

# **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**



**2015**

# Tartalomjegyzék

|                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------|----|
| Tartalomjegyzék                                               | 2  |
| Rövidítések jegyzéke                                          | 4  |
| Bevezetés                                                     | 8  |
| Pulmonális artériás hipertónia (PAH)                          | 11 |
| Gyógyszeres kezelés                                           | 12 |
| Endothelin-receptor antagonisták (ERA-k)                      | 13 |
| Foszfodiészteráz-5 gátlók                                     | 14 |
| Prosztanoidok                                                 | 15 |
| Új lehetőségek a gyógyszeres terápiában                       | 16 |
| A gyógyszeres kezelések hatékonysága                          | 17 |
| Állatkísérletes modellek a pulmonális hipertónia vizsgálatára | 17 |
| Krónikus hipoxia modell                                       | 18 |
| A monokrotalin indukálta modell                               | 19 |
| Saját vizsgálatok patkány PH modellen                         | 22 |
| Célkitűzések                                                  | 22 |
| Anyagok és módszerek                                          | 23 |
| Hatóanyag előkészítése                                        | 23 |
| Kísérleti protokoll                                           | 23 |
| A tüdő fénymikroszkópos szövettani és morfometriai analízise  | 24 |
| Gyulladásos citokinek és adhézións molekulák vizsgálata       |    |
| patkány citokin array kit segítségével                        | 25 |
| Gélelektroforézis és Western blot analízis                    | 26 |
| Statisztikai elemzés                                          | 27 |
| Eredmények                                                    | 27 |
| Sildenafil kezelés hatására bekövetkező változások a          |    |
| tüdőszövetben                                                 | 28 |
| Sildenafil kezelés hatása a citokin termelődésre              | 33 |
| Sildenafil kezelés hatása az NF- $\kappa$ B aktiválására      | 40 |
| Sildenafil kezelés hatása a PI-3K-Akt és MAPK                 |    |
| szignáltranszdukciós útvonalra                                | 43 |
| Következtetés                                                 | 50 |

|                                                                              |     |
|------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Akut pulmonális embólia (PE)                                                 | 51  |
| A tüdőembólia kezelése                                                       | 52  |
| Hemodinamikai és respiratórikus támogatás                                    | 52  |
| Trombolízis                                                                  | 53  |
| Sebészi embolektómia                                                         | 55  |
| Perkután katéteres kezelés                                                   | 56  |
| Vénás filterek                                                               | 56  |
| Antikoaguláns terápia                                                        | 57  |
| Pulmonális hipertónia akut tüdőembóliában                                    | 58  |
| Saját vizsgálatok patkány tüdőembólia modellen és a klinikai<br>gyakorlatban | 63  |
| Célkitűzések                                                                 | 63  |
| Anyagok és módszerek                                                         | 63  |
| Állatkísérletes modell                                                       | 63  |
| Klinikai vizsgálat                                                           | 66  |
| A hemoglobin koncentráció mérése                                             | 67  |
| NO konzumpciós assay                                                         | 67  |
| Statisztikai elemzés                                                         | 68  |
| Eredmények                                                                   | 69  |
| Állatkísérletes vizsgálatok                                                  | 69  |
| Klinikai eredmények                                                          | 73  |
| Következtetés                                                                | 76  |
| Jövőbeli tervek                                                              | 77  |
| Irodalomjegyzék                                                              | 78  |
| Publikációs lista                                                            | 99  |
| Köszönetnyilvánítás                                                          | 104 |

## 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 tromboplastin 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>                                      | 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 adenosin monofoszfát                                                                 |
| <b>cGMP</b>                                    | ciklikus guanosin 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>FDP</b>            | fibrin degradációs termék                                                                      |
| <b>Fract</b>          | fraktalkin                                                                                     |
| <b>GM-CSF</b>         | granulocita-makrofág kolónia-stimuláló faktor/Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor |
| <b>GSK-3β</b>         | glikogén szintáz kináz-3β                                                                      |
| <b>HE</b>             | hematoxillin-eozin                                                                             |
| <b>HIV</b>            | humán immunodeficiencia vírus                                                                  |
| <b>ICAM</b>           | intracelluláris adhéziós molekula/Intracellular Adhesion Molecule                              |
| <b>IκB</b>            | Kappa B inhibitora/Inhibitor of Kappa B                                                        |
| <b>IL-1α</b>          | interleukin-1α                                                                                 |
| <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-1α, MIP-3α</b> | makrofág gyulladásos 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 simaizom sejt/ 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 éknyomás / pulmonary wedge pressure                                              |
| <b>RANTES</b>                  | regulated on activation normal T cell expressed and secreted                                |
| <b>rtPA</b>                    | rekombináns 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>                     | simaizom sejt / smooth muscle cell                                                          |

|                                |                                                                                                      |
|--------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>STAT</b>                    | szignál transzdukciós és aktivátor fehérje/ signal transducer and activator of transcription protein |
| <b>TBS</b>                     | TRIS puffer                                                                                          |
| <b>Thym Chem</b>               | tímusz kemokin/Thymus Chemokine                                                                      |
| <b>TIMP-1</b>                  | mátrix metalloproteináz szöveti gátlója/ tissue inhibitor of metalloproteinase                       |
| <b>TL</b>                      | trombolízis                                                                                          |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | tumor nekrosis 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 streptokináz / ultra-high-dose streptokinase                                     |
| <b>UK</b>                      | urokináz                                                                                             |
| <b>VEGF</b>                    | vaszkuláris endoteliális növekedési faktor / Vascular Endothelial Growth Factor                      |
| <b>VSMCs</b>                   | vaszkuláris simaizom sejtek                                                                          |
| <b>VTS</b>                     | vénás tromboembóliás 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 [1]. A pulmonális hipertónia, valójában olyan kórállapot, amely nem csupán hemodinamikai, hanem egyfajta patofiziológiai állapot is, mely számos klinikai megbetegedés esetén előfordulhat. Az egyes klinikai manifesztációkban megjelenő hemodinamikai jellemzőket az 1. táblázat mutatja.

### 1. táblázat

A pulmonális hipertónia definíciója a hemodinamikai paraméterek alapján<sup>a</sup>

| Definíció           | Hemodinamikai jellemző                                                                                          | Klinikai csoport(ok)                                                                                                                |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PH                  | Pulmonális artériás középnyomás<br>$\geq 25$ Hgmm                                                               | Mind                                                                                                                                |
| Pre-kapilláris PH   | Pulmonális artériás középnyomás<br>$\geq 25$ Hgmm<br>PWP $\leq 15$ Hgmm<br>CO normál vagy csökkent <sup>b</sup> | PAH (1)<br>PH tüdőbetegség következtében (3)<br>Krónikus tüdőembóliás eredetű PH (4)<br>PH multifaktoriális mechanizmusok miatt (5) |
| Poszt-kapilláris PH | Pulmonális artériás középnyomás<br>$\geq 25$ Hgmm<br>PWP $> 15$ Hgmm<br>CO normál vagy csökkent <sup>b</sup>    | PH bal szívfél megbetegedés következtében (2)                                                                                       |
| Passzív             | TPG $\leq 12$ Hgmm                                                                                              |                                                                                                                                     |
| Reaktív             | TPG $> 12$ Hgmm                                                                                                 |                                                                                                                                     |

<sup>a</sup> Minden paraméter nyugalomban mérve.

<sup>b</sup> Magas CO fordulhat elő hiperkinetikus állapotokban, mint például a kisvérkört érintő a szisztémás keringéstől a pulmonális keringés felé mutató sönt esetén, anémiában, hipertireózisban, stb.

A klinikai csoportok oszlopában megjelenő számok a pulmonális hipertónia klinikai felosztásának csoportjainak felelnek meg, melyeket a 2. Táblázat részletez.

Klinikai megjelenését tekintve a pulmonális hipertenzív állapotok karakterisztikájuk alapján 6 csoportba kerültek besorolásra, melyet a 2. táblázat részletez [2]. Az első felosztást az



Egészségügyi Világszervezet jóváhagyásával 1973-ban ismertették az első nemzetközi primer pulmonális hipertónia konferencián. Ezt követően a klinikai klasszifikáció az évek során számos változtatáson ment keresztül. Egy korábban érvényben lévő felosztás a kaliforniai Dana Pointban rendezett 4<sup>th</sup> World Symposium on PH kongresszuson került bemutatásra 2008-ban, majd a European Society of Cardiology és a European Respiratory Society közös ajánlásában jelent meg 2009-ben [3]. A jelenleg érvényben lévő felosztás a franciaországi Nice-ben rendezett 5<sup>th</sup> World Symposium on PH kongresszuson került bemutatásra 2013-ban [2].

Bár a felosztásban szereplő kórállapotok inkább krónikus megbetegedések, melyek pulmonális hipertóniához vezetnek, akután fellépő pulmonális hipertóniát figyelhetünk meg akut tüdőembólia esetén is.

## 2. táblázat

### Klasszifikáció

#### 1 Pulmonális artériás hipertónia (PAH)

- 1.1 Idiopátiás
- 1.2 Öröklött
  - 1.2.1 BMPR2
  - 1.2.2 ALK1, endoglin (öröklött hemorrágiás teleangiectázia vagy a nélkül)
  - 1.2.3 Ismeretlen
- 1.3 Gyógyszerek és toxinok okozta
- 1.4 Asszociált (APAH)
  - 1.4.1 Kötőszöveti betegségek
  - 1.4.2 HIV fertőzés
  - 1.4.3 Portális hipertenzió
  - 1.4.4 Veleszületett szívbetegség (bal-jobb söntök)
  - 1.4.5 Schistosomiasis

#### 1' Pulmonális venookkluzív betegség és/vagy pulmonális kapilláris hemangiomatózis

#### 1'' Újszülöttek perzisztens pulmonális hipertóniája

#### 2 Pulmonális hipertónia bal szívfél elégtelenség következtében

- 2.1 Szisztolés diszfunkció
- 2.2 Diasztolés diszfunkció
- 2.3 Billentyű betegség
- 2.4 Kongenitális / szerzett bal kamrai beáramlási / kiáramlás obstrukció és kongenitális kardiomiopátia

#### 3 Pulmonális hipertónia tüdőbetegség és/vagy hipoxia miatt

- 3.1 Krónikus obstruktív tüdőbetegség
- 3.2 Intersticiális tüdőbetegség
- 3.3 Egyéb tüdőbetegségek kevert restriktív és obstruktív képpel
- 3.4 Alvási légzészavarok
- 3.5 Alveoláris hipoventillációval járó megbetegedések
- 3.6 Krónikus magassági betegség
- 3.7 Fejlődési rendellenességek

#### 4 Krónikus tromboembóliás pulmonális hipertónia

#### 5 PH tisztázatlan és/vagy multifaktoriális mechanizmussal

- 5.1 Hematológiai betegségek: myeloproliferatív betegségek, splenectomia
- 5.2 Szisztémás betegségek: szarkoidózis, pulmonális Langerhans sejt hisztiocitózis, lymphangioliomyomatosis, neurofibromatosis, vaszkulitisz
- 5.3 Metabolikus betegségek: glikogéntárolási betegségek, Gaucher kór, pajzsmirigy betegség
- 5.4 Egyéb: tumoros obstrukció, fibrotizáló mediasztinitisz, Dialízis kezelést igénylő krónikus veseelégtelenség

## **Pulmonális artériás hipertónia (PAH)**

A pulmonális artériás hipertónia egy ritka, progresszív, pusztító jellegű 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. Nagy multicentrikus regiszterek adatai szerint a PAH prevalenciája 15 eset/év a felnőtt lakosság körében, incidenciája 2,4 eset/millió felnőtt lakos/év Franciaországban [4]. Az Egyesült Államokban a prevalencia 10,6 eset/év, az incidencia 2,0 eset/millió felnőtt lakos/év [5]. Incidenciája magyar adatok szerint 1–2/millió lakos/év [6]. A betegség rendszerint fiatal korban jelentkezik, azonban az életkori és nemek szerinti megoszlása változást mutat az idővel. A National Institutes of Health Registry adatai szerint az 1980-as években az átlag életkor 36 év volt, 1,7-es nő-férfi aránnyal [7]. A mai regiszterek adatai szerint mind Franciaországban, mind az Egyesült Államokban a diagnózis megszületésekor átlag életkor 50 év [8]. Míg a francia regiszter a nő-férfi arányt 1,6-ban állapítja meg, addig ez az Egyesült Államokban 3,9 [8]. Ezen epidemiológiai eltolódás oka egyelőre ismeretlen.

A tünetek megjelenésétől a diagnózis felállításáig eltelt átlagos idő mind a mai napig rendkívül hosszú, mintegy 1,1 év [8], mely az elmúlt 15 évben érdemben nem változott. A diagnózis utáni várható élettartam – természetes lefolyás – kezeletlen állapotban kb. 2,8 év [9]. A túlélés valamelyest javulást mutat az utóbbi évtizedben. A National Institutes of Health Registry adatai szerint az 1980-as években a 3 éves túlélés 48%-os volt [10], addig ez ma 67%-os mind a francia, mind az amerikai regiszter adatai alapján [11,12].

PAH megjelenhet izoláltan (primer pulmonális hipertónia [PPH] vagy más néven idiopátiás PAH [IPAH]) vagy más betegséghez társultan, mint például kötőszöveti betegségek (scleroderma, szisztémás lupus erythematosus), anorexiának szedése, kokain vagy más kábítószer, gyógyszerek szedése esetén [2].

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 vazokonstrikció, mind gyulladásos folyamatok megelőzik a pulmonális arteriolák vaszkuláris átépülési folyamatát [13]. 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 [14].

A karakterisztikus patológiai elváltozásoknak köszönhetően a pulmonális artériák lumenális átmérője csökken, mely a kialakuló pulmonális vaszkuláris rezisztencia emelkedését eredményezi [15,16]. Mindazonáltal túlzott vazokonstrikció csak a betegek mintegy 20%-ban játszik szignifikáns szerepet [17].

A pulmonális keringés rezisztencia növekedése jobb kamrai túlterheléshez vezet, mely korlátozza a beteg fizikai teljesítőképességét, és végül jobb szívfél elégtelenséghez, majd idő előtti halálozáshoz vezet.

Számos szerről igazolódott, hogy alkalmazásukkal a betegek tünetei enyhíthetőek, a folyamat progressziója lassítható, azonban a betegség tényleges gyógyítására a mai napig nincs lehetőség. Nem meglepő tehát, hogy egyre nagyobb számú publikáció és e téren tartott konferencia tanúsítja a kardiológusok, immunológusok és pulmonológusok növekvő érdeklődését a téma iránt.

### **Gyógyszeres kezelés**

A gyógyszeres kezelés célja a tünetek enyhítése, a terhelési tolerancia, a hemodinamikai viszonyok és lehetőség szerint a klinikai kimenetel javítása.

A betegség pontos patogenezise mind a mai napig nem pontosan tisztázott, a vazokonstriktor / proliferatív anyagok (pl. endotelin) és vazodilatátor / antiproliferatív ágensek (pl. prosztaciklin, nitrogén-monoxid) egyensúlyának felborulása kimutatható volt a tüdő vaszkulaturában [18, 19].

Számos, ezt a felborult egyensúlyt helyreállítani igyekvő gyógyszer került a figyelem és a jelenleg is elfogadott kezelési eljárások középpontjába. A PAH-specifikus gyógyszeres kezelés lehetőségeit mutatja a 3. táblázat.

### 3. táblázat: A PAH-specifikus gyógyszeres kezelés lehetőségei

| Gyógyszercsoport                              | képviselő                                                                            |
|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>prosztanoidok</i>                          | epoprostenol<br>treprostinil<br>iloprost                                             |
| <i>endotelin receptor antagonisták</i>        | bosentan<br>sitaxsentan (visszavonva)<br>ambrisentan<br>macitentan (vizsgálat alatt) |
| <i>foszfodiészteráz -5 gátlók</i>             | sildenafil<br>tadalafil<br>vardenafil                                                |
| <i>tirozin kináz inhibitorok</i>              | imatinib (vizsgálat alatt)                                                           |
| <i>szolubilis guanilát cikláz aktivátorok</i> | riociguat (vizsgálat alatt)                                                          |
| <i>prosztaciklin receptor agonisták</i>       | selexipag (vizsgálat alatt)                                                          |

#### **Endothelin-receptor antagonisták (ERA-k):**

Az elérhető ERA-k két fő csoportja különíthető el:

1. nem-szelektív, kettős hatású, endotelin A receptoron és endotelin B receptoron is ható szerek. Ide tartozik a bosentan és a macitentan.
2. Szelektív endotelin A receptor antagonisták. Ide tartozik az ambrisentan és a sitaxsentan.

#### ***Bosentan***

Javítja a hemodinamikát és a terhelési toleranciát, késlelteti a progressziót az 1. csoportba tartozó PAH betegek esetén [20-23].

Klinikai felhasználását tekintve a PAH 1-es csoportban a II-III-IV-es WHO funkcionális csoportba tartozó betegeknél ajánlott.

#### ***Ambrisentan***

Randomizált, placebo-kontrollált tanulmányokban (pl. ARIES-1 és ARIES-2 vizsgálat) mérsékelt és súlyos állapotú idiopátiás és kötőszöveti betegséghez társuló PAH (WHO

funkcionális osztály II-III-IV) esetén késleltette a progressziót, és a klinikai hanyatlást, javította a terhelési toleranciát [24-26].

### ***Macitentan***

Újabban felfedezett endotelin receptor antagonist, melyre jellemző a magas szöveti penetráció, ugyanakkor nincs hatással a májenzimekre. Ez a gyógyszer a 3-as fázisú SERAPHIN tanulmányban szignifikánsan csökkentette a morbiditást és a mortalitást az 1-es csoportú pulmonális artériás hipertóniában [27].

A csoport negyedik tagja a szelektív endotelin a receptor antagonist sitaxsentan potenciális halálos májtoxicitása miatt visszavonásra került a piacról.

### **Foszfodiészteráz-5 gátlók (PD5-I-ok):**

A PD5 gátlók a cGMP lebomlását gátolják, így megnyújtják a nitrogén-monoxid vazodilatátor hatását, ezáltal pulmonális vazodilatációt okoznak [28]. Molekuláris szinten a cGMP szint növekedése miatt aktiválódik a PKG enzim. A PKG foszforilálja a szarkoplazmatikus retikulum  $Ca^{2+}$ -csatornáit, amibe megindul a befelé irányuló  $Ca^{2+}$ -influx, így pedig csökkeni fog az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -koncentráció. Mivel nem képes elegendő  $Ca^{2+}$  kötődni a kalmodulin (CaM) molekulához, a CaM képtelen lesz összekapcsolódni a miozin könnyű lánc kinázzal (MLCK), így ez a kináz enzim nem tudja majd foszforilálni a miozin fehérjét. Ezen folyamat következménye, hogy gátlődik az aktin-miozin komplex kialakulása, így az erekben a simaizom relaxálódik.

A gyógyszercsoport képviselői a sildenafil, a tadalafil és a vardenafil.

### ***-Sildenafil***

Javítja a pulmonális hemodinamikát és a terhelési toleranciát a pulmonális hipertónia 1-es csoportjában [28-31]. Sajnos a mortalitásra kifejtett hatásra mind a mai napig nincsenek megfelelő adatok. A SUPER-1 placebo kontrollált, randomizált tanulmányban 277 1-es csoportú PAH-ban szenvedő beteget vizsgáltak [30]. A sildenafilt kapott betegek mind a hemodinamikai státuszukban, mind a 6 perces járás tesztben javulást mutattak, mely hatás fennmaradt az egy éves utánkövetés során. A vizsgálatot később kiterjesztették 3 éves kezelési időtartamra (SUPER-2 vizsgálat) [32]. A vizsgálat során 259 beteget vontak be a három éves kezelés végére. A hemodinamikai javulás, a 6 perces járás teszt és a betegek

WHO funkcionális státusza is perzisztens javulást mutatott. A becsült 3 éves túlélés 79%-nak mutatkozott.

A sildenafil hatása az egyéb típusú pulmonális hipertóniákban egyelőre bizonytalan.

### ***Tadalafil***

Az 1-es csoportú PAH esetén előnyös hatás mutatkozik a kimenetel tekintetében. Egy randomizált, placebo kontrollált vizsgálatban 405 beteget vizsgáltak tadalafil kezelés mellett [33]. A tadalafil szignifikánsan növelte 6 perces járástávolságot, a klinikai rosszabbodásig eltelt időt, ugyanakkor javította az életminőséget. A járástávolság növekedésére kifejtett pozitív hatás fennmaradt további 52 hétig, melyet a PHRIST-2 tanulmányban vizsgáltak [34].

### ***Vardenafil***

Egy placebo kontrollált, randomizált vizsgálatban javította a 6 perces járástávolságot, a keringési perctérfogatot, ugyanakkor csökkentette a pulmonális artériás nyomást, a pulmonális vaszkuláris rezisztenciát és a klinikai progresszió eseteit [35].

### **Prosztanoidok:**

A prosztanoidok családja prosztaciklin analógokat tartalmazó gyógyszercsoport, melyek elérhetők intravénás, szubkután és inhalációs formában. A prosztaciklin vagy más néven endoteliális proszttaglandin I<sub>2</sub> egy potens szisztémás és pulmonális vazodilatátor és trombocita aggregáció gátló, mely hatásokat az intracelluláris cAMP szint növelésével fejt ki [36,37]. A prosztaciklin továbbá fontos szerepet játszik antiproliferatív, antitrombotikus, antimitogén és immunmodulációs folyamatokban [38]. A gyógyszercsoport képviselői az epoprostenol, treprostinil, iloprost.

### ***Epoprostenol***

Intravénás formában érhető el. Eredetileg, mint áthidaló kezelés került bevezetésre tüdőtranszplantációra váró betegek kezelésében, azonban mára a súlyos állapotú (WHO funkcionális csoport IV) betegek első vonalbeli kezelése [39]. Az intravénás epoprostenol kezelés javítja a hemodinamikát, fizikai terhelhetőséget és a túlélést IPAH esetén [37, 40-44]. A többi 1-es csoportba tartozó pulmonális hipertónia esetén a hatások hasonlóak, azonban a túlélésre kifejtett hatása az alacsony mintaszámra tekintettel nem egyértelmű [45-48].

### ***Treprostinil***

Adható intravénásan és szubkután formában, bár ez utóbbi a beadás helyén jelentkező fájdalom miatt elég ritka. A közelmúltban vezették be inhalációs úton történő alkalmazását 1-es csoportú PAH-ás betegek esetén, akik WHO funkcionális III-as csoportúak. Vizsgálatok egyelőre csak az 1-es csoportba tartozó PAH-ás betegekkel történtek, itt javította a hemodinamikai paramétereket, terhelési toleranciát és talán a túlélést [49-53].

Klinikai vizsgálatok eredményei alapján az FDA (US Food and Drug Administration) elfogadta az orális adagolás lehetőségét is [54,55].

### ***Iloprost***

Adható inhalációs és intravénás úton. Az inhalációs út előnye a pulmonális vaszkulaturára kifejtett direktebb hatás, hátránya, hogy napi 6-9 alkalommal kell alkalmazni. Több PH csoportba tartozó betegnél is alkalmazták, ahol a WHO funkcionális csoport III vagy IV volt [56].

### **Új lehetőségek a gyógyszeres terápiában**

A 3 fő gyógyszercsoporttal - endotelin receptor antagonisták, foszfodiészteráz 5 gátlók, prosztanoidok – végzett kezelések esetén, még ha kiterjesztett kombinációs kezeléseket is alkalmazunk, a betegség progrediálhat. Így minden új hatásmechanizmussal bíró szerre nagy szükség van.

Annak ellenére, hogy PAH-ban hasonlóságok figyelhetők meg a szisztémás hipertónia okozta artériás elváltozásokkal valamint, korai ateroszklerózis során megjelenő elváltozásokkal (intimális hiperplázia, miocita hiperplázia), az **aszpirin** és **simvastatin** kezelés nem váltotta be a reményeket PAH esetén [57].

Annak ellenére, hogy az aszpirin csökkentette a szérum tromboxán B2 szintet, mely az eiokozanoid metabolizmusra kifejtett várt hatást jelezte, és a simvastatin csökkentette a szérum összkoleszterin, LDL és oxidált LDL szintjét; nem volt szignifikáns különbség sem az aszpirinnel sem a simvastatinnal kezelt betegek esetén a klinikai progresszió tekintetében a placebohoz képest. Aszpirinnel kezelt betegek esetén a nagyobb vérzések száma azonban megnövekedett [57].

A **riociguat** egy első osztályú szolubilis guanilat cikláz stimulátor, mely pozitív hatást mutatott PAH-ban és inoperábilis CTEPH-ban. Az elért eredményeket a PATENT-1 és



CHEST-1 tanulmányban ismertették. A gyógyszer magától a nitrogén-monoxidtól függetlenül hat, azonban stimulálja az NO utat [58, 59].

Az **imatinib** egy anti-proliferatív ágens, melynek targetje a BCR-Abl tirozin kináz és gátolja PDGF alfa- és béta-receptorokat valamint a c-KIT-et. Egy 202 beteg bevonásával végzett placebo kontrollált, randomizált vizsgálatban (103 imatinib, 99 placebo), mint kiegészítő kezelés, javította a terhelési toleranciát és a hemodinamikát azokban az előrehaladott állapotú pulmonális artériás hipertóniában szenvedő betegekben, akik legalább 2 szerből álló kombinációs PAH kezelést kaptak. Mindazonáltal a vizsgálat nem igazolta az imatinib kimenetelre gyakorolt kedvező hatását [60].

