel mmol/L (0,3 mM) nagyságrendben is keletkezhet ^(24, 26, 27).

3.3. A hidrogén-peroxid, mint vazoaktív anyag

A H_2O_2 a szervezetben élettani körülmények között is megtalálható és önálló vaszkuláris hatásokkal rendelkezik, melyet már számos értípusban tanulmányoztak. Legtöbben a vazodilatációt kiváltó hatásának mechanizmusát vizsgálták. Feltételezik, hogy a H_2O_2 , mint endotélium eredetű hiperpolarizáló faktor (EDHF) vazodilatációt vált ki humán koronária és mezenteriális arteriolákban ^(28, 29). Ezenkívül fontos szerepe van az áramlás indukálta vazodilatáció kialakításában szintén humán koronária arteriolákban ^(30, 31), valamint feltételezhetően egy tartalék dilatációs mechanizmust képvisel, ha a nitrogén-monoxid (NO) szintje csökken ⁽³²⁾. Ezzel ellentétben a H_2O_2 vazokonstriktív hatását tapasztalták patkány vese artérián ^(33, 34), aortán ⁽³⁵⁾, nyúl pulmonáris artérián ⁽³⁶⁾, és kutya bazilaris artérián ⁽³⁷⁾. Érdekes módon a H_2O_2 koncentrációfüggő bifázisos választ (kis koncentrációban konstrikció, nagyobb koncentrációkban dilatáció) vált ki patkány vázizom és mezenteriális arteriolákon ^(24, 38).

Ezen változatos vazoaktív tulajdonságainak megfelelően a H2O2 számos jelátviteli útvonal aktiválására képes, melyeknek néhány elemét mások korábban már tanulmányozták. Megfigyelték például, hogy kutya cerebrális arteriolákon a H₂O₂ az arachidonsav (AA) metabolizmus aktiválásával és következményes cAMP (ciklikus-adenozin-monofoszfát) (39) felszabadítással vált vazodilatációt A H_2O_2 aktiválja a NO/cGMP ki (ciklikus-guanozin-monofoszfát) útvonalat, mely dilatációt okoz patkány vázizom arteriolákon és nyúl aortában ^(24, 40). A megnövekedett cGMP szint endoteliális prosztaglandinok felszabadulásához majd vazodilatációhoz vezet sertés koronária arteriolákon ⁽⁴¹⁾. A vaszkuláris simaizomsejteken található K⁺ csatornák aktiválásával a vazodilatáció endotél-független módon is létrejöhet (42-45).

Hasonló módon a H_2O_2 számos szignalizációs útvonal aktiválódása következtében válthat ki vazokonstrikciót is, mely útvonalak elemei fajtól, illetve értípustól függően különbözőek lehetnek. Így feltételezik a ciklooxigenáz (COX) enzim származékok ^(24, 33, 34, 46), tirozin-kinázok ^(33, 47), valamint a mitogén aktiválta protein kinázok ⁽⁴⁷⁻⁴⁹⁾ szerepét a vazokonstrikció mechanizmusában. Az sem tejesen tisztázott, hogy ezen útvonalak végeredményben az intracelluláris Ca²⁺ koncentráció emelkedéséhez vezetnek-e. Egyes kísérleti eredmények szerint a H₂O₂ által kiváltott vazokonstrikció Ca²⁺-függő útvonalak aktiválódása által valósul meg ^(33, 47), ugyanakkor Ca²⁺-független útvonalak szerepe sem kizárt ⁽⁵⁰⁾

3.4. Mieloperoxidáz: struktúra és funkció

A MPO hem tartalmú enzim, mely elsősorban a neutrofil granulociták azurofil granulumaiban található és ezen sejtekben a szárazanyagtartalom 1-2%-át is elérheti ^(51, 52). Emellett kimutatható monocitákban és eosinofil granulocitákban is ^(3, 53, 54). Első leírója, Agner 1941-ben verdoperoxidáznak nevezte, az enzim jellegzetes zöld színe miatt. Elsőként TBC-s betegek gennyes váladékából izolálták ⁽⁵⁵⁾.

A MPO erősen glikozilált fehérje, molekulasúlya 140 kDa, szerkezetét tekintve tetramer, két könnyű- (10-15 kDa) és két nehézláncból (55-64 kDa) áll, melyeket diszulfid-hidak kapcsolnak össze ^(56, 57). A MPO enzim aktív centrumában konzervált proximális és disztális hisztidinek találhatók, melyek közül a proximális hisztidin a redox folyamatokat szabályozza, míg a disztális hisztidin sav-bázis katalizátorként működik ⁽⁵⁸⁾. Ez a komplex enzim több intermedier állapottal rendelkezik, az aktuális állapotot több tényező határozza meg, mint például a hem-vas oxidáltsági állapota és a jelen lévő NO, illetve redukált oxigén gyökök (O_2^{-} , H_2O_2) ^(55, 59).

1970-ben Klebanoff leírta, hogy a MPO fő funkciója a szervezetet károsító mikrobák eliminálása ⁽⁶⁰⁾. A fagocita aktiváció során az enzim részben a fagolizoszómába, részben az extracelluláris térbe szekretálódik, és az úgynevezett oxidatív fellobbanáshoz ("oxidative burst") kapcsolódva fejti ki hatását ⁽⁵⁵⁾.

3.5. A mieloperoxidáz által katalizált reakció

A MPO reagálni képes a H_2O_2 -dal illetve a közegben jelen lévő halogén ionokkal, leginkább klorid ionnal ⁽⁵⁴⁾. A reakció végterméke a HOCl, amint azt az 1. reakcióegyenlet is mutatja ^(51, 61).

$$H_2O_2 + Cl^- + H^+ \longrightarrow H_2O + HOCl$$

1. Egyenlet: A mieloperoxidáz (MPO) reakciója hidrogén peroxiddal (H₂O₂) és klorid ionnal (Cl⁻)

A MPO rendszer aktivitása függ az elérhető H_2O_2 illetve más szubsztrátok mennyiségétől, valamint egyes antioxidáns molekulák, például a metionin koncentrációjától ^(62, 63). Bár a hipoklórossav viszonylag stabil és erős mikrobaellenes hatással rendelkező molekula⁽⁶⁴⁾, kóros körülmények között felszaporodva nem csak a mikróbákat károsítja, hanem kémiai reakciók révén a szervezet ép struktúráit is képes megváltoztatni. Reakcióba léphet például DNS molekulákkal, lipidekkel, lipoproteinekkel ⁽⁵¹⁾.

3.6. A mieloperoxidáz és a hidrogén-peroxid szerepe kardiovaszkuláris kórfolyamatokban

Normál körülmények között a H_2O_2 hozzájárul az aktuális érátmérő kialakulásához. Gyulladásos folyamatok során azonban felborul az egyensúly az oxidatív ágensek és az azokat eliminálni képes antioxidáns molekulák között, melynek következményeként a felszaporodott H_2O_2 az érfalat károsítva vaszkuláris diszfunkció kialakulását is okozhatja. A H_2O_2 káros hatásait részletesen tanulmányozták számos kórképben, így magas vérnyomás ^(4, 65), cukorbetegség ^(66, 67) és érelmeszesedés ⁽²⁵⁾ folyamán. A gyulladás során keletkező MPO szintén kiemelt szereppel bír a kardiovaszkuláris kórképek kialakulásában ^(63, 68). Egyértelmű összefüggést mutattak ki a szérum MPO szintje és az iszkémiás szívbetegség minden megjelenési formájának (például stabil- és instabil angina, miokardialis infarktus) előfordulása között ⁽⁶⁹⁾. Továbbá bizonyos tanulmányokban hangsúlyozzák a plazma MPO szint kardiovaszkuláris prognosztikai szerepét, illetve felvetik, hogy az használható a kardiovaszkuláris rizikó becslésére is ^(69, 70). Beszámoltak arról is, hogy MPO hiányos egyénekben csökkent a kardiovaszkuláris rizikó ^(71, 72).

Több kutatás is igazolta, hogy a MPO fontos szerepet játszik az érelmeszesedés . A MPO valamint a működése következtében létrejött oxidatív származékok, a nitrozilált, klórozott fehérjék, és a módosított LDL kimutathatók az ateroszklerotikus plakkokban ^(53, 73-75).

Bizonyos tanulmányok szerint a MPO az ateroprotektív NO elhasználása révén endotéldiszfunkciót okoz ^(76, 77). Az acetilkolin által kiváltott dilatáció gyengüléséről számoltak be azokban az egerekben, ahol magasabb plazma MPO szint volt mérhető ⁽⁷⁸⁾. Bebizonyították azt is, hogy a HOCl hozzájárul a nitrogén-monoxid szintáz (NOS) szétkapcsolásához (uncoupling), amely így szuperoxid-képző enzimmé válik ⁽⁷⁹⁾. Továbbá a HOCl képes reakcióba lépni az L-Argininnel ^(80, 81), melynek során a képeződő termékek gátolják a vazodilatatív NO keletkezését ⁽⁸²⁾. A MPO katalizált klorináció és nitrálás szelektív célpontja az Apolipoprotein A-I (Apo A-I), a HDL egyik fő fehérjéje. A kórosan módosult HDL szintén hozzájárul az ateroszklerózis kialakulásához ⁽⁸³⁾. A MPO és a HOCl képes a matrix metalloproteinázok aktiválására, amelyek gyengítik a plakk fibrózus sapkáját, így növelik a plakk-instabilitást, a plakkruptúra veszélyét ^(70, 84).

A MPO-t ezen kívül több tanulmány is fontos patogenetikai tényezőnek tartotta az iszkémia utáni reperfúzió, valamint az infarktust követő miokardiális remodelling folyamatában ^(69, 85, 86). Megfigyelték, hogy infarktus után jelentősen emelkedett a betegek MPO szintje a plazmában (18-szorosára egészséges egyénekhez viszonyítva), mely magyarázható az infarktus helyén felhalmozódó neutrofilok MPO szekréciójával ⁽⁸⁵⁾. A MPO ezen gyulladásos reakció részeként többféle mechanizmuson keresztül is képes befolyásolni a szívizom remodellációját. Bizonyítékok vannak arra vonatkozólag, hogy a MPO számos citotoxikus ágenst képez, például aldehideket, amelyek kovalensen módosítják a megmaradt

sejtek kulcsfontosságú ioncsatornáit, transzportfehérjéit, ezáltal csökkentve a kontraktilis funkciót ⁽⁶⁹⁾. Más szerzők szerint a MPO miokardiális mikrovaszkuláris diszfunkciót okoz a vaszkuláris NO szintjének csökkentése révén ⁽⁸⁵⁾. Mindezek mellett a MPO proteázok aktiválása révén is képes befolyásolni a remodellációt. Roman és mtsai szerint a MPO a plazminogén aktivátor inhibitor-1 (PAI-1) gátlásával aktiválja a plazmint, ami felgyorsítja a mátrix-fehérjék degradálását, így végeredményben elősegíti a kamrafal vékonyodását és dilatációját ⁽⁶⁹⁾. Más kutatók megfigyelték, hogy MPO knockout egerekben miokardiális infarktus után csökken a leukocita migráció és a kamradilatáció, így nagyobb lesz a megmaradt szisztolés funkció ⁽⁸⁶⁾.

Egyes kutatók kísérleti eredményeikből kiindulva a MPO-nak általános, alapvető és szisztémás vazoregulációs szerepet tulajdonítanak ⁽⁶⁾. A krónikus hatásokról napjainkra már sok adat összegyűlt, de az akut hatásokról még viszonylag keveset tudunk.

4. Célkitűzések

Tudományos kutatásaim során az alábbi célkitűzéseim voltak:

- 1. A hidrogén-peroxid által kiváltott vazokonstrikció mechanizmusának feltárása
- 2. A mieloperoxidáz vazoaktív tulajdonságainak feltérképezése

5. Anyagok és módszerek

5.1. Preparátumok előkészítése

Állatkísérleteink során az Munkahelyi Állatjóléti Bizottság (2010/63/EU) által jóváhagyott protokolloknak megfelelően jártunk el, kísérleteinkben csak szakmailag jártas személyek vettek részt.

Kísérleteinkhez hím Wistar patkányokat használtunk (200-250 g, Toxi-Coop Toxicological Research Centre, Dunakeszi), amelyeket normál tápon tartottunk (CRLT/N táp, Szinbad Kft, Gödöllő). Az állatokat 12 órás periódusokban sötét, illetve megvilágított környezetben tartottuk, lehetővé téve számukra a víz és a táplálék folyamatos hozzáférhetőségét. Az állatok altatását 50 mg/kg pentobarbitál intraperitoneális alkalmazásával végeztük. Ezt követően eltávolítottuk a gracilis izmot, a szívet és az agyat, melyet 4 °C-ra hűtött, előzetesen átbuborékoltatott (5% CO₂, 10% O₂, 85% N₂) Krebs oldatot (110 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 1 mM KH₂PO₄, 5 mM glükóz és 24 mM NaHCO₃) tartalmazó szilikon alapú Petri csészébe helyeztük.

