

# Lehetőségek a szív- és érrendszeri iszkémia-reperfúziós károsodás gyógyszeres befolyásolásában

## Doktori Tézisek

**Dr. Kriebitzsch-Barnucz Enikő**

Semmelweis Egyetem  
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Szabó Gábor, med. habil., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók:

Dr. Miklós Zsuzsanna, Ph.D., egyetemi adjunktus

Dr. Csont Tamás, med. habil., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Monos Emil, D.Sc., professor emeritus

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Ivanics Tamás, med. habil., egyetemi docens

Dr. Csonka Csaba, med. habil., tud. főmunkatárs

Budapest  
2017

# 1. BEVEZETÉS

Az iszkémia-reperfúziós (IR)-károsodás és a hipoxia mértékének csökkentése a mai napig jelentős problémát képvisel az intervenciós kardiológiában, illetve a szívsebészeti beavatkozások során. A kardioprotekció célja az IR-károsodás redukálása, mely magába foglalja az infarktus területének csökkentését, a súlyos ritmuszavarok megelőzését, illetve az ép szívizomzat kontraktilitásának megőrzését. Annak ellenére, hogy a kardioprotekció a mai napig intenzív kutatási téma, további kutatások szükségesek figyelembe véve, hogy az iszkémiás szívbetegség az fejlett országokban továbbra is vezető haláloknak számít.

Ezen tézisek tárgya ennek tükrében az IR-károsodás megelőzésének lehetőségei a kardiovaszkuláris rendszerben, különös tekintettel új terápiás stratégiákra, melyek az iszkémia és a reperfúzió okozta szervkárosodás, illetve funkcióromlás megelőzését célozzák.

## 1.1. Hipoxiás adaptációs mechanizmusok

Az emlősökben oxigénérzékelő mechanizmus segíti a sejtek adaptációját hipoxiás körülményekhez. Az evolúció során különböző sejtcsoportok specializálódtak az oxigénnyomás érzékelésére (karotisz, tüdőartéria, mellékvese chromaffin sejtjei). Ilyen szerepe van sejtszinten a hipoxia indukálta faktornak (HIF) is, mely a sejtek oxigénérzékelésében vesz részt. A HIF egy heterodimer molekula és transzkripciós faktorként működik, mely számos génaktiváláson keresztül hozzájárul a sejtek jobb oxigén-, illetve tápanyag ellátottságához. Két alegysége van: a folyamatosan expresszált HIF $\beta$ , illetve a szabályozó HIF $\alpha$  alegység, melynek expressziója oxigénfüggő és főként poszttranszlációval szabályozott. A HIF expresszióját a prolil hidroxiláz (PHD) nevű enzim szabályozza, mely normál oxigénnyomás esetén a HIF $\alpha$  alegység lebontásához járul hozzá, hipoxia esetén azonban a PHD gátlódik, a HIF $\alpha$  nem bomlik le és a sejtmagba transzlokálódva a HIF $\beta$  alegységgel a DNS-en az úgynevezett HRE (hipoxia válasz elem) - régióhoz kötődve adaptációs jelátviteli folyamatokat indít be a génexpresszió regulálásán keresztül. Nem teljesen feltárt módon a HIF aktivációja védi a sejteket az IR-károsodással szemben, a pozitív hatás

hátterében számos mechanizmus, mint például antioxidánsok, angiogenezis, sejthalál, illetve antiapoptotikus útvonalak szabályozása állnak. Kardiovaszkuláris szempontból a HIF lehetséges védő szerepét alátámasztják azok az eredmények, ahol szívinfarktus modelljében a HIF1 $\alpha$  overexpressziója az infarktus méretét csökkentette, javította a bal kamrai funkciót illetve javította a szívizom perfúzióját. A PHD gátló DMOG (dimetiloxallilglicin) kedvező hatása számos patofiziológiás folyamatban (mint például szívinfarktus, stroke, vese-ill. májkárosodás, perifériás érbetegség, súlyos anémia) igazolt. Kísérleteink során a PHD gátló szer (DMOG) hatását vizsgáltuk, mely normoxiás körülmények között képes HIF1 expresszió fokozására ezzel a sejteket előkészítve egy adaptációs válaszra hipoxiás körülmények során.

## **1.2. A cink szerepe IR-károsodás során**

A cink homeosztázis zavara, és az ezáltal okozott oxidatív stressz számos patofiziológiás folyamatban (pl. csökkent réz-cink szuperoxid diszmutáz a vörösvérsejtekben, emelkedett LDL-koleszterin szint, csökkent methionin és leucin enkefalin, szívfunkciós zavarok) megfigyelt jelenség. Makromolekulák, mint például a DNS, fehérjék vagy nukleotidok, illetve glükóz rendelkeznek egy réz-vagy cinkkötő alegységgel mely szabadgyökképződéshez vezet Fenton-reakció során. A cink szívizomvédő szerepe főként a redox homeosztázis befolyásolásán keresztül valósul meg, így például antagonistája a vasnak illetve réznek, és ezáltal a hidroxil gyökképződést gátolja. Másik fontos szerepe, hogy enzimekben kosubsztrátként (szuperoxid diszmutáz) szerepel és ezen enzimek működése a sejtek oxidatív stresszhez való adaptációjához járulnak hozzá. Emellett számos enzim megfelelő működéséhez járul hozzá a cink (pl. delta-aminolevulinsav-dehidratáz, dihidroorotáz, tubulin) többek között a szulfhidril csoport védelmével. A cink szerepe sejt- és kardioprotektív szerepével kapcsolatban számos közlemény jelent meg az utóbbi évtizedekben. Ezen publikációk közül némelyek a cink és cink komplexek (cink komplexei pl. hisztidináttal, karnozinnal, aszpartáttal) kedvező hatásáról számolnak be. A hatásmechanizmus teljes körű megértése viszont a biológia reakciók sokrétűsége miatt nem egyszerű, az egyetlen közös ezekben a tanulmányokban a cink jelenléte. Ezen

