

A flavonoid quercetin rövid és hosszú távú hatása a koronária arteriolákra

Doktori értekezés

Dr. Monori-Kiss Anna

Semmelweis Egyetem

Elméleti és Transzlációs Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Nádasy György, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Monos Emil, az MTA doktora,
professor emeritus

Hivatalos bírálók:

Dr. Blázovics Anna, az MTA doktora, egyetemi tanár
Dr. Farkas Orsolya, Ph.D., tudományos munkatárs

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Sótonyi Péter, az MTA rendes tagja, rektor emeritus

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Pavlík Gábor, az MTA doktora, professor emeritus
Dr. Szőke Éva, az MTA doktora, nyugalmazott egyetemi tanár

Budapest
2018

1. Bevezetés

A kardiovaszkuláris morbiditás és mortalitás mind súlyosabb arányokat ölt. Napjainkban ez a vezető halálok Magyarországon. A tudományos közösség egyik feladata a kardiovaszkuláris betegségek enyhítését célzó új eljárások, terápiák felkutatása. Nobel-díjjal kitüntetett magyar kutatónk, Szent-Györgyi Albert már 1936-ban foglalkozott a flavonoidok kapilláris permeabilitásra kifejtett hatásával. Az eltelt 80 évben egyre részletesebb kép alakult ki a polifenolok, köztük a flavonoidok sokszínű világáról, melynek meghatározó eleme a quercetin. A dinamikusan gyarapodó szakirodalom e molekula kardioprotektív hatásának különböző mechanizmusait ugyan tárgyalja, de - feltehetően metodikai nehézségek miatt - igen kevés adat került publikálásra a quercetin koronária artériákra kifejtett közvetlen hatásáról. A terápiás lehetőségek kiaknázásához nélkülözhetetlen a pontos vazodilátor hatás megismerése a miokardium vérellátásában kulcsfontosságú koronária arteriolákon. Disszertációm tárgya ezért a quercetin koronária arteriolákra kifejtett hatásának vizsgálata rövid és hosszú távú alkalmazás esetén.

A quercetin és glikozilált formái, például a rutin, a növényvilágban széleskörűen elterjedt molekulák. A kiegyensúlyozott vegyes étrenddel 28-42 mg-ot viszünk a szervezetünkbe naponta. Ez 0,1-1 $\mu\text{mol/liter}$ plazmakoncentrációt eredményez.

A quercetin akut vaszkuláris hatásáról viszonylag kevés humán adat áll rendelkezésre, de ezekből az a tendencia rajzolódik ki, hogy a mikrokeringés fokozódása nagyobb dózisok esetén

(több, mint 1000 mg polifenol) a NO produkció fokozása révén, de kisebb dózisoknál (50-400 mg quercetin) nem NO függő módon valósult meg. Állatkísérletes adatok azonban a hatás részletesebb és érzakaszonként differenciált módját mutatják. Endotél függő mechanizmusként a NO és prosztaciklin mediált, endotél független útvonalon pedig különféle ioncsatornák modulálása jelentős.

Hosszú távú quercetin kezelés hatására az endotél funkció javulásáról számoltak be, de ennek mechanizmusa nem tisztázott. Állatkísérletes eredmények szerint a quercetin antioxidáns hatása, intracelluláris enzimekkel történő interakciója, a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor expressziójának és jelátvitelének gátlása, valamint a mátrix metalloproteázok gátlása az erek szerkezetének és farmakológiai válaszkészségének átépüléséhez vezethet.

2. Célkitűzés

Jelen ismereteink szerint a quercetin a nagy artériáktól a kis artériák felé egyre jelentősebb vazodilatációt hoz létre. Milyen mértékű vazodilatációt vált ki koronária arteriolákon az élettanilag releváns quercetin koncentráció? Folytatódik-e a hatás fokozódása az egyre kisebb átmérőjű erek mentén?

Meglevő ismereteink alapján a koronária ereken létrejövő vazodilatáció jelentős részben endotél függő folyamat. Nincs azonban adatunk a NO és a prosztaciklin dependens útvonalak arányáról koronária arteriolákban. Mivel a NO vazodilatátor funkciója leginkább a kis artériákban érvényesül, feltételezhető, hogy a koronária arteriolákban más mediátorok, például a vazodilatátor prosztanoidok játsszák a főszerepet.