### **A gyógyszeres kezelések hatékonysága**

A gyógyszeres kezelések klinikai hatékonyságának felmérése mind a mai napig a kutatások középpontjában áll. Egy 3140 beteget magába foglaló 21 tanulmány bevonásával készített metaanalízis eredménye szerint az aktív kezelés a halálozás 43%-os csökkenését eredményezte (RR 0.57; 95% CI 0.35–0.92; P=0.023) [61]. Klinikai tanulmányok és szakirodalmi áttekintések megállapították, hogy a vazodilatátor kezelés nem vazoreaktív PAH betegek esetén a terhelhetőség szignifikáns, de korlátozott hatású javulását eredményezte a 6 perces sétálási teszt során [62]. Újabb vizsgálatok az összes kezelési stratégia eredményét összegezve azt mutatják, hogy a halálozás 39%-os csökkenése (95% CI 2%-62%, P = 0.041) figyelhető meg [63]. Mindazonáltal a vazodilatátor kezelés hatása a hosszútávú túlélésre pulmonális artériás hipertóniában mind a mai napig kérdéses. A tényleges mechanizmus, mely a mortalitás csökkenéséért felelős szintén nem tisztázott, ugyanis a halálozás csökkenése nem volt összefüggésbe hozható egy bizonyos gyógyszercsoporttal vagy annak dóziséval vagy a gyógyszer 6 perces sétálási tesztre illetve hemodinamikára kifejtett hatásával [63] .

A molekuláris mechanizmusok pontosabb megértésének tisztázására több állatkísérletes modell került bevezetésre.

### **Állatkísérletes modellek a pulmonális hipertónia vizsgálatára**

A PAH pulmonális elváltozásai számos patológiai folyamat eredményeképpen létrejött mikrovaskuláris károsodás következtében alakulnak ki. Számos PAH állatkísérletes modell

áll rendelkezésre a kutatásokhoz. Bár mindegyik állatmodellnek megvannak a korlátai az emberi megbetegedés vonatkozásában, nélkülözhetetlen kutatói eszközei a különböző celluláris mechanizmusok, molekuláris útvonalak feltérképezésének és mind a meglévő mind az új terápiás lehetőségek hátterének megértésének.

A leggyakrabban használt állatmodellek:

- krónikus hipoxia modell
- monokrotalin indukálta modell

### ***Krónikus hipoxia (KH) modell***

A kísérleti állatok 3-4 hétig normál nyomáson (normobárikus hipoxia) vagy alacsony nyomáson (hipobárikus hipoxia) történő oxigénben szegény levegőnek való kitétele krónikus hipoxiát eredményez [64]. Bár a különböző fajok között szignifikáns különbség lehet a KH-ra adott válaszreakcióban, ez a modell különösen praktikus és hasznos, mert kiszámítható és kiválóan reprodukálható patkányok felhasználásával. Az életkor igen fontos tényező, mely szignifikánsan befolyásolja az állatok válasz reakcióját, mivel a fiatal egyedek a gyorsan érő tüdővel, jóval érzékenyebbek a hipoxiára [65]. A KH ezekben az állatokban pulmonális vazokonstrikciót, média hipertrófiát és a normálisan nem muszkularizált kis artériák muszkularizációját eredményezi. A folyamat eredményeként ezen erek falában  $\alpha$ -simaizom aktint expresszáló sejtek jelennek meg. A korábban muszkularizált prekapilláris pulmonális artériák következményes, gyors kiszélesedése figyelhető meg (remodelling), mely az érfal média megvastagodásának és a simaizom sejtek hiperpláziájának valamint hipertrófiájának következménye. A jelenségek hamar megjelennek a betegség fellépését követően. A hipoxia indukálta remodelling folyamatában a másik fontos faktor a gyulladás. A gyulladás szignifikáns szerepét mutatja, az érfalban kialakuló mononukleáris sejtekből eredő perzisztens infiltráció. A nagyobb, proximális pulmonális artériák érfal megvastagodásnak és fibrózisnak köszönhetően az erek merevebbé válnak. Két hét hipoxiát követően a patkányokban a pulmonális artériás középnyomás megduplázódásával járó, mérsékelt PH fejlődik ki, mellyel párhuzamosan a strukturális változások progressziója is megfigyelhető. Bár jobb kamra (JK) hipertrófia is kifejlődik, tényleges jobb kamra elégtelenség nem jellemző [66]. Patkányokban a humán PAH-val ellentétben konkomitáló szisztémás hipertónia is megjelenik, ami fontos patofiziológiai különbségekre hívja fel a figyelmet [67]. Egy másik fontos különbség az emberi megbetegedéshez képest az irreverzibilis intimális fibrózis vagy a plexiform léziók kialakulásának hiánya a KH-ás patkány modellben [68]. Míg a média simaizomsejt rétegének hipertrófiája és hiperpláziája figyelhető meg, már relatíve enyhe pulmonális hipertónia esetén

is, addig a pulmonális endotélium megkímélt marad az átépült artériákban. Ugyanakkor az emberben kialakult súlyos PAH esetén az endotelsejtek intraluminális cluster képződése figyelhető meg [64]. A patkánymodell esetén KH-ban látható patológiai elváltozások lassú reverzibilitást mutatnak, amennyiben az oxigén szint a normálisra áll vissza, ugyanakkor az emberi IPAH normoxiás körülmények között alakul ki és irreverzibilis intimális fibrózishoz, valamint plexiform arteriopátia kialakulásához vezet [67].

Összefoglalva, a rágcsálók PH krónikus hipoxia modellje során kialakuló strukturális és fiziológiai változások azt mutatják, hogy erre a modellre, mint a kevésbé súlyos PH-ra (nem PAH) kell tekinteni, és a humán PH azon formáinak modellezésére alkalmas, melyek a hipoxiával hozhatók összefüggésbe, mint pl. a parenhimás pulmonális megbetegedések, alvással kapcsolatos légzési rendellenességek, súlyos COPD és krónikus magaslati betegség során kialakuló PH [66].

#### ***A monokrotalin indukálta modell***

A monokrotalin (MCT) egy mérgező 11-szénatomos makrociklikus pirrolizidin alkaloid, mely a pillangósvirágúak családjába tartozó *Crotalaria spectabilis* (1. ábra) magjában található [69].

**A**

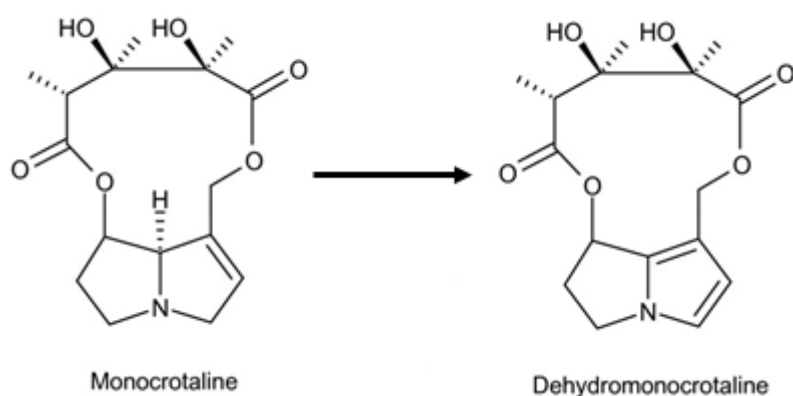


**B**



**1. ábra A: *Crotalaria spectabilis*, B: a monokrotalin kémiai szerkezete**

A monokrotalin önmagában inaktív prodrug, azonban a májban lévő CYP3A4 enzim (Citokróm P450 enzim rendszer tagja) hatására aktív metabolittá, dehidromonokrotalinná (2. ábra) alakul.



**2. ábra. A monocrotalin → dehydromonocrotalin átalakulás**

A szer hatására a pulmonális endoteliális sejtekben és a pneumocitákban a Golgi-apparátus megnagyobbodása alakul ki, ami megalocitózishoz vezet. Mivel ebben a sejtorganelumban 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. Mindemellett a monocrotalin erősen aktiválja az Nrf-2-mediálta (Nuclear factor erythroid 2- related factor 2) stressz jelátviteli útvonalat és a kaszpáz-3 enzimeket. A pulmonális vaszkuláris remodelling és emelkedett pulmonális artériás nyomás 2 héttel az egy dózisban beadott szubkután vagy intraperitoneális injekciót követően megfigyelhető, ezáltal a monocrotalin modellt vonzó állatkísérletes eszközzé téve széles körű kutatási tevékenységekhez. A citokróm P450 által végzett hepatikus metabolizmus különbségei miatt a monocrotalinra adott válasz fajonként, de még állatonként is eltérő lehet [66]. A monocrotalin exakt toxikológiai mechanizmusa a széleskörű kutatások ellenére mind a mi napig nem teljesen tisztázott [70]. A MCT indukálta PAH modell domináns strukturális elváltozása a pulmonális artériák médiahipertrofiája és nem az endotel sejt mediálta angio-obliteráció, ahogyan az a human megbetegedésben megfigyelhető. Az SMC hipertrofiát megelőzően a kis pulmonális artériák és vénák adventiciális rétegének markáns mononukleáris sejtes (főként makrofágok) infiltrációja mutatható ki az MCT-nal kezelt patkányokban [71]. Néhány kutató a pulmonális vénák okklúzióját mutatta ki, ami kérdéseket vethet fel az patkány MCT modell humán PAH megbetegedés leképezésével kapcsolatban [71, 72]. A vaszkuláris elváltozások mellett a MCT kezelt patkányokban kifejezett perivaszkuláris ödéma, az alveoláris szeptum kiszélesedése és az I-es típusú pneumociták megalocitózisa figyelhető meg. A MCT kezelt állatok tüdőszövetének elektronmikroszkópos vizsgálatai, mind a tüdő endoteliális sejteinek, mind az I-es típusú pneumocitáinak degenerációját mutatták, intersticiális hipercellularitás és fibrózis

mellett [69]. Szignifikáns JK hipertrófia és JK diszfunkció szintén jól dokumentáltak, melyek fontos faktorai a PH modelleknek, hiszen ezen jelenségek gyakran társulnak az emberi súlyos PH-hoz is [73]. Sajnálatos módon néhány kutató MCT indukálta miokarditist mind a jobb, mind a bal kamrát illetően leírt, ami tovább bonyolítja a JK hipertrófia és jobb szívfél elégtelenség vizsgálatának lehetőségét [74]. Más vizsgálatok szignifikáns máj- és vesekárosodást írtak le. Egy közelmúltban közölt megfigyelés szerint patkányokban a MCT hepatikus veno-okkluzív megbetegedést idéz elő [75, 76]. A pulmonális vazokonstrikció úgy tűnik szintén fontos szerepet játszik az MCT modellben. A vazokonstrikció ugyanakkor a humán PAH megbetegedések csak bizonyos csoportjára jellemző, miokarditisz és hepatikus veno-okkluzív megbetegedés pedig egyértelműen nem asszociálható az emberi PAH megbetegedéssel [69]. Mivel a MCT kezelt patkányokban nincs bizonyíték obstruktív intimális léziók kialakulására a perifériás pulmonális artériákban, így erre a modellre egy akut toxikus modellként tekinthetünk, mely a tüdő és más szervek (vese, más és szív) perifériás ereinek akut és szubakut károsodásával írható le [66]. Ennek megfelelően a patkány MCT modell a gyulladás kontextusában lehet informatív, és segíthet felderíteni a tüdőkárosodás és krónikus gyulladás szerepét a pulmonális vaszkuláris megbetegedésekben [69].

A MCT pulmonektómiával kombinálva („második csapás”) neointimális elváltozások (plexiform szerű léziók) kialakulásához és a kisebb arteriola lumenek obliterációjához vezet, amely strukturális megjelenés a humán betegek esetén is tapasztalható.

Egy további nagyon fontos ellentét a patkány modell és az emberi megbetegedés között, hogy a MCT indukálta PAH több intervenciós lehetőséggel is gyógyíthatónak tűnik. Számos ágensről (napjainkig több mint 30) írták le, hogy megelőzi, néhányuk vissza is fordítja a MCT indukálta PAH-t [66, 67].

Összefoglalva elmondható, hogy a csupán MCT-t használó modell a gyulladás asszociálta PAH modellezésre lehet alkalmas és korlátozott értékű a súlyos angioproliferatív PAH leképezésére.

## 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 gyulladásos folyamat csökkentéséhez.

Célunk volt feltérképezni a citokin hálózat változásait, melyhez 29 citokin expresszióját analizáló 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 phosphatidylinositol 3-kináz-Akt (PI-3k-Akt) útvonalat, feltárva ezzel génexpresszióval összefüggő szignáltranszdukciós útvonalak változásait.

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

## **Anyagok és módszerek**

A proteáz inhibitor koktél, foszfatáz inhibitor koktél és monokrotalin gyártója a Sigma (Magyarország). A protran nitrocellulóz membrán gyártója a Whatman GmbH (Németország). Az anti-tAkt, foszfospecifikus anti-Akt-1 Ser473, foszfospecifikus anti-ERK1/2 Thr202/Tyr204 és foszfospecifikus anti-p38MAPK antitestet a Cell Signaling Technology (Amerikai Egyesült Államok), a kemilumineszcenciához szükséges anyagokat a Millipore és az Amersham Biosciences (Magyarország) gyártotta. A kecske anti-nyúl és anti-egér tormaperoxidáz-konjugált másodlagos antitestet a Bio-Rad Laboratories-től (Amerikai Egyesült Államok) vásároltuk. Minden egyéb reagenst a kereskedelmileg elérhető legnagyobb tisztaságban alkalmaztunk.

### **Hatóanyag előkészítése**

A monokrotalint 0,5 N HCl oldatban oldottuk, oldódást követően az oldat pH-ját 0,5 N NaOH oldattal 7,4-re állítottuk.

A sildenafil oldatot 100 mg-os tabletták (Pfizer) összetörését követően, minden nap frissen 0,2 mg/ml koncentrációban ivóvízzel készítettük.

### **Kísérleti protokoll**

Kísérleteinkben 250-300 grammos hím Wistar patkányokat (n=72) vizsgáltunk, melyeket standard laboratóriumi körülmények között (kontrollált hőmérséklet, páratartalom), igény szerinti táplálék- (standard rágeszáló táp) és folyadékellátás mellett tartottunk 12 órás világossötét ciklusban. Az állatok elhelyezését, gondozását és a kísérletek kivitelezését az etikai szabályoknak és az egyetemi protokollnak megfelelően végeztük (BA02/2000-15024/2011, Pécsi Tudományegyetem, US NIH: Guide for the Care and Use of Laboratory Animals). A kísérletben résztvevő állatokat 4 csoportba randomizáltuk:

- Kontroll (n=8): 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 kaptak 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 kaptak 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 tüdőket 6%-os pufferelt formalinban fixáltuk, paraffinba ágyztuk, 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 automata beállításban. Az összehasonlíthatóság érdekében minden esetben a tüdők felszínétől azonos távolságra elhelyezkedő struktúrákat fényképeztük le, ezen szabály figyelembevétele mellett azonban a képek kiválasztása véletlenszerűen történt. Az alveolusok átlagos falvastagságát véletlenszerűen 50 helyen határoztuk meg metszetenként. A makrofágokat 5 egymást nem átfedő területen számoltuk metszetenként.



## Gyulladásos citokinek és adhézións molekulák vizsgálata patkány citokin array kit segítségével

A pulmonális hipertónia patomechanizmusában fontos szerepet betöltő citokinek vizsgálatát a tüdőszövetekből készült homogenizátumokon patkány citokin array kit segítségével szemikvantitatív módon végeztük [77]. A vizsgált citokinek listáját a 4. táblázat mutatja.

|               |                       |        |               |        |        |                |                |
|---------------|-----------------------|--------|---------------|--------|--------|----------------|----------------|
| CINC-1        | CINC-2 $\alpha/\beta$ | CINC-3 | CNTF          | Frakt. | GM-CSF | sICAM-1        | INF- $\gamma$  |
| IL-1 $\alpha$ | IL-1 $\beta$          | IL-1ra | IL-2          | IL-3   | IL-4   | IL-6           | IL-10          |
| IL-13         | IL-17                 | IP-10  | LIX           | L-Sel  | MIG    | MIP-1 $\alpha$ | MIP-3 $\alpha$ |
| RANTES        | ThymChem              | TIMP-1 | TNF- $\alpha$ | VEGF   |        |                |                |

4. táblázat A citokin array kit vizsgálható citokinjei

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. Az előkészített tüdőmintákat PBS-ben homogenizáltuk proteáz inhibitor koktél (4-(2-aminoetil)-benzolszulfonil-fluorid (AEBSF), aprotinin, bestatin, E-64, leupeptin, pepstatin A) hozzáadásával, majd 1% Triton X-100-at adtunk a mintákhoz, végül 15  $\mu$ l biotinizált antitesttel 1 órán át inkubáltuk. A nitrocellulóz membránt blokkoló pufferrel mostuk 1 órán át. A blokkolást követően a biotinizált antitesttel inkubált homogenizátum 1,5 ml-ét a nitrocellulóz membránra pipettáztuk, és +2-8°C-on egy éjszakán át inkubáltuk. Ezután a membránokat 3x10 percig pufferben mostuk, majd tormagyökér-peroxidázzal konjugált streptavidinnel fél órán át inkubáltuk. Háromszori mosást követően kemilumineszcens detektáló reagenst adtunk a keverékhez, és a filmeket előhívtuk. A kiértékelés során az immunpozitivitás pixeldenzitását ImageJ 1.40 szoftver segítségével értékeltük.

## Immunhisztológia

A metszeteket xilén segítségével deparaffinizáltuk, felszálló alkohol-oldatokban rehidráltuk, desztillált vízzel mostuk. Citrát puffer használatát követően (HISTOLS® Citrate Buffer, cat# 30010; Hisztopatológia Kft), 750 W mikrohullámú sütő, majd 20 perc szobahőmérséklet, a metszeteket TRIS (TBS) pufferrel mostuk (pH = 7.6), majd endogén peroxidázzal blokkoltuk (Peroxidase blocking, cat# 30012; Hisztopatológia Kft, 10 percm szobahőmérséklet). TBS

mosást követően a nonspecifikus kötőhelyek blokkolása következett (Background Blocking Protein Solution, cat# 30013; Histopatológia Kft), 10 perc, szobahőmérséklet, majd újabb mosás nélkül az elsődleges antitest alkalmazása: CD-34, cat# 10097.10, Q19-E, nyúl antitest 1: 200 hígítás, illetve anti-NF- $\kappa$ B p65 (foszfo S536) antitest (Abcam, cat# ab86299 1:20 hígítás). Az elsődleges antitesttel 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd TBS mosás következett. A másodlagos antitesttel (HISTOLS® R Detection System, anti-nyúl; Histopatológia Kft) 30 percen keresztül, szobahőmérsékleten inkubáltuk a metszeteket, melyet TBS mosás követett. A metszeteket 3-amino-9-etilkarbazollal (HISTOLS® Resistant AEC Chro-mogen/Substrate System, cat# 30015.K; Histopatológia Kft.) vagy 3,3'-diaminobenzidinnel (HIS-TOLS® DAB Chromogen/Substrate System, cat# 30014.K, Histopatológia Kft.) inkubáltuk, desztillált vízzel mostuk. A végső dehidrációt, xilénos mosást követően a metszeteket fixáltuk.

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

A tüdőszövetek 50 mg-os darabjait jégen 50 mM-os foszfát és proteáz inhibitor koktélt (mindegyik 1:1000 hígítású; Sigma-Aldrich) tartalmazó TRIS pufferben (pH=8,0) homogenizáltuk, majd a fehérjét triklóracetáttal precipitáltuk, majd -20°C-os Laemmli pufferben oldott acetonnal 3x mostuk. Az így elkészített mintákat 10%-os SDS-poliakrilamid gélen megfuttattuk, majd a fehérjét Protran nitrocellulóz membránra blottoltuk. Szárítás, majd 2 órás, 3%-os nem-zsíros tejben való 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-3 $\beta$ , phospho-GSK-3 $\beta$  (Ser9), phospho-Akt (S473), total Akt, total-NF- $\kappa$ B, phospho-NF- $\kappa$ B (Ser536) (minden esetben 1:1000 hígítás; Cell Signaling Technology, Beverly, USA). Inkubálást követően mosás 6 x 5 percen keresztül (TRIS és 0,2% Tween tartalmazó izotóniás sóoldattal pH:7,5) majd a nitrocellulóz membránokat két órán keresztül, szobahőmérsékleten kecske anti-nyúl HRP-konjugált (1:3000 hígítás; BioRad, Budapest, Magyarország) második antitestet tartalmazó oldatban inkubáltuk. Újabb mosás után az antigén-antitest komplexek jelenlétét ECL (enhanced chemiluminescence) módszer segítségével tettük láthatóvá ECL immunoblotting detection system (Amersham Biosciences) segítségével. A kopott filmeket komputeres szkennelést követően kiértékeltek, mely során az immunpozitivitás pixeldenzitását ImageJ 1.40 szoftver segítségével értékeltük.

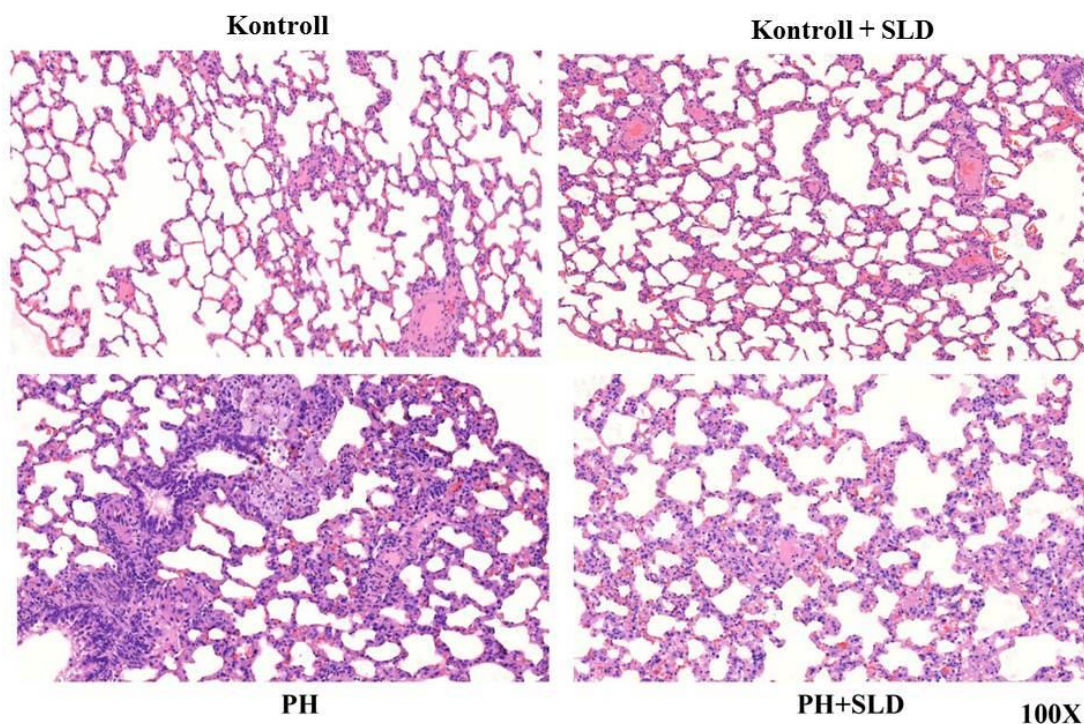
## **Statisztikai elemzés**

A kapott számadatok kielemezéséhez SPSS 20.0 programot alkalmazva, egyutas Anova tesztet használtunk posthoc Bonferroni analízissel, a normalitás tesztet pedig Kolmogorov-Smirnov tesztel végeztük el. A szignifikancia szintet  $p < 0,05$ -tel határoztuk meg.

## ***Eredmények***

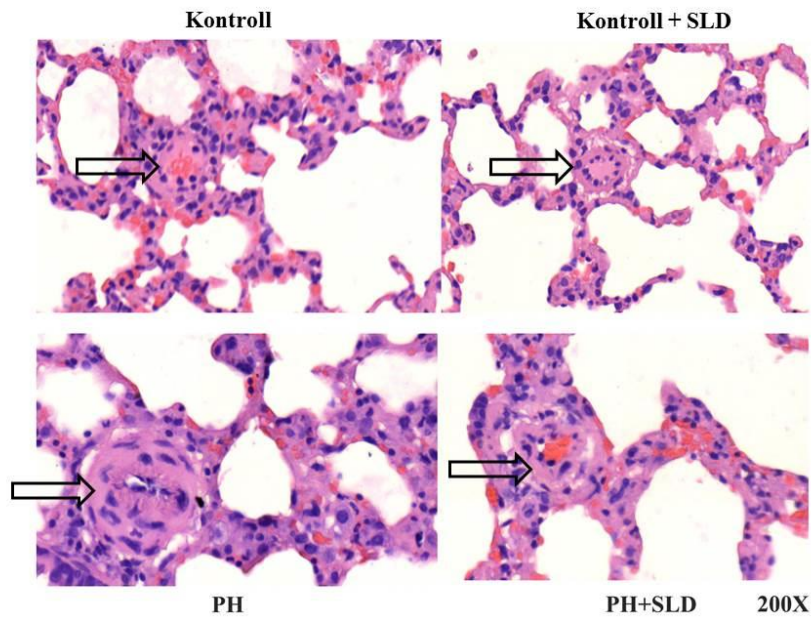
### **Sildenafil kezelés hatására bekövetkező változások a tüdőszövetben**

A tüdőszöveti metszetek 100x-os nagyítású hematoxin-eozin képeit a 3. ábra mutatja.



