

**THE ROLE OF INTRACELLULAR SIGNALING IN THE  
CARDIOPROTECTIVE EFFECT OF POLY(ADP-RIBOSE) POLYMERASE  
INHIBITION**

PhD thesis

**Author:** Anita Pálfi, M.D.

**Project leader:** Prof. Kálmán Tóth, M.D., Sc.D.

First Department of Medicine  
University of Pécs, Medical School  
Hungary

2006

#### ABBREVIATIONS

BNP	B-type natriuretic peptide
CK	creatine kinase
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinase
GSK-3 $\beta$	glycogen synthase kinase-3 $\beta$
ISO	isoproterenol hydrochloride
JNK	c-jun N-terminal kinase
LDH	lactate dehydrogenase
MAPK	mitogen activated protein kinase
NAD <sup>+</sup>	nicotinamide adenine dinucleotide
NIH	National Institutes of Health
NMR	nuclear magnetic resonance
PARP	poly(ADP-ribose) polymerase
PI3K	phosphatidylinositol-3-kinase
PKC	protein kinase C
TBARS	thiobarbituric acid reactive substances
TBS	TRIS-buffered saline
TTC	triphenyltetrazolium-chloride

## 1. INTRODUCTION

Enhanced activation of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) enzyme is a major contributor to oxidative stress-induced cell dysfunction and tissue injury. Reactive oxygen species and peroxynitrite formation expedites the ischemia-reperfusion-induced cardiac injury, and causes lipid peroxidation, protein oxidation and single-strand DNA breaks. Single-strand DNA breaks can activate the nuclear PARP, which ADP-ribosylates different nuclear proteins on the expense of cleaving NAD<sup>+</sup>. If PARP activation exceeds a certain limit, it can lead to cellular NAD<sup>+</sup> and ATP depletion, ultimately resulting in cell death. We and other investigators have already shown that PARP inhibitors can efficiently reduce oxidative myocardial damage during ischemia-reperfusion both in isolated heart perfusion and in *in vivo* myocardial infarction models; furthermore PARP inhibition provided significant protection against postinfarction heart failure.

Recent studies have however challenged the original conception that protection by PARP inhibitors exclusively rely on the preservation of NAD<sup>+</sup> and ATP stores. Several studies have suggested that PARP inhibitors may modify the activation state of signaling routes and gene expression. Nevertheless, to date, limited information is available on how PARP inhibition influences the signaling pathways during myocardial ischemia-reperfusion, or how PARP inhibition might modulate intracellular signaling during the progression of postinfarction remodeling and heart failure.

### PROTEIN KINASE CASCADES AND OXIDATIVE STRESS

Hypoxia-reoxygenation as well as other oxidative insults influence tissue survival partially via differential regulation of protein kinase cascades and inflammatory reactions. Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)-Akt and mitogen-activated protein kinase (MAPK) (including extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2), c-Jun N-terminal Kinase (JNK) and p38-MAPK) signaling networks have all been shown to alter their activation state in response to oxidant injury and therefore could potentially participate in cell fate decisions. Signaling through Akt and ERK appears to be prosurvival in nature associated with growth factor receptor stimulation. On the other hand, JNK and p38-MAPK activation was linked to apoptosis, but depending on the context and duration of activation, they can exert opposite effects, as well.

Cardiac remodeling, ultimately culminating in heart failure, characterized by inadequate myocyte hypertrophy, accumulation of extracellular matrix structural proteins (fibrillar collagen, type I and III collagen), metabolic parameters and gene expression, is also associated with alterations in intracellular signaling including the inhibition of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) via phosphorylation by Akt, protein kinase C (PKC), p70-S6 kinase, p90-RSK and protein kinase A. These

pathways and the MAP kinases have all been demonstrated to alter their activation state in response to hypertrophic stimuli and therefore may be responsible for myocardial hypertrophy.

As recent findings in a rodent septic shock model showed that PARP inhibition increased the phosphorylation and activation of Akt and attenuated the lipopolysaccharide-induced phosphorylation of ERK1/2, p90RSK and p38-MAP kinases, it suggested, that PARP inhibitors could modulate these signaling pathways which are also responsible for the cell-fate decisions in myocardial ischemia-reperfusion or in the development of cardiac hypertrophy.

