

**A fenntartott cGMP szintek javítják az endoteliális és vaszkuláris
funkciókat oxidatív stresszt követően**

Doktori tézisek

Dr. Hegedűs Péter

Semmelweis Egyetem
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Prof. Dr. Szabó Gábor, med. habil.

Hivatalos bírálók:

Dr. Szekeres Mária, Ph.D., tudományos munkatárs

Dr. Szokodi István, D.Sc., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke:

Prof. Dr. Sándor Péter, D.Sc., ny. egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

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

Dr. Jancsó Gábor, med. habil., egyetemi docens

Budapest

2016

Bevezetés

A szív és érrendszeri megbetegedések (CVD) évente Európában több mint 4 millió, az Európai Unión belül pedig megközelítőleg 1,9 millió halálesetért felelősek, ezzel évtizedek óta a halálozási és megbetegedési statisztikák élén állnak. Epidemiológiai vizsgálatok tanúsítják, hogy a dohányzás, cukorbetegség, hiperlipidémia, táplálkozási tényezők és az idős kor fokozzák a szív és érrendszeri megbetegedések kockázatát. Az endotélium diszfunkciójának súlyponti szerepe van a hiperkoleszterinémia, hipertónia, diabétesz, iszkémia/reperfúziós vagy akár a szepszis okozta kardiovaszkuláris károsodás kialakulásában. Egyre több bizonyíték utal az érfalban *in vivo* fölszabaduló szabadgyökök okozta oxidatív stresszre, mely az endotélium károsítása révén járul hozzá az említett folyamatok progressziójához. Az érbelhártya különösen érzékeny az oxidatív és nitrozatív folyamatok káros hatásaira. Fiziológias körülmények között egyensúly mutatkozik a reaktív oxigén gyökök (ROS) termelődése valamint az effektív eliminációs folyamatok között, mely egyensúly oxidatív stressz során fölborul a ROS termelődés javára, ezáltal széles spektrumban akadályozva a sejtfunkciókat. Hatásukra a protein, lipid és DNS molekulák oxidációja révén a sejt apoptózisa, magasabb koncentrációjuk esetében autofagocitózis és sejtnekrózis következik be. A reaktív oxigéngyökök közé tartozik a szuperoxid (O_2^-), hidrogénperoxid (H_2O_2), hipoklorit (OCl^-), hidroxid anion (OH^-) és a peroxinitrit ($ONOO^-$), mely a szuperoxid anion és a nitrogénmonoxid (NO) reakciójából származik, és az egyik legerősebb oxidáló ágens. A peroxinitrit képes a tirozin nitráció révén a fehérjék működését befolyásolni, így kedvezve például a gyulladáshoz, vagy épp gátolva az endotélsejtek repair mechanizmusait.

Az endoteliális diszfunkció és a kardiovaszkuláris megbetegedések közötti korrelációra való tekintettel a vaszkuláris oxidatív stressz gátlására, illetve az érdiszfunkció javítására irányuló terápiás stratégiák intenzív kutatások tárgyát képezik. Ismeretes, hogy a NO - ciklikus guanozin-monofoszfát (cGMP) – protein kináz G jelátviteli út szabályozza az értónust, a trombocita aggregációt, befolyásolja a sejtciklust és az extracelluláris mátrix képződését. Az intracelluláris cGMP akkumuláció igazoltan csökkenti a sejt- és szövetkárosodást fokozott szabadgyökterhelés okozta oxidatív stressz során. Épp ezért az újabb terápiás megközelítés az NO- sGC- cGMP útvonalat teszi újonnan fejlesztett gyógyszer-csoportok célpontjává.

