

기계환기로 인한 급성 폐손상에서 poly(ADP-ribose) polymerase-1의 역할

고려대학교 의과대학 내과학교실 ¹고려대학교의료원 안산병원 인간유전체연구소

김제형, 윤대위¹, 허규영, 정기환, 이승룡, 이상엽, 신철, 심재정, 인광호, 유세화, 강경호

The Role of Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 in Ventilator-Induced Lung Injury

Je-Hyeong Kim, M.D., Dae Wui Yoon¹, Gyu Young Hur, M.D., Ki Hwan Jung, M.D., Sung Yong Lee, M.D., Sang Yeub Lee, M.D., Chol Shin, M.D., Jae Jeong Shim, M.D., Kwang Ho In, M.D., Se Hwa Yoo, M.D., Kyung Ho Kang, M.D.

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Korea University, Seoul, Korea ¹Institute of Human Genomic Study, Ansan Hospital, Korea University Medical Center, Ansan, Korea

Background : Reactive oxygen species (ROS) take center stage as executors in ventilator-induced lung injury (VILI). The protein with DNA-damage scanning activity, poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP1), signals DNA rupture and participates in base-excision repair. Paradoxically, overactivation of PARP1 in response to massive genotoxic injury such as ROS can induce cell death through β -nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) depletion, resulting in inflammation. The purpose of this study is to investigate the role of PARP1 and the effect of its inhibitor in VILI.

Methods : Forty-eight male C57BL/6 mice were divided into sham, lung protective ventilation (LPV), VILI, and PARP1 inhibitor (PJ34)+VILI (PJ34+VILI) groups. Mechanical ventilator setting for the LPV group was PIP 15 cmH₂O + PEEP 3 cmH₂O + RR 90/min + 2 hours. The VILI and PJ34+VILI groups were ventilated on a setting of PIP 40 cmH₂O + PEEP 0 cmH₂O + RR 90/min + 2 hours. As a PARP1 inhibitor for the PJ34+VILI group, 20 mg/Kg of PJ34 was treated intraperitoneally 2 hours before mechanical ventilation. Wet-to-dry weight ratio and acute lung injury (ALI) score were measured to determine the degree of VILI. PARP1 activity was evaluated by using an immunohistochemical method utilizing biotinylated NAD. Myeloperoxidase (MPO) activity and the concentration of inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , and IL-6 were measured in bronchoalveolar lavage fluid (BALF).

Results : In the PJ34+VILI group, PJ34 pretreatment significantly reduced the degree of lung injury, compared with the VILI group ($p < 0.05$). The number of cells expressing PARP1 activity was significantly increased in the VILI group, but significantly decreased in the PJ34+VILI group ($p = 0.001$). In BALF, MPO activity, TNF- α , IL-1 β , and IL-6 were also significantly lower in the PJ34+VILI group (all, $p < 0.05$).

Conclusion : PARP1 overactivation plays a major role in the mechanism of VILI. PARP1 inhibitor prevents VILI, and decreases MPO activity and inflammatory cytokines. (*Tuberc Respir Dis* 2006; 60: 451-463)

Key words : Ventilator-induced lung injury, Acute lung injury, Poly (ADP-ribose) polymerase-1, Poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor

서론

*이 논문은 2004년도 정부재원 (교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음 (KRF-2004-003-E00088).

Address for correspondence : **Kyung Ho Kang, M.D.**, Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine, Korea University Guro Hospital, Korea University, #97, Gurodong-Gil, Guro-Gu, Seoul, Korea
Zip-code 152-703

Phone : 02-818-6638 Fax : 02-865-9670

E-mail : kkhchest@korea.ac.kr

Received : Jan. 23. 2006

Accepted : Apr. 24. 2006

기계환기는 많은 환자들의 치료 및 생명의 유지에 있어서 주요한 역할을 한다. 그러나 경우에 따라서는 기계환기 자체가 폐에 직접적인 손상을 일으킴으로써 부작용을 초래할 수도 있다. 기계환기로 인한 폐손상 (ventilator-induced lung injury, VILI)은 전통적으로 설정되는 많은 일회호흡량으로 인해서 폐포가 과팽창 됨으로써 발생하는 물리적인 신전손상 (stretch injury)과 적은 호기말 폐용적으로 인해서 폐포가 팽창과 허탈을 반복함으로 발생하는 전단력 (剪

斷力, shearing force)에 의해서 발생한다¹. VILI로 인해 폐내에서 발생한 염증반응은 폐조직에 국한되지 않고, 손상된 폐포-모세혈관 장벽을 통하여 전신적으로 순환하게 됨으로써, 결과적으로 다발성 장기기능 부전 (multiple system organ failure, MSOF)을 초래하여 급성폐손상이나 급성호흡곤란증후군 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 환자들을 사망에 이르게 하는 한 원인으로 추정되고 있다². 따라서 그간의 연구결과들을 토대로 폐보호적 기계환기 전략이 모색되었고, 여러 임상연구들에서 이 전략이 ARDS 환자들의 사망률을 개선시키는 효과가 있는 것으로 증명되었다^{3,4}. 그러나 이러한 개선에도 불구하고, 아직도 많은 수의 ARDS 환자들이 MSOF로 사망하고 있어, 최근에는 기계환기로 인한 기계적 스트레스가 폐의 세포 및 분자적 병리과정에 미치는 영향, 즉 생체상해 (biotrauma)에 관심이 집중되고 있다⁵. 현재까지 연구된 바에 의하면 생체상해의 여러 병리기전 중에서, 활성화된 호중구로부터 생성되는 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)이 염증반응 및 조직손상에 있어서 주요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다⁶.

Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP1)은 정상적으로 DNA 복구와 유전자 보전 (genomic integrity)에 관련된 세포핵 내 단백질로⁷⁻¹¹, DNA 파열을 신호하고 base-excision repair에 관여한다^{12,13}. 그러나 심한 DNA 손상으로 인해 과도하게 활성화될 경우에는 세포 내 β -nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) 및 그 전구물질인 ATP의 결핍을 초래하여 세포 사멸 및 괴사를 통한 염증반응을 일으킨다¹⁴⁻¹⁶. 다양한 염증반응 모델을 통한 연구들에서 활성산소종 및 산화질소 (nitric oxide)가 심한 DNA 손상 및 이로 인한 PARP1의 과활성을 유발하는 대표적인 원인이며, PARP1 억제제 및 PARP1 결핍 유전자 조작을 통해서 염증 정도가 감소되는 것으로 보고된 바 있다^{11, 17-24}.

따라서 본 연구에서는 VILI의 생체상해 과정에서, 활성산소종으로 인해 DNA의 손상이 발생하고, 이로 인해 PARP1이 과활성화되어 세포괴사가 초래되고, 비가역적인 염증반응이 발생하여 폐손상이 심화된다

는 가설 하에, 백서를 이용한 VILI 모델에서 PARP1의 역할 및 그 억제제의 전처치 효과에 대해서 연구하고자 하였다.

II. 대상 및 방법

1. 실험 동물

실험 대상 동물은 5주령, 체중 20 ~ 25 gm의 수컷 C57BL/6 생쥐 48마리를 네 군, 즉 겉보기 수술군 (Sham군), 폐보호적 환기군 (lung protective ventilation group, LPV군), 기계환기기로 인한 폐손상군 (ventilator-induced lung injury group, VILI군) 및 PARP1 억제제인 PJ34 전처치 후 기계환기기로 인한 폐손상군 (PJ34+VILI군)으로 나누어 실험하였다. 또한 12마리씩의 각군을 폐손상의 조직병리학적, 면역조직화학적 고찰을 위한 조직군 6마리, 기관지폐포 세척액 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 내 myeloperoxidase (MPO)의 활성 및 염증성 시토카인의 측정을 위한 BAL군 6마리로 나누어 고찰하였다.