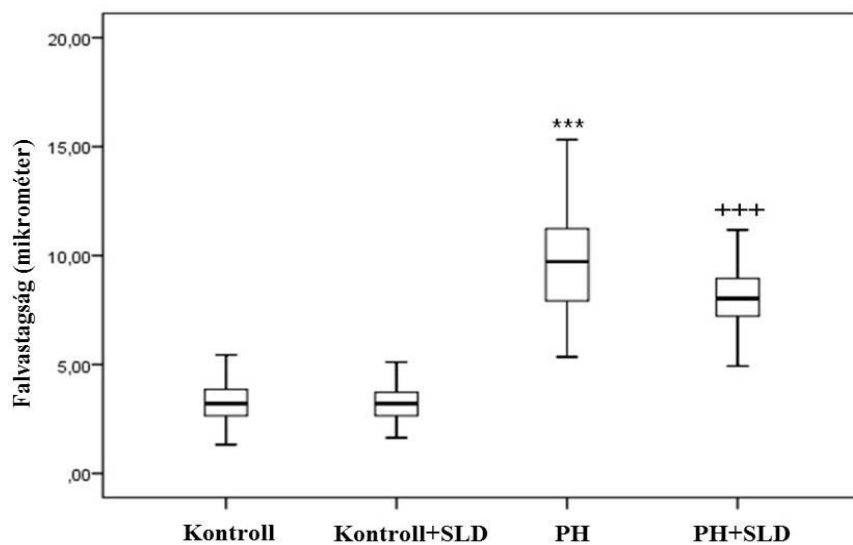
**1. ábra** Patkány tüdőszövetek vizsgálata, 100x-os nagyítás

*A kis nagyítású metszeteken is kiválóan megfigyelhető a különbség a kontroll állatok, a monokrotalin indukálta pulmonális hipertenzív csoport, illetve azon állatok között, amelyek sildenafil terápiában részesültek.*



4. ábra: A vaszkuláris remodeláció és az artériák lumenének szűkülete, 200x-os nagyítás

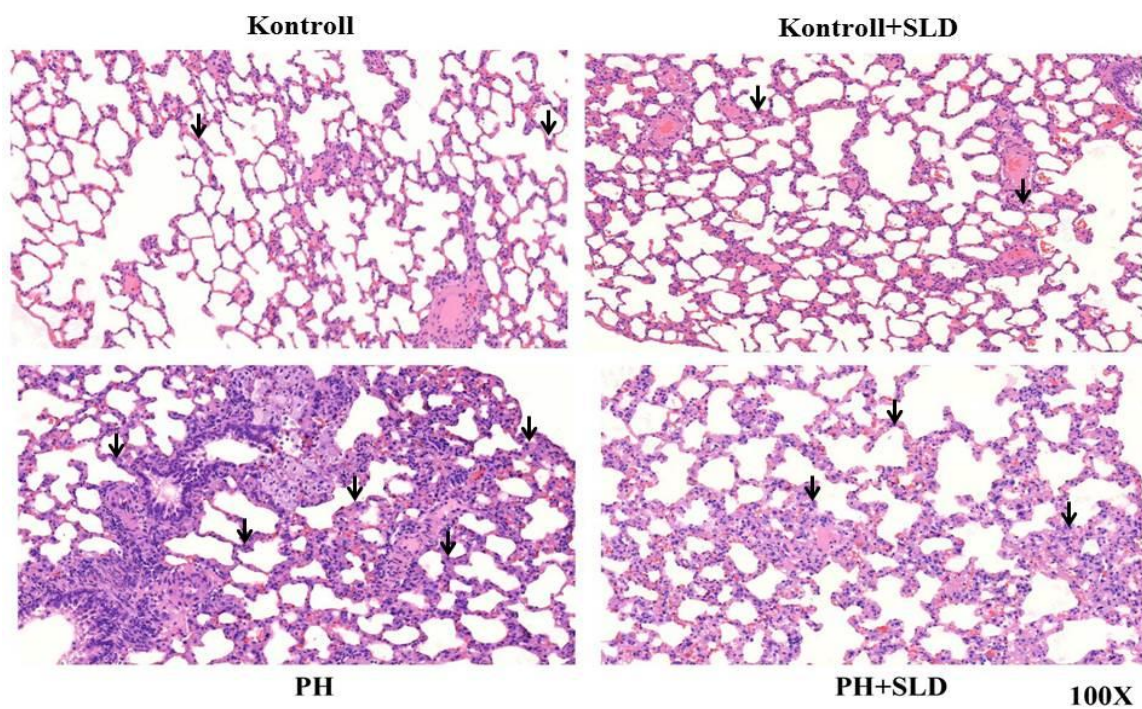
Az alveolusok falvastagságának változását az 1. diagram szemlélteti.



1. Diagram: Alveolus falvastagság változása a kórképben és a terápia hatására

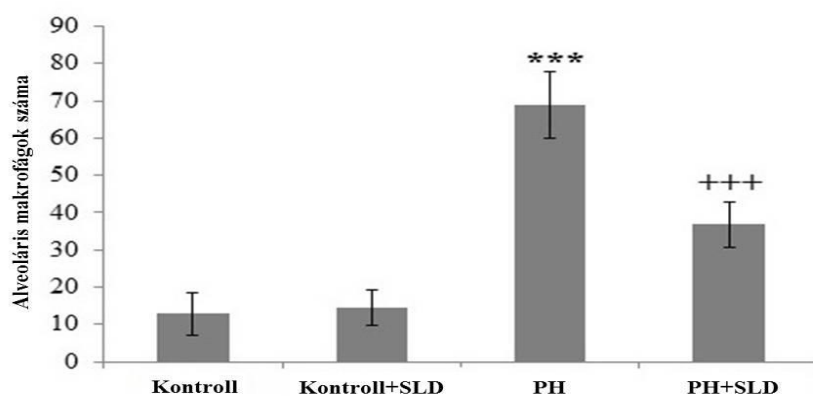
\*\*\*: szignifikáns változás a kontroll csoporthoz képest; +++: szignifikáns változás a PH csoporthoz képest ( $p < 0,05$ )





*5. Ábra. Makrofágok a patkány tüdőszöveteken*

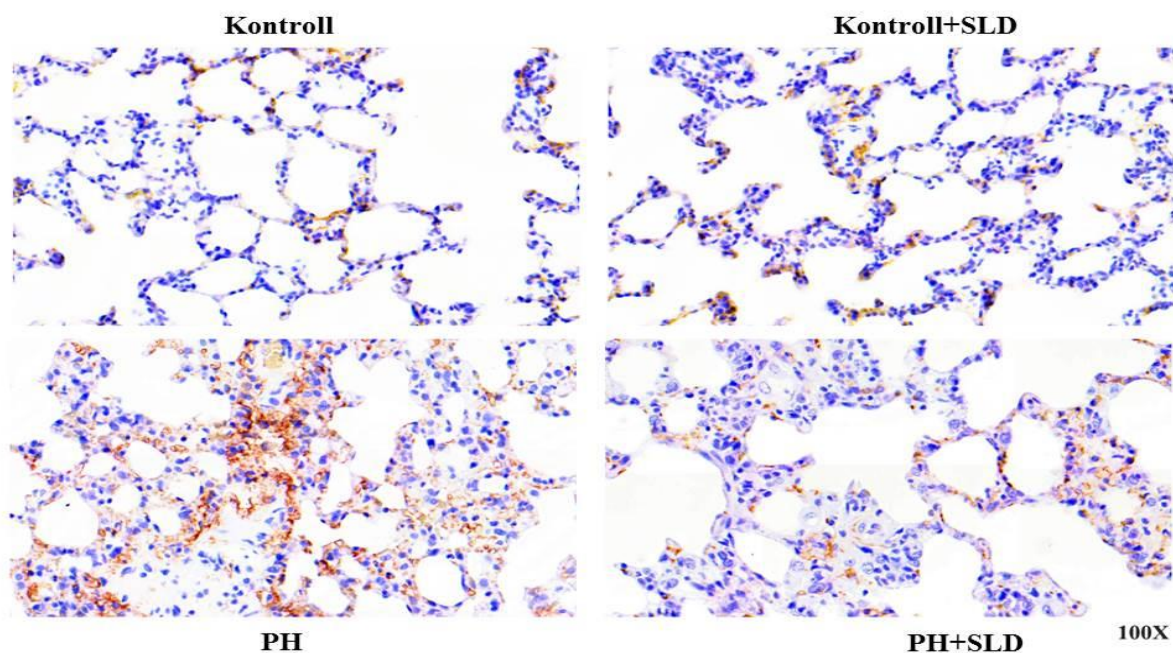
Az alveoláris makrofágok számának változását a 2. diagram mutatja



2. diagram: Alveoláris makrofágok darabszáma látóterenként,  
20 látótérben megszámlálva és átlagolva.

\*\*\*: szignifikáns változás a kontroll csoporthoz képest; ++++: szignifikáns változás a PH csoporthoz képest ( $p < 0,05$ )

A vaszkularizációt és vaszkuláris remodellinget mutató CD34 immunhisztokémia eredményeit a 6. ábra mutatja.



**6. ábra CD34 immunhisztokémiai vizsgálat patkány MCT modellben**

A kontroll csoport patkányaiból nyert mintákban láthatóak normál alveolusok, bronhiolusok normális, ép epitheliummal (3. ábra). Az alveolusok falvastagsága  $3,31 \pm 0,88 \mu\text{m}$ -nek mutatkozott (1. diagram). A vaszkularizációt és vaszkuláris remodellinget mutató CD34 immunhisztokémiai vizsgálat (6. ábra) gyenge, sporadikus pozitivitást mutatott. A sildenafil kezelés önmagában sem az alveolusok falvastagságában, sem a makrofág infiltráció mértékében nem okozott változást. (1. és 2. diagram, 5. ábra). Az MCT kezelés hatására a jellegzetes elváltozások láthatóak, így megvastagodott érfalak, gyulladásos sejtek toborzásának, migrációjának eredményeként azok tömeges megjelenése, illetve az alveolus falak megvastagodása (1. diagram) a pulmonális hipertenzív patkányokban. Míg a kontroll csoport képein az alveolus falak normálisan egy réteget képeznek, addig a beteg patkányokban 3-4 rétegre vastagszanak meg. 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 mutatja a muszkuláris artériák és arteriolák intimális és média hipertrófiája. A makrofágok kifejezett számbeli növekedése, infiltrációja szintén megfigyelhető MCT kezelés hatására (5. ábra, 2. diagram). A fenti jelenségek oka, hogy olyan biokémiai útvonalak aktiválódnak, melyek hatására fokozódik bizonyos citokinek és kemokinek termelése, ezek hatására a szövetek közé



történő fehérvérsejt extravazáció és a kötőszövetek mennyiségének következményes felszaporodása jön létre. A gyulladás helyére vándorolt makrofágok szöveti alveoláris makrofágokká alakulnak miután elhagyták az ér pályát és a kötőszövetek közé vándoroltak. Ezek a sejtek a mononukleáris fagocita rendszer tagjai és amellet, hogy feladatuk a kolloidális vagy finoman szemcsés anyagok bekebelezése, amikor nagyobb méretű idegentesttel találkoznak, összeolvadnak és többmagvú sejteket ún. idegentest-óriássejteket alkotnak. A tüdőszövetben ez a folyamat is súlyosbíthatja a patológiai folyamatokat, mivel kevesebb hely marad a szerv eredeti céljának megvalósítására, az alveolusok levegővel való megtöltésére, így tovább növekszik az oxigén és a szén-dioxid számára megteendő diffúziós távolság. A 200x-os nagyítású metszeteken (4. ábra) egy-egy artéria részletei láthatóak. A monokrotalin toxicitása miatt csökken az artériák lumenének átmérője, mivel a nagy mennyiségű kötőszövet felszaporodás által az erek mediája is megvastagszik. A sztenózis felgyorsult vérkeringéssel jár, ezáltal is gátat szabva a légzési gázok diffúziójának. Emellet pedig a vaszkuláris remodeláció kialakulása és artériák lumenének szűkülete miatt a vaszkuláris rezisztencia fokozódik, így a kisvérköri nyomás emelkedése jön létre.

Már a kisebb nagyítású metszeteken is feltűnő a sildenafil terápia hatásossága, így a monokrotalin indukálta fent ismertetett patológiás folyamatok és jelenségek szignifikánsan szuppresszáálódtak. A sildenafille 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. Az artériák lumenében ismét megjelennek a kontroll csoportban is látható vörösvértestek.

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 a z IL-1 $\alpha$ , CINC-1, CINC-2, LIX, MIG, MIP-1 $\alpha$  és a MIP-3 $\alpha$ . A citokinek meghatározó szerepet töltenek be a gyulladás folyamatában, a gyulladásos sejtek toborzásában, illetve aktivációjában. Számos korábbi tanulmány kiemelte már az **Interleukin-1 (IL-1)** és **-6 (IL-6)** szerepét a pulmonális hipertenzió patogenezisében. Ezek a

proinflammatorikus citokinek, amelyeket főként aktivált makrofágok, neutrofil granulociták, epiteliális és endoteliális sejtek termelnek, indítják el a gyulladásos választ és az oxidatív stressz folyamatát.

A **makrofág inflammatorikus protein (MIP)** a makrofágok által aktiválódott granulociták és limfociták termelik, és hatására fokozódik további különböző proinflammatorikus citokinek szintézise, így az IL-1 és IL-6, vagy a tumor nekrosis faktor alfa (TNF- $\alpha$ ), melyek kiemelt szerepet játszanak a pulmonális hipertenzió patogenezisében.

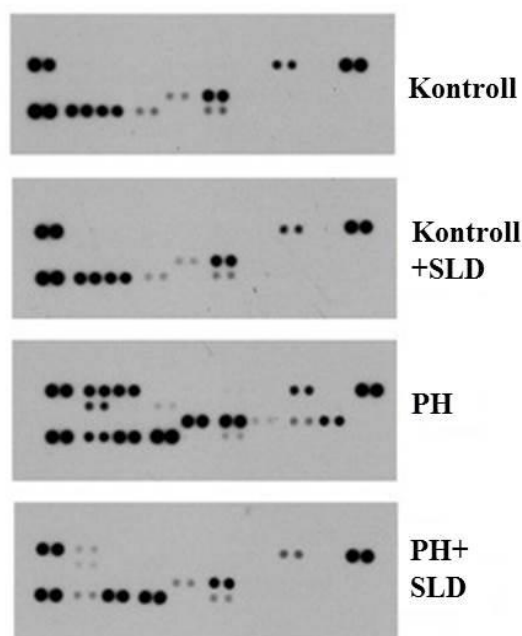
A **citokin indukálta neutrofil kemoattraktáns-1 (CINC-1)**: Ahogy neve is mutatja, a neutrofil granulociták vonzásáért felelős. Makrofágok, neutrofil granulociták és epiteliális sejtek expresszálják. Elősegíti a sejtkárosodást a tüdőszövetben. Korábbi tanulmányok már kimutatták, hogy a CINC-1 szérumszintje jó korrelációt mutat a tüdőszöveti koncentrációjával, így felveti egy kiváló korai szöveti marker szerepét a szöveti gyulladás és sérülés jelzésében.

A **citokin indukálta neutrofil kemoattraktáns-2 (CINC-2)**: Más néven makrofág inflammációs protein 2-alfa (MIP2- $\alpha$ ). Hasonlóan a CINC-1-hez neutrofil attraktáns, ezen felül kemotaktikus hatású a hemopoetikus őssejtek számára is. A monociták és makrofágok szekretálják.

A **lipopoliszacharid indukálta CXC kemokin (LIX)** egy II-es típusú alveoláris epithel sejtek által termelt kemokin, melynek expresszióját a nukleáris faktor kappa B (NF- $\kappa$ B) regulálja. Aktiválja az IL-1 és TNF- $\alpha$ . Ez a molekula facilitálja a neutrofil granulociták toborzását, így segítve elő az oxidatív stressz indukálta sérüléseket. Szerepe van a kötőszöveti remodelációban, a neutrofil homeosztázisban. Protektív hatású atheroszklerózisban, kontrollálja a makrofágokból történő habos sejt kialakulást.

Az **interferon gamma indukálta monokin (MIG)**: Más néven CXCL9 egy másik, kisméretű pulmonális hipertóniában túlexpresszált, a mononukleáris sejtekre, T-sejtekre nézve effektív kemoattraktáns a CXC kemokin családból, mely az IFN- $\gamma$  hatására termelődik. A MIG, a CXCL10 és CXCL11 mind a CXCR3 kemokin receptoron keresztül fejtik ki kemotaktikus hatásukat [78]. Ez a molekula is a sejthalált facilitálja. Az MMP-8 a MIG-et és a CXCL10-et két pozícióban hasítja, ezáltal bontja. Az MMP 9 szintén hasítja a MIG-et 3 különböző helyen, a karboxi-terminális régióban.

A különböző citokinek MCT, majd sildenafil kezelés hatására bekövetkező változásait a 7. ábra és a 3-8 diagramok mutatják.

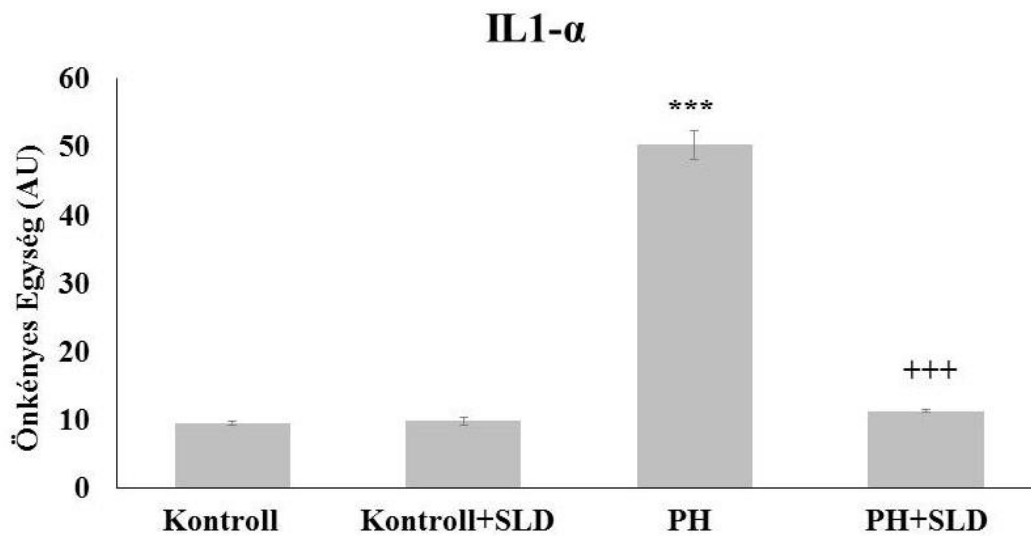


7.ábra: Patkány citokin array panel, melyen a különböző pontok az egyes citokinek / kemokinek jelölik

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

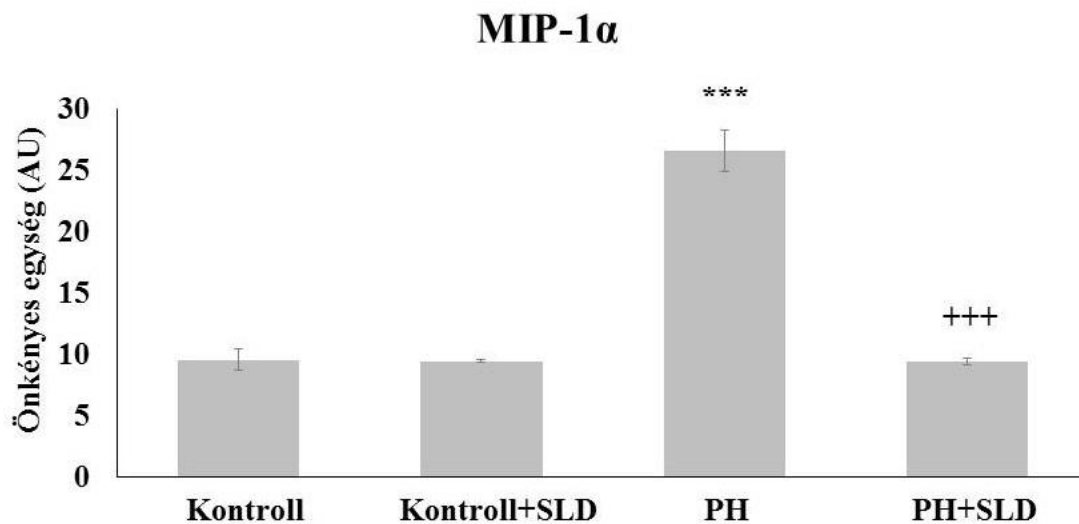
5. táblázat A patkány citokin array panel értelmezését segítő táblázat

A pirossal 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 kékkel jelölt citokinek esetében a pontok denzitása magasabb volt a kontroll csoportban, mint a PH csoportban. A feketével jelölt citokinek esetén nem tapasztaltunk változást.



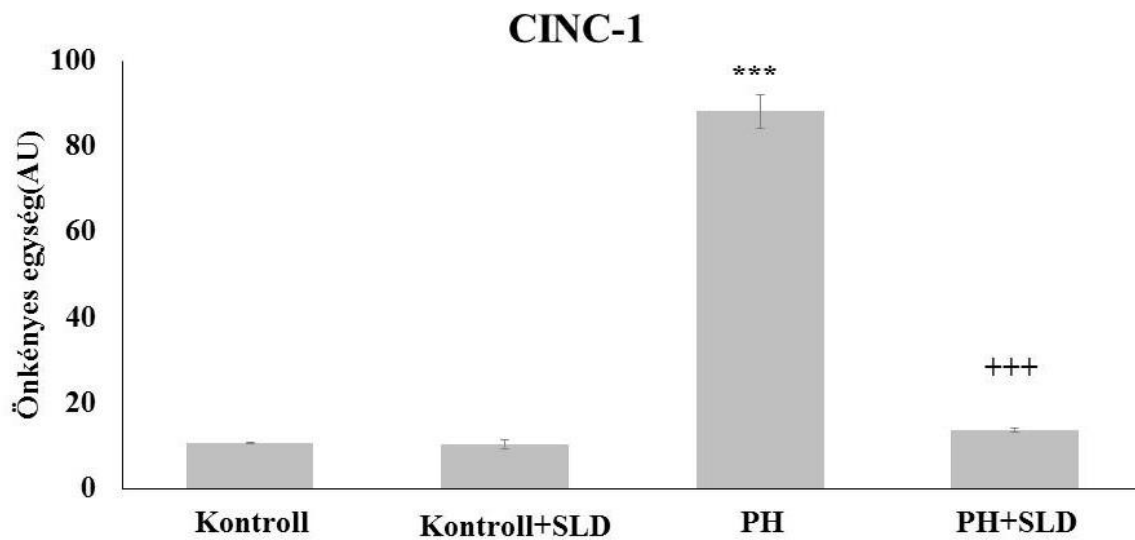
3. diagram: Az IL1- $\alpha$  szintjének változása a kórképben és a terápia hatására.

\*\*\*: szignifikáns változás a kontroll csoporthoz képest; +++: szignifikáns változás a PH csoporthoz képest ( $p < 0,05$ )



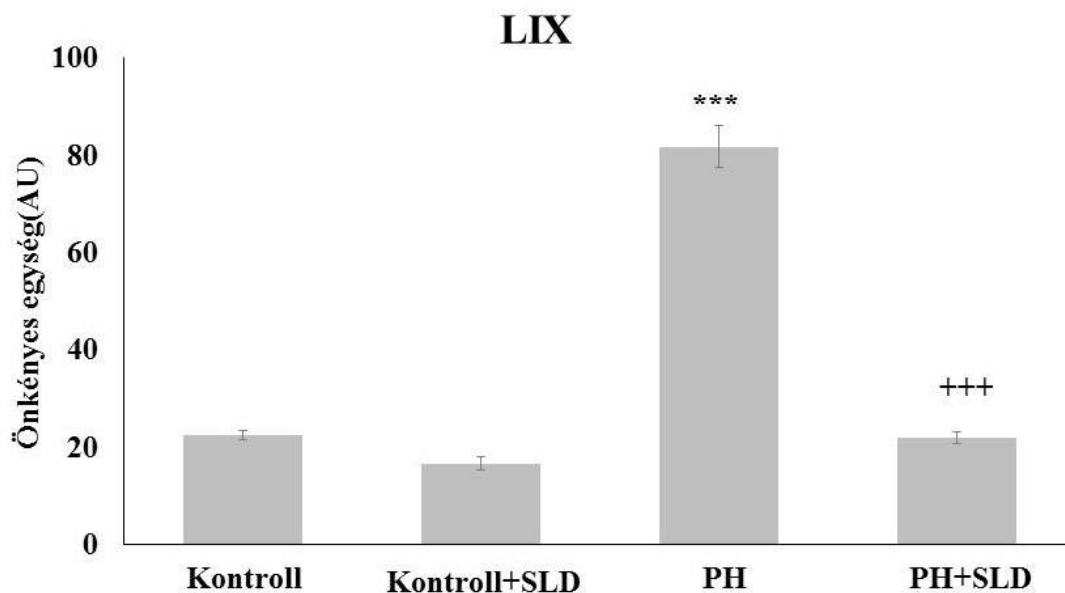
4. diagram: A MIP-1 $\alpha$  szintjének változása a kórképben és a terápia hatására.