A szolubilis guanilát-cikláz (sGC) az NO/cGMP jelátviteli útvonal downstream molekulája, mely a GTP-nek a jelátvivő molekula cGMP-vé alakításáért felelős. A ROS csökkenti a sGC hem alegységet tartalmazó NO-receptorának expresszióját, valamint a hem disszociációját okozza. Az oxidáció tehát potenciálisan károsítja az NO indukálta aktivációt, és az enzim degradációjához vezet. Ennek következtében oxidatív stressz vagy iszkémia/reperfúziós (I/R) károsodás esetén csökkenhet a hatékonysága a NO-donoroknak és más hatóanyagoknak, melyek az érfunkciót a sGC NO-függő aktivációján keresztül védik. Preklinikai tanulmányok kimutatták, hogy az új hem-független sGC-aktivátor cinaciguat megkerüli a károsodott NO-sGC-cGMP útvonalat az oxidált(Fe^{3+})/hem-mentes sGC aktivációja útján és preferáltan a kóros ereket tágítja a nem kórosakkal szemben. Fázis I. klinikai vizsgálatban az egészséges embereknek intravénásan beadott cinaciguat kedvező biztonságossági profillal rendelkezett és jól tolerálható volt.

A jelátvivő cGMP hozzáférhetőségét nem csupán szintézise, hanem foszfodiészterázok általi degradációja is befolyásolja, melyek tehát szintén alapvető fontosságú regulátorai az útvonalnak. A foszfodiészterázok családjának jelenleg ismert tizenegy tagjából több mint hét kölcsönhatásba léphet a cGMP-vel, ám a szív-érrendszerben (az érfalat is beleértve) metabolizmusáért legnagyobb részben a cGMP-szelektív foszfodiészteráz-5 (PDE-5) felelős. A cGMP elősegíti saját degradációját negatív visszacsatolás révén a PDE-5 upregulációja és jelentős aktivációja útján. Úgy találták, a szív-érrendszeri megbetegedésekben az oxidatív stressz miatt jelentősen fokozott PDE-5 kifejeződés felgyorsította a cGMP lebomlását. A jól ismert szelektív PDE-5-gátló vardenafil pedig kisállatkísérletekben igazolták, hogy jótékony hatással bír a szívizom I/R károsodása ellen prekondicionálás-szerű kezelést követően, és előnyös védő hatása van az erek endotéliumára.

Célkitűzések

A leírt mechanizmusokon alapulva, melyek útján az oxidatív stressz az endotélium és az erek működésének zavarához vezet, a jelen vizsgálatok arra irányulnak, hogy a megnövekedett cGMP szint hozzájárul-e az érfunkció és –struktúra oxidatív stressz elleni megóvásához.

1. A vaszkuláris oxidatív stressz első, peroxinitrit inkubációval létrehozott *in vitro* modelljének célja:
 - Az érműködés zavarának, és ehhez a csökkent cGMP szint hozzájárulásának vizsgálata akut oxidatív stresszt követően;
 - A szolubilis guanilát-cikláz-aktivátor cinaciguat hatásának tesztelése a peroxinitrit okozta érműködészavarra és az ennek alapját képező celluláris és molekuláris változásokra az érfalban;
2. A vaszkuláris oxidatív stressz második, *in vitro* iszkémia és reperfúzió által létrehozott modelljének célja:
 - Az I/R károsodás hatásának vizsgálata az érfunkcióra, -struktúrára és a cGMP szintre;
 - A szelektív foszfodiészteráz-5-gátló vardenafil által fenntartott cGMP szint hatásának tesztelése az *in vitro* I/R károsodás okozta érdiszfunkcióra;

Összegezve, a vizsgálatok fő célja olyan új, hatékony terápiás stratégiák megalapozása volt, mely a NO-sGC-cGMP útvonal működését elősegítve mérséklik az oxidatív stresszhez kapcsolódó endotélium- és érműködészavart.

Módszerek

I. Kísérleti modellek

1. In vitro modell a peroxinitrit expozíció okozta érdiszfunkció kimutatására

Sprague-Dawley patkányokból izolált mellkasi aortagyűrűket 30 percig az endotéliumot károsító peroxinitrit ($200 \mu\text{mol/l}$) jelenlétében inkubáltunk. Ezt követően szervfürdőben vizsgáltuk a létrejött vaszkuláris diszfunkciót a vazokonstrikció valamint az endotélfüggő és -független relaxációk tekintetében. A kísérleti csoportoknak megfelelően a patkányokat kétszer a sGC-aktivátor cinaciguat 10 mg/kg -os dóziséval per os előkezelésben részesítettük.