5.2. Az érátmérő vizsgálata izolált mikroereken

A vázizom arteriola, a koronária arteriola valamint a baziláris artéria izolálását és átmérőjének mérését a munkacsoport által korábban leírt módon végeztük ⁽⁸⁷⁾. A vázizom arteriola és a baziláris artéria elsőrendű ágának, illetve a szeptális artéria másodrendű ágának körülbelül 2 mm-es szakaszát sztereomikroszkóp segítségével, mikrosebészeti eszközökkel óvatosan izoláltuk a mellettük futó izomtól, idegtől illetve vénától. Ezt követően az izolált és mellékágakat nem tartalmazó ér egy megfelelően megtiszított, ép szakaszát kimetszettük. Az eret tartalmazó szövet eltávolítása, illetve az ér preparálása meghatározó lépés a kísérlet eredményességének szempontjából, mivel az ereket olyan mértékű stressz érheti, ami a reaktív gyökök fokozott keletkezése által eltérő eredményeket okozhat. Preparálás után az

izolált vázizom arteriolákat és koronária arteriolákat egy átbuborékoltatott hideg Krebs oldatot tartalmazó szervkamrába (Living Systems Instrumentation, St. Albans, VT, USA) helyeztük, mely két egymással szemben elhelyezkedő üvegkapillárist tartalmaz. Az érpályát modellező csőrendszer egyik vége egy dugó segítségével lezárt, a másik vége pedig egy olyan érzékeny nyomásszabályozó készülékhez (Living Systems Instrumentation, St. Albans, VT, USA) kapcsolódik, amely az állandó intraluminális nyomás fenntartásához pontosan elegendő mennyiségű Krebs oldatot pumpál a lumenbe. Az ereket először az egyik oldalon kanüláltuk, illetve rögzítettük, majd körülbelül 20 Hgmm-es nyomás alkalmazásával eltávolítottuk a vérsejteket. Ezt követően az ér disztális végét is kanüláltuk majd beállítottuk az eredeti érhosszt a kanülök távolságának változtatásával. Az oldatot Ca²⁺ tartalmú Krebs-mérőoldatra (2,5 mM CaCl₂) cseréltük, és a további kísérletek során kizárólag ezt az oldatot használtuk. Az oldatcserét követően a szervkád hőmérsékletét 37 °C-ra emeltük, valamint az intraluminális nyomást 80 Hgmm-re állítottuk. Az intraluminális nyomás hatására az arteriolákban körülbelül 60 perces inkubációs periódus után spontán miogén tónus alakult ki. Az erek átmérőjének mérését videomikroszkópos rendszerhez rögzített digitális kamerával detektáltuk és számítógép segítségével mértük (mikroszkóp: Nikon, Eclipse 80i; CCD kamera: Topica Technology Co Ltd, Taipei, Taiwan; video digitalizáló: National Institutes, Bethesda, USA). A kísérletekben az alkalmazott vazoaktív anyagokat a spontán miogén tónus kialakulását követően az ismert térfogatú (10 ml) kádba, megfelelő végkoncentrációkban, növekvő koncentrációban adtuk. A szer kádba juttatását követően folyamatosan regisztráltuk az adott anyag különböző végkoncentrációinak érátmérőre gyakorolt hatásait, és kumulatív koncentráció-hatás görbéket készítettünk. Ezt követően kimosási periódus következett, melynek során az arteriolák visszanyerték kiindulási tónusukat. Ennek megfelelően az egyes koncentráció-hatás görbék között minimum 10 percet vártunk.

Kísérleteink végén az erek maximális (passzív) átmérőjét Ca²⁺-mentes körülmények között határoztuk meg.



1. Ábra: A videomikroszkópos rendszer felépítése

5.3. Izometrikus kontrakciómérés

A baziláris artériát a fentiekben leírtak szerint izoláltuk, majd két körülbelül 4 mm-es szakaszt (érgyűrűt) metszettünk ki. Az izometriás kontrakció mérő rendszeren (DMT 510A, Aarhus, Dánia) két egyenként 40 µm átmérőjű fém drótot vezettünk az ér lumenébe majd ezt követően csavarok segítségével az egyik oldalt a mozgatható, a másik oldalt pedig az erőmérő karhoz rögzítettük, majd a Ca²⁺-mentes Krebs oldatot Ca²⁺-tartalmú oldatra cseréltük. Méréseink előtt az artéria gyűrűkön normalizációs protokollt végeztünk el, melynek során

15 másodpercenként 1,5 mN-os erővel feszítettük meg az ereket addig, amíg el nem értük a 13,4 kPa (120 Hgmm) nyomásértéket.



2. Ábra: Auto Dual Wire Myograph System 510, a szervkád és a rögzített ér

5.4. A hidrogén-peroxid érátmérőre gyakorolt hatásainak vizsgálata

Az inkubációs időt követően az ép állapotú erekben miogén tónus alakult ki (érátmérő csökkenés vázizom arteriolák esetében: 202±0,3 μm-ről 156±0,3 μm-re, n=118; koronária

arteriolák esetében: 180±11 μm-ről 115±6 μm-re, n=33). Kísérleteink kezdetén minden esetben ellenőriztük az arteriolák simaizom illetve endotél funkcióját. A vaszkuláris simaizom épségét növekvő koncentrációjú noradrenalin (1 nM-10 μM, vázizom arteriolák esetében), illetve szerotonin (1 nM-10 μM, koronária arteriolák esetében) hozzáadásával vizsgáltuk. Az endotélfunkció vizsgálatára növekvő koncentrációjú acetilkolin (1 nM-10 μM) kezelést alkalmaztunk.

A H₂O₂ különböző hígítású oldatait mindig frissen, a vizsgálatokat megelőzően készítettük el és felhasználásig jégen tároltuk. Kísérleteink első részében a H2O2-ot növekvő koncentrációban (1 µM-10 mM) alkalmaztuk. A H2O2 által kiváltott érátmérő változásokat a különböző koncentrációk hozzáadását követő 60. másodpercben detektáltuk. Méréseink során ellenőriztük a H₂O₂-ot tartalmazó szervkamra pH értékét, mely a legmagasabb H₂O₂ koncentráció esetében sem különbözött szignifikánsan а kontrollhoz képest (pH 7,52±0,03 H₂O₂ hiányában, pH 7,58±0,03 10 mM H₂O₂ jelenlétében, n=3). A H₂O₂ vaszkuláris hatásainak kinetikai vizsgálatára különböző koncentrációjú (10, 30, 100 és 300 µM) H₂O₂ kezeléseket hajtottunk végre (600 másodperc), melynek során minden 10. másodpercben rögzítettük az érátmérőt.

Kísérleteink egy részében az endotélium lehetséges szerepét kívántuk tanulmányozni ezért vázizom arteriolákon levegőbuborék átáramoltatásával endotélium fosztást hajtottunk végre. Az endotélium fosztás sikerességét acetilkolin (1 nM-10 μ M) ismételt hozzáadásával (96±5%, dilatáció endotélium jelenlétében, 0,3±0,2% dilatáció, endotélium fosztást követően), a megtartott simaizom funkciót noradrenalin (1 nM-10 μ M) használatával (62±6%, konstrikció endotélium jelenlétében, 55±6%, konstrikció endotélium fosztást követően) igazoltuk.

A H_2O_2 vazoaktív hatásait vázizom arteriolákon teszteltük különböző inhibitorok jelenlétében (15–30 perc inkubáció): PKC inhibitor (chelerythrine, 10 μ M), PLC inhibitor

(U73122, 10 μ M), PLA inhibitor (7,7-dimethyl-(5Z,8Z)-eicosadenic acid, 100 μ M;), Src kináz inhibitor (Src inhibitor-1, 5 μ M;), COX-1 és COX-2 inhibitor (indomethacin, 10 μ M), COX-1-szelektív inhibitor (SC-560, 1 μ M), COX-2-szelektív inhibitor (celecoxib, 3 μ M), valamint szintén COX-2-szelektív inhibitor (NS-398, 10 μ M). Méréseinket elvégeztük TXA2 receptor inhibitor (SQ-29548, 1 μ M) jelenlétében is vázizom artraiolákon és koronária arteriolákon. Az inhibitorokat dimetilszulfoxidban (DMSO), vagy etanolban oldottuk fel. A nem vízoldékony oldószerek maximális koncentrációja a szervkamrában 0,1% volt. Ezen oldószerek nem rendelkeztek önálló vaszkuláris hatásokkal.

5.5. A mieloperoxidáz érátmérőre gyakorolt hatásainak vizsgálata

MPO aktivitását a klorináció és a peroxidáció aktivitásásnak mérésére is alkalmas kittel (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA) határoztuk meg. A klorinációs aktivitás detektálása során a MPO által generált hioklorit (OCl-) alakította át a nem fluoreszcens szubsztrátot (APF, 2-(6-(4- 20 aminophenoxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoic acid) fluoreszceinné. A peroxidációs aktivitás vizsgálatához ADHP nem fluoreszcens szubsztrátot (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) alkalmaztunk, melyből MPO hatására rezofurin keletkezett. A fluoreszcencia változások meghatározása NovoStar plate Readerrel történt. Az arteriolákat MPO jelenlétében inkubáltuk (1,92 mU/ml, 300 másodperc), melynek során 10 másodpercenként rögzítettük az érátmérőt. Ezt követően növekvő koncentrációjú H₂O₂ (1 μM-10 mM) kezelést alkalmaztunk.

Kísérleteink egy részében az előzőekben leírtaknak megfelelően eltávolítottuk az endotéliumot. Az endotélium-fosztás sikerességét ebben az esetben is acetilkolinnal (1 nM-10 μ M) ellenőriztük (96±4% dilatáció endotélium jelenlétében, 6±4% konstrikció endotélium fosztást követően), a megtartott simaizom funkciót pedig noradrenalin (1 nM-10 μ M) hozzáadásával igazoltuk 71±1% konstrikció endotélium jelenlétében, 64±2% konstrikció endotélium fosztást követően).

A MPO és a H_2O_2 hatásait vázizom arteriolákon MPO specifikus inhibitor (4-aminobenzhydrazide, 50 μ M), TXA2 receptor inhibitor (SQ-29548, 10 μ M), COX inhibitor (indomethacin, 1 μ M) jelenlétében is megvizsgáltuk. Továbbá a MPO hatásait tanulmányoztuk a HOCl scavenger L-metioninnal (L-met; 20 μ M, 40 μ M, 100 μ M) történő inkubációt követően vázizom arteriolákon, illetve koronária arteriolákon is.

Kísérleteink végén az erek maximális (passzív) átmérőjét Ca²⁺-mentes körülmények között határoztuk meg.

5.6 Izometrikus kontrakció vizsgálata baziláris artériákon

Kísérleteink kezdetén a baziláris artériák életképességét növekvő koncentrációjú KCl (10 mM-60 mM) hozzáadásával teszteltük. Ezt követően az előzőekben leírtakhoz hasonlóan MPO (1,92 mU/ml, 300 másodperc) jelenlétében inkubáltuk az ereket, majd vizsgáltuk a növekvő koncentrációjú H_2O_2 (1 μ M-10 mM) hatására bekövetkező kontraktilis erő változásokat. A MPO hatásait L-met (100 μ M) jelenlétében is teszteltük.

5.7. Az intracelluláris Ca²⁺ koncentráció és az érátmérő párhuzamos vizsgálata

Az intracelluláris Ca²⁺ koncentráció méréséhez az arteriolákat az előzőleg leírt módon izoláltuk. Az ereket Ca²⁺-os Krebs oldatban 60 percig inkubáltuk, amely 1% BSA-t és 5 μM Fura-2-acetoxi-metilésztert (Molecular Probes, Eugene, OR) tartalmazott. Méréseinket Incyt Im2 Imaging rendszerrel (Intracellular Imaging, Cincinnati, OH, USA) végeztük. Az ereket váltakozva 340 és 380 nm-en világítottuk meg, majd az 510 nm-nél nagyobb hullámhosszúságú emittált fényt mértük. 2-5 másodpercenként képeket készítettünk, melyeket offline módon értékeltünk. Az érátmérő meghatározásakor a fluoreszcens képeken látható külső érátmérőket használtuk. A vizsgálatok során alkalmazott mérési terület nagysága az adott kezeléstől és az ér méretétől függően eltérő nagyságú volt (átlagosan 285±15 µm×105±6 µm).

5.8. A mieloperoxidáz klorinációs aktivitásának vizsgálata L-metionin jelenlétében

A MPO klorinációs aktivitásának vizsgálatához egy a kereskedelemben kapható kitet (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) használtunk. A mérés során a MPO által létrejött fluoreszcens termék 2-[6-(4-aminophenoxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl]-benzoiát (APF) mennyiségét határoztuk meg. A reakcióelegy a következőket tartalmazta: 45 μ M APF, 30 μ M H₂O₂, 3 U/L MPO, 200-0.39 mM L-metionin (sorozat hígítás). A méréseket PBS-ben (foszfát puffer tartalmú sóoldat, pH= 7,4) végeztük az *in vitro* vaszkuláris kísérleteinktől független módon. A fluoreszcens intenzitás változásokat (λ_{ex} = 485 nm, λ_{em} = 520 nm) 30 másodpercenként rögzítettük 5 percen keresztül fluoreszcens plate reader felhasználásával (NovoStar plate reader, BMG Labtech). A fluoreszcens intenzitás értékeit az idő függvényében ábrázoltuk, majd lineáris regressziót alkalmaztunk. Az egyenes meredeksége alapján határoztuk meg a MPO aktivitását.

5.9. Immunhisztokémia

Az immunhisztokémiai vizsgálatainkhoz patkányból a fentieknek megfelelő módon kimetszett gracilis izom kis darabját Tissue-tek O.C.T. oldatba (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) merítettük, majd folyékony nitrogénben fagyasztottuk. Ezt követően a blokkot kriosztátban metszettük (vastagság 10 μm), majd a metszeteket adherens tárgylemezre (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) helyeztük és 10 percig acetonban fixáltunk. A fixált metszetet 20 percen keresztül normál kecske szérummal blokkoltuk (1,5% PBS, Sigma, St. Louis, Mo, USA).

A COX enzimeket COX-1 (Rabbit anti COX1: ab109025; 1:50-szeres hígítás) és COX-2 (Rabbit anti COX2: ab15191; 1:50-szeres hígítás) specifikus antitestekkel jelöltük. Valamennyi elsődleges antitestet blokkoló pufferben hígítottuk. 90 perc inkubáció után a metszeteket tovább reagáltattuk a megfelelő másodlagos antitestekkel (Goat anti rabbit biotin,

1:100-szoros hígítás; goat anti mouse FITC, 1:300-szoros hígítás). A simaizomsejtek azonosítására simaizom aktint (NCL-SMA, 1:20-szoros hígítás; Novocastra Laboratories, New Castle, UK) alkalmaztunk. Végül a metszeteket DAPI-t (4',6-diamidino-2-phenylindole) tartalmazó fedőanyaggal (Vector Laboratories, Burlingame, USA) fedtük. A kötődő antitesteket fluoreszcens mikroszkópban (Nikon Eclipse 80i) figyeltük meg, és egy kamera segítségével (Scion, Frederick, MD, USA) számítógéppel rögzítettük. A képek további formázását ImageJ program segítségével (NIH Bethesda, MD, USA) végeztük.

