

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**Humán podocyták
hem-stresszre adott válaszreakciói**

Dr. Bányai Emese

Témavezető: Dr. Jeney Viktória



DEBRECENI EGYETEM

Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2018

Humán podocyták hem-stresszre adott válaszreakciói

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

Írta: Dr. Bányai Emese

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán Doktori Iskola
(Trombózis, hemosztázis és vaszkuláris biológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Jeney Viktória, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök:	Prof. Dr. Soltész Pál, az MTA doktora
tagok:	Prof. Dr. Csontos Csilla, az MTA doktora
	Prof. Dr. Reusz György, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: 2018. október 8. 11⁰⁰

helye: Belgyógyászati Intézet C épület könyvtár

Az értekezés bírálói: Dr. Cervenák László, PhD
Dr. Szabó Tamás, PhD

A bírálóbizottság:

elnök:	Prof. Dr. Soltész Pál, az MTA doktora
tagok:	Dr. Cervenák László, PhD
	Dr. Szabó Tamás, PhD
	Prof. Dr. Reusz György, az MTA doktora
	Prof. Dr. Csontos Csilla, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja: 2018. október 8. 13⁰⁰

helye: Belgyógyászati Intézet A épület tanterem

1. Bevezető és irodalmi áttekintés

Az oxigén-szállító hemoglobin (Hb) molekula számára a vörösvértesteken belüli mikrokörnyezet védelmet jelent a szervezetben folyamatosan képződő reaktív oxigéngyökök (ROS) oxidatív hatásával szemben. Intravaszkuláris hemolízissel járó kórállapotokban a Hb az extracelluláris térbe jut ahol különféle oxidációs állapotú Hb-formák jönnek létre, melyekről könnyen ledisszociál a hem-csoport.

A hem egy prooxidáns és proinflammatorikus tulajdonságú molekula, mely intravaszkuláris hemolízis esetén érzékenyíti az endothelsejteket az oxidatív stresszel szemben. Masszív intravaszkuláris hemolízis esetén a plazmában akkumulálódó Hb és a hem egy része a vesén keresztül a vizeletbe szűrődik át, és feltételezzük, hogy ezek a molekulák nephrotoxikus hatásuk révén közvetlenül hozzájárulnak a hemolitikus betegségeket kísérő akut veseelégtelenség kialakulásához.

A podocyták hosszú életű, a vese szűrőfunkciójában jelentős szerepet betöltő sejtek, azonban hem stressz tűrő képességük kevésbé ismert. Munkánk során így azt a célt tűztük ki, hogy a podocyták Hb-formákra illetve hem stresszre adott válaszát vizsgáljuk, és összehasonlíttuk az endothelsejtekével.

A vese kiválasztó működése, a podocyták szerepe

A vese feladata a szervezetben képződő anyagcsere végtermékek eltávolítása a vérből. Az elsődleges szűrlet képződésének helye a glomerulus, mely része a vese funkcionális alegységének a nefronnak. Az elsődleges szűrlet képződése a glomeruláris kapillárisok és a Bowman-tok között kialakult szemipermeábilis membránon keresztül valósul meg. Ezt a szemipermeábilis membránt a fenesztrált endothelsejtek, a glomeruláris bazálmembán és a podocyták (vagy visceralis epithelsejtek) hármasszöglet alkotja. A differenciált podocyták csillag alakú sejttestéből elsődleges és másodlagos polipoid lábnyúlványok nőnek ki, melyek fésűfogszerűen egymáshoz illeszkedve beborítják a glomeruláris kapillárisok felszínét. A szomszédos podocyták egymással érintkező másodlagos lábnyúlványai között jön létre a résdiafragma, melyet speciális intercelluláris junciók alkotnak.

A résdiafragma egy szerkezetileg porózus terület, mely szelektíven képes visszatartani a nagy molekulatömegű plazmafehérjéket a képződő ultrafiltrátumból. A lábnyúlványok leválása egyértelmű jele a podocyta károsodásának és szorosan összefügg az albuminuria és a proteinuria megjelenésével.

Intravaszkuláris hemolízis

Számos hematológiai betegségnek lehet elsődleges vagy másodlagos kóroki tényezője az intravaszkuláris hemolízis (sarlósejtes anémia, thalasszémiák, PNH, G6PD-deficiencia, HUS, TTP). Egy-egy hemolízises epizód során a plazmába kiáramló Hb mennyisége meghaladja a plazma Hb- és hemkötő fehérjéinek kapacitását. Ilyenkor szabad Hb és szabad hem halmozódik fel nagy mennyiségben a plazmában, mely könnyen oxidálódik.

A Hb oxidációja és a hem disszociációja

Élettani körülmények között a vörösvértestben a Hb 1-2%-a metHb formában van jelen, mivel az oxigén és a hem-csoport reakcióba lépésekor az oxigén elektront vesz el a Fe^{2+} -iontól, így Fe^{3+} -ion és szuperoxid-anion jön létre. A Hb H_2O_2 -dal való reakciója, mely két-elektronos oxidáció ferrilHb keletkezik ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}^{2-}$). A ferrilvas instabilitása miatt kialakulását intramolekuláris elektrontranszfer kíséri, melynek eredményeként globin-gyökök, porfirin-gyökök és keresztkötött hemoglobin-multimerek keletkeznek. A hemvas oxidációja következtében a hem elveszíti O_2 -kötő képességét, és lazul a globin-Fe kötés is, ennek következtében a hem-csoport disszociálhat a globinról.

Szisztémás és celluláris védelem az intravaszkuláris hemolízis során felszabaduló hem tartalmú molekulákkal szemben

Az intracelluláris ROS mennyisége számottevően az antioxidáns rendszerek működésétől függ. A ROS okozta károsodások kivédése, valamint a redox-szenzitív útvonalak szabályozása céljából a vörösvértestek és a többi sejt is nagy mennyiségben tartalmaznak antioxidáns enzimeket. Az emberi szervezetben a legjelentősebb antioxidánsok a szuperoxid-dizmutáz (SOD), a kataláz, és a glutation peroxidáz (GPX). A vörösvérsejtek speciális antioxidáns enzime a

NADH-methemoglobin-reduktáz, mely a Hb autooxidációja során keletkező metHb-t redukálja Hb-ná.