Megfigyelhető-e hosszú távú quercetin kezelés során a koronária arteriolákban a bazális NO produkció megváltozása? Hogyan befolyásolja ez, és az antioxidáns hatások a korosodás indukálta biomechanikai és farmakológiai remodelinget?

Mindezek alapján a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Kimutatható-e, és ha igen, milyen mértékű a vazorelaxáció patkány intramurális koronária arteriolákban különböző fiziológiás quercetin dózisok akut alkalmazása esetén?
2. Mennyiben NO felszabadulás, és mennyiben prostanoid felszabadulás által mediált az intramurális koronária arteriolákban kialakuló vazodilatáció?
3. Hogyan befolyásolja az intramurális koronária arteriolák korosodással együtt járó strukturális és funkcionális átépülését a tartós, hosszú távú quercetin szupplementáció?

3. Módszerek

3.1. Kísérleti állatok

A kísérleti állatokat a Semmelweis Egyetem Elméleti Orvostudományi Tömbjének állatházában tartottuk, ahol állandó hőmérséklet és páratartalom mellett ad libitum táp (S8106-S011 SM, Ssniff Spezialdiäten, Soest, Németország) és ivóvíz állt rendelkezésre. A kísérlet napján intraperitoneális pentobarbitál (45 mg/ttkg) anesztéziában a szívet kimetszettük és 4°C-os normál Krebs-Ringer oldatba (nKR) helyeztük (összetétele mmol/literben: NaCl 119, KCl 4,7, NaH₂PO₄ 1,2, MgSO₄ 1,17, NaHCO₃ 24, CaCl₂ 2,5, glukóz 5,5, EDTA 0,034). Minden kísérlet során betartottuk az állatkísérletekre

vonatkozó hazai, és az Európai Unió irányelveivel konform előírásokat. Az etikai engedély kelte 2009.09.28, regisztrációs száma 22.0/2960/003/2009, az engedélyező hatóság a Semmelweis Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága.

- *A quercetin akut hatásának vizsgálata*

A kísérletekhez 350-450 g tömegű hím Wistar patkányokat használtunk. Az állatok 3 napig akklimatizálódtak a kísérletek előtt.

- *A quercetin hosszú távú hatásának vizsgálata*

180-200 g testtömegű hím Wistar patkányokat két csoportba osztottunk. A kontroll csoport a fenti tápot és csapvizet kapott 8 hétig, míg a quercetinnel kezelt csoport azonos tápot és az ivóvízbe szuszpendált quercetint kapott 30 mg/ttkg/nap dózisban. Az állatok viselkedését, testtömegét és bőrének turgorát hetente kétszer ellenőriztük.

3.2. Preparátumok előkészítése

A vizsgálatokat nyomás angiométer technikával végeztük. Legalább 3 mm hosszú intramurális koronária arteriolát preparáltunk, melynek oldalágait lekötöttük, és két végén kanülálva szervfürdőbe (Experimetria LTD, Budapest) helyeztük. A szervfürdőben 75% N₂, 20% O₂, és 5% CO₂ gázeleggyel optimális pH-t (~7,4) és parciális oxigén nyomást (~95 Hgmm) tartottunk fent. A kanülökhöz csatlakoztatott szervopumpák az inkubációs periódusok alatt az érszakasz fiziológiás nyomásának megfelelő 50 Hgmm-t tartottak fent, míg a nyomás-görbék felvételekor az intraluminális nyomást 10-100 Hgmm között változtattuk, 3 perces inkubációval minden nyomásértéken. Minden vizsgálatunkat áramlástól mentes körülmények közt végeztük. Az inkubációs periódusok végén fotót készítettünk a preparátumról, melyet mikrométer

etalonnal (Wild, Heelbrugg, Svájc) kalibráltunk, és az átmérőt off-line meghatároztuk (Leica QWin, Wetzlar, Németország).