5.10. Statisztika

A konstriktív válaszokat a kiindulási érátmérőhöz (vazoaktív anyag hozzáadását megelőző érátmérő 80 Hgmm intraluminális nyomáson) viszonyítva fejeztük ki. A vazodilatációt a maximális (Ca²⁺-mentes körülmények között mért, passzív) érátmérő százalékában adtuk meg. A kontraktilis erő változásait abszolút egységekben tüntettük fel, a kiindulási erőértékekhez viszonyítva. Az ábrákon a nyert adatok átlagértékei \pm SEM szerepelnek. Statisztikai elemzéseinkhez Student féle *t*-próbát illetve két utas ANOVA-t és Dunnett's post hoc tesztet használtunk. Az értékeket akkor tekintettük szignifikánsan különbözőnek, ha a *P*<0,05 volt.

6. Eredmények

6.1. A hidrogén-peroxid által kiváltott vaszkuláris hatások

Vázizom arteriolákon a H2O2-ot növekvő koncentrációit alkalmazva koncentrációfüggő bifázisos hatást tapasztaltunk: alacsony koncentrációban (10-100 µM) alkalmazva a H_2O_2 vazokonstrikciót váltott ki (maximális vazokonstrikció 100 μM-nál, 34±3% vazokonstrikció, P<0,001 vs. kiindulási állapot; 3.A ábra), viszont nagyobb koncentrációban (3-10 mM) vazodilatációt eredményezett (maximális vazodilatáció 10 mM-nál, 80±11% vazodilatáció, P<0,001 vs. kiindulási állapot). Ezzel szemben koronária arteriolákon a H2O2 hozzáadására csak vazodilatáció volt megfigyelhető (maximális vazodilatáció 10 mM-nál, 96±3% vazodilatáció, P=0,01). A H₂O₂ által kiváltott válaszok kinetikáját vázizom arteriolákon teszteltük. A H2O2 hozzáadására létrejövő vazokonstriktív válasz tranziens jellegű volt, viszont az alacsony koncentrációban (10 µM és 30 µM) megfigyelhető vazokonstrikciót nem követte szignifikáns mértékű vazodilatáció. 100 µM illetve 300 µM H₂O₂ hozzáadását követően időfüggő bifázisos érátmérő változás jött létre: a kezdeti vazokonstrikciót követően jelentős vazodilatáció alakult ki. Nagyobb koncentrációban (3 mM) alkalmazva a H₂O₂ kezelés csak vazodilatációt okozott (**3.B ábra**).

3. Ábra: A hidrogén-peroxid vaszkuláris hatásai patkány vázizom és koronária arteriolákon

Intakt endotéliummal rendelkező izolált, vázizom arteriolákon (n=6 arteriola, 6 különböző állatból; piros teli kör, a továbbiakban kontroll) valamint koronária arteriolákon (n=7 arteriola, 7 különböző állatból; kék üres kör) növekvő koncentrációjú (1 μ M-10 mM) H₂O₂ kezelést alkalmaztunk, majd koncentráció-hatás görbéket készítettünk (**A** panel). Az érátmérő változásokat relatív egységekben fejeztük ki. A vazodilatációt a passzív átmérő (maximális dilatáció (100%) extracelluláris Ca²⁺ hiányában) és a kiindulási átmérő különbségének százalékában fejeztük ki, a vazokonstrikciót pedig a kiindulási érátmérő százalékában (0% az y tengelyen) adtuk meg. A csillagok a kiindulási értékekhez viszonyított szignifikáns eltérést jelölik. A H₂O₂ által kiváltott átmérő változások kinetikáját vázizom arteriolákon tanulmányoztuk (**B** panel). Az adott koncentrációjú H₂O₂ folyamatos jelenlétében 600 másodpercen keresztül inkubáltuk az ereket (n=3-5 arteriola különböző H₂O₂ koncentrációknál, 11 különböző állatból). A maximális vazokonstrikció illetve vazodilatáció értékét nyilakkal jelöltük.

6.2. Hidrogén-peroxid által kiváltott vazokonstrikció endotélium-függő folyamat

Vázizom arteriolákon a H₂O₂ jelenlétében tapasztalható vazokonstrikció gátolható volt az endotélium eltávolítását követően (0±8% vazokonstrikció 100 μ M H₂O₂-nál, *P*=0,03 *vs*. kontroll). Ugyanakkor az endotélfosztás nem befolyásolta a H₂O₂ által kiváltott vazodilatációt (69±10% dilatáció 10 mM H₂O₂-nál; **4. ábra**).

4. Ábra: A hidrogén-peroxid által kiváltott vazokonstrikció endotélium-függő folyamat vázizom arteriolákban

A H_2O_2 által kiváltott érátmérő változásokat detektáltuk intakt endotélium jelenlétében (n=6 arteriola, 6 különböző állatból; kontroll, piros, teli kör) valamint endotélium hiányában (n=5 arteriola 5 különböző állatból; fekete, teli kör). A csillag a kontrollhoz viszonyított szignifikáns eltérést mutatja.

6.3. A hidrogén-peroxid által kiváltott endoteliális szignalizáció ciklooxigenáz aktivációt eredményez

A H₂O₂ hatására kialakuló vazokonstrikció gátolható volt az alábbi inhibitorok alkalmazásával: PLA antagonista (7,7-dimethyl-(5Z,8Z)-eicosadienoic acid, 7±2% vazokonstrikció, P<0,005 vs. kontroll; **5.A ábra**), PKC antagonista (chelerythrine, 9±4% vazokonstrikció 100 µM H₂O₂-nál, P<0,005 vs. kontroll; **5.B ábra**), PLC inhibitor (U-73122, 15±18% vazodilatáció, P<0,05 vs. kontroll; **5.C ábra**) valamint Src kináz antagonista (Src inhibitor-1, 8±3% vazokonstrikció, P<0,005 vs. kontroll; **5.D ábra**).

5. Ábra: A hidrogén-peroxid az endoteliális Src-kináz, foszfolipáz C, protein-kináz C és a foszfolipáz A útvonal aktiválása által vazokonstrikciót okozmechanizmusa vázizom arteriolákban

A H_2O_2 hatására bekövetkező érátmérő változásokat tüntettük fel előkezelés nélkül (kontroll, piros, teli kör) illetve az alábbi antagonistákkal történő inkubációt (15-30 perc) követően (fekete, teli kör): PLA inhibitor 7,7-dimethyl-(5Z,8Z)-eicosadienoic acid (100 μ M, n=5 arteriola, 5 különböző állatból; **A** panel), PKC inhibitor chelerythrine (10 μ M, n=5 arteriola, 5 különböző állatból, **B** panel), PLC inhibitor U-73122 (10 μ M, n=4 arteriola 4 különböző állatból; **C** panel), valamint Src kináz inhibitor Src inhibitor-1 (5 μ M, n=5 arteriola 5 különböző állatból; **D** panel). A csillagok a kontrollhoz viszonyított szignifikáns eltérést jelölik.

6.4. Hidrogén-peroxid által kiváltott érátmérő változások szelektív és nem szelektív

ciklooxigenáz gátlószerek jelenlétében

A nem szelektív COX gátló indomethacin jelenlétében a H₂O₂-hatására bekövetkező vazokonstrikció gátolható volt, illetve vazodilatációba fordult át (41±17% vazodilatáció 100 μ M H₂O₂-nál, *P*<0,005 *vs*. kontroll; **6.A ábra**).

Kísérleteink egy másik részében megvizsgáltuk a különböző COX izoenzimek szerepét a H₂O₂ által kiváltott hatások kialakításában. A COX-1-et szelektíven gátló SC-560

gátolta a H₂O₂ által kiváltott vazokonstrikciót és vazodilatáció volt megfigyelhető (23±9% vazodilatáció 100 μ M H₂O₂-nál, *P*<0,05 *vs.* kontroll; **6.B ábra**) Ugyanakkor a COX-2-t szelektíven gátló celecoxib gátló hatása nem bizonyult szignifikánsnak a H₂O₂ által kiváltott vazokonstrikció tekintetében (13±4% vazokonstrikció 100 μ M H₂O₂-nál, *P*>0,05 *vs.* kontroll; **6.B ábra**). Eredményeinket megerősítettük egy másik COX-2 specifikus gátlószer, az NS-398 (10 μ M) alkalmazásával, mely szintén nem befolyásolta szignifikánsan a H₂O₂ hatására kialakuló vazokonstrikciót (11±1% vazokonstrikció 100 μ M H₂O₂-nál, *P*>0,05 *vs.* kontroll; **6.C ábra**).

6.5. A hidrogén-peroxid által aktivált vazokonstrikcióhoz vezető effektor mechanizmus

TXA2 receptor gátló (SQ-29548) gátolta a H_2O_2 által kiváltott vazokonstrikciót és vazodilatáció volt megfigyelhető (36±11% vazodilatáció 100 µM H_2O_2 -nál, *P*<0,005 *vs*. kontroll; **7.A ábra**). Ugyanezen gátlószer alkalmazása nem volt hatással a H_2O_2 által kiváltott vazodilatációra koronária arteriolák esetében (96±2% vazodilatáció 10 mM H_2O_2 -nál; **7.B ábra**). A TXA2 receptorok aktivációja vazokonstrikciót eredményezett mind a vázizom arteriolákon, (U46619, 69±2%, n=5, *P*<0,002 *vs*. kiindulási állapot; **7.C ábra**) mind a koronária arteriolákon (42±6%, *P*=0,002 *vs*. kiindulási állapot; **7.C ábra**).

6. Ábra: A hidrogén-peroxid által kiváltott vazokonstrikció ciklooxigenáz-1 közvetítésével jön létre

A H_2O_2 által kiváltott vazokonstrikció (kontroll, piros, teli kör) gátolható volt a nem-specifikus COX inhibitor, indomethacin (30 min) hatására (10 μ M, n=5 arteriola 4 különböző állatból, kiindulási érátmérő: 111±3 μ m, fekete, teli kör; **A** panel). **B** Panel: A különböző COX izoenzimek szerepét COX specifikus inhibitorok jelenlétében tanulmányoztuk: a COX-1-et SC-560 (1 μ M, n=5 arteriola 3 különböző állatból; fekete, teli négyzet) a COX-2-t celecoxib (3 μ M, n=4 arteriola 4 különböző állatból; fekete, teli háromszög) valamint NS-398 (10 μ M, n=3 arteriola 3 különböző állatból; fekete, teli rombusz; **C** Panel) alkalmazásával teszteltük. A szaggatott vonal a kontroll méréseket (COX inhibitor nélkül) reprezentálja. A csillagok a kontrollhoz viszonyított szignifikáns eltérést jelölik.

7. Ábra: A hidrogén-peroxid által kiváltott vazokonstrikció tromboxán A2-n keresztül valósul meg

A TXA2 receptorok szerepének vizsgálatára a H_2O_2 jelenlétében (piros, teli kör) létrejött érátmérő változásokat a TXA2 receptor antagonista SQ-29548 (1 μ M, n=10 arteriola 10 különböző állatból, 15-perc előkezelés) jelenlétében elvégzett kísérletekkel hasonlítottuk össze vázizom arteriolákon (**A** panel, fekete, teli kör) és koronária arteriolákon (**B** panel, fekete, teli kör) A csillagok a kontrollhoz viszonyított szignifikanciát mutatják. A TXA2 receptorok jelenlétét TXA2 receptor agonista U46619 (0,1 nM-10 μ M) hozzáadásával vizsgáltuk vázizom arteriolákban (piros, teli kör; n=5 arteriola 5 különböző állatból; **C** Panel) és koronária arteriolákban (kék, üres kör; n=5 arteriola 5 különböző állatból; **C** Panel). A csillagok a kiindulási érátmérőhöz viszonyított szignifikáns eltérést mutatják.

6.6. A hidrogén-peroxid növeli a vaszkuláris simaizomsejtek Ca²⁺ érzékenységét

A H₂O₂ kezelés (1 μ M-100 μ M) hatására bekövetkező vazokonstrikció során nem volt jelentős változás az intracelluláris Ca²⁺ koncentrációt jelző F_{340/380} arány tekintetében (**8.A ábra**). Ezzel szemben a noradrenalin (10 μ M) hozzáadására létrejövő vazokonstrikciót az F_{340/380} arány szignifikáns növekedése kísérte (0,96±0,04-ről 1,36±0,07-re, *P*=0,001; **8.B ábra**). A TXA2 receptor aktiválószer, U46619 jelenlétében megfigyelhető F_{340/380} arány növekedése szignifikánsan kisebbnek bizonyult a noradrenalin által kiváltott F_{340/380} növekedéséhez képest (0,87±0,04-ről 0,93±0,04-re *vs.* 0,92±0,04-ről 1,36±0,07-re, *P*<0,05) annak ellenére, hogy ezen két szer hatására hasonló mértékű vazokonstriktív válasz volt tapasztalható (44±5% *vs.* 57±6% vazokonstrikció, *P*>0,05; **8.C ábra**).

Kísérleteink következő csoportjában megismételtük a H₂O₂ által kiváltott érátmérő és Ca²⁺ koncentráció változások vizsgálatát Src kináz inhibitor (Src inhibitor-1) jelenlétében. A H₂O₂ által kiváltott vazokonstrikció Src kináz inhibitor hatására az előzőekben leírtakhoz hasonló módon gátolható volt, továbbá az F_{340/380} arány sem változott (**8.D ábra**). Funkcionális endotélium jelenlétében az acetilkolin kezelés hatására megfigyelhető vazodilatációt az F_{340/380} arány szignifikáns csökkenése kísérte (1,05±0,05-ról 0,89±0,04-re, P<0,05).

