

**Ph.D. thesis**

**Enhanced Akt activation by poly(ADP-ribose)polymerase inhibitors in  
postischemic hearts**

**Author: Krisztina Kovács, M.D.**

**Project leader: Prof. Balázs Sümegei, D.Sc.**

**Department of Biochemistry and Medical Chemistry  
University of Pécs Medical School  
Pécs, Hungary**

**2005.**

## Introduction

Ischemia-reperfusion is associated with enhanced formation of reactive oxygen species (ROS), such as hydrogen-peroxide, superoxide and hydroxyl radicals. ROS can initiate lipid peroxidation, protein oxidation and the formation of DNA breaks. Single-strand DNA breaks are the obligatory triggers of PARP activation. In response to DNA damage, PARP becomes activated and, by cleaving  $\text{NAD}^+$  as a substrate, catalyzes the building of homopolymers of adenosine diphosphate ribose units, resulting in a substantial depletion of intracellular  $\text{NAD}^+$ . As  $\text{NAD}^+$  functions as an electron carrier to the mitochondrial respiratory chain,  $\text{NAD}^+$  depletion is coupled to a rapid fall in intracellular ATP levels. Thus, excessive activation of PARP leads to ATP depletion, which may ultimately cause cell death. As a consequence, inhibition of PARP can improve the recovery of different cells from oxidative injury.

In heart tissue, a dominant fraction of energy production occurs in the mitochondria, therefore protection against oxidative damage of mitochondria can be a very important step in the normalization of cardiac energy production. Our previous data showed that PARP inhibitors were capable of reducing the oxidative damage of cellular components without any obvious scavenger activity. Although necrosis is responsible for a large proportion of cell loss during cardiac ischemia-reperfusion, it has been proven that apoptosis also occurs. Therefore, apoptosis may provide a new target for cardioprotection during an evolving acute myocardial infarction in humans, even so since the apoptotic cells, in contrast to the necrotic ones are still alive, and consequently, can be rescued by reversing the apoptotic process.

Previous results indicate that the growth-factor-associated kinase Akt is phosphorylated following ischemia-reperfusion in a phosphoinositol-3-kinase (PI3-kinase)-dependent manner. PI3-kinase pathway is one of several signal transduction pathways implicated in cell survival. Akt, in turn, phosphorylates a number of downstream targets leading to the inactivation of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3), the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bad, caspase-9, Forkhead transcription factor, as well as to the activation of nuclear factor  $\kappa\text{B}$  (NF $\kappa\text{B}$ ) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS). The overall impact of Akt action is thus a remarkable antiapoptotic effect, metabolic adjustment and vasodilation.

Previous results and our previous data demonstrate that PARP inhibitors protect hearts against ischemia-reperfusion injury.

## **Study objectives**

In this study we investigated the molecular mechanism of a known PARP inhibitor (4-hydroxyquinazoline) and an experimental compound exhibiting scavenger and PARP inhibitor properties (HO-3089) on the cardiac pathophysiology under conditions of ischemia-reperfusion in an isolated heart perfusion system. We monitored myocardial energy metabolism, cardiac contractile function, and measured the infarct size. Furthermore, we studied the effect of PARP inhibitors on the ischemia-reperfusion-induced oxidative myocardial injury, i.e. lipid peroxidation, protein oxidation, and total peroxide concentration. We found that ischemia-reperfusion activated Akt, therefore we have assessed the ability of PARP inhibitors to influence the phosphorylation of Akt. Finally, we used PI3-kinase inhibitors to see how they could affect the cardioprotective impacts of the PARP inhibitors.

## Materials and Methods

### Chemicals

4-hydroxyquinazoline, 2,4-dinitrophenylhydrazine, LY294002 and thiobarbituric acid were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. HO-3089 was synthesized in the Institute of Organic and Medicinal Chemistry (University of Pécs, Hungary). Wortmannin was purchased from Calbiochem. All other reagents were of the highest purity commercially available.

### Animals

Male Wistar rats weighing 300-350 g were used for this study. Rats were handled in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*.

### Heart perfusion

Rats were anaesthetized with 200 mg/kg ketamine intraperitoneally and heparinized with sodium heparin (100 IU/rat i.p.). Isolated rat hearts were perfused with a modified phosphate-free Krebs-Henseleit buffer according to the Langendorff method at a constant pressure of 70 mmHg, at 37°C as described before. The perfusion medium contained 118 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.25 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 11 mM glucose and 0.6 mM octanoic acid. The perfusate was adjusted to pH 7.40 and bubbled with 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> through a glass oxygenator. After a washout (non-recirculating period of 15 minutes), hearts were perfused for 10 min (baseline) and freeze-clamped to obtain "normoxic" hearts, or were then subjected to 30-minute global ischemia by closing the aortic influx and reperfused for either 15, 45 or 90 minutes. PARP inhibitors and/or PI3-kinase inhibitors were administered (4OHQ in 100 µM and HO-3089 in 25 µM, wortmannin in 100 nM and LY294002 10 µM) into the medium at the beginning of baseline perfusion. During ischemia, hearts were submerged into perfusion buffer at 37°C. At the end of the perfusion hearts were freeze clamped.

### NMR spectroscopy

NMR spectra were recorded with a Varian <sup>UNITY</sup>INOVA 400 WB instrument. <sup>31</sup>P measurements (161.90 MHz) of perfused hearts were run at 37°C in a Z•SPEC® 20-mm broadband probe (Nalorac Co., Martinez, CA, USA) applying GARP-1 proton decoupling ( $\gamma$ B2= 1.2 kHz) during

acquisition. Field homogeneity was adjusted by following the  $^1\text{H}$  signal ( $w^{1/2} = 10\text{-}15\text{ Hz}$ ). Spectra were collected with a time resolution of 3 min by accumulating 120 transients in each FID.

### **Heart function**

A latex balloon was inserted into the left ventricle through the mitral valve and filled to achieve an end-diastolic pressure of 8-12 mmHg. All measurements were performed at the same balloon volume. Hearts were selected on the basis of the stability of high-energy phosphates (assessed by NMR) during a control period of 15 minutes before the experiment. The length of normoxia, ischemia, and reperfusion was 10, 30, and 45 minutes, respectively. PARP inhibitors were added to the perfusion medium after the 15-minute control period. Functional data of the hearts (LVDP – left ventricular developed pressure, RPP – rate pressure product and  $\text{dP/dt}$ ) were monitored during the entire perfusion.

### **Infarct size**

Hearts were removed from the Langendorff apparatus. Both the auricles and the aortic root were excised and the ventricles were kept overnight at  $-4^\circ\text{C}$ . Frozen ventricles were sliced into uniform sections of about 2-3-mm thickness. The slices were incubated in 1% triphenyl tetrazolium chloride (TTC) at  $37^\circ\text{C}$  in 0.2 M Tris buffer ( $\text{pH}=7.40$ ) for 30 min. The normal myocardium was stained brick red, while the infarcted portion remained unstained. Infarct size was measured by the volume and weight method.

### **Lipid peroxidation and protein oxidation**

Lipid peroxidation was estimated from the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) using malondialdehyde standard. The protein carbonyl content was determined by using the 2,4-dinitrophenylhydrazine method.

