dc_189_11

Akadémiai Doktori Értekezés Tézisei

Iszkémiás károsodás csökkentése a mitokondriális funkció befolyásolása által

Dr. Lacza Zsombor

2011

dc_189_11

dc_189_11

tartalomjegyzék

1. Bevezetés **4**

2. Kísérleti eredmények **4**
2.1. A mitokondriális NO termelés mechanizmusa 4
2.2. Nitrozóglutationok és mitokondriális NO termelés 6
2.3. Nitrozatív stressz szerepe a diebétesz szövődményeiben 7
2.4. A mitoK_{AT}P csatornák alegységeinek azonosítása 7
2.5. A mitokondriumok szerepe az iszkémiában alkalmazott őssejt-terápiában 9
2.5. Tanulságok 11

4. Tézisek **13**
4.1. A mitokondriális ATP-függő K-csatornák alegység összetétele 13
4.2. NOS-enzim független mitokondriális NO termelés mechanizmusa 13
4.3. Mitokondriális fehérje nitráció és PARP aktivitás 14
4.4. Nitrozatív stressz és a cukorbetegség szövődményei 14
4.5. Mitokondriumok szerepe az iszkémiát követő sejtterápiában 14

5. Saját közlemények **16**
5.1. A dolgozatban szereplő közlemények 16
5.2. Egyéb közlemények 19
5.3. Szabadalmak 21
5.4. Könyvfejezetek 22
5.5. Magyar nyelvű közlemények 23

6. Köszönetnyilvánítás **24**

dc_189_11

1. Bevezetés

Az iszkémiás betegségek, kiemelten a stroke és a szívinfarktus a leggyakoribb halálokok közé tartoznak, patomechanizmusukról igen sok tudományos eredmény született. Az elmúlt 10 évben több más, degeneratív vagy metabolikus jellegű betegségről is kiderült, hogy mikroszintű iszkémiás károsodás áll a háttérben, ezáltal még a diabétesz kutatása is a hipoxia-iszkémia irányába fordult. Mindezen erőfeszítések ellenére eredményes oki terápia alig ismert, ezért új terápis célpontok, új eljárások azonosítása a kutatások legfőbb mozgatórugója. A jelen dolgozatban bemutatom az eredményeit három, egymástól alapvetően különböző terápiás irány kutatásának, amelyek mindegyike az iszkémiás károsodás csökkentésére irányult. Akár az ioncsatornák, akár a szabadgyökök, akár a sejtterápia volt a tudományos kutatásaim kiindulópontja, minden esetben a mitokondriumok működésének vizsgálatához vezettek az eredmények, ezért választottam a dolgozat vezérfonalául ezt a sejtalkotót.

2. Kísérleti eredmények

2.1. A mitokondriális NO termelés mechanizmusa

A nitrogán monoxid (NO) az 1990-es évek slágermolekulája volt az élettani kutatásokban és hamarosan egyértelmű bizonyítéok álltak rendelkezésünkre az NO sejten belüli metabolizmusával kapcsolatban. Jól ismert volt az NO termelésért felelős nitorgén monoxid szintáz (NOS) enzimek mibenléte, amelyek Ca-függő, citoplazmában elhelyezkedő fehérje dimerek voltak. Később jelentek meg az első olyan tudományos közlemények, amelyek felvetették, hogy létezik egy mitokondriális nitrogén monoxid szintáz (mtNOS) enzim variáns. Ez az enzim potenciálisan új gyógyszercélpont lehet, ezért annak felfedezése komoly versenyt és nagy lehetőséget ígért. A rendelkezésre álló antitestekkel végzett Western blotok viszont nem voltak képesek egyértelműen kimutatni hogy a

dc_189_11

feltételezett mtNOS bármelyik ismert NOS enzimmel lenne azonos, vagy esetleg azok mitokondirális változata lenne. Hasonló eredményeket találtunk májban, agyban és szívben, a méréseket később kiterjesztettük több fajra, így egér, patkány, malac és humán mintákkal is dolgoztunk. Mivel a mitokondriumokban több volt az aspecifikus jel mint a megfelelő, ezért az alapjában szemikvantitatív Western blotok mellett elkezdtünk immunprecipitációt, radioaktív NOS-aktivitás mérést is végezni amelyek összességükben már meggyőző adatokat szolgáltattak: egér máj mitokondriumokban csekély, de szignifikáns NOS aktivitást mértünk, amely hipoxia hatására duplájára emelkedett. Ez volt az első leírása annak hogy a mtNOS bármilyen élettani folyamatban szerepet játszik és ezzel megnyitotta a lehetőségét annak, hogy gyógyszercélpontként szolgáljon. A további kísérletek azonban nemigen tudtak továbblépni a korai eredményeken. Nem sikerült kimutatni az eNOS foszforliációját mitokondriumokban, nem sikerült transzport szekvenciákat azonosítani az ismert NOS fehérjéken, és NOS knockout egerekben is megvoltak ugyanazok a jelek - felmerült, hogy a korai eredmények nálunk és más kutatóknál is inkább extramitokondriális kontaminációtól származnak. Egy tőlünk független kutatócsoport a mtNOS-t az nNOS egyik variánsának azonosította, konferenciákon azonban többen felrótták nekik, hogy a kísérleteiket nemigen lehet megismételni. Saját kísérleteinekt ezért kiterjesztettük, és 8 különböző módszerrel vizsgáltuk a mitokondriális NO termelést, de összességében egyik sem volt meggyőző. A tudományos közvéleménynek be kellett látnia, hogy az értelmezésünk elhamarkodott volt, mtNOS nem létezik a keresett formában. A tudományban negatív eredményt meggyőzően igazolni még nehezebb mint pozitívat, de végülis 5 eredeti közleményünk szólt a mtNOS létezése ellen amelyet más kutatók mérései is igazoltak. Egyetlen kérdés maradt nyitva ebben a témában: a fluoreszcens NO mérő módszer (Diaminofluoreszcein és rokon vegyültetei), amely szinte minden kutató kezében erős mitokondriális jelet adott. Sőt, a fluoreszcens jel megvolt mindhárom NOS knockout állatban is, és sejten belül elsősorban a mitokondiumokban dúsult. Módszertani munkában végül kimutattuk, hogy a diaminofluoreszcein nem NO-t, hanem N_2O_3-t mér, amely kis NO koncentráció mellett, de erősen oxidatív környezetben jön létre: a mitokondrium éppen ilyen. Ez felvetette a valószínűségét annak, hogy az álpozitív mtNOS eredmények

dc_189_11

inkább az NO oxidált származékainak tudhatók be, amelyek valóban a mitokondriumban keletkeznek. A további kutatásaink során felfedeztünk egy mechanizmust, amely a légzési lánc részvételével elsősorban nitrozótiolok, például nitrozóglutation (GSNO) forrásból állít elő NO-t a mitokondriumokban. Noha a keresett helyen nem találtunk új NOS enzimet, mégis felfedeztünk egy új mitokondriális biokémiai mechanizmust, amely elsősorban a nitrozótiolokon alapul.

