

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

Gyulladásos szöveti mediátorok vazomotorikus hatásai

Csató Viktória

Témavezető: Prof. Dr. Papp Zoltán



DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2015

Gyulladásos szöveti mediátorok vazomotorikus hatásai

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: **Csató Viktória** okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán doktori iskolája
(Kardiovaszkuláris megbetegedések programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus
tagok: Dr. Kékesi Violetta, kandidátus
Dr. Szentmiklósi József, kandidátus

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK
Gyermekgyógyászati Intézet
Könyvtár
2015. május 11. 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Szentandrassy Norbert, PhD
Dr. Ivanics Tamás, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus
tagok: Dr. Ivanics Tamás, PhD
Dr. Szentandrassy Norbert, PhD
Dr. Kékesi Violetta, kandidátus
Dr. Szentmiklósi József, kandidátus

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK
Gyermekgyógyászati Intézet tanterme
2015. május 11. 13:00 óra

1. 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 gyulladós folyamat.

A gyulladás a szervezet védekező mechanizmusa, amely különféle károsító hatásokkal szemben segít megőrizni a test integritását, épségét. A gyulladós reakció szemmel látható jellemzőit már Celsus is leírta: duzzanat (tumor), vörös szín (rubor), fájdalom (dolor), melegség (calor). Tudjuk, hogy a jelenségek háttérében részben helyi értágulat áll, de a gyulladás során az érátérőt 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. Az említett folyamatok háttérében álló mechanizmusok megértésének tehát nagy a klinikai jelentősége, ezért fontossá vált az olyan lokálisan ható gyulladós mediátorok vazoaktív hatásainak feltérképezése is, mint amilyen a mieloperoxidáz (MPO) enzim. A MPO vaszkuláris hatásainak elemzését bonyolítja, hogy a szubsztrátjaként szereplő hidrogén-peroxid (H_2O_2) önmagában

is rendelkezik érhatásokkal. Ezért a MPO kiváltotta hatásokat a H_2O_2 -dal együtt célszerű értékelni.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A hidrogén-peroxid, mint reaktív vegyület

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. A szuperoxid anion (O_2^-) legjelentősebb forrása a NADPH-oxidáz enzim. A O_2^- alacsony pH-jú közegben spontán módon, magasabb pH mellett nagyrészt a szuperoxid dizmutáz (SOD) enzim által H_2O_2 -dá és molekuláris oxigénné alakul. A vaszkuláris szövetekben az endotélsejtek, a simaizomsejtek és a fibroblasztok is képesek H_2O_2 -ot termelni, de mennyisége gyulladási körülmények között a fehérvérsejt aktiváció következtében is jelentősen nő. Az erekben jelenlévő H_2O_2 valós koncentrációjának becslése nehéz feladat, egyes szerzők szerint patológiás körülmények között akár közel mmol/L (0,3 mM) nagyságrendben is keletkezhet

2.2 A hidrogén-peroxid, mint vazóaktív anyag

A H_2O_2 a szervezetben élettani körülmények között is megtalálható és önálló vaszkuláris hatásokkal rendelkezik, melyet már számos értípusban tanulmányoztak. Legtöbbször 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. Ezenkívül fontos szerepe van az áramlás indukálta vazodilatáció kialakításában szintén humán koronária arteriolákban valamint feltételezhetően egy tartalék dilatációs mechanizmust képvisel, ha a nitrogén-monoxid (NO) szintje csökken. Ezzel ellentétben a H_2O_2 vazokonstriktív hatását tapasztalták patkány vese artérián, aortán, nyúl pulmonáris artérián, és kutya bazilaris artérián. Érdekes módon a H_2O_2 koncentrációfüggő bifázisos választ (kis koncentrációban konstriktió, nagyobb koncentrációkban dilatáció) vált ki patkány vázizom és mezenteriális arteriolákon.

2.3. Mieloperoxidáz: struktúra és funkció

A MPO hem tartalmú enzim, mely elsősorban a neutrofil granulociták azurofil granulumaiban található, emellett kimutatható monocitákban és eosinofil granulocitákban is. A MPO erősen glikozilált fehérje, szerkezetét tekintve tetramer, két könnyű- (10-15 kDa) és két nehézláncból (55-64 kDa) áll, melyeket diszulfid-hidak kapcsolnak össze. 1970-ben Klebanoff leírta, hogy a MPO fő funkciója a szervezetet károsító mikrobák eliminálása. 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.