8. Ábra: A hidrogén-peroxid növeli a vaszkuláris simaizomsejtek Ca²⁺ érzékenységét

Az intracellularis Ca^{2+} ($F_{340/380}$) és a külső érátmérő változásait tanulmányoztuk vázizom arteriolákban kontroll körülmények között (n=5 arteriola 3 különböző állatból **A** panel), továbbá noradrenalin növekvő koncentrációinak hozzáadása során (**B** panel; n=5 arteriola 3 különböző állatból), valamint TXA2 receptor agonista U46619 (0,1 nM-10 μ M; **C** panel; n=5 arteriola 4 különböző állatból) jelenlétében.Vizsgálatainkat megismételtük Src kináz inhibitor (Src inhibitor-1, 5 μ M n=4 arteriola 3 különböző állatból, 20 perc előkezelés; **D** panel). A csillagok a kiindulási értékekhez viszonyított szignifikáns eltérést jelölik.

6.7. A mieloperoxidáz fokozza a hidrogén-peroxid által kiváltott vazokonstrikciót

A MPO (1,92 mU ml⁻¹) fokozta a H_2O_2 hatására bekövetkező vazokonstrikció mértékét különböző szövetekből származó vaszkuláris preparátumokon. Vázizom arteriolákon MPO hozzáadását követően jelentős mértékű vazokonstrikció jött létre (50±21% vazodilatáció 1 mM H_2O_2 -nál *vs.* 47±11% vazokonstrikció MPO alkalmazását követően, *P*=0,004; **9.A ábra**). Koronária arteriolákon a H_2O_2 kezelés önmagában csak vazodilatációt eredményezett, viszont MPO jelenlétében szignifikáns vazokonstrikció alakult ki (13±4% vazodilatáció 100 µM H_2O_2 -nál, *vs.* 6±3% vazokonstrikció MPO hozzáadását követően P=0,006; **9.B ábra**). Kevésbé volt hangsúlyos a MPO-függő vazokonstrikció baziláris artériákon (1,1±0,5 mN relaxáció 100 µM H₂O₂-nál *vs.* 1,6±0,7 mN kontrakció MPO hozzáadását követően, P<0,05; **9.C ábra**). A MPO kezelés önmagában (H₂O₂ hozzáadása nélkül) nem volt szignifikáns hatással a vázizom arteriolák és a koronária arteriolák érátmérőjére illetve a baziláris artériák esetében a kontrakciós erőre.

6.8. A mieloperoxidáz vaszkuláris hatásai hipoklórossav közvetítésével valósulnak meg vázizom arteriolákon

Annak tisztázására, hogy a MPO által kiváltott funkcionális válaszok kialakításában a MPO klorinációs, vagy peroxidációs aktivitása játszik nagyobb mértékben szerepet, kísérleteinket elvégeztük a HOCl scavenger molekula LMet (100 µM) valamint a MPO-specifikus inhibitor 4-aminobenzhydrazide (50 µM) jelenlétében is. Mivel a H₂O₂ extracelluláris koncentrációja 300 µM körüli értéket is elérhet in vivo, az alábbiakban ezen H₂O₂ koncentráció mellett kialakult eredményeinket fogom bemutatni. A MPO-specifikus inhibitor gátolta a MPO-hatására létrejött fokozott vazokonstrikció mértékét (maximális vazokonstrikció 300 µM H₂O₂+MPO: 47±7% vs. 5±18% vazokonstrikció, P=0,067; 10.A, B ábra). Ugyanakkor az L-Met nemcsak gátolta ezen vazokonstrikció kialakulását, hanem jelentős mértékű vazodilatációt okozott (73±11% vazodilatáció 300 µM H₂O₂, P<0,0001 vs. MPO+H₂O₂; **10.A, B ábra**). Megfigyeltük továbbá, hogy az L-Met (100 μM) kezelés nem volt hatással a H2O2 által kiváltott vazokonstrikcióra MPO hiányában (10.C ábra). Ezen eredményeink arra utalnak, hogy a MPO egy HOCl-tól független vazodilatáció kialakítására képes L-met jelenlétében. Ezzel párhuzamosan in vitro enzim assay vizsgálat során kimutattuk, hogy 100 µM L-Met teljes mértékben gátolta a MPO klorinációs aktivitását (10.D ábra).

9. Ábra: A mieloperoxidáz hatása a hidrogén-peroxid által kiváltott vazoaktív válaszokra különböző érpreparátumokban

MPO-zal történő inkubációt követően (aktivitás: 1,92 mU ml⁻¹, 600 sec), az intakt endotéliummal rendelkező izolált, kanülált vázizom arteriolákat (n=5 arteriola 4 különböző állatból; zöld, teli kör, **A** panel) vagy koronária arteriolákat (n=5 arteriola 5 különböző állatból; zöld, üres kör, **B** panel) növekvő koncentrációjú (1 μ M-10 mM) H₂O₂ kezeltük. Regisztráltuk az érátmérő változásait, majd kumulatív koncentráció-hatás görbéket szerkesztettünk. Az érátmérő változásokat relatív egységekben adtuk meg. Az izolált baziláris artériákat (n=5 arteriola 5 különböző állatból, zöld üres négyzet) a KCl-dal történő prekonstrikciót követően szintén MPO (aktivitás: 1,92 mU ml⁻¹, 600 sec) jelenlétében inkubáltuk, majd növekvő koncentrációjú H₂O₂ (1 μ M-3 mM) kezelést alkalmaztunk (**C** panel). A kontraktilis erőket abszolút értékekben adtuk meg, a kiindulási erő értékekhez viszonyítva. A csillagok a kontroll (H₂O₂) értékekhez viszonyított szignifikáns eltéréseket jelölik.

10. Ábra: A mieloperoxidáz hipoklórossav képződése által vezet vazokonstrikcióhoz vázizom arteriolákban

A MPO által kiváltott vazokonstrikció gátolható volt MPO specifikus inhibitor 4-aminobenzhydrazide (50 μ M) használatával (n=5 arteriola 4 különböző állatból; fekete, üres rombusz, **A** Panel). 100 μ M L-Met hatására a MPO által kiváltott vazokonstrikció gátolható volt és vazodilatáció volt megfigyelhető (n=5 arteriola 5 különböző állatból; fekete, üres háromszög). A piros, teli körök a H₂O₂ hatását jelentik önmagában, a zöld, teli körök pedig a H₂O₂ MPO jelenlétében kiváltott hatásait reprezentálják. A csillagok a MPO+H₂O₂ jelenlétében végzett kísérletekhez viszonyított különbséget, a kettőskeresztek pedig a MPO+MPO inhibitor és a MPO+L-Met mellett végzett mérések eredményeinek szignifikáns különbségeit jelölik. Az oszlopdiagrammon 300 μ M H₂O₂ (kontroll) hatásai láthatók, valamint MPO és 300 μ M H₂O₂ hatásai önmagában illetve MPO inhibitor vagy L-Met jelenlétében regisztrálva vázizom arteriolákban (**B** Panel). L-Met kezelés (100 μ M) nem befolyásolta a H₂O₂ által kiváltott bifázisos érátmérő változást (n=5 arteriola 5 különböző állatból; fekete, üres háromszög, **C** Panel). L-Met növekvő koncentrációit alkalmazva a MPO klorinációs aktivitása koncentráció-függő módon gátolható volt (100%: maximális aktivitás L-Met hiányában; **D** Panel).

6.9. Mieloperoxidáz által kiváltott vazodilatáció L-Metionin jelenlétében

Vázizom arteriolákon a MPO hatására megjelenő vazodilatáció L-Met (20 μ M, 40 μ M és 100 μ M) jelenlétében koncentrációfüggést mutat (maximális vazokonstrikció 300 μ M H₂O₂-nál 47±7% vs. 8±19%, 35±23%, és 73±11% vazokonstrikció 20 μ M, 40 μ M és 100 μ M L-Met jelenlétében; **11.A, B ábra**). Koronária arteriolák esetén a legnagyobb koncentrációban alkalmazott L-met kezelés (100 μ M) tovább fokozta a magasabb H₂O₂ koncentrációk (1 mM) által kiváltott vazodilatáció mértékét, ugyanakkor nem befolyásolta a 300 μ M H₂O₂ által kiváltott vazoaktív hatásokat (3±9% vs. 13±7% vazodilatáció; *P*=0,44; **11.C, D ábra**). Baziláris artériákban 100 μ M L-Met hozzáadása szignifikánsan nem befolyásolta a MPO által kiváltott kontrakciós erő változásokat (3,3±1,0 mN 300 μ M H₂O₂ vs. 4,0±1,0 mN, vazokonstrikció *P*=0,61; **11.E, F ábra**).

6.10. A mieloperoxidáz által kiváltott vazokonstrikció mechanizmusa vázizom arteriolákon

Vázizom arteriolákon az endotélium eltávolítását követően a MPO által kiváltott vazokonstrikció mértéke csökkent (47 \pm 7% vazokonstrikció 300 μ M H₂O₂+MPO endotélium jelenlétében, *vs.* 13 \pm 15% vazokonstrikció H₂O₂+MPO endothelium nélkül, *P*=0,07; **12.A ábra**).

A következő lépésben tanulmányoztuk a TXA2 receptorok szerepét a MPO által kiváltott vazokonstriktív hatások kialakításában. A TXA2 receptor inhibitor (1 μ M SQ-29548) gátolta a MPO által kiváltott vazokonstrikciót és vazodilatáció alakult ki (47±7% vazokonstrikció 300 μ M H₂O₂+MPO *vs.* 30±17% vazodilatáció 300 μ M H₂O₂+MPO+TXA2 receptor inhibitor, *P*=0,002; **12.B ábra**).

A COX szerepének igazolására méréseinket elvégeztük a nem specifikus COX gátlószer, indomethacin (1 μ M) jelenlétében is. A TXA2 inhibitorhoz hasonlóképpen a COX gátlószer is felfüggesztette a MPO által kiváltott vazokonstrikciót és vazodilatáció volt megfigyelhető (47±7% vazokonstrikció 300 μ M H₂O₂ *vs.* 69±16% vazodilatáció, *P*=0,002; **12.C ábra**).

11. Ábra: L-Metionin hatásai a mieloperoxidáz által kiváltott vaszkuláris válaszokra különböző érpreparátumokban

L-Met növekvő koncentrációi (20 μ M, 40 μ M vagy 100 μ M) koncentráció-függő módon gátolták a MPO által kiváltott vazokonstrikciót vázizom arteriolákban (n=6 arteriola 4 különböző állatból, 20 μ M L-Met jelenlétében, (fekete, üres négyzet); n=4 arteriola 4 különböző állatból, 40 μ M L-Met jelenlétében, (fekete, üres háromszög); n=5 arteriola 5 különböző állatból, 100 μ M L-Met jelenlétében (fekete, üres háromszög) **A** Panel). Az oszlopdiagramon a MPO és 300 μ M H₂O₂ (kontroll) vázizom arteriolákra kifejtett hatásai láthatók önmgában és növekvő koncentrációjú L-Met jelenlétében (**B** Panel). A csillagok a MPO jelenlétében kiváltott hatásokhoz viszonyított szignifikáns különbséget jelölik. Koronária arteriolákban az L-Met (100 μ M; fekete, üres háromszög) csak a magasabb H₂O₂ koncentrációk mellett megvalósuló MPO-függő vazodilatációt erősítette (n=4 arteriola 4 különböző állatból; **C** Panel). Az oszlopdiagromon a MPO és 300 μ M H₂O₂ (kontroll) koronária arteriolákra kifejtett hatásait tüntettük fel önmagában valamint 100 μ M és 1 mM L-Met jelenlétében (**D** Panel). L-Met (100 μ M; fekete, üres háromszög) nem befolyásolta szignifikánsan a MPO által kiváltott izometriás kontrakció változásokat baziláris artériákon (n=6 arteriola 3 különböző állatból, fekete, üres háromszög, **E** Panel). Az oszlopdiagramon MPO és 300 μ M H₂O₂ (kontroll) baziláris artériákra kifejtett hatásai láthatók önmagában és 100 μ M L-Met jelenlétében (**F** Panel).

12. Ábra: A MPO az endoteliális és a simaizomsejtekben található ciklooxigenáz-1 aktivációjával tromboxán A2 felszabaduláshoz vezet vázizom arteriolákban

A H_2O_2 által kiváltott vazokonstrikció (piros, teli kör; kontroll) hiányzott az endotélium eltávolítását követően (n=4 arteriola 4 különböző állatból; fekete, teli háromszög; A Panel). Ezzel szemben MPO jelenlétében az endotélium eltávolítása nem szüntette meg az alacsony H_2O_2 koncentrációban létrejövő vazokonstrikciót (n=5 arteriola 4 különböző állatból; fekete, üres háromszög; A Panel). A zöld, teli körök a MPO+ H_2O_2 hatását jelölik. A csillagok a MPO hatására kialakuló válaszok közötti szignifikáns különbséget jelölik endotélium jelenlétében és hiányában, a kettőskeresztek a kontroll körülmények és az endotélium hiányában végzett mérések közötti szignifikanciát mutatják. A MPO és H_2O_2 által kiváltott vazokonstrikciót megvizsgáltuk TXA2 receptor antagonista (n=5 arteriola 4 különböző állatból; fekete, üres háromszög, **C** Panel) jelenlétében is. A csillagok a MPO-hoz viszonyított szignifikáns eltéréseket jelentik.

