

# **Új molekuláris mechanizmusok és gyógyszer célpontok a pulmonális hipertónia kezelésében**

**Ph.D. értekezés**

**Szerző: Dr. Kiss Tamás**

**Témavezető: Prof. Dr. Sümegi Balázs**

**Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar**

**Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet**

**Pécs**



**2016**

## Rövidítések jegyzéke

<b>AEBSF</b>	4-(2-aminoetil)-benzolszulfonil-fluorid
<b>ALK-1</b>	aktivin receptor szerű kináz 1 gén/activin receptor-like kinase 1 gene
<b>AP-1</b>	aktivátor protein-1
<b>APAH</b>	kapcsolt pulmonális artériás magasvérnyomás/ associated pulmonary arterial hypertension
<b>aPTI</b>	aktivált parciális tromboplasztin idő
<b>APT</b>	akut pulmonális tromboembólia
<b>BCR-Abl</b>	töréspont klaszter- Abelson tirozin kináz/break point cluster - Abelson tyrosine kinase
<b>BK</b>	bal kamra
<b>BMPR2</b>	csont morfogenetikus fehérje receptor 2 típus/ bone morphogenetic protein receptor type2
<b>CaM</b>	kalmodulin
<b>CI</b>	keringési perctérfogat / cardiac index
<b>CINC-1, CINC-2<math>\alpha/\beta</math></b>	citokin indukálta neutrofil kemoattraktáns/cytokine-induced neutrophil chemoattractant
<b>CNTF</b>	ciliáris neurotróf faktor/Ciliary Neurotrophic Factor
<b>CO</b>	keringési perctérfogat/cardiac output
<b>CO<sub>2</sub></b>	szén-dioxid
<b>COPD</b>	krónikus obstruktív tüdőbetegség
<b>cAMP</b>	ciklikus adenzin monofoszfát
<b>cGMP</b>	ciklikus guanozin monofoszfát
<b>CTEPH</b>	krónikus tromboembóliás pulmonális hipertónia / Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension
<b>ECL</b>	fokozott kemilumineszcencia / Enhanced Chemiluminescence
<b>ECM</b>	extracelluláris matrix
<b>EF</b>	ejekciós frakció
<b>ERA</b>	endotelin receptor antagonist
<b>ERK ½</b>	extracelluláris szignál-regulált kináz/ extracellular signal-regulated kinase
<b>FDA</b>	Amerikai Étel és Gyógyszer Adminisztrációs Egyesület/ US Food and Drug Administration
<b>Fract</b>	fraktalkin
<b>GM-CSF</b>	granulocita-makrofág kolónia-stimuláló faktor/Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
<b>GSK-3<math>\beta</math></b>	glikogén szintáz kináz-3 $\beta$
<b>HE</b>	hematoxillin-eozin
<b>HIV</b>	humán immunodeficiencia vírus
<b>ICAM</b>	intracelluláris adhéziós molekula/Intracellular Adhesion Molecule
<b>I<math>\kappa</math>B</b>	Kappa B inhibitora/Inhibitor of Kappa B
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	interleukin-1 $\alpha$
<b>INF</b>	interferon
<b>i.p.</b>	intraperitoneális
<b>IP-10</b>	interferon gamma indukálta protein-10/Interferon Gamma-Induced Protein-10
<b>i.v.</b>	intravénás

<b>JK</b>	jobb kamra
<b>KH</b>	krónikus hipoxia
<b>LDL</b>	alacsony denzitású lipoprotein/ low density lipoprotein
<b>LIX</b>	lipopoliszacharid indukálta CXC kemokin/ lipopolysaccharide induced CXC chemokine
<b>LMWH</b>	alacsony molekulásúlyú heparin
<b>L-Sel</b>	L-Szelektin
<b>LV</b>	bal kamra
<b>MAPK</b>	mitogén aktivált protein kináz/ mitogen-activated protein kinase
<b>MCT</b>	monokrotalin
<b>MIG</b>	gamma interferon által indukált monokin/ monokine induced by gamma interferon
<b>MIP-1<math>\alpha</math>, MIP-3<math>\alpha</math></b>	makrofág gyulladási fehérje/macrophage inflammatory protein
<b>MLCK</b>	miozin könnyű lánc kináz
<b>MMPs</b>	matrix metalloproteinázok
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	nukleáris faktor kappaB/ nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
<b>NO</b>	nitrogén monoxid
<b>Nrf-2</b>	nukleáris faktor-eritroid 2 kapcsolt faktor 2/ Nuclear factor erythroid 2- related factor 2
<b>PA</b>	pulmonális artéria
<b>PASMC</b>	tüdő artériából származó simaizomsejt/ pulmonary arterial smooth muscle cell
<b>PAH</b>	pulmonális artériás magasvérnyomás/ pulmonary arterial hypertension
<b>PAP</b>	pulmonális artériás nyomás/pulmonary arterial pressure
<b>PARP</b>	poli(ADP-ribóz) polimeráz
<b>PBS</b>	foszfát puffer oldat
<b>PDE-5</b>	5 típusú foszfodiészteráz
<b>PDGF</b>	trombocita eredetű növekedési faktor/ platelet derived growth factor
<b>PE</b>	pulmonális embólia
<b>PESI</b>	pulmonális embólia súlyossági index / pulmonary embolism severity index
<b>PH</b>	pulmonális hipertónia / pulmonary hypertension
<b>PI-3K-Akt</b>	foszfatidilinozitol-3kináz-Akt/ phosphatidylinositide 3-kinase-Akt
<b>PKG</b>	protein kináz G
<b>p.o.</b>	per os- szájon át adagolva
<b>PVRI</b>	pulmonális vaszkuláris rezisztencia index
<b>PWP</b>	pulmonális ék nyomás/pulmonary wedge pressure
<b>RANTES</b>	regulated on activation normal T cell expressed and secreted
<b>rtPA</b>	szöveti plazminogén aktivátor
<b>RV</b>	jobb kamra
<b>SDS</b>	Na-dodecil-szulfát
<b>SEM</b>	az átlag szórása / standard error of the mean
<b>SK</b>	streptokináz
<b>SMC</b>	simaizomsejt / smooth muscle cell
<b>STAT</b>	szignál transzdukciós és aktivátor fehérje/ signal transducer and activator of transcription protein

<b>Thym Chem</b>	tímusz kemokin/Thymus Chemokine
<b>TIMP-1</b>	mátrix metalloproteináz szöveti gátlója/ tissue inhibitor of metalloproteinase
<b>TL</b>	thrombolízis
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	tumor nekrozis faktor- $\alpha$
<b>tPA</b>	szöveti típusú plazminogén aktivátor
<b>TPG</b>	transzpulmonális nyomás gradiens/ transpulmonary pressure gradient (mean PAP – mean PWP)
<b>UFH</b>	frakcionálatlan heparin
<b>UH-SK</b>	nagyon magas dózisú sztreptokináz/ultra-high-dose streptokinase
<b>UK</b>	urokináz
<b>VEGF</b>	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor/Vascular Endothelial Growth Factor
<b>VSMCs</b>	vaszkuláris simaizomsejtek
<b>VTS</b>	vénás thromboembóliás szindróma
<b>WHO</b>	egészségügyi világszervezet/World Health Organization

## Bevezetés

Pulmonális hipertóniáról azokban a kórállapotokban beszélhetünk, amikor a pulmonális artériás középnyomás nyugalomban meghaladja a 25 Hgmm-t, melyet jobb szívfél katéterezés során mérhetünk

A pulmonális artériás hipertónia egy ritka, progresszív és a mai napig gyógyíthatatlan megbetegedés. Kifejlődése gyakran alattomos, így felismerésekor a betegek már rendkívül előrehaladott stádiumban lehetnek. Bár ritka betegségről van szó az utóbbi években a felismert esetek száma növekedni látszik.