\*\*\*: szignifikáns változás a kontroll csoporthoz képest; +++: szignifikáns változás a PH csoporthoz képest ( $p < 0,05$ )



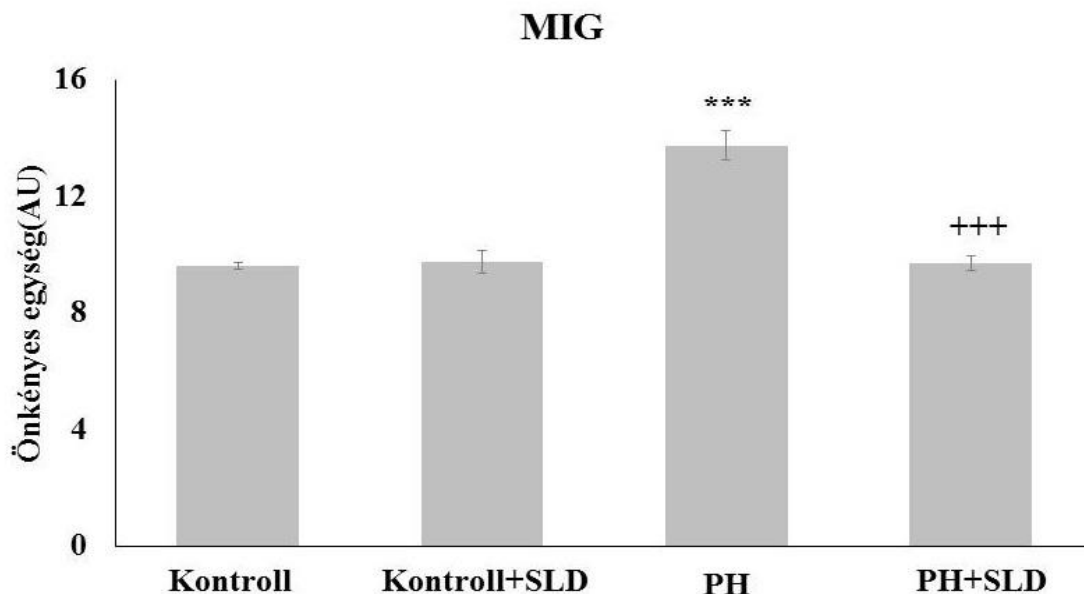
5. diagram: A CINC-1 szintjének változása a kórképben és a terápia hatására.

\*\*\*: szignifikáns változás a kontroll csoporthoz képest; +++: szignifikáns változás a PH csoporthoz képest ( $p < 0,05$ )



5. diagram: A LIX szintjének változása a kórképben és a terápia hatására.

\*\*\*: szignifikáns változás a kontroll csoporthoz képest; +++: szignifikáns változás a PH csoporthoz képest ( $p < 0,05$ )



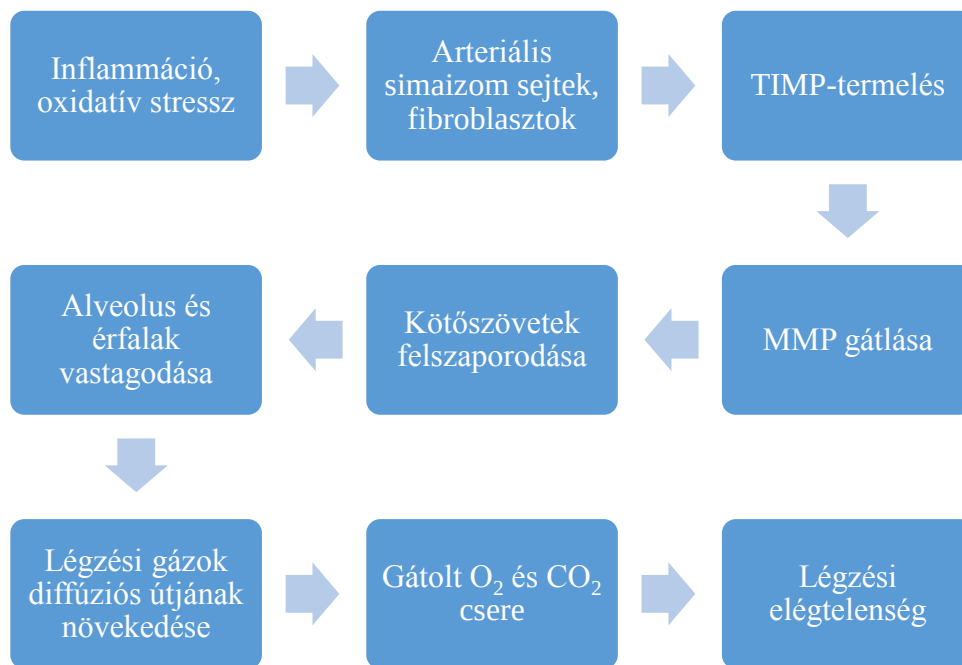
6. diagram: A MIG szintjének változása a kórképben és a terápia hatására.

\*\*\*: szignifikáns változás a kontroll csoporthoz képest; +++: szignifikáns változás a PH csoporthoz képest ( $p < 0,05$ )

Összefoglalva elmondható, hogy míg az oxidatív stressz és a következményes gyulladás miatt jelentősen megnő a citokinek, illetve kemokinek produkciója, amely nem csupán a kiinduló pontja a kórképnek, de tovább is súlyosbítja azt. Sildenafil hatására szignifikáns csökkenés tapasztalható ezekben a változásokban. Ezáltal igazolható a sildenafil jótékony, antiinflammatorikus hatása.

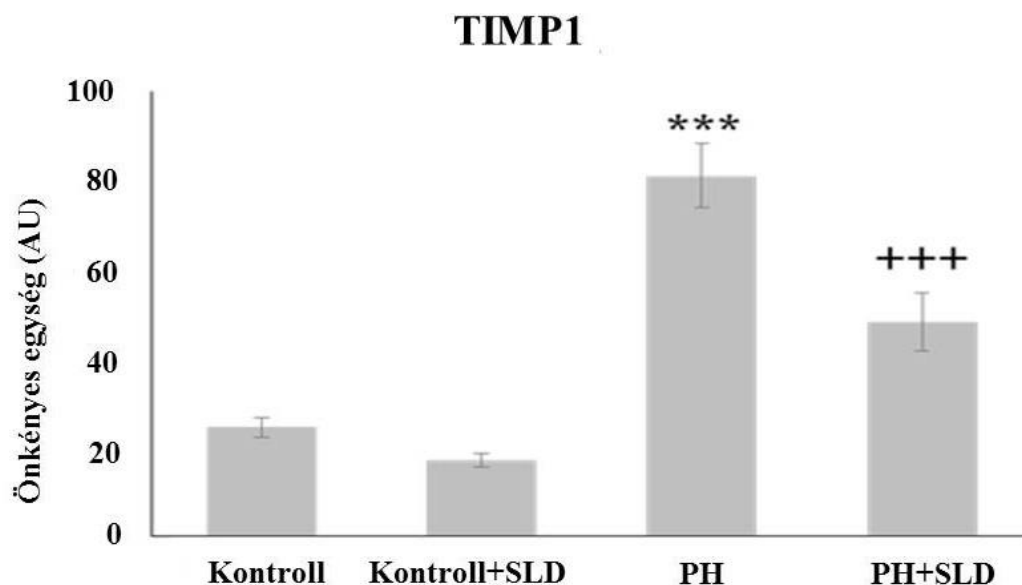
A vaszkuláris remodeláció a pulmonális artériákban karakterisztikus patológiai elváltozás pulmonális hipertóniában. A folyamat lényege, hogy az extracelluláris mátrix (ECM) proteolízisének és szintézisének komplex egyensúlya felborul. Míg a mátrix metalloproteinázok (MMP-k) a kötőszövetek lebomlásáért felelősek, addig a szöveti metalloproteináz inhibitorok (TIMP) ezen enzimek gátlását végzik. Mivel az inflammáció és az oxidatív stressz hatására az arteriális simaizom sejtek és a fibroblasztok elkezdik fokozottan termelni a TIMP-at, ez a gátló molekula pedig legátolja a MMP-kat, így az enzimek képtelenek lesznek lebontani a kötőszöveteket. Ezáltal az ECM szintézise kórosan túlsúlyba kerül annak proteolízisével szemben, így a tüdőben, az alveolus- és érfalakban

felhalmozódott nagy mennyiségű kötőszövet megakadályozza az oxigén és a széndioxid diffúzióját. A folyamatot a 8. ábra mutatja be.



**8. ábra:** A megnövekedett TIMP-termelés kiemelt szerepe a pulmonális hipertenzió kialakulásában.

Azáltal, hogy a sildenafil szignifikánsan csökkentette a TIMP szintjét, képes volt legátolni ezt a folyamatot, ezzel elősegíthette a légzési gázok diffúzióját. A TIMP változását MCT és sildenafil hatására a 8. diagram mutatja.



7. diagram: A szöveti metalloproteináz inhibitor-1 (TIMP-1) szintjének változása pulmonális hipertenzióban és sildenafil kezelés hatására

\*\*\*: szignifikáns változás a kontroll csoporthoz képest; +++: szignifikáns változás a PH csoporthoz képest ( $p < 0,05$ )

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

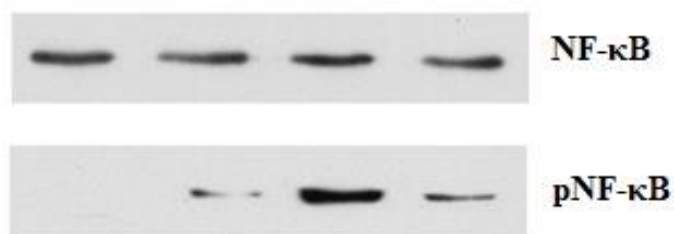
A legtöbb korábban említett MCT kezelésre indukálódott citokin expressziója az NF- $\kappa$ B transzkripció faktor által regulált (pl. LIX, IL-1) [79]. Az NF- $\kappa$ B olyan molekulák termelését is serkenti, melyek a gyulladásban adhéziós faktorokként funkcionálnak, ezáltal elősegítik a különböző gyulladásos sejtek kitapadását majd extravazációját. Ilyen molekula pl. az ICAM-1 [80].

Amíg nem áll elő az oxidatív stressz állapota, az NF- $\kappa$ B egy gátló molekulával képez komplexet a citoplazmában, az I $\kappa$ B-vel (kappa B Inhibitor). Amikor hipoxia alakul ki, aktiválódik a MAPK-kaszád, az I $\kappa$ B-kinázt is beleértve, amely enzim foszforilálja az I $\kappa$ B-t. Mivel ez a komplex szétesését okozza, az NF- $\kappa$ B gátlása és ez által a maszkolása is megszűnik, a molekula foszforilálódik, ami egy intranukleáris transzlokációs szignál az NF- $\kappa$ B számára [81-83].

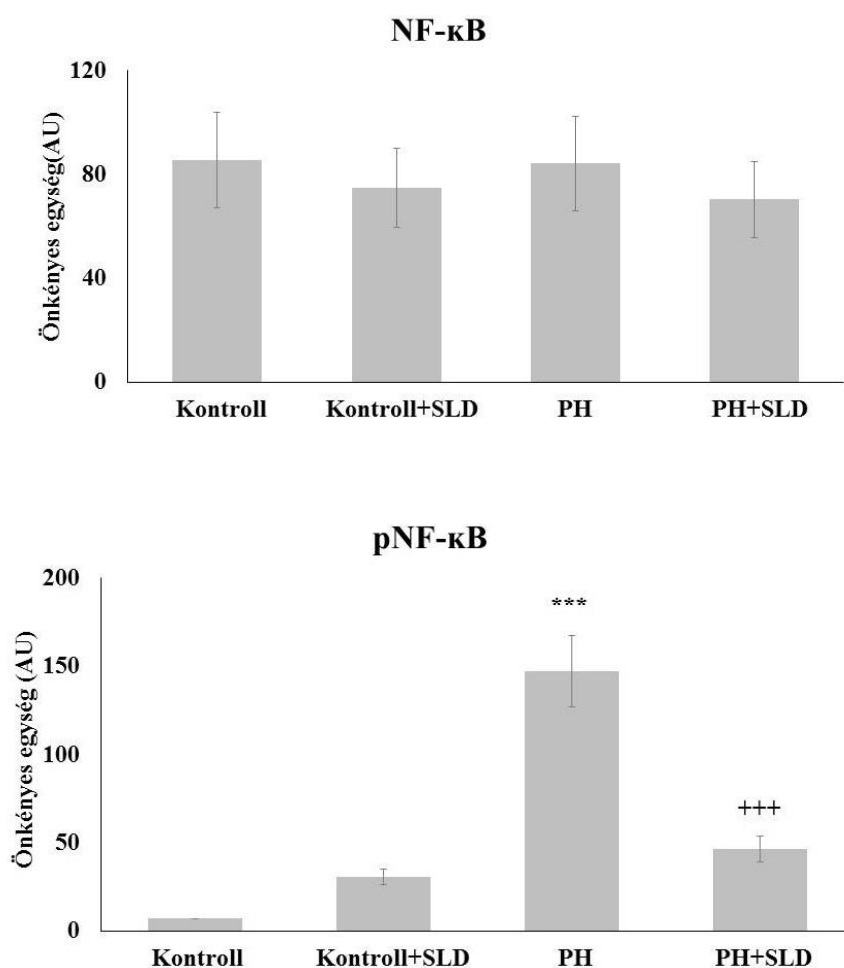
Kísérleteink során az NF- $\kappa$ B aktivációját immunhisztokémiai módszerrel és Western- blot analízissel vizsgáltuk foszfo-NF- $\kappa$ B p65 specifikus primér antitest felhasználásával. A



Western blot vizsgálat eredményét a 9. ábra és 9. diagram, az immunhisztokémiai vizsgálat eredményét a 10. ábra mutatja.

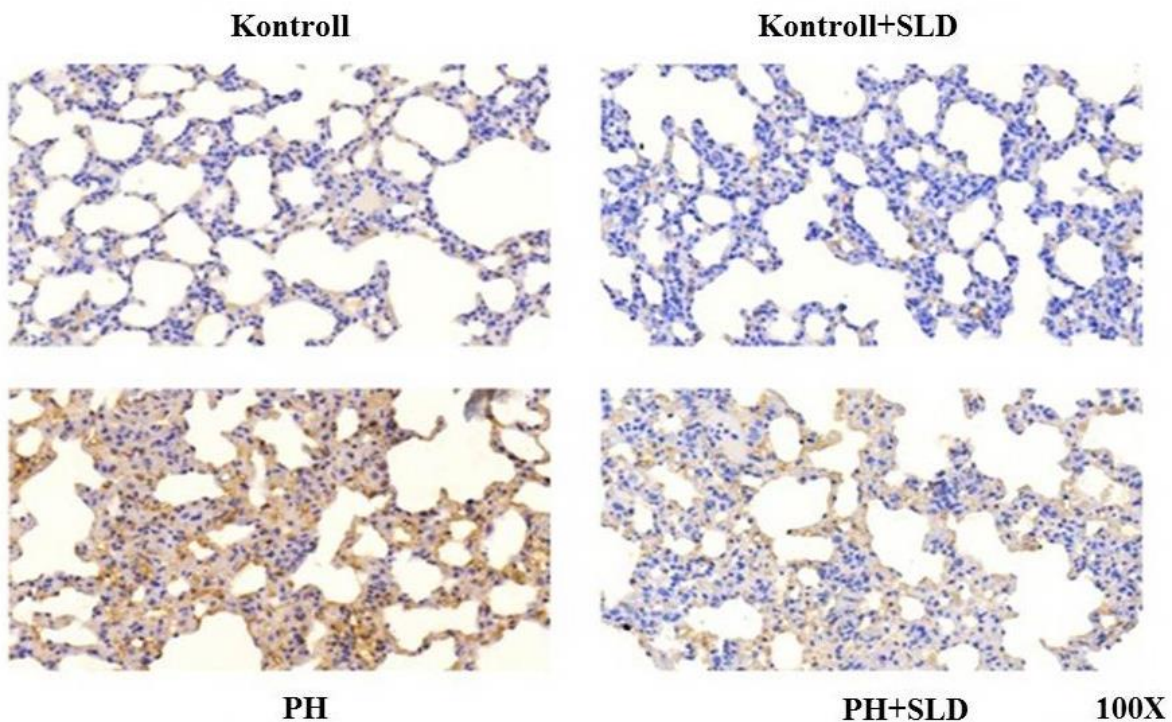


9. ábra: Az NF- $\kappa$ B aktivációjának változása MCT indukálta pulmonális hipertóniában és sildenafil terápia hatására tüdőszövet homogenizátumból Western blottal.



8. diagram: Az NF- $\kappa$ B aktivációjának kvantifikált változása MCT indukálta pulmonális hipertóniában és sildenafil terápia hatására tüdőszövet homogenizátumból Western blottal.

\*\*\*: szignifikáns változás a kontroll csoporthoz képest; +++: szignifikáns változás a PH csoporthoz képest ( $p < 0,05$ )



9. ábra: A sildenafil kezelés hatása az NF- $\kappa$ B aktivációra és nukleáris transzlokációjára MCT indukálta pulmonális hipertóniában. Immunhisztokémiai vizsgálat foszfo-NF- $\kappa$ B p65 specifikus elsődleges antitesttel. 100x-os nagyítású fénymikroszkópos felvétel.

A barna színnel jelölt, nukleuszba transzlokálódott pNF- $\kappa$ B jelentős aktivitást mutat a pulmonális hipertenzív patkányok tüdőszövetében. A terápia hatására gátlódott az NF- $\kappa$ B transzlokációja, így annak aktiválása is.

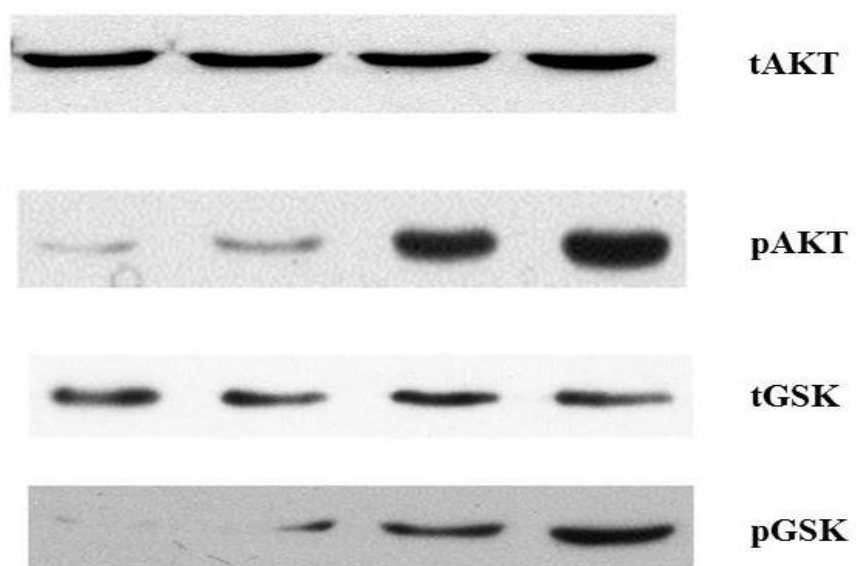
A foszfo- NF- $\kappa$ B p65 specifikus elsődleges antitesttel végzett immunoblotting során a kontroll csoportban sporadikusan megjelenő, gyenge háttér aktivitást mértünk. A sejtmagok csupán igen kis hányada mutatott az NF- $\kappa$ B nukleáris transzlokációjára utaló erős pozitív festődést. A sildenafil 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 figyeeltük 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 gátlódik, a

komplex a citoplazmában marad. A különböző proinflammatorikus proteinek, növekedési faktorok és apoptózis reguláló fehérjék mRNS-ének translációja pedig pNF- $\kappa$ B dependens génexpressziós folyamat, azonban egy igen fontos szabályozó molekula hiányában nem jöhet létre.

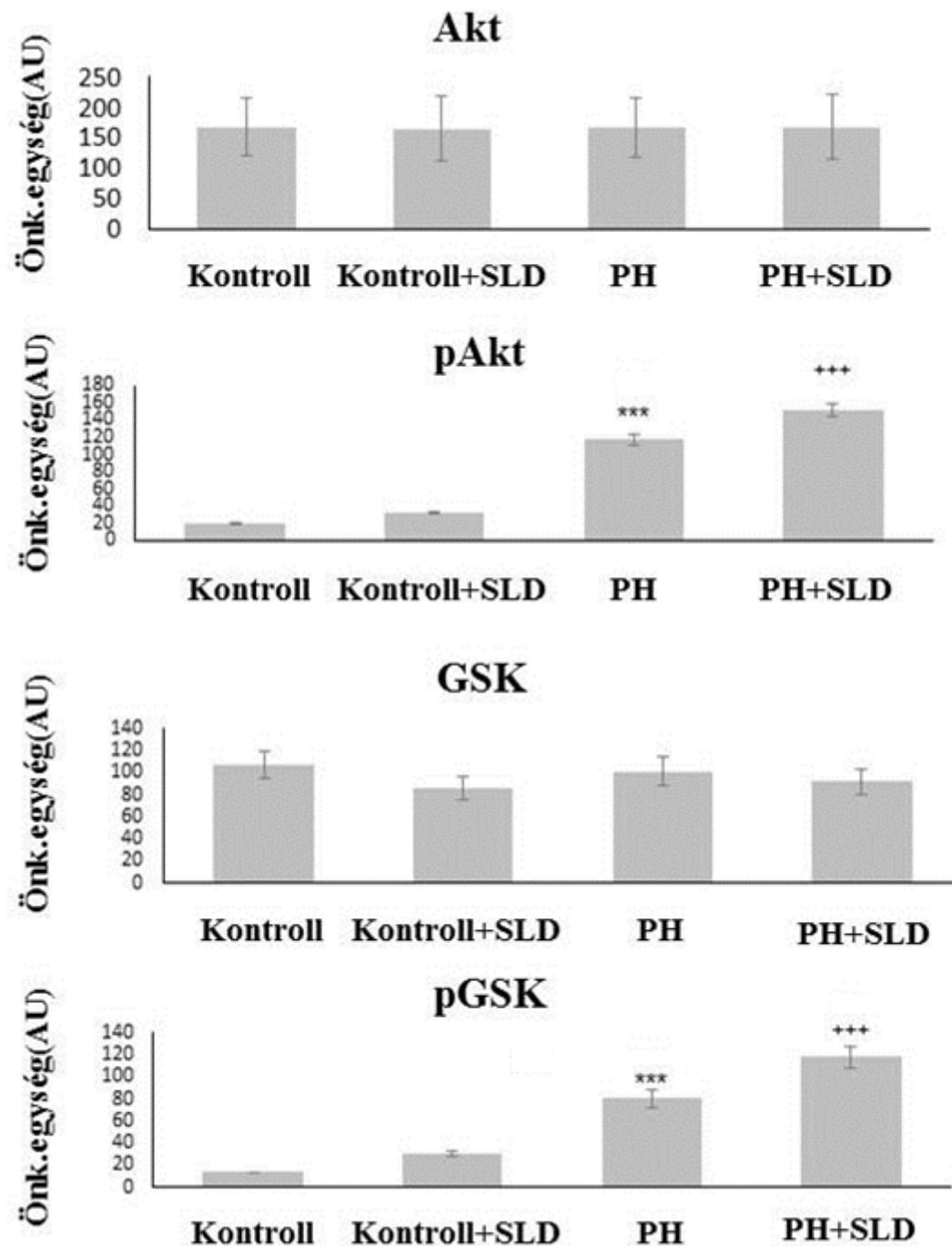
### **Sildenafil kezelés hatása a PI-3K-Akt és MAPK szignáltranszdukciós útvonalra**

Az NF- $\kappa$ B aktivációja különböző kináz típusú jelátviteli utakon keresztül szabályozott, így a PI-3K-Akt és MAPK útvonalon keresztül [84]. Ezen jelátviteli utak aktivációjának vizsgálatára foszforiláció-specifikus antitestek felhasználásával Western blot vizsgálatot végeztünk.

Az Akt molekula kiemelt szerepet játszik a sejtek túlélésében, a sejtek növekedésében és proliferációjában, a sejtmigrációban. Emellett fontos fehérje a vaszkuláris remodeláció folyamatában is [85]. Mivel a pAkt indukálja az endoteliális nitrogén-monoxid szintáz (eNOS), a nitrogén-monoxid a fokozott termelődése után elősegíti a simaizom relaxációt, így a vazodilatációt, amely folyamat hozzájárul ismételten az oxigén/szén-dioxid cseréhez, tehát javul a tüdőben az oxigén ellátás. Az Akt aktivációjának változását foszforiláció-specifikus primér antitestek felhasználásával Western blottal vizsgáltuk. A vizsgálatok eredményét a 11. ábra és a 10. diagram mutatja.



*11. ábra: Az Akt szignáltranszdukciós útvonal aktiválódásának vizsgálata Western blottal.*



10. diagram: Az Akt/GSK immunoblot eredményei kvantifikálva

\*\*\*: szignifikáns változás a kontroll csoporthoz képest; +++: szignifikáns változás a PH csoporthoz képest ( $p < 0,05$ )

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 (11. Ábra). Belső kontrollként nem foszforilált Akt antitestet alkalmaztunk, a különböző csoportok fehérjetartalma nem különbözik egymástól jelentős mértékben (11. Ábra).