2. In vitro modell a tartós hideg prezerváció, majd azt követő reoxigenizáció és hipoklorit expozíció okozta vaszkuláris diszfunkció kimutatására

Patkányokból izolált mellkasi aortagyűrűket hideg hipoxiás fiziológias sóoldatban inkubáltunk 24 órán keresztül, majd reoxigenizációt és 30 perc hipoklorit-inkubációt ($200 \mu\text{mol/l}$) követően szervfürdőben vizsgáltuk a létrejött vaszkuláris diszfunkciót a vazokonstrikció valamint az endotélfüggő és -független relaxációk tekintetében. A hideg iszkémiás tárolás során használt sóoldatot a vizsgálati csoportoknak megfelelően a PDE-5-gátló vardenafil különböző koncentrációival dúsítottuk (10^{-12} mol/l , 10^{-11} mol/l , 10^{-10} mol/l , 10^{-9} mol/l).

II. In vitro vaszkuláris funkcionális mérések

Elaltatott patkányok leszálló mellkasi aortáját eltávolítottuk, majd eltávolítottuk a periadventiciális szövetet. Az előkészített aortát 4 mm -es gyűrűkre vágtuk fel, majd az érgyűrűket az izometriás kontrakciós és relaxációs mérésekhez speciális fémhorgok segítségével izolált szervfürdő erőmérő berendezéséhez kapcsoltuk és számítógépes szoftver segítségével regisztráltuk. A szervfürdő folyadékterében az aortagyűrűk 25 ml térfogatú 37°C -os, karbogéngázzal ($95\% \text{ O}_2 - 5\% \text{ CO}_2$) átbuborékolgatott Krebs-Henseleit-oldatban helyezkedtek el. A kísérlet kezdetén az érgyűrűket 2 g passzív előfeszítés alá helyeztük, és 60 percig ekvilibráltuk rendszeresen frissítve a szervfürdő KH-oldatát. Kálium-klorid (KCl , 80 mM) hozzáadása után detektáltuk az érgyűrűk által kifejtett maximális erőt, majd kimosási fázis következett a kezdeti passzív előfeszítés eléréséig. Fenilefrin (10^{-6} M) hozzáadásával kontrakciót váltottunk ki, majd amikor az

összehúzódnak a platófázist ért el, dózisdependens relaxációs válaszokat okoztunk az endotélfüggő vazorelaxáns acetilkolin (ACh, 10^{-9} - 10^{-4} M), és a nem endotélfüggő vazorelaxáns nátrium-nitroprusszid (SNP, 10^{-10} - 10^{-5} M) emelkedő koncentrációinak hozzáadásával. A kontrakciós válaszokat grammban, a relaxációs válaszokat a fenilefrin-kontrakcióhoz viszonyítottan, százalékban fejeztük ki.

III. Szöveti vizsgálatok

1. Immunhisztokémia és TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUDP nick end-labeling) reakció

Szöveti földolgozás céljából minden kísérleti csoportból érgyűrűket 4%-os formalinban fixáltuk, paraffinba ágyasztuk, majd 3 μ m vastagságú metszeteket készítettünk. Immunhisztokémiai reakciót végeztünk korábban már leírt módszerek segítségével a nitrotirozin (a peroxinitrit in vivo jelenlétének bizonyítéka) és a cGMP detektálására. A TUNEL reakciót a kettős DNS-lánc törések kimutatása céljából végeztük.

2. Az immunhisztokémia és a TUNEL reakció kvantifikálása

Az immunhisztokémiai festődés intenzitása és eloszlása alapján elvégeztük a metszetek szemikvantitatív hisztomorfológiai kiértékelését. Az eredményeket egy pontozási rendszer segítségével fejeztük ki, mely figyelembe vette a festődés intenzitását és a pozitívan festődött sejtek arányát a mintában. A TUNEL reakció esetében a pozitív festődésű sejtmagokat számítottuk ki az összes sejtmag arányában.