2. VILI 모델의 형성

백서에 대한 기계 환기는, pentobarbital sodium 65 mg/Kg을 복강 내로 주사하여 마취시킨 후, 기관 절개를 시행하여 삽관한 후에, 동물용 기계환기기 (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA)를 이용하여 시행하였다. 적절한 VILI 모델 형성을 위한 기계환기기의 설정은 예비실험을 통해 다양한 조건으로 실험하여, 30분 간격으로 각 시점에서의 조직병리학적 소견을 고찰하여 가장 현저하게 미만성 폐포 손상 (diffuse alveolar damage) 및 초자막 (hyaline membrane)의 형성, 폐포출혈 (alveolar hemorrhage), 염증성 세포 침윤 등의 전형적인 급성폐손상의 조직 소견²⁵을 나타내는 조건과 기간을 결정하였다. 그 결과, 최고기도압 (peak inspiratory pressure, PIP) 40 cm-H₂O, 호기말양압 (positive end-expiratory pressure, PEEP) 0 cmH₂O, 분당호흡수 (respiratory rate, RR) 90회의 조건에서 시간이 경과하면서 전형적인 폐손상

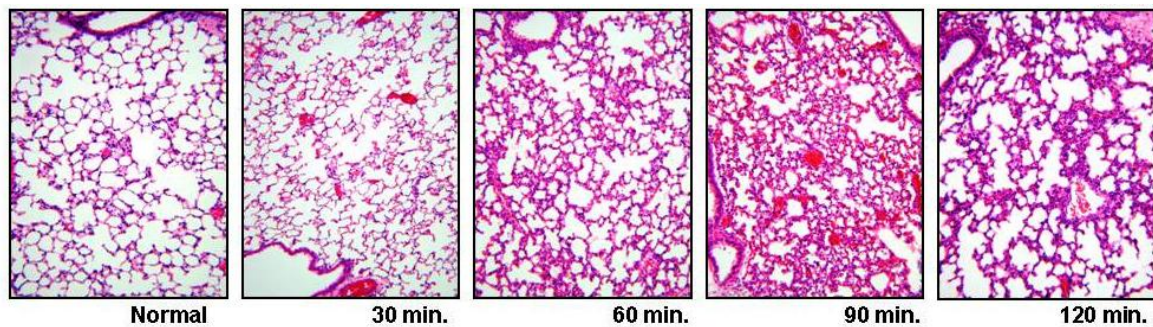


Figure 1. In the setting of 40 cmH₂O of peak inspiratory pressure, 0 cmH₂O of positive end-expiratory pressure, and 90 per minute of respiration rate, the degree of ventilator-induced lung injury increased with the lapse of time. The findings of severe acute lung injury such as alveolar congestion, hemorrhage, infiltration of inflammatory cells and thickening of alveolar wall were most prominent at about 120 minutes after mechanical ventilation (hematoxylin and eosin stain, $\times 100$).

의 소견이 진행하여, 2시간 경에 가장 심한 소견을 보이고(Figure 1), 기계환기를 지속할 경우 대부분의 생쥐가 2시간에서 2시간 30분 사이에 사망하였다. 따라서 VILI 및 PJ34+VILI군에 대한 기계 환기는 PIP 40 cmH₂O + PEEP 0 cmH₂O + RR 90/min.의 조건으로 2시간 동안 시행하였고, LPV군에 대해서는 PIP 15 cmH₂O + PEEP 3 cmH₂O + RR 90/min.의 조건으로 역시 2시간 동안 기계환기를 시행하였다. 기계환기 동안의 폐역학 (pulmonary dynamics)의 측정과 감시는 research pneumotach system (HANS RUDOLPH, Inc.[®], Kansas City, MO, USA)을 이용하였다.

3. 폐조직의 처리 및 기관지폐포세척술

각 군의 조직군에 대하여 조직의 처리는 다음과 같이 시행하였다. 마취가 되어 있는 상태에서, 복강을 절개하여 대동맥 및 하대정맥을 절단하여 충분히 실혈을 시킨 후에, 정중 흉골절개술로 흉곽을 절개하고, 폐와 심장을 함께 적출하였다. 그 후, 좌측 주기관지와 우상엽 기관지를 봉합사로 묶은 후, 좌측폐를 떼어 내어 PARP1에 대한 면역조직학적 활성의 고찰을 위해, 냉동주형 (cryomold)을 이용하여 O.C.T. (optimal cutting temperature) compound 내에 동결, 포매한 후 -70°C에 보관하였다. 우상엽에 대해서는 습건중량비(濕乾重量比, wet-to-dry weight ratio)를 측정하였

고, 우측폐의 나머지 부분에 대해서는 조직병리학적으로 고찰을 위해 우측 주기관지를 통해서 15 cmH₂O의 압력으로 4% paraformaldehyde 용액을 주입하여 폐를 팽창시킨 후, 역시 4% paraformaldehyde 용액 내에서 고정하였다. 48시간 후 심장 및 종격동 조직을 제거한 후에 70% alcohol in phosphate-buffered saline (PB-S) 내에서 냉장 보관 후, 파라핀에 포매하여 블록을 제작하였다.

BAL 군에 대한 기관지폐포세척술은, 마취된 상태에서 실혈을 통해 안락사를 시킨 후에, 흉곽을 절개하고, 삼관을 통하여 1 mL의 PBS를 주입하여 세차례 반복하여 시행하였다. 모집된 BALF를 2,000 \times g, 4°C의 조건에서 10분간 원심분리 한 후, 상층액을 추후 MPO 활성 및 염증성 시토카인 농도의 측정을 위하여 -70°C에 냉동보관 하였다.

4. 습건중량비의 측정

기계환기로 인한 폐손상으로 발생한 폐울혈 및 부종의 정도를 측정하기 위한 습건중량비의 측정은, 우상엽을 절제한 후 무게를 측정하여 습중량을 구하였고, 건중량은 80°C의 건조 오븐 내에서 72시간 동안 건조시킨 후에 무게를 측정하여, 습건중량비를 구하여 비교하였다.

5. 급성 폐손상 지수의 측정

기계 환기로 인한 급성폐손상 정도의 조직병리학적 고찰을 위해, 파라핀에 포매 된 폐조직을 5 mm의 두께로 잘라 Hematoxylin and Eosin(H/E) 염색을 시행하여 그 정도를 관찰하였다. 급성 폐손상 지수²⁶는 병리조직을 판독하여 1) alveolar capillary congestion, 2) hemorrhage, 3) infiltration or aggregation of inflammatory cells in the airspace or interstitium 및 4) thickness of the alveolar wall / hyaline membrane formation 등의 네 가지 지표에 대해서, 0 = minimal (little) damage, 1+ = mild damage, 2+ = moderate damage, 3+ = severe damage, 4+ = maximal damage의 five-point scale system으로 점수화한 후, 각 지표의 점수를 합산하여 비교하였다.

6. PARP1의 활성에 대한 면역조직화학적 측정

폐조직에서 PARP1의 활성은 PARP1의 기질인 biotinylated NAD를 이용한 면역조직화학적 방법을 이용하여 측정하였다^{27,28}. 우선 10 μ m의 동결폐조직 절편을 -20°C의 온도에서 95% 에탄올로 10분간 고정 한 후에, PBS로 세척하였다. 이후 1% Triton X-100 (in 100mM Tris pH 8.0)에 15분간 침습시킨 후, 37°C의 온도에서 15분간 reaction mixture (10 mM Mg-Cl₂, 1 mM dithiothreitol, 30 μ M biotinylated NAD⁺, in 100 mM Tris, pH 8.0)와 반응시켰다. 세 차례 PBS로 세척한 후에, 실온에서 30분 간 peroxidase-conjugated streptavidine (1:100)과 반응시켜 incorporated biotin을 검출한 후, 다시 PBS로 10분간 3번 세척하고, cobalt-enhanced nickel-DAB substrate로 발색반응을 시켰다. 대조 염색은 Nuclear Fast Red[®]로 하였고, 탈수시킨 후에 슬라이드를 제작하였다.

양성대조를 위하여 리포다당질 100 μ g (in 50 μ L of PBS)을 기관내로 투여하여 급성폐손상 모델을 유도한 뒤, PARP1에 대한 면역조직화학 염색을 시행한 결과, PARP1의 활성을 나타내는 다수의 세포들이 진하고 검게 염색되는 것을 확인하였다. PARP1 활성의 정량화는 5개의 고배율 ($\times 400$) 시야에서 면역조직화

학적으로 활성을 나타내어 염색되는 세포 수의 총합을 구하여 비교하였다.