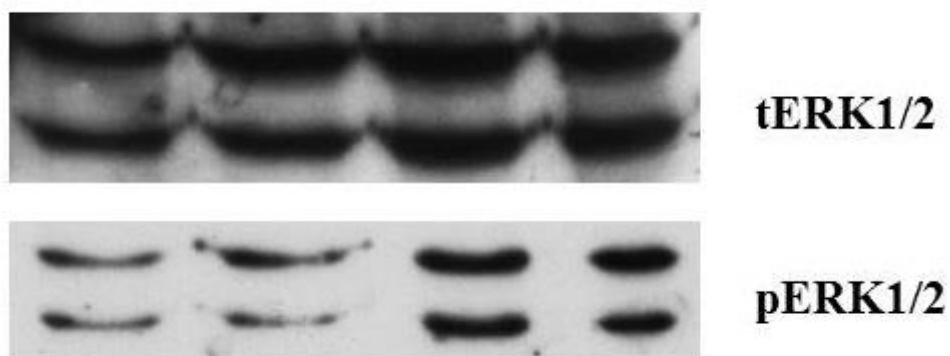
Az Akt downstream targetjének a glikogén szintáz kináz (GSK)-3 $\beta$ -nak a foszforilációja az Akt-hoz hasonló képet mutatott. Az aktivált Akt szuppresszálja a GSK-t, mivel foszforilálja és így inaktíválja azt (pGSK), ezáltal pedig a túlélés szempontjából kedvezően befolyásolja a sejtek metabolikus adaptációját [86]. Így a tüdőszöveti sejtek számára felhasználható energia mennyisége megnövelhető. A GSK aktivációjának vizsgálatára szintén foszforiláció-specifikus primér antitesteket használtunk, melyekkel Western blot analízist végeztünk. Az eredményeket a 11. ábra és a 10. diagram mutatja.

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.

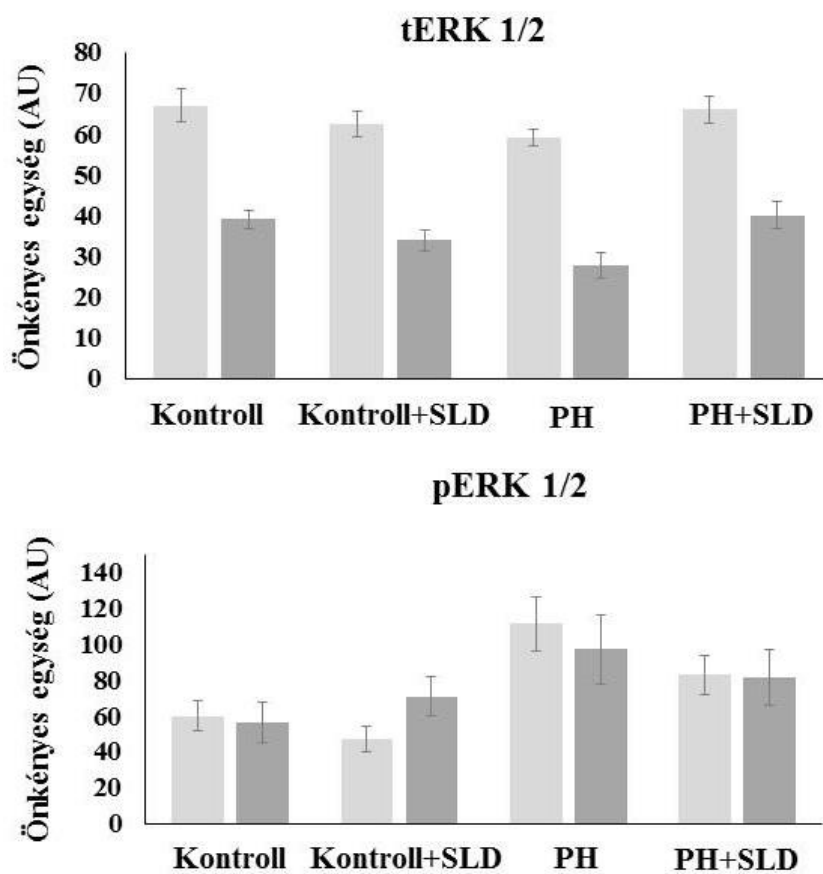
Mai ismereteink szerint a cGMP az ERK1/2 és p38 MAPK által regulált [87]. Előbbi az extracelluláris szignál regulálta kináz 1 és 2 (ERK1/2) fontos szerepet tölt be a pulmonális hipertenzió patogenezisében, az aktiválása pedig szükséges a pulmonális vaszkuláris remodeláció, a jobb kamrai nyomás emelkedés és a jobb szívfél hipertrófia prevenciójában [88]. Utóbbi a MAP kinázok családjába tartozó molekula, amelyek számos fontos transzkripciós faktor, enzim és más kinázok foszforilációjáért felelősek, ezáltal befolyásolva a sejtproliferációt, differenciációt, túlélést, apoptózist és inflammatórikus folyamatokat, valamint a vaszkuláris remodelációt is [88-90]. A p38MAPK esetében a foszforilált forma, a pp38MAPK az aktív alak.

Kísérleteink során megvizsgáltuk az MCT és a sildenafil ezekre kifejtett hatását.

Az ERK1/2 vizsgálatok eredményét a 12. ábra és a 11. diagram mutatja.



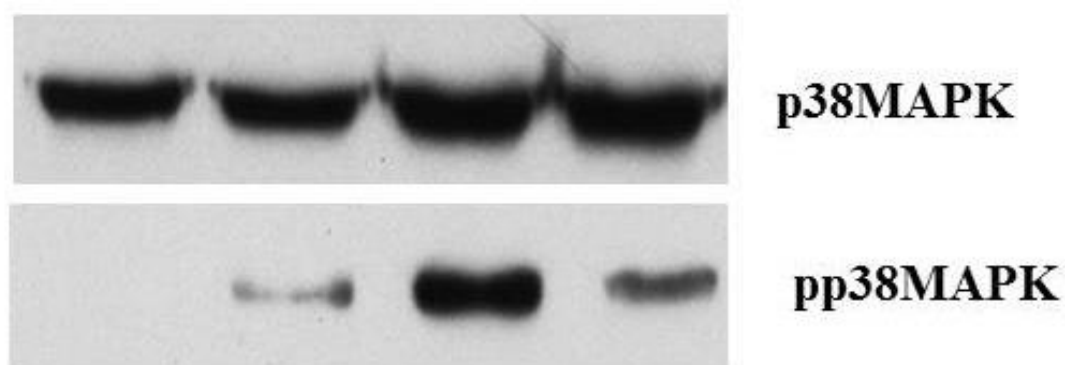
12. ábra. Az ERK1 és ERK2 jelátviteli útvonal vizsgálata Western blottal



11. diagram: Az ERK1 és ERK2 immunoblot eredményei kvantifikálva

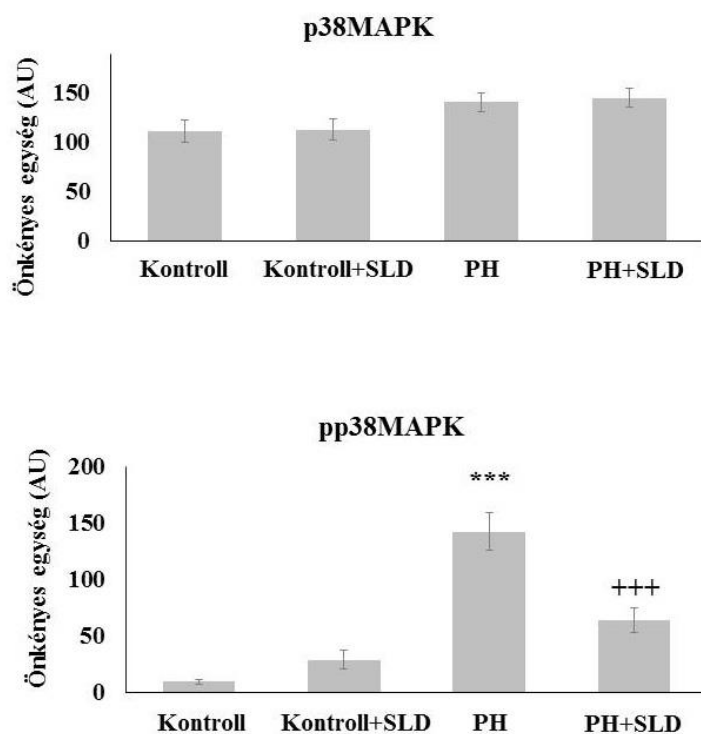
A kontroll állatok tüdejében az ERK 1 és ERK 2 foszforilációja mind sildenafil kezelés nélkül, mind sildenafil kezeléssel csupán enyhe fokot mutatott. Az MCT indukálta modellben a foszforilált ERK1 és 2 (pERK 1 és 2) szintje jelentősen emelkedett, a sildenafil képes legátolni az ERK foszforiláció megnövekedett expresszióját, tehát indukálja az ERK szignáltranszdukciós útvonalat, amely a legfontosabb jelátviteli molekula a sejt túlélés biokémiai útvonalában. Ez utóbbi jelenségek bár az oszlopdiagramok alapján szembetűnőek, statisztikai elemzés során a szignifikancia szintjét nem érték le.

A p38 MAPK aktivációjának változásait a 13. ábra és a 12. diagram mutatja.



**13. ábra: p38MAPK jelátviteli útvonalak vizsgálata Western blottal**





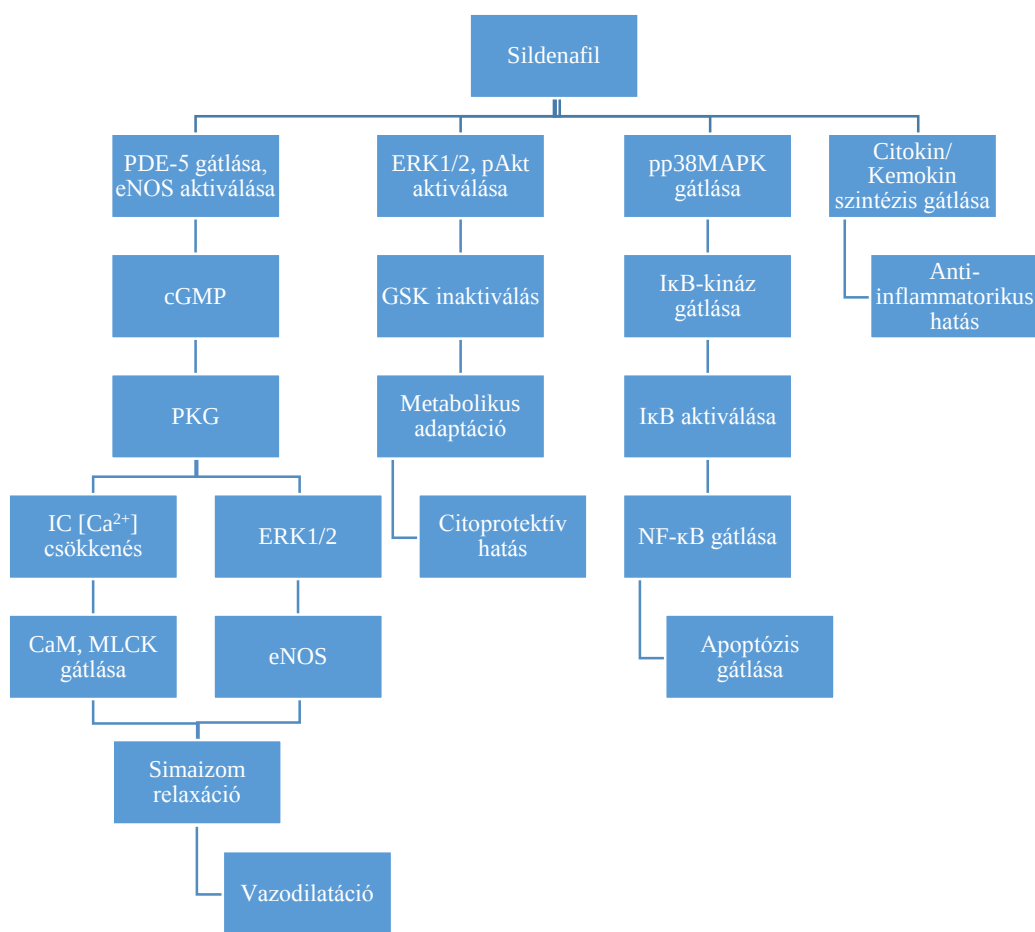
**11. diagram: p38MAPK immunoblot eredményei kvantifikálva**

**\*\*\*: szignifikáns változás a kontroll csoporthoz képest; +++: szignifikáns változás a PH csoporthoz képest ( $p < 0,05$ )**

A p38 MAPK foszforilációja a sildenafil kezelést nem kapott kontroll állatokban (sham 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 fent ismertetett eredményekből a következő konklúziókat vonhatjuk le: a sildenafilnek erős citoprotektív hatása van; mindamellett, 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.



**14.Ábra A sildenafil hatásainak összefoglalása**

(Rövidítések: PDE-5: Foszfodiészteráz-5; eNOS: endoteliális Nitrogén- Monoxid Szintáz; cGMP: ciklikus Guanil Monofoszfát; PKG: Protein Kináz G; IC: Intracelluláris; [Ca<sup>2+</sup>]: Kalcium koncentráció; CaM: Kalmodulin; MLCK: Miozin Könnyű Lánc Kináz; ERK1/2: Extracelluláris szignál Regulálta Kináz; pAkt: Foszforilált Akt; GSK: Glikogén Szintáz Kináz; pp38MAPK: Foszforilált p38 Mitogén Aktiválta Protein Kinázok; IκB: Kappa B Inhibitor; NF-κB: Nukleáris Faktor Kappa B)

## **Akut pulmonális embólia (PE)**

Az akut pulmonális embólia relatíve gyakori kórállapot, amely könnyen kritikus állapot kialakulásához vezethet, és magas mortalitással járhat. A kezeletlen tüdőembólia az esetek 30%-ban halálos kimenetelű, mely megfelelő terápiával 2-8%-ra csökkenthető [91].

Az akut tüdőembólia patomechanizmusa két fő patológiai szálon fut, melyet a 15. ábra szemléltet.

1. hemodinamikai érintettség
2. ventiláció / perfúzió aránytalanság (V/Q mismatch)

### Hemodinamikai hatások

A jobb kamrai utóterhelés növekszik, így a jobb kamra nyomás és a jobb kamra munkája is megnő, mely megnövekedett jobb kamrai oxigén igénnyel jár együtt. A fenti mechanizmusok jobb kamra dilatációt és az előbbiekkal együtt jobb kamrai diszfunkciót eredményeznek, így a jobb kamra ejekciós frakciója lecsökken. A megnövekedett nyomás és csökkent funkció miatt az interventrikuláris szeptum bal kamra felé tolódása figyelhető meg (D-jel). Mindezek eredményeképpen a bal kamrai előterhelés csökken, ami az oxigénhiánnyal együtt alacsony keringési perctérfogattal járó bal kamra elégtelenséghez vezet. A végeredmény szisztémás perfúzió csökkenés, hipotenzió, legsúlyosabb esetben sokk.

### Ventiláció/perfúzió aránytalanság

Az artéria pulmonális ágát, ágait elzáró vérrög következtében az alveolusok keringése csökken, ugyanakkor ventilációjuk megmarad, amely holtter ventilációhoz, V/Q aránytalansághoz vezet. A kialakuló sönt-keringés tovább rontja a globális artériás hipoxiát [92].

A fenti patofiziológiai folyamatok interakciója következtében akut cor pulmonale és pulmonális hipertenzió alakul ki. A korai fázisban a pulmonális hipertenzió fokozódik, az alveoláris szurfaktáns képződés pedig csökken.



megkezdését követően a sőnt keringés és a perctérfogat csökkenése miatt. Gépi lélegeztetés mellett a kapnográfia elengedhetetlen monitorozási feltétel, mivel a trombolízis eredményességére és a reembólia kialakulására korai non invazív paraméterként alkalmazható [98, 99]. Még kevés humán adat áll rendelkezésre, de megfelelő kezelésnek ígérkezik a jövőben a nitrogén-monoxid inhalációs adagolása PE-ban [100].

### ***Trombolízis (TL)***

A fibrinből és a hozzá csapzódott vörösvérsejtekből álló, feji és farki részre osztható trombus (feji rész az, ami elzárja a lument, míg a farki rész a fejtől kiindulva fokozatosan elvékonyodik) az első pár napban csak gyenge kötődést mutat az erek belső rétegét alkotó intimával, ami lehetővé teszi a rögződést. Ennek farmakológiai alapja a szervezet fibrinolitikus rendszerének aktiválódása: a plazminogén - plazmin átalakulás indukálásával, gyorsításával ugyanis a képződő plazmin képes a fibrinhálót oldani. A plazmin extrinsic és intrinsic módon aktiválható. Intrinsic aktiválását a XII faktor (Hageman) végzi, míg extrinsic aktiválását az endothel sejtek által termelt szöveti típusú plazminogén aktivátor (tPA). Klinikai gyakorlatban ennek rekombináns fajtája az rt-PA terjedt el, mint terápiás lehetőség [101].

A fiziológiás rendszerbe nem tartozó trombolitikum a streptokináz (SK). Ez egy a Streptococcus béta hemolitikus baktérium törzs által termelt vegyület, mely nem enzimátikus úton fejti ki hatását. Kötődik a plazminogén molekulákhoz, velük komplexet képezve eredményezi a plazminogén – plazmin átalakulást, vagyis ebben az esetben a plazminogén a litikus molekula. Tekintve, hogy a SK fajidegen fehérje természetű anyag, ellene allergiás reakció indulhat meg. Az antitestek plazmaszintje 4 nappal az első dózist követően emelkedik meg számottevően. Ennek terápiás vonzata, hogy a kezdő dózist követő 4. naptól SK adása nem javallt. Mivel a SK nem csak a fibrint, hanem a fibrinogént is bontja szemben az alteplázzal, ami fibrin specifikus, a fibrinogén szint jelentős csökkenését idézi elő, ami fokozhatja a vérzéses szövődmények kockázatát [102]. Másik terápiás lehetőség az urokináz (UK), melyet a vese sejtei termelnek inaktív formában, ebből enzimátikus hatás révén alakul ki az aktív forma. Erősebben kötődik a fibrinhez, mint a fibrinogénhez [102].

A TL indikált masszív pulmonális embóliában, a véna renalisok szintjéig terjedő alsó végtagi, a vállövi vénákat érintő trombózisok akut szakában. Hemodinamikai instabilitást okozó PE-ban alkalmazása kötelező annak ellenére is, hogy a vérzéses szövődmények kockázata 3-szorosa a heparin kezeléssel összehasonlítva [103-106].

Két órával a kezelés megkezdése után 30%-kal csökkenti a PAP-t, 15%-kal emeli a CI-et [107]. 72 óra elteltével a PAP 40%-kal csökken, a CI pedig 80%-kal emelkedik [108]. Echokardiográfiás vizsgálattal a TL 3. órája után a JK végdiastolés átmérőjének jelentős csökkenését találták [109]. Mindezekre a heparin kezelés nem képes. A PAIMS-2 vizsgálat rt-PA és heparin hatását vetette össze, melynek eredményeként az rt-PA 2 óra után 12%-kal, 24 óra után 35%-kal csökkentette az elzáródást, 7 nap után azonban az érelzáródás mértékének változása kiegyenlítődött a két csoportban. A sokkal járó PE-s betegek körében végzett heparint és TL-t összehasonlító randomizált vizsgálatot etikai okokból leállították, mivel 8 bevételre került beteg közül 4 heparinnal kezelt meghalt [110]. A különböző trombolitikumok effektivitásában eltérést nem találtak, a betegség kimenetelét sem befolyásolja a szer gyógyszer-tani összetétele.

A 2014-ben megjelent európai ajánlás az alábbi terápiás javaslatokat tette (6. táblázat) [111].

| Trombolitikum   | Dózis                                                                            |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| Streptokináz    | 250 000 E telítő adag 30 perc alatt, majd 100 000 E/óra 12 – 24 órán keresztül   |
|                 | Akcelerált rezsim: 1,5 millió E / 2 óra                                          |
| Urokináz        | 4400 E/kg telítő dózis 10 perc alatt, majd 4400 kg/kg/óra 12 – 24 órán keresztül |
|                 | Akcelerált rezsim: 3 millió egység / 2 óra                                       |
| rtPA (Altepláz) | 100 mg / 2 óra vagy                                                              |
|                 | 0,6 mg/kg 15 perc alatt (max. 50 mg)                                             |

6. táblázat: Elismert trombolízis kezelési rezsimek akut pulmonális embóliában

\* ESC 2014-es ajánlása alapján

### TL indikációi

- Súlyos sokkot okozó PE-ban
- Ha a beteg hemodinamikailag stabil (normotenzív, de tachikard), PESI  $\geq$  Class III, amennyiben a CT vizsgálat szerint nagy a perfúziós defektus, kifejezett jobb kamra terhelés jelei láthatóak echokardiográfia során, pozitív D-dimer, BNP és troponin szint detektálható, ESC 2014 ajánlás szerinti „intermediate-high-risk”- csoportú a beteg úgy a TL IIb B evidencia szinten ajánlott. Azonban a beteg írásos beleegyező nyilatkozatára van szükség [112].

A TL abszolút kontraindikációi (irodalom 2014-es ajánlás l.d. ESC ajánlás fent)

- *Vérzéses vagy ismeretlen eredetű stroke az anamnézisben*
- *Ischemiás stroke az elmúlt 6 hónapban*
- *Központi idegrendszeri károsodás vagy neoplazma.*
- *Májor trauma, sebészeti beavatkozás, fejsérülés az elmúlt 3 hétben*
- *1 hónapon belüli gastrointestinális vérzés*
- *Ismert fokozott vérzési kockázat*

Fontos megjegyezni, hogy életveszélyes állapotban minden abszolút kontraindikáció valójában relatív kontraindikációnak minősül.

A TL relatív kontraindikációi:

- TIA az elmúlt 6 hónapban
- orális antikoaguláns terápia
- terhesség, szülés utáni első héten belül
- nem komprimálható szűrési hely
- refrakter hipertenzió (szisztolés vérnyomás > 180 Hgmm)
- előrehaladott májbetegség
- infektív endokarditisz
- aktív peptikus fekély

***Sebészi embolektómia***

Multidiszciplináris megközelítés és individualizált indikáció mellett a hemodinamikai kollapszus fellépte előtt elvégzett artéria pulmonális embolektómia perioperatív mortalitása 6% vagy az alatti. A preoperatív trombolízis növeli a vérzés kockázatát, de nem abszolút kontraindikációja a sebészi embolektómiának. Mára háttérbe szorult, indikációit az alábbiakban foglalták össze:

- Magas rizikójú PE és bizonyos intermedier-magas kockázatú betegeknél, főképpen, ha trombolízis kontraindikált.
- Ha a beteg nem egyezik bele a TL-be.

- jobb szívfél trombus esetén, amennyiben az patent foramen ovalén át keresztülhatol az interatriális szeptumon [111].
- Javasolt lehet truncus pulmonálisban lévő „lovagló rög” jelenléte, sokkos állapotú beteg esetében is [113].

### ***Perkután katéteres kezelés***

A kezelés célja a pulmonális artériát elzáró trombus intervenciós úton történő eltávolítása a jobb kamrai terhelés csökkentésére, a tünetek és a túlélés javítására. Ma elsődlegesen azokban az esetekben ajánlott, amikor sokkos beteg esetén a szisztémás trombolízis abszolút kontraindikált vagy sikertelen, illetve az intermedier-high risk betegek esetén, ha szisztémás trombolízis végzésénél a vérzés veszélye nagyon magas [111]. Katéter intervenció végezhető lokális trombolízissel vagy a nélkül. Az intervenciós technikák lehetőségei:

- trombus fragmentáció
- reolitikus trombektómia
- aspirációs trombektómia
- rotációs trombektómia
- katéteren keresztüli célzott, lokális trombolízis
- ultrahangos, katéteren keresztüli célzott trombolízis
- farmakomechanikus trombolízis
- kombinált technikák

### ***Vénás filterek***

Az 1980-as években rutinszerűen helyeztek be véna cava inferior filtereket [114]. Az utóbbi 15 évben sokféle fajtát (Titanium Greenfield, LGM/Venatech, Bird's nest stb.) fejlesztettek ki. Megkülönböztetünk permanens és non-permanens filtereket. Ez utóbbi csoporton belül léteznek olyan filterek, melyeket néhány napon belül el kell távolítani és vannak olyanok, melyek hosszabb ideig bennhagyhatóak. Rutin használatuk nem terjedt el.

A vénás filterek indikációi [111].:

- rekuráló PE adekvát antikoaguláns terápia ellenére
- akut tüdőembóliában, ha az antikoaguláns kezelés ellenjavallt,
- traumás gerincvelő-sérülésben [115-118].