2.4. A mieloperoxidáz által katalizált reakció

A MPO reagálni képes a H_2O_2 -dal illetve a közegben jelen lévő halogén ionokkal, leginkább klorid ionnal, mely reakció végterméke a hipoklórossav (HOCl). A MPO rendszer aktivitása függ az elérhető H_2O_2 illetve más szubsztrátok mennyiségétől, valamint egyes antioxidáns molekulák, például a metionin koncentrációjától. Bár a HOCl viszonylag stabil és erős mikrobaellenes hatással rendelkező molekula, kóros körülmények között felszaporodva nem csak a mikrobákat károsítja, hanem kémiai reakciók révén a szervezet ép struktúráit is képes megváltoztatni.

2.5. Mieloperoxidáz és a hidrogén-peroxid 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, cukorbetegség és érelmeszesedés folyamán. A gyulladás során keletkező MPO szintén kiemelt szereppel bír a kardiovaszkuláris kórképek kialakulásában. Egyértelmű összefüggést mutattak ki a szérum MPO szintje és az iszkémiás szívbetegség minden megjelenési formájának (például stabil- és instabil angina, miokardiális

infarktus) előfordulása között. Bizonyos tanulmányokban hangsúlyozzák a plazma MPO szint kardiovaszkuláris prognosztikai szerepét, illetve felvetik, hogy használható a kardiovaszkuláris rizikó becslésére is. Beszámoltak arról is, hogy MPO hiányos egyéneknél csökkent a kardiovaszkuláris rizikó.

Több kutatás is igazolta, hogy a MPO fontos szerepet játszik az érlemezés patogenezisében. Egyes kutatók kísérleti eredményeikből kiindulva a MPO-nak általános, alapvető és szisztémás vazoregulációs szerepet tulajdonítanak. A krónikus hatásokról napjainkra már sok adat összegyűlt, de az akut hatásokról még viszonylag keveset tudunk.

3. Célkitűzés

Tudományos kutatásaim során az alábbi célkitűzéseim voltak:

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

4. Anyagok és módszerek

4.1. Preparátumok előkészítése

Állatkísérleteink során az Állatkísérletes Etikai Bizottság (2010/63/EU) által jóváhagyott protokolloknak megfelelően jártunk el, kísérleteinkben csak szakmailag jártas személyek vettek részt. Kísérleteinkhez hím Wistar patkányokat használtunk, az állatok altatását 50 mg/kg pentobarbitál intraperitoneális alkalmazásával végeztük.

4.2. Izolált mikroértechnika

A vázizom arteriola elsőrendű ágának, illetve a szeptális artéria másodrendű ágának körülbelül 2 mm-es szakaszt sztereomikroszkóp segítségével, mikrosebészeti eszközökkel izoláltuk. Az izolált vázizom arteriolákat és koronária arteriolákat egy oxigenizált hideg Krebs oldatot tartalmazó szervkamrába helyeztük. Az ereket mindkét oldalon kanuláltuk, illetve rögzítettük. Az oldatot Ca^{2+} tartalmú Krebs-mérőoldatra (2,5 mM CaCl_2) cseréltük, majd a szervkád hőmérsékletét 37 °C-ra emeltük, valamint az intraluminális nyomást 80 Hgmm-re állítottuk. Az erek átmérőjének mérését videomikroszkópos rendszerhez rögzített digitális kamerával detektáltuk és számítógép segítségével mértük.

4.3. 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 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 Ca^{2+} -mentes Krebs oldatot Ca^{2+} tartalmú oldatra cseréltük.

4.4. A hidrogén-peroxid érátmérőre gyakorolt hatásainak vizsgálata

Az inkubációs időt követően az ép állapotú erekben miogén tónus alakult ki (érátmérő csökkenés vázizom arteriolák esetében: $202 \pm 0,3 \mu\text{m}$ -ről $156 \pm 0,3 \mu\text{m}$ -re, $n=118$; koronária arteriolák esetében: $180 \pm 11 \mu\text{m}$ -ről $115 \pm 6 \mu\text{m}$ -re, $n=33$).