3.3. Vaszkuláris protokollok

- *A quercetin akut alkalmazásának dózis-hatás összefüggése*
Ezeket a vizsgálatokat $151 \pm 27 \mu\text{m}$ maximálisan relaxált belső átmérőjű koronária arteriolákon végeztük ($n=8$). A nKR oldatban végzett bevezető inkubáció után dózis-hatás görbét vettünk fel 10^{-9} mol/literes koncentrációtól 10^{-5} mol/literig, 50 Hgmm-es intraluminális nyomáson. Ez után a preparátumok minőségét ismételt nKR oldatos inkubációval ellenőriztük. Azon preparátumokat, ahol az érátmérő több mint 5%-kal eltért a kiindulási nKR-ben mért átmérőtől elvetettük. Végül a passzív, maximálisan relaxált érátmérőt kalciummentes Krebs-Ringer (Ca mentes KR) oldatban határoztuk meg (összetétele mmol/literben: NaCl 92, KCl 4,7, NaH_2PO_4 1,18, MgCl_2 20, MgSO_4 1,17, NaHCO_3 24, glukóz 5,5, EGTA 2, EDTA 0,025).

- *A quercetin akut hatásmódjának vizsgálata*
Ebben a vizsgálatban célunk volt a hatás méret függésének feltárása, ezért ezeket a vizsgálatokat $100\text{-}320 \mu\text{m}$ ($188 \pm 14 \mu\text{m}$) maximálisan relaxált belső átmérő tartományba eső koronária arteriolákon végeztük ($n=16$). Az erek aktív, spontán tónus alatt, nKR oldatban mérhető belső átmérője $70\text{-}240 \mu\text{m}$ ($149 \pm 13 \mu\text{m}$) volt. A bevezető inkubáció után vizsgáltuk az érátmérőt 10^{-7} mol/liter quercetin koncentráció, és ehhez adott 10^{-5} mol/liter indometacin (ciklooxigenáz gátló, a vazodilatátor prosztanoidok hatásának vizsgálatához) és 10^{-4} mol/liter N^{o} -nitro-L-arginin-metil-észter (L-NAME, endoteliális NO szintáz, eNOS gátló) jelenlétében. A reprodukálhatóságot ismételt nKR és quercetin oldatos inkubációval ellenőriztük, és a passzív átmérőt Ca mentes KR oldatban határoztuk meg.

Minden ponton 20 perc 50 Hgmm-es inkubáció után felvettük a 10-100 Hgmm közti nyomás érátmérő jelleggörbét.

- *Hosszú távú quercetin kezelés hatása a biomechanikai és farmakológiai remodelingre*

A felhasznált koronária arteriolák maximális, passzív belső átmérője $174 \pm 4 \mu\text{m}$ volt ($n=22$ quercetinnel kezelt és $n=20$ kontroll). A farmakológiai remodeling vizsgálatához 10^{-5} mol/liter noradrenalin, 10^{-5} mol/liter acetilkolin, 10^{-6} mol/liter bradikinin, és 10^{-4} mol/liter L-NAME-et használtunk a fenti nyomás emelkedés protokoll szerint. A reprodukálhatóságot ismételt nKR inkubációval ellenőriztük. A biomechanikai átépülést a Ca mentes KR oldatban felvett nyomás-érátmérő jelleggörbével vizsgáltuk.

3.4. Számítások

Az adatokat az azonos nyomáson mért passzív átmérő (Ca mentes KR-ben mért érátmérő) százalékában kifejezve normalizáltuk. A spontán tónust a 100- nKR oldalra számított relatív átmérő képlettel számítottuk. Az aktív tónust azonos módon, de farmakon jelenlétében számított relatív átmérővel határoztuk meg. A tangenciális falfeszülést a Laplace-Frank egyenlet, míg az inkrementális elasztikus modulust Cox 1979-es munkája alapján számítottuk ki.

3.5. Statisztika

Az adatok normál eloszlását Shapiro-Wilk teszttel ellenőriztük. A normál eloszlású adatokat átlag \pm SEM formában jelenítjük meg, a csoportok összehasonlításához t-tesztet, egy- és kétutas normál és ismétléses variancia analízist (ANOVA) Tukey poszt-hoc teszttel, Pearson korrelációt és lineáris regressziót használtunk. A nem normál eloszlású adatok leírása a medián és interkvartilis tartomány (medián [IQ25%; IQ75%]) formáját

követi, az összehasonlításukat Mann-Whitney teszttel végeztük. A szignifikancia határértékét $p < 0,05$ -ben határoztuk meg.