### EXPERIMENTAL MODELS OF CARDIAC OXIDATIVE INJURY

To elucidate the role of protein kinase signaling in the mechanism of cardioprotection afforded by PARP inhibitors, we utilized three experimental models. First, we investigated the effect of PARP inhibition on the recovery of energy metabolism *in vitro* in Langendorff perfused hearts during ischemia-reperfusion cycle, then the PARP inhibitor agent was tested *in vivo* in isoproterenol-induced (ISO) myocardial infarction model. Third the PARP inhibitor compound was administered in a rat model of chronic heart failure after isoproterenol-induced myocardial infarction. As known, subcutaneous administration of the beta-adrenoceptor agonist isoproterenol induces extensive amount of cardiomyocyte necrosis, ranging from patchy subendocardial necrosis to transmural infarction, while maintaining patent coronary vasculature. The exact mechanism of isoproterenol-induced myocardial damage has not been clarified, but a mismatch of oxygen supply versus demand following coronary hypotension and myocardial hyperactivity may offer the best explanation. It has been also demonstrated that ISO administration produces free radicals via  $\beta$ -adrenoceptor mechanism that affects the cell metabolism to such a degree that cytotoxic free radicals are formed producing myocardial necrosis. This effect results in both acute and chronic a deterioration of hemodynamic variables. The significant cell loss after the experimentally induced myocardial infarction is the initial insult that triggers the development of heart failure. The alteration in work load leads to consequent myocardial hypertrophy and finally ventricular enlargement and dilatation. Furthermore administration of high dosages of catecholamines is also followed by myocardial fibrosis, alterations in the collagen fibers or changes in the neurohormonal system. Finally injection of isoproterenol induces a syndrome in the rat that displays numerous typical characteristics of heart failure.

In this study PARP inhibition was achieved by a novel compound, L-2286, which was derived from 2-mercapto-4(3H)-quinazolinone by alkylation with 1-(2-chloroethyl)piperidine. L-2286 was chosen, because in *in vitro* PARP assay it exhibited significantly better PARP inhibitory activity than basic quinazolines such as 4-hydroxyquinazoline or 2-mercapto-4(3H)-quinazolinone.

## 2. AIMS OF THE STUDY

The aim of this work was to provide evidence for a new molecular mechanism of the cardioprotective effect of PARP inhibition.

### 1. To assess cardioprotection afforded by PARP inhibition

- a) We tested whether the novel quinoxaline derivative PARP inhibitor, L-2286 facilitated the recovery of myocardial energy metabolism and prevented the oxidative injury during ischemia-reperfusion in a Langendorff-heart perfusion system.
- b) We tested whether L-2286 prevented oxidative myocardial damage during isoproterenol-induced myocardial infarction by determining serum necroenzyme levels and infarct size.
- c) We tested whether PARP inhibition protected against postinfarction heart failure and ventricular remodeling by analyzing histological changes and metabolic alterations.

2. To provide evidence for a new additional cardioprotective mechanism, it was assessed, how PARP inhibition influenced the activation state of the intracellular signaling pathways responsible for myocyte cell survival or hypertrophic response. Therefore the phosphorylation states of the

- a) P13-kinase/Akt pathway,
- b) protein kinase C
- c) and mitogen activated protein kinase cascades were examined by Western blotting.

## 3. MATERIALS AND METHODS

### 3.1 HEART PERFUSION

Adult male CFY-strain Sprague-Dawley rats weighing 300-380 g were used for the Langendorff heart perfusion experiments and the myocardial infarction model. The animals were housed in solid-bottomed polypropylene cages and received commercial rat diet and water ad libitum. The investigation conformed to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the U.S. National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996), and was approved by the Animal Research Review Committee of the University of Pecs Medical School. Rats were anesthetized with 200 mg/kg ketamine intraperitoneally and heparinized with sodium heparin (100 IU/rat i.p.). Hearts were perfused via the aorta according to the Langendorff method at a constant pressure of 70 mmHg, at 37°C as described previously. The perfusion medium was a modified phosphate-free Krebs-Henseleit buffer consisting of 118 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 25 mM CaHCO<sub>3</sub>, 11 mM glucose and 0.6 mM octanoic acid and, in the treated group, L-2286 in 10 and 20 µM concentrations. The perfusate