Kísérleteink első részében a H₂O₂-ot növekvő koncentrációban (1 µM-10 mM) alkalmaztuk. A H₂O₂-kiváltotta érátmérő változásokat a különböző koncentrációk hozzáadását követő 60. másodpercben detektáltuk. A H₂O₂ vaszkuláris hatásainak kinetikai vizsgálatára különböző koncentrációjú (10, 30, 100, 300 µM és 3 mM) 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. A H₂O₂ vasoaktív hatásait vázizom arteriolákon teszteltük különböző inhibitorok jelenlétében: PKC inhibitor (chelerythrine), PLC inhibitor (U73122), PLA inhibitor (7,7-dimethyl-(5Z,8Z)-eicosadenic acid), Src kináz inhibitor (Src inhibitor-1), COX-1 és COX-2 inhibitor (indomethacin), COX-1-szelektív inhibitor (SC-560), COX-2-szelektív inhibitor (celecoxib), valamint szintén COX-2-szelektív inhibitor (NS-398). Méréseinket elvégeztük TXA₂ receptor inhibitor (SQ-29548) jelenlétében is vázizom arteriolákon és koronária arteriolákon.

4.5. A mieloperoxidáz érátmérőre gyakorolt hatásainak vizsgálata

A MPO aktivitását a luminol oxidációjával létrejövő kemilumineszcenciás szignál detektálásával határoztuk meg. 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. A MPO és a H₂O₂ hatásait vázizom arteriolákon MPO specifikus inhibitor (4-aminobenzhydrazide), TXA₂ receptor inhibitor (SQ-29548), COX inhibitor (indomethacin) jelenlétében is megvizsgáltuk. Továbbá a MPO hatásait tanulmányoztuk a HOCl scavenger L-metioninnal (L-met) történő inkubációt követően vázizom arteriolákon, valamint koronária arteriolákon is.

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

4.6. Izometrikus kontrakció vizsgálata baziláris artériákon

Baziláris artériákon végzett kísérleteink során az előzőekben leírtakhoz hasonlóan MPO (1,92 mU/ml, 300 másodperc) jelenlétében inkubáltuk az ereket, majd vizsgáltuk a növekvő koncentrációjú H₂O₂ (1 μM-10 mM) hatására bekövetkező kontraktilis erő változásokat. A MPO hatásait L-met jelenlétében is teszteltük.

4.7. Az intracelluláris Ca²⁺ koncentráció és az érátmérő változások párhuzamos mérése

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 tartalmazott. Méréseinket Incyt Im2 Imaging rendszerrel 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.

4.8. Mieloperoxidáz klorinációs aktivitásának vizsgálata L-metionin jelenlétében

A MPO klorinációs aktivitásának vizsgálatához egy a kereskedelemben kapható kitet 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 méréseket PBS-ben (foszfát puffer tartalmú sóoldat, pH= 7,4) végeztük az *in vitro* vaszkuláris kísérleteinktől független módon. A fluoreszcens intenzitás változásokat ($\lambda_{\text{ex}}= 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}= 520 \text{ nm}$) 30 másodpercenként rögzítettük 5 percen keresztül fluoreszcens plate reader felhasználásával. A fluoreszcens intenzitás értékeit az idő függvényében ábrázoltuk, majd lineáris regressziót alkalmaztunk. Az egyenes meredeksége alapján határoztuk meg a MPO aktivitását.

4.9. Immunhisztokémia

Immunhisztokémiai vizsgálatainkhoz patkányból a fentieknek megfelelő módon kimetszett gracilis izom kis darabját Tissue-tek O.C.T. oldatba merítettük, majd folyékony nitrogénben fagyasztottuk. Ezt követően a blokkot kriosztátban metsztük (vastagság: 10 μm), a metszeteket adherens tárgylemezre helyeztük és fixáltuk. A COX enzimeket COX-1 és COX-2 specifikus antitestekkel jelöltük. A

simaizomsejtek azonosítására simaizom aktint alkalmaztunk. Végül a metszeteket DAPI-t (4',6-diamidino-2-phenylindole) tartalmazó fedőanyaggal fedtük.

4.10. Statisztika

A konstriktív válaszokat a kiindulási érátmérőhöz (vazoaktív anyag hozzáadását megelőző érátmérő 80 Hgmm intraluminális nyomáson) viszonyítva fejeztük ki. A vazodilatációt a maximális (Ca^{2+} -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.