7. PARP1 억제제

PJ34+VILI군에 대하여 PARP1 억제제로 PJ34 [N-(6-Oxo-5,6-dihydrophenanthridin-2-yl)-N, N-dimethylacetamide, hydrochloride] (Calbiochem[®], USA)를 20 mg/Kg²⁹의 용량으로 복강 내 주사하였다. 적절한 투여 시간의 결정을 위해 예비실험을 통하여, 기계환기 전 24, 12, 6, 4, 3, 2, 1 시간 및 0.5 시간에 PJ34를 전처치 한 후, 2시간 동안 PIP 40 cmH₂O + PEEP 0 cmH₂O + RR 90/min.의 조건으로 기계환기를 시행하였다. 그 결과 기계환기 전 24시간부터 2시간까지 조직에서 PARP1의 활성이 점차로 감소하다가, 2시간 전에 전처치 하였을 경우 가장 낮은 활성을 보인 후, 다시 증가하는 소견을 보여, 기계환기 2시간 전에 전처치하기로 결정하였다. Sham, LPV 및 VILI군에 대하여는 200 μ L의 PBS를 안락사 혹은 기계환기 2시간 전에 복강 내로 주사하였다.

8. BALF 내 MPO 활성 및 염증성 시토카인 농도의 측정

폐출혈은 기계환기로 인한 폐손상의 전형적인 소견으로, 조직이나 BALF 내에서 호중구의 침윤이나 분해를 측정하는 것은, 출혈로 인하여 과평가 될 가능성이 있어, 활성화된 호중구의 침윤을 정확히 반영할 수 없다. 따라서 활성산소종의 주요한 원인인 활성화된 호중구의 지표로서, 이 세포에서 분비되는 MPO의 활성을 BALF 내에서 측정하였다. MPO 활성은 50 μ L의 BALF를 microtiter plate 내에서 200 μ L의 O-dianisidine dihydrochloride (1.25 mg/mL in PBS), 0.1% wt/vol의 bovine serum albumin (BSA) 및 H₂O₂ (0.05% = 0.4 mM)과 반응시킨 후에, 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 결정하였다³⁰.

BALF 내 염증성 시토카인 농도는 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) 및 IL-6에 대하여 Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay

(ELISA) (R&D Systems, MN, USA) 법으로 측정하였다.

9. 통계

모든 결과는 평균 \pm 표준오차 (mean \pm standard error of mean, SEM)로 표시하였다. 각 군 간의 비교는 비모수적 Mann-Whitney U 검정과 Kruskal Wallis 검정을 사용하여 분석하였다. 모든 계산은 SPSS for Windows Release 11.0.0(SPSS Inc. USA)을 사용하였고, p 값이 0.05 이하인 경우 통계적인 유의성이 있는 것으로 판단하였다. PARP1의 활성화와 폐손상 정도 및 염증성 시토카인과의 상관관계는 Spearman's rank correlation coefficient를 이용하여 분석하였다.

III. 결 과

1. 폐손상의 정도

전반적인 폐손상의 정도를 H/E 염색 하에서 고찰한 결과, VILI군에서 폐포 전반에 다량의 삼출액 및 초자막의 형성과 폐포벽 및 폐포 내에 많은 염증성 세포들의 침윤, 폐모세혈관 주위 및 폐포 내 출혈과 간질의 비후 및 부종 등이 관찰되었다. 반면 LPV군에서는 Sham군과 비교하여 정도의 염증성 세포의 침윤만이 관찰될 뿐 현저한 폐손상의 소견은 없었다. PJ34+VILI군의 경우에 있어서는 VILI군과 비교하여 전반적인 폐손상의 정도가 현저하게 감소하여, 정도의 염증성 세포의 증가 소견 만이 관찰되었고, 간질의 비후, 출혈 및 부종 등의 폐손상의 소견은 없었다

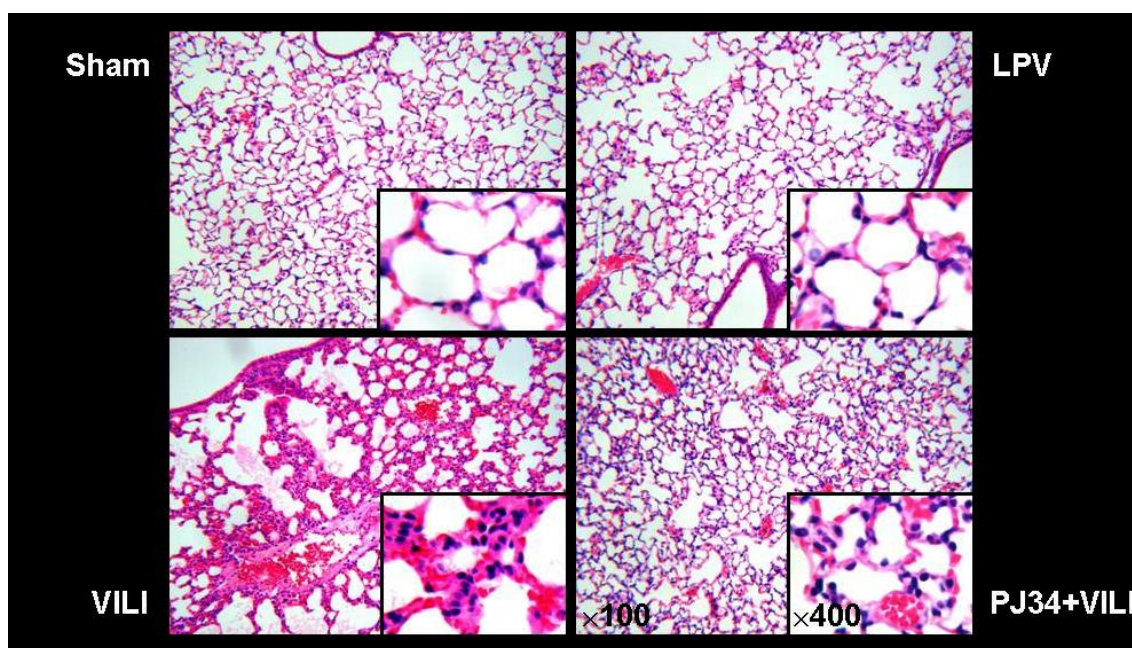


Figure 2. Histopathologic examination shows high levels of intra-alveolar exudates, inflammatory infiltration, hemorrhage, and interstitial edema in the VILI group. In the LPV group, significant acute lung injury was absent and only mild inflammatory cellular infiltration was observed. The PJ34+VILI group shows a moderately higher level of inflammatory cell infiltration and congestion than the LPV group, while the overall degree of lung injury was significantly lower than the VILI group (hematoxylin eosin stain).

Sham: sham group, LPV: lung protective ventilation group, VILI: ventilator-induced lung injury group, PJ34+VILI: poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor (PJ34)+VILI group