A PAH megjelenésére jellemző a tüdő mikrocirkulációjában jelentkező progresszív, obstruktív, proliferációs elváltozások kialakulása, a vaszkuláris remodelling jelensége. Jelenleg csak korlátozott ismereteink vannak azon patológiai folyamatokról, melyek a kardiovaszkuláris károsodás kialakulásához vezetnek. Több bizonyíték született arra, hogy mind vazokonstriktív, mind gyulladásos folyamatok megelőzik a pulmonális arteriolák vaszkuláris átépülési folyamatát. Az endoteliális diszfunkció számos ponton játszik szerepet ennek a mikrovaszkuláris károsodásnak a kialakulásában, melyet média hipertrófia, intimális proliferatív elváltozások, adventiciális kiszélesedés és perivaszkuláris gyulladásos infiltráció jellemez. Ezek az átalakulások, valamint reaktív oxigén szabadgyökök felelősek a csökkent apoptózisért és megnövekedett proliferációs vaszkuláris átépülésért.

Számos szerről igazolódott, hogy alkalmazásukkal a betegek tünetei enyhíthetőek, a folyamat progressziója lassítható, azonban a betegség tényleges gyógyítására a mai napig nincs lehetőség.

A PD5 gátlók a cGMP lebomlását gátolják, így megnyújtják a nitrogén-monoxid vazodilatátor hatását, ezáltal pulmonális vazodilatációt okoznak.

A monokrotalin (MCT) egy mérgező 11-szénatomos makrociklikus pirrolizidin alkaloid, mely a *Crotalaria spectabilis* magjában található. A szer hatására a pulmonális endoteliális sejtekben és a pneumocitákban a Golgi-apparátus megnagyobbodása alakul ki, ami megalocitózishoz vezet. Mivel ebben a sejtorganellumban a fehérjék szerkezetének kialakítása akadályozottá válik, a sejtmembrán fehérjéinek hiánya áll elő, így

kompenzatórikusan proliferációs és anti-apoptotikus faktorok indukálódnak, illetve károsodik a nitrogén-monoxid-szignáltranszdukciós útvonal szabályozása.

## **Saját vizsgálatok patkány PH modellen**

### ***Célkitűzések***

Jelen munkánkban a sildenafil szerepét vizsgáltuk a tüdőben MCT indukálta PH patkány modellen. Fel kívántunk térképezni olyan új mechanizmusokat, melyek a sildenafil már ismert vazodilatációs hatásán túl, attól függetlenül hozzájárulnak a szer pozitív hatásaihoz pulmonális hipertóniában.

Vizsgáltuk azokat a mechanizmusokat, melyekkel a sildenafil hozzájárul a MCT okozta gyulladáshoz csökketéséhez.

Célunk volt feltérképezni a citokin hálózat változásait, melyhez 29 citokin expresszióját analízáló átfogó citokin arrayt használtunk.

Vizsgáltuk továbbá az aktivált B-sejtek nukleáris-faktor-kappa B (NF- $\kappa$ B) aktivációs útvonalát, a mitogen-aktivált-protein-kinázokat (MAPK) és a foszfatidylinositol 3-kináz-Akt (PI-3k-Akt) útvonalat, feltárva ezzel génextpresszióval összefüggő szignáltranszdukciós útvonalak változásait.

A morfológiai változásokat szövettani vizsgálatokkal, a biokémiai eltéréseket a patkány citokin array mellett Western blot analízissal, immunhisztológiai vizsgálatokkal elemeztük.

### **Kísérleti protokoll**

Kísérleteinkben 250-300 grammos hím Wistar patkányokat (n=72) vizsgáltunk, melyeket standard laboratóriumi körülmények között (kontrollált hőmérséklet, páratartalom), igény szerinti táplálék- és folyadékellátás mellett tartottunk 12 órás világos-sötét ciklusban. A kísérletben résztvevő állatokat 4 csoportba randomizáltuk:

- Kontroll (n=6): Az állatok a 0. napon 0,1 ml/kg izotóniás sóoldatot kaptak i.p.
- Sildenafil-kezelt kontroll csoport (n=8) (Kontroll+SLD): Az állatok a 0. napon 0,1 ml/kg izotóniás sóoldatot kaptak i.p. és 2 mg/kg/nap sildenafilt p.o. a 0-tól 28. napig, melyet az ivóvizükkel adagoltunk.

- Pulmonális hipertenzív csoport (n=8) (PH): Az állatok 60 mg/kg monokrotalint kaptak i.p. a 0. napon.
- Pulmonális hipertenzív + sildenafil kezelt csoport (n=8) (PH+SLD): Az állatok 60 mg/kg monokrotalint kaptak i.p. a 0. napon és 2 mg/kg/nap sildenafilt p.o. a 0-tól 28. napig, melyet az ivóvizükkel adagoltunk.

Az állatokat 4 hét elteltével isoflurannal túlaltattuk, majd szerveiket eltávolítottuk, és azok tömegét megmértük. A molekuláris biológiai vizsgálatokhoz szükséges szövetmintákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, és további feldolgozásig -80°C-on tároltuk.

A túlélésvizsgálatokhoz mind a 4 csoportban 10-10 állatot használtunk.

### **A tüdő fénymikroszkópos szövettani és morfometriai analízise**

A tüdőt 6%-os pufferelt formalinban fixáltuk, paraffinba ágyaztuk, és rotatoros mikrotommal (Leica 2135) 5 µm vékony sorozatmetszeteket készítettünk. A metszeten hematoxilin-eozin (HE) festést végeztünk. A metszetekről digitális kamerával (Olympus E-450 Digital SLR) 200x nagyítás mellett készítettünk felvételeket. Az alveolusok átlagos falvastagságát véletlenszerűen 50 helyen határoztuk meg metszetenként. A makrofágokat 5 egymást nem átfedő területen számoltuk metszetenként.

### **Gyulladásos citokinek és adhézis molekulák vizsgálata patkány citokin array kit segítségével**

A citokinek vizsgálatát a tüdőszövetekből készült homogenizátumokon patkány citokin array kit (R&D Systems; Biomedica Hungaria, Hungary) segítségével végeztük. A vizsgált citokinek listáját az 1. táblázat mutatja. A módszer a mintában lévő fehérjék és a nitrocellulóz membránon duplikátumban található befogó antitestek közötti specifikus kötődésen alapul. A vizsgálat során minden csoport – kontroll, sildenafil-kezelt kontroll, PH, PH + sildenafil-kezelt – tüdőszövet mintáit megvizsgáltuk. Az array használata a gyártó leírásának megfelelően történt. A folyamat végén a filmeket előhívtuk. A kiértékelés során az immunpozitivitás pixeldenzitását ImageJ 1.40 szoftver segítségével értékeltük.

### **Immunhisztológia**

A vizsgálat során a szövettani metszeteket előkészítést követően elsődleges nyúl antitesttel (anti-CD34 - cat# 10097.10, clone: Q19-E, antitest 1:200 hígítás, illetve anti-NF-κB antitest - Abcam, cat#ab86299 in 1:20 hígítás) inkubáltuk. Másodlagos anti-nyúl antitesttel (HISTOLS

–R Detection System, anti-rabbit, Histopathology Ltd.) szobahőmérsékleten inkubáltuk a metszeteket majd xilénes mosást, tisztítást követően a metszeteket fixáltuk.