2.2. Nitrozóglutationok és mitokondriális NO termelés

A leginkább szükséges eszköz a további kutatásokhoz egy mitokondriumokra specifikus NO donor, lehetőleg nitrozóglutation (GSNO) lett volna. Egy amerikai kollégám, Paul Brookes létre is tudott hozni egy ilyen molekulát és hamarosan tesztelte a mitokondrium-specifikus GSNO hatásait. Mire az én ugyanerre a témára beadott pályázatom forráshiány miatt elutasításra került, addigra ő kiderítette, hogy a mito-spefikus GSNO éppen ugyanúgy hat, mint a sima GSNO. Innentől fogva elsősorban a GSNO, mint endogén, nagy mennyiségben jelen lévő NO donor hatásaira koncentráltam. Nehéz proteomikai megoldásokkal, de sikeresen azonosítottuk azokat a fehérjéket, amelyek GSNO hatására nitrálódnak a mitokondriumokban: ezek között kellett keresni az élettani hatásokért felelősöket. A részleges lista furcsa egyveleget mutatott, amelyekből egyetlen enzim tűnt ki: a dihidro-lipoamid-dehidrogenáz (DLDH), amely az urea-ciklus része. Azért volt érdekes, mert az enzimkomplex amihez tartozik, ugyanúgy NADH-t használ szubsztrátként mint a jól ismert poliADP-ribóz-polimeráz (PARP), amely a nitrozatív stressz egyik fő downstream enzime. Megvizsgáltuk a lehetőségét annak, hogy a DLDH megfelelő környezetben képes lehet-e PARP-jellegű enzimatikus működésre. Meglepődve tapasztaltuk, hogy mind mitokondriális lizátumban, mind rekombináns formában az enzim képes PAR termelésre. Ezzel a felfedezéssel eljutottunk odáig, hogy ugyan a mitokondriumokban nem sikerült NOS enzimet találni, de azonosítottunk két új mechanizmust is, amelyek egyike az energiatermelő oxidatív foszforiláció enzimrendszerének részvételével nitrozáló ágenseket hoz létre, egy másik mechanizmus pedig ennek hatására mitokondriális poli-ADP-

dc_189_11

ribozilációt, így együttesen egy teljes, a sejtmagihoz hasonló biokémiai láncot azonosítottunk amely kizárólag mitokondriális enzimeket tartalmaz. A további kutatások ennek potenciális terápiás kihasználására fókuszáltak.

2.3. Nitrozatív stressz szerepe a diebétesz szövődményeiben

Először azt kerestük hogy cukorbetegségben, amelyről egyre inkább ismert hogy az alapvető perifériás elváltozások oxidatív stresszre vezethetők vissza, hol lehet tetten érni a nitrozilációt. Érdekes módon a mitokondriumok világától legmesszebb vezető úton tudtunk sikeres fejlesztés irányába lépni: noha amerikai kollégákkal azonosítottuk az ingadozó cukorszint oxidatív stresszt okozó hatását, Magyarországon pedig terhességi cukorbetegségben találtunk jó diagnosztikus lehetőséget a nitrozatív stressz markerekben, a GSNO mint potenciális gyógyszercélpont a diabéteszes láb szindrómában bizonyult sikeresnek. Az állatkísérletek sikere után a fő nehézséget az okozta, hogy egy laboratóriumban jól használható készítmény teljesen alkalmatlan gyógyászati környezetben: vizes oldatban a féléletideje mindössze 5,5 óra. A molekulától eltérni nem akartunk, mivel endogén anyag, metabolizmusa jól ismert, ezért mellékhatásokra nemigen kell számítani egy megfelelő formuláció esetén. Sok próbálkozás után végül három független utat is találtunk amelyek révén stabil, lokálisan alkalmazható készítményt állítottunk elő, amelyet végül emberen (saját magunkon) ki is próbáltunk - szép vazodilatációt okozott, amely területileg igen lokalizált volt. A szabadalmakat egy svájci gyógyszercég vette meg, akik a klinikai fejlesztést és kipróbálást végzik, reméljük a kész termék sikeresen eljut majd a betegekhez. Amikor elkezdtem keresni a hipotetikus mtNOS enzimet, a fő mozgatórugó a szív és agyi iszkémia volt, de ahogy a fenti történetből látszik, egy komoly zsákutca után a továbblépés mégiscsak elvitt egy gyógyszerfejlesztésig, noha nem abban a formában ahogy elterveztem.