A plazma Hb- és hemkötő fehérjéi

A haptoglobin (Hp) segíti a szabad hemoglobin eltávolítását a plazmából a makrofágok CD163-receptorán keresztül endocitózis révén. A makrofágokban a hem oxigenáz-1 (HO-1) enzim bontja a hem-csoportot. Amikor a hemolízis során felszabaduló Hb mennyisége meghaladja a plazmában lévő Hp kapacitását, a szabad Hb egy részét a vese távolítja el. A 32-kDa-os hemoglobin $\alpha\beta$ -dimer kis méretének köszönhetően könnyen eléri a vesét és az erek falát, átjut az érfalak endothelsejtrétegén a subendothelialis és a perivascularis régiókba. A hemopexin (Hx) intravaszkuláris hemolízisben a Hb-ból származó hem-csoport megkötésében tölt be fontos szerepet. A Hx-hem-komplexet az LDLR1/CD91-receptoron keresztül veszik fel a sejtek endocytosis révén, majd a hemet a HO-1-enzim lebontja, a képződő vas pedig a ferritinben tárolódik.

A hem-oxigenáz/ferritin rendszer

A hem molekula egy porfirin-vázas vegyület, melyben a négy pirrolgyűrű egy két vegyértékű vasionnal (Fe^{2+}) alkot komplexet. A hem-mediált sejtkárosodással szemben a HO/ferritin rendszer nyújt védelmet. A HO enzim katalizálja hem molekula lebomlását, melynek során vas, biliverdin és szénmonoxid keletkezik. A hem-oxigenáz-1 (HO-1) izoforma egy 32-kD-os hőssokkfehérje, mely transzkripciós szinten indukálható és citoprotektív tulajdonságokkal rendelkezik. A HO-1 enzimnek számos induktora van, melyek közül jelen dolgozat keretein belül kiemelendő a hem és Hb formák.

A ferritin intracelluláris vastároló molekula, mely egy fehérjeburokból (apoferritin) és vasmicellákból áll. A multimer H- és L-ferritin alegységekből épül fel, melyek közül a H-alegység rendelkezik ferroxidáz aktivitással. Az L-alegységnek a vas ferritin molekulába történő beépítésében és megtartásában van kiemelt szerepe. A ferritin egyik legfontosabb feladata, hogy korlátozza a szabadgyök képződéséhez rendelkezésre álló szabad vas-ionok mennyiségét.

Hemolízis és az akut vesekárosodás (AKI)

A hem-csoportot tartalmazó fehérjék többek között direkt citotoxikus hatásuk révén képesek akut veseelégtelenséget okozni. Az ismétlődően kialakuló akut vesekárosodás hajlamosít krónikus veseelégtelenség kialakulására.

A hem prooxidáns jellege, a hem mint Fenton reagens

Az emberi szervezet teljes vaskészletének mintegy 70%-a a Hb molekula hem proszterikus csoportjában van jelen. A hemben található vas az oxigén transzportjában, megkötésében és elengedésében játszik szerepet. A vas és az oxigén között lejátszódó Fenton-reakció következtében reaktív hidroxil-gyökök keletkeznek.

A hem proinflammatorikus jellege, a hem mint veszély asszociált molekuláris mintázat (DAMP)

A hem veszély-asszociált mintázatként (DAMP) is funkcionál. Az NLRP3 inflammaszóma aktiválásán keresztül hozzájárulhat az innate immunrendszer aktiválásához, következményesen a podocyta károsodásához és a glomerulosclerosis létrejöttéhez.

Az oxidált Hb-formák prooxidáns és proinflammatorikus hatásai

A vörösvértestekből felszabaduló Hb-t a ROS-ok metHb-ná oxidálják. A metHb a hemhez hasonlóan képes oxidatív károsodást okozni az endothelsejtekben, fokozza a HO-1 és a ferritin szintézisét. Az endothelsejtek érzékenyítése a hem indukálta HO-1/ferritin rendszer működésének felfokozásával segíthet kivédeni az oxidatív stressz okozta akut szervkárosodást. A vas Fe^{4+} (ferril) állapota nem stabil, ezért könnyen visszatér a stabilabb Fe^{3+} állapotba, miközben a globin-láncokat alkotó aminosavakkal reakcióba lép. Az így keletkező globingyökök egymással reagálva kovalens kötések alakítanak, melyek révén keresztkötött Hb multimerek képződnek, ezek összessége a ferrilHb. A ferrilHb endothelsejtekben proinflammatorikus hatással bír, károsítja az endothelsejtréteg integritását és fokozza a permeabilitását.

2. Célkitűzések

Tudományos kutatásaim során az alábbi célokat fogalmaztam meg:

- Steril hemolízis egérmódelben vizsgáljuk az extracelluláris Hb, az oxidált Hb-formák, illetve a szabad hem mennyiségét a plazmában.
- Steril hemolízis egérmódelben vizsgáljuk az extracelluláris Hb, az oxidált Hb-formák, illetve a szabad hem mennyiségét a vizeletben.
- *In vitro* körülmények között vizsgáljuk a különböző oxidáltsági állapotú Hb-formák, illetve a szabad hem ROS-termelésre kifejtett hatását és sejttoxicitást indukáló hatását humán podocytákon.

A podocytákkal végzett kísérletek eredményeinek összehasonlítása az endothelsejtekkel kapcsolatos ismereteinkkel.

- *In vitro* körülmények között vizsgáljuk az extracelluláris Hb, az oxidált Hb-formák, illetve a szabad hem hatását a podocyták HO-1 és ferritin expressziójára és analizáljuk ezen fehérjék szerepét a podocyták hem-stressz elleni védelmében.

A podocytákkal végzett kísérletek eredményeinek összehasonlítása az endothelsejtekkel kapcsolatos ismereteinkkel.

3. Anyagok és Módszerek

3.1. Humán podocytá sejt vonal tenyésztése

A human podocytá sejt vonalat Moin Saleem (University of Bristol) adományozta kutató csoportunknak. Az AB 8/13 jelzéssel ellátott normál humán podocytá típusú sejt vonalat „permisszív” körülmények között 33°C-on szaporítottuk RPMI 1640 médiumban, majd az 50-60%-os konfluenciát elért tenyészetet 37°C-os inkubátorba helyeztük át ún. „nem permisszív” körülmények közé 14 napig.

3.2. Humán umbilikális véna endothelsejtek (HUVEC) tenyésztése

Az endothelsejtekkel újszülöttek köldök vénájából szeparáltuk és Komplet Médiumban tenyésztettük.

3.3. Immunfluoreszcens festés

A podocytákat humán synaptopodin elleni antitesttel, illetve a citoskeletont felépítő F-aktin hálózatot FITC-cel konjugált falloidinnel tettük láthatóvá. A mintákat DAPI magfestőt tartalmazó EverBrite™ mounting mediummal fedtük.

3.4. Time-lapse imaging videomikroszkópia

A sejttenyészetet 37°C-os inkubátorba helyeztük és a 0. naptól a 14. napig videomikroszkóp segítségével követtük a sejtek differenciálódásának folyamatát.