tézisben a Q50 nevű vaskelátor és cink-komplex vegyület (mely a 8-hidoxikinolonnal rokon) lehetséges kedvező szerepét vizsgáltuk erek IR-károsodása során.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Kísérleteink során az erek, illetve a szív IR-károsodása során fellépő patofiziológiás változásait, illetve az ezek gyógyszeres befolyásolásának hatásait tanulmányoztuk kisállat-modellekben. Kísérleteink fókuszában a HIF útvonal szerepe az erekben és cink-komplexek antioxidáns hatásai IR során. Ezen kísérletek az említett jelátviteli utak jobb megértését célozzák, illetve hozzájárulhatnak esetlegesen újabb terápiás lehetőségekhez.

Az egyik célja a tézisnek a HIF szerepének megértése erek hideg iszkémiás, meleg reperfüziós károsodása során patkány aortákon. Az ereket DMOG-gal előkezeltük, mely a PHD gátlásán keresztül HIF stabilizációhoz vezetett normoxiás körülmények között, ezzel előkészítve az ereket az IR-károsodásra. A reperfüziós károsodás szimulálásához hipokloritot adtunk az erekhez. Az így előidézett érkárosodást illetve a kezelés hatásait érfunkciós mérésekkel vizsgáltuk. A hatásmechanizmus jobb megértéséhez kiegészítésül sejtkultúrák kísérleteket, szövettani vizsgálatokat és molekuláris vizsgálatokat végeztünk.

A tézis másik fő témája a Q50 nevű, vaskelátor és cink-komplex vegyület hatásának megértése. Ennek során patkányokban regionális- és globális miokardiális iszkémiát idéztünk elő kísérletes körülmények között. A kísérleteink során a szívfunkciós paramétereket mértük majd végezten a sejtszintű és molekuláris változásokat vizsgáltuk kezelésünk hatásosságának mérésére.

### 3. MÓDSZEREK

#### 3.1. A PHD gátlás hatása az érfunkcióra

##### 3.1.1. Állatok

Kísérleteinkhez Sprague-Dawley patkányokat (250-350 g, hím) használtunk, melyeket véletlenszerűen soroltunk az egyes kísérleti csoportokba.

##### 3.1.2. Kísérleti csoportok

Az érfunkciós kísérletekben a következő három csoport vett részt: 1) *Kontroll* csoport, ezekben az izolált erek közvetlenül a preparálás után a szervfürdős kísérletben vettek részt; 2) Nátrium-hipoklorit csoport (*NaOCl*), az ereket a preparálást követően 24 órán át 4 °C-on tároltuk; 3) *DMOG* csoport, az ereket a preparálást követően 24 órán át 4 °C-on tároltuk *DMOG* ( $10^{-4}$  M) oldatban.

Az izolált vaszkuláris simaizomsejteken sejt kultúrák kísérletekben a következő csoportok vettek részt: 1) *Kontroll* csoport, hideg iszkémia és meleg reperfüziót nem elszenvedett sejtek. 2) Nátrium-klorid csoport (*NaCl*), a sejteket 24 órán át 4 °C-on tároltuk, majd 6 óra meleg perfúzió következett normál médiummal. 3) *DMOG* csoport, a sejteket 24 órán át 4 °C-on tároltuk, majd 6 óra meleg perfúzió következett médiummal mely *DMOG*-gal volt kiegészítve ( $10^{-3}$  M).

##### 3.1.3. Az *in vitro* hideg iszkémiás tárolás és meleg-reperfüziós érkárosodás modellezése

24 órás hideg tárolás után az izolált patkány aortagyűrűk vazokonstriktív képességét, valamint endotélfüggő- és nem endotélfüggő vazorelaxációját az alábbiakban részletesen leírt módon vizsgáltuk. Az endotél oxidatív sérülését az érgyűrűk *NaOCl*-val való 30 perces inkubálásával váltottuk ki a fenilefrin kontrakció előtt.

##### 3.1.3.1. *In vitro* vaszkuláris funkcionális mérések

Az elaltatott patkányok mellkasi aortáját bilaterális thorakotómia után eltávolítottuk és 4°C-os Krebs-Henseleit oldatba helyeztük, szteromikroszkóp alatt eltávolítottuk a periaortális kötőszöveteket. Az így előkészített aortát 4 mm széles gyűrűkre

metszettük, majd a gyűrűket izolált szervfürdő erőmérő berendezéséhez kapcsoltuk fémhorgok segítségével. A szervfürdő folyadékterében az aortagyűrűk 37 °C-os, karbogéngázzal átbuborékolgatott Krebs-Henseleit-oldatban helyezkedtek el a kísérlet alatt. Az aortagyűrűk által kifejtett izometriás erőket speciális erőmérő berendezéssel és a hozzákapcsolt szoftverrel regisztráltuk. A kísérlet kezdetén az aortagyűrűket 2 g passzív előfeszítés alá helyeztük és 60 percig equilibráltuk. Kálium-klorid (KCl, 100 mM) hozzáadása után detektáltuk az érgyűrűk által kifejtett maximális erőket, majd kimosási fázis következett a kezdeti passzív előfeszítés (2 g) eléréséig. Fenilefrin ( $10^{-6}$  M) hozzáadásával az érgyűrűk kontrakcióját váltottuk ki, majd a stabil platófázis elérésekor, dóziszfüggő relaxációs válaszokat váltottunk ki az endotélfüggő vazorelaxáns acetilkolin, és a nem endotélfüggő vazorelaxáns nátrium-nitroprusszid emelkedő koncentrációinak hozzáadásával. A kontrakciós válaszokat grammban, a relaxációs válaszokat a fenilefrin-kontrakcióhoz viszonyítottan, százalékban fejeztük ki.