6.11. A vaszkuláris ciklooxigenáz expresszió vizsgálata vázizom arteriolákon

A COX izoenzimek vaszkuláris expresszióját immunohisztokémiai módszerrel vizsgáltuk. Ennek során mind a vaszkuláris simaizomsejtek, mind az endotélsejtek pozitív jelet mutattak COX-1 antitest esetében, viszont a COX-2 jelenlétét nem tudtuk igazolni.

13. Ábra: A ciklooxigenáz-1 izoenzim kimutatható az endotélsejtekben valamint a vaszkuláris simaizomsejtekben is vázizom arteriolákban

A COX-1 izoenzimek expresszióját a vaszkuláris sejtekben immunohisztokémiai módszerrel igazoltuk. A simaizomsejteket zöld, a COX enzimet piros, a sejtmagokat pedig kék színnel jelöltük (felülről lefelé). A legalsó képek a felettük lévő három kép egymásra vetítésével készültek. A kontroll felvételeket (elsődleges antitest nélkül) a jobb oldali oszlopban tüntettük fel.

6.12. A mieloperoxidáz által kiváltott vazokonstrikció Ca²⁺ érzékenyítés révén valósul meg

A MPO által kiváltott vazokonstrikciót (29±3% vazokonstrikció 1 mM H₂O₂-nál, P=0,04 vs. kontroll) nem kísérte a F_{340/380} arány szignifikáns változása 1 µM-1 mM H₂O₂ koncentrációtartományban (**14.A ábra**). Ezzel szemben a noradrenalin (1 nM-10 µM) által okozott hasonló mértékű vazokonstrikció (44±4% vazokonstrikció 10 µM noradrenalin, P=0,0005 vs. kontroll) az F_{340/380} arány szignifikáns növekedésével járt együtt (0,85±0,03-ról 1,15±0,09-re; **14.B ábra**). A MPO kezelés önmagában nem befolyásolta az érátmérőt, sem pedig az F_{340/380} arány mértékét.

14. Ábra: A mieloperoxidáz növeli a vaszkuláris simaizomsejtek Ca²⁺ érzékenységét

Az intracelluláris Ca²⁺ ($F_{340/380}$, zöld kör, illetve háromszög) és a külső érátmérő (fekete, üres kör illetve háromszög) változásait tanulmányoztuk vázizom arteriolákban kontroll körülmények között (n=7 arteriola 6 különböző állatból; **A** Panel), továbbá noradrenalin növekvő koncentrációinak hozzáadása során (n=7 arteriola 6 különböző állatból; **B** panel). A csillagok a kiindulási értékekhez viszonyított szignifikáns különbséget jelölik.

6.13. A hidrogén-peroxid és a mieloperoxidáz hatásmechanizmusa vázizom arteriolákon

Vázizom arteriolákon a H_2O_2 az endoteliális Src-PLC-PKC-PLA-COX-1 útvonalat aktiválja, mely endoteliális TXA2 termelődését okozza. A simaizomsejteken található TXA2 receptorok aktivációjának következtében fokozódik a vaszkuláris simaizom Ca²⁺ érzékenysége, mely végeredményben vazokonstrikciót okoz (**15. ábra**).

A neutrofil aktiváció következtében felszabaduló és az érpályába jutó MPO a H₂O₂-al reagálva HOCl-t képez. A HOCl az endoteliális és a simaizomsejtekben található COX-1-et is aktiválja, így fokozza a TXA2 termelődését. A fokozott TXA2 receptor aktiváció következtében fokozott vazokonstrikció tapasztalható. A fiziológiásan jelenlévő HOCl scavenger, L-met gátolja a MPO klorinációs aktivitását, ennek következtében az enzim peroxidációs aktivitása érvényesül, mely egy eddig nem tisztázott útvonalon végül vazodilatációt vált ki (**15. ábra**).

15. Ábra: A hidrogén-peroxid és a mieloperoxidáz vaszkuláris hatásainak mechanizmusa vázizom arteriolákon

A hidrogén-peroxid (H₂O₂) aktiválja az endoteliális Src-kináz (SRC)-foszfolipáz C (PLC)-foszfolipáz A (PLA)-ciklooxigenáz-1 (COX-1) útvonalat, mely tromboxán A2 (TXA2) felszabadulásához vezet. A TXA2 a vaszkuláris simaizom Ca²⁺ érzékenységét fokozva vazokonstrikciót vált ki. Mieloperoxidáz (MPO) jelenlétében hipoklórossav (HOCl) keletkezik, ami az endoteliális és a simaizomban található COX-1 aktivációját okozva fokozott TXA2 termelődést okoz. Ugyanakkor a rendszerben jelenlévő L-metionin (L-met) gátolva a MPO klorinációs aktivitását, felfüggeszti a vazokonstikciót és egy MPO-függő vazodilatatív útvonal aktiválódása figyelhető meg.

Kezelés	Endotélium eltávolítása	PLA inhibitor	PKC inhibitor	PLC inhibitor	Src inhibitor	COX inhibitor	COX-1 inhibitor	COX-2 inhibitor	COX.2 inhibitor	TXA2 inhibitor
Gátlószer neve		7,7- dimethyl- (5Z,8Z)- eicosadienoic acid	Chelerythrine	U- 73122	Src inhibitor-1	Indomethacin	SC-560	Celecoxib	NS-398	SQ- 29548
Változás (100 µM) H ₂ O ₂ mellett	0±8% konstrikció	7±2% konstrikció	9±4% konstrikció	15±18% dilatáció	8±3% konstrikció	41±17% dilatáció	23±9% dilatáció	13±4% konstrikció	11±1% konstrikció	36±11% dilatáció

1. Táblázat: A hidrogén-peroxid vazomotoros hatásainak tanulmányozása során alkalmazott inhibitorok.

A konstriktív válaszokat a kiindulási érátmérőhöz (vazoaktív anyag hozzáadását megelőző érátmérő 80 Hgmm intraluminális nyomáson) viszonyítva fejeztük ki. A vazodilatációt a maximális (Ca²⁺-mentes körülmények között mért, passzív) érátmérő százalékában adtuk meg. A táblázatban a 100 μ M H₂O₂ mellett kialakult érátmérő változás értékeit tüntettük fel. Kontrollként a 100 μ M H₂O₂ jelenlétében mért érátmérő értéket (34±3% vazokonstrikció) használtuk.

Kozolás	Endotélium	MPO inhibitor	HOCl	HOCl	HOCl	COX	TXA2
Kezeles	eltávolítása	MFO minoitoi	scavenger	scavenger	scavenger	inhibitor	inhibitor
Gátlószer		4-	L-metionin	L-metionin	L-metionin	Indomethesin	50 20548
neve		aminobenzhydrazide	20 µM	40 µM	100 µM	muomethacm	3Q-29340
Változás (300 µM)	13±15% konstrikció	5±18% konstrikció	8±19% konstrikció	35±23% konstrikció	73±11% konstrikció	69±16% dilatáció	30±17% dilatáció
H ₂ O ₂ mellett			1101101111010			unuuuu	unuuuu

2. Táblázat: A mieloperoxidáz vazomotoros hatásainak tanulmányozása során alkalmazott inhibitorok.

A konstriktív válaszokat a kiindulási érátmérőhöz (vazoaktív anyag hozzáadását megelőző érátmérő 80 Hgmm intraluminális nyomáson) viszonyítva fejeztük ki. A vazodilatációt a maximális (Ca²⁺-mentes körülmények között mért, passzív) érátmérő százalékában adtuk meg. A táblázatban a 300 μ M H₂O₂ mellett kialakult érátmérő változás értékeit tüntettük fel. Kontrollként a 300 μ M H₂O₂ és MPO jelenlétében mért érátmérő értéket (47±7% vazokonstrikció) használtuk.

7. Megbeszélés

Az erekben kialakuló gyulladásos elváltozások sok, napjainkban igen komoly egészségügyi problémát jelentő betegség alapját képezik, illetve egyéb kóros folyamatokkal együtt súlyos, összetett kezelést igénylő kórképek megjelenéséhez vezetnek. Az intenzív klinikai és kísérletes kutatások ellenére a vaszkuláris gyulladásos folyamatok során jelentkező mikrocirkulációs elváltozások természete és azoknak a gyulladás során a keringés szabályozásban betöltött szerepe nem kellőképpen tisztázott. Ezért tudományos kutatásaimban célul tűztem ki, hogy megvizsgáljam a gyulladásos folyamatokban kulcsfontosságú szerepet betöltő enzim, a MPO vaszkuláris preparátumokra kifejtett hatásait, továbbá a MPO szubsztrát H₂O₂ vazoaktív hatásainak mechanizmusát. A cél elérése érdekében vázizom és koronária mikroarteriolákon, valamint baziláris artériákon vizsgáltuk meg az endotélium és vaszkuláris simaizom által közvetített érválaszokat.

7.1. A hidrogén-peroxid által kiváltott vaszkuláris hatások vizsgálata

A H₂O₂-t fiziológiás körülmények között is fontos keringésszabályozó molekulaként tartjuk számon, éppen ezért a hatásmechanizmusának feltárása széleskörűen kutatott feladat. A H₂O₂ rendkívül sokszínű hatást képes előidézni fajtól, értípustól, vaszkuláris preparátumtól függő módon. Ezek közül leginkább mint EDHF terjedt el és ennek megfelelően a vazodilatációt kiváltó hatás mechanizmusát már többen leírták ^(24, 39, 42, 43), ezzel szemben a vazokonstrikciót okozó hatásával kapcsolatban még nincsen egyértelmű magyarázat.

A H_2O_2 endotéliumtól függő módon befolyásolja az érátmérőt patkány vese artériákban ⁽³⁵⁾, kutya baziláris artériákban ⁽⁸⁸⁾, sertés koronária arteriolákban ⁽⁴¹⁾ illetve nyúl aortában ⁽⁴⁰⁾. Ugyanakkor az endotéliumtól függetlenül megvalósuló hatásairól is beszámoltak humán koronária arteriolákban ⁽³²⁾, kutya koronária arteriolákban ⁽⁴⁴⁾ és patkány aortában ⁽³³⁾. Jelen tanulmány eredményei szerint a H_2O_2 által kiváltott vazokonstrikció teljes mértékben megszűnt az endotélium eltávolításának hatására, valamint a TXA2 receptorok gátlószerének jelenlétében. Ezek alapján feltételezzük, hogy a H₂O₂ endoteliális TXA2 képződéséhez vezet, mely receptoraihoz kapcsolódva vazokonstrikciót vált ki ⁽³⁵⁻³⁷⁾. Továbbá eredményeink alapján azt is elmondhatjuk, hogy a H₂O₂ endotélium-függő vazodilatációt eredményez vázizom arteriolákon, amennyiben a TXA2 receptorokon keresztül megvalósuló konstriktív mechanizmus gátolt. A TXA2 receptorok gátlása nem volt hatással a H₂O₂ által kiváltott vazodilatációra koronária arteriolákon, viszont a receptor aktivációja vazokonstrikciót váltott ki mind a vázizom arteriolákban, mind pedig a koronária arteriolákban. Ezek alapján feltételezzük, hogy a TXA2 receptorok mindkét értípusban jelen vannak, tehát valószínűleg a H₂O₂ különböző jelátviteli útvonalak aktiválásán keresztül hat ezen erekben.

A COX szubsztrátjaként működő AA szintéziséért a PLA felelős különféle vaszkuláris preparátumokban ⁽⁸⁹⁾, ezért tanulmányoztuk a PLA lehetséges szerepét a H_2O_2 által okozott vazokonstrikció kialakításában. PLA antagonista (7,7-dimethyl-(5Z,8Z)-eicosadienoic acid, 100 μ M) jelenlétében a H_2O_2 által kiváltott vazokonstrikció gátolható volt. Ez az eredmény összhangban van Gao és mtsai által leírt kísérletekkel, melyeket mezenteriális arteriolákon végeztek ⁽³⁸⁾.

A PLA aktivációja megvalósulhat az enzim PKC általi foszforilációja következtében ⁽⁹⁰⁾. Így a következő lépésben PKC antagonista chelerythrine jelenlétében (10 μ M) inkubáltuk az ereket, melyet követően a H₂O₂ által kiváltott vazokonstrikció mértéke szignifikánsan csökkent. Mivel a PLC hidrolízise során keletkezett diacilglicerol a PKC aktiválásához vezet ⁽⁹¹⁾, PLC antagonistát (U73122, 10 μ M) alkalmaztunk, melynek hatására a H₂O₂ által okozott vazokonstrikció szignifikánsan csökkent. Fontos megjegyezni, hogy a PKC útvonal gátlása (PLC vagy PKC inhibitior használatával) közvetlenül hatással lehet a TXA2 receptor stimuláció által létrejött vazokonstrikcióra, a H₂O₂ endoteliális hatásaitól függetlenül. Ugyanakkor megfigyeltük, hogy a PLC gátlása nem volt hatással a TXA2 receptor agonista

U46619 által kiváltott vazokonstrikcióra így feltételezzük, hogy a PLC egy upstream (endoteliális) modulátorként van jelen a H_2O_2 által kiváltott vazokonstrikcióhoz vezető szignalizációs útvonalban.

A H₂O₂-hatásaiban a PLC aktivációja kapcsán már korábban megfigyelték az Src kináz szerepét egér embrionális fibroblasztokban ⁽⁹²⁾. Ezért megvizsgáltuk, hogy igazolható-e a szerepe a H₂O₂ vaszkuláris hatásainak kiváltásában is. Src-kináz antagonista hozzáadására a H₂O₂ által kiváltott vazokonstrikció csökkent.

Továbbá a H₂O₂ által kiváltott vazokonstrikció teljes mértékben gátolható volt a nem specifikus COX gátlószer indomethacin alkalmazásával, mely eredményünk összhangban van korábbi megfigyelésekkel ^(24, 33, 35, 38, 93, 94). Vizsgálataink következő részében tanulmányoztuk a különböző COX izoenzimek szerepét. Ennek során azt tapasztaltuk, hogy a H₂O₂-hatására létrejött vazokonstrikció gátolható volt COX-1 specifikus antagonista használatával, viszont nem változott a COX-2-t specifikusan gátló inhibitor jelenlétében, ami alapján feltételezzük, a COX-1 elsődleges mediátor szerepét ezen hatás létrejöttében.