3.5. Humán veséből származó szövetminta immunhisztokémiai festése

A vese cortexéből származó, formalinban fixált, paraffinba ágyazott szövetmintában a podocytákat Wilms tumor-1 elleni antitesttel, a bennük expresszálandó H-ferritint pedig a Paolo Arosiotól kapott monoklonális antitest segítségével festettük meg. A vizsgált antigéneket Vectastain Elite ABC előhívó kit segítségével vizualizáltuk.

3.6. Giemsa festés

A metanollal fixált podocytákat Giemsa oldattal festettük.

3.7. Sejt magok preparálása és a kromatin struktúra vizsgálata

A podocytákat permeabilizáltuk, majd colcemiddel metafázis-blokkot végeztünk. Jégecet és metanol 1:3 arányú elegyével izoláltuk, majd fixáltuk a sejtmagokat. A

sejtnag preparátumot tárgylemezre cseppentettük és DAPI-t tartalmazó sejtrögzítő közeget helyeztünk a fedőlemez alá (EverBrite mounting medium, Biotium Inc.).

3.8. Antioxidáns enzimek aktivitásának vizsgálata

A podocytaikat KH_2PO_4 pufferben szonikálással feltártuk és a felülúszókból meghatároztuk a kataláz, a SOD és a GPX enzimek aktivitását.

3.9. Western blot analízis

A podocytaikat és az endothelsejteket kezelést követően szolubilizáló oldatban lizáltuk. A H-ferritin vizsgálatához a mintákat 6%-os natív poliakrilamid gélen választottuk szét, a HO-1 vizsgálatához pedig 12%-os SDS-poliakrilamid gélen szeparáltuk a fehérjéket. A natív gél használatát az indokolta, hogy a H-ferritin elleni antitest a fehérjének egy olyan konformációs epitópját ismeri fel, mely a fehérje natív szerkezetének megőrzése mellett tud bekötődni. A nitrocellulóz membránra blotolt fehérjék kimutatásához humán FtH elleni elsődleges antitestet, illetve humán HO-1 elleni elsődleges antitestet használtunk. A kovalens módon keresztkötött Hb formák kimutatásához vizeletet szeparáltunk 12%-os SDS-poliakrilamid gélen, majd a Hb kimutatására tormaperoxidázzal (HRP) konjugált anti-Hb antitestet alkalmaztunk.

3.10. Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (qRT-PCR)

Az endothelsejteket és a differenciált podocytaikat RNA-STAT60 reagensben szolubilizáltuk, és RNS-t izoláltunk belőlük. Az RNS-t cDNS-sé írtunk át SuperScript™ II reverz transzkriptáz segítségével. A cDNS mintákkal összeállított PCR reakciót valós idejű qPCR készülékben futtattuk. A HO-1 gén amplifikációja során iTaq™ polimerázt és validált FAM fluorofórral konjugált TaqMan próbát, valamint a tervezett primereket alkalmaztunk. Háztartási génként a GAPDH-t használtuk. A relatív génexpressziós változásokat $\Delta\Delta C_t$ módszer segítségével számítottuk ki.

3.11. Humán L-ferritin mérés ECLIA technikával

Az endothelsejteket és a podocytaikat a Western blotnál alkalmazott szolubilizáló oldatban vettük fel. A ferritin meghatározását szendvics technikán alapuló elektrochemilumineszcens immunoassay módszerrel végeztük automatával.

3.12. A podocytaik viabilitásának vizsgálata

A podocytaikat hemmel, H_2O_2 -dal, vagy e két anyag kombinációjával kezeltük. A kombinált kezelésnél a H_2O_2 hozzáadását a sejtenyészethez 1 óráss hem-előkezelés előzte meg. Négy óra elteltével a sejtekhez MTT-reagenst adtunk, az élő sejtek által termelt formazán kristályokat DMSO-ban oldottuk, az oldat abszorbanciáját pedig spektrofotométer segítségével mértük 590 nm-en.

3.13. Tiobarbitursav reaktív anyagok meghatározása

A podocytaikat 6% SDS tartalmú KH_2PO_4 pufferben lizáltuk és a mintákhoz TBAR-reagenst (2-tiobarbitursav, HCl, triklórecetsav) adtunk. N-butanol hozzáadásával extrahálást végeztünk és a szerves anyagokat tartalmazó fázis optikai denzitását 532 nm-en megmértük.

3.14. ROS-termelés vizsgálata

Endothelsejtekhez és differenciált podocytaikhoz H_2DCFDA -t adtunk, majd hemmel (5 $\mu\text{mol/l}$) és H_2O_2 -dal (100 $\mu\text{mol/l}$) kezeltük a sejteket. Az intracelluláris észterázok hatására a H_2DCFDA -ból fluoreszcens DCF képződött. A minták fluoreszcens jelintenzitását 4 órán keresztül lemezolvasóval detektáltuk.

3.15. Egér kísérletek

A véletlenszerűen két csoportra osztott 12 darab C57BL/6 egér közül az egyik csoportnál PHZ intraperitoneális (i.p.) adásával hemolízist váltottuk ki, a kontroll egerek pedig PBS-t (i.p.) kaptak.

3.16. Hemoglobin-koncentráció meghatározása spektrofotometriás módszerrel egér plazmából és vizeletből

C57BL/6 egerekben PHZ-val indukált steril hemolízist követően gyűjtött vér, illetve vizeletmintákból a Hb, a metHb és a hemikrom koncentrációját az optikai denzitis értékek alapján számítottuk ki.

3.17. Hemoglobin preparálás

Heparinnal alvadásgátolt vérből vörösvértestekből hemoglobint preparáltunk. A vörösvértesteket fiziológiás sóoldattal hígítottuk és mostuk, Na-foszfát pufferrel lizáltuk, majd a lizátumhoz 1/20-ad térfogatarányban Tris bázist (1 mol/L) adtunk. A vvt-lizátumot DEAE Sepharose CL-6B gyantát tartalmazó oszlopra vittük fel. A hemoglobint az oszlopról Tris bázis pufferrel eluáltuk. A hemoglobin koncentrációját az alábbi egyenlet segítségével számítottuk ki: $[Hb] = 66 \times A_{574} - 80 \times A_{630}$; $[metHb] = 279 \times A_{630} - 3 \times A_{574}$. MetHb előállításához 1,5-szeres moláris mennyiségű $K_3[Fe(CN)_6]$ -tal, a ferrylHb előállításához pedig 10-szeres moláris mennyiségű H_2O_2 -dal reagáltattuk a hemoglobint, majd dializáltuk a mintákat.

3.18. Statisztikai analízis

A statisztikai elemzéseket a GraphPad Prism 5.0 szoftverrel páratlan és páros t-teszt, valamint Tukey post-hoc teszttel kiegészített ANOVA felhasználásával végeztük. Szignifikáns különbségnek a $p < 0,05$ értéket tekintettük.