#### **3.1.4. Hideg iszkémiás tárolás és meleg reperfúziós károsodás izolált simaizomsejteken**

Patkányok aortáiból vaszkuláris simaizomsejteket izoláltunk, majd médiummal reszuszpendáltuk és inkubáltuk. A kísérlet kezdetekor a médiumot lecseréltük és NaCl oldatra vagy pedig DMOG-gal kiegészített NaCl oldatra és 24 órára 4 °C-on tovább inkubáltuk. A hideg inkubálást követően ismét normál médium volt a sejtekhez adva, és a reperfúzió szimulálása végett további 6 órát 37 °C-on voltak inkubálva.

#### **3.1.5. Az mRNS-expresszió meghatározása**

Kísérleteink végén az izolált aortagyűrűkből azonnal, 2, 4 illetve 6 óra után, illetve a simaizom sejt kultúra sejtjeiből mRNS-t izoláltunk, majd a hem-oxigenáz (HO-1) expresszióját határoztuk meg. A minták relatív mRNS expresszióját GAPDH-ra normalizáltuk.

### **3.1.6. Statisztika**

Minden adatot átlagérték  $\pm$  S.E.M. formájában adtuk meg. A csoportok adatait Student-t-teszttel illetve varianciaanalízissel (ANOVA) és Bonferroni-teszttel hasonlítottuk össze. A csoportok között megfigyelt különbségeket  $p < 0,05$  értékek mellett tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

## **3.2. Q50 hatásai az IR állatkísérletes modelljében**

### **3.2.1. A regionális miokardiális IR kísérletes modellje**

A hím Sprague-Dawley patkányokat pentobarbitál intraperitoneális injekciójával elaltattuk majd tracheotómiát követően intubáltuk és kisállat lélegeztetőgéppel lélegeztettük. A mellkast bal oldali thorakotómiával megnyitottuk, majd perikardiotómia után a bal leszálló koronáriát lekötöttük 45 percre, majd a lekötés feloldásával megkezdődött a 24 órás reperfúzió. Az ál operált (sham) állatok esetében a koronária körül a fonál nem volt megszorítva.

#### **3.2.1.1. Kísérleti csoportok**

A patkányokat 4 csoportba osztottuk: 1) Áloperált állatokat (*Sham* csoport) a Q50 oldószerevel kezeltük és a koronária körüli fonalat nem kötöttük meg. 2) *Sham+Q50* csoport, a patkányokat Q50-nel kezeltük és a koronária körüli fonalat nem kötöttük meg. 3) *I/R* csoport, a patkányokat oldószerevel kezeltük de IR-t szenvedtek el; 4) *I/R+Q50* csoport, Q50 kezelés és IR-nak kitett csoport. Az oldószert illetve Q50-t az állatok intravénásan kapták a reperfúzió kezdete előtt 5 perccel.

#### **3.2.1.2. *In vivo* hemodinamikai mérések**

A 24 órás reperfúziós periódus elteltével az állatokat pentobarbitállal elaltattuk, majd tracheotómiát követően mesterségesen lélegeztettük. A szívfunkció mérésére egy katétert vezetünk a karotiszon keresztül a bal kamrába. Az így regisztrált nyomás és térfogat adatokból részben további számításokkal megkaptuk a szív bal kamrai pumpafunkcióját jellemző adatokat.

### **3.2.2. A heterotop szívtranszplantáció modellje**

A szívtranszplantációt izogenikus hím Lewis patkányokon végeztük a kilöködés okozta másodlagos reakciók kiküszöbölése végett. A donor állatokat intraperitoneális ketamin és xylazin keverékkel elaltattuk, majd ezt követően intravénásan heparinal kezeltük. Custodiol oldattal a kardioplégiát indukáltunk, majd 1 óra iszkémiát követően a donor szívek aortáját a recipiens állatok hasi aortájával, a truncus pulmonalisat pedig a vena cava inferiorral kapcsoltuk össze „end-to-side” anasztomózzal. Ezt követően a lekötések feloldásával és a szív perfúziója megindult.

#### **3.2.2.1. Kísérleti csoportok**

A patkányokat 4 csoportba osztottuk: 1) *Kontroll* csoport, a szívek mindenféle kezelés nélkül explantációra kerültek. 2) *Kontroll+ Q50* csoport, Q50 előkezelés explantáció előtt 1 órával. 3) *I/R* csoport, a donor patkányokat a Q50 oldószerével kezeltük elő donor szívek explantációja előtt 1 órával, majd 1 óra iszkémiás periódus az anasztomózis megnyitásáig. 4) *Q50+I/R* csoport, Q50 kezelés a donor szív explantációja előtt 1 órával, majd 1 óra iszkémiás periódus az anasztomózis megnyitásáig. Az oldószert és a Q50-t intravénásan a vena cava inferioron keresztül adtuk be.