IV. Kvantitatív Real-Time PCR vizsgálat

A homogenizált érgyűrűkből RNS-t izoláltuk, majd átírást követően real-time PCR analízist végeztünk az endotelin-1, kaszpáz-3, BAX, Bcl-2, eNOS és iNOS mRNS expressziók meghatározására. Minden minta esetén duplikátumokat vizsgáltunk, a kvantifikációt a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) expressziójához viszonyítva végeztük.

V. Western-blot analízis

A homogenizált érgyűrűkből izolált fehérjéken Western-blot analízist végeztünk a p17 kaszpáz-3 fragmentum, Bax és Bcl-2 kifejeződésének meghatározására. Referencia fehérjének a GAPDH-t választottuk.

VI. Statisztika

Az adatokat Shapiro-Wilk tesztnek vetettük alá. Normál eloszlás esetén a csoportok összehasonlítása egyutas ANOVA és Bonferroni teszt alkalmazásával történt, az értékeket átlag \pm átlag szórása (SEM) formában tüntettük fel. PCR eredmények összehasonlítására Kruskal-Wallis próbát és Dunn-féle post hoc tesztet végeztünk. Statisztikailag szignifikánsnak a $p < 0,05$ értékeket tekintettük.

VII. Fölhasznált anyagok

A cinaciguatot (BAY 58-2667) 1%-os metil-cellulózban oldottuk, míg a hidrogén-peroxidot 4.7%-os NaOH-oldatban. A vardenafil, fenilefrin, acetilkolin és nátrium-nitroprusszidot fiziológias sóoldatban oldottuk föl és hígítottuk. A nátrium-hipoklorit desztillált vízben került föloldásra.

Eredmények

I. In vitro peroxinitrit okozta vaszkuláris károsodás - a cinaciguat hatása

1. Vaszkuláris diszfunkció

Az érgyűrűk peroxinitrit expozíciója szignifikánsan csökkentette az acetilkolin által kiváltott endotéliumfüggő, NO-mediálta vazorelaxációt. Elvárásainkkal összhangban a patkányok cinaciguattal történő előkezelése szignifikánsan javította az endotélium-dependens relaxációt peroxinitrit expozíciót követően. Az endotélium-független vazodilatátor nátrium-nitroprusszid hatására bekövetkező maximális relaxációban nem mutatkozott különbség az egyes csoportok között (I. Táblázat).

	Kontroll	Peroxinitrit	Cinaciguat+ Peroxinitrit	Cinaciguat
R _{max} to ACh (%)	93.2 ± 2.0	44.5 ± 5.9*	67.1 ± 3.5* [#]	93.9 ± 1.1 [#]
pD ₂ to ACh	7.6 ± 0.1	6.6 ± 0.2*	7.0 ± 0.1	7.9 ± 0.1 [#]
P _{max} to SNP (%)	100.1 ± 0.2	100.2 ± 0.3	100.2 ± 0.2	101.6 ± 0.2
pD ₂ to SNP	8.8 ± 0.2	8.2 ± 0.1*	8.2 ± 0.1*	9.1 ± 0.3 [#]
PE (% of KCl)	73 ± 5	114 ± 3*	108 ± 5*	78 ± 5 [#]

I. Táblázat: Izolált érgyűrűk acetilkolinra (ACh) és a nátrium nitroprusszidra (SNP) mutatott maximális relaxációs (R_{max}, %) és pD₂ (affinitás) értékei, továbbá a fenilefrin által indukált kontrakciós (PE % of KCl) értékek az 0.1 mol/l koncentrációjú kálium-klorid kiváltotta depolarizáció százalékában. Az értékek a mean ± S.E.M. –et mutatják 12-15 érgyűrű esetén.