4. Eredmények

4.1. Extracelluláris Hb, oxidált Hb-formák és szabad hem megjelenése egér plazmában és vizeletben steril hemolízist követően

Modellünkben C57BL/6 egerekben indukáltunk steril hemolízist fenilhidrazin (PHZ) intraperitoneális injekciójával. Az egerek plazmájában meghatároztuk a hem, a Hb, a metHb és a hemikróom teljes koncentrációját a 0. órától számított 4, 16 illetve 20 óra elteltével. A mért adatokból kiszámítottuk a plazma szabad hem koncentrációját, melyet nem hemoglobinhoz asszociált hemként definiáltunk. A PHZ-nal indukált hemolízis során jelentős mértékben megnőtt a plazmában az extracelluláris Hb, a metHb, és a hemikróom mennyisége, valamint a szabad hem koncentrációja is. A változás már 4 óra elteltével jól észlelhető volt, 16 óra után pedig minden mért paraméter tekintetében szignifikáns változást tapasztaltunk.

20 órával a hemolízis indukcióját követően a Hb, a metHb és a hemikróom koncentrációját a PBS-sel, illetve a PHZ-nal kezelt C57BL/6 egerek vizeletében is meghatároztuk. A PHZ-nal kezelt egerek vizeletének Hb tartalma nem tért el a kontroll egerektől, azonban az oxidált Hb-formák: a metHb és a hemikróom koncentrációja jóval magasabb volt ezeknek az állatoknak a vizeletében.

Következő kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy a kovalens módon keresztkötött ferrilHb-formák jelen vannak-e a vizeletben PHZ-nal indukált steril hemolízist követően. Vizeletet gyűjtöttünk a hemolízis indukciója után 4, 16 illetve 20 órával és megvizsgáltuk a vizelet minták Hb tartalmát redukáló körülmények között Western blot technikával. A PHZ-nal kezelt egerek vizeletében 16 illetve 20 órával a kezelés után Hb monomerek (16 kDa) és dimerek (32 kDa) jelenlétét igazoltuk, a kontroll egerek vizeletében viszont nem észleltük a Hb-formák jelenlétét.

Munkánk további részében a podocyta hemolízisre, illetve hem-stressz hatására bekövetkező változását vizsgáltuk *in vitro* körülmények között az általunk használt immortalizált humán podocyta sejtvonal osztódási és differenciálódási tulajdonságaival összefüggésben.

4.2. A podocyta sejtvonal osztódásával és terminális differenciálódásával kapcsolatos vizsgálatok

Amint a 33°C-on permisszív körülmények között osztódó podocyta sejtenyészet elérte az 50-60%-os konfluenciát, nem permisszív körülmények közé helyeztük át a sejtenyészetet, hogy megkezdődhessen a sejtek differenciálódása. 14 napon át videomikroszkóp segítségével követtük a sejtek morfológiájának, valamint a sejtszámnak a változását. A növekedési görbe elemzéséből azt láttuk, hogy az első 9 napban folyamatosan nőtt a sejtszám, a sejtek száma a 9-10. nap között érte el a maximális értéket, majd egy enyhe csökkenést követően közel állandóvá vált. A 10-14. nap között már csak elvétve láttunk sejtosztódást.

Miután a sejteket 37°C-ra helyeztük, a nem differenciált sejtek fokozatosan vették fel a differenciált podocytákra jellemző morfológiát. Nem permisszív körülmények között a kis méretű, epithelszerű sejtek megjelenésére a macskakő-rajzolat volt jellemző. Ezzel szemben a permisszív körülmények között differenciálódott podocyták sejtestje jelentősen megnőtt, szabálytalan alakúvá vált, valamint számos, különböző alakú és méretű rövid lekerekített, vagy hosszú orsószerű lábnyúlványok jelentek meg. Az orsószerű nyúlványok kialakulását megelőzően gyakran megfigyelhető volt a citoplazmatikus kitüremkedések részleges visszahúzódása. A differenciált sejtek között több esetben láttunk celluláris hypertrophiát, illetve a sejthalál kialakulását, míg más sejtek nyúlványokat kezdtek növesztetni. Számos két magvú, nem osztódó sejtet is felfedeztünk a tenyészetben. Noha a 9. nap után a sejtszám kis mértékben csökkent, a sejtek motilitása változatlanul élénk maradt. A sejtek migrációja mindaddig megfigyelhető volt, amíg a tenyésztő edény alját teljes egészében le nem fedték.

Mivel szerettük volna megtudni, hogy 14 nap alatt teljes mértékben lezajlott-e a podocyták differenciálódásának folyamata, megvizsgáltuk a nem differenciált és a differenciált sejtek synaptopodin expresszióját immunfestés segítségével. A nem differenciált podocytákban nem volt megfigyelhető

synaptopodin-festődés, míg a differenciált sejtek jól látható módon expresszálták a synaptopodint. A citoszkeleton átalakulását a differenciálódás folyamata során az aktinhoz kötődni képes falloidin segítségével tettük láthatóvá.

A differenciálódás folyamata alatt a sejtmag átmérője is jelentősen megnövekedett. A differenciált sejtmagok nagyméretűek, míg a nem differenciált sejtmagok kisméretűek. Szerettük volna megtudni, hogy a sejtmag méretének növekedése együtt jár-e a kromatin szerkezet változásával. Nem differenciált és a differenciált sejtmagokat lizáltunk, majd a kromatin szerkezetet megfestettük DAPI-val. A nem differenciált sejtek nukleoplazmájában elszórtan számos területen láthattunk heterokromatint, ahol a géntranszkripció többnyire inaktív. Mikroszkópban kromoszómákat is megfigyeltünk, melyek a kromatin szerkezetnek egy kondenzáltabb állapotát mutatják. Ezekben a régiókban magas fokú mitotikus aktivitás észlelhető. Ezzel szemben, a differenciált podocyták nukleoplazmájában a kromatin szerkezet sokkal homogénebb elrendeződést mutat. Kevesebb heterokromatin látható, mivel az aktívan átíródó gének lazább szerkezetbe rendeződtek.