### **Determination of total peroxide concentration**

Hundred milligrams of heart tissue were homogenized with a Teflon-glass homogenizer in ice-cold MOPS (50 mM) and EDTA (1 mM) buffer. Homogenates were then bubbled with argon gas, sonicated, then Tween 20 was added to a final concentration of 1%, and the samples were homogenized again by sonication. After centrifuging the samples, peroxide concentrations of the supernatants were measured by means of Biomedica OxyStat assay (Biomedica GmbH, Wien, Austria).

### **Western blot analysis**

Fifty milligrams of heart samples (hearts with both 15 and 45 minutes of reperfusion) were homogenized in ice-cold Tris buffer (50 mM, pH=8.0) and harvested in 2x concentrated SDS-polyacrylamide gel electrophoretic sample buffer. Proteins were separated on 12% SDS-polyacrylamide gel and transferred to nitrocellulose membranes. After blocking (2 hours with 3% non-fat milk in Tris buffered saline) membranes were probed overnight at 4°C with antibodies recognizing the following antigens: phospho-specific Akt-1 / protein kinase B- $\alpha$  Ser<sup>473</sup> (1:1000 dilution; Cell Signaling Technology, Beverly, USA), non-phosphorylated Akt / PKB (1:1000; Cell Signaling Technology, Beverly, USA), phospho-specific glycogen synthase kinase (GSK)-3 $\beta$  Ser<sup>9</sup> (1:1000; Cell Signaling Technology, Beverly, USA). Membranes were washed six times for 5 minutes in Tris buffered saline (pH=7.5) containing 0.2% Tween (TBST) prior to addition of goat anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:3000 dilution, BioRad, Budapest, Hungary). Membranes were washed six times for 5 minutes in TBST and the antibody-antigen complexes were visualized by means of enhanced chemiluminescence. The results of Western blots were quantified by means of Scion Image Beta 4.02 program.

### **Statistical analysis**

Statistical analysis was performed by analysis of variance and all of the data were expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. Significant differences were evaluated by use of unpaired Student's *t* test and *P* values below 0.05 were considered to be significant (\*).

## Results

### *Effect of PARP inhibitors on the energy metabolism, contractile function, and cell death of hearts during ischemia-reperfusion*

Energy metabolism of Langendorff perfused hearts was monitored in the magnet of NMR spectroscopy enabling to detect changes in the level of high-energy phosphate intermediates. Ischemia induced a rapid decrease in creatine phosphate and ATP levels and a fast evolution of inorganic phosphate. Under our experimental conditions, high-energy phosphate intermediates only partially recovered in untreated hearts during the 45-minute reperfusion phase; on the other hand, HO-3089 and moreover 4-hydroxyquinazoline facilitated the recovery of creatine phosphate and ATP. These data show that each PARP inhibitor could significantly improve the final recovery of high-energy phosphate intermediates (expressed as % of the normoxic level:  $61.2 \pm 5.7\%$  for 4OHQ-treated and  $49.1 \pm 5.4\%$  for HO-3089-treated versus  $24.2 \pm 5.1\%$  for untreated hearts). PARP inhibitors also promoted the faster and more complete reutilization of inorganic phosphate during reperfusion (expressed as % of the value at the end of ischemic period:  $27.8 \pm 3.2\%$  for 4OHQ-treated and  $31.5 \pm 4.1\%$  for HO-3089-treated versus  $53.7 \pm 2.9\%$  for untreated hearts).

To evaluate the effect of PARP inhibitors on the postischemic myocardial functional recovery, isolated hearts were perfused in the absence or presence of  $100 \mu\text{M}$  4OHQ or  $25 \mu\text{M}$  HO-3089. At the end of the normoxic period, LVDP was  $135.2 \pm 16.4 \text{ mmHg}$ , RPP was  $3.4 \pm 0.15 \times 10^4 \text{ mmHg/min}$ ,  $\text{dP/dt}_{\text{max}}$  was  $1310 \pm 196 \text{ mmHg/s}$  and the average heart rate was  $217 \pm 19 \text{ beats/min}$ . Both PARP inhibitors significantly improved the recovery of all parameters indicating that the preservation of energy metabolism resulted in a better functional performance.

Triphenyl tetrazolium chloride staining of the myocardium after 90-min of postischemic reperfusion revealed that PARP inhibitors were capable of significantly diminishing the infarct size compared to untreated cases (expressed as % of the total area:  $33.1 \pm 4.2\%$  for 4OHQ and  $37.2 \pm 5.7\%$  for HO-3089 compared to  $64.2 \pm 6.8\%$  for untreated).

### *Effect of PARP inhibitors on cardiac oxidative damage and ischemia-reperfusion-related Akt phosphorylation*

Lipid peroxidation induced by ischemia-reperfusion in Langendorff perfused hearts was characterized by the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). Under our

experimental conditions, ischemia-reperfusion increased the amount of TBARS compared to the normoxic conditions. In normoxic hearts, PARP inhibitors did not have significant effects on TBARS. When ischemia-reperfusion was performed in the presence of PARP inhibitors, the formation of TBARS was significantly lower than in the hearts subjected to ischemia-reperfusion alone, indicating that PARP inhibitors prevented the ischemia-reperfusion-induced lipid peroxidation.

Reactive oxygen species formation in ischemia-reperfusion cycle can also trigger the oxidation of proteins, which can be characterized by the quantity of protein-bound aldehyde groups. Ischemia-reperfusion significantly elevated the level of protein oxidation; nevertheless, the administration of PARP inhibitors during ischemia-reperfusion cycle prevented the increase in the protein-bound aldehyde groups.

In addition, under our experimental conditions, moderate Akt kinase phosphorylation occurred as a result of ischemia-reperfusion. On the other hand, 4-hydroxyquinazoline and HO-3089 treatment could further enhance Akt activation.

#### *PI3-kinase inhibitors interfere with the cardioprotection by PARP inhibitors*

To test whether the observed Akt activation contributes to the cardioprotective effect of the PARP inhibitors, we treated hearts with PI3-kinase inhibitors. When added by itself, 100 nM wortmannin or 10  $\mu$ M LY294002 did not alter the recovery of high-energy phosphates and the elevation of inorganic phosphate during ischemia-reperfusion. On the other hand, both agents significantly reduced the beneficial effect of PARP inhibitors on creatine phosphate, ATP and inorganic phosphate levels. Furthermore, the PARP inhibitor-induced functional improvement was also significantly attenuated in the presence of PI3-kinase inhibitors.

When applied alone, wortmannin and LY294002 did not affect the infarct size in hearts exposed to IR (59.6 $\pm$ 6.5% and 60.1 $\pm$ 5.8%, respectively). However, co-administration of PARP inhibitors and PI3-kinase inhibitors during IR led to an increase in infarct sizes as compared to those in hearts treated with the PARP inhibitors alone (from 36.1 $\pm$ 2.2% in 4OHQ-treated to 42.5 $\pm$ 3.4% in 4OHQ + LY294002 and to 41.6 $\pm$ 2.9% in 4OHQ + wortmannin-treated hearts; and from 33.4 $\pm$ 3.1% in HO-3089-treated to 45.3 $\pm$ 2.7% in HO3089 + wortmannin and 47.2 $\pm$ 2.6% in HO-3089 + LY294002-treated hearts).