A TXA2 receptorok expressziója számos sejttípuson kimutatható, így a vaszkuláris simaizomsejteken is ⁽⁹⁵⁾. A TXA2 receptorok aktivációja G_q fehérjéken keresztül a PLC útvonal aktiválásához vezet, mely következményes Ca^{2+} felszabadulást és PKC aktivációt vált ki (a Ca^{2+} -függő útvonal) ^(96, 97). A TXA2 aktiváció G_{12} fehérjékhez kapcsoltan ⁽⁹⁷⁾, Rho-kináz útvonal aktiválását okozza (a Ca^{2+} -független útvonal), ennélfogva a kontraktilis fehérjék Ca^{2+} érzékenységét fokozza ⁽⁹⁶⁾. Mindemellett, a G_{12} fehérjék is fokozhatják a sejtekbe történő Ca^{2+} belépést egy másik Ca^{2+} -függő mechanizmus aktiválásán keresztül, ahogyan ezt megfigyelték patkány kaudális arteriális simaizomsejtekben ⁽⁹⁸⁾. Eredményeink szerint a H_2O_2 által kiváltott vazokonstrikció során nem volt tapasztalható az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció jelentős mértékű megnövekedése, viszont a kontrollként alkalmazott noradrenalin által kiváltott érátmérő csökkenést szignifikáns intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedés kísérte. Ezzel

együtt teszteltük a TXA2 receptor agonista U46619 hatását is, mely a noradrenalinhoz hasonló mértékű vazokonstrikciót váltott ki, viszont ezen hatás során jóval kisebb mértékű intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedés volt kimutatható, mint a noradrenalin esetében. Ezen eredmények alátámasztják azon feltételezésünket, hogy a H₂O₂ növeli a vaszkuláris simaizomsejtek Ca²⁺ érzékenységét és nem a Ca²⁺ koncentráció emelésén keresztül hat.

Korábbi tanulmányokban is leírtak hasonló megfigyeléseket, miszerint az extracelluláris Ca²⁺ eltávolítása nem befolyásolta a H₂O₂ által kiváltott vazokonstrikciót nyúlból ^(36, 50) vagy sertésből ⁽³⁹⁾ izolált pulmonáris arteriolákban. A Ca²⁺ érzékenység fokozásának hátterében többféle mechanizmus is állhat. Egyik lehetséges magyarázat lehet a miozin könnyűlánc foszfatáz gátlása Rho-kinázon (ROCK) vagy PKC-n keresztül, és az ezáltal megnövekedett mértékű LC20 (miosin regulatory light chain) foszforiláció ⁽⁹⁹⁾. Továbbá elképzelhető a PKC és a ROCK által befolyásolt aktin citoszkeleton dinamikus regulációjának szerepe is ⁽¹⁰⁰⁾.

7.2. A mieloperoxidáz hatása a hidrogén-peroxid által kiváltott érválaszokra

Gyulladásos folyamatok során a vaszkuláris szövetekben nő a H₂O₂ koncentrációja, ezáltal képes az érátmérő szabályozására az aktuális vérállátási igényeknek megfelelően. Ezzel együtt az aktivált fehérvérsejtek MPO-t termelnek, mely feltételezéseink szerint befolyásolni tudja a H₂O₂ érátmérő szabályozó szerepét.

Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a MPO fokozza a H₂O₂ által kiváltott vazokonstrikció mértékét mindhárom vizsgált értípusban, továbbá gyengíti a vazodilatációs mechanizmust. Ezen jelenség hátterében többféle lehetőség is állhat. Egyik lehetséges magyarázatként felmerül, hogy a MPO felhasználja a H₂O₂-ot, ezért ugyanazon mértékű vazodilatáció kialakulásához elvileg több H₂O₂ alkalmazására lenne szükség. Ennek az elméletnek ellentmond azon megfigyelésünk, miszerint az alacsonyabb H₂O₂ koncentráció mellett létrejövő vazokonstrikció mértéke fokozódott MPO jelenlétében. Ezek alapján tehát a

MPO nem egyszerűen eltolja a H_2O_2 által kiváltott érválaszok koncentráció-függését, vagyis a fokozott vazokonstrikció hátterében más mechanizmust feltételezünk. A MPO és a H_2O_2 reakciója során egy újabb erős oxidatív tulajdonságú molekula, HOCl keletkezik, ami szintén befolyásolhatja a H_2O_2 vazoaktív tulajdonságait. Számos kutatás foglalkozott a HOCl oxidatív tulajdonságainak erekre kifejtett hatásainak feltérképezésével. A HOCl képes SH oxidációra, karbonilálásra, tirozin nitrálásra valamint aminosavak közötti keresztkötések létrehozására is (^{101, 102)}. Kevesebb információ áll rendelkezésre azzal kapcsolatban, hogy a HOCl rendelkezike önálló vaszkuláris hatásokkal. Egyes kutatócsoportok megfigyelték, hogy a HOCl szuperoxid-anion-függő módon gátolja a NOS-t, mivel szuperoxid dizmutázzal ezen hatásait gátolni tudták ⁽⁸²⁾. Továbbá a HOCl eddig ismeretlen útvonalon vazokonstrikciót okoz szarvasmarhából izolált pulmonáris artériákon ⁽¹⁰³⁾.

Miután bemutattuk, hogy a vaszkuláris szöveteket érintő gyulladásos folyamatok során felszabaduló MPO hogyan befolyásolja a H₂O₂ vazoaktív tulajdonságait, megpróbáltuk feltérképezni a MPO által kiváltott hatások lehetséges mechanizmusát vázizom arteriolákon. Az L-met alkalmazásával, ami egy széleskörűen elfogadott HOCl scavenger molekula (vagyis gátolja az enzim klorinációs aktivitását) ⁽¹⁰⁴⁻¹⁰⁶⁾, gátolható volt a MPO jelenlétében létrejövö fokozott vazokonstriktív válasz, valamint szignifikáns vazodilatáció volt megfigyelhető. Az MPO specifikus inhibitor 4-aminobenzhydrazide képes az enzim klorinációs és peroxidáz aktivitását is gátolni ^(51, 107, 108). A mi kísérleti elrendezésünkben a MPO inhibitor gátolta a MPO által kiváltott fokozott vazokonstrikciót és a kontroll körülményekhez hasonló mértékű vazokonstrikciót detektáltunk. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a MPO jelenlétében megfigyelhető konstriktív válasz kialakításában a MPO-függő klorinációs útvonal aktiválódásának van fő szerepe.

L-Met jelenlétében MPO-függő vazodilatációt figyelhettünk meg, mely kontroll körülmények között (MPO hiányában) nem volt tapasztalható. Feltételezésünk szerint ezen vazodilatáció a MPO peroxidációs aktivitásának következtében jön létre, mivel az L-Met csak a klorinációs útvonal gátlására képes.

Továbbá fontos megjegyeznünk, hogy koronária arteriolákban, valamint baziláris artériákban a MPO hatása kevésbé volt kifejezett a vázizom arteriolákon megfigyeltekhez képest, ennek megfelelően az L-met jelenlétében tapasztalt változások is kevésbé voltak jelentősek. Ezek alapján elmondató, hogy a MPO-függő vazodilatációs útvonal elemei eltérő módon vannak jelen különböző vaszkuláris preparátumokban.

Kísérleteinket megismételtük intakt endotélium hiányában is, mellyel kizárhatjuk az endotélium-függő hatásokat, beleértve a NO csökkent hasznosulását is ^(79, 82, 103). Korábbiakban azt találtuk, hogy a H₂O₂ által kiváltott vazokonstrikció endotélium-függő folyamat. Az endotélium eltávolítása nem teljesen szüntette meg a MPO által kiváltott vazokonstrikciót, vagyis a MPO által okozott vazokonstrikció csak részben endotélium-függő folyamat. További kísérleteinkben mind a TXA2 receptor gátló SQ-29548 mind pedig a nemspecifikus COX inhibitor indomethacin, gátolta a MPO hatására kialakuló vazokonstrikciót. Mindezen megfigyeléseink alapján arra következtetünk, hogy a MPO TXA2 felszabadulásához vezet nem csak az endoteliális sejtekben, hanem a vaszkuláris simaizomsejtekben is.

Ezen elképzelésünk igazolása érdekében immunhisztokémiai vizsgálatot végeztünk, melynek során vázizom arteriolákból készített metszeteken vizsgáltuk a különböző COX izoenzimek expresszióját. A COX-1 enzim specifikusan jelen volt mind az endotéliumban, mind pedig a simaizomsejtekben. A fenti eredmények arra utalnak, hogy a HOCl - COX-1 - TXA2-útvonal aktiválódása MPO-függő vazodilatáció gátlásához vezethet vázizom arteriolákban.

A MPO által okozott vazokonstrikció során nem tapasztaltuk az intracelluláris Ca²⁺ koncentráció jelentős mértékű növekedését. Viszont a noradrenalin hatására bekövetkező

szignifikáns vazokonstrikcióval párhuzamosan, az intracelluláris Ca²⁺ koncentráció jelentős mértékű növekedése volt megfigyelhető. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a MPO növeli a vaszkuláris simaizomsejtek kontraktilis apparátusának Ca²⁺ érzékenységét, és nem az intracelluláris Ca²⁺ koncentráció emelésén keresztül hat.

Mindezek alapján, a H₂O₂ fontos vazoregulációs szabályozó szereppel rendelkező molekula, ugyanakkor az eredő hatása függ egyéb vazoaktív molekulák jelenlététől is. Gyulladásos állapotban a megnövekedett mennyiségű H₂O₂ mellett MPO is felszabadul, mely fokozza a H₂O₂ hatására létrejövő vazokonstrikciót vázizom arteriolákon. Ezen gyulladással járó állapotokban az L-met megakadályozza a MPO által kiváltott fokozott vazokonstrikciót és hozzájárul a gyulladásra jellemző vazodilatáció kialakításához.

8. Az értekezésben szereplő új tudományos eredmények

A H₂O₂ és a MPO vaszkuláris hatásainak tanulmányozásának alapján a következő eredeti megállapításokat tettük:

- Izolált vaszkuláris preparátumon tanulmányoztuk a H₂O₂ által kiváltott vazokonstrikció mechanizmusát: fiziológiás koncentrációban alkalmazva a H₂O₂ az endoteliális Src kinázt aktiválja, mely TXA2 szintézisén és a vaszkuláris simaizomsejtek Ca²⁺ érzékenységének fokozásán keresztül vazokonstrikcióhoz vezet.
- Kimutattuk, hogy az érpályában kialakuló gyulladásos folyamatok során, a lokálisan felszabaduló MPO hatására fokozódik a H₂O₂ vazokonstriktív hatása.
- 3. A MPO vazokonstrikciót elősegítő hatása a HOCl termelődésén keresztül valósul meg.
- A MPO az endoteliális és a simaizomsejtekben található COX-1 aktiválására is képes, ezáltal fokozva a TXA2 termelődését mely Ca²⁺ érzékenyítéshez vezet.
- 5. Megállapítottuk, hogy a MPO klorinációs hatását gátolva egy, az enzim peroxidációs aktivitásához köthető szignalizációs útvonal is felismerhető, mely vazodilatációt vált

ki.

9. Összefoglalás

A vaszkuláris szövetek gyulladásos elváltozásai a társadalom nagy hányadát érintő kardiovaszkuláris betegségek kiindulópontját jelentik, így fontossá vált az ezen folyamat során felszabaduló vazoaktív hatásokkal bíró anyagok tanulmányozása.

Célul tűztük ki a H₂O₂ által kiváltott vazokonstrikció mechanizmusának feltérképezését, valamint a MPO vazomotoros hatásainak tanulmányozását. Az érátmérő és a kontraktilis erő változásainak mérését patkányból izolált vázizom arteriolákon (VA), koronária arteriolákon (KA), valamint baziláris artériákon végeztük (BA).

A H₂O₂ VA-on és BA-on koncentrációfüggő bifázisos hatást váltott ki: alacsony koncentrációban vazokonstrikciót, magasabb koncentrációban vazodilatációt okozott. Ezzel szemben KA-on csak vazodilatációt figyeltünk meg. A H₂O₂ által kiváltott vazokonstrikció VA-on gátolható volt az endotélium eltávolításával, valamint a következő gátlószerek alkalmazásával: TXA2 antagonista, nem szelektív COX inhibitor, COX-1 inhibitor, PLA és PKC antagonista valamint Src kináz inhibitor. MPO jelenlétében fokozódott a H₂O₂ hatására megfigyelhető vazokonstrikció mindhárom értípusban. A MPO által kiváltott vazokonstrikció VA-on gátolható volt MPO specifikus inhibitor, L-met, TXA2 antagonista illetve nem szelektív COX inhibitor használatával. Az endotélium eltávolítása részben gátolta a MPO által kiváltott vazokonstrikciót. A H₂O₂ és a MPO, valamint a TXA2 agonista által kiváltott vazokonstrikció nem járt együtt az intracelluláris Ca²⁺ koncentráció növekedésével.

Eredményeink szerint, a H_2O_2 aktiválja az Src-kináz, PKC, PLA és a COX-1 útvonalat, mely az endoteliális TXA2 szintézisén keresztül fokozza a vaszkuláris simaizom Ca^{2+} érzékenységét és vazokonstrikciót okoz. A MPO klorinációs aktivitásának következtében keletkezett HOCl fokozza a TXA2 termelését az endotélsejtekben és a simaizomsejtekben is, ezáltal fokozza a H₂O₂ által kiváltott vazokonstrikciót. A fiziológiásan jelen lévő L-met ezen útvonal gátlására képes.