### **Gélelektroforézis és Western blot analízis**

A tüdőszövetek 50 mg-os darabjait homogenizáltuk, a fehérjéket triklóracetáttal precipitáltuk. Az elkészített mintákat 10%-os SDS-poliakrilamid gélen megfuttattuk, majd a fehérjéket Protran nitrocellulóz membránra blottoltuk. Blokkolás után a membránokat egy éjszakán keresztül inkubáltuk 4°C-on az első antitesteket tartalmazó oldatokban – total-p38MAPK, phospho38MAPK (Thr180/Tyr182), phospho-extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 (Thr202/Tyr204), total ERK1/2, total GSK-3b, phospho-GSK-3b (Ser9), phospho-Akt (S473), total Akt, total-NF-κB, phospho-NF-κB (Ser536). Inkubálást követően a nitrocellulóz membránokat szobahőmérsékleten kecske anti-nyúl tormagyökér-peroxidáz-konjugált második antitestet tartalmazó oldatban inkubáltuk. Az antigén-antitest komplexek jelenlétét ECL (enhanced chemiluminescence) módszer segítségével tettük láthatóvá. A kopott filmeket komputeres szkennelést követően kiértékeljük, mely során az immunpozitivitás pixeldenzitását ImageJ 1.40 szoftver segítségével értékeltük.

### **Statisztikai elemzés**

A kapott számadatok kielemezéséhez egyutas Anova tesztet használtunk post hoc Bonferroni analízissel, a normalitás tesztet pedig Kolmogorov-Smirnov teszttel végeztük el. A szignifikancia szintet  $p < 0,05$ -tel határoztuk meg. A statisztikai elemzést IBM SPSS Statistics 20 szoftver segítségével végeztük.

## ***Eredmények***

### **Sildenafil kezelés hatására bekövetkező változások a tüdőszövetben**

A kontroll csoport patkányjaiból nyert mintákban az alveolusok falvastagsága  $3,31 \pm 0,88 \mu\text{m}$ -nek mutatkozott. A vaszkularizációt és vaszkuláris remodellinget mutató CD34 immunhisztokémiai vizsgálat gyenge, sporadikus pozitívítást mutatott. A sildenafil kezelés önmagában sem az alveolusok falvastagságában, sem a makrofág infiltráció mértékében nem okozott változást. Az MCT kezelés hatására megvastagodott érfalak, gyulladásosejtek toborzásának, migrációjának eredményeként azok tömeges megjelenése, illetve az alveolus falak megvastagodása volt látható a pulmonális hipertenzív patkányokban. Az alveolusok falvastagsága ebben a csoportban szignifikáns növekedést mutatott a kontroll csoporthoz képest ( $9,77 \pm 2,63 \mu\text{m}$  vs  $3,31 \pm 0,88 \mu\text{m}$ ). A kis pulmonális artériák extenzív vaszkuláris

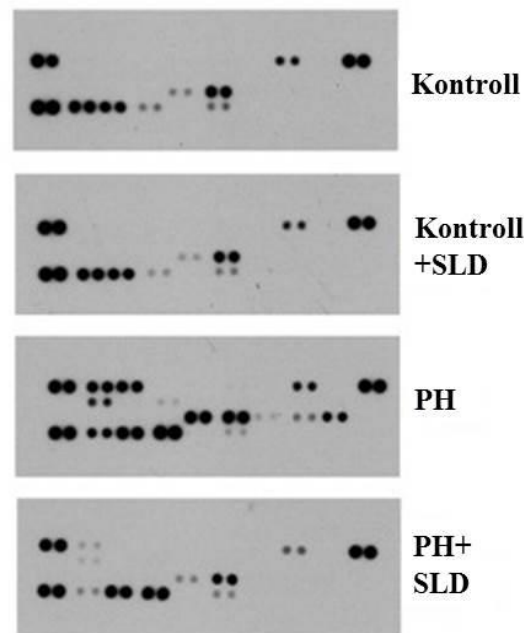


remodelling jelenségét mutatták. A makrofágok kifejezett számbeli növekedése, infiltrációja szintén megfigyelhető volt MCT kezelés hatására. A sildenafilal kezelt patkányok csoportjában jelentős alveolus falvastagság csökkenést figyelhetünk meg a beteg állatokhoz képest (alveolus falvastagság  $8,1 \pm 1,47 \mu\text{m}$  vs  $9,77 \pm 2,63 \mu\text{m}$ ), amely elősegítheti a légzési gázok diffúzióját. A kezelés hatására továbbá az erek lumene megnyílik, ezáltal csökken a vaszkuláris rezisztencia és ezen keresztül a pulmonális artériás vérnyomás is.

Mindezek az eredmények már az első lépéseknél alátámasztották azon hipotézisünket, miszerint a sildenafil jótékony hatással rendelkezik pulmonális hipertóniában és ez a hatás nem csupán az irodalomban már korábban leírt vazodilatációs, hanem antiinflammatorikus hatásának is a következménye.

### Sildenafil kezelés hatása a citokin termelésre

A MCT számos citokin és kemoattraktáns protein expresszióját szignifikánsan megnövelte, melyek közül kiemelendő az IL-1 $\alpha$ , CINC-1, CINC-2, LIX, MIG, MIP-1 $\alpha$  és a MIP-3 $\alpha$ . A sildenafil szignifikánsan csökkentette ezen citokinek aktivációját. A különböző citokinek MCT, majd sildenafil kezelés hatására bekövetkező változásait az 1. ábra és az 1. táblázat mutatják.



**1.ábra: Patkány citokin array panel,**  
*melyen a különböző pontok az egyes citokinek / kemokinek jelölik*

Ref Spt	CINC-1	CINC-2 $\alpha/\beta$	CINC-3	CNTF	Frakt.	GM-CSF	sICAM-1	INF- $\gamma$	Ref Spt
	<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	IL-1 $\beta$	IL-1ra	IL-2	IL-3	IL-4	IL-6	IL-10	
	IL-13	IL-17	IP-10	<b>LIX</b>	<b>L-Sel</b>	<b>MIG</b>	<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	<b>MIP-3<math>\alpha</math></b>	
Ref Spt	<i>RANTES</i>	<i>Thym Chem</i>	<b>TIMP-1</b>	TNF- $\alpha$	<i>VEGF</i>			Neg Ctr	

### 1. táblázat A patkány citokin array panel értelmezését segítő táblázat

A kiemelten jelölt citokinek mutatták a legjelentősebb változásokat, ahol a kontroll csoporthoz képest a PH csoportban nőtt az egyes pontok denzitása, a PH+SLD csoportban pedig ehhez képest csökkent. A dőlten jelölt citokinek esetében a pontok denzitása magasabb volt a kontroll csoportban, mint a PH csoportban. A nem jelölt citokinek esetén nem tapasztaltunk változást.