*p < 0.05 versus Kontroll; [#] p < 0.05 versus peroxinitrit csoport;

2. Immunhisztokémiai és TUNEL vizsgálatok

A kontroll csoporthoz képest a nitrozin-festődés jelentős fokozódását tapasztaltuk az aortafal sejtjeiben peroxinitrit inkubáció hatására, mely szignifikánsan csökkent cinaciguat előkezelés hatására (kontroll: 3.8±0.4 vs. ONOO⁻: 6.4±0.4, p<0.05; ONOO⁻ vs. cinaciguat+ONOO⁻: 4.4±0.3; p<0.05).

A peroxinitrit expozíció önmagában nem csökkentette az érgyűrűkben detektált cGMP szintet, a cinaciguat kezelés jelentősen fokozta az aortafal cGMP festődését (ONOO⁻: 5.9±0.7; vs. cinaciguat+ONOO⁻: 7.9±0.6; p<0.05; kontroll: 7.2±0.6; cinaciguat: 7.7±0.8).

A TUNEL módszerrel jelentős mértékű DNS-törést detektáltunk az aortafal sejtjeiben a

peroxinitrit expozíció hatására, míg a cinaciguat kezelés csökkentette a peroxinitrit hatására bekövetkező DNS-károsodást (kontroll: 35 ± 2 vs. ONOO^- : 49 ± 3 ; $p < 0.05$; ONOO^- vs. cinaciguat+ ONOO^- : 34 ± 3 ; $p < 0.05$).

3. Cinaciguat hatása a génexpresszióra

Peroxinitrit expozíció szignifikánsan fokozta az ET-1, BAX és kaszpáz-3 mRNA expresszióját az intakt érgyűrűkhöz képest, míg cinaciguat hatására ez a változás jelentősen mérséklődött. Ezzel összhangban a cinaciguat kezelés teljes mértékben megakadályozta a Bcl-2 és eNOS mRNA szint csökkenését. Nem mutatkozott statisztikai különbség az indukálható NOS mRNA kifejeződésében az egyes csoportok között (1. Ábra).

4. A cinaciguat kezelés hatása a hasadt kaszpáz-3, BAX és Bcl-2 protein szintekre

A Western-blotot követő denzitometriás analízis kétszeres emelkedést igazolt a p17-es kaszpáz töredék és ötszörös emelkedést a BAX protein expressziója esetében peroxinitrit expozíció hatására. A cinaciguat kezelés az mRNA vizsgálatokkal összhangban jelentősen csökkentette ezen proapoptotikus fehérjék jelenlétét az aortagyűrűkben. Önmagában a cinaciguat nem okozott változást a vizsgált fehérjék kifejeződésében. Az antiapoptotikus Bcl-2 fehérje jelenlétét jelentősen csökkentette a peroxinitrit inkubáció, míg megtartott fehérje jelenlétet tapasztaltunk cinaciguat hatására.

II. Hideg prezerváció, in vitro reoxigenizáció és hipoklorit okozta vaszkuláris diszfunkció – a vardenafil hatásai

1. Vaszkuláris diszfunkció aortagyűrűkben

24 órás hideg iszkémiának kitett, majd hipoklorittal ($200 \mu\text{mol/l}$) inkubált aortagyűrűk szignifikánsan csökkent maximális relaxációt mutattak az endotéliumfüggő, NO mediálta hatású acetilkolinra a kontroll csoporthoz viszonyítva. A konzerváló oldat 10^{-11} mol/L vardenafillal való kiegészítése szignifikánsan fokozta a vazorelaxációt a gyűrűk hipoklorit expozícióját követően a fiziológias sóval kezelt csoporthoz képest. A vardenafillal kezelt csoportok között nem volt statisztikai különbség. Az acetilkolinnal szemben az aortagyűrűk nátrium-nitroprusszid indukálta endotélium-független vazorelaxációjában nem volt szignifikáns különbség a maximális relaxációt illetően az egyes kísérleti csoportok között (II. Táblázat).