2.4. A mitoK_{AT}P csatornák alegységeinek azonosítása

dc_189_11

Minden kutató tudja, hogy egyszerre több kísérleti vonalat kell folytatni, mivel sohasem lehet tudni melyik ág vezet sikerre és melyik lassul le technikai vagy más nehézségek miatt. A mtNOS kutatása közben ezért kapcsolódtam bele egy technikailag hasonló, de más elvi irányba, a mitokondriális ATP-függő kálium csatornák (mitoK_{AT}P) kutatásába. Az ötlet egyszerűnek látszott: ha már úgyis csinálunk egy sor Western blotot NOS antitestekkel, csináljunk párhuzamosan K_{ATP} alegység antitestekkel is. Akkoriban fedezték fel ugyanis, hogy az egyik ismert K_{ATP} nyitó vegyület, a diazoxid, a mitokondriumokra specifikus, de ami fontosabb: képes megvédeni a szívizmot az infarktus hatásaitól. A hatás igen jelentős volt: az elhalt terület csökkenése 30%-kal, a halálozási arány csökkenése 50%-ról közel nullára, stb. Munkatársaimmal hasonló eredményeket találtunk agyban is kísérleti állatokban, ezért volt fontos a mitoK_{ATP} mint lehetséges gyógyszercélpont azonosítása. Ahogy a NOS esetében, itt is hamar kiderült hogy a mitokondriumban minden máshogy van. Találtunk egyértelműen a mitokondriumokban dúsuló Kir alegység variánsokat, de a SUR alegység variánsok nagyon más molekulasúlynál szerepeltek. Proteomikai technikákat kellett bevetni, 2-dimenziós blotokat és immunprecipitációt végezni, az antitestek által felismert szekvenciák révén a lehetséges szekvencia-szakaszokat azonosítani, in silico mitokondriális traszport-tag-eket azonosítani, végül primer szekvenálást is végeztünk. A kutatás fontossága kiemelkedő volt, ugyanis a mitoK_{AT}P csatorna egy ideális gyógyszercélpont: a nagy gyógyszergyárak mindegyike fejlesztett értágító vagy antidiabetikus céllal a K_{ATP}-n ható szereket, több szer pl. a Glibenklamid igen elterjedt gyógyszer ma is, ezért ha sikerül a célpontot azonosítani, akkor a gyógyszerfejlesztés eddigi tudása, tapasztalatai, és nem utolsó sorban az elvetett vegyületek közötti keresés hamar talált volna egy szívinfarktus és stroke megelőző molekulát. Egy igazi új blockbuster-jelöltet, amelyre nagyon szüksége van már a betegeknek. Saját kísérleteink azonban egyre inkább meggyőztek arról, hogy a mitoK_{ATP} csatorna tévútnak bizonyult: ugyan valószínűleg tényleg jelen van a mitokondriumok belső membránjában, de mennyisége olyan alacsony, hogy számottevő hatása nincsen az organellum működésére. A K_{ATP} nyitó vegyületek farmakológiai hatékonysága továbbra is meggyőző, de a hatásmechanizmust máshol kell keresni, könnyen lehet, hogy

dc_189_11

nem is egy csatorna van illetve hogy nem elsősorban K_{ATP} jellegű. Az új blockbuster azóta is várat magára, pedig az élettani lehetőség megvan...

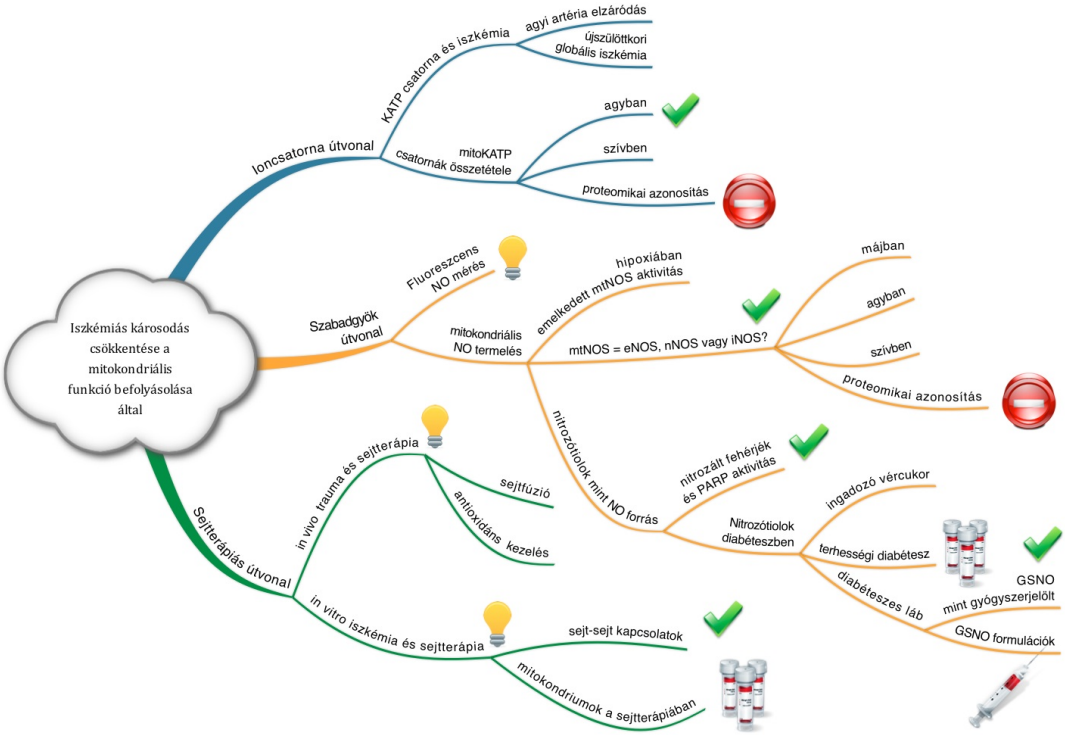
2.5. A mitokondriumok szerepe az iszkémiában alkalmazott őssejt-terápiában

