

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

REAKTÍV NITROGÉN INTERMEDIEREK ÁLTAL INDUKÁLT
POLI(ADP-RIBÓZ) POLIMERÁZ ÉS MÁTRIX
METALLOPROTEINÁZ AKTIVÁCIÓ VIZSGÁLATA
IN VITRO ÉS *IN VIVO*

Bai Péter



DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ORVOSI VEGYTANI INTÉZET
2003

Bevezetés

Nitrozatív stressz és a nitrozatív stressz biológiai hatásai

Az elmúlt évtizedek biológiai kutatásainak legfontosabb eredményei közé tartozik a reaktív nitrogén intermedierek (RNI) *in vivo* jelentőségének felismerése. A legismertebb RNI-t, az NO-t a nitrogén-monoxid szintáz (NOS) enzimek termelik. Hosszú időn át az NO-t citoprotektív és citotoxikus hatások kiváltására is képesnek tartották, azonban más, biológiailag jelentős RNI-k felismerése óta inkább citoprotektív hatásúnak tekintik. Az NO szuperoxid anionnal lezajló reakciójában képződő vegyületet peroxinitritnek nevezzük. Az NO egy elektronos redukciójának terméke a nitroxil anion.

A peroxinitrit több aminosav oxidatív módosítására képes, ami enzimek és ioncsatornák inaktiválódásához vezethet. A peroxinitrit által kiváltott nitrálódás a tirozin és a triptofán oldalláncokon történik. A reakcióban képződő nitrotirozint eredetileg az *in vivo* termelődő peroxinitrit indikátorának tekintik. A nitroxilnek szintén vannak biokémiai hatásai, elsősorban a fehérjék ciszteinil oldalláncot módosítja, illetve átmeneti fémkomplexekkel reagál.

A peroxinitrit citotoxikusnak mutatkozott számos sejtvonalon, például HaCaT keratinocitákon, Raw makrofágokon és timocitákon. A nitroxil citotoxikusnak bizonyult neuronokon, MCF-7 humán tüdőkarcinoma sejtvonalon, V79 hörcsög tüdő fibroblaszt vonalon is.

A poli(ADP-ribóz) polimeráz-1

A poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) géncsalád 18 tagja közül a legismertebb és a legelterjedtebb a PARP-1. A PARP-1 egy- vagy kétszálú DNS törés hatására aktiválódik, homodimereket alkot és a DNS törésekhez kapcsolódik. A DNS-hez kapcsolódás indukálja a PARP-1

enzimatis aktivációját. Az aktivált PARP-1 a NAD^+ hasításával poli-ADP-ribóz polimereket (PAR) szintetizál a megfelelő akceptor fehérjék glutamát oldalláncaira.

A PARP-nak bizonyítottan szerepe van a genomi integritás megvédésében, a DNS hibajavításban, a replikációban, a génexpresszió és a differenciálódás szabályzásában. Azonban szempontunkból a legfontosabb a sejthalálban játszott szerepe. A sejtelhalásának két típusát különböztetjük meg: alapvetően morfológiai jellemzők alapján beszélünk apoptózisról, illetve onkózisról.

A PARP aktivációt a DNS károsító szerek citotoxikus hatásával először Berger és munkatársai hozták összefüggésbe. Az elmélet szerint a PARP aktiváció elfogyasztja a sejt NAD^+ készletét a PAR szintézis közben. A NAD^+ újrashintézise pedig ATP igényes, így elfogy a sejt ATP készlete. Az ATP hiánya leállítja az ATP igényes folyamatokat, a NAD^+ hiánya pedig a mitokondriális elektrontranszportláncot állítja le, ami a membránpotenciál összeomlásához vezet. Emiatt a mitokondriális F1/F0 ATPáz enzim ATPáz-ként kezd működni. Ezek a folyamatok az ATP mennyiség és a sejtbeli energia csökkenéséhez vezetnek. A PARP az ATP/ NAD^+ szintet csökkentő képessége miatt gátolja az energiaigényes apoptózis beindulását és az onkózis felé tereli a sejtet.