5. Eredmények

5.1. Hidrogén-peroxid kiváltotta vaszkuláris hatások

Vázizom arteriolákon a H_2O_2 növekvő koncentrációit alkalmazva koncentráció-függő bifázisos hatást tapasztaltunk: alacsony koncentrációban (10-100 μM) alkalmazva a H_2O_2 vazokonstriktiót váltott ki (maximális vazokonstriktió 100 μM -nál, $34 \pm 3\%$ konstriktió, $P < 0,001$ vs. kiindulási állapot), viszont nagyobb koncentrációban (3-10 mM) vazodilatációt eredményezett (maximális vazodilatáció 10 mM-nál, $80 \pm 11\%$ vazodilatáció, $P < 0,001$ vs. kiindulási állapot). Ezzel szemben koronária arteriolákon H_2O_2 hozzáadására csak vazodilatáció volt megfigyelhető (maximális vazodilatáció 10 mM-nál, $96 \pm 3\%$

vazodilatáció, $P=0,01$). A H_2O_2 -kiváltotta válaszok kinetikáját vázizom arteriolákon teszteltük. A H_2O_2 hozzáadására létrejövő vazokonstriktív válasz tranziens jellegű volt, viszont az alacsony koncentrációban ($10\ \mu\text{M}$ és $30\ \mu\text{M}$) megfigyelhető vazokonstriktiót nem követte szignifikáns mértékű vazodilatáció. $100\ \mu\text{M}$ illetve $300\ \mu\text{M}$ H_2O_2 hozzáadását követően időfüggő bifázisos érátmérő változás jött létre: a kezdeti vazokonstriktiót követően jelentős vazodilatáció alakult ki. Nagyobb koncentrációban ($3\ \text{mM}$) alkalmazva a H_2O_2 kezelés csak vazodilatációt okozott.

5.2. Hidrogén-peroxid kiváltotta vazokonstriktió endotélium-függő folyamat

Vázizom arteriolákon a H_2O_2 jelenlétében tapasztalható vazokonstriktió gátolható volt az endotélium eltávolítását követően ($0\pm 8\%$ vazokonstriktió $100\ \mu\text{M}$ H_2O_2 -nál, $P=0,03$ vs. kontroll). Ugyanakkor az endotélfosztás nem befolyásolta a H_2O_2 -kiváltotta vazodilatációt ($69\pm 10\%$ dilatáció $10\ \text{mM}$ H_2O_2 -nál).

5.3. A hidrogén-peroxid-kiváltotta endotéliális szignalizáció ciklooxygenáz aktivációt eredményez

A H_2O_2 hatására kialakuló vazokonstriktió gátolható volt az alábbi inhibitorok alkalmazásával ($100\ \mu\text{M}$ H_2O_2 -mellett): PLA antagonistá ($7\pm 2\%$ vazokonstriktió, $P<0,005$ vs. kontroll), PKC antagonistá ($9\pm 4\%$ vazokonstriktió, $P<0,005$ vs. kontroll), PLC inhibitor ($15\pm 18\%$ vazodilatáció, $P<0,05$ vs. kontroll) valamint Src kináz antagonistá ($8\pm 3\%$ vazokonstriktió, $P<0,005$ vs. kontroll).

5.4. Hidrogén-peroxid kiváltotta érátmérő változások szelektív és nem szelektív ciklooxygenáz gátlószeres jelenlétében

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

Kísérleteink egy másik részében megvizsgáltuk a különböző COX izoenzimek szerepét a H₂O₂-kiváltotta hatások kialakításában. A COX-1-et szelektíven gátló SC-560 gátolta a H₂O₂-kiváltotta vazokonstrikciót és vazodilatáció volt megfigyelhető (23±9% vazodilatáció 100 µM H₂O₂-nál, *P*<0,05 vs. kontroll). Ugyanakkor a COX-2-t szelektíven gátló celecoxib gátló hatása nem bizonyult szignifikánsnak a H₂O₂-kiváltotta vazokonstrikció tekintetében (13±4% vazokonstrikció 100 µM H₂O₂-nál, *P*>0,05 vs. kontroll). Eredményeinket megerősítettük egy másik COX-2 specifikus gátlószer alkalmazásával, mely szintén nem befolyásolta szignifikánsan a H₂O₂ hatására kialakuló vazokonstrikciót (11±1% vazokonstrikció 100 µM H₂O₂-nál, *P*>0,05 vs. kontroll).