#### **3.2.2.2. Hemodinamikai mérések**

Egy óra reperfúziót követően az állatokat ketamin és xylazin keverékével elaltattuk. A szívcsúcson keresztül a bal kamrába egy ballon katétert vezetünk, mely lehetővé tette a bal kamrai pumpafunkciót jellemző adatok regisztrálását. A mérések végétével a szíveket későbbi vizsgálatokhoz konzerváltuk.

#### **3.2.2.3. A magas energiájú foszfátszintek meghatározása**

A szívizomszövet homogenizálása után egy forgalomban levő kit segítségével az ATP, ADP és AMP tartalmat mértük. Az úgynevezett „energy charge potential” kiszámítása az alábbi képlettel történt:  
$$ECP = \frac{[ATP + 0.5 ADP]}{[ATP + ADP + AMP]}$$



### **3.2.2.4. Kvantitatív real-time PCR és Western blot**

A citokróm c-oxidáz, SOD-1 és MMP-2 mRNS és protein expresszió változásait az egyes csoportokban meghatároztuk. A minták relatív mRNS expresszióját GAPDH-ra normalizáltuk.

### **3.2.3. *In vitro* szívizomsejt védelem modellje**

H9c2 patkány embrionális szívizomsejteket az úgynevezett DMEM-médiumban (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) tenyésztettük és a növekedésük ütemét, illetve a Q50-kezelés hatását az úgynevezett „real-time cell electronic sensing assay” segítségével mértük. A sejteket az oxidatív stressz szimulálása végett hidrogén peroxiddal (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) kezeltük, 30 perccel ezután Q50-nel vagy az oldószerével kezeltük a különböző csoportokat és további 24 órán át mértük a sejtek elektromos impedanciáját.

### **3.2.4. Statisztika**

Minden adatot átlagérték  $\pm$  S.E.M. formájában adtuk meg. A csoportok adatait Student-t-teszttel illetve varianciaanalízissel (ANOVA) és Bonferroni-teszttel hasonlítottuk össze. A csoportok között megfigyelt különbségeket  $p < 0,05$  értékek mellett tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

## **4. EREDMÉNYEK**

### **4.1. A prolil hidroxiláz gátlás hatása az érfunkcióra**

#### **4.1.1. Endotélium-függő relaxációs válaszok izolált aorta gyűrűkön**

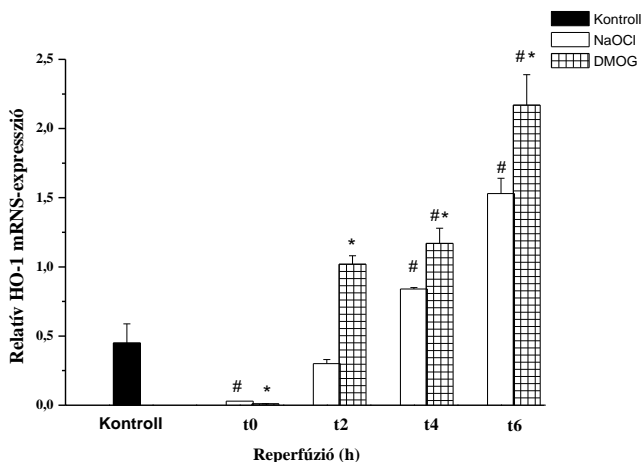
A NaOCl csoportban 24 óra hideg iszkémiát követően nátrium hipoklorittal kiváltott reperfúziós károsodás után a vaszkuláris funkció károsodott, mely az acetilkolinra adott endotélfüggő vazorelaxációs képesség (ún.  $R_{max}$  ACh) csökkenését okozta. DMOG kezelés hatására az endotélfunkció jelentősen javult, mely az acetilkolinra mutatott relaxációs képesség javulásában nyilvánult meg. A direkt simaizom depolarizációt és simaizom kontrakciót kiváltó kálium-klorid hatása jelentősen csökkent a hipoklorittal kezelt csoportban, ezen a DMOG kezelés nem javított.

**1. táblázat** Kontroll, NaOCl illetve DMOG csoportok vazokonstriktív és vazorelaxációs paramétereit. Az értékeket átlag  $\pm$  SEM-ben ábrázoltuk. Szignifikáns ( $p < 0,05$ ): # vs. kontroll; \* vs. NaOCl.

	Kontroll	NaOCl	DMOG $10^{-4}$ M
<b>R<sub>max</sub> ACh (%)</b>	95 $\pm$ 1	44 $\pm$ 4 #	68 $\pm$ 5 #,*
<b>pD2 ACh</b>	7,23 $\pm$ 0,10	6,46 $\pm$ 0,11	6,20 $\pm$ 0,44 #
<b>R<sub>max</sub> SNP (%)</b>	101 $\pm$ 1	101 $\pm$ 1	100 $\pm$ 1
<b>pD2 SNP</b>	8,26 $\pm$ 0,06	8,11 $\pm$ 0,06	8,33 $\pm$ 0,10
<b>KCl (g)</b>	3,83 $\pm$ 0,15	2,52 $\pm$ 0,20#	2,74 $\pm$ 0,20#
<b>Fenilefrin (g)</b>	3,25 $\pm$ 0,15	3,45 $\pm$ 0,15	3,10 $\pm$ 0,16

#### 4.1.2. A hem-oxigenáz mRNS szintjének változása

A szervfürdős kísérletekben részt vett aortákban a „meleg reperfúzió” után a HO-1 mRNS expressziója az NaOCl csoportban szignifikánsan csökkent kontroll csoporthoz képest. A „reperfúzió” második órájától kezdve a protil hidroxilázzal kezelt csoport HO-1 mRNS szintje szignifikánsan magasabb volt a NaOCl csoporthoz képest.