Oxidatív stressz patológiai szerepe

A peroxinitrit *in vivo* fiziológiai hatásairól részletes ismeretekkel rendelkezünk. Peroxinitrit túlzott termelődését ischaemia-reperfúziós károsodásban, sokkban, illetve gyulladásban mutatták ki. Bizonyították az összefüggést a peroxinitrit termelődése és a patológiai elváltozások között. A peroxinitrit DNS törések létrehozásán keresztül PARP aktivációhoz vezet. *In vivo* vizsgálatok a nitroxillal kapcsolatban

elsősorban a keringési rendszerre gyakorolt hatását vizsgálták. Szíven az NO-hoz hasonló hatásokat okoz a nitroxil kezelés.

Egy másik – számunkra fontos – szabad gyökök által aktiválható enzimsorozat a mátrix metalloproteinázok (MMP) családja. Az MMP-k szerteágazó funkcióval rendelkező cink endopeptidázok. Fiziológias funkciójuk az extracelluláris mátrix újraépülésének biztosítása fiziológias és patológias folyamatok során. Aktivációjuk szerepet játszik több betegségben, például artritiszben és kardiovaszkuláris betegségekben.

Az MMP-k inaktív proenzimek formájában szintetizálódnak. Az inaktivitásért a fehérje N-terminálisán található propeptid (vagy autoinhibitor) domén felelős. Az MMP aktivációnak két útját ismerjük. A proteolitikus aktiváció esetében az autoinhibitor domént valamilyen proteáz lehasítja. A proteolitikus aktiváció során változik az adott MMP molekulatömege, a kb. 8-12 kDa méretű inhibitor domén lehasadása után.

Később ismerték meg a térszerkezetváltozás okozta aktivációs útvonalat. Ebben az esetben a zimogénben valamilyen térszerkezetváltozás vezet az aktivációhoz. Ilyen hatást fejthetnek ki erős detergenssek, merkurivegyületek, vagy ROI-k, illetve peroxinitrit. Más csoportok már demonstrálták ennek az útvonalnak a jelenétét szíven.

A szívelégtelenség kialakulásában nagy jelentőséggel bír az extracelluláris mátrix lebontásának és felépítésének egyensúlyának megbomlása. A szíven az extracelluláris mátrixot felépítő kollagén sérülése esetén a kardiomiociták „megcsúsznak”, ami ventrikuláris dilatációhoz, fokozatos kontraktilis diszfunkcióhoz és a szívfunkciók általános gyengüléséhez vezet.

Munkánk során megvizsgáltuk az RNI-k szerepét a doxorubicin (DOX) kiváltotta kardiotoxicitásban. A DOX egy széles spektrumú,

antraciklin alapú, szolid tumorok, limfómák, illetve leukémiák kezelésére használt citosztatikum. A DOX legsúlyosabb mellékhatása súlyos kardiotoxicitása.

A kardiotoxicitás oka a DOX katalizálta szabadgyök termelés, amit az antracénszármazékok kinon-szemikinon ciklikus átalakulása okoz a szívizomsejtek mitokondriumában. A redukcióval képződő szemikinon instabil vegyület és az elektronját könnyen továbbadja reaktív intermediereket hozva létre. A DOX kezelés a szívizomsejtek energiaháztartását megzavarja, és károsítja a szívizomsejtek DNS állományát, illetve leírták a DOX NF κ B aktiváló hatását is.

Célkitűzés

Munkánk során az alábbi két témakör köré csoportosítottuk kérdéseinket.

Az Angeli sóból felszabaduló nitroxil citotoxicitásának vizsgálata.

- Aktiválja-e az Angeli só a DNS törés - PARP aktiváció útvonalat?
- Hasonlít-e az Angeli só által kiváltott citotoxicitás a más oxidánsokkal (hidrogén peroxid, peroxinitrit) kiváltott sejthalálhoz?
- Képződik-e peroxinitrit Angeli só kezelés során?