### ***Antikoaguláns terápia***

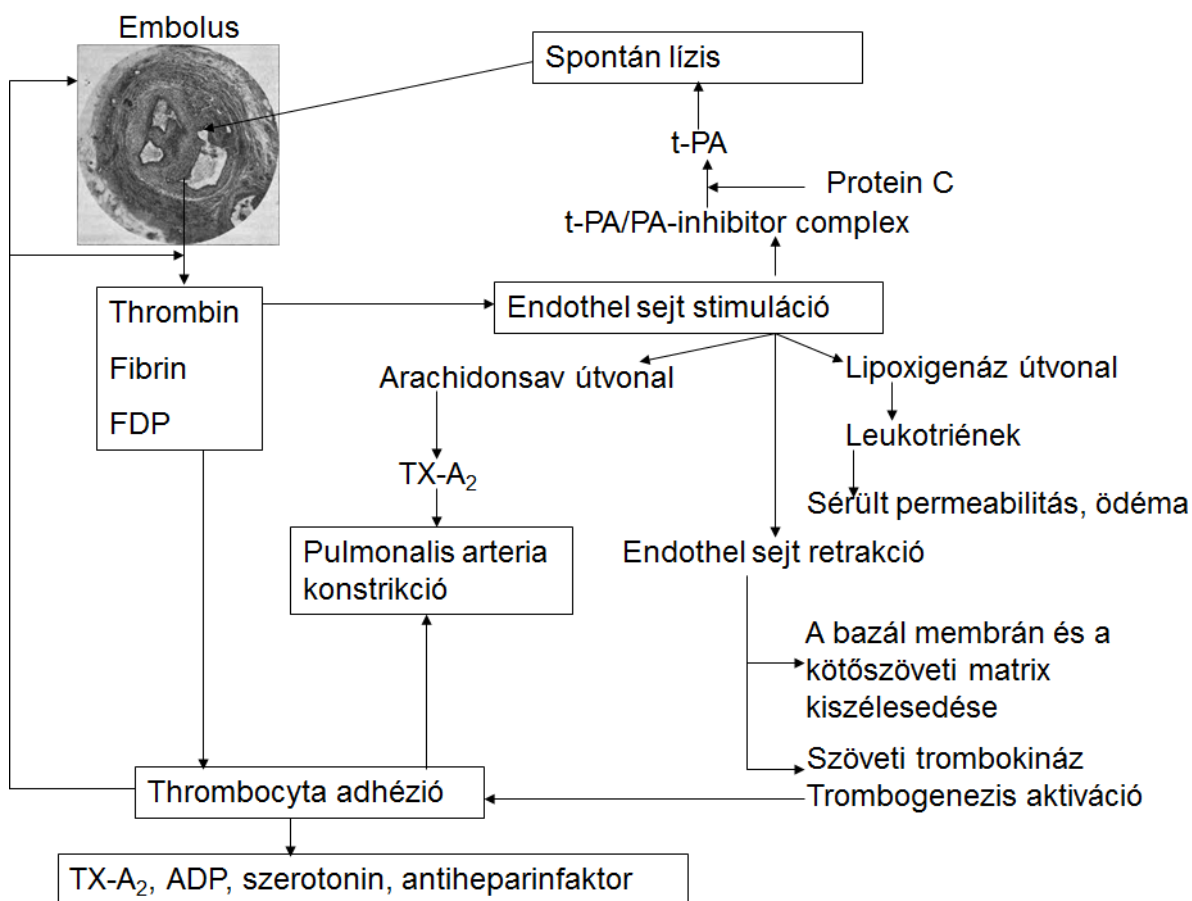
A nem frakcionált heparin kezelés (UFH) Barrit és Jordan 1960-ban végzett klinikai tanulmánya óta terjedt el [119]. Az Észak-Amerikai Konszenzus Konferencia a trombózisról és az antikoaguláns terápiáról 1988 áprilisában úgy foglalt állást, hogy a frakcionálatlan heparin (UFH) terápia az aktivált parciális tromboplastin idő (aPTI) kontrollja alapján történjen [120], vagy alacsony molekulásúlyú heparin (LMWH) esetében amidiplase assay alapján a plazma heparin szint 0,3-0,6 anti Xa IU között legyen. Az LMWH helyettesítheti a UFH-t, de nem ajánlott akut masszív PE-ban [121,122]. Az európai [111] és magyar konszenzus ajánlás [102] is az UFH kezelést részesíti előnyben a TL előtt és az aktív litikus periódusban jó ellenőrizhetősége (aPTI) és a potenciális várható hemodinamikai instabilitás, vérzésveszély miatt. Nem masszív PE-ban LMWH tartós adása, lehetőleg napi egyszeri terápiás dózisban javasolt [123]. A heparin kezelést a PE kizárásáig meg kell kezdeni, majd tartósan alkalmazni az akut PE-ban. A szerzők felhívják a figyelmet a heparin kezelés ritka, de életveszélyes szövödményére a heparin indukálta trombocitopéniára, az időben történő felismerés miatt a trombocita szám rendszeres ellenőrzése szükséges [124].

### **Tartós orális antikoaguláns kezelés**

3-5 napos heparin kezelést követően kell bevezetni. Ha ismert fenntartó ok (pl. végtagtörés, műtét utáni állapot stb.) magyarázta a VTS-t, amely megszűnt, az antikoaguláns kezelés 3 hónapig elegendő. Idiopátiás esetben 3-6 hónapig kell folytatni, majd a genetikai vagy szerzett hemosztazeológiai okokat kivizsgálni. Ezen eredmények alapján az élethosszig tartó antikoagulációt a továbbiakban mérlegelni szükséges [125].

## 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 kaskád, a trombociták és endoteliális sejtek. Az aktiváció következményeként endothel diszfunkció alakul ki [126]. 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.



**16 ábra: Akut pulmonális embólia**

\*(Átvéve: Az intenzív terápia gyakorlata, szerkesztette: Bogár Lajos, Molnár Zsolt. A szerkesztők engedélyével.)

Az oxidatív stressz és a leukocita aktiváció szinten fontos tényező, azonban human vizsgálatokból csak limitált adattal rendelkezünk a pulmonális embóliához társuló oxidatív stressz patológiájáról [127]. Az akut szakban a granulociták reaktív oxigén gyököket és szöveti proteázokat, míg a gyógyulási szakban a monociták anti-inflammatorikus citokineket termelnek. A granulocita aktiváció a pulmonális kapillárisokban a legkifejezettebb. Ischaemia reperfüzió alatt az oxigén szabadgyökök és az endogén antioxidánsok közötti egyensúly felborul. A granulocita aktiváció egy többlépcsős folyamat, mely a granulociták endothelhez történő adhéziójához és extravaszkuláris migrációhoz vezet. Az aktivált granulociták mieloperoxidáz termelése fokozódik. A kitapadt leukociták és aggregáló trombociták mikrocirkulációs keringészavart, így szöveti károsodást eredményeznek [128,129].

A mátrix metalloproteázok (MMP-k) szintén érintettek a masszív tüdőembólia során létrejövő akut jobb szívfél elégtelenség kialakulásában [130]. Az MMP-k az endoproteázok egy olyan csoportját képezik, melyek feladata az extracelluláris matrix proteinek és más mediátorok lebontása. MMP-2 és MMP-9 aktiváció figyelhető meg kardiális diszfunkcióban [131], és kétségtelenül hasonló a helyzet akut tüdőembólia esetén is. Az MMP-2 bontja a kardiális troponin I-t, myosin light chain -1-et, szarkomer és citoskeletális fehérjéket [132]. Transzkripciós faktorok több komplex interakciója befolyásolja az MMP expressziót és aktivitást. Ilyen faktorok az aktivátor protein-1 (AP-1) [133], a signal transducer and activator of transcription fehérjék (STATs), és a nukleáris faktor kappa B (NF- $\kappa$ B), melyek fontos regulátorai az MMP-2 és MMP-9 expresszióknak [134]. Mindennek közvetlen terápiás vonatkozása lehet, mint hiszen pl. NF- $\kappa$ B inhibitorok alkalmazása megelőzheti az MMP up-regulációt [135] ezáltal megelőzhetők az MMP mediálta kardiovaszkuláris hatások. Kutatócsoportunkkal tudományos közleményben összegeztük az MMP-k szerepét a pulmonális embólia okozta pulmonális hipertóniában [136]. Közleményünket irodalmi adatokra és saját kísérletes eredményekre alapoztuk. Kutatócsoportunk néhány tagja számolt be először arról, hogy az abnormális MMP aktivitás hozzájárulhat a pulmonális embólia okozta hemodinamikai változásokhoz [137,138].

Egy kezdeti vizsgálatban mikrogyöngyökkel végzett tüdőembóliát követően vizsgálták patkányok tüdő mintáit és tüdő MMP-2 valamint MMP-9 aktivitását mérték zselatin zimográfiával. Ezek a vizsgálatok az MMP-9 aktivitás fokozódását igazolták mikrogyöngyökkel kiváltott tüdőembólia során fellépő hemodinamikai elégtelenség esetén [137,139].

Ezen eredmények további megerősítést nyertek egy későbbi kutyákon végzett vizsgálatban [138]. Ebben a vizsgálatban altatott kutyákon idéztek elő tüdőembóliát mikrogyöngyökkel.

Az embolizációt addig végezték, míg az alap pulmonális artériás középnyomás 20 Hgmm-rel emelkedett. Teljes hemodinamikai értékelés történt az alaphelyzetben, majd 5 és 120 perccel az embolizációt követően. A tüdő embolizáció a pulmonális rezisztencia indexet 289%-kal növelte meg és ez a hatás együtt járt a plazma MMP-9 szint emelkedésével. Hasonló emelkedés az MMP-2 szintben nem volt megfigyelhető [138].

A fenti két vizsgálat egyértelműen igazolta, hogy az MMP szint mind a tüdőben, mind a plazmában emelkedést mutat akut tüdőembólia után. Amíg a normal tüdőszövetben általában alacsony MMP szinteket találunk, jól ismert, hogy gyulladásban és tüdőkárosodásban az MMP expresszió és aktivitás fokozódik [140]. A korábbi eredmények [137,138] magyarázata lehet a gyulladásos sejtek toborzása és a keringésből a tüdőszövetbe történő migrációja. Valóban figyelemre méltó korai neutrofil influx-szal és a makrofágok számának növekedésével járó gyulladásos válaszreakció volt látható a pulmonális embóliának kitett állatok artéria pulmonálisában [140]. Ebből kifolyólag a tüdő MMP-9 aktivitás tüdőembólia utáni emelkedésének legvalószínűbb mechanizmusa a neutrofilek tüdőszövetbe és vaszkulaturába történő korai beáramlása és a nagymennyiségű MMP-9-et tartalmazó granulomok rapid kibocsátása [141]. Az aktivált neutrofil granulociták reaktív oxigén szabadgyök termelése, így szuperoxid termelése is fokozódik, mely MMP aktiválódáshoz vezet [142,143]. Az MMP aktiválás ezen mechanizmusa különös szereppel bírhat akut tüdőembóliában, mert az oxidatív stressz [144-146] rontja a NO biohasznosulását és aktivitását, valószínűsíthetően hozzájárulva ezzel a pulmonális hipertónia kialakulásához akut tüdőembóliában [147]. Érdekes, hogy több tanulmány is született, amely a tüdőembólia kezelésére az NO aktivitás fokozását célozta, azonban néhányukban az MMP aktivitás csökkenését észlelték [148,149]. A pulmonális vaszkulatura szempontjából különösen fontos, hogy az erek mechanikus feszülésének növekedése a reaktív oxigén szabadgyökök képződését facilitálja, így hozzájárul a fokozott MMP termeléshez [150]. Az aktivált MMP-k (különösen az MMP-2 és -9) továbbá a vaszkuláris struktúra diszrupciójához vezetnek, mely az elasztikus lamina interna fragmentációjához vezetnek, mely egy korai hisztopatológiai jellemzője a pulmonális hipertóniának és a pulmonális vaszkulatura fokozott permeabilitásához vezet [151].

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 [152]. Endothelin-1 receptor antagonisták kísérletes akut tüdőembólia modellben kifejtett előnyös hemodinamikai hatásáról szintén vannak adatok [153,154]. A

fentiek alapján lehetséges tehát, hogy a tüdőembólia során létrejövő neutrofilek általi MMP-9 kibocsátás aktiválja az endothelin-1 termelődést, amely további neutrophil aktivációhoz vezet, így egy pozitív feedback hurkot létrehozva elősegíti a leukociták endothelsejtekhez történő adhézióját és a neutrofilek gyulladásos szövetekbe történő migrációját [155,156]. Ráadásul a megnövekedett MMP aktivitás bizonyos vazodilatátor anyagok degradációján keresztül is elősegíti a vazokonstriktiót, így pl. a calcitonin-gén-related peptidét [157], mely a pulmonális erek potens vazodilatátora [158]. Hasonlóan, az MMP-2 bontja a vazodilatátor hatású adrenomedullint, ezáltal elősegítve a vazokonstriktió kialakulását [159]. Az MMP-9 proteolitikus hatásánál fogva bontani képes a IV-es típusú kollagént, laminint, fibronektint, melyek az extracelluláris matrix nagy részét alkotó fehérjék, így hozzájárulhat a vérzéses szövődmények kialakulásához [160,161]. 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 [162]. 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 [163]. 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 [164]. Az MMP-9 szint kritikusan emelkedett a kardioembóliás eredetű stroke-ok [165, 166] hemorrágiás transzformációja és az altepláz kezelés akut stroke-ban történő használata esetén [167], ezáltal egy lehetséges magyarázat kínálkozik arra a mechanizmusra, miként is jön létre stroke esetén hemorrágiás transzformáció. 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 [168-170].

A vazoaktív anyagok egyensúlyának felborulása szintén fontos szerepet játszik az akut tüdőembólia során fellépő pulmonális hipertónia kialakulásában. Ilyenkor a vazokonstriktor anyagok (pl. szerotonin, endothelin-1, tromboxán A<sub>2</sub>) produkciója meghaladja az endogén vazodilatátorokét (prosztaciklin, NO [171, 172]).

A közelmúltban experimentális állatkísérletes modellekben szignifikáns hemolízist sikerült kimutatni akut pulmonális embóliában, valamint a megemelkedett vaszkuláris rezisztencia

háttérben megnövekedett argináz I és II aktivitást írtak le [173, 174]. A szerzők rámutattak, hogy a hemolízis indukálta argináz I szint növekedés l-arginin depléciót eredményez, károsan befolyásolva így az endogén NO termelést [173, 174], amely jelentős protektív szereppel bír az akut tüdőembólia során fellépő kardiovaszkuláris válaszreakcióval szemben [147]. 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 vazokonstrikció és endoteliális diszfunkció alakul ki, melyet a szabad hemoglobin NO scavenging hatása okoz. Ennek eredményeképpen kevesebb NO diffundál a vaszkuláris simaizom sejtekhez [175-179]. Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a hemodinamikai hatások az NO-cGMP jelátviteli úton keresztül attenuálhatók mind állatkísérletes [146, 180-182], mind human pulmonális embólia során [183-186].

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, mint pl. sarlósejtes anémia [175] vagy preeclmpsia [187], vagy éppen vértranszfúzió kapcsán [176, 188-190] korábban már leírásra került.

# **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 konszumpcióját, 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.

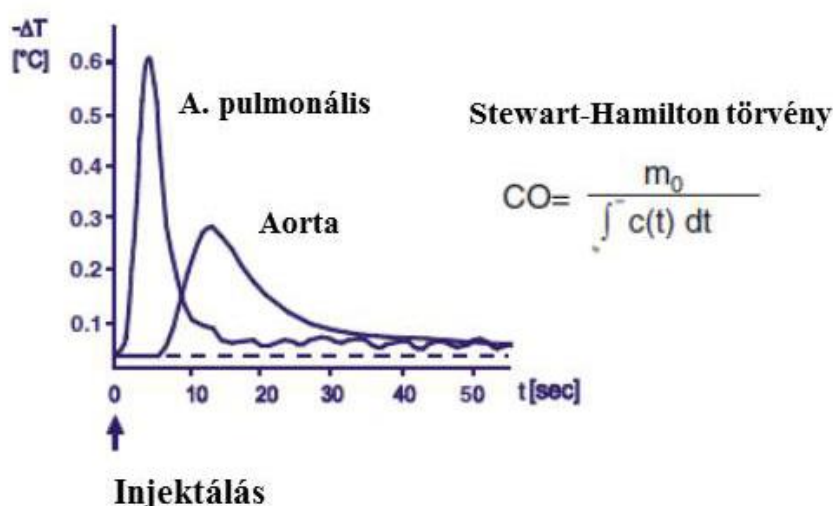
Klinikai vizsgálatban néztük a trombolitikus terápia hatását a szabad hemoglobin koncentrációra és NO fogyasztásra.

## **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

üzem módban, szobalevegőt inhaláltatva, volumenkontrollált üzem módban lélegeztettük. A tidal volument 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 vezettünk 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. Az alap (baseline) hemodinamikai paramétereket legalább 30 perc-stabilizáció után végeztük. 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 [19] (17. ábra).



17. ábra: Termodilúciós görbék az aortából és artéria pulmonálisból.

*A keringési perctérfogat számolása a Stewart-Hamilton képlettel*



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 kanülön keresztül. A véralvadékat saját vér (5 ml/ttkg) mintákból nyertük, melyet legalább 60 percen keresztül hagytunk 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 (baseline), 30 és 180 perccel a tüdő 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 [163]. A betegeket prospektíven magas és közepes rizikójú csoportokba soroltuk az aktuális Európai Kardiológus Társaság (European Society of Cardiology) ajánlása szerint [192]. 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 [193], 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 echokardiográfiás 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 molekulásúlyú heparin készítményt (LMWH). Arcmaszkon keresztül 50, ill. 100% oxigén adását végeztük, hogy a  $\text{SaO}_2$ -t 95% vagy a felett tartsuk. Fájdalomcsillapításra 2 mg i.v. morfin bólusokat alkalmaztunk. A gyanítottn hipovolémiás betegek 20 ml/kg/30 min krisztalloid infúziót kaptak. A fenntartó

foliadékpótlás 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 (baseline) tükrözte, majd a trombolízis után 8 órával, 1, 3, 5 és 30 nappal. A vérmintákból meghatároztuk a plazma szabad hemoglobin koncentrációját és NO fogyasztát.

A kontrollcsoport (n=28) tagjaitól vett vérmintákból szintén meghatároztuk a plazma szabad hemoglobin koncentrációját és NO fogyasztát, 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 (baseline) teremtett. Ezek után minden egyes 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**

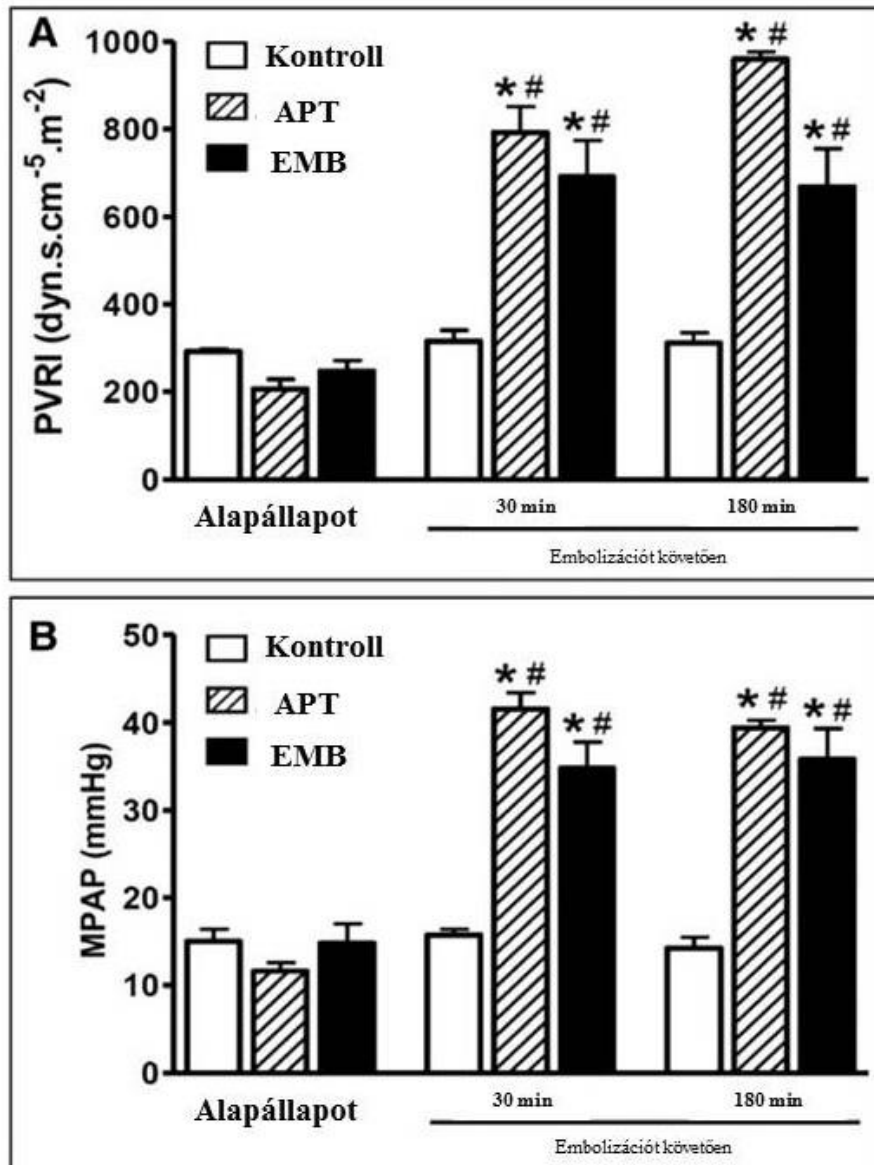
Kétutas (embolizáció vs idő) variancia analízist (ANOVA) és egyutas ANOVA tesztet használtunk melyet posthoc Bonferroni analízissel egészítettünk ki, hogy a hemodinamikai és biokémiai változásokat összehasonlítsuk. A szabad hemoglobin koncentráció és a NO konszumpció vagy más hemodinamikai paraméter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

## ***Eredmények***

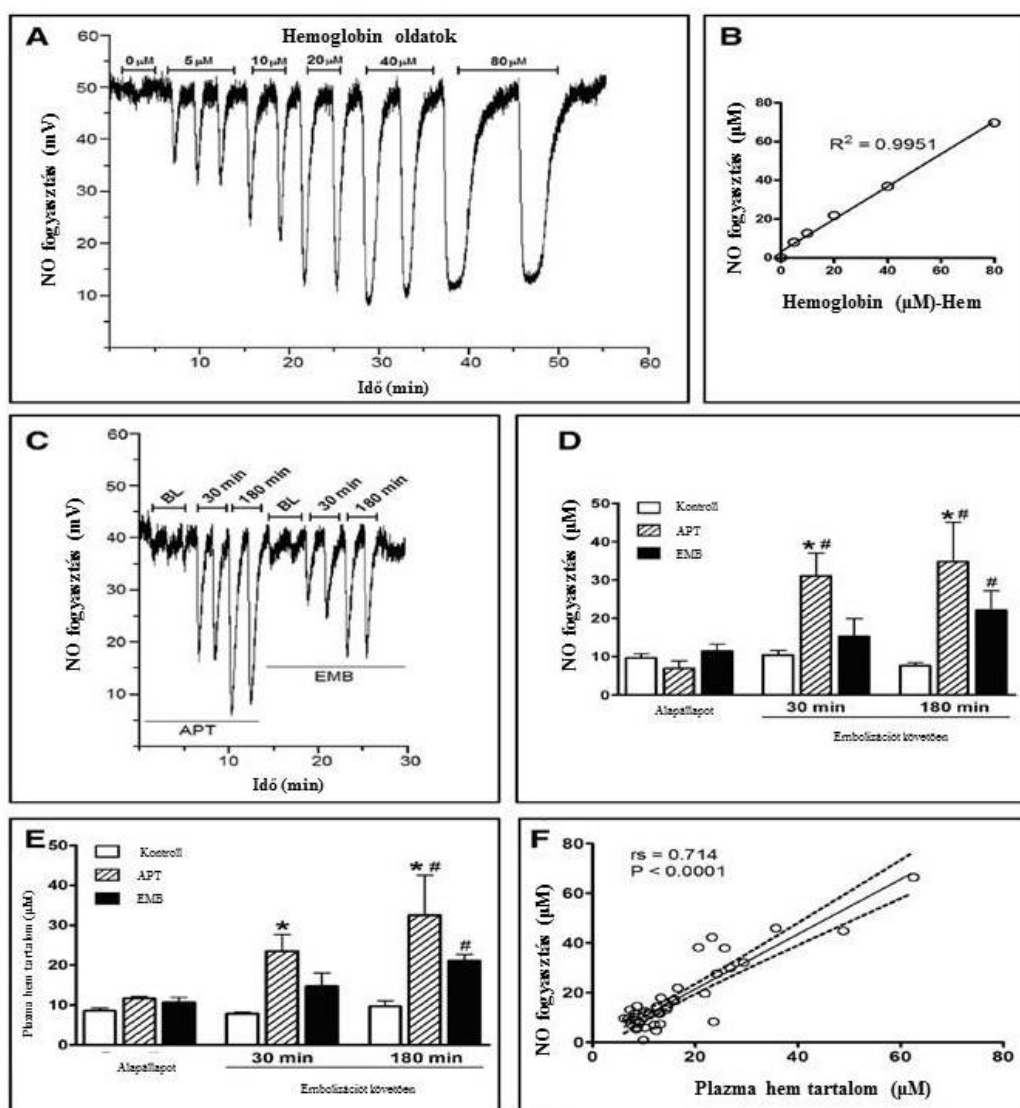
### **Állatkísérletes vizsgálatok**

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 mikrogöngy embolizáció), mert a véralvadék képződés más úton befolyásolja a szabad hemoglobin szintet, mint a mikrogöngy embolizáció.