**1. ábra** A hem-oxigenáz mRNS-szintjének változása a reperfúziós idő függvényében. A második órát követően a DMOG kezelés a HO-1 mRNS szintjének növekedését okozta. Az értékeket átlag  $\pm$  SEM-ben ábrázoltuk.

Izolált vaszkuláris simaizomsejtek esetében 6 óra meleg reperfúzió után a DMOG-gal kezelt csoport HO-1 mRNS szintje szignifikánsan magasabb volt a NaCl csoporthoz képest (nem mutatott adat).

## **4.2. A Q50 kezelés hatása regionális miokardiális iszkémiareperfúzióra**

A leszálló korária lekötését és reperfúziót követően az oldószert és Q50-et kapott egyedek között nem találtunk különbséget a szívinfarktus méretében, mely alátámasztja, hogy a két csoportban kiváltott miokardiális károsodás mértéke hasonló.

### **4.2.1. A Q50 kezelés hatásai miokardiális infarktus kísérletes modelljében**

Miokardiális infarktust követően a kezelt és kontroll állatok között nem találtunk jelentős különbséget a szívfrekvencia, bal-kamrai végdiasztolés nyomás, verőtérfogat, perctérfogat értékeiben. A megemelkedett végdiasztolés- és végszisztolés nyomás értékek a miokardiális infarktust elszenvedett állatok esetében számottevő javulást mutattak Q50 kezelés hatására. Az I/R-csoportban a preload-függő (pl.  $dP/dt_{max}$ ) és nem preload-függő (pl.  $dP/dt_{max}$ -EDV összefüggés meredeksége) kontraktilitást jellemző paraméterek jelentősen javultak Q50 kezelés hatására. Ezentúl az ejekciós frakció is szignifikánsan javult az I/R+Q50 a kezeletlen I/R csoporthoz képest. A szisztolés és diasztolés nyomás és az artériás középnyomás szignifikánsan csökkent az áloperált Sham csoporthoz képest mind az I/R, I/R+Q50 és sham+Q50 csoportban. A Sham csoporthoz képest a miokardiális infarktust elszenvedett csoportban szignifikánsan csökkent a bal kamrai szisztolés nyomás, PRSW,  $dP/dt_{min}$  és károsodott a relaxáció, mely a megnyúlt Tau értékben nyilvánult meg. A posztisztkémias Q50 kezelés nem javított szignifikánsan ezen paramétereken.

**2. táblázat: A szívfunkció változásai a különböző csoportokban.** BK: bal kamrai; PRSW: a verőmunka-diasztolés térfogat összefüggés meredeksége, az ún. preload recruitable stroke work;  $dP/dt_{\min}$ : a diasztolés nyomáscsökkenés sebessége, Tau: a bal kamrai relaxáció időkonstansa; EDPVR: végdiasztolés nyomás-térfogat összefüggés. \* $P < 0.05$  vs. sham, # $P < 0.05$  vs. I/R.

	Sham	Sham+Q50	I/R	I/R+Q50
<i>Alapvető hemodinamikai adatok</i>				
Szívfrekvencia [ütés/perc]	404±8	431±19	383±17	410±21
Artériás középnyomás [Hgmm]	136±3	119±3* #	101±3*	111±6*
<i>Bal kamrai nyomás és térfogat</i>				
BK-i végsziszt. nyomás [Hgmm]	136±8	127±5#	110±3*	118±8
BK-i végdiaszt. nyomás [Hgmm]	15±2	14±3	16±2	15±4
Végszisztolés térfogat [ $\mu$ l]	52±10	64±20	93±8*	43±8#
Végdiasztolés térfogat [ $\mu$ l]	113±17	120±19#	177±15*	97±13#
Verőtérfogat [ $\mu$ l]	61±24	85±7	84±10	86±9
<i>Ejekciós fázis és nyomás-térfogat összefüggés változásai</i>				
Ejekciós frakció [%]	46±15	51 ± 8	47 ± 3	52 ± 10#
Perctérfogat [ml/min]	46±6	38 ± 4	50 ± 9	35 ± 3
Verőmunka [Hgmm $\times$ $\mu$ l]	10129±1895	8373 ± 1838	11790 ± 2031	6762 ± 1623
PRSW [Hgmm]	93±14	114 ± 12#	75 ± 4*	93 ± 11
<i>Az aktív relaxációt jellemző értékek</i>				
$-dP/dt_{\min}$ [Hgmm/s]	12625±1678	11910±1119#	7217±275*	8653±967
Tau [ms]	10,4±0,9	10,4±1,1#	14,6±0,7*	13,9±1,1*
<i>A passzív diasztolés funkció indexe</i>				
EDPVR meredeksége [mmHg/ $\mu$ l]	0,043±0,011	0,070±0,007	0,062±0,011	0,050±0,008

## 4.2.2. A Q50 kezelés hatásai szívtranszplantáció modelljében

### 4.2.2.1. A Q50 kezelés hatása a graft funkciójára

Szívtranszplantációt követően 1 óra reperfúzió után a bal kamrai kontraktilitás jelentősen javult a Q50 csoportban a kezeletlen I/R csoporthoz képest. A Q50 kezelt csoport  $dP/dt_{\min}$  javulása a jobb miokardiális relaxációt tükrözi.