A doxorubicin által okozott kardiomiopátiában a szabad gyökök és a PARP szerepének vizsgálata.

- A doxorubicin által okozott kardiomiopátiában aktiválódik-e a DNS törés - PARP aktiváció útvonal, és ez vezet-e sejtpusztuláshoz?
- Van-e mátrix metalloproteináz aktiváció a doxorubicin indukálta kardiomiopátiában a szívben?

Anyagok és módszerek

Timocita preparálás és kezelés

Hat-nyolc hetes hím C57BL6 egerek tímuszát használtuk kísérleteinkben. A sejteket RPMI-1640 médiumban tartottuk, melyet 10% főtális borjúsavóval egészítettünk ki (37°C-on 5% CO₂). Nitroxil termelésére az Angeli só (AS) nevű gyökdonor vegyületet használtuk, PARP gátlószerként 3-amino-benzamidot (3AB) alkalmaztunk.

Doxorubicin kezelés

Hím Balb/c egereket (25-30g) egyszeri dózisban kezeltünk DOX-al (25 mg/kg i.p.). Az állatokat két nappal a kezelés megkezdése után használtuk az alább részletezett vizsgálatokra. A PJ34 (PARP inhibitor) kezelés egy órával a DOX beadása előtt kezdődött (20 mg/kg i.p.) és folytatódott naponta (3x10 mg/kg/nap). Az FP15 kezelés (1 mg/kg/nap p.o., ivóvízbe keverve) két órával a DOX kezelés előtt kezdődött.

Egyszálú DNS törések kimutatása

A DNS töréseket comet assay-vel mutattuk ki a Trevigen comet assay kitjének segítségével.

Radioaktív PARP aktivitásmérés

A timocitákat 30 percen át kezeltük elő PARP inhibitorral, ezt követően AS-t adtunk a rendszerhez. A médiumot 0,5 ml aktivitásmérő pufferre cseréltük, mely 0,5 µCi/ml ³H-NAD⁺-ot tartalmazott. Harminc perccel később a sejtfehérjéket jéghideg 50%-os TCA-val kicsaptuk. A csapadékot 2% SDS/0.1 N NaOH oldatban szolubilizáltuk, a beépült radioaktivitást folyadékszintillációs számlálóval mértük meg.

Immunodotblot alapú poli(ADP-ribóz)meghatározás

A timocitákat az előzőekben tárgyalthoz hasonlóan kezeltük, majd lizáltuk RIPA pufferben, melyet NaOH-dal és EDTA-val egészítettünk ki. A mintákból 20 µg fehérjét vittünk fel Hybond N+ membránra dot-blot technikával. A blotot 0,4 M NaOH fixálás után blokkoltuk, majd anti-poli(ADP-ribóz) elleni antitesttel mutattuk ki a képződött PAR-t.

Citotoxicitás meghatározása

Az AS kezelés által kiváltott sejtpusztulást propidium jodid (PI) felvétellel határoztuk meg. A sejteket először PARP inhibitorral kezeltük 30 percen át, melyet AS kezelés követett 4 órán át. A timocitákat ezután 2,5 µg/ml PI oldattal festettük 15 percen át, majd áramlási citometriával analizáltuk a mintákat.

Annexin-FITC - propidium jodid kettős jelölés

Három órával az AS kezelés után a sejteket PBS-ben mostuk és 10^5 sejtet 5 µl Annexin V-FITC-cel és 5 µg/ml PI-dal Annexin festettünk. A mintákat áramlási citometriával elemeztük.

Mitokondriális membrán depolarizáció és szuperoxid termelés kimutatása

A mitokondriális membránpotenciál változását és a szekunder szuperoxid termelést 3,3'-dihexiloxakarbocianin jodid és hidroetidium kettős festéssel határoztuk meg áramlási citometriával.