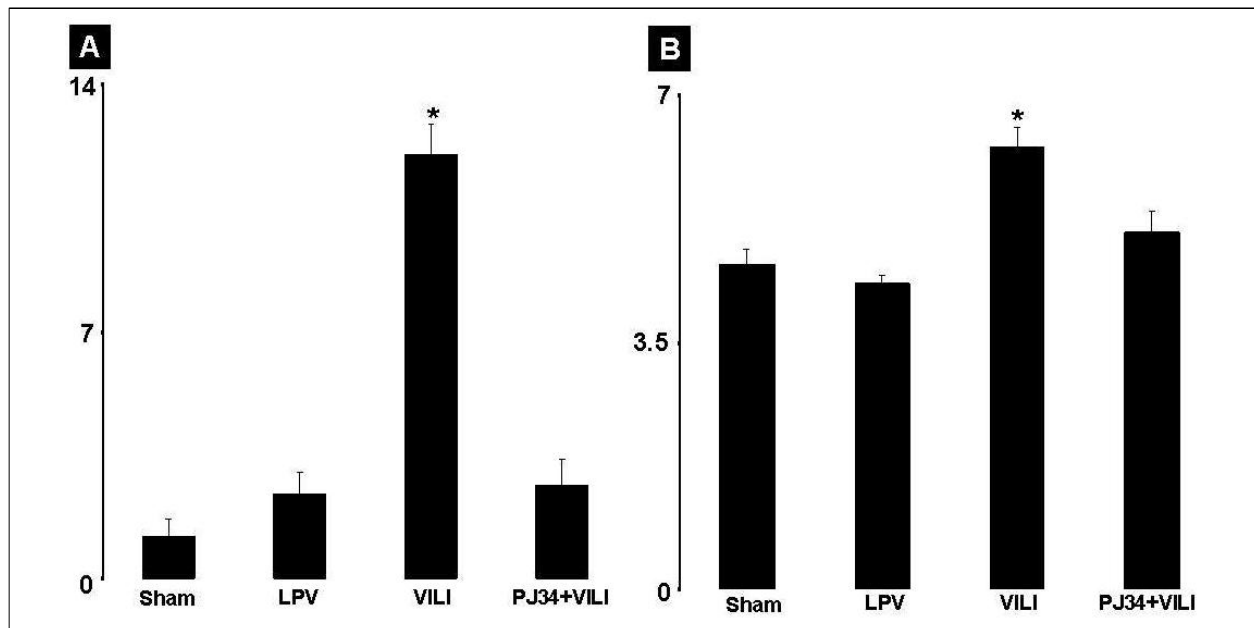


Figure 3. Acute lung injury score (A) and wet-to-dry weight ratio (B) were significantly different among the groups ($p=0.000$ and $p=0.001$ by Kruskal-Wallis test, respectively) and higher in the VILI group than the other groups (* $p<0.05$, compared with other groups). Sham: sham group, LPV: lung protective ventilation group, VILI: ventilator-induced lung injury group, PJ34+VILI: poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor (PJ34)+VILI group

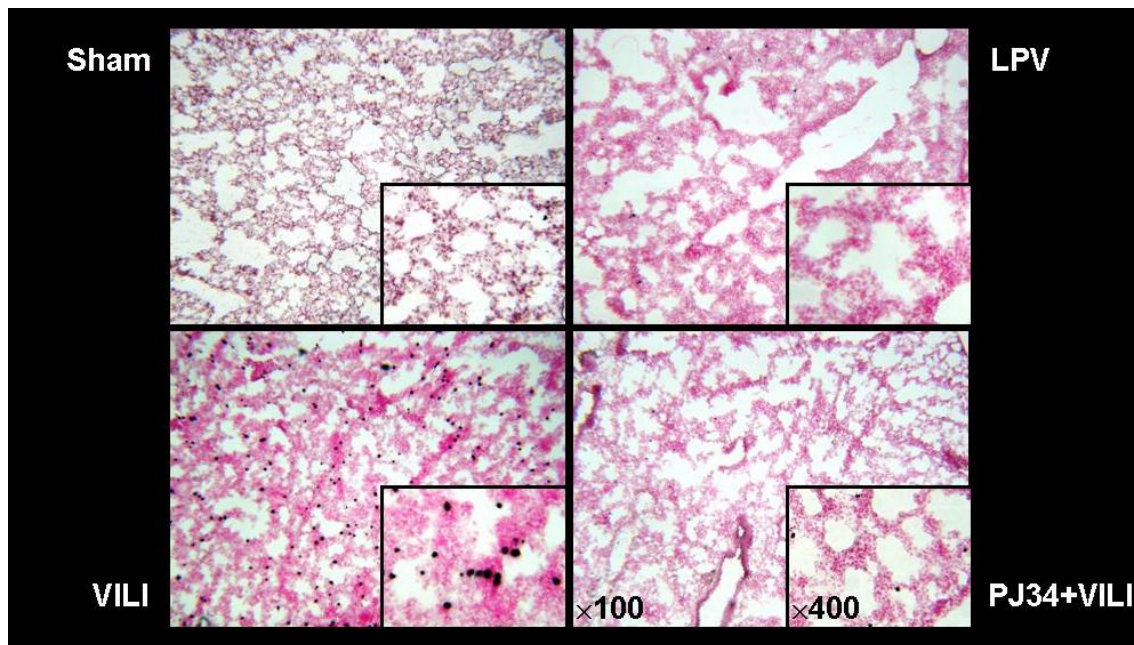


Figure 4. In immunohistochemical method utilizing biotinylated NAD, the cells with poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP1) activity were stained as dark black color. In the VILI group, the number of cells with PARP1 activity enormously increased compared with the sham or LPV groups. After PARP1 inhibitor, PJ34, pretreatment, the PARP1 activity positive cells significantly decreased in the PJ34+VILI group. Sham: sham group, LPV: lung protective ventilation group, VILI: ventilator-induced lung injury group, PJ34+VILI: poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor (PJ34)+VILI group

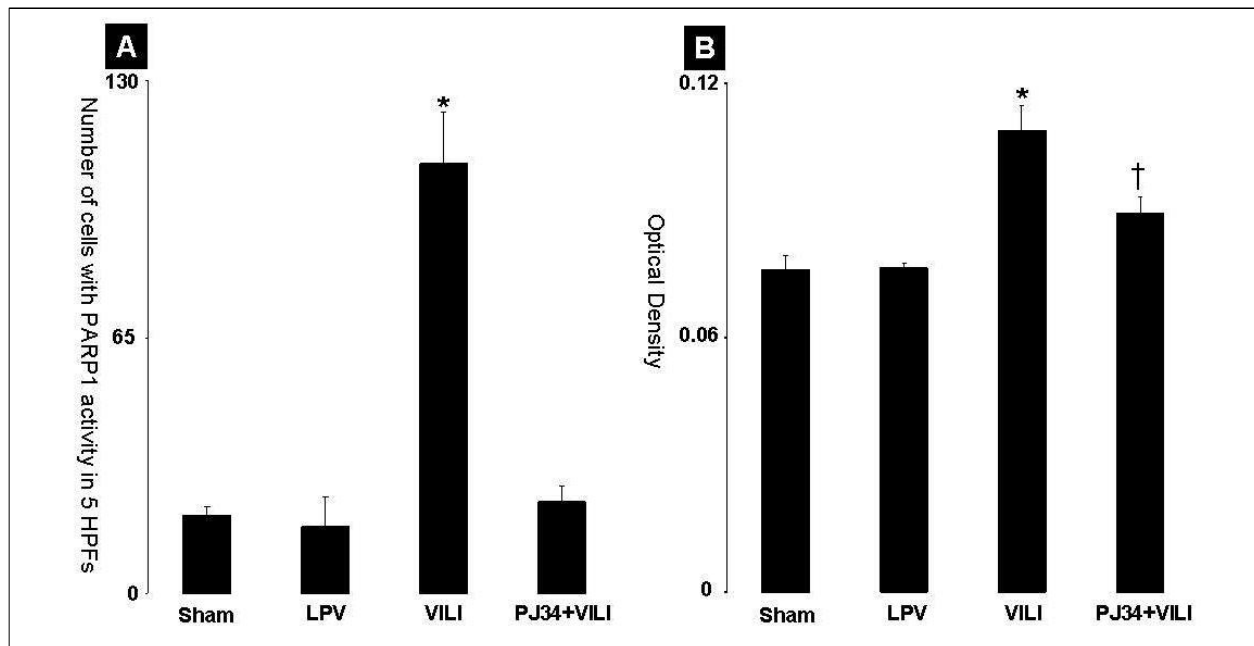


Figure 5. The number of cells with PARP1 activity in 5 high power fields (HPFs, $\times 400$) (A) and myeloperoxidase (MPO) activity in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) (B) were significantly different among the groups ($p=0.002$ and $p=0.001$ by Kruskal-Wallis test, respectively) and higher in the VILI group than the other groups ($*p<0.05$, compared with other groups). MPO activity of PJ34+VILI group was significantly higher than Sham and LPV group ($†p<0.05$).