10. Summary

Cardiovascular disorders are often related to the inflammatory processes of the blood vessels. The better understanding of the underlying mechanisms may help the treatment and prevention.

The aim of this study was to investigate the mechanism of the H_2O_2 -evoked vasoconstriction and to explore the vasomotor activity of MPO. The measurement of the changes of the arteriolar diameter and the contractile force was performed on isolated skeletal muscle arterioles (SMAs), coronary arterioles (CAs) and basilar arteries (BAs) of the rat.

 H_2O_2 produced a biphasic response in the SMAs and in the BAs: it evoked constrictions at lower concentrations and dilations at higher doses. In contrast, H_2O_2 caused only vasodilation in CAs. H_2O_2 induced constrictions of SMAs were inhibited after endothelium removal or by preincubation with antagonists of the TXA2 receptor, COX-1, PLA, PKC and Src kinase. In the presence of MPO the H_2O_2 -evoked vasoconstriction was pronounced in these vessel types. The mechanism of the MPO-evoked vasoconstriction was detailed in SMAs. The MPO-evoked vasoconstriction was inhibited using MPO-specific inhibitor, or L-met and by preincubation with TXA2 antagonist or with COX inhibitor. The MPO-mediated vasoconstriction was only partly inhibited by endothelium removal. The vasoconstriction evoked by H_2O_2 or MPO was not accompained with a significant increase of intracellular Ca²⁺ concentration, similarly to that evoked by TXA2 agonist.

We conclude that the H_2O_2 activates the Src kinase, PKC, PLA, COX-1 pathway leading to the endothelial synthesis of TXA2. TXA2 increases the Ca²⁺ sensitivity of the vascular smooth muscle, thereby causing vasoconstriction. In the presence of MPO, HOCl is generated which increases the TXA2 production both in the endothelial cells and in the smooth muscle cells leading to increased vasoconstriction. Physiologically present L-met can inhibit this pathway.

11. Irodalomjegyzék

- Tracy, R.P., *The five cardinal signs of inflammation: Calor, Dolor, Rubor, Tumor and Penuria (Apologies to Aulus Cornelius Celsus, De medicina, c. A.D. 25).* J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2006. 61(10): p. 1051-2.
- Mittal, M., et al., *Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury*. Antioxid Redox Signal, 2014. 20(7): p. 1126-67.
- 3. Lau, D. and S. Baldus, *Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease*. Pharmacol Ther, 2006. **111**(1): p. 16-26.
- 4. Montezano, A.C. and R.M. Touyz, *Molecular mechanisms of hypertension reactive oxygen species and antioxidants: a basic science update for the clinician.* Can J Cardiol, 2012. **28**(3): p. 288-95.
- 5. Sprague, A.H. and R.A. Khalil, *Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease*. Biochem Pharmacol, 2009. **78**(6): p. 539-52.
- Rudolph, T.K., et al., *Myeloperoxidase deficiency preserves vasomotor function in humans*. Eur Heart J, 2012. 33(13): p. 1625-34.
- 7. Taniyama, Y. and K.K. Griendling, *Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms*. Hypertension, 2003. **42**(6): p. 1075-81.
- 8. Touyz, R.M. and E.L. Schiffrin, *Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension*. Histochem Cell Biol, 2004. **122**(4): p. 339-52.
- 9. Valko, M., et al., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.* Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(1): p. 44-84.
- Paravicini, T.M. and R.M. Touyz, NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. Diabetes Care, 2008.
 31 Suppl 2: p. S170-80.

- 11. Davies, K.J., Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. IUBMB Life, 2000. **50**(4-5): p. 279-89.
- 12. Halliwell, B. and J.M. Gutteridge, *Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease*. Biochem J, 1984. **219**(1): p. 1-14.
- 13. Valko, M., et al., *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*. Chem Biol Interact, 2006. **160**(1): p. 1-40.
- Zhang, D.X. and D.D. Gutterman, *Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. 292(5): p. H2023-31.
- Briones, A.M. and R.M. Touyz, *Oxidative stress and hypertension: current concepts*.
 Curr Hypertens Rep, 2010. 12(2): p. 135-42.
- Mueller, C.F., et al., *ATVB in focus: redox mechanisms in blood vessels*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. 25(2): p. 274-8.
- 17. Nedeljkovic, Z.S., N. Gokce, and J. Loscalzo, *Mechanisms of oxidative stress and vascular dysfunction*. Postgrad Med J, 2003. **79**(930): p. 195-199; quiz 198-200.
- Cai, H., K.K. Griendling, and D.G. Harrison, *The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases*. Trends Pharmacol Sci, 2003. 24(9): p. 471-8.
- 19. Guzik, T.J., et al., Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. Circulation, 2002. 105(14): p. 1656-62.
- 20. Kowalski, J., et al., *Neutrophils superoxide anion generation during carvedilol therapy in patients with stable angina*. Int J Cardiol, 2005. **102**(3): p. 397-402.
- Droge, W., Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev, 2002. 82(1): p. 47-95.

- 22. Brandes, R.P. and J. Kreuzer, *Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation*. Cardiovasc Res, 2005. **65**(1): p. 16-27.
- 23. Cai, H., Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. Cardiovasc Res, 2005. **68**(1): p. 26-36.
- 24. Cseko, C., Z. Bagi, and A. Koller, *Biphasic effect of hydrogen peroxide on skeletal muscle arteriolar tone via activation of endothelial and smooth muscle signaling pathways.* J Appl Physiol (1985), 2004. **97**(3): p. 1130-7.
- 25. Hulsmans, M., E. Van Dooren, and P. Holvoet, *Mitochondrial reactive oxygen species and risk of atherosclerosis*. Curr Atheroscler Rep, 2012. **14**(3): p. 264-76.
- 26. Root, R.K. and J.A. Metcalf, H₂O₂ release from human granulocytes during phagocytosis. Relationship to superoxide anion formation and cellular catabolism of H₂O₂: studies with normal and cytochalasin B-treated cells. J Clin Invest, 1977. 60(6): p. 1266-79.
- Liu, X. and J.L. Zweier, A real-time electrochemical technique for measurement of cellular hydrogen peroxide generation and consumption: evaluation in human polymorphonuclear leukocytes. Free Radic Biol Med, 2001. 31(7): p. 894-901.
- Liu, Y., et al., H₂O₂ is the transferrable factor mediating flow-induced dilation in human coronary arterioles. Circ Res, 2011. 108(5): p. 566-73.
- Matoba, T., et al., Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries. Biochem Biophys Res Commun, 2002. 290(3): p. 909-13.
- 30. Miura, H., et al., *Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles.* Circ Res, 2003. **92**(2): p. e31-40.

- 31. Liu, Y., et al., Mitochondrial sources of H₂O₂ generation play a key role in flow-mediated dilation in human coronary resistance arteries. Circ Res, 2003. 93(6): p. 573-80.
- 32. Cai, H., *NAD(P)H oxidase-dependent self-propagation of hydrogen peroxide and vascular disease.* Circ Res, 2005. **96**(8): p. 818-22.
- 33. Yang, Z.W., et al., *Mechanisms of hydrogen peroxide-induced contraction of rat aorta*. Eur J Pharmacol, 1998. **344**(2-3): p. 169-81.
- 34. Rodriguez-Martinez, M.A., et al., *Contractile responses elicited by hydrogen peroxide in aorta from normotensive and hypertensive rats. Endothelial modulation and mechanism involved.* Br J Pharmacol, 1998. **125**(6): p. 1329-35.
- 35. Gao, Y.J. and R.M. Lee, *Hydrogen peroxide is an endothelium-dependent contracting factor in rat renal artery.* Br J Pharmacol, 2005. **146**(8): p. 1061-8.
- 36. Sheehan, D.W., et al., *Characterization and mechanisms of* H_2O_2 -induced contractions of pulmonary arteries. Am J Physiol, 1993. **264**(5 Pt 2): p. H1542-7.
- 37. Katusic, Z.S., et al., *Endothelium-dependent contractions to oxygen-derived free radicals in the canine basilar artery*. Am J Physiol, 1993. **264**(3 Pt 2): p. H859-64.
- 38. Gao, Y.J., et al., *Mechanisms of hydrogen-peroxide-induced biphasic response in rat mesenteric artery*. Br J Pharmacol, 2003. **138**(6): p. 1085-92.
- Iida, Y. and Z.S. Katusic, *Mechanisms of cerebral arterial relaxations to hydrogen peroxide*. Stroke, 2000. **31**(9): p. 2224-30.
- 40. Zembowicz, A., et al., Involvement of nitric oxide in the endothelium-dependent relaxation induced by hydrogen peroxide in the rabbit aorta. Br J Pharmacol, 1993.
 110(1): p. 151-8.

- 41. Thengchaisri, N. and L. Kuo, *Hydrogen peroxide induces endothelium-dependent and -independent coronary arteriolar dilation: role of cyclooxygenase and potassium channels.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **285**(6): p. H2255-63.
- 42. Barlow, R.S. and R.E. White, *Hydrogen peroxide relaxes porcine coronary arteries by stimulating BKCa channel activity*. Am J Physiol, 1998. **275**(4 Pt 2): p. H1283-9.
- 43. Hayabuchi, Y., et al., Hydrogen peroxide-induced vascular relaxation in porcine coronary arteries is mediated by Ca²⁺-activated K⁺ channels. Heart Vessels, 1998.
 13(1): p. 9-17.
- 44. Rogers, P.A., et al., H₂O₂ activates redox- and 4-aminopyridine-sensitive K_v channels in coronary vascular smooth muscle. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. 292(3):
 p. H1404-11.
- 45. Zhang, D.X., et al., *H*₂*O*₂-*induced dilation in human coronary arterioles: role of protein kinase G dimerization and large-conductance Ca*²⁺-*activated K*⁺ *channel activation.* Circ Res, 2012. **110**(3): p. 471-80.
- 46. Gao, Y.J. and R.M. Lee, *Hydrogen peroxide induces a greater contraction in mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats through thromboxane A(2) production.* Br J Pharmacol, 2001. **134**(8): p. 1639-46.
- 47. Yang, Z.W., et al., Hydrogen peroxide induces contraction and raises [Ca²⁺]_i in canine cerebral arterial smooth muscle: participation of cellular signaling pathways. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1999. 360(6): p. 646-53.
- 48. Ardanaz, N., W.H. Beierwaltes, and P.J. Pagano, Comparison of H₂O₂-induced vasoconstriction in the abdominal aorta and mesenteric artery of the mouse. Vascul Pharmacol, 2007. 47(5-6): p. 288-94.
- 49. Oeckler, R.A., P.M. Kaminski, and M.S. Wolin, Stretch enhances contraction of bovine coronary arteries via an NAD(P)H oxidase-mediated activation of the

extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase cascade. Circ Res, 2003. **92**(1): p. 23-31.

- Pelaez, N.J., et al., H₂O₂ mediates Ca²⁺- and MLC₂₀ phosphorylation-independent contraction in intact and permeabilized vascular muscle. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. 279(3): p. H1185-93.
- 51. Malle, E., et al., *Myeloperoxidase: a target for new drug development?* Br J Pharmacol, 2007. **152**(6): p. 838-54.
- 52. Nauseef, W.M. and H.L. Malech, *Analysis of the peptide subunits of human neutrophil myeloperoxidase*. Blood, 1986. **67**(5): p. 1504-7.
- 53. Daugherty, A., et al., *Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions.* J Clin Invest, 1994. **94**(1): p. 437-44.
- 54. Hampton, M.B., A.J. Kettle, and C.C. Winterbourn, *Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing.* Blood, 1998. **92**(9): p. 3007-17.
- 55. Klebanoff, S.J., *Myeloperoxidase: friend and foe*. J Leukoc Biol, 2005. 77(5): p. 598-625.
- Akin, D.T. and J.M. Kinkade, Jr., Processing of a newly identified intermediate of human myeloperoxidase in isolated granules occurs at neutral pH. J Biol Chem, 1986.
 261(18): p. 8370-5.
- 57. Koeffler, H.P., J. Ranyard, and M. Pertcheck, *Myeloperoxidase: its structure and expression during myeloid differentiation*. Blood, 1985. **65**(2): p. 484-91.
- 58. Davies, M.J., et al., *Mammalian heme peroxidases: from molecular mechanisms to health implications*. Antioxid Redox Signal, 2008. **10**(7): p. 1199-234.
- 59. Abu-Soud, H.M. and S.L. Hazen, *Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase*. J Biol Chem, 2000. **275**(8): p. 5425-30.

- 60. Klebanoff, S.J., *Myeloperoxidase: contribution to the microbicidal activity of intact leukocytes.* Science, 1970. **169**(3950): p. 1095-7.
- 61. Cook, N.L., et al., Myeloperoxidase-derived oxidants inhibit sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase activity and perturb Ca²⁺ homeostasis in human coronary artery endothelial cells. Free Radic Biol Med, 2012. **52**(5): p. 951-61.
- 62. Rosen, H., et al., *Methionine oxidation contributes to bacterial killing by the myeloperoxidase system of neutrophils*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(44): p. 18686-91.
- 63. Podrez, E.A., H.M. Abu-Soud, and S.L. Hazen, *Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis.* Free Radic Biol Med, 2000. **28**(12): p. 1717-25.
- 64. Pullar, J.M., M.C. Vissers, and C.C. Winterbourn, *Living with a killer: the effects of hypochlorous acid on mammalian cells*. IUBMB Life, 2000. **50**(4-5): p. 259-66.
- 65. Lacy, F., et al., *Plasma hydrogen peroxide production in human essential hypertension: role of heredity, gender, and ethnicity.* Hypertension, 2000. **36**(5): p. 878-84.
- 66. Erdei, N., et al., H₂O₂ increases production of constrictor prostaglandins in smooth muscle leading to enhanced arteriolar tone in Type 2 diabetic mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. 292(1): p. H649-56.
- 67. Shi, Y., et al., Oxygen-derived free radicals mediate endothelium-dependent contractions in femoral arteries of rats with streptozotocin-induced diabetes. Br J Pharmacol, 2007. **152**(7): p. 1033-41.
- Nicholls, S.J. and S.L. Hazen, *Myeloperoxidase and cardiovascular disease*.
 Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. 25(6): p. 1102-11.