5.5. Hidrogén-peroxid által aktivált vazokonstrikcióhoz vezető effektor mechanizmus

TXA₂ receptor inhibitor gátolta a H₂O₂-kiváltotta vazokonstrikciót és vazodilatáció volt megfigyelhető (36±11% vazodilatáció 100 µM H₂O₂-nál, *P*<0,005 vs. kontroll). Ugyanezen gátlószer alkalmazása nem volt hatással a H₂O₂-kiváltotta vazodilatációra koronária arteriolák esetében (96±2% vazodilatáció 10

mM H₂O₂-nál). A TXA₂ receptorok aktivációja vazokonstriktiót eredményezett mind a vázizom arteriolákon, (69±2%, n=5, *P*<0,002 vs. kiindulási állapot) mind a koronária arteriolákon (42±6%, *P*=0,002 vs. kiindulási állapot).

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

A H₂O₂ kezelés (1 μM-100 μM) hatására bekövetkező vazokonstriktió során nem volt jelentős változás az intracelluláris Ca²⁺ koncentrációt jelző F_{340/380} arány tekintetében. Ezzel szemben a noradrenalin (10 μM) hozzáadására létrejövő vazokonstriktiót az F_{340/380} arány szignifikáns növekedése kísérte (0,96±0,04-ről 1,36±0,07-re, *P*=0,001). 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% vazokonstriktió, *P*>0,05).

5.7. A mieloperoxidáz fokozza H₂O₂-kiváltotta vazokonstriktiót

A MPO (1,92 mU ml⁻¹) fokozta a H₂O₂ hatására bekövetkező vazokonstriktió mértékét különböző szövetekből származó vaszkuláris preparátumokon. Vázizom arteriolákon MPO hozzáadását követően jelentős mértékű vazokonstriktió jött létre (50±21% vazodilatáció 1 mM H₂O₂-nál vs. 47±11% vazokonstriktió MPO alkalmazását követően, *P*=0,004). Koronária

arteriolákon a H₂O₂ kezelés önmagában csak vazodilatációt eredményezett, viszont MPO jelenlétében szignifikáns vazokonstriktió alakult ki (13±4% vazodilatáció 100 µM H₂O₂-nál, vs. 6±3% vazokonstriktió MPO hozzáadását követően P=0,006). Kevésbé volt hangsúlyos a MPO-függő vazokonstriktió 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). 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.

5.8. A mieloperoxidáz vaszkuláris hatásai a hipoklórossav közvetítésével valósulnak meg a 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 L-met valamint a MPO-specifikus inhibitor 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 vazokonstriktió mértékét (maximális vazokonstriktió 300 µM H₂O₂+MPO: 47±7% vs. 5±18% vazokonstriktió, P=0,067). Ugyanakkor az L-Met nemcsak gátolta ezen vazokonstriktió kialakulását, hanem jelentős mértékű vazodilatációt okozott (73±11% vazodilatáció 300 µM H₂O₂, P<0,0001 vs. MPO+H₂O₂). Megfigyeltük

továbbá, hogy az L-Met kezelés nem volt hatással a H₂O₂-kiváltotta vazokonstriktóra MPO hiányában. 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.

5.9. Mieloperoxidáz kiváltotta vazodilatáció L-Metionin jelenlétében

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

5.10. A mieloperoxidáz kiváltotta vazokonstriktió mechanizmusa vázizom arteriolákon

Vázizom arteriolákon az endotélium eltávolítását követően a MPO-kiváltotta vazokonstriktió mértéke csökkent (47±7% vazokonstriktió 300 µM H₂O₂+MPO

endotélium jelenlétében, vs. $13\pm 15\%$ vazokonstriktió H_2O_2 +MPO endotélium nélkül, $P=0,07$).

A következő lépésben tanulmányoztuk a TXA2 receptorok szerepét a MPO-kiváltotta vazokonstriktív hatások kialakításában. A TXA2 receptor inhibitor gátolta a MPO-kiváltotta vazokonstriktiót és vazodilatáció alakult ki ($47\pm 7\%$ vazokonstriktió $300\ \mu M\ H_2O_2$ +MPO vs. $30\pm 17\%$ vazodilatáció $300\ \mu M\ H_2O_2$ +MPO+TXA2 receptor inhibitor, $P=0,002$).

A COX szerepének igazolására méréseinket elvégeztük nem specifikus COX gátlószer jelenlétében is. A TXA2 inhibitorhoz hasonlóképpen a COX gátlószer is felfüggesztette a MPO-kiváltotta vazokonstriktiót és vazodilatáció volt megfigyelhető ($47\pm 7\%$ vazokonstriktió $300\ \mu M\ H_2O_2$ vs. $69\pm 16\%$ vazodilatáció, $P=0,002$).