PI3-kinase inhibitors administered by themselves could lower the IR-induced increase in TBARS (82.4 $\pm$ 5.7 nM/g in wortmannin-treated and 81.4 $\pm$ 3.9 nM/g in LY294002-treated hearts versus 125.2 $\pm$ 5.4 nM/g in untreated hearts). When the PARP inhibitors were administered together with



PI3-kinase inhibitors, the latter partially antagonised the effect of the former resulting in higher TBARS values than with the PARP inhibitors alone (51.3±2.3% for 4OHQ + wortmannin- and 62.8±3.4% for 4OHQ + LY294002- versus 46.3±3.2% for 4OHQ-treated hearts; 52.5±3.1% for HO3089 + wortmannin- and 58.7±4.3% for HO-3089 + LY294002- versus 49.5±4.1 for HO3089-treated hearts). Similarly to the TBARS data, the protein oxidation and total peroxide concentrations of the heart samples after IR were reduced by wortmannin and LY294002, but the PARP inhibitors had more pronounced effect decreasing protein oxidation and total peroxide concentrations to almost normoxic levels, and the PI3 inhibitors partially antagonised the effect of the PARP inhibitors.

When added alone, wortmannin and LY294002 did not significantly affect the moderate IR-induced phosphorylation (activation) of Akt-1. However, the administration of PARP inhibitors together with PI3-kinase inhibitors significantly increased Akt-1 phosphorylation, although these increases were much smaller than those observed in case of the PARP inhibitors alone. In addition, the ischemia-reperfusion-triggered slight increase in GSK-3 $\beta$  phosphorylation was not blocked by wortmannin or LY294002. Similarly to the Akt phosphorylation, the co-administration of PARP inhibitors and PI3-kinase inhibitors significantly attenuated GSK-3 $\beta$  phosphorylation compared to the effect of the PARP inhibitors alone.

## Discussion

Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors protect hearts against IR injury, but the molecular mechanism of this protection remains to be elucidated. Excessive activation of PARP can cause  $\text{NAD}^+$  and ATP depletion and cardiomyocyte necrosis. In addition, during IR a considerable fraction of cardiac myocytes die in apoptotic cell death, but the role of PARP in this process is also unknown. Furthermore, we and others showed that PARP inhibitors protect mitochondria in postischemic heart, and decrease the degree of ROS production, which is predominantly a mitochondrial process in postischemic myocardium. Recent works reported the existence of mitochondrial poly(ADP-ribose) polymerases which could be blocked with PARP-1 inhibitors. Although this might be involved in mitochondrial protection, several other pathways should also be considered.

We have previously demonstrated that PARP inhibitors induced the phosphorylation and activation of Akt in the liver, lung and spleen of lipopolysaccharide-treated mice, raising the possibility that the protective effect of PARP inhibition was, at least partially, mediated through the PI3-kinase/Akt pathway. Similar data were also seen in neuronal cells. These observations indicate that the protective effect of PARP inhibitors involve far more complexity than it is expected merely from  $\text{NAD}^+$  and ATP depletion, because Akt kinase can phosphorylate several regulatory proteins, including GSK-3 $\beta$ , caspase-9, BAD, or FKHR. Phosphorylation and so inactivation of pro-apoptotic BAD protein contribute to the stabilization of mitochondrial membrane system and may prevent the release of pro-apoptotic proteins, i.e. cytochrome c or apoptosis-inducing factor. Therefore, the mitochondrial protective effect of PARP inhibitors can be mediated via the PI3-kinase/Akt/BAD pathway.

Here, we characterized the PARP-inhibitory property of well established and a novel PARP inhibitor in perfused hearts. These PARP inhibitors improved the recovery of creatine phosphate, ATP and pH, and the reutilization of inorganic phosphate in hearts subjected to ischemia-reperfusion. The PARP inhibitors limited the oxidative myocardial damage, which was characterized by decreased lipid peroxidation, total peroxide content and protein oxidation. Furthermore, the favorable changes in cardiac energetics were accompanied by improved recovery of functional performance and reduced infarct size.

Under the same experimental conditions, PARP inhibitors elicited Akt phosphorylation. We showed that this phosphorylation event was associated with Akt activation, because the down-

stream Akt substrate, GSK-3 $\beta$  was simultaneously phosphorylated. Although these data demonstrated the activation of Akt upon PARP inhibitor administration, they did not provide evidence that Akt activation played a considerable role in the protective effect of PARP inhibitors.

PI3-kinase inhibitors significantly, albeit not completely, diminished the Akt and GSK-3 $\beta$  phosphorylation in the presence of PARP inhibitors indicating that these compounds could penetrate the heart and that a significant portion of Akt phosphorylation occurred via the PI3-kinase pathway. Inhibition of the PI3-kinase/Akt pathway in the presence of PARP inhibitors significantly reduced the recovery of creatine phosphate, ATP and pH, and the reutilization of inorganic phosphate suggesting that Akt activation significantly contributed to the restoration of energy homeostasis of the reperfused myocardium. This phenomenon might be explained by the beneficial effects of Akt on the preservation of mitochondrial membrane integrity. In accordance with this view, PI3-kinase inhibitors compromised the protective effect of PARP inhibitors on infarct size and on the recovery of heart function. Wortmannin or LY294002 alone did not exert significant effect on the recovery of postischemic energy metabolism, although, these compounds attenuated myocardial oxidative damage with an unknown mechanism. Furthermore, PI3-kinase inhibition hardly influenced Akt phosphorylation, even 5-fold concentrations of wortmannin or LY294002 failed to completely block Akt phosphorylation during IR. Thus, the low phosphorylation level of Akt seen in postischemic hearts may occur in a PI3-kinase-independent way. In contrast, PARP inhibitor-elicited Akt phosphorylation overwhelmingly occurred through PI3-kinase, because PI3-kinase inhibition could block this event. Since decreased Akt activation significantly reduced the protective effects of PARP inhibitors, we suggest that Akt activation and subsequent events contribute to a significant extent to the cardioprotective effect of PARP inhibitors in postischemic hearts.

## Conclusions

Our data provide the first insight into how PARP inhibitors can influence the intracellular signal transduction pathways. Both examined PARP inhibitors preserved cardiac energy metabolism as well as cardiac contractile function during ischemia-reperfusion, and also attenuated the oxidative injury of the myocardium. Moreover, PARP inhibitor administration prompted the activation of Akt and the subsequent inactivation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  both during normoxic perfusion and ischemia-reperfusion. The phosphatidylinositol-3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 partially abrogated the beneficial effects of PARP inhibitors, concerning the myocardial energetics, contractile function, infarct size, oxidative damages as well as Akt activation. Taken together, protective effects of the examined PARP inhibitors may be in part attributable to their ability to upregulate the prosurvival Akt protein kinase cascade.