### Sildenafil kezelés hatása az NF- $\kappa$ B aktiválására

A korábban leírt, MCT kezelés hatására szignifikánsan indukálódó citokinek expressziója az NF- $\kappa$ B transzkripciós faktor által regulált. Kísérleteink során az NF- $\kappa$ B aktivációját immunhisztokémiai módszerrel és Western- blot analízissel vizsgáltuk foszfo-NF- $\kappa$ B p65 specifikus primer antitest felhasználásával. A foszfo- NF- $\kappa$ B p65 specifikus elsődleges antitesttel végzett immunoblotting során a kontroll csoportban sporadikusan megjelenő, gyenge háttér aktivitást mértünk. A sejtmagok csupán igen kis hányada mutatott az NF- $\kappa$ B nukleáris transzlokációjára utaló erős pozitív festődést. A sildenafil kezelés önmagában (MCT kezelés nélkül) nem okozott szignifikáns változást az NF- $\kappa$ B aktivációjában, ugyanakkor az NF- $\kappa$ B jelentősen fokozott foszforilációját így annak intranukleáris transzlokációját figyeltük meg az MCT kezelt pulmonális hipertenzív patkányok tüdőszövetének endoteliális és epiteliális sejtjeiben. Az állatok tüdőszövetében az NF- $\kappa$ B foszforilációja, azaz aktivációja szignifikáns mértékben csökkent sildenafil kezelés hatására az MCT indukálta pulmonális hipertenzív állapotban, mivel megakadályozza az I $\kappa$ B leválását az NF- $\kappa$ B molekuláról, így az NF- $\kappa$ B nukleuszba való áthelyeződése gátolódik, a komplex a citoplazmában marad. A különböző proinflammatorikus proteinek, növekedési faktorok és apoptózis reguláló fehérjék mRNS-ének transzlációja pedig pNF- $\kappa$ B dependens génexpressziós folyamat, azonban egy igen fontos szabályozó molekula hiányában nem jöhet létre.

### **Sildenafil kezelés hatása a PI-3K-Akt és MAPK szignáltranszdukciós útvonalra**

Az NF- $\kappa$ B aktivációja számos kináz típusú szignáltranszdukciós útvonalon keresztül szabályozott, így a PI-3K-Akt és MAPK útvonalakon keresztül is. Az Akt aktivációjának változását foszforiláció-specifikus primer antitestek felhasználásával Western blottal vizsgáltuk. Az Akt aktivációja gyakorlatilag nem volt detektálható a kontroll állatokban. A sildenafil kezelés önmagában enyhén fokozta az Akt foszforilációját, aktivációját, ez azonban statisztikailag nem mutatkozott szignifikáns mértékűnek. A pAkt szintje jelentősen megemelkedik a pulmonális hipertenzív patkányok tüdőszövetében védekező mechanizmusként, ugyanakkor a sildenafil terápia hatására még inkább felerősödik ez a szignáltranszdukciós útvonal.

Az Akt downstream targetjének a glikogén szintáz kináz (GSK)-3 $\beta$ -nak a foszforilációja az Akt-hoz hasonló képet mutatott. A GSK aktivációjának vizsgálatára szintén foszforiláció-specifikus primer antitesteket használtunk, melyekkel Western blot analízist végeztünk. Az MCT kezelés szignifikánsan megnövelte az Akt aktivációját, melyet a sildenafil kezelés tovább fokozott. Ugyanez a hatás volt megfigyelhető a pGSK-3 $\beta$  esetében is, mely ez utóbbi esetben szignifikánsnak mutatkozott. A GSK gátlása által a sildenafil megakadályozza a mitokondriális permeabilitás tranzíciót, ami nekrotikus sejthalál folyamatát indítaná el.

Mai ismereteink szerint a cGMP az ERK1/2 és p38 MAPK által regulált. Kísérleteink során megvizsgáltuk az MCT és a sildenafil ezekre kifejtett hatását. A kontroll állatok tüdejében az ERK 1 és ERK 2 foszforilációja mind sildenafil kezelés nélkül, mind sildenafil kezeléssel csupán enyhe fokot mutatott. Az MCT indukálta modellben a foszforilált ERK1 és 2 (pERK 1 és 2) szintje jelentősen emelkedett, a sildenafil képes legátolni az ERK foszforiláció megnövekedett expresszióját, tehát indukálja az ERK szignáltranszdukciós útvonalat, amely a legfontosabb jelátviteli molekula a sejttúlélés biokémiai útvonalában. Ez utóbbi jelenségek bár szembetűnőek, statisztikai elemzés során a szignifikancia szintjét nem érték le. A p38 MAPK foszforilációja a sildenafil kezelést nem kapott kontroll állatokban (kontroll csoport) gyakorlatilag nem volt detektálható, a sildenafil kezelés hatására enyhe emelkedés volt mérhető. Az MCT jelentős mértékben indukálja a MAPK jelátviteli útvonalat. A p38MAPK esetében a foszforilált forma, a pp38MAPK szintje pulmonális hipertóniában az oxidatív stressz hatására megnő, azonban a sildenafil kezelés hatására itt is szignifikáns koncentráció csökkenés tapasztalható akárcsak a citokinek/kemokinek esetében. Mivel a MAPK inhibíciója által az I $\kappa$ B funkciója nem gátolt, az I $\kappa$ B komplexben marad az NF- $\kappa$ B-vel, így az gátlás alatt marad, ezzel is elősegítve a sejtek túlélését.

## ***Következtetés***

A sildenafilnek erős citoprotektív hatása van; mindemellett, hogy vazodilatációt okoz, ezáltal optimalizálja a tüdő keringését, az oxigenizációt, határozottan gátolja az apoptózist és a proinflammatorikus biokémiai útvonalakat, illetve szuppresszálja ezek jelátviteli mediátorait. Összefoglalva tehát: nagyobb szerepet kaphatna a gyulladásos betegségek további terápiájában.

## **Akut pulmonális embólia (PE)**

Az akut pulmonális embólia relatíve gyakori kórállapot, amely könnyen kritikus állapot kialakulásához vezethet, és magas mortalitással járhat.

### **Pulmonális hipertónia akut tüdőembóliában**

Az artéria pulmonálisba illetve annak ágrendszerébe jutó embólusok az erek mechanikai obstrukcióhoz vezetnek, ezáltal a pulmonális artériákban megemelkedik a nyomás. Mindazonáltal nem csupán a mechanikai obstrukció, amely pulmonális artériákban kialakuló emelkedett nyomáshoz vezet pulmonális embólia során. Az in situ trombózis hatására aktiválódik a koagulációs kaszkád, a trombociták és endoteliális sejtek. Az aktiváció következményeként endotel diszfunkció alakul ki. Bizonyos tényezők, mint az emelkedett nyomás, gyulladás, egyes citokinek, extracelluláris matrix remodelling, extracelluláris matrix metalloproteázok, az endogén vaszkuláris elasztáz, plazminogén aktivátor/plazmin rendszer szintén szerepet játszanak a patogenezisben.

Az oxidatív stressz és a leukocita aktiváció szinten fontos tényező, azonban human vizsgálatokból csak limitált adattal rendelkezünk a pulmonális embóliához társuló oxidatív stressz patológiájáról.

A mátrix metalloproteázok (MMP-k) szintén érintettek a masszív tüdőembólia során létrejövő akut jobb szívfél elégtelenség kialakulásában. Az aktivált neutrofil granulociták reaktív oxigén szabadgyök termelése, így szuperoxid termelése is fokozódik, mely MMP aktiválódáshoz vezet. A pulmonális vaszkulátúra szempontjából különösen fontos, hogy az erek mechanikus feszülésének növekedése a reaktív oxigén szabadgyökök képződését facilitálja, így hozzájárul a fokozott MMP termeléshez. Az aktivált MMP-k (különösen az MMP-2 és -9) a vaszkuláris struktúra diszrupciójához vezetnek, mely az elasztikus lamina interna fragmentációjához vezetnek, mely egy korai hisztopatológiai jellemzője a pulmonális hipertóniának. Egy további tényező, mely szerepet játszhat az akut tüdőembólia okozta

pulmonális hipertónia kialakulásában az MMP-k vaszkuláris tónusra kifejtett hatása. Az aktivált MMP-k az ún. nagy endothelin-1 endotelin 1-32-vé alakulását indíthatják el, amely molekula potens vazokonstriktor hatású.