A harmadik irány, amelyet ugyanabban az időben, ugyanannak a célpontnak a vizsgálatára terveztem teljesen eltérő mechanizmusokat vizsgált. Agyi iszkémiában és traumában, amelyek egyaránt maradandó agykárosodást okoznak, sejtbeültetéssel terveztem javítani a szöveti funkciót. A sejtterápia egy szinttel magasabban helyezkedik el mint a mitokondriumok: nem sejten belüli, hanem sejtek, szövetek közötti hatásokat vizsgálunk. Mégis, a mitokondriumok ebben a mechanizmusban is kulcsszerepet játszanak. Az első nehézséget az okozta, hogy 2001 környékén a sejtterápiás kutatások még éppen csak elkezdődtek. Először ezért egy rágcsáló modellt dolgoztunk ki agyi trauma és embrionális szöveti őssejt beültetés irányába, majd ennek segítségével azonosítottuk hogy a nitrozatív stressz gátlása jelentősen fokozza a beültetett őssejtek túlélését. Mellékleletként megfigyeltük, hogy néhány sejt valószínűleg fúzionált: az átültetett sejtek jelölt magja mellett egy jelöletlen sejtmag is látható volt. Ez indított el abba az irányba, hogy nagy idő és térbeli felbontással, in vitro vizsgáljuk a sejtterápiát. Kidolgoztunk egy további módszert, amely a konfokális mikroszkóp asztalán, folyamatos monitorozás mellett képes megmutatni az iszkémiás sejthalál és őssejt-hozzáadás folyamatát. A kísérleteket elsősorban a sejtfúzió vizsgálatára terveztük, de nem ez volt a leglényegesebb megfigyelésünk. Sikerült ugyan lefilmezni néhány valódi sejtfúziót károsodott és átültetett sejtek között, azonban ez nagyon ritka jelenség volt. Egy-egy fúzió nem volt képes magyarázatot adni arra, hogy miért van akár 30%-nyi kettősen jelölt sejt már egy nap együtt-tenyésztés után is. A kézenfekvő válasz az volt, hogy a hozzáadott sejteket jelölő festék aspecifikusan átoldódik a károsodott sejtekbe, ezzel a fúzió látszatát keltve. A részletes megfigyelések ezt viszont kizárták: a filmszerű felgyorsított felvételeken azt láttuk, hogy több sejt képes egymás közvetlen közelében megőrizni a saját festékét, míg más sejtek aktívan sejt-sejt kontaktusba lépnek és a festékek kicserélődnek. Aktív, sejtek által szabályozott

dc_189_11

folyamatról van tehát szó. De mi lehet ez? A szakirodalom kevés támpontot nyújtott. Mindössze 10 cikk foglalkozott sejtek közötti membrán traszporttal, amely az általunk megfigyelthez hasonlóan nanométeres vastagságú membránhidakon keresztül történik. Egy cikk leírta, hogy ezeken a nanotubulusokon mitokondriumok áramlanak, amelyet mi is megfigyeltünk. Egy másik közlemény pedig azt találta, hogy mitokondrium-irtott sejtek egészséges társaiktól képesek átvenni, transzportálni mitokondriumokat és ezzel visszaállítani az oxidatív sejtlégzést. Hipotézisünk tehát az volt, hogy az iszkémián átesett sejtek, amelyek 24 órán belül elhalnak, megmenekülhetnek azáltal, hogy egészséges sejtektől nanotubulusokon át mitokondriumokat vesznek át. Eléggé merész hipotézis volt, de hihető és főleg jól vizsgálható a saját fejlesztésű módszerekkel. A kísérletek részben igazolták a hipotézést, mivel kimutattuk hogy jól respiráló mitokondriumok nélkül az őssejt-beültetés szövetmentő hatása nem érvényesül, de azt is igazoltuk, hogy ehhez nem szükséges a mitokondrimuk átjutása egyik sejtből a másikba. Ezek a megfigyelések jelentős érdeklődést váltottak ki, az egyik cikkünk sokáig a folyóirat legtöbbet letöltött cikkei között volt, egy éven belül több review-ban is idézték és szakmai fórumokon vitatták meg a kollégák. A mechanizmus pontos felderítése még hátravan, de bízom benne hogy a mitokondriumokkal szerzett korábbi tapasztalatok, jók és rosszak egyaránt, segíteni fognak abban, hogy ez a kutatási irány is végül új terápiák kifejlesztéséhez vezessen.

dc_189_11



1. ábra. Az értekezés tematikájának áttekintése, minden végpont egy-egy tudományos közlemény. Sárga villanykörte jelöli a kidolgozott új módszereket, zöld pipa a tézisekben szereplő legfontosabb felfedezéseket, behajtani tilos tábla a további kutatások lezárását, vérvételi csövek az új klinikai eljárások fejlesztési irányát, illetve injekció a szabadalmaztatott új gyógyszer formulációt.

2.5. Tanulságok

A 10 éves munka során több ígéretes ötletről bizonyosodott be, hogy vakvákánynak bizonyult, 3 esetben új kutatási módszereket kellett kifejleszteni hogy egyáltalán továbbléphessünk, de végül a 3 megközelítésből a szabadgyökök esetében szabadalmazott gyógyszerformuláció fejlesztése nőtt ki a kutatási irányból, míg két esetben új klinikai protokollok kidolgozása van folyamatban. Utólag visszatekintve könnyen kiszámítható, hogy 15 eredeti tudományos közleményt felölelő új alapkutatási eredmény kellett ahhoz, hogy egyetlen hasznosítható technológia jöjjön létre - és egyáltalán nem volt megjósolható, hogy melyik eredmény vezet majd ide, illetve hogy milyen betegség lesz a

dc_189_11

célcsoportunk. A tanulság számomra inkább az volt, hogy minden kutatásnak úgy kell nekiállni, hogy egy lépéssel közelebb vigyen egy új terápia vagy diagnosztikum kifejlesztéséhez, és ha nyílik egy lehetőség akkor azon az úton kell végigmenni még akkor is, ha ez elvezet az eredeti érdeklődési területemről és kisebb tudományos újdonsággal szolgál. Noha tudományosan izgalmasabb egy új nitrogén monoxid szintáz enzim után kutatni, de a cukorbetegeken inkább egy jól használható nitrogén monoxid donor készítmény segíthet - amelynek kifejlesztéséhez fel kellett használni az alapkutatási tapasztalatokat is.

Budapest, 2011. Augusztus 21.

Lacza Zsombor

dc_189_11

4. Tézisek

A dolgozatban ismertett tudományos eredmények téziseit az alábbi 5 pontban foglalom össze. A kutatási eredmények eléréséhez három új kísérleti vizsgáló módszert is ki kellett fejleszteni, amelyek önálló módszertani közleményekben és könyvfejezetekben jelentek meg. Az alapkutatási eredmények révén azonosítottunk egy új terápiás lehetőséget, amelynek kiaknázására egy gyógyszerformulációt szabadalmaztattunk, és amelyet jelenleg egy gyógyszergyár fejleszt tovább a klinikai alkalmazhatóság irányába.