Although little is known about the precise triggers of ischemia-reperfusion-induced signaling pathways, it has been proposed that oxidative stress, mediated by ROS, may play an important role in this process. Our findings suggest that Akt activation occurs as a response to PARP inhibitor treatment and could play an important role in promoting cell survival. However, further studies are required to delineate the role of Akt activation and the detailed signaling mechanisms under conditions of various treatment agendas.

These promising results further our understanding of the executive mechanisms of how these compounds may confer their remarkable cardioprotection and attract additional efforts to elucidate the precise interplay between the molecules and the signaling elements.

## **Publications of the author**

### **I. Papers serving as basis for the Ph.D. thesis**

1. TOTH A., HALMOSI R., KOVACS K., DERES P., KALAI T., HIDEG K., TOTH K., SUMEGI B. Akt activation induced by an antioxidant compound during ischemia-reperfusion. *Free Radic. Biol. Med.* 35(9), 1051-63, 2003.

Impact factor: 5.063

2. TOTH A., KOVACS K., DERES P., HALMOSI R., HANTO K., KALAI T., HIDEG K., SUMEGI B., TOTH K. Impact of a novel cardioprotective agent on the ischaemia-reperfusion-induced Akt kinase activation. *Biochem. Pharmacol.* 66: 2263-72. 2003.

Impact factor: 2.993

3. K. KOVACS, A. TOTH, P. DERES, T. KALAI, K. HIDEG, B. SUMEGI. Myocardial protection by selective poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Exp. and Clin Cardiol.* 9; 17-20, 2004.

4. DERES P, HALMOSI R, TOTH A, KOVACS K, PALFI A, HABON T, CZOPF L, KALAI T, HIDEG K, SUMEGI B, TOTH K. Prevention of doxorubicin-induced acute cardiotoxicity by an experimental antioxidant compound. *J. of Cardiovasc Pharm* 45 (1): 36-43, 2005.

Impact factor: 1.905

5. K. KOVACS, A. TOTH, P. DERES, T. KALAI, K. HIDEG, F. GALLYAS Jr., B. SUMEGI. Critical role of PI3-kinase/Akt activation in the PARP inhibitor induced heart function recovery during ischemia-reperfusion. *Biochem. Pharmacol.* (accepted for publication)

Impact factor: 2.993

### **II. Book chapters**

1. KOVACS K., TOTH A., DERES P., HANTO K., HIDEG K., SUMEGI B. Effect of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors on the activation of ischemia-reperfusion induced inflammatory

processes in Langendorff perfused hearts. In: Proceedings of the 37<sup>th</sup> Congress of the European Society for Surgical Research (Szeged, Hungary, May 23-25, 2002). Ed.: Boros, M. Monduzzi Editore, 63-68, 2002.

2. B. SUMEGI, K. KOVACS, B. VERES, B. RADNAI, G. VARBIRO, Z. BOGNAR, A. TOTH, F. GALLYAS. Oxidative Stress and the Endoplasmic Reticulum. In: Endoplasmic Reticulum: A metabolic Compartment Eds: A. Benedetti et al., IOS Press, 121-130, 2005.

### III. Additional papers

1. B. BOROS, K. KOVACS, R. OHMACHT. Fast Separation of Amino Acid Phenylthiohydantoin Derivatives by HPLC on a Non-porous Stationary Phase. *Chromatographia*, 51, 202-204, 2000.

Impact factor: 1.317

2. OHMACHT R., BOROS B., KOVÁCS K. Fast seaparation of biomolecules by HPLC on a Non-Porous Stationary Phase. (Hungarian) *Magyar Kémiai Folyóirat*, 11, 465-467, 1999.

3. GIRAN L., KOVACS K., SUMEGI B. A possible role of Phosphatidic acid in ischemia-reperfusion-induced mitochondrial ROS production. (manuscript under preparation)

4. KOVACS K., GIRAN L., PALFI A., SUMEGI B. Mitochondrial ROS production induced by the activation of Phospholipase D during ischemia-reperfusion in Langendorff-perfused hearts. (manuscript under preparation)

### IV. Published abstracts

1. KOVACS K., TOTH A., DERES P., HIDEG K., SUMEGI B. Effect of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors on the intracellular signal transduction during ischaemia-reperfusion (IR). 22<sup>nd</sup> Meeting of the International Society for Heart Research – European Section, July 3-6, 2002, Szeged, Hungary, *J Mol Cell Cardiol*, 34, A19, 2002.

2. DERES P., HALMOSI R., TOTH A., KOVACS K., BERENTE Z., HIDEG K., TOTH K., SUMEGI B. Protective effect of H-2545 on doxorubicin-induced acute cardiotoxicity. 22<sup>nd</sup> Meeting of the International Society for Heart Research – European Section, July 3-6, 2002, Szeged, Hungary, J Mol Cell Cardiol, 34, A35, 2002.
3. SUMEGI B., KOVACS K., TAPODI A., DERES P., TOTH A., BERENTE Z., OSZ E., KALAI T., HIDEG K. Effect of PARP inhibitors on the activation of MAP kinases in Langendorff perfused hearts. 28<sup>th</sup> Meeting of the Federation of European Biochemical Societies, 20-25 October, 2002, Istanbul, Turkey, Eur J Biochem, 269 Suppl. 1, PS5-152, 2002.
4. KOVACS K., TOTH A., DERES P., SUMEGI B. Differential effect of Metoprolol, Verapamil and 4-hydroxyquinazoline on the ischemia-reperfusion-induced myocardial processes. Heart Failure/International Society for Heart Research – European Section Meeting 2003, June 21-24, 2003, Strasbourg, France. Basic Res Cardiol, 98, 189, 2003.
5. TOTH A., KOVACS K., DERES P., PALFI A., HANTO K., HALMOSI R., HIDEG K., SUMEGI B., TOTH K. Impact of an antioxidant compound on the activity of the protective Akt pathway during myocardial ischemia-reperfusion. Heart Failure/International Society for Heart Research – European Section Meeting 2003, June 21-24, 2003, Strasbourg, France. Eur J Heart Failure, 2/1, 58-59, 2003.
6. SUMEGI B., KOVACS K., TOTH A., DERES P. Effect of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors on the activation of the protective Akt pathway in Langendorff perfused hearts. Heart Failure/International Society for Heart Research – European Section Meeting 2003, June 21-24, 2003, Strasbourg, France. Eur J Heart Failure, 2/1, 55-56, 2003.
7. KOVACS K., TOTH A., DERES P., OSZ E., VERES B., RADNAI B., SUMEGI B. Impact of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors on the activation of PI3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways in postischemic myocardium. SFRR-Europe Meeting 2003, June 26-29, 2003, Ioannina, Greece. Free Radic Res, 37, Suppl. 1, PP101, 2003.
8. SUMEGI B., KOVACS K., TOTH A., DERES P., PALFI A. Impact of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors on the activation of PI3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase

pathways in postischemic myocardium. Special FEBS 2003 Meeting on Signal Transduction, July 3-8, 2003, Brussels, Belgium. Eur J Biochem, 270 Suppl. 1, PS01-0867, 2003.