4. Eredmények

4.1. A quercetin dózis-hatás összefüggése patkány intramurális koronária arteriolán

Az arteriolák kiindulási, spontán tónusát ($20,2 \pm 4,3\%$) már 10^{-9} mol/liter quercetin koncentráció szignifikánsan csökkentette. A plazmaszinthez közeli, 10^{-7} mol/liter koncentráció a tónust a felére csökkentette, míg 10^{-5} mol/liter teljesen relaxálta az arteriolákat. A relaxáció reverzibilis volt, az arteriolák tónusa kimosás után helyreállt (egyutas ismétléses ANOVA, Tukey poszt-hoc teszttel, minden quercetin koncentrációnál $p < 0,05$ vs. nKR.).

4.2. A quercetin akut hatásmódja

10^{-7} mol/liter quercetin hatására jelentős vazodilatáció jött létre a koronária arteriolákon. Az arteriolák a spontán tónusuk ($21,3 \pm 2,3\%$) mintegy felét, $48,9 \pm 6,7\%$ -át relaxálták (kétutas ismétléses ANOVA, Tukey poszt hoc teszttel 10-70 Hgmm közt $p < 0,05$ vs. nKR). Az eltérő méretű arteriolák relaxációja a spontán tónusra, mint prekontrakcióra normalizálva összehasonlítható. E szerint a spontán tónus arányában létrejövő quercetin hatás és a passzív átmérő közt nincs korreláció (Pearson korreláció a passzív átmérő és a tónuscsökkenés aránya közt $r = -0,03$, ns.). Azonban mivel az átmérő csökkenésével a spontán tónus egyre fokozottabb, a kisebb arteriolákon létrejövő dilatáció élettanilag jelentősebb. Mind az indometacin, mind az L-NAME hatására a quercetinnel dilatált arteriolák kontraháltak, jelezvén, hogy

mind a vazodilátor prosztanoidok, mind a NO részt vesznek a jelátvitelben (indometacin: kétutas ismétléses ANOVA Tukey poszt-hoc teszttel 20-60 Hgmm közt $p < 0,05$ quercetin+indometacin vs. quercetin, L-NAME: kétutas ismétléses ANOVA Tukey poszt-hoc teszttel 10-70 Hgmm közt $p < 0,05$ quercetin+indometacin+L-NAME vs. quercetin+indometacin). Azonban 50 Hgmm-en indometacin hatására jelentősebb vazokonstrikció jött létre, mint L-NAME hatására (7,8% [3,1; 10,5] vs. 3,5% [1,3; 5,1], Mann Whitney próba $p < 0,01$). A quercetin beadása után az indometacin hatására létrejövő vazokonstrikció méretfüggőnek bizonyult, az egyre kisebb arteriolák egyre jelentősebb kontrakciót produkáltak (Pearson korreláció a passzív átmérő és az indometacin hatása közt $r = -0,65$, $p < 0,01$).

4.3. Hosszú távú quercetin kezelés hatása a biomechanikai és farmakológiai átépülésre

A nyolc hetes kezelés végén a kontroll és a kezelt állatok viselkedésében, testtartásában, szőrzetében nem volt különbség. A két csoport testtömegük (507 ± 9 g vs. 504 ± 10 g, t próba, ns.) és a szívtömegük ($1,38 \pm 0,14$ g vs. $1,35 \pm 0,18$ g, t próba, ns.) szerint sem tért el egymástól.

A kontroll és kezelt arteriolák passzív átmérőjében és elasztikus modulusában nem volt különbség (mindkét összehasonlításban kétutas ANOVA-val ns.), tehát az érfal kötőszöveti elemeiben nem történt átépülés. Azonban, mikor kifejlődött az arteriolák fiziológiás állapotára jellemző spontán tónus, a kezelt arterioláknak magasabb spontán tónusuk volt, mint a kontroll arterioláknak (kétutas ANOVA, $p < 0,01$). Ez szignifikánsan kisebb aktív belső átmérőt eredményezett a kezelt csoportban (kétutas ANOVA, $p < 0,01$). Ezzel

összefüggésben az arteriolák falvastagsága teljesen relaxált passzív állapotban nem különbözött (Mann Whitney próba, ns.), míg aktív, spontán tónus alatt a kezelt arteriolák fala vastagabb volt (Mann Whitney próba, $p < 0,05$). Ebből következik, hogy aktív állapotban a kezelt csoport tangenciális falfeszülése szignifikánsan, mintegy 30%-kal kisebb volt (kétutas ANOVA, $p < 0,01$). Biomechanikai ératépülés tekintetében tehát a kulcsmotívum a fokozott spontán tónus, ami az érfal vastagodását és a falfeszültség csökkenését okozza. Egyben megteremti a quercetinrel kezelt koronária arteriolák nagyobb dilatációs rezervét.