was adjusted to pH 7.40 and bubbled with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> through a glass oxygenator. After a washout, non-recirculating period of 10 min, hearts were either perfused under normoxic conditions for 10 min, or were subjected to a 30-min global ischemia by closing the aortic inflow and reperused for 15 min. The experimental compound was administered into the perfusion medium at the beginning of normoxic perfusion. During ischemia hearts were submerged into perfusion buffer at 37°C. Hearts were freeze-clamped at the end of each perfusion.

### 3.2 NMR SPECTROSCOPY

NMR spectra were recorded with a Varian UNITY INOVA 400 WB instrument. <sup>31</sup>P measurements (161.90 MHz) of perfused hearts were run at 37°C in a Z-SPEC in a 20-mm broadband probe (Nalorac Co., Martinez, CA, USA), applying GARP-1 proton decoupling (γB2=1.2 KHz) during acquisition. Field homogeneity was adjusted by following the <sup>1</sup>H signal (w/1/2=10-15 Hz). Spectra were collected with a time resolution of 3 min by accumulating 120 transients in each free induction decay (FID). 45° flip angle pulses were employed after a 1.25 s recycle delay and transients were acquired over a 10 KHz spectral width in 0.25 s, and the acquired data points (5000) were zero filled to 16 K. Under the above circumstances the relative concentrations of the species can be taken proportional to the peak areas, because interpulse delays exceeded 4-5xT1 values of the metabolites to be analyzed in <sup>31</sup>P experiments.

### 3.3 LIPID PEROXIDATION AND PROTEIN CARBOXYL CONTENT

Lipid peroxidation was estimated from the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). TBARS were determined using a modification of a described method. Cardiac tissue was homogenized in 6.5% trichloroacetic acid (TCA) and a reagent containing 15% TCA, 0.375% thiobarbituric acid (TBA) and 0.25% HCl was added, mixed thoroughly, heated for 15 min in a boiling water bath, cooled, centrifuged and the absorbance of the supernatant was measured at 535 nm against a blank that contained all the reagents except the tissue homogenate. Using malondialdehyde standard, TBARS were calculated as nmol/g wet tissue.

To measure protein carbonyl content, 50 mg of frozen heart tissue were homogenized with 1 ml 4% perchloric acid and the protein content was collected by centrifugation. The protein carbonyl content was determined by means of the 2,4-dinitrophenylhydrazine-method.

### 3.4 MYOCARDIAL INFARCTION MODEL

Myocardial infarct was induced by subcutaneous injection of 80 mg/kg isoproterenol hydrochloride (ISO) (Sigma-Aldrich Co, Budapest, Hungary), while physiological saline (1 ml/kg) was given to control rats intraperitoneally. ISO solutions were prepared with sterile distilled water immediately before injection. ISO-treated animals were divided into two groups: while the ISO group received repeated injections of saline, the ISO+L-2286 group received L-2286 10 min before (10 mg/kg) and

every hour for 5 hours (3 mg/kg) after ISO administration. Electrocardiogram was made before and hourly (for 5 hours) after ISO administration (Schiller AG electrocardiograph, Switzerland). For Western blot analysis animals were sacrificed and hearts were freeze-clamped at 0, 0.5, 1, 2, 4, 24 hours.

### 3.5 INFARCT SIZE MEASUREMENT

24 h after the ISO administration, animals were sacrificed, hearts were removed and kept overnight at -20°C. Frozen ventricles were sliced into 2-3 mm thick sections and then incubated in 1% triphenyltetrazolium-chloride (TTC) at 37°C in 0.2 M Tris buffer (pH 7.4) for 30 min. While the normal myocardium was stained brick red, the infarcted areas remained unstained. Size of the infarcted area was estimated by the volume and weight method.