9. KOVACS K., TOTH A., DERES P., SUMEGI B. Activation of the Akt kinase pathway by poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors during myocardial ischemia-reperfusion. European Society of Cardiology Congress 2003, August 31-September 3, 2003, Vienna, Austria. Eur Heart J, 2003.

10. SUMEGI B., KOVACS K., TAPODI A., DERES P., BERENTE Z., OSZ E., TOTH A. Role of poly(ADP-ribose) polymerase in the pathomechanism of oxidative cell damage. IV. International Symposium on Myocardial Cytoprotection, September 25-27, 2003, Pécs, Hungary. J Exp Clin Cardiol, 2003.

11. KOVACS K., TOTH A., DERES P., SUMEGI B. Differential effect of metoprolol, verapamil and 4-hydroxyquinazoline on the ischemia-reperfusion-induced myocardial processes. IV. International Symposium on Myocardial Cytoprotection, September 25-27, 2003, Pécs, Hungary. J Exp Clin Cardiol, 2003.

12. KOVACS K., TOTH, A., DERES, P., SUMEGI, B. Activation of the Akt kinase pathway by poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors during myocardial ischemia-reperfusion. European Society of Cardiology Congress 2003, August 31-September 3, 2003, Vienna, Austria. Eur Heart J. Vol.24, Abstr. Suppl. Aug/Sept., 590., 2003.



## **Acknowledgements**

I am grateful for the help of my teacher and project leader, Professor Balázs Sümegi who suggested the theme and gave support and useful advises during my Ph.D. curriculum. I thank to Professor Kálmán Hideg that he supported us to examine new compounds developed by his team.

I am grateful to my closest colleagues who assisted me in pursuing my experimental studies: Dr. Ambrus Tóth, Dr. Péter Deres, Dr. Anita Pálfi, and Dr. Katalin Hantó.

I would like to express my thanks to Laszlo Giran and Bertalan Horvath for their excellent technical help and to the technicians at the Department of Biochemistry and Medical Chemistry for their kind help.

I express my warmest and heartfelt thanks to my mother, my brother and my husband for their love and encouraging support during my studies and work.

Ph.D. értekezés tézisei

**Poli(ADP-ribóz) polimeráz gátló szerek által kiváltott Akt aktiváció  
postischaemiás szívben**

**Dr. Kovács Krisztina**

**Program- és témavezető: Prof. Dr. Sümegei Balázs**

**Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar  
Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet  
Pécs**

**2005.**

## Bevezetés

Ischaemia-reperfúzió alatt jelentős mennyiségben képződnek reaktív oxigén gyökök (ROS), mint pl. a  $H_2O_2$ , szuperoxid és hidroxil gyökök. A reaktív oxigén szabadgyökök különböző sejtkárosító folyamatokat indítanak be, úgy mint a lipid peroxidáció, a fehérje oxidáció és a DNS törés. Az egyes láncú DNS törések aktiválják a nukleáris poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) enzimet. Az aktivált PARP az intracelluláris  $NAD^+$ -ot nikotinamidra és ADP-ribózra hasítja, mely utóbbit polimerek formájában különböző nukleáris fehérjékhez köti és egyben automodifikálja önmagát. A PARP aktivitás így celluláris  $NAD^+$  depléciót okoz. Mivel a NADH a mitokondriális légzési lánc elektron szállítója, a  $NAD^+$  hiány rövid időn belül ATP depléciót okoz. A túlzott mértékű PARP aktivitás tehát ATP hiányt okoz, amely végül a sejt elhalásához vezethet. A PARP gátlása megóvhatja a különböző sejteket az oxidatív károsodásuktól.

A szívizom energiatermelése döntő mértékben a mitokondriumokban zajlik, így a mitokondrium védelme fontos szerepet játszhat a szívizom energiatermelésének fenntartásában. Korábbi adataink szerint a PARP inhibitorok csökkenteni tudták a sejtek oxidatív károsodásait, minden gyökfogó (scavenger) aktivitás nélkül. A szívizom ischaemia-reperfúzió során a szívizomsejtek döntő mértékben nekrozissal pusztulnak el, mára bizonyítást nyert, hogy apoptózis is előfordul. Az apoptózis új terápiás célpont lehet a szívizom infarktus elleni védelemben, hisz ezek a sejtek, szemben a nekrotikusan elpusztultakkal, még potenciálisan megmenthetők a sejthaláltól.

Az oxidatív stressz a receptor tirozin-kináz–foszfatidilinozitol-3-kináz–Akt jelátviteli utat is aktiválja, amely protektív hatással rendelkezik az apoptózis gátlásán (inaktiválja a Bad fehérjét, kaszpáz-9-t és a Forkhead transzkripciósi faktort) valamint metabolikus adaptáción (a glikogén-szintáz-kináz-3 $\beta$  /GSK-3 $\beta$ / gátlásával serkenti a glikogén és fehérje szintézist) és vazodilatáción (aktiválja az endothelialis nitrogén-monoxid-szintáz /eNOS/) keresztül.

Korábbi munkáink és irodalmi adatok szerint a PARP-inhibitorok védőhatást mutatnak a szívizom ischaemia-reperfúziós károsodásával szemben.

## Célkitűzések

Izolált szívperfúziós modellen vizsgáltuk egy ismert PARP gátló vegyület; a 4-hidroxi-kinazolin és egy kísérleti stádiumban lévő scavenger és PARP gátló tulajdonsággal is rendelkező vegyület; a HO-3089 hatását a szívizom energiaháztartására, a szívteljesítményre és az elhalt szívizom területek nagyságára ischaemia-reperfúzió körülményei között. Mértük a két vegyület oxidatív károsodásokra (lipid peroxidációra, fehérje oxidációra és össz peroxid mennyiségekre) kifejtett hatását. Ezt követően a perfundált szívizomszövetekben Western blot analízis segítségével vizsgáltuk a protektív útvonalak aktiválódását (különös tekintettel az Akt és GSK-3 $\beta$  foszforilációjára). A foszfatidilinozitol-3-kináz specifikus gátlószerével (wortmannin és LY294002) végzett kísérletek pedig mélyebb betekintést engedtek a vizsgált szerek esetleges hatásmechanizmusába.

## **Anyagok és módszerek**

### **Anyagok**

A 4-hidroxi-kinazolint, a 2,4-dinitrofenilhidrazint, az LY294002-t és a tiobarbitursavat a Sigma Aldrich Chemical Co.-tól vásároltuk. A wortmannint a Calbiochemtől vásároltuk. A HO-3089 a Szerves- és Gyógyszerkémiai Intézetben került szintézisre. Minden egyéb reagenst a kereskedelmileg elérhető legnagyobb tisztaságban alkalmaztunk.

### **Állatok**

A Langendorff szívperfúzió során 300-350 grammos felnőtt, hím patkányok szívét használtuk. Minden állatkísérletet az állatok tartásával és használatával foglalkozó etikai alapelveknek megfelelően végeztünk.