Sham: sham group, LPV: lung protective ventilation group, VILI: ventilator-induced lung injury group, PJ34+VILI: poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor (PJ34)+VILI group

(Figure 2). 이를 급성폐손상 지수로 정량화하여 비교한 결과 Sham군에서는 1.20 ± 0.58 , LPV군에서는 2.40 ± 0.6 , VILI군에서는 12.0 ± 0.87 , 그리고 PJ34+VILI군에서는 2.67 ± 0.67 로 네 군간에 유의한 차이를 보였다 ($p=0.000$ by Kruskal-Wallis test). 각 군간의 비교에 있어서는 VILI군에서 다른 세군에 비하여 통계학적으로 유의하게 높았고 ($p<0.05$, compared with other groups), Sham, LPV 및 PJ34+VILI 세군간의 비교에 있어서는 유의한 차이가 없었다 ($p>0.05$) (Figure 3A).

습건중량비는 Sham군에서는 4.60 ± 0.21 , LPV군에서는 4.33 ± 0.11 , VILI군에서는 6.28 ± 0.26 , 그리고 PJ34+VILI군에서는 5.05 ± 0.32 로 네 군간에 유의한 차이를 보였다 ($p=0.001$ by Kruskal-Wallis test). 각 군간의 비교에 있어서는 다른 세군에 비하여 VILI군에서 유의하게 높았고 ($p<0.05$, compared with other groups), Sham, LPV 및 PJ34+VILI 세군간의 비교에

있어서는 역시 유의한 차이를 나타내지 않았다 ($p>0.05$) (Figure 3B).

2. 폐조직에서 PARP1의 활성

Biotinylated NAD를 이용한 면역조직화학 염색에서 PARP1의 활성을 보여, 진하고 검게 염색되는 세포의 수를 5개의 고배율 ($\times 400$) 시야에서 고찰한 결과 (Figure 4), Sham군에서는 19.75 ± 2.29 개, LPV군에서는 17.0 ± 7.64 개, VILI군에서는 108.75 ± 13.18 개, 그리고 PJ34+VILI군에서는 23.50 ± 3.70 개로 네 군간에 유의한 차이를 보였다 ($p=0.002$ by Kruskal-Wallis test). VILI군에서 다른 세군에 비하여 유의하게 높았고 ($p<0.05$, compared with other groups), PJ34+VILI군에서 현저히 감소하여 Sham 및 LPV군과의 비교에 있어서 유의한 차이가 관찰되지 않았다 ($p>0.05$) (Figure 5A).

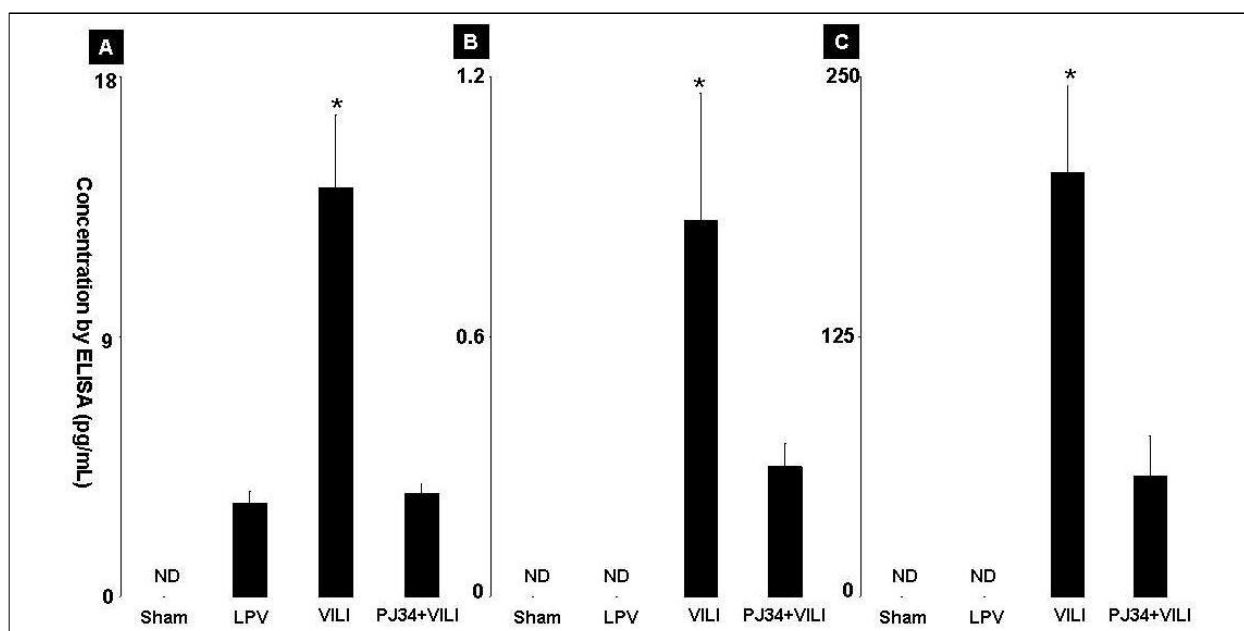


Figure 6. The concentration of tumor necrosis factor (TNF)- α (A), interleukin (IL)-1 β (B), and IL-6 (C) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were significantly higher in the VILI group than the other groups (* $p < 0.05$, compared with other groups).

ELISA: enzyme-linked immuno-sorbent assay, ND: not detected, Sham: sham group, LPV: lung protective ventilation group, VILI: ventilator-induced lung injury group, PJ34+VILI: poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor (PJ34)+VILI group

3. BALF 내 MPO 활성 및 염증성 시토카인의 농도

BALF 내의 MPO의 활성은, Sham군에서는 0.076 ± 0.003 O.D. (optical density), LPV군에서는 0.076 ± 0.001 O.D., VILI군에서는 0.109 ± 0.006 O.D., 그리고 PJ34+VILI군에서는 0.089 ± 0.004 O.D.로 네 군간에 유의한 차이를 보였다 ($p = 0.001$ by Kruskal-Wallis test). VILI군에서 다른 세군에 비하여 유의하게 높았고 ($p < 0.05$, compared with other groups), PJ34+VILI군에서는 VILI군과 비교하여 현저히 감소되기는 하였으나, Sham 및 LPV군과의 비교에 있어서 유의하게 높았다 ($p < 0.05$, compared with Sham and LPV group) (Figure 5B).

염증성 시토카인의 농도는 TNF- α (Figure 6A)의 경우는 Sham군에서는 검출되지 않았고, LPV, VILI 및 PJ34+VILI군에서는 각각 3.24 ± 0.42 pg/mL, 14.16 ± 2.53 pg/mL 및 3.58 ± 0.33 pg/mL로 세 군간에 유의한 차이를 보였으며 ($p = 0.001$ by Kruskal-Wallis test), VILI군에서 다른 두 군에 비해 유의하게 높았다

($p = 0.002$). IL-1 β (Figure 6B) 및 IL-6 (Figure 6C)는 Sham 및 LPV군에서는 검출되지 않았고, VILI군에서는 각각 0.87 ± 0.29 pg/mL 및 204.01 ± 41.85 pg/mL, PJ34+VILI군에서는 각각 0.30 ± 0.05 pg/mL 및 57.85 ± 19.5 pg/mL로, PJ34+VILI군에서 VILI군에 비하여 유의하게 낮았다 ($p = 0.019$ and $p = 0.015$, respectively)

4. PARP1의 활성과 폐손상의 정도 및 염증성 시토카인 농도와의 상관관계

VILI군과 PJ34+VILI군간에 PARP1의 활성과 폐손상의 정도 및 염증성 시토카인 농도와의 상관관계를 Spearman's rank correlation coefficient를 이용하여 분석한 결과, PARP1의 활성은 급성폐손상지수 ($r = 0.950$, $p = 0.000$) 및 습근중량비 ($r = 0.680$, $p = 0.015$) 등의 폐손상 정도와 TNF- α ($r = 0.691$, $p = 0.039$), IL-1 β ($r = 0.897$, $p = 0.003$) 그리고 IL-6 ($r = 0.699$, $p = 0.011$) 등의 염증성 시토카인의 농도와 유의한 상관관계를 보였다 (Figure 7).