Ismert tény, hogy fibrinolitikus hatású anyagok, mint pl. a pulmonális embólia kezelésében használt szöveti plazminogén aktivátor (rt-PA; altepláz) képes a neutrofilek MMP-9 kibocsátását megnövelni. Kutatócsoportunk tagjainak sikerült először leírnia masszív és szubmasszív tüdőembólia altepláz vagy streptokináz kezelését követően létrejövő emelkedett MMP-9 szintet, mely emelkedés nem járt együtt a plazma TIMP-1 szintjének szignifikáns változásával. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a trombolízis megnöveli a nettó MMP aktivitást, és ez a hatás megnövelheti a kezelés szövődményeként kialakuló intracerebrális vérzés kockázatát, mely a lízisterápia leginkább felt szövődménye és az esetek több mint 50%-ban halálos kimenetelű. Bár ma még nem bizonyított, hogy az emelkedett MMP-9 aktivitás felelős a tüdőembóliában használt trombolízis kezelése során kialakuló agyvérzésért, az MMP-9 inhibitorok felhasználása talán egy lehetőség az agyvérzéses és egyéb vérzéses szövődmények rizikójának csökkentésére tüdőembólia trombolízis kezelésének alkalmazása során, ahogyan azt korábban állatkísérletes modellekben le is írták.

A vasoaktív anyagok egyensúlyának felborulása szintén fontos szerepet játszik az akut tüdőembólia során fellépő pulmonális hipertónia kialakulásában. A közelmúltban experimentális állatkísérletes modellekben szignifikáns hemolízist sikerült kimutatni akut pulmonális embóliában, valamint a megemelkedett vaszkuláris rezisztencia hátterében megnövekedett argináz I és II aktivitást írtak le. A szerzők rámutattak, hogy a hemolízis indukálta argináz I szint növekedés l-arginin depléciót eredményez, károsan befolyásolva így az endogén NO termelést. Normál körülmények között a hemoglobin a vörösvérsejtekhez kötött, így az endoteliális sejtek által termelt NO hatással a vaszkuláris simaizom sejtekre hatva vazodilatációt eredményez. Megnövekedett sejttől független hemoglobin koncentráció emelkedése esetén az elérhető NO mennyisége csökken, mely egy újonnan leírt fontos human megbetegedést eredményező biokémiai mechanizmus. A folyamat során hemolízis indukálta vazokonstriktió és endoteliális diszfunkció alakul ki, melyet a szabad hemoglobin NO scavenging hatása okoz. Feltételezésünk szerint a tüdőembólia és a trombolízis kezelés megnöveli a szabad hemoglobin koncentrációt, ami károsítja a NO biohasznosulását a NO scavenging mechanizmus által, ahogy az más hemoglobin dekompartmentalizációs kórállapotokban korábban már leírásra került. Vizsgálatainkat mind állatkísérletes tüdőembolizációs modellen, mind klinikai vizsgálatokban végeztük.

## **Saját vizsgálatok állatkísérletes tüdőembólia modellen és a klinikai gyakorlatban**

### ***Célkitűzések***

Hipotézisünk szerint a tüdőembólia maga és a trombolitikus terápia megnöveli a szabad hemoglobin koncentrációt és ezáltal a vérplazma NO konzumpcióját, így csökkentve a NO biohasznosulását, hozzájárulva ezzel a vaszkuláris rezisztencia növekedéséhez.

Jelen munkánkban állatkísérletes modellen vizsgáltuk az autológ véralvadék transzfúziójával, illetve mikrogyöngyökkel végzett tüdő embolizáció során kialakuló szabad hemoglobin szinteket és a plazma NO fogyasztást.

A kísérleti eredmények validálásához összehasonlítottuk akut tüdőembóliás betegek és egészséges önkéntesek szabad hemoglobin koncentrációját és NO fogyasztást.

Klinikai vizsgálatban néztük a trombolitikus terápia hatását a szabad hemoglobin koncentrációra és NO fogyasztásra.

### ***Anyagok és módszerek***

#### **Állatkísérletes modell**

A kísérletek a braziliai São Paulo Egyetem Orvostudományi Karán (Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brasil) készültek. Az állatok elhelyezését, gondozását és a kísérletek kivitelezését az etikai szabályoknak és az egyetemi protokollnak megfelelően végeztük (Guidelines of the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Pécsi Tudományegyetem, US NIH: Guide for the Care and Use of Laboratory Animals). A kísérletek során tizennégy  $17,2 \pm 2,0$  kg (átlag  $\pm$  szórás) tömegű hím bárányt használtunk. Az állatokat intramuszkuláris ketamin (10 – 15 mg/kg) és xylazine (0,1 – 0,2 mg/kg) kombinációjával elaltattuk, majd pancuroniummal (0,1 mg/kg bólus és 0,5 – 1 mg/kg/óra i.v.) lazítottuk és intratracheálisan intubáltuk. Ezt követően volumen kontrollált üzemmódban, szobalevegőt inhaláltatva, volumenkontrollált üzemmódban lélegeztettük. A tidal volumet 15 ml/ttkg-ra állítottuk, a légzésszámot pedig a fiziológiás artériás CO<sub>2</sub> tenzió eléréséhez adaptáltuk. Az anesztézia fenntartását intramuszkuláris ketamin (5mg/ttkg) és midazolam (0,5 mg/ttkg) kombinációjának 30 percenkénti adásával végeztük. Fiziológiás sóoldattal feltöltött katétereket helyeztünk a bal femorális artériába és jobb femorális vénába.

Előbbit nyomásátalakító transzducerrel összekötve folyamatos vérnyomásmonitorozásra, utóbbit folyadék és gyógyszeradagolásra használtuk. A bal femorális vénán keresztül egy 7,5F-es Swan-Ganz katétert vezetünk a pulmonális artériába. A kanül pozícióját a kanülon keresztül nyert nyomáshullám morfológiájából állapítottuk meg. A katétert szintén nyomásátalakítóhoz csatlakoztattuk, így mértük az artéria pulmonális középnyomást, a centrális vénás nyomást és a pulmonális éknyomást. A transzducereket a jobb szívfél magasságában kalibráltuk (nulláztuk) minden egyes mérési sorozat előtt. A termodilúciós keringési perctérfogat méréseket 3-as sorozatok átlagolásával viteleztük ki, melyekhez egyenként 3 ml fiziológiás sóoldatot használtunk. Az eredményeket monitoroztuk és rögzítettük (DX2010 Monitor, Dixtal do Brasil, Manaus, Brasil). A szívfrekvenciát felszíni EKG elektródák segítségével az I-es végtagi elvezetés felhasználásával mértük. A cardiac index, szisztémás vaszkuláris rezisztencia index (SVRI) és pulmonális vaszkuláris rezisztencia index (PVRI) értékek standard formulákkal a termodilúciós görbékből, és az invazív nyomásmérési eredményekből kerültek meghatározásra.

Az állatokat 3 kísérleti csoportba randomizáltuk.

1. Kontroll csoport (n=4): nem embolizált állatok, amelyek csak fiziológiás sóoldatot kaptak.
2. Akut pulmonális tromboembólia (APT) csoport (n=5): az embolizációt autológ véralvadék infúziójával végeztük 5 – 10 percen keresztül a jobb pitvarba helyezett kanülon keresztül. A véralvadékat saját vér (5 ml/ttkg) mintákból nyertük, melyet legalább 60 percen keresztül hagyunk alvadni, majd 2-3 mm-es fragmentumokra vágunk.
3. Mikrogyöngy embolizációs csoport (EMB) (n=5): az embolizációt 300 µm-es mikrogyöngyök (Sephadex G50; Pharmacia Fine Chemicals; Uppsala, Sweden) 5-10 percen keresztül 30 másodpercenként végzett intravénás (vena cava inferior) adagolásával végeztük. A mikrogyöngyökkel történő infundálást minden egyes állat esetén addig végeztük, amíg az artéria pulmonális középnyomás 20 Hgmm-el meg nem emelkedett.