### **Langendorff szívperfúzió**

A kísérleti patkányokat 200 mg/ttkg ketamin intraperitoneális beadásával altattuk el, és 100 IU i.p. Na-heparinnal heparinizáltuk. A szíveket a Langendorff módszer szerint az aortán keresztül retrográd perfundáltuk 70 Hgmm-es állandó nyomással 37°C-on. A perfúziós folyadék módosított, foszfátmentes Krebs-Henseleit puffer volt, amely 118 mM NaCl-t, 5 mM KCl-t, 1,25 mM CaCl<sub>2</sub>-t, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>-t, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>-t, 11 mM glükózt és 0,6 mM oktánsavat tartalmazott, és pH-ját 7,4-re állítottuk. A 15 perces kimosási fázist követően a szíveket 10 percig normoxiás körülmények között perfundáltuk, majd az aorta beáramlási csövének az elzárásával 30 perces globális ischaemiát hoztunk létre, amit 15, 45 illetve 90 perces reperfúziós fázis követett. Az alkalmazott vegyületeket a kimosási fázist követően adtuk a perfúziós médiumhoz: 25 µM HO-3089, 100 µM 4-hidroxi-kinazolin, valamint 100 nM wortmannin ill. 10µM LY294002. A perfúziók végén a szíveket lefagyasztottuk.

### **NMR spektroszkópia**

A <sup>31</sup>P spektrumokat Varian UNITY<sup>INOVA</sup> 400 WB készülékkel detektáltuk. A perfundált szívek <sup>31</sup>P méréseit (161,9 MHz) 37°C-on Z•SPEC 20 mm-es „broadband” mintavételi fejjel végeztük (Nalorac Co., Martinez, California, USA) a felvétel alatt GARP-1 proton lecsatolást alkalmazva. A mező homogenitását a proton jel ( $w^{1/2} = 10-15$  Hz) követésével állítottuk be. A spektrumokat 3 percenként gyűjtöttük, minden FID (free induction decay) jelben 120 tranziens összegyűjtésével.

## **Szívfunkció**

A mitrális billentyűn keresztül egy gumiballont helyeztünk a bal kamrába, és annyira töltöttük levegővel, hogy a végdiasztolés nyomás 8-12 Hgmm legyen. Minden mérést ugyanazon ballon térfogattal végeztük. A 15 perces kimosási fázist követően a szíveket 10 percig normoxiás körülmények között perfundáltuk, majd az aorta beáramlási csövének az elzárásával 30 perces globális ischaemiát hoztunk létre, amit 15, 45 illetve 90 perces reperfüziós fázis követett. Az alkalmazott vegyületeket a kimosási fázist követően adtuk a perfúziós médiumhoz: 25  $\mu$ M HO-3089, 100  $\mu$ M 4-hidroxi-kinazolin. A szívfunkciót jellemző adatokat (LVDP, RPP, dP/dt) a perfúziók teljes időtartama alatt detektáltuk.

## **Elhalt szívizom terület nagyságának mérése**

A perfúziót követően a szív pitvarait és az aortagyököt levágtuk, majd a szívet felkötve egész éjszakán át  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A kamrákat még fagyott állapotban egyforma 2-3 mm vastagságú darabokra vágtuk, melyeket 30 percig 1 %-os trifenil- tetrazolium klorid oldatban (0,2 M Trisz pH=7,40 pufferben oldva)  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on festettük. A normál szívizomszövet téglavörösre festődött, míg az elhalt terület színe nem változott (nem festődött). Az elhalt terület nagyságát felület és súly alapján számoltuk.

## **Lipid peroxidáció és fehérje oxidáció**

A lipid peroxidáció mértékét a tiobarbitursav reaktív anyagok képződése alapján határoztuk meg egy malondialdehid standard segítségével. A protein karbonil-tartalmat a 2,4-dinitrofenilhidrazin módszerrel mértük.

## **Totál peroxid mennyiség meghatározás**

A szívizomszövetek 100 mg-os darabjait jégen MOPS (50 mM) és EDTA (1 mM) pufferben homogenizáltuk. Az oldatot argon gázzal átbuborékolattuk, majd szonikálást követően Tween 20-t adtunk a mintákhoz, melynek a végkoncentrációja 1 % volt. Centrifugálást követően a felülúszókból Biomedica OxyStat kisset használva (Biomedica GmbH, Bécs, Ausztria) totál peroxid tartalmat határoztunk meg.

## **Gélelektroforézis és Western Blot analízis**

A szívizomszövetek 50 mg-os darabjait jégen 50 mM-os Tris pufferben (pH=8,0) homogenizáltuk, majd 2x mintapuffert adtunk hozzá. Az így elkészített mintákat 12%-os SDS-poliakrilamid gélen

megfuttattuk, majd a fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltuk. Szárítás, majd 2 órás, 3%-os nem-zsíros tejben való blokkolás után a membránokat egy éjszakán keresztül inkubáltuk az első antitesteket tartalmazó oldatokban – nem foszforilált Akt, foszfo-Akt (1:4000 hígítás; Calbiochem, Darmstadt, Németország) és foszfo-GSK-3 $\beta$  (1:1000 hígítás, Cell Signaling Technology, Beverly, USA). Mosás (Tris és 0,2% Tween tartalmazó oldattal) után a nitrocellulóz membránokat két órán keresztül, szobahőmérsékleten anti-nyúl HRP-konjugált (1:3000 hígítás; BioRad, Budapest, Magyarország) második antitestet tartalmazó oldatban inkubáltuk. Újabb mosás után az antigén-antitest komplexek jelenlétét ECL (enhanced chemiluminescence) módszer segítségével tettük láthatóvá. Az eredményeket Scion Image 4.02 programmal számszerűsítettük.

### **Statisztikai analízis**

Variancia analízist végeztünk, és az összes adatot az átlag  $\pm$  S.E.M.-ként (a középérték közép hibája) adtuk meg. A párosítatlan Student-féle t teszttel ítéltük meg a szignifikáns különbségeket, és a 0,05 alatti p értékeket tekintettük szignifikánsnak.

## Eredmények

*A PARP gátló szerek hatása a szívizom energia metabolismusára, kontraktilis funkciójára és a sejthalálra ischaemia-reperfúzió körülményei között*

NMR spektroszkópiás módszerrel Langendorff szívperfúzió alatt figyeltük a szívizomszövetek nagy-energiájú foszfát intermedierjeinek változását a perfúzió teljes időtartama alatt. Az ischaemiás időszak alatt gyors kreatin-foszfát és ATP csökkenést, valamint anorganikus foszfát szint emelkedést tapasztaltunk. Kísérleti körülményeink között a nem kezelt esetekben a 45 perces reperfúziós fázis alatt a nagy-energiájú foszfát intermedierek csak részleges visszatérését tapasztaltuk, szemben az alkalmazott PARP-inhibitorokkal, melyek elősegítették a kreatin-foszfát (CrP) és ATP visszatérését. Mindkét vizsgált vegyület szignifikáns mértékben javította a kreatin-foszfát szintek visszatérését ( 61.2±5.7% a 4OHQ-al kezelt és 49.1±5.4% a HO-3089-al kezelt esetekben szemben 24.2±5.1% a nem kezelt esetekhez képest). A PARP inhibitorok elősegítették az ischaemia során felhalmozódott anorganikus foszfát gyorsabb és teljesebb felhasználódását a reperfúzió alatt (a vég-ischaemiás érték %-ában kifejezve: 27.8±3.2% a 4OHQ-kezelt és 31.5±4.1% a HO-3089-kezelt esetekben, szemben a 53.7±2.9% a nem kezelt szívekben).