5.11. Vaszkuláris ciklooxygenáz 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.

5.12. A mieloperoxidáz kiváltotta vazokonstriktió Ca^{2+} érzékenyítés révén valósul meg

A MPO által kiváltott vazokonstriktiót ($29\pm 3\%$ vazokonstriktió $1\ mM\ H_2O_2$ -nál, $P=0,04$ vs. kontroll) nem kísérte a $F_{340/380}$ arány szignifikáns változása 1

μM -1 mM H_2O_2 koncentrációtartományban. Ezzel szemben a noradrenalin (1 nM-10 μM) által okozott hasonló mértékű vazokonstriktió ($44\pm 4\%$ vazokonstriktió 10 μM noradrenalin, $P=0,0005$ vs. kontroll) az $F_{340/380}$ arány szignifikáns növekedésével járt együtt ($0,85\pm 0,03$ -ról $1,15\pm 0,09$ -re, $P<0,05$). A MPO kezelés önmagában nem befolyásolta az érátmérőt, sem pedig az $F_{340/380}$ arány mértékét.

6. 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 molekula, a MPO vaszkuláris preparátumokra kifejtett hatásait, továbbá a MPO szubsztrátjaként működő H_2O_2 vazoaktív hatásainak mechanizmusát. A cél elérése érdekében vázizom és koronária mikroarteriolákon, valamint baziláris artériákon vizsgáltuk meg az endotélium és vaszkuláris simaizom által közvetített érválaszokat.

6.1. A hidrogén-peroxid által kiváltott vaszkuláris hatások vizsgálata vázizom arteriolákban

A H_2O_2 -t fiziológias körülmények között is fontos keringésszabályozó molekulaként tartjuk számon, éppen ezért a hatásmechanizmusának feltárása széleskörűen kutatott feladat. A H_2O_2 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, ezzel szemben a vazokonstriktiót okozó hatásával kapcsolatban még nincsen egyértelmű magyarázat.

A H_2O_2 endotéliumtól függő módon befolyásolja az érátmérőt patkány vese artériákban, kutya baziláris artériákban, sertés koronária arteriolákban, illetve nyúl aortában. Ugyanakkor az endotéliumtól függetlenül megvalósuló hatásairól is beszámoltak humán koronária arteriolákban, kutya koronária arteriolákban és patkány aortában. Jelen tanulmányban azt találtuk, hogy a H_2O_2 -kiváltotta vazokonstriktió teljes mértékben megszűnt az endotélium eltávolításának hatására, valamint a TXA2 receptorok gátlását okozó szer jelenlétében. Ezek alapján feltételezzük, hogy a H_2O_2 endotéliális TXA2 képződéséhez vezet, mely receptoraihoz kapcsolódva vazokonstriktiót vált ki. A TXA2 receptorok gátlása nem volt hatással a H_2O_2 -kiváltotta vazodilatációra koronária arteriolákon, viszont a receptor aktivációja vazokonstriktiót 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 H_2O_2 különböző jelátviteli útvonalak aktiválásán keresztül hat ezen erekben.

A COX szubsztrátjaként működő AA szintéziséért a PLA felelős különféle vaszkuláris preparátumokban, ezért tanulmányoztuk a PLA lehetséges szerepét a H_2O_2 által okozott vazokonstriktió kialakításában. PLA antagonistá jelenlétében a H_2O_2 -kiváltotta vazokonstriktió gátolható volt. A PLA aktivációja megvalósulhat az enzim PKC-általi foszforilációja következtében. Így a következő lépésben PKC antagonistá jelenlétében inkubáltuk az ereket, melyet követően a H_2O_2 -kiváltotta vazokonstriktió mértéke szignifikánsan csökkent. Mivel a PLC hidrolízise során keletkezett diacilglicerol a PKC aktiválásához vezet, PLC antagonistát alkalmaztunk, melynek hatására a H_2O_2 által okozott vazokonstriktió szignifikánsan csökkent. Fontos megjegyezni, hogy a PKC útvonal gátlása (PLC vagy PKC inhibitor használatával) közvetlenül hatással lehet a TXA₂ receptor stimuláció által létrejött vazokonstriktióra, a H_2O_2 endotéliális hatásaitól függetlenül. Ugyanakkor megfigyeltük, hogy a PLC gátlása nem volt hatással a TXA₂ receptor agonista U46619 által kiváltott vazokonstriktióra így feltételezzük, hogy a PLC egy upstream (endotéliális) modulátorként van jelen a H_2O_2 -kiváltotta vazokonstriktióhoz vezető szignalizációs útvonalban.