A hemodinamikai méréseket 30 és 180 perccel az embolizáció után végeztük. Artériás vérmintákat induláskor (alapvonal), 30 és 180 perccel a tüdők embolizációját követően vettünk, melyekből plazma szabad hemoglobin és plazma NO fogyást mértünk.

### **Klinikai vizsgálat**

Vizsgálatainkat az 1975-ös Helsinkai Deklaráció etikai ajánlásai szerint a Pécsi Tudományegyetem Etikai Bizottságának (Institutional Scientific and Human Research Ethics Committee of the University of Pécs (810/2001)) engedélyével végeztük. Minden beteg részletes tájékoztatást kapott a vizsgálat adatairól, lépéseiről, céljáról, majd írásos beleegyező

nyilatkozattal járultak hozzá a vizsgálatban való részvételhez. A betegeket prospektíven magas és közepes rizikójú csoportokba soroltuk az aktuális Európai Kardiológus Társaság (European Society of Cardiology) ajánlása szerint. A helyi lakosságból 28 random önkéntes kiválasztása történt a kontroll csoportba. A 14 kaukázusi beteg két alcsoportra került beosztásra. 7 beteg ultra-high-dose streptokináz (UH-SK) kezelést (9 millió egység/6 óra) kapott, 7 beteg altepláz kezelésben (100 mg/2 óra) részesült.

Betegbevonási kritériumok:

- A perfúziós defektus  $> 50\%$ , melyet spirál CT vagy tüdőszcintigráfia megerősített  
*és*
- Hemodinamikai instabilitás (szisztolés vérnyomás  $< 90$  Hgmm)  
*vagy*
- Stabil hemodinamika mellett pozitív echokardiográfias lelet (D-jel vagy jobb kamra nyomás  $> 40$  Hgmm) és emelkedett troponin-I szint ( $> 0,11$  ng/l).

Kizárási kritériumok:

- Írásos beleegyező nyilatkozat hiánya  
*vagy*
- Előrehaladott malignus betegség  
*vagy*
- Trombolízis abszolút ellenjavallata

A betegek APT gyanúja esetén egy egyszeri 5000 IU i.v. bólus nem frakcionált Na-heparint (UFH) kaptak, amennyiben még nem kaptak kis molekulású heparin készítményt (LMWH). Arcmaszkon keresztül 50, ill. 100% oxigén adását végeztük, hogy a SaO<sub>2</sub>-t 95% vagy a felett tartjuk. Fájdalomcsillapításra 2 mg i.v. morfin bólusokat alkalmaztunk. A gyanítottnan hipovolémiás betegek 20 ml/kg/30 min kristalloid infúziót kaptak. A fenntartó folyadékpótlás 1,5 – 2 ml/kg/h volt. Hemodinamikai instabilitás esetén katekolamin támogatást indítottunk, hogy az artériás középnyomás 70-80 Hgmm között legyen. A noradrenalin dózisa 5-20 µg/min között változott, míg dobutamin esetén 5–10 µg/kg/min dózist alkalmaztunk. A dobutamin kezelést csak abban az esetben alkalmaztuk, amikor a noradrenalin kezelés mértéke meghaladta a 10 µg/min értéket. Egyik beteg sem igényelt gépi lélegeztetést. A szupportív terápia egyéb elemei a két betegcsoport között (UH-SK és altepláz)



azonosak voltak. A streptokinázzal kezelt betegek esetén UFH kezelés folytatása csak a trombolízis után kezdődött, míg altepláz kezelés esetén az UFH kezelés szimultán zajlott a lízisterápiával. Az UFH kezelés folytatása lízis után 48 órán át zajlott, vagy terápiás dózisu LMWH kezelés indult. Az UFH kezelést az irodalmi ajánlásokban szereplő heparin állítási nomogram alapján végeztük. A trombolízis hatásosságát egy második spirál CT vagy tüdőszcintigráfia vizsgálattal végeztük. Amennyiben bármelyik vizsgálat a perfúziós defektus méretének csökkenését legalább 30%-kal nem erősítette meg, úgy a trombolízis kezelést 24h elteltével az első ciklus kezeléshez képest megismételtük. Amennyiben a betegek fibrinogén szintje 2g/l alá csökkent a második trombolitikus ciklus előtt, friss fagyasztott plazmát transzfundáltunk a fibrinogén szint javítására. Artériás vérmintát vettünk a trombolízis előtt, mely az alapállapotot tükrözte, majd a trombolízis után 8 órával, 1, 3, 5 és 30 nappal. A vérmintákból meghatároztuk a plazma szabad hemoglobin koncentrációját és NO fogyasztását. A kontrollcsoport (n=28) tagjaitól vett vérmintákból szintén meghatároztuk a plazma szabad hemoglobin koncentrációját és NO fogyasztását, hogy összehasonlítsuk a tüdőembólián átesett betegek értékeivel.

### **A hemoglobin koncentráció mérése**

A plazma szabad hemoglobin koncentrációjának mérésére a kereskedelmi forgalomban elérhető speciális kittet (Cat.#K013H1, Arbor Assays, Ann Arbor, MI) használtuk. Az eljárás során mindenben a gyártó utasításai szerint jártunk el.

### **NO konzumpciós assay**

A mérésekhez speciális konzumpciós assayt használtunk, mellyel detektálható volt a plazmaminták NO fogyasztása. Egy nitrogénnel tisztított üveg edénybe foszfát pufferelt fiziológiás sóoldatba (pH: 7,4) 40 µM-os DETA NONOate (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) oldatot készítettünk, melyet egy kemilumineszcens NO analizátorral (Sievers Model 280 NO Analyzer, Boulder, CO) kötöttünk sorba, hogy egy egyenletes 40-60 mV körüli alap NO szignált nyerjünk. Ez a szignál a DETA NONOate bomlásából származó NO-ból ered, így stabil alaphelyzetet teremtett. Ezek után mindenegyes plazmamintából 3x 50 µl mennyiséget adtunk a rendszerhez. A minták az NO szignál alapvonalhoz viszonyított csökkenését eredményezték (NO fogyasztás, mV). Az adatokat ORIGIN Version 6.1 szoftver (Originlab, Northampton, MA) segítségével elemeztük és a csökkenő NO szignál görbe alatti terület számértékét határoztuk meg minden egyes plazmaminta esetén.

## **Statisztikai elemzés**

Kétutas (embolizáció vs idő) variancia analízist (ANOVA) és egyutas ANOVA tesztet használtunk melyet post hoc Bonferroni analízissel egészítettünk ki, hogy a hemodinamikai és biokémiai változásokat összehasonlítsuk. A szabad hemoglobin koncentráció és a NO konzumpció vagy más hemodinamikai paraméter összefüggésének meghatározására a Spearman féle rangkorrelációs koefficiens határoztuk meg. A plazma szabad hemoglobin koncentrációjának és a klinikai minták NO konzumpciójának összefüggését Student t-próbával határoztuk meg, a trombolízis okozta változásokat pedig egyutas ANOVA tesztel és post hoc Bonferroni analízissel végeztük. Az adatok ábrázolása átlag  $\pm$  átlag szórása és  $p$  érték megadásával történt.