	Kontroll	Fiziológiás sóoldat	Vardenafil (10 ⁻¹² M)	Vardenafil (10 ⁻¹¹ M)	Vardenafil (10 ⁻¹⁰ M)	Vardenafil (10 ⁻⁹ M)
R _{max} ACh (%)	97.9 ± 0.56	48.3 ± 5.6*	64.2 ± 3.3*	74.8 ± 3.5* [#]	68.3 ± 4.5*	61.0 ± 4.5*
pD ₂ ACh	7.6 ± 0.09	6.4 ± 0.1*	6.7 ± 0.1*	6.9 ± 0.1* [#]	6.83 ± 0.1*	6.7 ± 0.1*
R _{max} SNP (%)	99.9 ± 0.02	99.8 ± 0.1	99.5 ± 0.4	99.9 ± 0.1	99.9 ± 0.1	99.8 ± 0.1
pD ₂ SNP	8.3 ± 0.07	8.2 ± 0.1	8.3 ± 0.1	8.8 ± 0.2*	8.4 ± 0.1	8.2 ± 0.1
PE (% KCl)	75.5 ± 2,75	121.2 ± 1.9*	117.3 ± 5.8*	122.1 ± 4.3*	110.4 ± 4.9*	124.9 ± 7.9*

II. Táblázat: Izolált érgyűrűk acetilkolinra (ACh) és a nátrium nitroprusszidra (SNP) mutatott maximális relaxációs (R_{max}, %) és pD₂ (affinitás) értékei, továbbá a fenilefrin által indukált kontrakciós (PE % of KCl) értékek az 0.1 mol/l koncentrációjú kálium-klorid kiváltotta depolarizáció százalékában. Az értékek a mean ± S.E.M. –et mutatják 15-20 érgyűrű esetén.

*p < 0.05 versus Kontroll; [#] p < 0.05 versus Fiziológiás sóoldat;

2. Immunhisztokémia és TUNEL

24 órás hideg iszkémiás konzerválás, majd reoxigenizáció és 30 perces hipoklorit inkubáció szignifikánsan alacsonyabb cGMP-immunreaktivitáshoz vezetett a fiziológiás sóval kezelt csoportban a kontrollhoz viszonyítva. A vardenafil hozzáadása szignifikánsan magasabb cGMP-festődési pontszámhoz vezetett a fiziológiás sóval kezelt csoporthoz képest.

Hideg iszkémiás konzerválás, reoxigenizáció és hipoklorit inkubáció szignifikánsan növelte a TUNEL-pozitív sejtmagok denzitását az aortaszegmentekben a kontroll érgyűrűkhöz viszonyítva (kontroll: 10±6 vs. fiziológiás sóoldat: 72±4; p>0.05). Ez azt jelzi, hogy az oxidatív stressz DNS-fragmentációt okozott az aortafalban. A vardenafil hozzáadása szignifikánsan csökkentette DNS-töréseket (fiziológiás sóoldat vs. vardenafil 10⁻¹¹: 14±5; p<0.05).

3. Vardenafil szabályozza az aorta génexpresszióját

Az aortagyűrűk 24 órás hideg iszkémiás konzerválása, majd 30 perces hipoklorit inkubációja szignifikánsan fokozta az ET-1, BAX és kaszpáz-3 mRNS expresszióját a natív kontroll gyűrűkhöz képest. Ezeket a változásokat szignifikánsan mérsékelte a prezervációs oldat vardenafillal való kiegészítése. Hosszas iszkémiás tárolás és hipoklorit

expozíció a Bcl-2 mRNS expresszió szignifikáns csökkenését okozta, mely fokozható volt vardenafillal. A tároló oldat kiegészítése vardenafillal nem befolyásolta az endoteliális és indukálható nitrogén-monoxid-szintáz mRNS szintjét.