A farmakológiai válasz-készség tekintetében a kezelt arteriolák noradrenalin indukálta vazorelaxációja kisebb mértékű volt, mint a kontroll csoporté (kétutas ANOVA, $p < 0,01$). Az eredmény igazolja a szakirodalomban leírtakat, miszerint a quercetin és metabolitjai gátolják az adenilát-ciklázot. Mind az acetilkolin, mind a bradikinin kiváltotta NO mediált relaxáció a kezelt csoportban mérsékeltebb volt, mint a kontroll csoportban (kétutas ANOVA, $p < 0,01$), ellenben az L-NAME hatására a kezelt csoport jelentősebb vazokonstriktiót produkált (kétutas ANOVA, $p < 0,05$, Tukey poszt hoc teszttel 60-100 Hgmm között szignifikáns). A koronária arteriolák esetén az acetilkolin hatása ép endotél mellett is méretfüggő, a nagyobb arteriolákat dilatálja, a kisebbeket kontrahálja. Jelen kísérletünkben minden arteriolán dilatációt tapasztaltunk, tehát a méretbeli különbségek még nem okoztak farmakológiai válasz-készség változást. Összevetve az L-NAME-mel megfigyelt bazális, és a bradikinin indukálta maximális NO mediált választ az egyes nyomásokon, láthatóvá válik, hogy a teljes NO mediált válaszlehetőség tartományában nincs

különbség a két csoport közt (kétutas ANOVA, ns.), tehát feltehetően nem növekedett az eNOS mennyisége, amit a szakirodalom is alátámaszt. Azonban, a quercetinrel kezelt arteriolák bazális NO termelése a nyomás növelésével sem csökken, nem úgy, mint a kontroll csoportból származó arterioláké (lineáris regressziós egyenesek összehasonlítása, $p < 0,05$). Az azonos skálán magasabb nyugalmi érték mellett kisebb tere van a további eNOS serkentésnek, így érthető a kezelt csoportban tapasztalt limitált bradikinin válasz.

5. Következtetések

A fentebb megfogalmazott kérdéseinkre a következő válaszokat kaptuk:

1. Kimutatható-e, és ha igen, milyen mértékű a vazorelaxáció patkány intramurális koronária arteriolákban különböző fiziológiás quercetin dózisok akut alkalmazása esetén?

Az intramurális koronária arteriolák már 1 nmol/liter quercetin hatására szignifikánsan relaxálnak. A relaxáció dózis függően fokozódik 10 μ mol/liter koncentrációig, ahol az arteriolák tónusa gyakorlatilag nullára csökken. Az átlagos quercetin plazmakoncentráció a 100 nmol/liter tartományban várható. Ebben a dózisban a quercetin kiváltotta vazorelaxáció nem csak szignifikáns, de élettanilag is jelentős: a teljesen relaxált, passzív átmérőnek átlagosan 10%-a. Az arteriolák a meglévő, átlagosan 20%-os tónusuk 49%-át relaxálják 100 nmol/liter quercetin hatására. A nagyobb spontán tónusú, kisebb átmérőjű arteriolák esetében a fokozott spontán tónus miatt a kialakuló vazorelaxáció élettanilag jelentősebb.

2. Mennyiben NO felszabadulás, és mennyiben prosztanoid felszabadulás által mediált az intramurális koronária arteriolákban quercetin hatására kialakuló vazodilatáció?