4.1. A mitokondriális ATP-függő K-csatornák alegység összetétele

Az iszkémiás prekondíciókiváltásában alapvető szerepet játszó mitoK_{ATP} csatornák feltételezhető alegységeinek azonosítása során megállapítottuk, hogy a pórus formáló Kir6.1 és Kir6.2 jelen van a mitokondriális membránokban. A klasszikus K_{ATP} csatorna gátlószer szulfonilurea-kötőhely is kimutatható mind szív, mind agy mitokondriumokban, de egyik ismert szulfonilurea-receptor sem targetált a mitokondriális mátrixba. Ezek alapján feltételezhető, hogy egy új típusú KATP csatorna az, amely a mátrix K-egyensúlyának fenntartásában részt vesz.

4.2. NOS-enzim független mitokondriális NO termelés mechanizmusa

A mitokondrium, mint a reaktív nitrogén tartalmú ágensek fő támadáspontja maga is képes lehet NO termelésére. Sokrétű kísérletes megközelítésből kimutattuk, hogy egyik ismert NO-szintáz enzim sincsen jelen a mitokondriumokban amely érdemi mennyiségben képes lenne NO-t termelni. Ezzel szemben igazoltuk, hogy a mitokondriális légzési lánc uniquinon ciklusa képes reaktív nitrogén tartalmú ágenseket termelni.

dc_189_11

4.3. Mitokondriális fehérje nitráció és PARP aktivitás

Oxidatív stressz esetén a mitokondriális fehérjék tiol csoportjai nitrálódnak, illetve poli-ADP-ribóz oldalláncok kapcsolódnak hozzájuk, ezzel befolyásolva az érintett fehérjék funkcióját. Kimutattuk, hogy az egyik ilyen fehérje a dihidrolipoamid-dehidrogenáz (DLDH), majd több párhuzamos módszerrel is igazoltuk, hogy a DLDH a KGDH komplex részeként képes mérhető PARP aktivitást mutatni. A mitokondriális eredetű nitrogén tartalmú oxidánsok aktiválni képesek egy önálló PARP kaszkádot a mitokondriumokban, amely a sejtmagi PARP-tól függetlenül működik. Mivel a PAR polimerekről ismert hogy sejthalált váltanak ki a mitokondriális sejtkárosító funkciók aktiválásával, ezért kísérleteinkkel egy teljes NO-függő mitokondriális sejthalál mechanizmust tudtunk rekonstruálni

4.4. Nitrozatív stressz és a cukorbetegség szövődményei

A cukorbetegség több szervet érintő szövődményeinek kialakulásában is kulcsszerepet játszik a nitrozatív stressz és a relatív NO hiány, mivel az NO metabolizmusa az értágító és trombocita aggregáció csökkentő NO felől eltolódik a nitrozatív stresszt kiváltó peroxinitrit felé. Ezen mechanizmust kimutattuk ingadozó vércukorszint okozta endotél diszfunkcióban, terhességi cukorbetegségben, illetve igazoltuk, hogy cukorbeteg láb szindrómában az NO külsőleges bevitele képes jelentősen javítani a mikrocirkulációt. Ez utóbbi felismerés vezetett oda, hogy egy új gyógyszerformulációt dolgoztunk ki, amely NO donorként a (mellesleg a mitokondriumokban is jelen lévő) GSNO-t tartalmaz.

4.5. Mitokondriumok szerepe az iszkémiát követő sejtterápiában

Az iszkémiás károsodás után transzplantált őssejtek többféle úton képesek javítani a sérült szövet működését. A transzdifferenciáció, sejtfúzió és a parakrin faktorok mellett elsőként leírtunk egy negyedik lehetéses mechanizmust, a sejt-sejt közötti kapcsolatok szerepét. A sejt-sejt kapcsolat

dc_189_11

leginkább vékony membránhidakon, nanotubulusokon keresztül valósul meg, amelyet a sejtek irányítottan csatolnak egymáshoz. A beültetett sejtekben jól működő, respiráló mitokondrium állományra van szükség ahhoz, hogy a megmentő hatást el tudják érni, de közvetlen mitokondrium transzfer nem történik.

dc_189_11

5. Saját közlemények

A doktori fokozatszerzéshez szükséges szcientometriai adatok. A "sejtbiológia" témakör minimális limitjei zárójelben megadva.

Összesített impakt faktor	128,243 (60)
PhD munkában nem szereplő közlemények impakt faktora	115,807 (30)
Összes citáció	781 (240)
Független citáció	643 (240)
Első vagy utolsó szerzős közlemények impakt faktora	76,150 (40)
Első vagy utolsó szerzős közlemények összes citációja	483 (160)
Első vagy utolsó szerzős közlemények független citációja	409 (160)

5.1. A dolgozatban szereplő közlemények

1. Lacza, Z., M. Puskar, J. P. Figueroa, J. Zhang, N. Rajapakse, and D. W. Busija. Mitochondrial nitric oxide synthase is constitutively active and is functionally upregulated in hypoxia. Free Radic Biol Med 2001;31:1609-1615.
2. Rajapakse, N., K. Shimizu, B. Kis, J. Snipes, Z. Lacza, and D. Busija. Activation of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels prevents neuronal cell death after ischemia in neonatal rats. Neurosci Lett 2002;327:208-212.
3. Shimizu, K., Z. Lacza, N. Rajapakse, T. Horiguchi, J. Snipes, and D. W. Busija. MitoK(ATP) opener, diazoxide, reduces neuronal damage after middle cerebral artery occlusion in the rat. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2002;283:H1005-11.
4. Lacza, Z., E. M. Horvath, K. Komjati, T. Hortobagyi, C. Szabo, and D. W. Busija. PARP inhibition improves the effectiveness of neural stem cell transplantation in experimental brain trauma. Int J Mol Med 2003;12:153-159.
5. Lacza, Z., J. A. Snipes, B. Kis, C. Szabo, G. Grover, and D. W. Busija. Investigation of the subunit composition and the pharmacology of the

dc_189_11

mitochondrial ATP-dependent K+ channel in the brain. Brain Res 2003;994:27-36.