**3. táblázat. A Q50 hatásai szívtranszplantációt követően.** Bal kamrai paraméterek 1 órával transzplantáció után.  $dP/dt_{\min}$ : a diasztolés nyomáscsökkenés maximális sebessége,  $dP/dt_{\max}$ : a szisztolés nyomásemelkedés maximális sebessége, LVSP: bal kamrai szisztolés nyomás, LVEDP: bal kamrai diasztolés nyomás  $P < 0.05$ : \* vs. I/R.

	I/R	Q50 + I/R
LVSP [Hgmm]	$80 \pm 2$	$105 \pm 5^*$
$dP/dt_{\max}$ [Hgmm/s]	$1781 \pm 94$	$3219 \pm 190^*$
LVEDP [Hgmm]	$5,5 \pm 2,0$	$7,1 \pm 4,1$
$dP/dt_{\min}$ [Hgmm/s]	$989 \pm 115$	$2477 \pm 424^*$

### 4.2.2.2. A Q50 kezelés hatásai a szívizom nagyenergiájú foszfátjaira

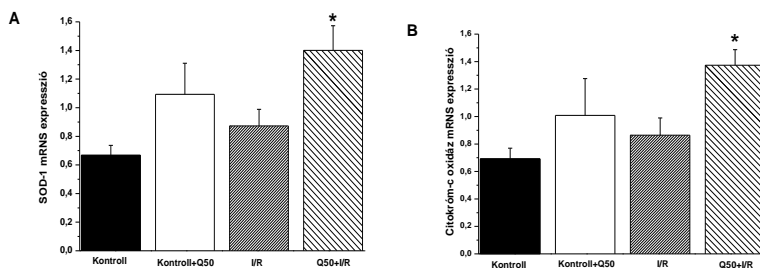
Szívtranszplantációt követően a szívizom nagyenergiájú foszfát szintje (ATP és ADP) szignifikánsan magasabb volt a Q50-nel előkezelt csoportban. Az úgynevezett „energy charge potential”, a szívizom energiaellátottságának indikátora szintén jelentősen magasabb volt Q50 kezelés hatására az IR-csoporthoz képest.

**4. táblázat A Q50 kezelés hatásai a miokardium ATP, ADP és AMP tartalmára szívtranszplantáció állatkísérletes modelljében.** I/R: iszkémia/reperfúzió, ATP: adenozin-trifoszfát; ADP: adenozin-difoszfát; AMP: adenozin-monofoszfát. \* $P < 0.05$  vs. többi csoport.

	Kontroll	I/R	Q50 + I/R
ATP [ $\mu\text{mol/g}$ ]	$6,58 \pm 1,12$	$1,86 \pm 0,41^*$	$6,66 \pm 0,63$
ADP [ $\mu\text{mol/g}$ ]	$3,48 \pm 0,16$	$2,05 \pm 0,42^*$	$5,01 \pm 0,43$
AMP [ $\mu\text{mol/g}$ ]	$1,91 \pm 0,22$	$2,07 \pm 0,22$	$2,59 \pm 0,61$
Energy charge potential	$0,69 \pm 0,07$	$0,49 \pm 0,04^*$	$0,85 \pm 0,08$

### 4.2.2.3. A Q50 kezelés hatásai a szívizom mRNS és protein expressziójára szívtranszplantáció modelljében

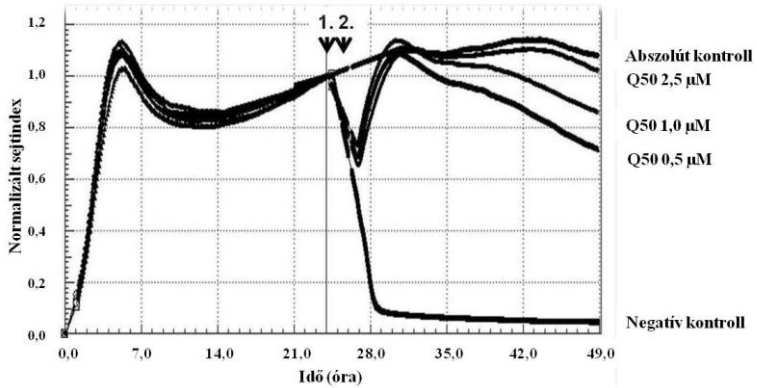
A szuperoxid diszmutáz-1 és a citokróm-oxidáz mRNS expresszióját hasonlítottuk össze a különböző csoportokban. A Q50-nel kezelt csoportban ezen enzimek mRNS szintje szignifikánsan magasabb volt a kontroll csoporthoz képest, és ezt a proteinexpresszió változásai is teljes mértékben tükrözték (nem mutatott adatok).



2. ábra A Q50 kezelés hatása szívtranszplantációt követően a génexpressziókra. (A) SOD-1, (B) citokróm-c oxidáz mRNS expresszió. A SOD-1 és a citokróm-c oxidáz mRNS-szintje szignifikánsan magasabb volt a Q50-előkezelt csoportban. Az értékek átlag  $\pm$  SEM-ben vannak ábrázolva, szignifikáns:  $p < 0,05$ .

### 4.2.3. A Q50 utókezelés hatása H9c2 szívizomsejtekre

A sejtek egy éjszakán keresztül a platen megtapadtak. Ezután  $H_2O_2$ -vel oxidatív stresszt indukáltunk, 30 perc elteltével pedig a Q50-nel kezeltük a sejteket (0,5, 1,0 és 2,5  $\mu M$ ). A normalizált sejtindexet a  $H_2O_2$  kezelés időpontjában számítottuk. A sejtek kezelése 100  $\mu M$   $H_2O_2$ -dal a sejtindex jelentős csökkenését okozta, míg az abszolút kontroll csoport (nem kezeltük  $H_2O_2$ -dal) sejtindexe kissé növekedett. A sejtek Q50-nel való utókezelése jelentős mértékű dózis-függő citoprotektív hatásban nyilvánult meg. Három óra elteltével a legkisebb koncentrációjú Q50-nel kezelt csoport is elérte az abszolút kontroll csoportban megfigyelt sejtindex értékeit.