Eredményeink szerint az akut quercetin kiváltotta vazodilatáció részben NO mediált, azonban mérettől függően (150-180 μm alatt) a prosztanoid mediált endoteliális relaxáció dominálhat. Az arteriolák kaliberének csökkenésével a prosztanoid mediált dilatáció egyre jelentősebb, míg NO mediált relaxáció esetén nem találtunk ilyen összefüggést. Így tehát az általunk legtöbbször vizsgált, kis méretű arteriolákban a prosztanoid mediált relaxáció jelentősebb volt, mint a NO mediált válasz.

3. Hogyan befolyásolja az intramurális koronária arteriolák korosodással együtt járó strukturális és funkcionális átépülését a tartós, hosszú távú quercetin szupplementáció?

A két hónapos 30 mg/ttkg/nap dózisú quercetin szupplementáció hatására az intramurális koronária arteriolák spontán tónusa és bazális NO termelése fokozódott. Ezek következményeként a kezelt állatok arterioláiban a magasabb simaizom aktivitás megnövelte az érfal vastagságát, és lecsökkentette az izobár tangenciális falfeszülést. Mindezen változások nagyobb dilatációs rezervet biztosítanak a koronária keringésnek.

6. Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények:

Monori-Kiss A, Kiss F, Restifo JM, Monos E, Nadasy GL. (2017) Chronic administration of quercetin induces biomechanical and pharmacological remodeling in the rat coronary arteries. *Physiol Res*, 66: (4) pp. 591-599. IF: 1,461

Monori-Kiss A, Monos E, Nadasy GL. (2014) Quantitative analysis of vasodilatory action of quercetin on intramural coronary arteries of the rat in vitro. *PLoS One*, 9 (8): Paper e105587. 6 IF: 3,234

A disszertációtól független közlemények:

Pal E, Hadjadj L, Fontanyi Z, Monori-Kiss A, Mezei Z, Lippai N, Magyar A, Heinzlmann A, Karvaly G, Monos E, Nadasy G, Benyo Z, Varbiro S. (2018) Vitamin D deficiency causes inward hypertrophic remodeling and alters vascular reactivity of rat cerebral arterioles. *PLoS One*, 13(2):e0192480 IF: 2,806

Hadjadj L, Varbiro S, Horvath EM, Monori-Kiss A, Pal E, Karvaly GB, Heinzlmann A, Magyar A, Szabo I, Sziva RE, Benyo Z, Buday M, Nadasy GL. (2018) Insulin resistance in an animal model of polycystic ovary disease is aggravated by vitamin D deficiency: Vascular consequences. *Diab Vasc Res*, 2018:1479164118758580 IF: 3,417

Gósi G, Monori-Kiss A, Nádasy G, Durkó A, Tőkés A, Monos E, Acsády G. (2014) Comparison of passive and active biomechanical properties of human cervical and leg veins. *Int Angiol*, 33 (4): 348-356. IF: 0,833

Varbiro S, Sara L, Antal P, Monori-Kiss A, Tokes AM, Monos E, Benko R, Csibi N, Szekeres M, Tarszabo R, Novak A, Paragi P, Nadasy GL. Lower-limb veins are thicker and vascular reactivity is decreased in a rat PCOS model: concomitant vitamin D3 treatment partially prevents these changes. *Am J Physiol Circ Physiol*, 307 (6): H848-H857. (2014) IF: 3,838

Csibi N, Sára L, Nádasy GyL, Antal P, Monori-Kiss A, Benkő R, Tőkés A-M, Monos E, Várbiró Sz. (2013) A vénás rendszer adaptációs mechanizmusai policisztás petefészek szindrómában. *Magyar Nőorvosok Lapja*, 76 (6): 11-20.

Sára L, Nádasy GyL, Antal P, Monori-Kiss A, Szekeres M, Masszi G, Monos E, Várbiro Sz. (2012) Pharmacological reactivity of resistance vessels in a rat PCOS model – vascular effects of parallel vitamin D3 treatment. *Gynecol Endocrinol*, 28 (12): 961-964. IF: 1,303

Sára L, Nádasy GyL, Antal P, Szekeres M, Monori-Kiss A, Horváth EM, Tőkés AM, Masszi G, Monos E, Várbiró Sz. (2012) Arteriolar biomechanics in a rat polycystic ovary syndrome model - Effects of parallel vitamin D3 treatment. *Acta Physiol Hung*, 99 (3): 279-288. Paper 0231-424x. IF: 0,882