- Roman, R.M., A.E. Wendland, and C.A. Polanczyk, *Myeloperoxidase and coronary arterial disease: from research to clinical practice*. Arq Bras Cardiol, 2008. **91**(1): p. e11-9.
- 70. Karakas, M. and W. Koenig, *Myeloperoxidase production by macrophage and risk of atherosclerosis*. Curr Atheroscler Rep, 2012. **14**(3): p. 277-83.
- 71. Nikpoor, B., et al., A functional myeloperoxidase polymorphic variant is associated with coronary artery disease in French-Canadians. Am Heart J, 2001. 142(2): p. 336-9.
- Hoy, A., et al., Serum myeloperoxidase concentration in a healthy population: biological variations, familial resemblance and new genetic polymorphisms. Eur J Hum Genet, 2001. 9(10): p. 780-6.
- 73. Hazen, S.L. and J.W. Heinecke, *3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima.* J Clin Invest, 1997. **99**(9): p. 2075-81.
- 74. Hazen, S.L., et al., Elevated levels of protein-bound p-hydroxyphenylacetaldehyde, an amino-acid-derived aldehyde generated by myeloperoxidase, are present in human fatty streaks, intermediate lesions and advanced atherosclerotic lesions. Biochem J, 2000. 352 Pt 3: p. 693-9.
- 75. Hazell, L.J., et al., *Presence of hypochlorite-modified proteins in human atherosclerotic lesions.* J Clin Invest, 1996. **97**(6): p. 1535-44.
- 76. Eiserich, J.P., et al., *Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase.*Science, 2002. 296(5577): p. 2391-4.
- 77. Abu-Soud, H.M. and S.L. Hazen, *Nitric oxide is a physiological substrate for mammalian peroxidases.* J Biol Chem, 2000. **275**(48): p. 37524-32.

- Zhang, H., et al., Inhibition of myeloperoxidase decreases vascular oxidative stress and increases vasodilatation in sickle cell disease mice. J Lipid Res, 2013. 54(11): p. 3009-15.
- 79. Xu, J., et al., Uncoupling of endothelial nitric oxidase synthase by hypochlorous acid: role of NAD(P)H oxidase-derived superoxide and peroxynitrite. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. 26(12): p. 2688-95.
- 80. Zhang, C., et al., *L-arginine chlorination products inhibit endothelial nitric oxide production.* J Biol Chem, 2001. **276**(29): p. 27159-65.
- 81. Zhang, C., et al., *Endothelial dysfunction is induced by proinflammatory oxidant hypochlorous acid.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **281**(4): p. H1469-75.
- Stocker, R., et al., Hypochlorous acid impairs endothelium-derived nitric oxide bioactivity through a superoxide-dependent mechanism. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. 24(11): p. 2028-33.
- 83. Zheng, L., et al., Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidasecatalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease. J Clin Invest, 2004. **114**(4): p. 529-41.
- 84. Fu, X., et al., Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of promatrilysin (MMP-7). A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. J Biol Chem, 2001. 276(44): p. 41279-87.
- 85. Baldus, S., et al., *Myeloperoxidase enhances nitric oxide catabolism during myocardial ischemia and reperfusion*. Free Radic Biol Med, 2004. **37**(6): p. 902-11.
- 86. Askari, A.T., et al., Myeloperoxidase and plasminogen activator inhibitor 1 play a central role in ventricular remodeling after myocardial infarction. J Exp Med, 2003.
 197(5): p. 615-24.

- 87. Czikora, A., et al., *Structure-activity relationships of vanilloid receptor agonists for arteriolar TRPV1*. Br J Pharmacol, 2012. **165**(6): p. 1801-12.
- 88. Yang, Z.W., et al., Endothelium-dependent relaxation to hydrogen peroxide in canine basilar artery: a potential new cerebral dilator mechanism. Brain Res Bull, 1998.
 47(3): p. 257-63.
- Wong, M.S. and P.M. Vanhoutte, COX-mediated endothelium-dependent contractions: from the past to recent discoveries. Acta Pharmacol Sin, 2010. 31(9): p. 1095-102.
- 90. Akiba, S. and T. Sato, *Cellular function of calcium-independent phospholipase A2*.
 Biol Pharm Bull, 2004. 27(8): p. 1174-8.
- 91. Meier, M. and G.L. King, *Protein kinase C activation and its pharmacological inhibition in vascular disease*. Vasc Med, 2000. **5**(3): p. 173-85.
- 92. Wang, X.T., et al., Oxidative stress-induced phospholipase C-gamma 1 activation enhances cell survival. J Biol Chem, 2001. **276**(30): p. 28364-71.
- 93. Gao, Y. and P.M. Vanhoutte, *Products of cyclooxygenase mediate the responses of the guinea pig trachea to hydrogen peroxide*. J Appl Physiol (1985), 1993. **74**(5): p. 2105-11.
- 94. Gil-Longo, J. and C. Gonzalez-Vazquez, *Characterization of four different effects* elicited by H_2O_2 in rat aorta. Vascul Pharmacol, 2005. **43**(2): p. 128-38.
- 95. Sellers, M.M. and J.N. Stallone, Sympathy for the devil: the role of thromboxane in the regulation of vascular tone and blood pressure. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. 294(5): p. H1978-86.
- 96. Nakahata, N., *Thromboxane A2: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology.* Pharmacol Ther, 2008. **118**(1): p. 18-35.

- 97. Offermanns, S., et al., G proteins of the G₁₂ family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(2): p. 504-8.
- 98. Wilson, D.P., et al., Thromboxane A2-induced contraction of rat caudal arterial smooth muscle involves activation of Ca²⁺ entry and Ca²⁺ sensitization: Rho-associated kinase-mediated phosphorylation of MYPT1 at Thr-855, but not Thr-697. Biochem J, 2005. 389(Pt 3): p. 763-74.
- 99. Somlyo, A.P. and A.V. Somlyo, Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. Physiol Rev, 2003. 83(4): p. 1325-58.
- 100. Walsh, M.P. and W.C. Cole, *The role of actin filament dynamics in the myogenic response of cerebral resistance arteries*. J Cereb Blood Flow Metab, 2013. **33**(1): p. 1-12.
- Prutz, W.A., Hypochlorous acid interactions with thiols, nucleotides, DNA, and other biological substrates: Arch Biochem Biophys, 1996. 332(1). p. 110-20.
- 102. Albrich, J.M., C.A. McCarthy, and J.K. Hurst, *Biological reactivity of hypochlorous acid: implications for microbicidal mechanisms of leukocyte myeloperoxidase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(1): p. 210-4.
- 103. Turan, N.N., A.T. Demiryurek, and I. Kanzik, *Hypochlorous acid-induced responses in sheep isolated pulmonary artery rings:* Pharmacol Res, 2000. **41**(5). p. 589-96.
- 104. Okabe, E., et al., *The effect of hypochlorous acid and hydrogen peroxide on coronary flow and arrhythmogenesis in myocardial ischemia and reperfusion*. Eur J Pharmacol, 1993. 248(1): p. 33-9.

- 105. Zhang, C., et al., Interaction of myeloperoxidase with vascular NAD(P)H oxidasederived reactive oxygen species in vasculature: implications for vascular diseases: Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. 285(6): p. H2563-72.
- 106. Zhang, C., J. Yang, and L.K. Jennings, Leukocyte-derived myeloperoxidase amplifies high-glucose--induced endothelial dysfunction through interaction with high-glucose-stimulated, vascular non--leukocyte-derived reactive oxygen species. Diabetes. 2004. 53(11): p. 2950-9.
- 107. Kettle, A.J., et al., *Inhibition of myeloperoxidase by benzoic acid hydrazides*. Biochem J, 1995. 308 (Pt 2): p. 559-63.
- Kettle, A.J., C.A. Gedye, and C.C. Winterbourn: *Mechanism of inactivation of myeloperoxidase by 4-aminobenzoic acid hydrazide*. Biochem J, 1997. **321 (Pt 2)**: p. 503-8.

12. Tárgyszavak

- Ca²⁺ érzékenység
- endotélsejt
- foszfolipáz C
- hidrogén-peroxid
- hipoklórossav
- mieloperoxidáz
- mikroarteriola
- simaizomsejt
- tromboxán A2
- vazokonstrikció

13. Keywords

- Ca^{2+} sensitivity
- endothelial cell
- hydrogen-peroxide
- hipochloric acid
- microarteriole
- myeloperoxidase
- phospholipase C
- smooth muscle cell
- thromboxane A2
- vasoconstriction

14. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, *Dr. Papp Zoltán*nak, aki magasszintű és precíz szakmai tudásával támogatta a PhD munkámat és segített elsajátítani a kutatói szakma alapjait.

Hálásan köszönöm *Dr. Tóth Attilán*ak, aki nemcsak gyakorlati és elméleti tanácsaival nyújtott segítséget, hanem példát mutatott a számomra oly szimpatikus kutatói hozzáállásával. Rávilágított arra, hogy mennyire fontos a tudományos kíváncsiság megőrzése és vezetésével minden egyes kísérletet örömmel és várakozással végeztem el.

Köszönöm *Dr. Édes István* professzor úrnak, aki a Kardiológiai Intézet vezetőjeként megteremtette az értekezésben bemutatott kísérletek kivitelezésének feltételeit.

Nagy örömöt és büszkeséget jelent számomra, hogy közös munkában vehettem részt *Dr. Koller Ákos* professzor úrral, akinek hálásan köszönöm bölcs szakmai tanácsait.

Köszönettel tartozom *Dr. Czikora Ágnes*nek, aki nélkülözhetetlen segítséget nyújtott a kísérleti technika elsajátításában. Szeretném megköszönni TDK hallgatómnak *Dr. Pető Attilá*nak, aki hozzájárult a kísérletek megvalósításához.

Köszönöm a Klinikai Fiziológiai Tanszék munkatársainak, különösen *Mányiné Siket Ivettának* és *Pásztorné Tóth Enikő*nek, hogy megkönnyítették és támogatták a munkámat. Külön szeretném megköszönni *Orosz József*nek, aki az állatkísérletekkel kapcsolatban nyújtott segítséget. Köszönöm a tanszék jelenlegi és volt PhD hallgatóinak a támogatását és a sok boldog emléket illetve külön szeretném megköszönni azoknak a fantasztikus embereknek, akikkel az érlaborban dolgozhattam együtt, így *Dr. Fülöp Gábor*nak is, aki megteremtette az oldott, vidám hangulatot, mely nagyban megkönnyítette a munkámat.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni barátomnak, *Kistamás Kornél*nak, aki támogatott és lelket öntött belém a nem túl sikeres időkben, illetve *édesanyám*nak és *nagyszüleim*nek, mert az ő szeretetük és bíztatásuk nélkül jelen disszertáció nem készülhetett volna el.

15. Függelék

DEBRECENI EGYETEM Egyetemi és Nemzeti Könyvtár

Nyilvántartási szám: Tárgy: DEENK/60/2015.PL Publikációs Lista

Jelölt: Csató Viktória Neptun kód: C8RAZ0 Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola MTMT azonosító: 10037271

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

 Csató, V., Pető, A., Fülöp, G.Á., Rutkai, I., Pásztorné T., E., Fagyas, M., Kalász, J., Édes, I., Tóth, A., Papp, Z.: Myeloperoxidase evokes substantial vasomotor responses in isolated skeletal muscle arterioles of the rat. *Acta Physiol. "accepted by publisher" (2015)* IF:4.251 (2013)

 Csató, V., Pető, A., Koller, Á., Édes, I., Tóth, A., Papp, Z.: Hydrogen peroxide elicits constriction of skeletal muscle arterioles by activating the arachidonic acid pathway. *PLoS One. 9* (8), e103858-, 2014. DOI: http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0103858 IF:3.534 (2013)

Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. ¤ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 39. ¤ Tel.: (52) 410-443 E-mail: <u>publikaciok@lib.unideb.hu</u> ¤ Honlap: <u>www.lib.unideb.hu</u>

DEBRECENI EGYETEM Egyetemi és Nemzeti Könyvtár

További Közlemények

 Kalász, J., Pásztorné Tóth, E., Fagyas, M., Balogh, Á., Tóth, A., Csató, V., Édes, I., Papp, Z., Borbély, A.: Myeloperoxidase impairs the contractile function in isolated human cardiomyocytes. *Free Radic. Biol. Med. "accepted by publisher" (2015)* IF:5.71 (2013)

- 4. Fagyas, M., Úri, K., Siket, M.I., Fülöp, G.Á., Csató, V., Daragó, A., Boczán, J., Bányai, E., Szentkirályi, I.E., Maros, T.M., Szerafin, T., Édes, I., Papp, Z., Tóth, A.: New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) II: Albumin suppresses angiotensin converting enzyme (ACE) activity in human. *PLoS One.* 9 (4), 28 p., 2014. DOI: http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0087844 IF:3.534 (2013)
- Tóth, A., Czikora, Á., Pásztor, T.E., Dienes, B., Bai, P., Csernoch, L., Rutkai, I., Csató, V., Mányiné, I.S., Pórszász, R., Édes, I., Papp, Z., Boczán, J.: Vanilloid receptor-1 (TRPV1) expression and function in the vasculature of the rat. *J. Histochem. Cytochem.* 62 (2), 2014. DOI: http://dx.doi.org/10.1369/0022155413513589 IF:2.403 (2013)

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 19,432 A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 7,785

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2015.03.16.

Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. ¤ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 39. ¤ Tel.: (52) 410-443 E-mail: <u>publikaciok@lib.unideb.hu</u> ¤ Honlap: <u>www.lib.unideb.hu</u>