Kaspáz-3 aktivitás mérése

Hat órával az AS kezelés megkezdése után a timocitákat lizáltuk. A lizátumokhoz reakciópuffert adtunk, amely tartalmazta a kaspáz-3 specifikus DEVD-pNA konjugátum szubsztrátot (300 µM). Egy óra inkubáció után a pNA abszorbanciáját spektrofotometriásan mértük.

A DNS fragmentáció kimutatása (DNS létra képződése)

Az internukleoszomális DNS fragmentációt agaróz gélelektroforézissel mutattuk ki az AS kezelés megkezdése után 6 órával. A sejteket agaróz gélre vittük fel, melyen az elektroforézis során SDS-t és proteináz K-t futattunk keresztül. A megfuttatott gélben a DNS-t etidium bromiddal festettük meg.

Nitrotirozin kimutatása Western blot segítségével

A sejteket 30 percen át AS-sel és peroxinitrittel kezeltük, majd RIPA pufferben lizáltuk. 15 µg fehérjét SDS-PAGE segítségével elválasztottunk és nitrocellulóz membránra transzferáltunk. A fehérjékben lévő nitrotirozint specifikus antitesttel mutattuk ki.

Szérum laktát dehidrogenáz és kreatin kináz aktivitásának meghatározása

Két nappal a DOX kezelés után az egerekből vért vettünk a vena cava inferiorból. A vért hagytuk megalvadni, és a laktát dehidrogenáz és kreatin kináz aktivitást kolorimetriás aktivitásmérő kitekkel mértük a szérumból. Az LDH és CK aktivitásokat U/L dimenzióban fejeztük ki.

Metalloproteináz zimográfia

Két nappal a DOX kezelés megkezdése után az egerek szívét fiziológiás sóoldattal perfundáltuk, majd kimetszettük. Az így nyert szövetmintát kalcium tartalmú pufferben homogenizáltuk. A homogenizátumokat ezután 2X SDS mintapufferrel kevertük össze, és szobahőmérsékleten inkubáltuk 15 percen át. Ezekből a mintákból 7,5 µg fehérjét zimográfias gélekre vittünk fel. A géleket a futtatás után renaturáltuk 30 percig állandó rázatás alatt, majd az előhívást 37 °C-on végeztük éjszakán. Az emésztetlen szubsztrátot Brilliant Blue festékkel festettük meg.

Eredmények

Az Angeli só által kiváltott timocita sejthalál vizsgálata

AS kezelés (200 μ M) a sejtek genomi DNS-ében egyszálú töréseket okozott. Permeabilizált timocitákban AS kezelés hatására megnövekedett a TCA-val kicsapható triciált fehérjék mennyisége, ami a PARP aktivitás megemelkedésére utal. Az aktivitás specificitását 3AB előkezeléssel igazoltuk. A PAR polimerek dot bloton specifikus antitesttel történő kimutatása a radioaktív módszerhez hasonló eredményt mutattak.

Az AS kezelés a timociták koncentrációfüggő nekrozisához vezetett. A $K_3Fe(CN)_6$ és TEMPOL gyökfogókkal történő előkezelés megvédte a timocitákat az AS által indukált sejtpusztulástól, amiből arra utal, hogy a felszabaduló nitroxil hatására lépett fel citotoxicitás. Az intracelluláris kalcium megkötése a sejtpermeabilis BAPTA kalcium kelátor vegyülettel szignifikáns védő hatást mutatott hasonlóan a PARP inhibitor 3AB-hez.

A citotoxicitás jellemzésére Annexin-FITC és PI kettős festést is végeztünk. Az AS-sel kezelt sejtek három populációt képeznek: a FITC/PI kettős negatív normál, a PI pozitív onkotikus, illetve a FITC pozitív és PI negatív apoptotikus sejtek populációját. A timocitákat 150 μ M AS-val kezelve az onkotikus és apoptotikus sejtek aránya megnő a kontroll mintában mérthez képest. 3AB előkezelés csökkenti az onkotikus sejtek arányát megnövelve az apoptotikus és a normál sejtek arányát.