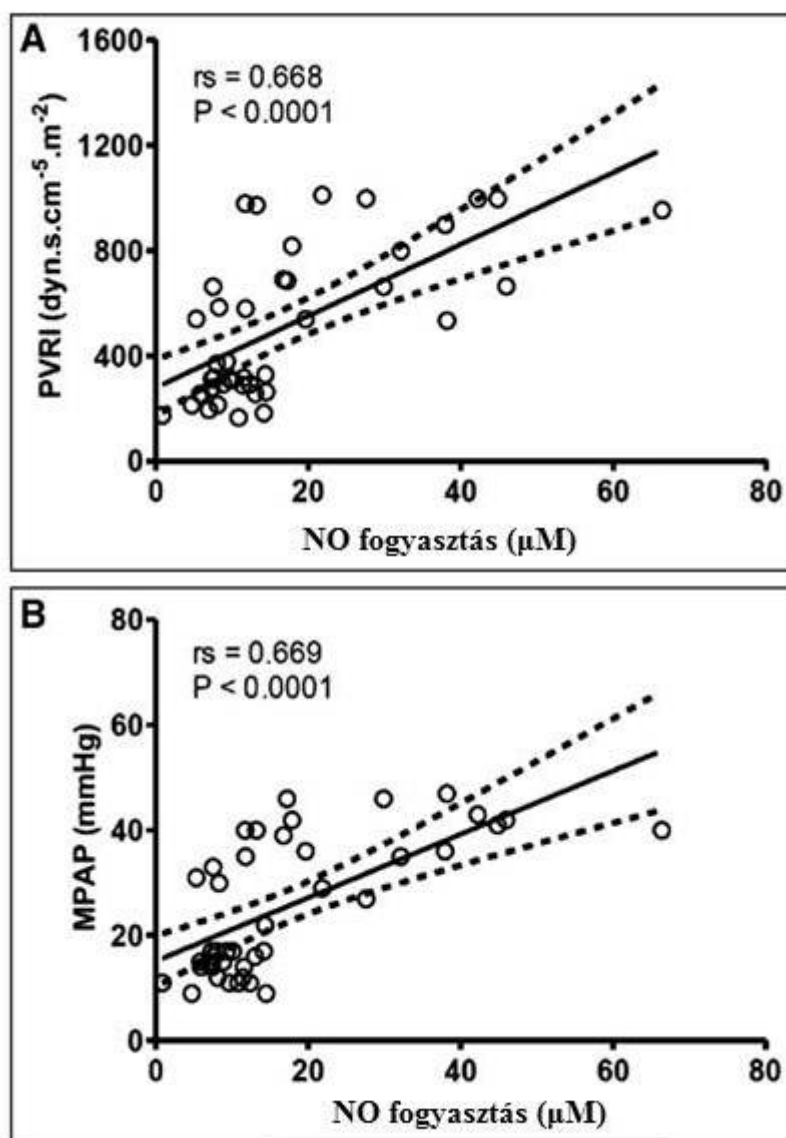
Ahogy várható volt, a tüdő embolizációja megnövelte mind a PVRI-et mind a pulmonális artériás középnyomást mindkét modell esetében (18. ábra A és B;  $p < 0,05$ ) és ezek a hemodinamikai változások együtt jártak a plazma megnövekedett hem koncentrációjával (19. ábra E;  $p < 0,05$ ) és a megnövekedett NO felhasználással (19. ábra D;  $p < 0,05$ ). A 19. ábra mutatja a NO fogyás alakulását szabad hemoglobin tartalmú oldatok esetén (standard görbe; 19. ábra A és B), valamint az embolizált állatok (APT és EMB csoport) vérmintái esetén alapállapotban, 30 és 180 perccel az embolizációt követően (19. C. ábra). Szignifikáns korrelációt találtunk a NO konzumpció és a vérminták hem koncentrációja között (19F. ábra;  $r_s = 0,714$ ,  $p < 0,001$ ). Ezen eredményekkel párhuzamosan szignifikáns korreláció mutatkozott a PVRI (20 A. ábra;  $r_s = 0,668$ ;  $p < 0,001$ ) vagy MPAP (20 B. ábra;  $r_s = 0,669$ ;  $p < 0,001$ ) és a NO fogyasztás között.



18. ábra. Pulmonális vaszkuláris rezisztencia index (PVRI) (A) és pulmonális artériás középnyomás (MPAP) (B) alapállapotban, 30 és 180 perccel az embolizációt követően (time after embolisation) a kontroll (Sham) csoportban ( $n = 4$ ; fehér oszlopok), az akut pulmonális tromboembólia (APT) csoportban ( $n = 5$ ; csíkozott oszlopok), és a mikrogöngy embolizációs csoportban (EMB) ( $n = 5$ ; fekete oszlopok). Az értékek feltüntetése átlag  $\pm$  átlag szórása (SEM), \* $p < 0,05$  a kontroll csoporthoz képest, # $p < 0,05$  a saját alapállapothoz képest.



19. ábra Nitrogén monoxid (NO) konszumpciós assay A, A foszfát pufferelt fiziológiás sóoldatban lévő DETA NONOate által létrehozott NO szignál. Az NO szignál átmeneti csökkenései megfelelnek az egyes hemoglobin oldatok NO konszumpciójának (standard görbe). B, Szignifikáns korreláció a NO konszumpció mértéke (elfogyasztott NO mennyiség) és a hemoglobin koncentráció között a standard görbét alkotó oldatok esetén. C, NO konszumpció az embolizált állatok (APT és EMB csoport) vérmintáival alaphelyzetben, 30 és 180 perccel az embolizációt követően. D, Az egyes vérminták NO felhasználása. E, A szabad hemoglobin koncentráció, a plazma hem koncentrációjában kifejezve alaphelyzetben, 30 és 180 perccel az embolizáció után a kontroll csoportban ( $n = 4$ ; fehér oszlopok), az akut pulmonális tromboembólia (APT) csoportban ( $n = 5$ ; csíkozott oszlopok), és a mikrogöngy embolizációs csoportban (EMB) ( $n = 5$ ; fekete oszlopok). F, Szignifikáns korreláció a NO fogyasztás és a plazma hem koncentrációja között. A regressziós egyenes és a 95%-os konfidencia intervallum megrajzolva, a  $p$  érték és a Spearman koefficiens ( $r_s$ ) értékek feltüntetve. Az értékek feltüntetése átlag  $\pm$  átlag szórása (SEM),  $*p < 0,05$  a kontroll csoporthoz képest,  $\#p < 0,05$  a saját alaphelyzethez képest.

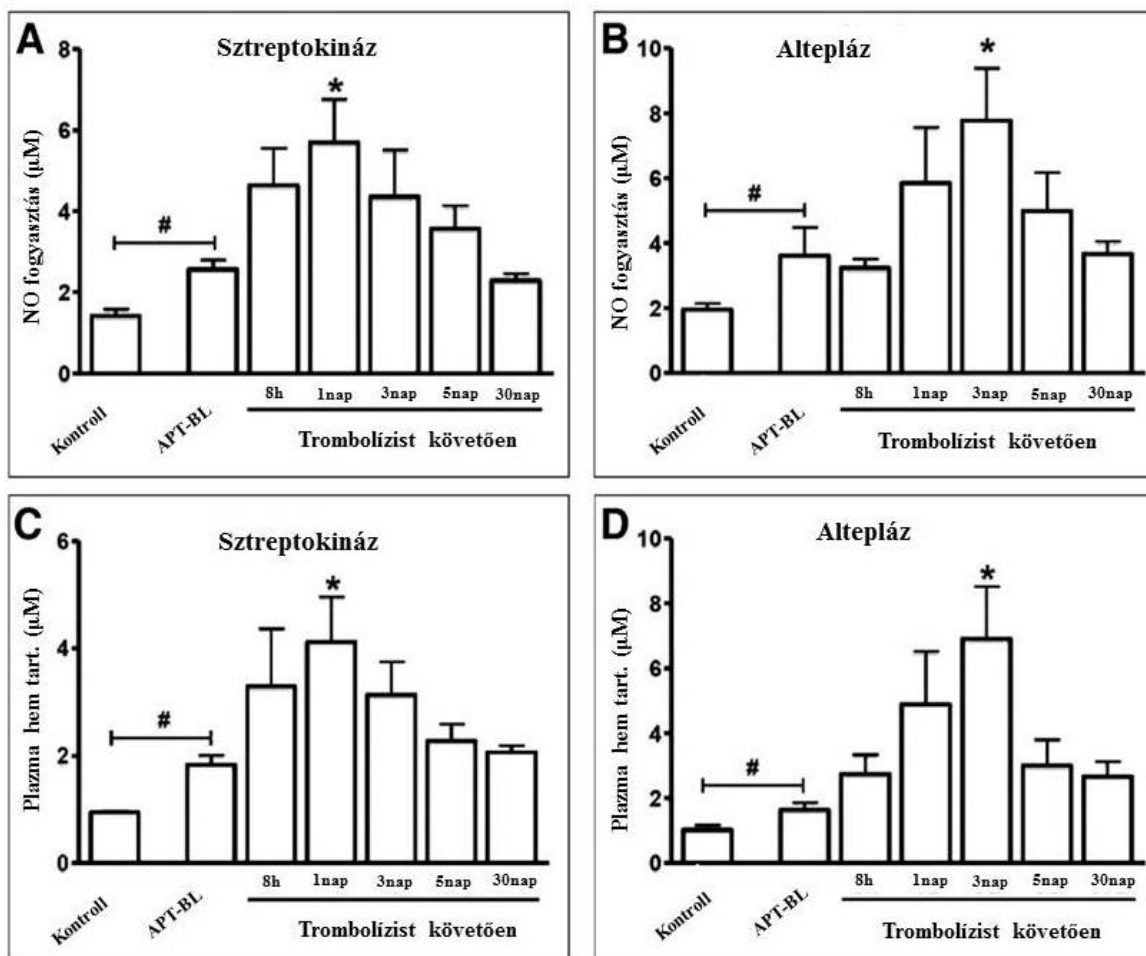


20. ábra: Szignifikáns korreláció mind a pulmonális vaszkuláris rezisztencia index (PVRI) (A), mind a pulmonális artériás középnyomás (MPAP) (B) és a nitrogén monoxid (NO) konszumpció között. A regressziós egyenes és a 95%-os konfidencia intervallum megrajzolva, a p érték és a Spearman koefficiens ( $r_s$ ) értékek feltüntetve

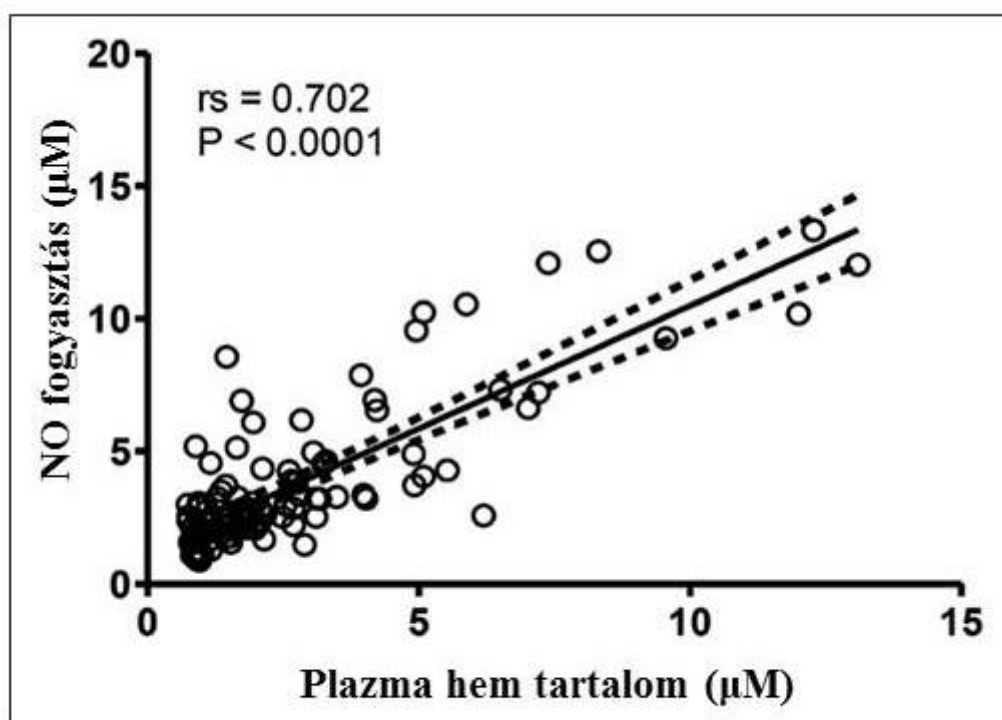


## **Klinikai eredmények**

Azért, hogy a kísérletes eredményeket validáljuk, akut tüdőembólia klinikai eseteiben vizsgáltuk a megnövekedet plazma szabad hemoglobin koncentrációjához társuló NO fogyaszt 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  $p < 0,05$ ; 21. ábra). 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 (22. ábra;  $r_s = 0,702$ ;  $p < 0,001$ )



21. ábra: Nitrogén monoxid (NO) fogyasztás (A és B) és szabad plazma hemoglobin koncentráció (C és D), mint hem koncentráció alakulása akut tüdőembóliában és trombolízis (TL) kezelés hatására. Az x tengelyen az egészséges önkéntesek (Control;  $n = 28$ ) és akut tüdőembóliát elszenvedett betegek alapállapotának értékei, valamint a trombolízis kezelés utáni 8. óra, 1., 3., 5. és 30. nap eredményei streptokináz ( $n = 7$ ) és altepláz ( $n = 7$ ) kezelést követően. 1.). Az értékek feltüntetése átlag  $\pm$  átlag szórása (SEM), # $p < 0,05$  az akut tüdőembóliás betegek alapállapota (APT – BL) a kontroll csoporthoz képest (APT-BL vs. Control), \* $p < 0,05$  a trombolízis kezelés során mért értékek a saját alapállapothoz (APT - BL) képest (TL vs. APT-BL).



22 ábra. Szignifikáns összefüggés volt kimutatható a plazma minták NO fogyasztásában és a plazmák hem tartalma között akut tüdőembóliás betegeknél. A regressziós egyenes és a 95%-os konfidencia intervallum megrajzolva, a  $p$  érték és a Spearman koefficiens ( $r_s$ ) értékek feltüntetve.

## **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. Mindezeken 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.

## **Jövőbeli tervek**

Jövőbeli terveink között szerepel, hogy a sildenafil hatását összehasonlítsuk más terápiás lehetőségekkel a pulmonális hipertenzió kezelésében, úgymint a rezveratrol, illetve poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) gátló szerek. A PARP gátlók alkalmazása akut embóliás betegek esetében is indokolt lehet.

Emellett egy másik modellt is alkalmazni kívánunk a pulmonális hipertónia vizsgálatára, mégpedig a krónikus hipoxiás modellt, hipoxiás kamra alkalmazásával. Szereink hatását ezen modellben is vizsgálunk, morfológiai és biokémiai módszerekkel feltérképezve a védő mechanizmusokat.

### **Támogatás:**

Kísérleteinket egy részét a PTE, ÁOK-KA-2013/3 kutatási pályázat támogatta.

## Irodalomjegyzék

- [1] Hatano S, Strasser T. World Health Organization 1975. Primary pulmonary hypertension. Geneva: WHO; 1975.
- [2] Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Krishna Kumar R, Landzberg M, Machado RF, Olschewski H, Robbins IM, Souza R. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. J Am Coll Cardiol 2014 Feb 25;63(7):746
- [3] Galiè N, Hoeper MM, Humbert M, Torbicki A, Vachiery JL, Barbera JA, et al. ESC Committee for Practice Guidelines (CPG). Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). Eur Heart J. 2009 Oct;30(20):2493-537.
- [4] Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, et al. Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. Am J Respir Crit Care Med 2006; 173:1023-1030.
- [5] Frost AE, Badesch DB, Barst RJ, et al. The changing picture of patients with pulmonary arterial hypertension in the United States: how REVEAL differs from historic and non-US Contemporary Registries. Chest 2011; 139:128-137.
- [6] Az Egészségügyi Minisztérium szakmai protokollja A pulmonalis hipertónia diagnózisa és kezelése. 2012
- [7] Rich S, Dantzker DR, Ayres SM, et al. Primary pulmonary hypertension. A national prospective study. Ann Intern Med 1987; 107:216-223.
- [8] Badesch DB, Raskob GE, Elliott CG, et al. Pulmonary arterial hypertension: baseline characteristics from the REVEAL Registry. Chest 2010; 137:376-387.

- [9] Ghamra ZW, Dweik RA. Primary pulmonary hypertension: an overview of epidemiology and pathogenesis. *Cleve Clin J Med* 2003; 70 Suppl 1:S2-8.
- [10] D'Alonzo GE, Barst RJ, Ayres SM, et al. Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann Intern Med* 1991; 115:343-349.
- [11] Thenappan T, Shah SJ, Rich S, et al. A USA-based registry for pulmonary arterial hypertension: 1982-2006. *Eur Respir J* 2007; 30:1103-1110.
- [12] Humbert M, Sitbon O, Yaici A, et al. Survival in incident and prevalent cohorts of patients with pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2010; 36:549-555.
- [13] Rabinovitch M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest*. 2012; 122(12): 4306–4313.
- [14] Chan SY, Loscalzo J. Pathogenic mechanisms of pulmonary arterial hypertension. *J Mol Cell Cardiol*. 2008; 44(1): 14–30.
- [15] Sitbon O, Humbert M, Jais X, et al. Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2005; 111:3105–11.
- [16] Voelkel NF, Quaife RA, Leinwand LA, et al. Right ventricular function and failure: report of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group on cellular and molecular mechanisms of right heart failure. *Circulation*. 2006;114:1883–91
- [17] Rich S, Kaufmann E, Levy PS. The effect of high doses of calciumchannel blockers on survival in primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 1992;327:76–81.
- [18] Farber HW, Loscalzo J. Pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2004;351:1655–1665.

- [19] Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, et al. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004;43(Suppl. 12):S13–S24.
- [20] Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, et al. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2002; 346:896.
- [21] Channick RN, Simonneau G, Sitbon O, et al. Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study. *Lancet* 2001; 358:1119.
- [22] McLaughlin VV, Sitbon O, Badesch DB, et al. Survival with first-line bosentan in patients with primary pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2005; 25:244.
- [23] Sitbon O, Badesch DB, Channick RN, et al. Effects of the dual endothelin receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary arterial hypertension: a 1-year follow-up study. *Chest* 2003; 124:247.
- [24] Galié N, Badesch D, Oudiz R, et al. Ambrisentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46:529.
- [25] Galié N, Olschewski H, Oudiz RJ, et al. Ambrisentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension: results of the ambrisentan in pulmonary arterial hypertension, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter, efficacy (ARIES) study 1 and 2. *Circulation* 2008; 117:3010.
- [26] Oudiz RJ, Galie N, Olschewski H, Torres F, Frost A, Ghofrani HA, et al. Long-term ambrisentan therapy for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2009;54(21):1971-81.
- [27] Pulido T, Adzerikho I, Channick RN, Delcroix M, Galie N, Ghofrani HA, et al. Macitentan and morbidity and mortality in pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2013;369(9):809-18.



- [28] Galie N, Ghofrani HA, Torbicki A, Barst RJ, Rubin LJ, Badesch D, et al. Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2005;353(20):2148-57.
- [29] Abrams D, Schulze-Neick I, Magee AG. Sildenafil as a selective pulmonary vasodilator in childhood primary pulmonary hypertension. *Heart* 2000; 84:E4.87.88.
- [30] Prasad S, Wilkinson J, Gatzoulis MA. Sildenafil in primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 2000; 343:1342.
- [31] Pepke-Zaba J, Gilbert C, Collings L, Brown MC. Sildenafil improves health-related quality of life in patients with pulmonary arterial hypertension. *Chest* 2008; 133:183.
- [32] Rubin LJ, Badesch DB, Fleming TR, et al. Long-term treatment with sildenafil citrate in pulmonary arterial hypertension: the SUPER-2 study. *Chest* 2011; 140:1274.
- [33] Galiè N, Brundage BH, Ghofrani HA, et al. Tadalafil therapy for pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2009;119:2894.
- [34] Oudiz RJ, Brundage BH, Galie N. Tadalafil for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2012. 60(8):768-74.
- [35] Jing ZC, Yu ZX, Shen JY, et al. Vardenafil in pulmonary arterial hypertension: a randomized, double-blind, placebocontrolled study. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183:1723.
- [36] Moncada S, et al: An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 1976, 263(5579):663–5.
- [37] Rubin LJ, et al: Treatment of primary pulmonary hypertension with continuous intravenous prostacyclin (epoprostenol). Results of a randomized trial. *Ann Intern Med* 1990, 112(7):485–91.

- [38] O'Callaghan DS, et al: Treatment of pulmonary arterial hypertension with targeted therapies. *Nat Rev Cardiol* 2011, 8(9):526–38.
- [39] William Hopkins, Lewis J Rubin Treatment of pulmonary hypertension in adults. UpToDate database [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com).
- [40] Barst RJ, Rubin LJ, McGoon MD, et al. Survival in primary pulmonary hypertension with long-term continuous intravenous prostacyclin. *Ann Intern Med* 1994; 121:409.
- [41] Barst RJ, Rubin LJ, Long WA, et al. A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1996; 334:296.
- [42] Shapiro SM, Oudiz RJ, Cao T, et al. Primary pulmonary hypertension: improved long-term effects and survival with continuous intravenous epoprostenol infusion. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30:343.
- [43] Higenbottam T, Butt AY, McMahon A, et al. Long-term intravenous prostaglandin (epoprostenol or iloprost) for treatment of severe pulmonary hypertension. *Heart* 1998; 80:151.
- [44] Sitbon O, Humbert M, Nunes H, et al. Long-term intravenous epoprostenol infusion in primary pulmonary hypertension: prognostic factors and survival. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40:780.
- [45] Tuder RM, Cool CD, Geraci MW, et al. Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:1925.
- [46] McLaughlin VV, Genthner DE, Panella MM, et al. Compassionate use of continuous prostacyclin in the management of secondary pulmonary hypertension: a case series. *Ann Intern Med* 1999; 130:740.

- [47] Rosenzweig EB, Kerstein D, Barst RJ. Long-term prostacyclin for pulmonary hypertension with associated congenital heart defects. *Circulation* 1999; 99:1858.
- [48] Humbert M, Sanchez O, Fartoukh M, et al. Short-term and long-term epoprostenol (prostacyclin) therapy in pulmonary hypertension secondary to connective tissue diseases: results of a pilot study. *Eur Respir J* 1999; 13:1351.
- [49] Tapson VF, Gomberg-Maitland M, McLaughlin VV, et al. Safety and efficacy of IV treprostinil for pulmonary arterial hypertension: a prospective, multicenter, open-label, 12-week trial. *Chest* 2006; 129:683.
- [50] Simonneau G, Barst RJ, Galie N, et al. Continuous subcutaneous infusion of treprostinil, a prostacyclin analogue, in patients with pulmonary arterial hypertension: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:800.
- [51] Barst RJ, Galie N, Naeije R, et al. Long-term outcome in pulmonary arterial hypertension patients treated with subcutaneous treprostinil. *Eur Respir J* 2006; 28:1195.
- [52] Benza RL, Rayburn BK, Tallaj JA, et al. Treprostinil-based therapy in the treatment of moderate-to-severe pulmonary arterial hypertension: long-term efficacy and combination with bosentan. *Chest* 2008; 134:139.
- [53] Benza RL, Tapson VF, Gomberg-Maitland M, et al. One-year experience with intravenous treprostinil for pulmonary arterial hypertension. *J Heart Lung Transplant* 2013; 32:889.
- [54] Tapson VF, Torres F, Kermeen F, et al. Oral treprostinil for the treatment of pulmonary arterial hypertension in patients on background endothelin receptor antagonist and/or phosphodiesterase type 5 inhibitor therapy (the FREEDOM-C study): a randomized controlled trial. *Chest* 2012; 142:1383.
- [55] Jing ZC, Parikh K, Pulido T, et al. Efficacy and safety of oral treprostinil monotherapy for the treatment of pulmonary arterial hypertension: a randomized, controlled trial. *Circulation* 2013; 127:624.

- [56] Olschewski H, Simonneau G, Galiè N, et al. Inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 2002;347:322.
- [57] Kawut SM, Bagiella E, Lederer DJ, Shimbo D, Horn EM, Roberts KE, et al. Randomized clinical trial of aspirin and simvastatin for pulmonary arterial hypertension: ASA-STAT. *Circulation* 2011;123(25):2985-93.
- [58] Ghofrani HA, Galie N, Grimminger F, Grunig E, Humbert M, Jing ZC, et al. Riociguat for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2013;369(4):330-40.
- [59] Ghofrani HA, D'Armini AM, Grimminger F, Hoeper MM, Jansa P, Kim NH, et al. Riociguat for the treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 2013;369(4):319-29.
- [60] Hoeper MM, Barst RJ, Bourge RC, Feldman J, Frost AE, Galie N, et al. Imatinib mesylate as add-on therapy for pulmonary arterial hypertension: results of the randomized IMPRES study. *Circulation* 2013 Mar 12;127(10):1128-38.
- [61] Galiè N1, Manes A, Negro L, Palazzini M, Bacchi-Reggiani ML, Branzi A. A meta-analysis of randomized controlled trials in pulmonary arterial hypertension. *Eur Heart J*. 2009;30(4):394-403.
- [62] Macchia A, Mariani J, Comignani PD, Tognoni G. Clinical trials using vasodilators in pulmonary arterial hypertension: where do we go from here? *Rev Recent Clin Trials*. 2011;6(3):228-34.
- [63] Alejandro Macchia, Roberto Marchioli, Gianni Tognoni, Marco Scarano, RosaMaria Marfisi, Luigi Tavazzi, et al. Systematic Review of Trials using Vasodilators in Pulmonary Arterial Hypertension: Why a New Approach is Needed. *Am Heart J*. 2010;159(2):245-257.
- [64] Voelkel NF, Tudor RM. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: a model for what human disease? *J Clin Invest* 2000;106(6):733-8.