A PARP gátló szerek hatását a szívizom funkciójának a visszatérésére a már korábban is (100 µM 4OHQ és 25 µM HO-3089) alkalmazott koncentrációkkal detektáltuk. A normoxiás fázis végén a LVDP értéke 135.2±16.4 mmHg, a RPP értéke  $3.4±0.15×10^4$  mmHg/min, a  $dp/dt_{max}$  értéke 1310±196 mmHg/s volt, míg az átlagos szívfrekvencia 217±19 ütés/min volt. Mindkét vizsgált vegyület szignifikáns mértékben javította az összes jellemző értéket, jelezve hogy az energiaháztartás megőrzése jobb szívfunkciót eredményez.

A 90 perces reperfundált szívizom minták trifenil-tetrazolimklorid festése alapján elmondható, hogy az alkalmazott PARP gátló vegyületek szignifikáns mértékben csökkentették az elhalt szívizom területek nagyságát a nem kezelt mintákhoz képest (a teljes területnagyság %-ában kifejezve: 33.1±4.2% a 4OHQ-al kezelt és 37.2±5.7% a HO-3089-al kezelt esetekben, szemben a 64.2±6.8% a nem kezelt esetekben).

*A PARP gátló szerek hatása az oxidatív károsodásokra, valamint az ischaemia-reperfúzió által kiváltott Akt foszforilációra*

Az ischaemia-reperfúzió által kiváltott lipid-peroxidáció mértékét a Langendorff-perfundált szívizomszövetekből a tiobarbitursav-reaktív termékek mérésével határoztuk meg (TBARS).



Kísérleti körülményeink között az ischaemia-reperfúzió jelentős mértékben növelte a TBARS mennyiségét a normoxiás körülményekhez viszonyítva. Normoxiás körülmények között a PARP inhibitoroknak nincsen szignifikáns szerepük a TBARS mennyiségének változtatásában. Ischaemia-reperfúzió körülményei között azonban a PARP inhibitorok szignifikáns mértékben csökkentették a TBARS mennyiségét, szemben az ischaemia-reperfúzió által indukálttal, jelezve, hogy a PARP inhibitorok megóvják a szívmot az ischaemia-reperfúzió által kiváltott lipid-peroxidációtól.

Az ischaemia-reperfúziós ciklus által kiváltott reaktív oxigén gyökök növelik a fehérjék oxidációjának a mértékét, amit a protein-karbonil tartalom mérésével határoztunk meg. Az ischaemia-reperfúzió szignifikáns mértékben növelte a fehérje oxidáció mértékét, melyet a PARP gátlók alkalmazásával mérsékelni tudtunk.

Kísérleti körülményeink között a az ischaemia-reperfúzió önmagában mérsékelt Akt aktivációt okoztak, melyet az alkalmazott PARP gátló szerek tovább erősítettek.

#### *A PI3-kináz gátlószerei befolyásolják a PARP gátlók szívmot védő hatását*

Kíváncsiak voltunk, hogy a megfigyelt fokozott Akt aktiváció hozzájárul-e a PARP gátlók szívmotvédő hatásához, a szívmot PI3-kináz gátló szerekkel kezeltük. A wortmannint 100 nM-os koncentrációban önmagában adva, vagy a LY294002-t 10  $\mu$ M-os koncentrációban önmagában adva nem változtatta a nagy-energiájú foszfát intermedierek visszatérését és nem segítette az anorganikus foszfát szint csökkenését. Minkét vegyület azonban csökkentette a kardioprotektív vegyületek kedvező hatását, mind a kreatin-foszfát, mind az ATP, mind az anorganikus foszfát szintjére. Ezen túlmenően az alkalmazott PI3-kináz gátló vegyületek a PARP-gátlók által kiváltott megnövekedett szívteljesítményt is szignifikáns mértékben csökkentették.

A wortmannint és LY294002-t önmagában alkalmazva nem befolyásolták az ischaemia-reperfúzió okozta elhalt szívmotterület nagyságát (az értékek  $59.6 \pm 6.5\%$  és  $60.1 \pm 5.8\%$  voltak). A PARP gátló és PI3-kináz gátló szerek együttes alkalmazása azonban megnövelte az elhalt szívmotterületek nagyságát, a csak a PARP gátló szerekkel kezelt esetekhez képest ( $36.1 \pm 2.2\%$ -ról a 4OHQ-al kezelt,  $41.6 \pm 2.9\%$ -ra a 4OHQ + wortmannin-al kezelt  $42.5 \pm 3.4\%$ -ra a 4OHQ + LY294002-al kezelt és esetekben; illetve  $33.4 \pm 3.1\%$ -ról a HO-3089-al kezelt,  $45.3 \pm 2.7\%$ -ra a HO3089 + wortmannin-al kezelt és  $47.2 \pm 2.6\%$ -ra a HO-3089 + LY294002-al kezelt esetekben).

A PI3-kináz gátló szerek önmagukban is csökkenteni tudták az IR által okozott lipid peroxidáció mértékét ( $82.4 \pm 5.7$  nM/g a wortmannin-al kezelt és  $81.4 \pm 3.9$  nM/g a LY294002-al kezelt esetekben, szemben a  $125.2 \pm 5.4$  nM/g a nem kezelt esetekhez képest). A PARP gátló és PI3-kináz gátló

szereket együtt alkalmazva, a magasabb TBARS szinteket eredményeztek, mint a PARP gátlók önmagukban ( $51.3 \pm 2.3\%$  a 4OHQ + wortmannin kezelt és  $62.8 \pm 3.4\%$  a 4OHQ + LY294002 kezelt, szemben a  $46.3 \pm 3.2\%$  a csak 4OHQ-kezelt esetekben; illetve  $52.5 \pm 3.1\%$  a HO3089 + wortmannin kezelt és  $58.7 \pm 4.3\%$  a HO-3089 + LY294002 kezelt, szemben a  $49.5 \pm 4.1\%$  a csak HO3089-al kezelt esetekben). Hasonlóan a lipid peroxidációs értékekhez a fehérje oxidáció és a totál peroxid koncentráció értékét is csökkentette mind a wortmannin, mind az LY294002, bár nem olyan mértékben, mint az alkalmazott PARP gátlók. A PI3-kináz gátló szerek részlegesen tudták csökkenteni a PARP gátlók védő hatását.

A wortmannin-t és LY294002-t önmagában alkalmazva nem befolyásolták döntő mértékben az IR okozta Akt aktivációt. Ugyanakkor a PARP gátlókat és PI3-kináz gátlókat együttesen alkalmazva az Akt-1 foszforilációjának az emelkedését találtuk, ami azonban szignifikánsan kisebb mértékű volt, mint a csak PARP gátló szerrel kezelt esetekben. Az ischaemia-reperfúzió által okozott gyenge GSK-3 $\beta$  foszforilációt a wortmannin és a LY294002 sem tudta gátolni. Hasonlóan az Akt foszforilációhoz a PARP gátlók és PI3-kináz gátlók együttes alkalmazása szignifikáns mértékben gyengíteni tudta a GSK-3 $\beta$  foszforilációját a PARP gátlók önálló alkalmazása során talált értékkel szemben.