A timociták AS kezelése (150 μ M) után a mitokondriális membránpotenciál lecsökkent, illetve ezzel párhuzamosan megnövekedett a szekunder szuperoxid produkció. A PARP gátlása szignifikánsan csökkentette, de teljesen nem gátolta meg ezeket az elváltozásokat.

A sejthalál további jellemzésére a kaszpáz-3 aktivitását és a DNS létra képződését vizsgáltuk. A kaszpáz-3 aktivációja nitroxil hatására

enyhe, kissé elnyújtott emelkedést, majd csökkenést mutatott. PARP inhibitor jelenlétében a kaszpáz-3 aktivitás hasonló lefutású volt, ám hamarabb kezdett emelkedni, és jóval magasabb értéket ért el, mint az inhibitor nélküli mintáknál. A DNS létra képződése a kaszpáz aktivitáshoz hasonló dinamikát mutatott.

Kísérleti rendszerünkben nem találtunk jelentős fehérjenitrálódást, míg pozitív kontrollunk – peroxinitrittel kezelt timociták – erőteljes jelet adott.

A PARP és szabad gyökök szerepe a doxorubicin által okozott kardiomiopátiában

A DOX kezelés során a szívizomsejtek pusztulását szérum markerenzimek (CK és LDH) aktivitásváltozásának követésével vizsgáltuk. Két napos DOX kezelés mind a CK, mind az LDH szérumszintjét megemelte. Mind az FP15, mind a PJ34 előkezelés meggátolta mind a CK, mind az LDH szint emelkedését. Vagyis a DOX kezelés során fellépő sejtelhalás patomechanizmusában mind szabad gyökök, mind a PARP aktiváció szerepet játszik.

Az oxidatív stressz által aktivált MMP-ket zimográfiával azonosítottuk. A kontroll szívekben nem, vagy alig láttunk MMP aktivitást. A DOX kezelés hatására mindkét kísérlet során megjelent egy 34 kDa molekulatömegű zselatináz enzim. A sávok denzitometráálásával megbecsültük az enzim aktivitásának változását, mely mintegy négyszeres aktivitásváltozást mutatott a DOX kezelt mintákban a kontrollhoz képest. Az FP15 kezelés meggátolta az MMP aktivitás megemelkedését ebben a modellben, azonban a PARP gátlás nem. Az MMP aktivitás Ca^{2+} függését replikátum gélek Ca^{2+} mentes előhívó pufferben történő előhívással igazoltuk.

Diszkusszió

A nitroxil citotoxicitásának vizsgálata

Az NO egyelektronos redukciójával keletkező nitroxil koncentrációfüggő módon citotoxikusnak bizonyult az általunk alkalmazott timocita modellrendszerben. Nitroxil hatására alkalikus comet-assay-vel az irodalmi adatokhoz hasonlóan sikerült a DNS egyszálú törését igazolni. A DNS törés PARP aktivációt okozott (dot-blot és $^3\text{H-NAD}^+$ beépülés). A PARP aktiváció gátlása szignifikáns, de nem nagyfokú védelmet biztosított a citotoxicitás ellen. A nitroxil citotoxicitása összefüggést mutatott az intracelluláris kalcium koncentráció megemelkedésével. A DNS törés - PARP aktiváció – onkózis útvonal úgy tűnik csak egy mechanizmus a nitroxil által indukált citotoxikus útvonalak közül.

Felvetődik a kérdés, hogy maga a nitroxil felelős-e a tapasztalt citotoxicitásért, vagy esetleg más szabad gyök. A peroxinitrit termelődésének lehetőségét kísérleti rendszerünkben a timociták fehérjéiben a tirozil oldalláncok nitrálódásának kimutatásával vizsgáltuk Western bloton. Eredményeink szerint AS kezelés során nem képződik peroxinitrit, mivel AS kezelés hatására nem tapasztaltunk tirozin nitrációt. A nitrálás hiányában valószínűsíthetünk más biokémiai folyamatot, mint például a fehérjék ciszteinjeinek nitrozilálása, illetve oxidatív módosítása.