## ***Eredmények***

### **Állatkísérletes vizsgálatok**

Azért, hogy vizsgálni tudjuk, vajon az experimentálisan létrehozott tüdőembólia során a plazma NO fogyasztásának növekedése a szabad hemoglobin koncentrációjának növekedésével hozható összefüggésbe, az embolizált állatok vérmintáin különböző méréseket végeztünk. Hipotézisünket 2 különböző állatmodellen teszteltük (saját véralvadék és mikrogyöngy embolizáció), mert a véralvadék képződés más úton befolyásolja a szabad hemoglobin szintet, mint a mikrogyöngy embolizáció.

Ahogy várható volt, a tüdő embolizációja megnövelte mind a PVRI-et mind a pulmonális artériás középnyomást mindkét modell esetében ( $p < 0.05$ ) és ezek a hemodinamikai változások együtt jártak a plazma megnövekedett hem koncentrációjával ( $p < 0.05$ ) és a megnövekedett NO felhasználással ( $p < 0.05$ ). Szignifikáns korrelációt találtunk a NO konzumpció és a vérminták hem koncentrációja között ( $p < 0.001$ ). Ezen eredményekkel párhuzamosan szignifikáns korreláció mutatkozott a PVRI ( $p < 0.001$ ) vagy MPAP ( $p < 0.001$ ) és a NO fogyasztás között.

### **Klinikai eredmények**

Azért, hogy a kísérletes eredményeket validáljuk, akut tüdőembólia klinikai eseteiben vizsgáltuk a megnövekedett plazma szabad hemoglobin koncentrációjához társuló NO fogyást is. Ennek érdekében a fent említett paramétereket megmértük akut tüdőembólián átesett betegek vérmintáiból. Az állatkísérletes eredményekkel összhangban azt találtuk, hogy az egészséges emberek mintáihoz képest az akut tüdőembóliát elszenvedett betegek vérében

mind a plazma hem koncentráció, mind a NO fogyasztás magasabbnak mutatkozott (mindegyik esetben  $p < 0,05$ ). Ráadásul mindkét paraméter azonnal további emelkedést mutatott mind alteplázzal, mind streptokinázzal végzett trombolízis után (mindkét esetben  $p < 0,05$ ). Érdekes, hogy ezen változások csúcspontja előbb következett be a streptokinázzal kezelt betegek esetében. A változások csúcspontját streptokináz kezelés esetén a trombolízis utáni 1. nap, míg altepláz kezelés után a 3. napon észleltük. Fontos még egyszer hangsúlyozni, hogy szignifikáns korrelációt találtunk a NO fogyasztás és a plazma hem koncentrációja között ( $p < 0,001$ ).

### ***Következtetés***

Eredményeink támogatják azt az álláspontot, hogy a vaszkuláris funkció fiziológiás kontrollja károsodik akut PE-ban. Vizsgálatunk volt az első, amely igazolta, hogy mind állatkísérletes, mind klinikai tüdőembólia esetén a NO konzumpció a fokozott hemolízis hatására megnövekszik. Vizsgálataink hozzájárultak azon korábbi felfedezések szélesebb körű megismeréséhez, hogy az endogén NO képződés fontos protektív mechanizmus az akut tüdőembóliára adott kardiovaszkuláris válaszreakció során. Igazoltuk továbbá, hogy az akut tüdőembólia során bekövetkező hemoglobin dekompartmentalizáció következetesen megnöveli a NO konzumpciót ezáltal csökkenti a vaszkuláris NO biológiai hasznosulását. Vizsgálataink egy új a hemoglobin dekompartmentalizációját és fokozott NO konzumpciót magába foglaló mechanizmusra mutattak rá, melyek talán szerepet játszanak a tüdőembólia során fellépő pulmonális hipertónia és hemodinamikai instabilitás kialakulásában. Mindezeket túl először írtuk le, hogy a trombolitikus terápia tovább súlyosbíthatja ezeket a változásokat akut tüdőembóliás betegekben. Felfedezéseinknek számos esetleges klinikai felhasználhatósága kínálkozik és segíthet megérteni azokat a komplex mechanizmusokat, melyek fontos szerepet játszanak az akut tüdőembólia során fellépő pulmonális hipertónia és hemodinamikai változások kialakulásában.

## Publikációs lista

### Értekezés alapjául szolgáló közlemények:

1. **Kiss T**, Kovacs K, Komocsi A, Tornynos A, Zalan P, Sumegi B, Gallyas F Jr, Kovacs K. Novel Mechanisms of Sildenafil in Pulmonary Hypertension Involving Cytokines/Chemokines, MAP Kinases and Akt.  
PLOS ONE 9:(8) Paper e104890. 10 p. (2014)  
IF: 3,234
2. Neto-Neves Evandro M, **Kiss Tamás**, Mühl Diána, Tanus-Santos Jose E. Matrix Metalloproteinases as Drug Targets in Acute Pulmonary Embolism  
CURRENT DRUG TARGETS 14:(3) pp. 344-352. (2013)  
IF: 3,597
3. Sertório, Jonas T, Neto-Neves, Evandro M, Dias-Junior, Carlos A, Sousa-Santos, Ozélia, **Kiss Tamás**, Mühl Diana, Tanus-Santos, Jose E. Elevated plasma hemoglobin levels increase nitric oxide consumption in experimental and clinical acute pulmonary thromboembolism  
CRITICAL CARE MEDICINE 41:(7) pp. E118-E124. (2013)  
IF: 6,147

### Egyéb közlemények:

1. **Kiss Tamás**. A gépi lélegeztetés technikai feltételei  
In: Bogár Lajos, Molnár Zsolt (szerk.) Az intenzív terápia gyakorlata. 579 p.  
Budapest: Medicina Könyvkiadó Zrt., 2013. pp. 209-216.  
(ISBN:978 963 226 440 0)- könyvfejezet
2. **Kiss Tamás**. Kontrollált üzemmódú gépi lélegeztetés  
In: Bogár Lajos, Molnár Zsolt (szerk.) Az intenzív terápia gyakorlata. 579 p.  
Budapest: Medicina Könyvkiadó Zrt., 2013. pp. 218-231.  
(ISBN:978 963 226 440 0)- könyvfejezet
3. **Kiss Tamás**. Akut gastrointestinalis vérzés  
In: Bogár Lajos, Molnár Zsolt (szerk.) Az intenzív terápia gyakorlata. 579 p.

Budapest: Medicina Könyvkiadó Zrt., 2013. pp. 449-457.

(ISBN:978 963 226 440 0)- könyvfejezet

4. **Kiss Tamás**. Minőségi mutatók az intenzív terápiában

In: Bogár Lajos, Molnár Zsolt (szerk.) Az intenzív terápia gyakorlata. 579 p.

Budapest: Medicina Könyvkiadó Zrt., 2013. pp. 555-561.

(ISBN:978 963 226 440 0)- könyvfejezet

5. Mühl D, Woth G, **Kiss T**, Ghosh S, Tanus-Santos JE. Pathophysiology, diagnosis and treatment of pulmonary embolism focusing on thrombolysis. New approaches.

In: Çobanoğlu Ufuk (szerk.) Pulmonary Embolism. 236 p.

Rijeka: InTech Education and Publishing, 2012. pp. 119-140.

(ISBN:978-953-51-0233-5)- könyvfejezet

6. Tabah A, Koulenti D, Laupland K, Misset B, Valles J, de Carvalho FB, Paiva JA, Cakar N, Ma XC, Eggimann P et al. Characteristics and determinants of outcome of hospital-acquired bloodstream infections in intensive care units: the EUROBACT International Cohort Study

Collaborator: ... **Tamas Kiss** (MD) ....