4.3. Hem hatása az endothelsejtek és a podocyták oxidatív stressztűrő képességére és ROS termelésére

Az endothelsejtek számára a hem önmagában nem citotoxikus, azonban már alacsony koncentrációban is jelentősen fokozza a különféle ROS-ok sejthalált indukáló hatását. Vizsgáltuk a hem és a H_2O_2 által elindított oxidatív stresszválaszt podocyteken, melyet összevetettünk az endothelsejteknél tapasztalt válaszokkal. Az endothelsejtekben a hem és a H_2O_2 önmagában nem okozott sejthalált, azonban hem-előkezelést követően a H_2O_2 50 $\mu\text{mol/L}$ koncentrációban mintegy 40%-os, 100 $\mu\text{mol/L}$ koncentrációban pedig mintegy 50%-os sejtpusztulást eredményezett. Ezzel szemben a podocytákra nézve sem az önmagában alkalmazott hem vagy H_2O_2 , sem pedig a hem előkezelést követően adott H_2O_2 nem volt toxikus hatással. Azt tapasztaltuk, hogy a podocyták nagymértékben ellenállóak az oxidatív stresszel szemben.

Endothelsejteket és differenciált podocytaikat kezeltünk HBSS-pufferben hígított hemmel ($5\mu\text{mol/L}$), H_2O_2 -dal ($100\mu\text{mol/L}$), vagy hem-előkezelést követően alkalmazott H_2O_2 -dal. A ROS-termelést DCFDA-módszerrel vizsgáltuk. Az endothelsejteken H_2O_2 hatására kis mértékben, hem hatására viszont jelentős mértékben fokozódott a ROS termelődése. Tendenciájában mindenhol fokozódott a sejtek ROS-termelése, de szignifikánsan magasabb ROS-képződést csak az első órákban mértünk. Ezzel szemben podocytaikban a hem fokozta a ROS-termelést, de a H_2O_2 nem. A hem előkezelést követően adott H_2O_2 tendenciájában növekvő ROS-képződést eredményezett. A két sejtet összehasonlítva megállapítottuk, hogy a podocyta az általunk vizsgált összes körülmény hatására kevesebb ROS-t termelnek, mint az endothelsejtek.

A hem a podocyta HO-1 mRNS és fehérje expresszióját is fokozta az endothelsejtekhez hasonló módon. Azonban amíg endothelsejtekben dózisfüggő választ kaptunk mRNS és fehérjeszinten egyaránt, addig a podocytaiban $10\mu\text{M}$ hem már maximális HO-1 fehérje expressziót váltott ki, dózisfüggést nem tapasztaltunk.

Egerekben végzett *in vivo* kísérleteink során láttuk, hogy a hem a plazmában elsősorban különféle oxidáltági állapotú Hb-hoz kötött formában van jelen. Ezért megvizsgáltuk, hogy vajon ezek a Hb-formák képesek-e hem forrásként szolgálni az endothelsejtek és podocytaik számára.

A két sejt Hb-formákkal indukált HO-1 mRNS és fehérje indukációjában apró különbségeket tapasztaltunk. Például a Hb az endothelsejtekben nem, ezzel szemben a podocytaiban kismértékben emelte a HO-1 mRNS szintjét. Az oxidált Hb-formák, a metHb és a ferrilHb mindkét sejtben indukálták a HO-1 mRNS-t, és közülük a ferrilHb volt az erősebb induktor. A HO-1 fehérje expresszióját podocytaiban és endothelsejtekben a metHb és a ferrilHb fokozza.

A különböző oxidáltági fokú Hb-formáknak a hatását a ferritin kétféle alegységének expressziójára szintén megvizsgáltuk endothelsejtekben és podocytaiban. Az endothelsejtek kontroll körülmények között alacsony mértékben

expresszálják a ferritin H-alegységét (FtH), azonban a hem jelentős mértékben fokozta az FtH expressziót. Ezzel szemben a podocytaokban kontroll körülmények között is magas a FtH expressziója, mely hem kezelésre nem fokozódott. Endothelsejtekben az FtH expresszióját a metHb kismértékben, a ferrilHb erőteljesebben fokozza. A podocyta FtH expressziója kontroll körülmények között meghaladja az endothelsejtek FtH expresszióját, ferrilHb hatására pedig további emelkedést tapasztaltunk. Endothelsejtekben az FtL expresszióját a hem és a ferrilHb emelte meg szignifikánsan. Podocytaónál alapállapotban az FtH expressziójához hasonlóan a FtL expressziója is magasabb, mint az endothelsejtekénél. Podocytaokban az FtL alegység expresszióját nem csupán a ferrilHb, hanem a hem is indukálta.

Összehasonlítottuk a differenciált és a nem differenciált podocyta oxidatív rezisztenciáját. A nem differenciált sejtek érzékenyek bizonyultak a H_2O_2 -dal szemben. A 125-500 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban alkalmazott H_2O_2 hatására a nem differenciált podocyta körülbelül 50%-nál tapasztaltunk sejthalált. Ezzel szemben ugyanezen H_2O_2 dózisok mellett a differenciált podocytaónál nem észleltünk citotoxicitást. A nem differenciált podocytaóhoz önmagában hozzáadott hem dózis-függő módon okozott sejthalált. Ugyanazokban a dózisokban alkalmazva a differenciált podocytaónál semmilyen citotoxikus hatása nem volt a hemnek. Amikor nem differenciált sejtekhez adtunk hem előkezelést követően H_2O_2 -t, még tovább csökkent a sejtek életképessége (53,3% vs. 25,3%), míg a differenciált sejtek túléltek az éretlen sejtek számára halálos stimulust jelentő kombinált hem- és a H_2O_2 -kezelést.

A nem differenciált podocytaónál hem- és H_2O_2 -kezelés hatására egyaránt dózisfüggő módon megemelkedett a TBARS oxidatív metabolitok szintje. Ezzel szemben ugyanazon mértékű stimulus a differenciált sejtekenél nem okozott szignifikáns TBARS-szint emelkedést. Az antioxidáns enzimek közül mind a GPX, mind a kataláz, mind pedig a SOD enzim aktivitása jelentősen magasabb volt az érett podocytaóban, mint a nem differenciáltakban.

Kontroll körülmények között a differenciált podocyták FtH expressziója mintegy négyszerese volt a nem differenciált sejtekének, illetve magasabb, mint az endothelsejteké. A nem differenciált sejtek FtH expressziója hem hatására dózisfüggő módon emelkedett, ugyanakkor a differenciált podocytaiban csak a legmagasabb hem dózisinál tapasztaltuk az FtH expressziójának kismértékű fokozódását. Humán felnőtt veséből származó szövettani metszeteken WT-1-elleni antitesttel tettük láthatóvá a podocytaikat a glomeruluson belül, és ezzel párhuzamosan FtH-elleni antitesttel is megfestettük őket. Azt láttuk, hogy a cortexben elhelyezkedő glomerulusokban számos podocyta erős FtH festődést mutatott.