- [65] Stenmark KR, Fagan KA, Frid MG. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. *Circ Res* 2006;99(7):675-91.
- [66] Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, Mooi WJ, McMurtry IF. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009;297(6):L1013-L1032.
- [67] Firth AL, Mandel J, Yuan JX. Idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Dis Model Mech* 2010;3(5-6):268-73.
- [68] Zaiman A, Fijalkowska I, Hassoun PM, Tudor RM. One hundred years of research in the pathogenesis of pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;33(5):425-31.
- [69] Gomez-Arroyo JG, Farkas L, Alhussaini AA, Farkas D, Kraskauskas D, Voelkel NF, et al. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012;302(4):L363-L369.
- [70] Rosenberg HC, Rabinovitch M. Endothelial injury and vascular reactivity in monocrotaline pulmonary hypertension. *Am J Physiol* 1988;255(6 Pt 2):H1484-H1491.
- [71] Wilson DW, Segall HJ, Pan LC, Dunston SK. Progressive inflammatory and structural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline-treated rats. *Microvasc Res* 1989;38(1):57-80.
- [72] Meyrick BO, Reid LM. Crotalaria-induced pulmonary hypertension. Uptake of 3H-thymidine by the cells of the pulmonary circulation and alveolar walls. *Am J Pathol* 1982;106(1):84-94.
- [73] Kay JM, Harris P, Heath D. Pulmonary hypertension produced in rats by ingestion of *Crotalaria spectabilis* seeds. *Thorax* 1967;22(2):176-9.
- [74] Miyauchi T, Yorikane R, Sakai S, Sakurai T, Okada M, Nishikibe M, et al. Contribution of endogenous endothelin-1 to the progression of cardiopulmonary alterations in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circ Res* 1993;73(5):887-97.

- [75] Roth RA, Dotzlauf LA, Baranyi B, Kuo CH, Hook JB. Effect of monocrotaline ingestion on liver, kidney, and lung of rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1981;60(2):193-203.
- [76] Chen MY, Cai JT, Du Q, Wang LJ, Chen JM, Shao LM. Reliable experimental model of hepatic veno-occlusive disease caused by monocrotaline. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2008;7(4):395-400.
- [77] Nedvig K, Weber G, Nemeth J, Kovacs K, Reglodi D, et al. (2012) Changes of PACAP immunoreactivities and cytokine levels after PACAP-38 containing intestinal preservation and autotransplantation. *J Mol Neurosci.* 48(3):788-94.
- [78] Tensen CP, Flier J, Van Der Raaij-Helmer EM, Sampat-Sardjoeopersad S, Van Der Schors RC, Leurs R, et al. "Human IP-9: A keratinocyte-derived high affinity CXC-chemokine ligand for the IP-10/Mig receptor (CXCR3)". *The Journal of Investigative Dermatology* 1999;112 (5): 716–22.
- [79] Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994;12:141-79.
- [80] Thanos D, Maniatis T. NF-kappa B: a lesson in family values. *Cell* 1995;80(4):529-32.
- [81] Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell.* 2002;109 Suppl:S81-96.
- [82] Raychaudhuri B, Dweik R, Connors MJ, Buhrow L, Malur A, Drazba J, et al. Nitric oxide blocks nuclear factor-kappaB activation in alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;21(3):311-6.
- [83] Wang Q, Zuo XR, Wang YY, Xie WP, Wang H, Zhang M. Monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension is attenuated by TNF-alpha antagonists via the suppression of TNF-alpha expression and NF-kappaB pathway in rats. *Vascul Pharmacol* 2013;58(1-2):71-7.

- [84] Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(1): 49–62.
- [85] Fan Z, Li C, Qin C, Xie L, Wang X, Gao Z, et al. Role of the PI3K/AKT pathway in modulating cytoskeleton rearrangements and phenotype switching in rat pulmonary arterial vascular smooth muscle cells. *DNA Cell Biol* 2014;33(1):12-9.
- [86] Miura T, Tanno M. Mitochondria and GSK-3beta in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Drugs Ther* 2010;24(3):255-63.
- [87] Marathe N, Rangaswami H, Zhuang S, Boss GR, Pilz RB. Pro-survival Effects of 17b-Estradiol on Osteocytes are Mediated by Nitric Oxide/cGMP via Differential Actions of cGMP-dependent Protein Kinases I and II. *J Biol Chem*. 2012;287(2): 978–988.
- [88] Zeng Z, Li Y, Jiang Z, Wang C, Li B, Jiang W. The extracellular signal-regulated kinase is involved in the effects of sildenafil on pulmonary vascular remodeling. *Cardiovasc Ther* 2010;28(1):23-9.
- [89] Li B, Yang L, Shen J, Wang C, Jiang Z. The antiproliferative effect of sildenafil on pulmonary artery smooth muscle cells is mediated via upregulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and degradation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation. *Anesth Analg* 2007;105(4):1034-41.
- [90] Lu J, Shimpo H, Shimamoto A, Chong AJ, Hampton CR, Spring DJ, et al. Specific inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase with FR167653 attenuates vascular proliferation in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004;128(6):850-9.
- [91] Goldhaber SZ. Pulmonary embolism. *N Engl J Med* 1998; 339: 93-104.
- [92] Stratmann G, Gregory GA. Neurogenic and humoral vasoconstriction in acute pulmonary thromboembolism. *Anesth Analg* 2003;97:341-54.

- [93] Goldhaber SZ, Kessler CM, Heit JA et al: Recombinant tissue-type plasminogen activator versus a novel dosing regiment of urokinase in acut pulmonary embolism: a randomized controlled multicenter trial. J Am Coll Cardiol 1992; 20: 24-30.
- [94] Ozier Y, Dubourg O, Farcot JC et al: Circulatory failure in acut pulmonary embolism. Intens Care Med 1984; 10: 91-7.
- [95] Mercat A, Diehl JL, Meyer G et al: Hemodynamic effects of fluid loading in acut pulmonary mebolism. Crit Care Med 1999; 27: 540-4.
- [96] Jardin F, Genevray B, Brun-Ney D et al: Dobutamine. A hemodynamic evaluation in pulmonary embolism shock. Crit Care Med 1985; 13: 1009-12.
- [97] Boulain T, Lanotte R et al: Efficacy of epinephrine therapy in shock complicating pulmonary embolism. Chest 1993; 104: 300-2.
- [98] Büchner S, Pfeiffer B, Hachenberg T: Lungenembolie (CME 1/2/2005). Anasth Intensivmed 2005; 46: 9-22.
- [99] Vieillard-Baron A, Page B, Augarde R et al: Acute cor pulmonale in massive pulmonary embolism: incidence, echocardiographic pattern, clinical implications and recovery rate. Intens Care Med 2001; 27: 1481-1486.
- [100] Szold O, Khoury W, Biderman P, Klausner JM et al: Inhaled nitric oxide improves pulmonary functions following massive pulmonary embolism: a report of four patients and review of the literature. Lung 2006; 184 (1):1-5.
- [101] Meneveau N, Ming LP et al: In hospital and long- term outcome after sub-massive and massive pulmonary embolism submitted to thrombolytic therapy. Eur Heart J 2003; 24: 1447-54.
- [102] Magyar konszenzus nyilatkozat. Szerkesztő: Pfliegler György. Összeállítók: Magyar Thrombosis és Haemostaseologiai Társaság szakértői. Harmadik, javított, bővített kiadás 2006.



[103] Goldhaber SZ: Thrombolysis in pulmonary embolism: A large-scale clinical trial is overdue. *Circulation* 2001; 104: 2876-2878.

[104] Konstantinides S: The case for thrombolysis in acute major pulmonary embolism: hemodynamic benefits and beyond. *Intens Care Med* 2002; 28: 1547-1551.

[105] British Thoracic Society guidelines for management of suspected acute pulmonary embolism. British Thoracic Society Standards of Care Committee Pulmonary Embolism Guideline Development Group. *Thorax* 2003; 58: 470-484.

[106] Konstantinides S, Tiede N, Geibel A et al: Comparison of alteplase versus heparin for resolution of major pulmonary embolism. *Am J Cardiol* 1998; 82: 966-970.

[107] Dalla-Volta S, Palla A, Santilicandro A et al: PAIMS 2: alteplase combined with heparin in the treatment of acute pulmonary embolism. Plasminogen activator Italian multicenter study 2. *J Am Coll Cardiol* 1992; 20: 520-6.

[108] Tibbitt DA, Davies JA, Anderson JA et al: Comparison by controlled clinical trial of streptokinase and heparin in treatment of life-threatening pulmonary embolism. *Brit Med J* 1974; 1: 343-7.

[109] Goldhaber SZ, Haire WD, Feldstein ML et al: Alteplase versus heparin in acute pulmonary embolism: randomised trial assessing right-ventricular function and pulmonary perfusion. *Lancet* 1993; 341: 507-11.

[110] Jerjes-Sanchez C, Ramirez-Rivera A, De Lourdes Garcia M et al: Streptokinase and Heparin versus heparin alone in massive pulmonary embolism: A randomized controlled trial. *J Thromb Thrombolys* 1995; 2: 227-9.

[111] Konstantinides SV, Torbicki A, Agnelli G, Danchin N, Fitzmaurice D, Galiè N, et al. Task Force for the Diagnosis and Management of Acute Pulmonary Embolism of the European Society of Cardiology (ESC). 2014 ESC guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism. *Eur Heart J*. 2014;35(43):3033-69.

- [112] Meyer G, Vicaut E, Danays T, Agnelli G, Becattini C, Beyer-Westendorf J, et al. PEITHO Investigators.: N Engl J Med 2014; 370: 1402-11.
- [113] Doerge H, Schoendube FA, Voss M et al: Surgical therapy of fulminant pulmonary embolism: early and late results. Thorac Cardiovasc Surg 1999; 47: 9-13.
- [114] Tadavarty SM, Castaneda-Zuniga W, Salamonwitz E et al: Kimray Greenfield vena cava filters: percutaneous introduction. Radiology 1984; 151: 525-6.
- [115] Thery C, Asseman P, Amrouni N et al: Use of a new removable vena cava filter in order to prevent pulmonary embolism in patients submitted to thrombolysis. Eur Heart J 1990; 11: 334-41.
- [116] Rogers FB, Strindberg G, Shackford SR et al: Five year follow-up of prophylactic vena cava filters in high-risk trauma patients. Arch Surg 1998; 133: 406-11.
- [117] Geffroy F, Furber A, L'Hosta P et al: Very long-term outcome of 68 vena cava filters implanted percutaneously. Arch Mal Coeur Vaiss 2002; 95: 38-44.
- [118] Asch MR: Initial experience in humans with a new retrievable inferior cava filter. Radiology 2002; 225: 835-844.
- [119] Barritt DW, Jordan SC: Clinical features of pulmonary embolism. Lancet 1961; 1: 729-32.
- [120] Raschke RA, Reilly BM, Guidry JR et al: The weight-based heparin dosing nomogram compared with a standard care nomogram a randomized controlled trial. Ann Intern Med 1993; 119: 871-81.
- [121] The Columbus investigators. Low-molecular-weight heparin in the treatment of patient with venous thromboembolism. New Engl J Med 1997; 337: 657-62.

- [122] Simonneau G, Sors H, Charbonnier B et al: A comparison of low-molecular-weight heparin with unfractionated heparin for acute pulmonary embolism. *New Engl J Med* 1997; 337: 663-9.
- [123] Couturaud F, Julian JA, Kearon C: Low molecular weight heparin administered once versus twice daily in patients with venous thromboembolism: a meta-analysis. *Thromb Haemostasis* 2001; 86: 980-984.
- [124] Warkentin TF, Levin MN, Hirsh J et al: Heparin induced thrombocytopenia in patients treated with low molecular weight heparin or unfractionated heparin. *New Engl J Med* 1995; 332: 1330-5.
- [125] Kearon C, Gent M, Hirsh J et al: A comparison of three months of anticoagulation with extended anticoagulation for a first episode of idiopathic venous thromboembolism. *N Engl J Med* 1999; 340: 901-7.
- [126] Galie N, Torbicki A, Barst R, et al. Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension. The Task Force on Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2004; 25: 2243-78.
- [127] Muhl D, Furedi R, Cristofari J, et al. Evaluation of oxidative stress in the thrombolysis of pulmonary embolism. *J Thromb Thrombolysis* 2006; 22: 221-8.
- [128] Albelda SM, Smith CW, Ward PA. Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J* 1994; 8: 504-12.
- [129] Wagner JG, Roth RA. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol Rev* 2000; 52:349-74.
- [130] Fortuna GM, Figueiredo-Lopes L, Dias-Junior CA, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. A role for matrix metalloproteinase-9 in the hemodynamic changes following acute pulmonary embolism. *Int J Cardiol* 2007; 114: 22-7.

- [131] Chow AK, Cena J, Schulz R. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. *Br J Pharmacol* 2007; 152: 189-205.
- [132] Wang W, Sawicki G, Schulz R. Peroxynitrite-induced myocardial injury is mediated through matrix metalloproteinase-2. *Cardiovasc Res* 2002; 53: 165-74.
- [133] Alfonso-Jaume MA, Bergman MR, Mahimkar R, et al. Cardiac ischemia-reperfusion injury induces matrix metalloproteinase-2 expression through the AP-1 components FosB and JunB. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291: H1838-46.
- [134] Deschamps AM, Spinale FG. Pathways of matrix metalloproteinase induction in heart failure: bioactive molecules and transcriptional regulation. *Cardiovasc Res* 2006; 69: 666-76.
- [135] Cau SB, Guimaraes DA, Rizzi E, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate down-regulates vascular matrix metalloproteinases and ameliorates vascular dysfunction and remodelling in renovascular hypertension. *Br J Pharmacol* 2011; 164: 372-81.
- [136] Neto-Neves EM, Kiss T, Muhl D, Tanus-Santos JE. Matrix metalloproteinases as drug targets in acute pulmonary embolism. *Curr Drug Targets* 2013;14(3):344-52.
- [137] Palei AC, Zaneti RA, Fortuna GM, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Hemodynamic benefits of matrix metalloproteinase-9 inhibition by doxycycline during experimental acute pulmonary embolism. *Angiology* 2005; 56: 611-7.
- [138] Fortuna GM, Figueiredo-Lopes L, Dias-Junior CA, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. A role for matrix metalloproteinase-9 in the hemodynamic changes following acute pulmonary embolism. *Int J Cardiol* 2007; 114: 22-7.
- [139] Souza-Costa DC, Figueiredo-Lopes L, Alves-Filho JC, et al. Protective effects of atorvastatin in rat models of acute pulmonary embolism: involvement of matrix metalloproteinase-9. *Crit Care Med* 2007; 35: 239-45.
- [140] Eagleton MJ, Henke PK, Luke CE, et al. Inflammation and intimal hyperplasia associated with experimental pulmonary embolism. *J Vasc Surg* 2002; 36: 581-8.

- [141] Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2002; 37: 375-536.
- [142] Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 2002; 90: 251-62.
- [143] Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2002; 37: 375-536.
- [144] Souza-Costa DC, Zerbini T, Metzger IF, Rocha JB, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. L-Arginine attenuates acute pulmonary embolism-induced oxidative stress and pulmonary hypertension. *Nitric Oxide* 2005; 12: 9-14.
- [145] Neto-Neves EM, Dias-Junior CA, Uzuelli JA, et al. Sildenafil improves the beneficial hemodynamic effects exerted by atorvastatin during acute pulmonary thromboembolism. *Eur J Pharmacol* 2011; 670: 554-60.
- [146] Dias-Junior CA, Neto-Neves EM, Montenegro MF, Tanus-Santos JE. Hemodynamic effects of inducible nitric oxide synthase inhibition combined with sildenafil during acute pulmonary embolism. *Nitric Oxide* 2010; 23: 284-8.
- [147] Dias-Junior CA, Sertorio JT, Tanus-Santos JE. Aminoguanidine produces beneficial haemodynamic effects in a canine model of acute pulmonary thromboembolism. *Acta Physiol (Oxf)* 2007; 191:189-96.
- [148] Dias-Junior CA, Cau SB, Oliveira AM, et al. Nitrite or sildenafil, but not BAY 41-2272, blunt acute pulmonary embolism-induced increases in circulating matrix metalloproteinase-9 and oxidative stress. *Thromb Res* 2009; 124: 349-55.

- [149] Souza-Costa DC, Zerbini T, Palei AC, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. L-arginine attenuates acute pulmonary embolism-induced increases in lung matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9. *Chest* 2005; 128: 3705-10.
- [150] Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 2002; 90: 251-62.
- [151] Jeffery TK, Morrell NW. Molecular and cellular basis of pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Prog Cardiovasc Dis* 2002; 45: 173-202.
- [152] Fernandez-Patron C, Radomski MW, Davidge ST. Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. *Circ Res* 1999; 85: 906-11.
- [153] Tanus-Santos JE, Gordo WM, Udelsmann A, Cittadino MH, Moreno H, Jr. Nonselective endothelin-receptor antagonism attenuates hemodynamic changes after massive pulmonary air embolism in dogs. *Chest* 2000; 118: 175-9.
- [154] Tanus-Santos JE, Gordo WM, Udelsmann A, Moreno H, Jr. The hemodynamic effects of endothelin receptor antagonism during a venous air infusion in dogs. *Anesth Analg* 2000; 90: 102-6.
- [155] Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2002; 37: 375-536.
- [156] Fernandez-Patron C, Radomski MW, Davidge ST. Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. *Circ Res* 1999; 85: 906-11.
- [157] Fernandez-Patron C, Stewart KG, Zhang Y, Koivunen E, Radomski MW, Davidge ST. Vascular matrix metalloproteinase-2-dependent cleavage of calcitonin gene-related peptide promotes vasoconstriction. *Circ Res* 2000; 87: 670-6,
- [158] Barnes PJ, Liu SF. Regulation of pulmonary vascular tone. *Pharmacol Rev* 1995; 47: 87-131.

- [159] Martinez A, Oh HR, Unsworth EJ, et al. Matrix metalloproteinase-2 cleavage of adrenomedullin produces a vasoconstrictor out of a vasodilator. *Biochem J* 2004; 383: 413-8.
- [160] Montaner J, Alvarez-Sabin J, Molina CA, et al. Matrix metalloproteinase expression is related to hemorrhagic transformation after cardioembolic stroke. *Stroke* 2001; 32: 2762-7.
- [161] Rosell A, Cuadrado E, Ortega-Aznar A, Hernandez-Guillamon M, Lo EH, Montaner J. MMP-9-positive neutrophil infiltration is associated to blood-brain barrier breakdown and basal lamina type IV collagen degradation during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke. *Stroke* 2008; 39: 1121-6.
- [162] Cuadrado E, Ortega L, Hernandez-Guillamon M, et al. Tissue plasminogen activator (t-PA) promotes neutrophil degranulation and MMP-9 release. *J Leukoc Biol* 2008; 84: 207-14.
- [163] Muhl D, Ghosh S, Uzuelli JA, Lantos J, Tanus-Santos JE. Increases in circulating matrix metalloproteinase-9 levels following fibrinolysis for acute pulmonary embolism. *Thromb Res* 2010; 125:549-53.
- [164] Arcasoy SM, Kreit JW. Thrombolytic therapy of pulmonary embolism: a comprehensive review of current evidence. *Chest* 1999; 115: 1695-707.
- [165] Montaner J, Alvarez-Sabin J, Molina CA, et al. Matrix metalloproteinase expression is related to hemorrhagic transformation after cardioembolic stroke. *Stroke* 2001; 32: 2762-7.
- [166] Rosell A, Cuadrado E, Ortega-Aznar A, Hernandez-Guillamon M, Lo EH, Montaner J. MMP-9-positive neutrophil infiltration is associated to blood-brain barrier breakdown and basal lamina type IV collagen degradation during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke. *Stroke* 2008; 39: 1121-6.
- [167] Ning M, Furie KL, Koroshetz WJ, et al. Association between tPA therapy and raised early matrix metalloproteinase-9 in acute stroke. *Neurology* 2006; 66: 1550-5.

- [168] Machado LS, Sazonova IY, Kozak A, et al. Minocycline and tissue-type plasminogen activator for stroke: assessment of interaction potential. *Stroke* 2009; 40: 3028-33.
- [169] Sumii T, Lo EH. Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis-associated hemorrhagic transformation after embolic focal ischemia in rats. *Stroke* 2002; 33: 831-6.
- [170] Murata Y, Rosell A, Scannevin RH, Rhodes KJ, Wang X, Lo EH. Extension of the thrombolytic time window with minocycline in experimental stroke. *Stroke* 2008; 39: 3372-7.
- [171] Herve P, Launay JM, Scrobohaci ML, et al. Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension. *Am J Med* 1995; 99:249-54.
- [172] Stewart DJ, Levy RD, Cernacek P, Langleben D. Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Ann Intern Med* 1991; 114: 464-9.
- [173] Watts JA, Gellar MA, Fulkerson MB, et al: Arginase depletes plasma l-arginine and decreases pulmonary vascular reserve during experimental pulmonary embolism. *Pulm Pharmacol Ther* 2012; 25:48–54.
- [174] Watts JA, Marchick MR, Gellar MA, et al: Up-regulation of arginase II contributes to pulmonary vascular endothelial cell dysfunction during experimental pulmonary embolism. *Pulm Pharmacol Ther* 2011; 24:407–413.
- [175] Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE, et al: Cell free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nat Med* 2002; 8:1383–1389.
- [176] Donadee C, Raat NJ, Kanas T, et al: Nitric oxide scavenging by red blood cell microparticles and cell-free hemoglobin as a mechanism for the red cell storage lesion. *Circulation* 2011; 124:465–476.
- [177] Gladwin MT, Crawford JH, Patel RP: The biochemistry of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin: role in blood flow regulation. *Free Radic Biol Med* 2004; 36:707–717.



- [178] Kato GJ, Gladwin MT: Evolution of novel small-molecule therapeutics targeting sickle cell vasculopathy. *JAMA* 2008; 300:2638–2646.
- [179] Rother RP, Bell L, Hillmen P, et al: The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: A novel mechanism of human disease. *JAMA* 2005; 293:1653–1662].
- [180] Dias-Junior CA, Vieira TF, Moreno H Jr, et al: Sildenafil selectively inhibits acute pulmonary embolism-induced pulmonary hypertension. *Pulm Pharmacol Ther* 2005; 18:181–186.
- [181] Dias-Junior CA, Tanus-Santos JE: Hemodynamic effects of sildenafil interaction with a nitric oxide donor compound in a dog model of acute pulmonary embolism. *Life Sci* 2006; 79:469–474.
- [182] Souza-Silva AR, Dias-Junior CA, Uzuelli JA, et al: Hemodynamic effects of combined sildenafil and L-arginine during acute pulmonary embolism-induced pulmonary hypertension. *Eur J Pharmacol* 2005; 524:126–131.
- [183] Bonatti HJ, Harris T, Bauer T, et al: Transfemoral catheter thrombolysis and use of sildenafil in acute massive pulmonary embolism. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2010; 24:980–984.
- [184] Bonatti HJ, Sawyer RG, Hagspiel KD. Use of sildenafil in a liver transplant recipient with acute pulmonary embolism. *Eur Surg* 2010;42(1):65–67.
- [185] Ganière V, Feihl F, Tagan D: Dramatic beneficial effects of sildenafil in recurrent massive pulmonary embolism. *Intensive Care Med* 2006;32:452–454.
- [186] Lewis GD, Bloch KD, Semigran MJ: Pulmonary thromboembolism superimposed on a congenital ventricular septal defect in a 50-yearold man inhaled nitric oxide and sildenafil to the rescue. *Cardiol Rev* 2004; 12:188–190.

- [187] Sandrim VC, Montenegro MF, Palei AC, et al: Increased circulating cell-free hemoglobin levels reduce nitric oxide bioavailability in preeclampsia. *Free Radic Biol Med* 2010; 49:493–500.
- [188] Vermeulen Windsant IC, de Wit NC, Sertorio JT, et al: Blood transfusions increase circulating plasma free hemoglobin levels and plasma nitric oxide consumption: a prospective observational pilot study. *Crit Care* 2012; 16:R95.
- [189] Gladwin MT, Kim-Shapiro DB: Storage lesion in banked blood due to hemolysis-dependent disruption of nitric oxide homeostasis. *Curr Opin Hematol* 2009; 16:515–523.
- [190] Kim-Shapiro DB, Lee J, Gladwin MT: Storage lesion: Role of red blood cell breakdown. *Transfusion* 2011; 51:844–851.
- [191] Sakka SG1, Reuter DA, Perel A. The transpulmonary thermodilution technique. *J Clin Monit Comput.* 2012;26(5):347-53.
- [192] Torbicki A, Perrier A, Konstantinides S, et al; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG): Guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism: the Task Force for the Diagnosis and Management of Acute Pulmonary Embolism of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2008; 29:2276–2315.
- [193] Martin M, Fiebach BJ: Short-term ultrahigh streptokinase treatment of chronic arterial occlusions and acute deep vein thromboses. *Semin Thromb Hemost* 1991; 17:21–38.

## **Publikációs lista**

### **Értekezés alapjául szolgáló közlemények:**

1. Kiss T, Kovacs K, Komocsi A, Tornyos 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  
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 resveratrol on monocrotaline induced pulmonary hypertension. HMAA Summer Conference Balatonfüred, 2015, August 21 - 22, 2015
3. Roxána Ritz, A Soti, 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 Intenzív 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, 2007.10.07-2007.10.10. 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 citokine 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, hogy csatlakozzam kutatócsoportjához, 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 a családomat, akik bátorítottak, támogattak és kiálltak mellettem ezen az úton.