INTENSIVE CARE MEDICINE 38:(12) pp. 1930-1945. (2012)- ... sokszerzős közlemény

IF: 5,258

7. Woth G, Varga A, Ghosh S, Krupp M, **Kiss T**, Bogar L, Muhl D. Platelet aggregation in severe sepsis. JOURNAL OF THROMBOSIS AND THROMBOLYSIS 31:(1) pp. 6-12.

(2011)

IF: 1,476

8. Kovács Krisztina, Hanto Katalin, Bognár Zita, Tapodi Antal, Bognár Eszter, N Kiss Gyöngyi, Szabó Alíz, Rappai Gábor, **Kiss Tamás**, Sümegi Balázs, ifj Gallyas Ferenc.

Prevalent role of Akt and ERK activation in cardioprotective effect of Ca<sup>2+</sup> channel-and beta-adrenergic receptor blockers. MOLECULAR AND CELLULAR BIOCHEMISTRY 321:(1-2)

pp. 155-164. (2009)

IF: 1,896

### **Idézhető absztraktok:**

1. Krisztina Kovacs, **Tamas Kiss**, Roxana Ritz, Andras Soti, Balazs Sumegi. Effect of resveratrol on monocrotaline induced pulmonary hypertension. MOLECULES OF LIFE FEBS3+Meeting, September 16-19, 2015 / Portorož, Slovenia

2. András László Soti, R Ritz, K Kovacs, **T Kiss**: The effect of resvartol on monocrotalin induced pulmonary hypertension. HMAA Summer Conference Balatonfüred, 2015, August 21 - 22, 2015
3. Roxána Ritz, A Sóti, K Kovács, **T Kiss**: Novel mechanisms of Sildenafil in pulmonary hypertension involving cytokines/chemokines, MAP kinases and Akt. HMAA Summer Conference Balatonfüred, 2015, August 21 - 22, 2015
4. Tornyos Adrienn, **Kiss Tamás**, Kovács Krisztina, Komócsi András, Zalán Petra, Sümegi Balázs, Ifj. Gallyas Ferenc, Kovács Krisztina. A szildenafil új terápiás mechanizmusai a pulmonális hipertóniában. Magyar Kardiológusok Társasága 2015. Évi Tudományos Kongresszusa, Balatonfüred, 2015. 05.06- 09.
5. **Kiss T**, Ruppert OP, Ritz R, Kovacs K, Muhl D, Sumegi B, Kovacs K. Effects of Sildenafil on Monocrotaline Induced Pulmonary Hypertension. *CARDIOLOGIA HUNGARICA* 43:(Sp G) p. G16. (2013)
6. **Kiss Tamás**. Miért szeretek/szeretnék külföldön dolgozni? Mindenütt jó, de legjobb otthon! In: MAITT Dél-Dunántúli Szekció XII. Tudományos Ülése. Konferencia helye, ideje: Harkány, Magyarország, 2012.02.24-2012.02.25.p. 5.
7. Szabó Z, Dán L, Szekeres A, **Kiss T**, Jáksó K, Mühl D, Sárosi V. Ha a beteg L.A.M-entál, a közös cél Bécs. In: Szegedi Intenzíves Találkozó 2012. Konferencia helye, ideje: Szeged, Magyarország, 2012.11.15-2012.11.17. Szeged: p. 16.
8. Szabó Alíz, Rápolti Edit, Gál Janka, Balog Mária, **Kiss Tamás**, Kálai Tamás, Sümegi Balázs, Hideg Kálmán. Mitokondrium permeabilizáció és sejthalál kiváltása mitokondriumba irányított SOD mimetikumokkal. 39. Membrán-transzport Konferencia Sümeg, Hungary, 2009. (2009)
9. Szabó Alíz, Balog Mária, Kovács Krisztina, **Kiss Tamás**, Kálai Tamás, Sümegi Balázs, Hideg Kálmán. Mitokondrium permeabilizáció és sejthalál kiváltása mitokondriumba irányított SOD mimetikumokkal. Biológus Doktoranduszok Konferenciája (Conference of Biology PhD Students) Pécs, Hungary, 2009 (2009)
10. Szabó A, **Kiss T**, Jancsó G, Wéber Gy, Róth E, Bognár Z, Kovács K, Ifj Gallyas F. A posztkondicionálás hatása a jelátviteli útvonalak aktivitására különböző szövetekben hasi aorta műtétet követő reperfúzió során. *CARDIOLOGIA HUNGARICA* 38: p. B21. (2008)
11. Szabó Alíz, **Kiss Tamás**, Jancsó Gábor, Wéber György, Róth Erzsébet, Bognár Zita, Kovács Krisztina, Ifj Gallyas Ferenc. A posztkondicionálás hatása a jelátviteli útvonalak aktivitására különböző szövetekben hasi aorta műtétet követő reperfúzió során. In: Magyar

Kardiológusok Társasága 2008. évi Kongresszusa. Konferencia helye, ideje: Balatonfüred, Magyarország, 2008.05.07-2008.05.10. Paper 170.

12. Kovacs K, Szabo A, Bognar E, Kiss Gy, **Kiss T**, Sarszegi Z, Sumegi B, Gallyas F. Identification of novel drug targets preventing ischemic heart diseases. BRIDGES IN LIFE SCIENCES ANNUAL SCIENTIFIC REVIEW 1:(1) p. 42. (2007) RECOOP HST Consortium. Konferencia helye, ideje: Pécs, Magyarország, 2007.10.07-2007.10.13. p. 42. (ISBN:978-963-06-3012-2)

13. Szabó A, Bognár Z, Szántó Á, Tapodi A, Solti I, **Kiss T**, Kovács K, ifj Gallyas F, Sümegi B. The cardioprotection of a new SOD mimetic MPT inhibitory compound HO3538. FOLIA HEPATOLOGICA 11:(Sp.3.) p. 34. (2007) A Magyar Szabadgyök Kutató Társaság IV. Kongresszusa. Pécs, Magyarország: 2007.10.11 -2007.10.13.

14. Furedi R, Mühl D, **Kiss T**, Cristofari J, Gecse K, Roth E, Lantos J. Changes of platelet function, leucocyte activation and cytokine levels in septic patients. p. No. O476. p. Oral and poster presentation, 19th ESICM (European Society of Intensive Care Medicine) Annual Congress Barcelona, Spain, September 24-27, 2006. (2006)

15. Füredi R, Mühl D, **Kiss T**, Cristofari J, Gecse K, Róth E, Lantos J. Predictive role of oxidative stress in sepsis and multiple organ failure INTENSIVE CARE MEDICINE 32:(Supplement 1) p. S126. (2006)

### **Köszönetnyilvánítás**

Szeretnék köszönetet mondani Sümegi Balázs Professor Úrnak, hogy lehetővé tette számomra, kutatócsoportjához való csatlakozást, és végig segítette munkámat. Köszönöm a Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet dolgozóinak, TDK hallgatóinak; Ritz Roxána és Sóti András László, munkáját.

Szeretném megköszönni Bogár Lajos Professor Úrnak a támogatását és segítségét a tudományos és szakmai munkám során, hisz kérdéseimmel bármikor fordulhattam Hozzá segítségért. Köszönet illeti az Aneszteziológiai és Intenzív terápiás Intézet összes dolgozóját, akik ugyancsak segítettek munkámat. Köszönöm Dr. Mühl Diána segítségét a mindennapokban, tudományos, szakmai és bármely egyéb kérdésekben bátran számíthatok Rá. Köszönöm Dr. Jáksó Krisztián őszinte barátságát, támogatását.

Végül, de nem utolsó sorban köszönet illeti feleségemet, aki nélkülözhetetlen szakmai segítségen felül végig bátorított, támogatott és kiállt mellettem ezen az úton.