A nitroxil által indukált sejthalál a timocitákon hasonló jellegzetességeket mutatott más oxidánsokkal indukált sejthalálhoz: a mitokondriális membránpotenciál csökkenését okozta, illetve a szekunder szuperoxid termelés emelkedéséhez vezetett. Az NO-hoz hasonló biológiai tulajdonságokkal rendelkező nitroxil képes lehet a

mitokondrium fémtartalmú enzimeit, mint például a citokrómokat, vas-kén fehérjéket, illetve az elektrontranszportlánc további fehérjét módosítani. Ez a mitokondriális membránpotenciál csökkenéséhez, illetve szekunder szuperoxid termeléshez vezet.

Az Angeli só kezelés apoptózist okozott (DNS-fragmentáció, kaspáz-3 aktiváció, annexin - PI festés), ami a koncentráció emelkedésével onkózisba váltott. Az apoptózis - onkózis kapcsoló működése hasonló volt az eddig az irodalomban leírtakhoz, azonban kevésbé volt kifejezett váltás. A két sejthalálforma átkapcsolás oka egyrészt valószínűleg a már leírt PARP aktiváció okozta ATP-NAD⁺ csökkenéssel, illetve ezen folyamat gátlásával magyarázható. Másrészt lehetséges, hogy az AS kezelés a proapoptotikus fehérjék (pl. kaspázok) aktivitását megváltoztatta nitrozilálással, vagy oxidatív módosítással.

A doxorubicin által okozott kardiomiopátia vizsgálata

Eredményeink szerint nitrotirozin festődés tapasztalható a DOX kezelés miatt kardiomiopátiában szenvedő egerek szívében, ami feltételezhetően peroxinitrit képződését jelzi. A peroxinitrit képződéséhez szükséges NO termelődésének egyik forrása lehet az indukálható NOS. Az indukálható NOS expresszióját az NFκB transzkripciós faktor szabályozza, amit a DOX aktiválhat.

A DOX kinon-szemikinon ciklusa során keletkező reaktív intermedierek közül a legfontosabb a szuperoxid, a hidrogén peroxid és a hidroxil gyök termelődése. A szuperoxid gyök az NO-val képes peroxinitritet képezni. A peroxinitrit lebontását katalizáló FP15 *in vivo* hatékonyan bontotta a képződő peroxinitritet, megakadályozva a nitrotirozin képződését.

Az egerek kamrai szívfunkciói – Pacher Pál kollegám eredményei szerint – a kezelés ötödik napjára jelentősen romlottak. Mind a PARP inhibitor PJ34, mind az FP15 a DOX által okozott szívfunkciókárosodás ellen hatott, azonban míg az FP15 teljes védelmet nyújtott a DOX ellen, addig a PJ34 szignifikáns, azonban korántsem teljes mértékű védelmet biztosított. A kardiomiociták sejthalálát vizsgálva mindkét vegyület ugyanolyan hatásfokkal védte ki az LDH és a CK szérumbeli aktivitásának onkotikus sejthalálra jellemző emelkedését. Ebből feltételezhető, hogy a szívizomsejtek a szabadgyök képződés – DNS törés – PARP aktiváció – ATP és NAD^+ deplécio – onkózis útvonalon pusztulnak el. Okkal feltételezhető, hogy hasonlóan a más sejtes modellekben leírtakhoz ebben az esetben is a PARP gátlása az onkotikus sejteket apoptotózisba terelte. A sejtek feltételezhetően a szervezet számára kevésbé megterhelő apoptotikus útvonalon pusztultak el, ez okozza a részleges védettséget.