6. Lacza, Z., E. Horvath, and D. W. Busija. Neural stem cell transplantation in cold lesion: a novel approach for the investigation of brain trauma and repair. Brain Res Brain Res Protoc 2003;11:145-154.
7. Lacza, Z., J. A. Snipes, A. W. Miller, C. Szabo, G. Grover, and D. W. Busija. Heart mitochondria contain functional ATP-dependent K+ channels. J Mol Cell Cardiol 2003;35:1339-1347.
8. Lacza, Z., J. A. Snipes, J. Zhang, E. M. Horvath, J. P. Figueroa, C. Szabo, and D. W. Busija. Mitochondrial nitric oxide synthase is not eNOS, nNOS or iNOS. Free Radic Biol Med 2003;35:1217-1228.
9. Lacza, Z., T. F. Horn, J. A. Snipes, J. Zhang, S. Roychowdhury, E. M. Horvath, J. P. Figueroa, M. Kollai, C. Szabo, and D. W. Busija. Lack of mitochondrial nitric oxide production in the mouse brain. J Neurochem 2004;90:942-951.
10. Busija, D. W., Z. Lacza, N. Rajapakse, K. Shimizu, B. Kis, F. Bari, F. Domoki, and T. Horiguchi. Targeting mitochondrial ATP-sensitive potassium channels--a novel approach to neuroprotection. Brain Res Brain Res Rev 2004;46:282-294.
11. Lacza, Z., E. M. Horvath, E. Pankotai, A. Csordas, M. Kollai, C. Szabo, and D. W. Busija. The novel red-fluorescent probe DAR-4M measures reactive nitrogen species rather than NO. J Pharmacol Toxicol Methods 2005;52:335-340.
12. Lacza, Z., A. V. Kozlov, E. Pankotai, A. Csordas, G. Wolf, H. Redl, M. Kollai, C. Szabo, D. W. Busija, and T. F. Horn. Mitochondria produce reactive nitrogen species via an arginine-independent pathway. Free Radic Res 2006;40:369-378.
13. Horvath, E. M., Z. Lacza, A. Csordas, C. Szabo, M. Kollai, and D. W. Busija. Graft derived cells with double nuclei in the penumbral region of experimental brain trauma. Neurosci Lett 2006;396:182-186.
14. Lacza, Z., E. Pankotai, A. Csordas, D. Gero, L. Kiss, E. M. Horvath, M. Kollai, D. W. Busija, and C. Szabo. Mitochondrial NO and reactive nitrogen species production: does mtNOS exist? Nitric Oxide 2006;14:162-168.

dc_189_11

15. Csordas, A., E. Pankotai, J. A. Snipes, A. Cselenyak, Z. Sarszegi, A. Cziraki, B. Gaszner, L. Papp, R. Benko, L. Kiss, E. Kovacs, M. Kollai, C. Szabo, D. W. Busija, and Z. Lacza. Human heart mitochondria do not produce physiologically relevant quantities of nitric oxide. Life Sci 2007;80:633-637.
16. Ihnat, M. A., J. E. Thorpe, C. D. Kamat, C. Szabo, D. E. Green, L. A. Warnke, Z. Lacza, A. Cselenyak, K. Ross, S. Shakir, L. Piconi, R. C. Kaltreider, and A. Ceriello. Reactive oxygen species mediate a cellular 'memory' of high glucose stress signalling. Diabetologia 2007;50:1523-1531.
17. Seabra, A. B., E. Pankotai, M. Feher, A. Somlai, L. Kiss, L. Biro, C. Szabo, M. Kollai, M. G. de Oliveira, and Z. Lacza. S-nitrosoglutathione-containing hydrogel increases dermal blood flow in streptozotocin-induced diabetic rats. Br J Dermatol 2007;156:814-818.
18. Lacza, Z., E. Pankotai, and D. W. Busija. Mitochondrial nitric oxide synthase: current concepts and controversies. Front Biosci 2009;14:4436-4443.
19. Pankotai, E., Z. Lacza, M. Muranyi, and C. Szabo. Intra-mitochondrial poly(ADP-ribosyl)ation: potential role for alpha-ketoglutarate dehydrogenase. Mitochondrion 2009;9:159-164.
20. Horvath, E. M., R. Magenheim, E. Kugler, G. Vacz, A. Szigethy, F. Levardi, M. Kollai, C. Szabo, and Z. Lacza. Nitrative stress and poly(ADP-ribose) polymerase activation in healthy and gestational diabetic pregnancies. Diabetologia 2009;52:1935-1943.
21. Cselenyak, A., E. Pankotai, E. M. Horvath, L. Kiss, and Z. Lacza. Mesenchymal stem cells rescue cardiomyoblasts from cell death in an in vitro ischemia model via direct cell-to-cell connections. BMC Cell Biol 2010;11:29.
22. Hornyak, I., L. Kiss, K. Fekete, E. Pankotai, and Z. Lacza. Az S-Nitrozoglutation nitrogénmonoxid-donor molekula terápiás alkalmazásának lehetőségei. Érbetegségek 2010;17:55-59.
23. A. Cselenyák, E. Pankotai, A. Csordás, L. Kiss, and Lacza, Z. Live-Cell Fluorescent Imaging of Membrane or Mitochondrion Transfer between Connected Cells in Culture. In: edited by Méndez-Vilas, A., and Díaz, J. FORMATEX, 2011, 764-771.

dc_189_11

24. Hornyak, I., E. Pankotai, L. Kiss, and Z. Lacza. Current Developments in the Therapeutic Potential of S-Nitrosoglutathione, an Endogenous NO-donor Molecule. Curr Pharm Biotechnol 2011