**3. ábra A Q50-utókezelés sejtvédő hatásai a H9c2-sejteken oxidatív stresszt követően.** A H9c2 embrionális szívizomsejteken oxidatív stresszt váltottunk ki ( $100\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 1. nyíl). 30 perc elteltével különböző koncentrációban Q50-nel (2. nyíl) kezeltük az egyes sejtszöveteket. Az ábrázolt vonalak az egyes méréseket mutatják egy-egy well-ben. A normalizált sejtinдекс megmutatja a sejtek relatív életképességét az egyes well-ekben. A fekete függőleges vonal az ábra közepén a sejtinдекс normalizálásának időpontját mutatja, mely egyben a  $\text{H}_2\text{O}_2$ -adásának időpontja.

## 5. KÖVETKEZTETÉSEK

A kísérletes kardiológia és szívsebészet egyik fő kutatási célpontja az erek és a szívizomzat hipoxiás és iszkémiás állapotainak jobb megértése. Kutatásaim során ezen témának a különböző modellekben való vizsgálatát és a lehetséges esetleges gyógyszeres beavatkozási lehetőségeit vizsgáltam.

A kutatómunka egyik célja a HIF szerepének vizsgálata izolált patkány aortákon hideg iszkémiás tárolást követő meleg reperfúziós károsodásban. Ezen kísérleteinkben izolált patkány aortákat DMOG-gal kezeltünk, mely a PHD gátláson keresztül normoxiás állapotban HIF stabilizációt okoz. A reperfúziós károsodás szimulálásához a meleg reperfúzió során az ereket nátrium-hipoklorittal kezeltük. Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a HIF stabilizáció a vazorelaxációs képesség javulását eredményezi, mely HO-1-en keresztül valósulhat meg.

Második modellünkben a cink-komplex és vaskelátor Q50 hatásait vizsgáltuk regionális és globális miokardiális iszkémia-reperfúziós károsodás során. A regionális miokardiális iszkémiát a leszálló koronáriaartéria lekötésével váltottuk ki, és Q50 kezelés hatására ugyan a szívizomelhalás területe nem lett kisebb, de javult a szívizom kontraktilitása.

Globális miokardiális iszkémia modelljében ortotóp szívtranszplantációt végeztünk, melyben a Q50 kezelés javította a bal kamrai pumpafunkciót és emelkedett miokardiális ATP-ellátottságot idézett elő a kontroll csoporthoz képest.



## 6. PUBLIKÁCIÓK

### A PhD értekezés témájában megjelent közlemények:

1. Barnucz E, Veres G, Hegedűs P, Klein S, Zöller R, Radovits T, Korkmaz S, Horkay F, Merkely B, Karck M, Szabó G. (2013) Prolyl-hydroxylase inhibition preserves endothelial cell function in a rat model of vascular ischemia reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther*, 345(1):25-31. IF: 3,855
2. Korkmaz S, Barnucz E\*, Loganathan S, Li S, Radovits T, Hegedus P, Zubarevich A, Hirschberg K, Weymann A, Puskás LG, Ózsvári B, Faragó N, Kanizsai I, Fábíán G, Gyuris M, Merkely B, Karck M, Szabó C, Szabó G. (2013) Q50, an iron-chelating and zinc-complexing agent, improves cardiac function in rat models of ischemia/reperfusion-induced myocardial injury. *Circ J*, 77(7):1817-1826. IF: 3,685  
\*: megosztott első szerző

### Egyéb közlemények:

1. Veres G, Hegedűs P, Barnucz E, Schmidt H, Radovits T, Zöller R, Karck M, Szabó G. (2015) TiProtec preserves endothelial function in a rat model. *J Surg Res*, 200(1):346-355.
2. Loganathan S, Korkmaz-Icöz S, Radovits T, Li S, Mikles B, Barnucz E, Hirschberg K, Karck M, Szabó G. (2015) Effects of soluble guanylate cyclase activation on heart transplantation in a rat model. *J Heart Lung Transplant*, 34(10):1346-1353.
3. Veres G, Hegedűs P, Barnucz E, Zöller R, Klein S, Schmidt H, Radovits T, Korkmaz S, Karck M, Szabó G.(2015) Endothelial dysfunction of bypass graft: direct comparison of in vitro and in vivo models of ischemia-reperfusion injury. *PLoS One*. 15;10(4):e0124025.
4. Veres G, Hegedűs P, Barnucz E, Zöller R, Klein S, Radovits T, Korkmaz S, Karck M, Szabó G. (2015) Graft preservation with heparinized blood/saline solution induces severe graft dysfunction. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 20(5):594-600.
5. Korkmaz S, Atmanli A, Li S, Radovits T, Hegedűs P, Barnucz E, Hirschberg K, Loganathan S, Yoshikawa Y, Yasui H, Karck M, Szabó G. Superiority of zinc complex of acetylsalicylic acid to acetylsalicylic acid in