Eredményeink valószínűsítik a DOX kardiotoxikus hatásában MMP-k megjelenését. Kimutattuk egy 34 kDa MMP aktiválódását doxorubicin kezelés hatására. Az aktivációban szerepet játszik a szabad gyökök megjelenése, de eredményeink szerint a PARP szerepe nem valószínű az általunk leírt aktiváció során. Feltételezzük, hogy az aktiválódó MMP-k a szív extracelluláris mátrixának degenerációjával a szívizomsejtek munkájának rosszabb hatásfokú átadását okozzák a szívizomsejtek „csúszása” miatt. Ezáltal hozzájárulnak a DOX által okozott kontraktilis diszfunkció kialakulásához.

A DOX által kiváltott MMP aktiváció kórélettani jelentőségének megismeréséhez további vizsgálatokra van szükség. Azonban ha bizonyítható kóroki összefüggés az MMP aktiváció és a DOX

kardiotoxikus mellékhatása között, akkor új farmakológiai és terápiás célpontot jelenthet a kardiotoxicitás megelőzésében. MMP gátlószerek alkalmazása a szolid tumorok doxorubicin terápiájában nemcsak a kardiotoxicitást csökkentheti, hanem egyúttal adjuváns hatásként a tumorok metasztázis képző képességét is gátolhatja.

Konklúzió

1. Az Angeli só kezelés egyszálú DNS töréseken keresztül PARP aktivációhoz vezet timocitákban.
2. Az Angeli só kezelés a mitokondriális membránpotenciál összeomlásához, illetve szekunder szuperoxid termeléshez vezetett.
3. Az Angeli só kezelés során nem képződik nitrotirozin, ami a peroxinitrit képződés hiányára utal.
4. Eredményeink alapján, bár az Angeli só indukálta sejthalálban szerepet játszik a DNS törés - PARP aktiváció – NAD^+ és ATP deplécio – onkózis útvonal, nem olyan domináns a hatása, mint más reaktív oxigén intermedierek, vagy RNI-k esetében.
5. Doxorubicin indukálta kardiomiopátiában kimutattuk a peroxinitrit és a PARP aktiváció szerepét a szívizomsejtek onkotikus sejtpusztulásában.
6. Bizonyítottuk az FP15 peroxinitrit lebontó képességét *in vivo*.
7. Doxorubicin indukálta kardiomiopátiában egy 34 kDa MMP aktivációját mutattunk ki.
8. A 34 kDa MMP aktiváció szabad gyök indukált, és feltételezhető, hogy a 34 kDa MMP aktivációja térszerkezetének megváltozásával áll összefüggésben.

Közlemények

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Bai P, Bakondi E, Szabó E, Gergely P, Szabo C, Virag L (2001) Partial protection by poly(ADP-ribose)polymerase inhibitors from nitroxyl-induced cytotoxicity in thymocytes. *Free. Radical. Bio. Med.* **31(12)**:1616-1623.

IF.: 5.082

Pacher P, Liaudet L, **Bai P**, Virag L, Mabley JG, Hasko G, Szabo C (2002) The activation of poly(ADP-ribose) polymerase contributes to the development of doxorubicin-induced heart failure. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **300**:862-867.

IF.: 3.555

Pacher P, Liaudet L, **Bai P**, Mabley J, Kaminsky PM, Virag L, Deb A, Szabo E, Ungvari Z, Wolin MS, Szabo C (2003) A potent peroxynitrite decomposition catalyst, FP15, protects against the development of doxorubicin-induced cardiac dysfunction. *Circulation* **107**: 896-904.