5.2. Egyéb közlemények

1. Benyo, Z., Z. Lacza, C. Gorlach, and M. Wahl. Selective inhibition of neuronal nitric oxide synthase fails to alter the resting tension and the relaxant effect of bradykinin in isolated rat middle cerebral arteries. Acta Physiol Hung 1999;86:161-165.
2. Benyo, Z., Z. Lacza, T. Hortobagyi, C. Gorlach, and M. Wahl. Functional importance of neuronal nitric oxide synthase in the endothelium of rat basilar arteries. Brain Res 2000;877:79-84.
3. Lacza, Z., B. Erdos, C. Gorlach, M. Wahl, P. Sandor, and Z. Benyo. The cerebrocortical microcirculatory effect of nitric oxide synthase blockade is dependent upon baseline red blood cell flow in the rat. Neurosci Lett 2000;291:65-68.
4. Lacza, Z., K. Kaldi, K. Kovecs, C. Gorlach, Z. Nagy, P. Sandor, Z. Benyo, and M. Wahl. Involvement of prostanoid release in the mediation of UTP-induced cerebrovascular contraction in the rat. Brain Res 2001;896:169-174.
5. Lacza, Z., P. Herman, C. Gorlach, T. Hortobagyi, P. Sandor, M. Wahl, and Z. Benyo. NO synthase blockade induces chaotic cerebral vasomotion via activation of thromboxane receptors. Stroke 2001;32:2609-2614.
6. Lacza, Z., M. Puskar, B. Kis, J. V. Perciaccante, A. W. Miller, and D. W. Busija. Hydrogen peroxide acts as an EDHF in the piglet pial vasculature in response to bradykinin. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2002;283:H406-11.
7. Hortobagyi, T., C. Gorlach, Z. Benyo, Z. Lacza, S. Hortobagyi, M. Wahl, and T. Harkany. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase-mediated activation of poly(ADP-ribose) polymerase in traumatic brain injury: neuroprotection by 3-aminobenzamide. Neuroscience 2003;121:983-990.
8. Erdos, B., Z. Lacza, I. E. Toth, E. Szelke, T. Mersich, K. Komjati, M. Palkovits, and P. Sandor. Mechanisms of pain-induced local cerebral blood flow

dc_189_11

changes in the rat sensory cortex and thalamus. Brain Res 2003;960:219-227.

9. Lacza, Z., L. Dezsi, K. Kaldi, E. M. Horvath, P. Sandor, and Z. Benyo. Prostacyclin-mediated compensatory mechanism in the coronary circulation during acute NO synthase blockade. Life Sci 2003;73:1141-1149.
10. Simandle, S. A., B. A. Kerr, Z. Lacza, D. M. Eckman, D. W. Busija, and F. Bari. Piglet pial arteries respond to N-methyl-D-aspartate in vivo but not in vitro. Microvasc Res 2005;70:76-83.
11. Kiss, L., M. Chen, D. Gero, K. Modis, Z. Lacza, and C. Szabo. Effects of 7-ketocholesterol on the activity of endothelial poly(ADP-ribose) polymerase and on endothelium-dependent relaxant function. Int J Mol Med 2006;18:1113-1117.
12. Molnar, A., A. Toth, Z. Bagi, Z. Papp, I. Edes, M. Vaszily, Z. Galajda, J. G. Papp, A. Varro, V. Szuts, Z. Lacza, D. Gero, and C. Szabo. Activation of the poly(ADP-ribose) polymerase pathway in human heart failure. Mol Med 2006;12:143-152.
13. Lacza, Z., and D. W Busija. Urotensin-II is a nitric oxide-dependent vasodilator in the pial arteries of the newborn pig. Life Sci 2006;78:2763-2766.
14. Toth-Zsamboki, E., E. Horvath, K. Vargova, E. Pankotai, K. Murthy, Z. Zsengeller, T. Barany, T. Pek, K. Fekete, R. G. Kiss, I. Preda, Z. Lacza, D. Gero, and C. Szabo. Activation of poly(ADP-ribose) polymerase by myocardial ischemia and coronary reperfusion in human circulating leukocytes. Mol Med 2006;12:221-228.
15. Mersich, T., E. Szelke, B. Erdos, Z. Lacza, K. Komjati, and P. Sandor. Somatosensory pain does not affect total cerebral blood volume. Neuroreport 2007;18:649-652.
16. Lacza, Z., L. Hortobagyi, B. Horvath, E. M. Horvath, P. Sandor, and Z. Benyo. Additive effect of cyclooxygenase and nitric oxide synthase blockade on the cerebrocortical microcirculation. Neuroreport 2009;20:1027-1031.
17. Horvath, B., G. Lenzser, B. Benyo, T. Nemeth, R. Benko, A. Iring, P. Herman, K. Komjati, Z. Lacza, P. Sandor, and Z. Benyo. Hypersensitivity to

dc_189_11

thromboxane receptor mediated cerebral vasomotion and CBF oscillations during acute NO-deficiency in rats. PLoS One 2010;5:e14477.

18. Buday, A., P. Orsy, M. Godo, M. Mozes, G. Kokeny, Z. Lacza, A. Koller, Z. Ungvari, M. L. Gross, Z. Benyo, and P. Hamar. Elevated systemic TGF-beta impairs aortic vasomotor function through activation of NADPH oxidase-driven superoxide production and leads to hypertension, myocardial remodeling, and increased plaque formation in apoE(-/-) mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2010;299:H386-95.
19. Aberg, J., E. Pankotai, G. Hulsart Billstrom, M. Weszl, S. Larsson, C. Forster-Horvath, Z. Lacza, and H. Engqvist. In vivo evaluation of an injectable premixed radiopaque calcium phosphate cement. Int J Biomater 2011;2011:232574.
20. Horvathy, D. B., P. P. Nardai, T. Major, K. Schandl, A. Cselenyak, G. Vacz, L. Kiss, M. Szendroi, and Z. Lacza. Muscle regeneration is undisturbed by repeated polytraumatic injury. Eur J Trauma Emerg Surg 2011;37:161-167.
21. Schwirtlich, M., A. Kwakowsky, Z. Emri, K. Antal, Z. Lacza, A. Cselenyak, Z. Katarova, and G. Szabo. GABAergic signaling in primary lens epithelial and lentoid cells and its involvement in intracellular Ca(2+) modulation. Cell Calcium 2011
22. Kiss, L., R. Benko, E. Kovacs, T. Szerafin, K. Modis, C. Szabo, and Z. Lacza. Human internal thoracic artery grafts exhibit severe morphological and functional damage and spasmic vasomotion due to oxidative stress. Med Sci Monit 2011;17:CR411-6.
23. Kiraly, M., K. Kadar, D. B. Horvathy, P. Nardai, G. Z. Racz, Z. Lacza, G. Varga, and G. Gerber. Integration of neuronally predifferentiated human dental pulp stem cells into rat brain in vivo. Neurochem Int 2011;59:371-381.