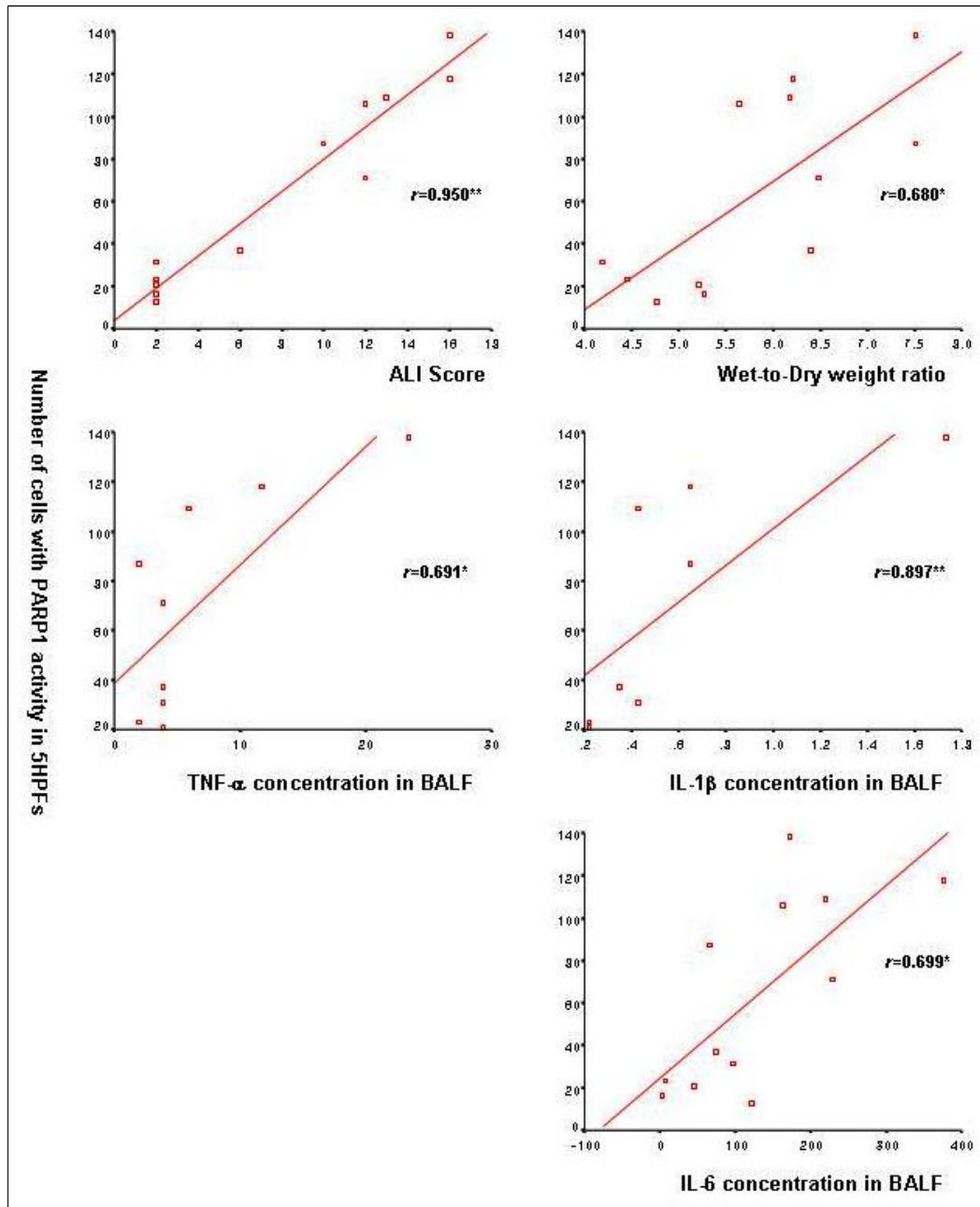


Figure 7. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP1) activity showed significant relationship with degree of acute lung injury (ALI) and inflammatory cytokines in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) (r =Spearman's rho, $*p<0.05$ and $**p<0.01$).

HPF: high power field, TNF- α : tumor necrosis factor- α , IL-1 β : interleukin-1 β , IL-6: interleukin-6

IV. 고 찰

본 연구의 결과에 의하면 VILI의 병리기전에 있어서 활성화된 호중구의 지표인 MPO의 상승과 함께 PARP1이 과활성화되는 것으로 나타났다. 또한 폐손

상의 정도 및 염증성 시토카인의 증가는 PARP1의 과활성과 유의한 상관관계를 보였으며, PARP1 억제제를 전처치하였을 경우 의미 있게 감소하였다.

VILI는 기계환기로 인한 신전손상 및 전단력으로 인해 발생하는 압력상해 (barotrauma), 용적상해

(volutrauma), 그리고 허탈상해 (atelectrauma) 등의 생체물리적 손상 (biophysical injury) 및 이 과정에서 각종 염증성 세포가 침윤·활성화되고^{31,32}, 염증성 매개 물질들이 증가³³하는 생체상해, 즉 생체화학적 손상(biochemical injury)를 포함한다. 이와 같은 손상기전들을 근거로 일회호흡량 그리고/혹은 고원부압력 (plateau pressure)을 제한하고, 적절한 PEEP을 적용하여 폐포의 모집을 유지함으로써 주로 생체물리적 손상을 최소화하는 폐보호적 환기법이 모색되었으며, 여러 임상연구들에서 ARDS 환자들의 사망률을 개선시키는 것으로 보고되었다³⁴. 그러나 폐보호적 환기법의 적용에도 불구하고 많은 수의 ARDS 환자들이 MSOF의 발생으로 인하여 사망하고 있다. 따라서 최근에는 기계환기로 인한 물리적 스트레스가 폐의 세포 및 분자적 병태생리에 미치는 생체화학적 손상, 즉 생체손상에 대해 관심이 집중되고 있으며⁵, 그 정도는 기계환기 양식³⁴⁻³⁷ 및 전략⁵에 따라 다르게 나타나는 것으로 알려졌다. 호중구는 생체상해를 특징짓는 염증반응에 있어서 주요한 염증세포로³⁸, 폐포상피세포, 혈관내피세포, 폐포대식세포 및 섬유모세포 등에서 분비되는 화학유인물질과 부착분자를 매개로 하여 모집되고³⁹, 활성화되어 단백분해효소 및 활성산소종을 분비하여 염증반응 및 세포손상을 일으킨다⁴⁰⁻⁴³.

활성산소종은 세포 표면의 부착분자 발현의 조절, 전사인자들의 활성 및 각종 염증성매개물질의 조절을 통해서 염증 기전에 영향을 미침으로써, 막지질 과산화, 세포의 기질의 개형 (remodeling), 단백분해효소의 활성, 미토콘드리아 호흡의 변화 및 백혈구 이동 등의 염증성 변화를 일으킨다. 또한 활성산소종과 같은 반응성 분자 (reactive molecule) 등은 DNA에 대한 일차적인 손상을 유발하며, 지속적인 DNA 손상의 축적은 노화현상과 다양한 질병의 발생원인이다. 모든 생명체들은 DNA 손상을 복구하는 특별하고 복잡한 체계를 가지고 있는데, 그 가운데에서 가장 즉각적이고 강력한 생화학적 반응이 핵단백 (nuclear protein)의 poly(ADP-ribosyl)ation이며, 이 반응은 PARP1에 의하여 매개된다. 여러가지 내인성 인자 중에서, 활성산소종은 강력한 DNA 손상 인자로, 손상된 DNA로부터 생성된 DNA strand breaks는 PARP1을

활성화시키고⁴⁴, 이로 인한 poly(ADP-ribosyl)ation은 DNA replication, repair of DNA damage, gene expression 및 apoptosis 등의 각종 생리적, 병태생리적 변화를 유발한다⁴⁵⁻⁴⁷. 그러나, 심한 DNA 손상을 동반한 몇몇 병리적 상황에서, 과도한 PARP1의 활성화는 세포 내의 NAD⁺와 그 전구물질인 ATP를 소실시킴으로써, 비가역적인 세포독성과 세포 사멸을 초래할 수 있다. 이러한 PARP1의 과활성은 각종 장기의 염증성, 재관류, 퇴행성 및 혈관 질환에 대한 동물 실험들에서, 병태생리에 주요한 역할을 하며, 또한 PARP1의 약물학적 억제제가 이를 예방할 수 있는 것으로 보고된 바 있다⁴⁸. 특히 폐질환에 대한 연구들에 의하면, ovalbumin에 의한 천식 모델에서 PARP1이 과활성되고, 이를 억제하였을 경우 염증성 매개물질이 감소하고, 폐기능이 개선되는 것으로 보고된 바 있다. 리포다당질 및 고농도의 산소에 의한 급성폐손상 모델에서도 PARP1 억제제에 의해서 염증성 세포의 침윤과 염증성 매개물질이 감소됨으로써 폐손상의 정도가 감소되고, 실험동물의 생존률을 개선되는 것으로 보고되었다⁴⁸. 일반적으로 염증 반응에 있어서 PARP1의 억제는 염증 병소로의 호중구의 침윤을 감소시키는 것으로 나타나^{11,49}, PARP1이 부착분자의 발현을 조절하는 것으로 추정되고 있다^{24,50}.