A H_2O_2 -hatásaiban a PLC aktivációja kapcsán már korábban megfigyelték az Src kináz szerepét egér embrionális fibroblasztokban. Ezért megvizsgáltuk, hogy igazolható-e a szerepe a H_2O_2 vaszkuláris hatásainak kiváltásában is. Src-kináz antagonistá hozzáadására a H_2O_2 -kiváltotta vazokonstriktió csökkent.

Továbbá a H₂O₂-kiváltotta vazokonstrikció teljes mértékben gátolható volt a nem specifikus COX gátlószer indomethacin alkalmazásával, mely eredményünk összhangban van korábbi megfigyelésekkel. Vizsgálataink következő részében tanulmányoztuk a különböző COX izoenzimek szerepét. Ennek során azt tapasztaltuk, hogy a H₂O₂-hatására létrejött vazokonstrikció gátolható volt COX-1 specifikus antagonistával, viszont szignifikánsan 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. A TXA₂ receptorok aktivációja G_q fehérjéken keresztül a PLC útvonal aktiválásához vezet, mely következményes Ca²⁺ felszabadulást és PKC aktivációt vált ki (a Ca²⁺-függő útvonal). A TXA₂ aktiváció G₁₂ fehérjékhez kapcsolatosan, Rho-kináz útvonal aktiválását okozza (a Ca²⁺-független útvonal), ennél fogva a kontraktilis fehérjék Ca²⁺ érzékenységét fokozza. Mindemellett, a G₁₂ fehérjék is fokozhatják a sejtekbe történő Ca²⁺ belépést egy másik Ca²⁺-függő mechanizmus aktiválásán keresztül, ahogyan ezt megfigyelték patkány kaudális arteriális simaizomsejtekben. Eredményeink szerint a H₂O₂-kiváltotta vazokonstrikció során nem volt tapasztalható az intracelluláris Ca²⁺ koncentráció jelentős mértékű megnövekedése, viszont a kontrollként alkalmazott noradrenalin kiváltotta érátmérő csökkenést szignifikáns intracelluláris Ca²⁺ koncentráció emelkedés kísérte. Ezzel együtt teszteltük a TXA₂ receptor agonista U46619 hatását is, mely a noradrenalinéhoz 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 H_2O_2 növeli a vaszkuláris simaizomsejtek Ca^{2+} érzékenységet és nem a Ca^{2+} koncentráció emelésén keresztül hat.

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

Gyulladásos folyamatok során a vaszkuláris szövetekben nő a H_2O_2 koncentrációja, ezáltal képes az érátmérő szabályozására az aktuális vérellátási igényeknek megfelelően. Ezzel együtt az aktivált fehérvérsejtek MPO-t termelnek, mely feltételezéseink szerint befolyásolni tudja a H_2O_2 érátmérő szabályozó szerepét.

Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a MPO fokozza a H_2O_2 által kiváltott vazokonstriktió 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 H_2O_2 -ot, ezért ugyanazon mértékű vazodilatáció kialakulásához elvileg több H_2O_2 alkalmazására lenne szükség. Ennek az elméletnek ellentmond azon megfigyelésünk, miszerint az alacsonyabb H_2O_2 koncentráció mellett létrejövő vazokonstriktió mértéke fokozódott MPO jelenlétében. Ezek alapján tehát a MPO nem egyszerűen eltolja a H_2O_2 által kiváltott érválaszok koncentrációfüggését, vagyis a fokozott vazokonstriktió 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. Kevesebb információ áll rendelkezésre azzal kapcsolatban, hogy a HOCl rendelkezik-e önálló vaszkuláris hatásokkal. Egyes kutatócsoportok megfigyelték, hogy a HOCl szuperoxid-anion-függő módon gátolja a NOS-t, mivel szuperoxid dizmutázzal ezen hatásait gátolni tudták. Továbbá a HOCl eddig ismeretlen útvonalon vazokonstriktiót okoz szarvasmarhából izolált pulmonáris artériákon.