4. Vardenafil hatása a hasadt kaszpáz-3 szintre, a BAX és Bcl-2 protein expresszióra

24 órás hideg tárolás és hipoklorit expozíció után a p17-es kaszpáz töredék és Bax sávok denzitometriás analízise szignifikáns növekedést mutatott a fiziológias sóoldattal kezelt csoportban a kontroll csoporthoz képest. A fehérjeszint ezen növekedését szignifikánsan mérsékelte a vardenafillal való kezelés. Az antiapoptotikus Bcl-2 fehérje szignifikánsan csökkent a fiziológias sóoldattal kezelt csoportban a kontrollhoz viszonyítva, míg a vardenafil hozzáadása a Bcl-2 szintjét a kontrollokéval azonosan tartotta.

Következtetések

Ezen disszertáció főbb eredményei két tételben összegezhetők:

- Az akut oxidatív stressz, mint a peroxinitrit terhelés vagy a reperfúziós károsodás az érfalban csökkent intracelluláris cGMP szinthez és következményesen vaszkuláris diszfunkcióhoz vezet. Ehhez a jelenséghez további molekuláris változások társulnak, így fokozva a sejtek apoptózishajlamát.
- Az intracelluláris cGMP szint farmakológiai úton történő fenntartása nem csupán az érfunkció megőrzéséhez járul hozzá, de az oxidatív károsodás miatt kifejlődő további patológiás szubcelluláris változások kialakulását is megelőzi. Mind a cGMP szintézisének fokozása cinaciguat által, mind a cGMP degradációjának gátlása vardenafillal hatékonyan javított az érfunkción és megakadályozta az intracelluláris patológiás molekuláris változások kialakulását.

Az első vizsgálatban a peroxinitrit által kiváltott oxidatív károsodást és a vaszkuláris válaszkészség sérülését tanulmányoztuk izolált patkány aortán. A második vizsgálat egy *in vitro* iszkémia-reperfúziós károsodás érműködésre kifejtett hatására irányult. Az oxidatív stressz okozta vaszkuláris diszfunkcióhoz mindkét esetben az érfal csökkent cGMP szintje és megnövekedett apoptózisráta társult. A cGMP szintjének fenntartása a szolubilis guanilat-cikláz cinaciguat általi aktivációjának vagy a foszfodiészteráz-5 vardenafil általi gátlásának révén rendre javította az endotélfunkciót és csökkentette a DNS-károsodás mértékét. Ezeket az eredményeket következetesen alátámasztották a pro- és antiapoptotikus faktorok arányának emelkedett cGMP szinthez társuló előnyös változásai. Ezen munka magában foglalja a vizsgálatot, mely elsőként kínált bizonyítékot a PDE-5-gátlás endotéliumot védő jótékony hatására a hideg iszkémiás tárolás és reperfúzió alatt.

Összegezve, a jelen munka alátámasztja az elképzelést, mely szerint a cGMP-szintézis farmakológiai aktivációja és/vagy a cGMP lebontásának gátlása új potenciális terápiás megközelítést jelenthet az oxidatív stresszhez társuló vaszkuláris diszfunkció mérséklésében.

Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

1. *Hegedűs P, Veres G, Radovits T, Barnucz E, Korkmaz S, Székely N, Kolonics F, Merkely B, Szabó G. (2014) A foszfodiészteráz-5 inhibitor vardenafil hatása a hipoxia-reoxigenáció okozta endotél-diszfunkcióra patkány aortában. Card. Hung; 44: 224-30.*
2. *Veres G*, Hegedűs P*, Barnucz E, Zöller R, Radovits T, Korkmaz S, Kolonics F, Weymann A, Karck M, Szabó G. (2013) Addition of vardenafil into storage solution protects the endothelium in a hypoxia-reoxygenation model. Eur J Vasc Endovasc Surg.;46:242-8.*
3. *Korkmaz S, Loganathan S, Mikles B, Radovits T, Barnucz E, Hirschberg K, Li S, Hegedűs 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.;18:70-7.*

A disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények

1. *Hegedűs P, Li S, Korkmaz-Icöz S, Radovits T, Mayer T, Al Said S, Brlecic P, Karck M, Merkely B, Szabó G. (2016) Dimethyloxalylglycine treatment of brain-dead donor rats improves both donor and graft left ventricular function after heart transplantation. J Heart Lung Transplant. Jan;35:99-107*
2. *Korkmaz-Icöz S, Lehner A, Li S, Vater A, Radovits T, Hegedűs P, Ruppert M, Brlecic P, Zorn M, Karck M, Szabó G. (2015) Mild Type 2 Diabetes Mellitus Reduces the Susceptibility of the Heart to Ischemia/Reperfusion Injury: Identification of Underlying Gene Expression Changes. J Diabetes Res. 2015:396-414.*

3. Korkmaz-Icöz S, Vater A, Li S, Lehner A, Radovits T, *Hegedűs P*, Ruppert M, Brlecic P, Zorn M, Karck M, Szabó G. (2015) *Mild type 2 diabetes mellitus improves remote endothelial dysfunction after acute myocardial infarction*. J Diabetes Complications. Nov-Dec;29:1253-60.
4. Veres G, *Hegedűs P*, Barnucz E, Schmidt H, Radovits T, Zöller R, Karck M, Szabó G. (2016) *TiProtec preserves endothelial function in a rat model*. J Surg Res. Jan;200:346-55.
5. 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. Apr 15;10:e0124025
6. 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.; 20:594-600.
7. Korkmaz S, Atmanli A, Li S, Radovits T, *Hegedűs P*, Barnucz E, Hirschberg K, Loganathan S, Yoshikawa Y, Yasui H, Karck M, Szabó G. (2015) *Superiority of zinc complex of acetylsalicylic acid to acetylsalicylic acid in preventing postischemic myocardial dysfunction*. Exp Biol Med (Maywood). Sep;240:1247-55.
8. Li S, Loganathan S, Korkmaz S, Radovits T, *Hegedűs P*, Zhou Y, Karck M, Szabó G.(2015) *Transplantation of donor hearts after circulatory or brain death in a rat model*. J Surg Res.;195:315-24.
9. Li S, Korkmaz S, Loganathan S, Radovits T, *Hegedűs P*, Karck M, Szabó G. (2015) *Short- and long-term effects of brain death on post-transplant graft function in a rodent model*. Interact Cardiovasc Thorac Surg.;20:379-86.
10. *Hegedűs P*, Korkmaz S, Radovits T, Schmidt H, Li S, Yoshikawa Y, Yasui H, Merkely B, Karck M, Szabó G. (2014) *Bis(aspirinato)zinc(II) complex successfully inhibits carotid arterial neointima formation after balloon-injury in rats*. Cardiovasc Drugs Ther.;28:533-9.

- 11.** 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, Fábrián 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.*;77:1817-26. Epub 2013 Apr 11.
- 12.** Korkmaz S, Zitron E, Bangert A, Seyler C, Li S, *Hegedüs P*, Scherer D, Li J, Fink T, Schweizer PA, Giannitsis E, Karck M, Szabó G, Katus HA, Kaya Z. (2013) *Provocation of an autoimmune response to cardiac voltage-gated sodium channel NaV1.5 induces cardiac conduction defects in rats* *J Am Coll Cardiol.*;62:340-9.
- 13.** Barnucz E, Veres G, *Hegedüs 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.*;345:25-31.
- 14.** 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. (2012) *Acute ethanol exposure increases the susceptibility of the donor hearts to ischemia/reperfusion injury after transplantation in rats* *PLoS One.*;7:e49237.
- 15.** Barnucz E, Korkmaz S, Radovits T, Veres G, Hirschberg K, *Hegedüs P*, Páli Sz, Merkely B, Szabó Gr. (2012) *Az NO-cGMP-PKG-rendszer gyógyszeres befolyásolása szívinfarktus állatkísérletes modelljében* *Cardiol. Hung.*; 42: 6-13
- 16.** Gellér L, Szilágyi Sz, Srej M, *Hegedüs P*, Róka A, Merkely B, Róka A (2008) *Bal posterolateralis járulékos köteg sikeres transaortikus ablációja mechanikus mitrális műbillentyűs betegeknél* *Cardiol. Hung.*; 38: 254-257