본 연구는, VILI의 생체손상 과정에서 주로 활성화된 호중구로부터 유래되는 활성산소종이 DNA의 과도한 손상을 유발하고, 결과적으로 PARP1의 과활성을 초래하여 염증반응으로 인한 폐손상이 발생할 것이라는 가설 하에 실험을 진행하였다. 실험 결과, VILI군에서 대조군 및 LPV군과 비교하여 활성화된 호중구의 지표인 MPO, PARP1의 활성, 염증성 시토카인 및 폐손상의 정도가 유의하게 증가하여, PARP1의 과활성이 VILI의 병리과정에 있어서 주요한 역할을 하는 것으로 관찰되었다. 또한 최근에 보고된 한 연구에서는, 주기적인 기계적 긴장이 폐포 상피세포에서 ROS를 상승시키는 것으로 보고된 바 있어⁵¹, 염증세포로부터 분비되는 ROS 이외에도, 물리적인 자극으로 인해서 생성되는 ROS가, 본 연구에서 관찰된 PARP1의 과활성에 있어서도 주요한 역할을 할 것으로 추정할 수 있다.

본 연구에서 PARP1 억제제로 사용한 PJ34, N-(6-Oxo-5,6-dihydrophenanthridin-2-yl)-N,N-dimethylacetamide, hydrochloride는, 수용성의 phenanthridinone 유도체로, PARP1 억제제의 원형 (prototype)인 3-aminobezamide보다 약 10,000배의 효과를 지니고 있다. *In vitro* 실험에서 PARP1의 활성을 용량의존적으로 억제하고, peroxyxynitrate로 인한 세포의 괴사를 억제하는 것으로 보고된 이후에, 다양한 *in vivo* 모델들에서 PARP1으로 인한 병태생리 현상의 발생을 예방하는 것으로 보고된 바 있다^{27,48,52}. 본 연구에서도 PJ34+VILI군에서 PJ34의 전처치는 BALF 내 MPO의 활성을 감소시켜, 활성화된 호중구의 침윤이 감소됨을 반영하였고, 동시에 BALF 내 염증성 시토카인의 감소와 함께 폐손상의 지표들을 감소시켰다.

결론적으로, 다양한 병태생리 모델들에서 증명된 PARP1의 과활성이 기계환기로 인한 급성폐손상에서도 주요한 역할을 하는 것으로 관찰되었으며, 이의 약물학적 억제가 폐손상의 발생을 감소시키는 것으로 나타나, PARP1 과활성의 효율적인 조절이나 억제가 향후 급성폐손상 및 급성호흡곤란증후군 환자들의 예후를 개선하는 데 있어서 유효성이 있을 것으로 판단된다.

요 약

연구배경: 활성산소종은 기계환기로 인한 폐손상 (ventilator-induced lung injury, VILI)에서 주요한 역할을 한다. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP1)은 DNA 손상 감지 기능을 하는 단백질로서, DNA 파열을 신호하고 복구에 관여한다. 그러나 활성산소종에 의한 것과 같은 심한 유전자 손상을 받게 되면, 과활성화되어 β -nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+)의 결핍을 통한 세포의 사멸을 초래하여, 염증 반응을 일으킨다. 본 연구에서는 VILI의 기전에 있어서 PARP1의 역할 및 그 억제제의 효과를 고찰하고자 하였다.

방 법: 48마리의 수컷 C57BL/6 생쥐를 걸보기 수술군 (Sham군), 폐보호적 환기군 (lung protective ventilation group, LPV군), 기계환기로 인한 폐손상

군 (ventilator-induced lung injury group, VILI군) 및 PARP1 억제제인 PJ34 전처리 후 기계환기로 인한 폐손상군 (PJ34+VILI군)으로 나누어 실험하였다. LPV군에 대한 기계환기는 PIP 15 cmH₂O + PEEP 3 cmH₂O + RR 90/min. 조건으로, VILI 및 PJ34+VILI군에 대해서는 PIP 40 cmH₂O + PEEP 0 cmH₂O + RR 90/min.의 조건으로 2시간 동안 시행하였다. PJ34+VILI군에서 PARP1 억제제로는, PJ34 20 mg/Kg을 기계환기 2시간 전에 복강 내로 주사하였다. VILI의 정도는 습건중량비 및 급성폐손상 지수로 측정하였고, PARP1의 활성은 biotinylated NAD를 이용한 면역조직화학적 방법을 이용하였다. 또한 기관지폐포세척액 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 내에서 myeloperoxidase (MPO) 활성 및 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6 등의 염증성 시토카인의 농도를 측정하였다.

결 과: PJ34+VILI군에서 VILI군과 비교하여, PJ34 전처치로 인하여 폐손상의 정도가 현저히 감소하였다 ($p<0.05$). 5개의 고배율 시야에서 관찰한 PARP1의 활성을 보이는 세포의 수는 VILI군에서 유의하게 증가하였고, PJ34+VILI군에서 현저히 감소하였다 ($p=0.001$). BALF 내에서 측정한 MPO 활성 및 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 농도 역시 PJ34+VILI군에서 의미 있게 감소하였다 ($p<0.05$).

결 론: VILI의 기전에 있어서 PARP1의 과활성이 주요한 역할을 하고, PARP1 억제제가 MPO 활성 및 염증성 시토카인의 감소와 함께 VILI의 발생을 억제한다.

참 고 문 헌

1. International consensus conferences in intensive care medicine: ventilator-associated Lung Injury in ARDS. This official conference report was cosponsored by the American Thoracic Society, The European Society of Intensive Care Medicine, and The Societe de Reanimation de Langue Francaise, and was approved by the ATS Board of Directors, July 1999. Am J Respir Crit Care Med 1999;160:2118-24.
2. Slutsky AS, Tremblay LN. Multiple system organ failure: is mechanical ventilation a contributing