5. Megbeszélés

Munkánk során az intravaszkuláris hemolízis modellezéséhez C57BL/6 egerekben indukáltunk steril hemolízist PHZ intraperitoneális injekálásával. Ezeknél az egereknél már 4 óra elteltével jelentős mértékben megnőtt a plazmában az extracelluláris Hb, a metHb, a hemikróm mennyisége, valamint a szabad hem koncentrációja is. Intravaszkuláris hemolízissel járó betegségekben az akut vesekárosodás a hemolízist követően pár órán belül kialakul, a krónikus vesekárosodás viszont csak hónapok vagy évek múltán válik nyilvánvalóvá. Az intravaszkuláris hemolízissel járó epizódok tovább ronthatják a károsodott vesefunkciót, melyre kiemelt figyelmet kell fordítani a krónikus veseelégtelenség (CKD) globális epidémiája miatt. A CKD-ban megfigyelhető irreverzibilis podocyta-károsodás pontos mechanizmusa egyelőre nem ismert.

Munkánk további részében a podocyta hemolízisre, illetve hem-stressz hatására bekövetkező változását vizsgáltuk. A podocyta igen fejlett, speciális képességekkel rendelkező sejtek. Lábnúlványaik a résdiafragmát alkotva körülveszik a glomeruláris kapillárisokat. Az egymással fésűszerűen összefonódó lábnúlványok alakítják a résmembrán filtrációs pórusait, melyek a glomeruláris filtrációs barrier szelektív permeabilitását biztosítják. A podocyta károsodása fehérjevesztéshez, proteinuriához vezet, mely a legtöbb glomeruláris eredetű betegségben megfigyelhető. A podocyta differenciálódásának folyamatát time-lapse videomikroszkópia segítségével élő sejteken vizsgáltuk, a Moin Saleem és mtsi. által létrehozott immortalizált podocyta sejttenyészetben. A podocyta számos mitózison és egy teljes differenciálódási folyamaton átesik: kialakult a nagy sejttest és a hosszú lamellipodiumok. A sejttestben és a podocyta lábnúlványaiban az aktin filamentumok longitudinálisan nagy kötegekbe rendeződtek. A synaptopodin egy podocyta-specifikus fehérje, melynek fontos szerepe van a citoskeleton integritásának megőrzésében, lehetővé teszi a lábnúlványok dinamikus plaszticitásának fenntartását. A synaptopodin a differenciálódás folyamán jelenik meg a sejtekben. A sejteket a differenciálódás

lezajlását követően is fokozott motilitás jellemezte. Egy közlemény – melyben négyféle podocytá sejtvonal tulajdonságait vetették össze a szerzők –, szintén arról számolt be, hogy a humán podocyták migrációs aktivitása és motilitása igen magas. A sejtenyészetben élő podocyták progresszív módon kilépnek a sejtciklusból és ezzel párhuzamosan elveszítik azt a képességüket, hogy önmagukat megsokszorozzák, azaz pótolják a károsodott funkciójú vagy elpusztult sejteket. Liapis és mtsi. által korábban leírtakkal összhangban mi is azt láttuk, hogy a podocyták az érési folyamat során elveszítették mitotikus aktivitásukat és többé már nem voltak képesek osztódásra. Mindezek magyarázzák azt a megfigyelésünket, miszerint a nem differenciált sejtkultúra proliferációs rátája magasabb, mint a differenciált sejtenyészeté.

Kutatásainkat megelőzően kevés információ állt rendelkezésre a glomeruláris podocyták sejtmagjainak tulajdonságairól. A szakirodalomban leírtaknak megfelelően mi is azt találtuk, hogy a nem differenciált sejtek magszerkezete, illetve kromatin szerkezete különbözik a differenciált sejtektől. A nem differenciált sejtek magjában elszórtan és több helyen volt látható heterokromatin állomány. Azt láttuk, hogy a nem differenciált podocyták sejtmagjában számos heterokromatin régió található, emellett szabad szemmel jól látható kromoszómákat is tartalmaznak a sejtmagok, mely a sejt magas mitotikus aktivitására utal. Ezzel szemben, az érett, differenciált podocytáknál sokkal homogénebb kromatinszerkezetet találtunk: kevesebb volt a heterokromatikus régió, az aktívan átíródó gének lazábban szerveződtek. Ezek az észlelések is azt támasztják alá, hogy a differenciált podocytáknál magas a génexpressziós ráta, viszont nem láttunk szorosan szerveződött kromatinállományt és mikroszkópban szabad szemmel észlelhető kromoszómákat, ami arra utal, hogy ezek a sejtek kis valószínűséggel mennek végig a sejtcikluson.

A podocytákat oxidatív stresszel szembeni rezisztenciáját, illetve azokat a pontos mechanizmusokat, melyek a sejt túlélését segítik ezidáig nemsokán vizsgálták. Balla és mtsi. korábban ismertették az endothelsejtek hem-stresszre

adott válaszát, miszerint a hem önmagában nem citotoxikus az endothelsejtek számára, azonban már alacsony koncentrációban is jelentősen fokozza a reaktív oxigéngyökök citotoxikus hatását. A glomerulusban szoros kontaktusban élő és együttműködő endotheleknél és a podocytáknál vizsgáltuk összehasonlításban a hem és a H_2O_2 által elindított oxidatív stresszválaszt. A várakozásainknak megfelelően az endothelsejtekben a hem és a H_2O_2 önmagában nem okozott sejthalált, azonban hem-előkezelést követően a H_2O_2 100 $\mu\text{mol/L}$ koncentrációban 50%-os sejtpusztulást eredményezett. Ezzel szemben a podocytáknál sem az önmagában alkalmazott hem vagy H_2O_2 , sem pedig a hem-előkezelést követően adott H_2O_2 nem volt toxikus. Azt láttuk, hogy a podocyták nagymértékben ellenállóak az oxidatív stresszel szemben.

Az endothelsejteknél a hemmel végzett szenzitizálást követően kialakuló oxidatív sejthalál lezajlásában kiemelt szerepe van a fokozott ROS termelésnek. Kísérleteink során azt láttuk, hogy az endothelsejtekben H_2O_2 hatására kis mértékben, hem hatására viszont jelentős mértékben fokozódott a ROS termelődése. Amikor az endothelsejtek hem előkezelést követően és H_2O_2 -dal kezeltük, a hemhez hasonló, vagy még annál is nagyobb mértékű ROS-termelést észleltünk. Tendenciájában mindenhol fokozódott a sejtek ROS-termelése, de szignifikánsan magasabb ROS-képződést csak az első órákban mértünk. Ezzel szemben podocytákban csak a hem fokozta a ROS-termelést, a H_2O_2 -kezelés nem. A hem előkezelést követően adott H_2O_2 tendenciájában növekvő ROS-képződést eredményezett. A két sejtet összehasonlítva megállapítottuk, hogy a podocyták ROS-termelésének fokozódása minden vizsgált körülmény esetén elmarad az endothelsejtektől.