5.3. Szabadalmak

1. Lacza, Z., and I. Hornyák. Pharmaceutical composition comprising S-nitrosoglutathione and polysaccharide. 2010, US 20100292326
2. Lacza, Z., and M. Weszl. Method for producing an implantable bone composition. 2010, US 20100303885

dc_189_11

3. Lacza, Z., and I. Hornyák. Method for stabilization of S-nitrosoglutathione and composition prepared by the same. 2011, US 20110136910
4. Lacza, Z., M. Weszl, and V. Izápy. Imaging chamber for supporting multiple investigation of cells and tissues by various techniques. 2011, PCT/HU2011/000003
5. Lacza, Z., M. Weszl, and V. Izápy. Device for centrifugation and further processing of tissue aspirates in closed system. 2011, PCT/HU2011/000002
6. Lacza, Z., and I. Hornyak. Method for colorimetric determination of cPNMP specific enzyme activity via coupled enzymatic reactions. 2011, EP 11462003.2
7. Horváthy, D. B., G. Vácz, and Z. Lacza. Protein coated bioactive suture for cell transplantation and method for producing thereof. 2011, US 61/526,727

5.4. Könyvfejezetek

1. Sándor, P., Komjáti, K., de Jong, W., Erdős, B., Lacza, Z., Benyó, Z., and Reivich, M. Hemorrhage-induced brain ischaemia: Modulatory role of endogenous opioids and antiopioids in the cerebrovascular bed. In: Ischemic blood flow in the brain, edited by Fukuuchi, Y, Tomita, M., and Koto, A. Springer-Verlag, Tokyo, 2000,
2. Benyo, Z., Z. Lacza, T. Hortobagyi, C. Gorlach, and M. Wahl. Functional importance of neuronal nitric oxide synthase in the endothelium of rat basilar arteries. Brain Res 2000;877:79-84.
3. Sándor, P., Benyó, Z., Erdős, B., Lacza, Z., and Komjáti, K. The Roy-Sherrington hypothesis: facts and surmises. In: International Congress Series 1235, edited by 2002, 325-335.
4. Lacza, Z. Technológia Transzfer a Semmelweis Egyetemen. In: Innovációmenedzsment, edited by Pörzse, G. Semmelweis Kiadó, 2009,
5. A. Cselenyák, E. Pankotai, A. Csordás, L. Kiss, and Lacza, Z. Live-Cell Fluorescent Imaging of Membrane or Mitochondrion Transfer between

dc_189_11

Connected Cells in Culture. In: edited by Méndez-Vilas, A., and Díaz, J. FORMATEX, 2011, 764-771.

6. Lacza, Z., and Weszl, M., Business from IP. Semmelweis Innovations, 2011.

5.5. Magyar nyelvű közlemények

1. Zador, Z., Z. Lacza, Z. Benyo, T. Harkany, and T. Hortobagyi. [Apoptosis in focal brain ischemia]. Ideggyogy Sz 2003;56:216-228.
2. Zador, Z., Z. Benyo, Z. Lacza, T. S. Hortobagyi, T. Harkany, and T. Hortobagyi. [Neuroprotection in brain ischemia--doubts and hopes]. Ideggyogy Sz 2004;57:81-93.
3. Csordas, A., and Z. Lacza. Őssejtek és regenerációs orvostudomány. Praxis 2005
4. Muranyi, M., and Z. Lacza. [Influence of diabetes mellitus on cerebral ischemia and reperfusion injury]. Orv Hetil 2006;147:1885-1889.
5. Muranyi, M., and Z. Lacza. [Astrocytes in health and disease]. Orv Hetil 2007;148:697-702.
6. Hornyak, I., L. Kiss, K. Fekete, E. Pankotai, and Z. Lacza. Az S-Nitrozoglutation nitrogénmonoxid-donor molekula terápiás alkalmazásának lehetőségei. Érbetegségek 2010;17:55-59.
7. Kiss, L., R. Benkő, E. Kovács, T. Szerafin, K. Módis, C. Szabó, and Z. Lacza. Humán arteria thoracica interna graftok morfológiai és funkcionális vizsgálata. Érbetegségek 2010;17:9-15.
8. Kiss, L., E. Dongó, Z. Janicsek, M. Szepes, Z. Benkő, A. Cselenyak, and Z. Lacza. Őssejtterápia alkalmazásának eredményei perifériás érbetegségben. Érbetegségek 2010;17:33-38.
9. Cselenyak, A., Z. Benkő, M. Szepes, E. Horváth, Z. Lacza, and L. Kiss. Az őssejtek szerepe a szívinfarktus kezelésében: in vitro kísérletes módszer a hatásmechanizmus vizsgálatára. Érbetegségek 2011;18:3-11.

dc_189_11

6. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom mindazon tanároknak, akik szakmai tudása és bíztatása indított el majd tartott meg ezen a pályán. Gimnáziumban Dr. Berend Mihály biológia szakköre és Dr. Csaba György fizika tanítása ismertette meg velem a természettudományok alapjait. Az egyetemi évek alatt a tudományos diákköri vezetőim, Prof. Sándor Péter és Prof. Benyó Zoltán voltak azok, akik iránymutatása mellett megtanultam kísérletezni. Külföldön sokat tanultam Prof. David Busija vezetése alatt nemcsak tudományos munkában, hanem munkaszervezés, kutatócsoport építés tekintetében is, amelyért igen hálás vagyok. Hazatérésem után Prof. Kollai Márk és Dr. Szabó Csaba adott lehetőséget arra, hogy önálló kutatócsoportot alapítsak, támogatásuk nélkül a külföldön elindított kutatások nem tudtak volna itthon hasznosulni. Köszönettel tartozom Prof. Tulassay Tivadar rektor úrnak is, mivel megbízott az egyetemi technológia transzfer iroda megszervezésével, és ennek kapcsán tudtam az alapkutatási eredményeket egy lépéssel tovább vinni a hasznosítás, klinikai bevezetés felé. Prof. Szendrői Miklós javaslatára indultam el a tudomány és klinikum együttes pályáján, mentorálása nélkül nem tudtam volna hazai körülmények között kutatóorvosként dolgozni. Köszönettel tartozom PhD és TDK hallgatóimnak, akik szorgalma, szakma iránti elkötelezettsége elengedhetetlenül szükséges volt az eredmények elérésében.

Hálás vagyok feleségemnek, Ildikónak a türelméért és támogatásáért, amely átsegített a tudományos munka kudarcos időszakain. Hasonlóképpen köszönettel tartozom szüleimnek és testvéremnek, akik bíztatása nélkül el sem indultam volna a tudományos kutatás útján.