## Megbeszélés

A poli(ADP-ribóz) polimeráz gátló szerek védelmet nyújtanak myocardialis ischaemia-reperfúzió során, a védelem molekuláris magyarázata azonban még felderítetlen terület. A túlzott mértékű PARP aktiváció a sejt  $\text{NAD}^+$  és ATP szintjeinek csökkenéséhez és a szívizomsejtek nekrozisához vezet. A szívizomsejtek jelentős része IR alatt apoptózis útján hal el, de a PARP szerepe ebben a folyamatban még nem teljesen tisztázott. Irodalmi adatok és saját eredményeink kimutatták, hogy a PARP gátló vegyületek megvédik a postischaemiás szívizom szövetet és csökkentik a szabadgyök termelés mértékét, mely döntően a mitokondriumokban zajlik. Jelen munkánk a mitokondriális poli(ADP-ribóz) polimerázokról szól, melyeket PARP-1 gátló szerekkel blokkolni tudtunk. Ennek szerepe lehet a mitokondriumok védelmében, de valószínű sokkal összetettebb kérdéstről van szó.

Korábbi eredményeink kimutatták, hogy a PARP gátló szerek fokozzák az Akt foszforilációját és aktivációját májban, tüdőben és lépben lipopoliszacharid kezelt egerekben, és, hogy a PARP gátlók védelme csak részben történik a PI3-kináz/Akt útvonalon keresztül. Hasonló eredményeket találtak idegsejteknél is. Ezek a megfigyelések azt mutatják, hogy a PARP gátlók védő hatása sokkal összetettebb, mint azt az  $\text{NAD}^+$  és ATP hiánytól várnánk, hisz az Akt számos szabályozó fehérjét képes foszforilálni- többek között a GSK-3 $\beta$ -t, kaszpáz-9-t, BAD fehérjét és a FKHR-transzkripciós faktort. A pro-apoptotikus BAD fehérje foszforilációja és inaktivációja hozzájárul a mitokondrium membrán stabilizációjához, és megóvjá a pro-apoptotikus fehérjék kiáramlását, mint pl. a citokróm c, vagy az apoptózist indukáló faktor. A PARP gátló védelme tehát a PI3-kináz/Akt/BAD fehérje útvonalon keresztül zajlik.

Munkánkban egy ismert és egy újonnan kifejlesztett PARP gátló vegyület hatását vizsgáltuk perfundált szívizomban. Az alkalmazott PARP gátlók elősegítették a kreatin-foszfát, ATP és pH szintek visszatérését és az anorganikus foszfát szintek csökkenését ischaemia-reperfundált szívizomban. A PARP gátlók csökkentették az oxidatív károsodásokat- a lipid peroxidáció, fehérje oxidáció és a totál peroxid koncentrációk mértékét. A szívizom energetikájára is kedvezően hatottak, elősegítették a szívfunkció visszatérését, és csökkentették az elhalt szívizomterületek nagyságát.

Kísérleti körülményeink között a PARP gátlók fokozták az Akt foszforilációját. Kimutattuk, hogy ez a foszforiláció egyben aktivációt is jelent, hisz az Akt egyik szubsztrátja, a GSK-3 $\beta$  is foszforilálódik egyidejűleg. Bár ezen adatok azt mutatták, hogy az Akt aktivációja a PARP gátlás

következménye, még nem teljesen bizonyos, hogy a PARP gátlók védelme az Akt aktivációjával magyarázható.

A PI3-kináz gátlók szignifikáns, bár nem teljes mértékben tudták csökkenteni az Akt és GSK-3 $\beta$  foszforilációját PARP gátlókkal együtt alkalmazva, jelezve, hogy az Akt foszforilációja döntő mértékben a PI3-kináz útvonalon keresztül zajlik. A PI3-kináz/ Akt útvonal gátlása PARP inhibitorokkal együtt adva szignifikáns mértékben csökkentette a kreatin-foszfát, ATP és pH szintek visszatérését és az anorganikus foszfát szintek csökkenését, jelezve, hogy az Akt aktivációjának fontos szerepe lehet a szívizom energiaháztartásának a helyreállításában reperfüzió során. Ez a megfigyelés magyarázható azal, hogy az Akt segíti a mitokondrium membrán integritásának a megóvását. A PI3-kináz gátlók csökkentették a PARP gátló védő hatását az elhalt szívizom terület nagyságára és a szívizom energiájának a visszatérésére. A wortamannin és az LY294002 önmagában alkalmazva nem befolyásolta döntő mértékben a szívizom energitájának a visszatérését, bár általunk nem ismert mechanizmussal csökkentették a szívizom oxidatív károsodásait. Továbbá a PI3-kináz gátlók nem tudták befolyásolni az Akt foszforilációját, még 5-szörös koncentrációban alkalmazva sem sikerült teljesen blokkolni az Akt foszforilációját IR során. Azt feltételezzük, hogy az Akt egy kis mértékben tehát PI3-kináz independens útvonalon keresztül is aktiválódik. A PARP gátlók által okozott Akt aktiváció, azonban döntő mértékben a PI3-kinázon keresztül történik, hisz ez teljesen gátolható PI3-kináz gátló szerekkel.

## Következtetések

Munkánk során először igazoltuk, hogy a PARP inhibitorok befolyásolják az intracelluláris jelátviteli útvonalakat. Mindkét vizsgált PARP gátló vegyület megvédte a szívizom energia metabolismusát és kontraktilis funkcióját ischaemia-reperfúzió körülményei között, és csökkentették az oxidatív szívizom-károsodásokat. A PARP inhibitorok az Akt fokozott aktivációját idézték elő, ami a GSK 3 inaktivációjához vezetett. A foszfoinozitol-3-kináz enzimet gátló wortmannin és LY294002 részben csökkentette a PARP inhibitorok védő hatását- mind a szívizom energetikát, kontraktilis funkciót, elhalt terület nagyságot, oxidatív károsodásokat, és az Akt aktivációt is. Eredményeink azt mutatták, hogy a vizsgált vegyületek kardioprotektív tulajdonságához a protektív Akt jelátviteli útvonal aktivációja is hozzájárulhat.

Bár még keveset tudunk az ischaemia-reperfúzió által indukált jelátviteli folyamatokról. Az oxidatív stressz által kiváltott szabadgyököknek fontos szerepük lehet.

Eredményeink azt mutatják, hogy az Akt aktivációját a PARP gátló kezelés okozza, és hogy ennek fontos szerepe lehet a sejtek túlélésére. A PARP gátlók protektív jelátviteli utakra gyakorolt hatásainak megismerése új perspektívát nyithat a humán betegségek pathomechanizmusának megértésében, és a jövőbeni gyógyszeres beavatkozás lehetőségét vetíti elénk.