- preventing postischemic myocardial dysfunction. (2015) *Exp Biol Med* (Maywood). 240(9):1247-1255.
6. Radovits T, Korkmaz S, Mátyás C, Oláh A, Németh BT, Páli S, Hirschberg K, Zubarevich A, Gwanmesia PN, Li S, Loganathan S, Barnucz E, Merkely B, Szabó G. (2015) An altered pattern of myocardial histopathological and molecular changes underlies the different characteristics of type-1 and type-2 diabetic cardiac dysfunction. *J Diabetes Res*, 2015:728741.
  7. Rylova SN, Barnucz E, Fani M, Braun F, Werner M, Lassmann S, Maecke HR, Weber WA. Does imaging  $\alpha\beta3$  integrin expression with PET detect changes in angiogenesis during bevacizumab therapy? (2014) *J Nucl Med*, 55(11):1878-1884.
  8. Veres G, Hegedüs P, Barnucz E, Zöller R, Radovits T, Korkmaz S, Kolonics F, Weymann A, Karck M, Szabó G. Addition of vardenafil into storage solution protects the endothelium in a hypoxia-reoxygenation model. (2013) *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 46(2):242-248.
  9. Radovits T, Arif R, Bömicke T, Korkmaz S, Barnucz E, Karck M, Merkely B, Szabó G. Vascular dysfunction induced by hypochlorite is improved by the selective phosphodiesterase-5-inhibitor vardenafil. (2013) *Eur J Pharmacol*, 15;710(1-3):110-9.
  10. Li S, Korkmaz S, Loganathan S, Weymann A, Radovits T, Barnucz E, Hirschberg K, Hegedüs P, Zhou Y, Tao L, Páli S, Veres G, Karck M, Szabó G. Acute ethanol exposure increases the susceptibility of the donor hearts to ischemia/reperfusion injury after transplantation in rats. (2012) *PLoS One*, 7(11):e49237.
  11. Weymann A, Schmack B, Okada T, Soós P, Istók R, Radovits T, Straub B, Barnucz E, Loganathan S, Pätzold I, Chaimow N, Schies C, Korkmaz S, Tochtermann U, Karck M, Szabó G. (2013) Reendothelialization of human heart valve neoscaffolds using umbilical cord-derived endothelial cells. *Circ J*, 77(1):207-216.
  12. Korkmaz S, Loganathan S, Mikles B, Radovits T, Barnucz E, Hirschberg K, Li S, Hegedüs P, Páli S, Weymann A, Karck M, Szabó G. (2013) Nitric oxide- and heme-independent activation of soluble guanylate cyclase attenuates peroxynitrite-induced endothelial dysfunction in rat aorta. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 18(1):70-77.

13. Hirschberg K, Tarcea V, Páli S, Barnucz E, Gwanmesia PN, Korkmaz S, Radovits T, Loganathan S, Merkely B, Karck M, Szabó G. (2013) Cinaciguat prevents neointima formation after arterial injury by decreasing vascular smooth muscle cell migration and proliferation. *Int J Cardiol*, 31;167(2):470-477.
14. Loganathan S, Radovits T, Korkmaz S, Hirschberg K, Barnucz E, Weymann A, Bömicke T, Arif R, Karck M, Szabó G. (2012) Enhancement of myocardial and vascular function after phosphodiesterase-5 inhibition in a rat model. *Thorac Cardiovasc Surg*, 60(4):247-254.
15. Kemecei P, Miklós Z, Bíró T, Marincsák R, Tóth BI, Komlódi-Pásztor E, Barnucz E, Mirk E, Van der Vusse GJ, Ligeti L, Ivanics T. (2010) Hearts of surviving MLP-KO mice show transient changes of intracellular calcium handling. *Mol Cell Biochem*, 342(1-2):251-60.
16. Hirschberg K, Radovits T, Korkmaz S, Loganathan S, Zöllner S, Seidel B, Páli S, Barnucz E, Merkely B, Karck M, Szabó G. (2010) Combined superoxide dismutase mimetic and peroxynitrite scavenger protects against neointima formation after endarterectomy in association with decreased proliferation and nitro-oxidative stress. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 40(2):168-175.
17. Korkmaz S, Radovits T, Barnucz E, Hirschberg K, Neugebauer P, Loganathan S, Veres G, Páli S, Seidel B, Zöllner S, Karck M, Szabó G. (2009) Pharmacological activation of soluble guanylate cyclase protects the heart against ischemic injury. *Circulation*, 120(8):677-686.
18. Korkmaz S, Radovits T, Barnucz E, Neugebauer P, Arif R, Hirschberg K, Loganathan S, Seidel B, Karck M, Szabó G. (2009) Dose-dependent effects of a selective phosphodiesterase-5-inhibitor on endothelial dysfunction induced by peroxynitrite in rat aorta. *Eur J Pharmacol*, 615(1-3):155-162.
19. Radovits T, Korkmaz S, Loganathan S, Barnucz E, Bömicke T, Arif R, Karck M, Szabó G. (2009) Comparative investigation of the left ventricular pressure-volume relationship in rat models of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 297(1):H125-133.
20. Radovits T, Bömicke T, Kökény G, Arif R, Loganathan S, Kécsán K, Korkmaz S, Barnucz E, Sandner P, Karck M, Szabó G. (2009) The

phosphodiesterase-5 inhibitor vardenafil improves cardiovascular dysfunction in experimental diabetes mellitus. *Br J Pharmacol*, 156(6): 909-919.

21. Loganathan S, Radovits T, Hirschberg K, Korkmaz S, Barnucz E, Karck M, Szabó G. (2008) Effects of selective phosphodiesterase-5-inhibition on myocardial contractility and reperfusion injury after heart transplantation. *Transplantation*, 27;86(10):1414-1418.