A hem sejten belüli degradációját a HO-enzim végzi, melynek során biliverdin, CO és vas-ion keletkezik. A szakirodalomban leírtakkal összhangban endothelsejtekben hem hatására dózisfüggő módon fokozódott a HO-1 mRNS és fehérje expressziója. A hem az endothelsejtekhez hasonlóan a podocyták HO-1 mRNS és fehérje expresszióját is fokozta. Azonban különbséget találtunk a kétféle

glomeruláris sejttípus között a HO-1 fehérje expressziójának dózisfüggésében, mivel endothelsejtekben dózisfüggő választ váltott ki a hem mRNS és fehérjeszinten egyaránt, a podocytáknál viszont már 10 μ M hem maximális HO-1 fehérje expressziót indukált és dózisfüggést nem tapasztaltunk.

A ferritin molekula a hem degradációja során a hemből kiszabaduló vasat szekvesztrálja, és biológiailag inaktív módon tárolja a citoszolban. Hemolízis során a vörösvértestekből szabaddá váló hemoglobin főként dimer formában van jelen a plazmában, mely kisebb méreténél fogva könnyen átjut a glomerulusokon és a reaktív környezetben oxidálódva nephrotoxikus hatást fejt ki. Kísérleteinkben az endothelsejtek alapállapotban csupán kis mértékben expresszálták a ferritin H-alegységét, a hem azonban jelentős mértékben képes volt fokozni az FtH expresszióját. Ezzel szemben a podocytákban mindenféle behatás nélkül, kontroll körülmények között is magas az FtH expressziója, mely hem-kezelés hatására nem fokozódott.

Ezt követően a Hb-formák FtH indukciót kiváltó hatását vizsgálva azt észleltük, hogy az endothelsejtekben az FtH expresszióját a methHb kismértékben, a ferrilHb erőteljesebben fokozza. A podocyták FtH expressziója kontroll körülmények között meghaladja az endothelsejtek FtH expressziójának mértékét, és ferrilHb hatására további emelkedést tapasztaltunk. Endothelsejtekben az FtL expresszióját a hem és a ferrilHb is szignifikánsan megemelte. Podocytáknál az FtL expressziója is magasabb volt kontroll körülmények között, mint az endothelsejteké. Az FtL alegység expresszióját a hem és a ferrilHb is indukálja podocytákban. A podocyák magas FtH koncentrációja és ebből kifolyólag magas oxidatív stressztűrő képessége hozzájárulhat a podocyták hosszú élettartamának.

A dolgozatban bemutatott endothelsejtes kísérleteket saját magam végeztem, melyek eredményei összhangban vannak az irodalomban már korábban közöltekkel. Az endothelsejtekkel végzett kísérletek többsége nem tekinthető újnak, csupán a podocytákkal kapott eredmények értékét és relevanciáját növelendő végeztünk összehasonlítást a két sejttípus között, referenciasejtként

használva az endotheleket. Ez alól kivételt képez az oxidált Hb formák által kiváltott HO-1 és ferritin indukció, mely új eredménynek minősül.

Kísérleteink eredménye alapján beszámoltunk arról, hogy a differenciált podocyták oxidatív rezisztenciája a H_2O_2 -indukálta oxidatív stresszel szemben jóval nagyobb, mint a még nem differenciált sejteké. A hem önmagában dózisfüggő módon és erősen szignifikáns mértékben csökkentette a nem differenciált podocyták életképességét, míg ugyanazon dózisban alkalmazva semmilyen citotoxikus hatást nem fejtett ki a differenciált sejteknél. Amennyiben a nem differenciált podocytákat hem-előkezelésben is részesítettük a H_2O_2 -kezelést megelőzően, életképességük még inkább lecsökkent. Ezzel szemben az érett differenciált sejtek ezt a halálos kombinációt is túléltek.

A H_2O_2 és a hem által okozott sejthalál a nem differenciált podocytáknál együtt járt a TBARS-szint növekedésével, míg ugyanezek a triggerek a differenciált podocytáknál nem eredményeztek szignifikáns TBARS-szint emelkedést. A differenciált sejteknél a fokozott oxidatív rezisztencia mellett az antioxidáns GPX, kataláz és SOD enzimek aktivitását is magasabbnak találtuk, mint a nem differenciált sejteknél.

A FtH képes szekvesztrálni a Fenton-rekációt katalizáló vas-ionokat. A FtH védelmet nyújt a szöveti károsodás ellen, az FtH kondicionális deléciója fokozza a nephrotoxicitást az akut vesekárosodás kísérletes egér modelljében. Eredményünk összhangban van az irodalmi adatokkal, miszerint az FtH kiemelt szerepet játszhat a podocyták káros hatásokkal szembeni védelmében. A differenciált podocyták ellenállóbbak az oxidatív stresszhatásokkal szemben és több FtH-t expresszálnak, mint a nem differenciált podocyták.

Szerettük volna megvizsgálni, hogy kísérleti eredményeink mennyiben relevánsak in vivo, ezért humán vese cortexből nyert szövettani mintából metszeteket készítettünk és immunhisztokémiai módszerrel tettük láthatóvá a FtH expresszióját. A szövettani minta bőségesen tartalmazott glomerulusokat. A látottak igazolták azt a feltevésünket, miszerint a glomeruláris kapillárisokat

körülvevő podocyták cytoplazmájában jelentős mennyiségű FtH tárolódik, mely hozzájárulhat magas oxidatív rezisztenciájukhoz és segítheti túlélésüket oxidatív stressz esetén.

6. Összefoglalás

A podocyták a vese glomerulusaiban található egyedi funkcióval bíró sejtek, melyeknek a fésűfogszerűen egymásba illeszkedő lábnyúlványai alkotják a glomeruláris kapilláris felszínén a résdiafragmát.

A podocyták az embrionális fejlődés során elveszítik osztódási képességüket. Élettartamuk meglehetősen hosszú, a károsodott sejtek pótlására érdemben nincs lehetőség. A lábnyúlványok leválása a kapillárisok felszínéről egyértelmű jele a podocyták károsodásának.

A hemolízissel járó betegségekben (PNH, HUS, malária, hemoglobinopathiák stb.) a Hb-ból szabaddá váló hem proinflammatorikus és prooxidatív tulajdonságai révén érkárosodást és vesekárosodást képes előidézni. A hem mellett az oxidált Hb-formákról is leírták, hogy akután képesek szenzitizálni az endothelsejteket az oxidatív ágensekkel szemben és citotoxicitást kiváltani. Ha viszont krónikusan, hosszabb időn keresztül többször is találkoznak az endothelsejtek a hemmel és az oxidált Hb formákkal, azok felindukálják a sejtekben a HO-1/ferritin rendszert, mely védi a sejteket az oxidatív károsodással szemben.