Miután bemutattuk, hogy a vaszkuláris szöveteket érintő gyulladásos folyamatok során felszabaduló MPO hogyan befolyásolja a H_2O_2 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), gátolható volt a MPO jelenlétében létrejövő fokozott vazokonstriktív válasz, valamint szignifikáns vazodilatáció volt megfigyelhető. Az MPO specifikus inhibitor 4-aminobenzhydrazide képes az enzim klorinációs és peroxidáz aktivitását is gátolni. A mi kísérleti elrendezésünkben a MPO inhibitor gátolta a MPO által kiváltott fokozott vazokonstriktiót és a kontroll körülményekhez hasonló mértékű vazokonstriktiót 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 arteriolákban megfigyeltekhez képest, ennek megfelelően az L-Met jelenlétében tapasztalt változások is kevésbé voltak jelentősek. Ezek alapján elmondható, 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. A tanulmány korábbi részében azt találtuk, hogy a H_2O_2 -kiváltotta vazokonstriktio endotélium-függő folyamat. Az endotélium eltávolítása nem teljesen szüntette meg a MPO kiváltotta vazokonstriktiót, vagyis a MPO által okozott vazokonstriktio csak részben endotélium-függő folyamat. További kísérleteinkben mind a TXA2 receptor gátlószer, mind pedig a nonspecifikus COX inhibitor gátolta a MPO hatására kialakuló vazokonstriktiót. Mindezen megfigyeléseink alapján arra következtetünk, hogy a MPO TXA2

felszabadulásához vezet nem csak az endotéliális 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 vazokonstriktió során nem tapasztaltuk az intracelluláris Ca²⁺ koncentráció jelentős mértékű növekedését. Viszont a noradrenalin hatására bekövetkező szignifikáns vazokonstriktióval párhuzamosan, az intracelluláris Ca²⁺ koncentráció jelentős mértékű növekedése volt megfigyelhető. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a MPO növeli a vaszkuláris simaizomsejtek kontraktilis apparátusának Ca²⁺ érzékenységet, 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 vasoaktív molekulák jelenlététől is. Gyulladásos állapotban a megnövekedett mennyiségű H₂O₂ mellett MPO is felszabadul, mely fokozza a H₂O₂ hatására létrejövő vazokonstriktiót vázizom arteriolákon. Ezen gyulladással járó állapotokban az L-Met megakadályozza a MPO által kiváltott fokozott vazokonstriktiót és hozzájárul a gyulladásra jellemző vazodilatáció kialakításához.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Dr. Papp Zoltánnak, aki magasszintű és precíz szakmai tudásával támogatta a PhD munkámat és segített elsajátítani a kutatói szakma alapjait. Hálásan köszönöm Dr. Tóth Attilának, aki nemcsak gyakorlati és elméleti tanácsaival nyújtott segítséget, hanem példát mutatott a számomra oly szimpatikus kutatói hozzáállásával. Köszönöm Dr. Édes István professzor úrnak, aki a Kardiológiai Intézet vezetőjeként megteremtette az értekezésben bemutatott kísérletek kivitelezésének feltételeit. Nagy örömet és büszkeséget jelent számomra, hogy közös munkában vehettem részt Dr. Koller Ákos professzor úrral, akinek hálásan köszönöm bölcs szakmai tanácsait. Köszönettel tartozom Dr. Czikora Ágnesnek, aki nélkülözhetetlen segítséget nyújtott a kísérleti technika elsajátításában. Szeretném megköszönni TDK hallgatónak Dr. Pető Attilának, aki hozzájárult a kísérletek megvalósításához. Köszönettel tartozom Mányiné Siket Ivettának és Pásztorné Tóth Enikőnek, valamint a Klinikai Fiziológiai Tanszék munkatársainak, hogy megkönnyítették és támogatták a munkámat. Köszönettel tartozom Orosz Józsefnek, aki az állatkísérletekkel kapcsolatban nyújtott segítséget. Külön szeretném megköszönni azoknak a fantasztikus embereknek, akikkel az érlaborban dolgozhattam együtt, így Dr. Fülöp Gábornak is, aki megteremtette az oldott, vidám hangulatot, mely nagyban megkönnyítette a munkámat. Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni barátomnak, Kistamás Kornélnak, aki támogatott és lelket öntött belém a nem túl sikeres időkben,

illetve édesanyámnak és nagyszüleimnek, mert az ő szeretetük és biztatásuk nélkül jelen disszertáció nem készülhetett volna el.



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

Jelölt: Csató Viktória
Neptun kód: C8RAZO
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10037271

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **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)
2. **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)





További Közlemények

3. 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., Uri, 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)
5. 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 tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2015.03.16.