IF.: 10.517

Egyéb közlemények

Bai P, Mabley JG, Liaudet L, Virág L, Szabó C, Pacher P: Matrix metalloproteinase activation is an early event in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Oncol. Rep.* (in press)

IF.: 1.171

Bakondi E, **Bai P**, Erdélyi K, Szabo E, Gergely P, Hunyadi J, Szabo C, Virag L: Cytoprotective effect of gallotannin in oxidatively stressed HaCaT keratinocytes: the role of poly(ADP-ribose) metabolism. *Exp. Derm.* (in press)

IF.: 2.234

Bakondi E, Gönczi M, Szabó É, **Bai P**, Pacher P, Gergely P, Kovács L, Hunyadi J, Szabó C, Csernoch L, Virág L (2003) Role of intracellular calcium mobilization and cell density-dependent signaling in oxidative stress-induced cytotoxicity in HaCaT keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **121(1)**:88-95.

IF.: 4.645

Virag L, Szabó E, Bakondi E, **Bai P**, Gergely P, Hunyadi J, Szabo C (2002): The nitric oxide – peroxynitrite - poly(ADP-ribose) polymerase pathway in the skin. *Exp. Derm.* **11(3)**:189-202.

IF.: 2.234

Bakondi E, **Bai P**, Szabó E, Hunyadi J, Gergely P, Szabo C, Virag L (2002) Detection of poly(ADP-ribose) polymerase activation in oxidatively stressed cells and tissues by using biotinylated NAD substrate. *J. Histochem. Cytochem.* **50(1)**:91-98.

IF.: 2.718

Szabó E, Virag L, Bakondi E, Gyüre L, Haskó G, **Bai P**, Hunyadi J, Gergely P, Szabo C (2001) Peroxynitrite-induced poly(ADP-ribose)

polymerase activation in keratinocytes: implications for contact hypersensitivity. *J. Invest. Dermatol.* **117(1)**:74-80.

IF.: 4.645

Bai, P., Erdélyi, K., Bakondi, E., Hegedus, C., Gergely, P., Szabo, C., Virag, L. Potential role of peroxynitrite in the DNA damage, poly(ADP-ribose) polymerase activation and cytotoxicity caused by the alkylating agent N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) in thymocytes. (közlésre benyújtva)

Mabley, J.G., Pacher, P., **Bai, P.**, Wallace, R., Goonesekera, S., Virag, L., Southan, G.J., Szabo, C. Suppression of intestinal polyposis in *Apc*^{min/+} mice by inhibition of inducible nitric oxide synthase, inhibition of poly (ADP-ribose) synthetase or neutralization of peroxynitrite. (közlésre benyújtva)

Idézhető absztraktok

Bai, P., Bakondi, E., Gergely, P., Szabo, C., Virág, L. (2002) Mechanism of nitroxyl (NO⁻/HNO)-induced cytotoxicity in thymocytes. *FASEB J.* **16(5)**, A1166-A1167.

Bakondi, E., **Bai, P.**, Bak, I., Szabó, E., Gergely, P., Szabó, C., Virág, L. (2002) Role of poly(ADP-ribose) polymerase in contact hypersensitivity. *FASEB J.* **16(4)**, A674-A675.

Virág, L., **Bai, P.**, Bak, I., Bakondi, E., Szabo, E., Liaudet, L., Gergely, P., Szabo, C. (2002) Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase attenuates leukocyte migration in an ovalbumin-induced asthma model in mice. *FASEB J.* **16(4)**, A674.

Pacher, P., Liaudet, L., **Bai, P.**, Virag, L., Mabley, J.G., Szabo, C. (2002) Activation of poly(ADP-ribose)-polymerase contributes to the development of doxorubicine-induced heart failure. *FASEB J.* **16(4)**, A570.

Pacher, P., Liaudet, L., **Bai, P.**, Virag, L., Mabley, J.G., Szabo, C. (2002) A potent peroxynitrite decomposition catalyst, FP15, protects against the doxorubicine-induced heart failure. *FASEB J.* **16(4)**, A177.

Szabo E, Bakondi E, **Bai P**, Hunyadi J, Gergely P, Szabo C, Virag L (2001) Regulation of oxidative stress-induced cytotoxicity in HaCaT keratinocytes. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol.* **15(Suppl 2)**:200.