Munkánk célja volt feltárni, hogy a vese glomerulusainak podocytaí ugyanúgy reagálnak-e az őket érő oxidatív hatásokra, mint azt korábban az ér endothelsejtjeinél már leírák és a HO-1/ferritin rendszernek van-e szerepe a podocyták túlélésében. Bizonyítékokat szolgáltatunk arra, hogy a podocyták az embrionális differenciálódás folyamata során alapvető morfológiai és funkcionális változásokon mennek keresztül, melyek az oxidatív stresszel szemben segítik a sejtek védelmi mechanizmusainak megerősödését, ellenállóvá és hosszú életűvé teszik a podocytaikat. Az antioxidáns enzimek és a FtH egyaránt részét képezik a humán podocyták oxidatív stresszel szembeni védelmi mechanizmusainak és rávilágítanak ennek a fontos, de podocytaikban ezideig nem vizsgált védelmi rendszernek a szerepére.

7. Saját közlemények jegyzéke



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/88/2018.PL
Tárgy: PHD Publikációs Lista

Jelölt: Bányai Emese
Neptun kód: ITU3VF
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Erdei, J., Tóth, A., Balogh, E., Nyakundi, B. B., **Bányai, E.**, Ryffel, B., Paragh, G., Cordero, M. D., Jeney, V.: Induction Of NLRP3 Inflammasome Activation By Heme In Human Endothelial Cells.
Oxidative Med. Cell. Longev. 2018, 1-14, 2018.
IF: 4.593 (2016)
2. **Bányai, E.**, Balogh, E., Fagyas, M., Arosio, P., Hendrik, Z., Király, G., Szemán-Nagy, G., Tanczos, B., Pócsi, I., Balla, G., Balla, J., Bánfalvi, G., Jeney, V.: Novel functional changes during podocyte differentiation: increase of oxidative resistance and H-ferritin expression.
Oxid. Med. Cell. Longev. 2014, 1-10, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/976394>
IF: 3.516

További közlemények

3. Balogh, E., Tóth, A., Tolnai, E., Bodó, T., **Bányai, E.**, Szabó, D. J., Petrovski, G., Jeney, V.: Osteogenic differentiation of human lens epithelial cells might contribute to lens calcification.
Biochim. Biophys. Acta-Mol. Basis Dis. 1862, 1724-1731, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbdis.2016.06.012>
IF: 5.476
4. Becs, G., Jarjou, A., Agarwal, A., Sikura, K. É., Becs, Á., Nyitrai, M., Balogh, E., **Bányai, E.**, Eaton, J. W., Arosio, P., Poli, M., Jeney, V., Balla, J., Balla, G.: Pharmacological induction of ferritin prevents osteoblastic transformation of smooth muscle cells.
J. Cell. Mol. Med. 20 (2), 217-230, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jcmm.12682>
IF: 4.499





5. Fagyas, M., Uri, K., Mátyiné Siket, I., Daragó, A., Boczán, J., **Bányai, E.**, Édes, I., Papp, Z., Tóth, A.: New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) I: endogenous angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition.
PLoS One. 9 (4), 1-29, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0087843>
IF: 3.234
6. Fagyas, M., Uri, K., Mátyiné Siket, I., Fülöp, G. Á., Csató, V., Daragó, A., Boczán, J., **Bányai, E.**, Szentkirályi, I., 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), 1-28, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0087844>
IF: 3.234
7. Fagyas, M., Uri, K., Mátyiné Siket, I., Daragó, A., Boczán, J., **Bányai, E.**, Édes, I., Papp, Z., Tóth, A.: New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) III: endogenous inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) provides protection against cardiovascular diseases.
PLoS One. 9 (4), 1-29, 2014.
IF: 3.234
8. Potor, L., **Bányai, E.**, Becs, G., Soares, M. P., Balla, G., Balla, J., Jeney, V.: Atherogenesis May Involve the Prooxidant and Proinflammatory Effects of Ferryl Hemoglobin.
Oxid. Med. Cell. Longev. 2013, [1-13], 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/676425>
IF: 3.363

A közlő folyóiratok összesített impact faktora: 31,149

A közlő folyóiratok összesített impact faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):

8,109

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, 2018.04.11.

8. Köszönetnyilvánítás:

Elsőként témavezetőmnnek szeretnék köszönetet mondani a munka magas színvonalú szakmai irányításáért, a folyamatos támogatásáért, végtelen türelméért és a nehezebb időszakokban sem sajnált biztató szavaiért. Mindig töretlen lelkesedésével, kitaró és pozitív hozzáállásával a tudomány szeretetének átadására törekedett. Megtanított a tudomány iránti alázatra. Magas szintű szakmai tudása, emberséges hozzáállása és barátsága örökérvényű útravalóul szolgál azon az úton melynek kapuját megnyitotta előttem.

Köszönöm a támogatását Dr. Balla József professzor úrnak, aki lehetővé tette, hogy az egyetemi évek alatt megkezdett kutatási munkámat az általa vezetett laboratóriumban folytathassam, pénzügyi támogatást nyújtott a kísérletek megvalósításához, valamint kiterjedt szakmai kapcsolatait megmozgatva segítette az együttműködést más munkacsoportokkal és nagyszerű szakmai meglátásával segítette a projekt megvalósulását.

Köszönetet mondok Balogh Enikőnek a podocytról készült time-lapse kísérletek kivitelezésében nyújtott hathatós közreműködéséért és barátságáért. Köszönöm a támogatást a labor összes dolgozójának, köztük Barna Erikának, akik hozzájárultak ahhoz, hogy ez a munka megszülethessen.

Külön köszönöm a kísérletek kivitelezéséhez nyújtott segítségét és barátságát Dr. Becs Gergely kollégámnak, aki kiváló meglátásaival és mindig segítőkész természetével jelentősen hozzájárult, hogy e munka megszülethessen.

Legvégül, de a legnagyobb szeretettel mondok köszönetet férjemnek, Dr. Fagyas Miklósnak, aki nem csupán egy szeretetteljes nyugodt háttérrel biztosított számomra az elmélyült munkához, hanem mindvégig támogatott szakmailag és emberileg. Hitt a munka sikerében és bizakodásával erőt adott.

A kutatómunkánkat a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap (NKFI, K116024), valamint az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával megvalósult GINOP-2.3.2-15-2016-00005 számú projektek támogatták.

*Ezt a munkát nagy szeretettel ajánlom férjemnek, Miklósnak,
és gyermekeimnek, Lillának és Leventének!*