- factor? *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1721-5.
3. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2000;342:1301-8.
4. Amato MB, Barbas CS, Medeiros DM, Magaldi RB, Schettino GP, Lorenzi-Filho G, et al. Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1998;338:347-54.
5. Tremblay LN, Slutsky AS. Ventilator-induced injury: from barotrauma to biotrauma. *Proc Assoc Am Physicians* 1998;110:482-8.
6. Uhlig S, Uhlig U. Pharmacological interventions in ventilator-induced lung injury. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25:592-600.
7. Ame JC, Spenlehauer C, de Murcia G. The PARP superfamily. *Bioessays* 2004;26:882-93.
8. Bouchard VJ, Rouleau M, Poirier GG. PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage. *Exp Hematol* 2003;31:446-54.
9. Huber A, Bai P, de Murcia JM, de Murcia G. PARP-1, PARP-2 and ATM in the DNA damage response: functional synergy in mouse development. *DNA Repair* 2004;3:1103-8.
10. Nguewa PA, Fuertes MA, Valladares B, Alonso C, Perez JM. Poly(ADP-ribose) polymerases: homology, structural domains and functions: novel therapeutical applications. *Prog Biophys Mol Biol* 2005;88:143-72.
11. Virag L, Szabo C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* 2002;54:375-429.
12. D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier GG. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J* 1999;342:249-68.
13. Herceg Z, Wang ZQ. Functions of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death. *Mutat Res* 2001;477:97-110.
14. Berger NA. Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage. *Radiat Res* 1985;101:4-15.
15. Berger NA, Berger SJ. Metabolic consequences of DNA damage: the role of poly (ADP-ribose) polymerase as mediator of the suicide response. *Basic Life Sci* 1986;38:357-63.
16. Berger NA, Whitacre CM, Hashimoto H, Berger SJ, Chatterjee S. NAD and poly(ADP-ribose) regulation of proteins involved in response to cellular stress and DNA damage. *Biochimie* 1995;77:364-7.
17. Eliasson MJ, Sampei K, Mandir AS, Hurn PD, Traystman RJ, Bao J, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. *Nat Med* 1997;3:1089-95.
18. Ha HC, Snyder SH. Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:13978-82.
19. Heller B, Wang ZQ, Wagner EF, Radons J, Burkle A, Fehsel K, et al. Inactivation of the poly(ADP-ribose) polymerase gene affects oxygen radical and nitric oxide toxicity in islet cells. *J Biol Chem* 1995;270:11176-80.
20. Szabo C, Zingarelli B, O'Connor M, Salzman AL. DNA strand breakage, activation of poly (ADP-ribose) synthetase, and cellular energy depletion are involved in the cytotoxicity of macrophages and smooth muscle cells exposed to peroxynitrite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:1753-8.
21. Virag L, Salzman AL, Szabo C. Poly(ADP-ribose) synthetase activation mediates mitochondrial injury during oxidant-induced cell death. *J Immunol* 1998;161:3753-9.
22. Zhang J, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH. Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science* 1994;263:687-9.
23. Zingarelli B, O'Connor M, Wong H, Salzman AL, Szabo C. Peroxynitrite-mediated DNA strand breakage activates poly-adenosine diphosphate ribosyl synthetase and causes cellular energy depletion in macrophages stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 1996;156:350-8.
24. Zingarelli B, Salzman AL, Szabo C. Genetic disruption of poly (ADP-ribose) synthetase inhibits the expression of P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circ Res* 1998;83:85-94.
25. Dreyfuss D, Saumon G. Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:294-323.
26. Imanaka H, Shimaoka M, Matsuura N, Nishimura M, Ohta N, Kiyono H. Ventilator-induced lung injury is associated with neutrophil infiltration, macrophage activation, and TGF-beta 1 mRNA upregulation in rat lungs. *Anesth Analg* 2001;92:428-36.
27. Garcia Soriano F, Virag L, Jagtap P, Szabo E, Mabley JG, Liaudet L, et al. Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly(ADP-ribose) polymerase activation. *Nat Med* 2001;7:108-13.
28. Zhang J. Use of biotinylated NAD to label and purify ADP-ribosylated proteins. *Methods Enzymol* 1997;280:255-65.
29. Liaudet L, Pacher P, Mabley JG, Virag L, Soriano FG, Hasko G, et al. Activation of poly(ADP-Ribose) polymerase-1 is a central mechanism of lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation. *Am J Respir*

- Crit Care Med 2002;165:372-7.
30. Hirano S. Migratory responses of PMN after intra-peritoneal and intratracheal administration of lipopolysaccharide. *Am J Physiol* 1996;270:L836-45.
31. Tsuno K, Miura K, Takeya M, Kolobow T, Morioka T. Histopathologic pulmonary changes from mechanical ventilation at high peak airway pressures. *Am Rev Respir Dis* 1991;143:1115-20.
32. Woo SW, Hedley-Whyte J. Macrophage accumulation and pulmonary edema due to thoracotomy and lung over inflation. *J Appl Physiol* 1972;33:14-21.
33. Tremblay L, Valenza F, Ribeiro SP, Li J, Slutsky AS. Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos mRNA expression in an isolated rat lung model. *J Clin Invest* 1997;99:944-52.
34. Matsuoaka T, Kawano T, Miyasaka K. Role of high-frequency ventilation in surfactant-depleted lung injury as measured by granulocytes. *J Appl Physiol* 1994;76:539-44.
35. Sugiura M, McCulloch PR, Wren S, Dawson RH, Froese AB. Ventilator pattern influences neutrophil influx and activation in atelectasis-prone rabbit lung. *J Appl Physiol* 1994;77:1355-65.
36. Takata M, Abe J, Tanaka H, Kitano Y, Doi S, Kohsaka T, et al. Intraalveolar expression of tumor necrosis factor- α gene during conventional and high-frequency ventilation. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:272-9.
37. Okuyama K. Inflammatory chemical mediators during conventional ventilation and during high frequency oscillatory ventilation. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:1550-4.
38. Zhang H, Downey GP, Suter PM, Slutsky AS, Ranieri VM. Conventional mechanical ventilation is associated with bronchoalveolar lavage-induced activation of polymorphonuclear leukocytes: a possible mechanism to explain the systemic consequences of ventilator-induced lung injury in patients with ARDS. *Anesthesiology* 2002;97:1426-33.
39. Jafari B, Ouyang B, Li LF, Hales CA, Quinn DA. Intracellular glutathione in stretch-induced cytokine release from alveolar type-2 like cells. *Respirology* 2004;9:43-53.
40. Li LF, Yu L, Quinn DA. Ventilation-induced neutrophil infiltration depends on c-Jun N-terminal kinase. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:518-24.
41. Rimensberger PC, Fedorko L, Cutz E, Bohn DJ. Attenuation of ventilator-induced acute lung injury in an animal model by inhibition of neutrophil adhesion by leumedins (NPC 15669). *Crit Care Med* 1998; 26:548-55.
42. Ohta N, Shimaoka M, Imanaka H, Nishimura M, Taenaka N, Kiyono H, et al. Glucocorticoid suppresses neutrophil activation in ventilator-induced lung injury. *Crit Care Med* 2001;29:1012-6.
43. Chavolla-Calderon M, Bayer MK, Fontan JJ. Bone marrow transplantation reveals an essential synergy between neuronal and hemopoietic cell neurokinin production in pulmonary inflammation. *J Clin Invest* 2003;111:973-80.
44. Althaus FR, Kleczkowska HE, Malanga M, Muntener CR, Pleschke JM, Ebner M, et al. Poly ADP-ribosylation: a DNA break signal mechanism. *Mol Cell Biochem* 1999;193:5-11.
45. Boulares AH, Yakovlev AG, Ivanova V, Stoica BA, Wang G, Iyer S, et al. Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis: caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. *J Biol Chem* 1999;274:22932-40.
46. Boulares AH, Zoltoski AJ, Yakovlev A, Xu M, Smulson ME. Roles of DNA fragmentation factor and poly(ADP-ribose) polymerase in an amplification phase of tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2001;276:38185-92.
47. Ding R, Pommier Y, Kang VH, Smulson M. Depletion of poly(ADP-ribose) polymerase by antisense RNA expression results in a delay in DNA strand break rejoining. *J Biol Chem* 1992;267:12804-12.
48. Jagtap P, Szabo C. Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4:421-40.
49. Szabo C, Lim LH, Cuzzocrea S, Getting SJ, Zingarelli B, Flower RJ, et al. Inhibition of poly (ADP-ribose) synthetase attenuates neutrophil recruitment and exerts antiinflammatory effects. *J Exp Med* 1997;186: 1041-9.
50. Zingarelli B, Hake PW, O'Connor M, Denenberg A, Wong HR, Kong S, et al. Differential regulation of activator protein-1 and heat shock factor-1 in myocardial ischemia and reperfusion injury: role of poly (ADP-ribose) polymerase-1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:H1408-15.
51. Chapman KE, Sinclair SE, Zhuang D, Hassid A, Desai LP, Waters CM. Cyclic mechanical strain increases reactive oxygen species production in pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;289:L834-41.
52. Abdelkarim GE, Gertz K, Harms C, Katchanov J, Dirnagl U, Szabo C, et al. Protective effects of PJ34, a novel, potent inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in vitro and in vivo models of stroke. *Int J Mol Med* 2001;7:255-60.