### 3.6 SERUM NECKROENZYME DETERMINATION

Serum lactate dehydrogenase (LDH) and creatine kinase (CK) levels were determined from blood samples collected 24 h after ISO administration. Myocardial enzyme activities were measured by standard methods as described earlier.

### 3.7 CHRONIC HEART FAILURE MODEL

350-380 g male CFY rats received two subcutaneous injections (separated by a 24-hour interval) of 80 mg/kg isoproterenol. Twenty-four hours after the second injection the surviving animals were randomly assigned to receive either 5 mg/kg L-2286, or water daily. The PARP inhibitor treatment was delayed 24 h to avoid the decrease of infarct size by the PARP inhibition. L-2286 was given for 8 weeks. At the end of 8 weeks body weights were measured and standard ECG was recorded to determine the R wave amplitude and J point depression (lead II). Animals were subsequently sacrificed, their hearts were removed, the atria and great vessels were trimmed from the ventricles and the weight of the ventricles was measured. It was then normalized to the body weight and the length of right tibia. Hearts were then freeze-clamped or fixed in 10% formalin.

### 3.8 DETERMINATION OF PLASMA B-TYPE NATRIURETIC PEPTIDE

Blood samples were collected into the Lavender Vacutainer tubes containing EDTA and aprotinin (0.6 TIU/ml of blood), centrifuged at 1600 g for 15 minutes at 4°C. Plasma were collected and kept at -70°C. Plasma B-type natriuretic peptide-45 (BNP-45) levels were determined by enzyme immunoassay method (BNP-45, Rat EIA Kit, Phoenix Pharmaceuticals Inc., CA, USA).

### 3.9 MEASUREMENT OF MITOCHONDRIAL ENZYME ACTIVITY

NADH:cytochrome-c oxidoreductase activity was measured as described previously. Enzyme activity was determined by measuring the rate of cytochrome c reduction at 550 nm in a medium containing 50 mM sodium-phosphate, 1 mM sodium-azide, 1.5 mM NADH and 50-75 µg mitochondrial protein/ml, pH 7.5. The reaction was started by addition of 40 µl cytochrome c.

### 3.10 HISTOLOGY

Ventricles fixed in formalin were sliced, and embedded in paraffin. 5 µm thick sections were cut serially from base to apex. 10 to 12 slices at 1-mm intervals were stained with haematoxylin and eosin. The sections were mounted on slides and projected at a magnification of 40x and photomicrographs were taken. Mean myocyte diameters on HE stained sections were calculated by measuring 100 cells per specimen in the region of the cell nucleus using the two-point distance function of the Telpath analyzer system (Bollman.com, 2000). Type III collagen was stained as a marker of interstitial fibrosis on frozen sections, 5 µm thick by the Vector M.O.M.<sup>TM</sup> Kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) staining procedure. After fixing and dehydrating, sections were washed in TRIS-buffered saline (TBS) containing 0.5% Tween 20, pH 7.6. To block the endogenous peroxidase activity, sections were incubated in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> then washed in TBS. After 1 h incubation with M.O.M.<sup>TM</sup> mouse IgG blocking reagent (containing 20% normal rat serum) sections were washed in TBS, and incubated in the working solution of M.O.M.<sup>TM</sup> diluent for 5 min. Primary mouse antisera against type III collagen (1:1000, Monoclonal Anti-Collagen, Type III, Sigma-Aldrich Co, Budapest, Hungary) diluted in M.O.M.<sup>TM</sup> diluent reacted at room temperature for 30 min, followed by two 2-minute rinses in TBS. Biotinylated Anti-Mouse IgG Reagent was the applied for 10 min and sections were washed twice for 2 min in TBS. VECTASTAIN ABC Reagent was applied for 5 min that was followed by two 2-minute rinses in TBS. Sections were then stained with Vector NOVARED Substrate (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) for five min, washed in distilled water, dehydrated, mounted on slides and projected at a magnification of 10x. The sections were quantified with the NIH ImageJ analyzer system. All histologic and immunohistological samples were examined by an investigator in a blinded fashion.

### 3.11 WESTERN BLOT ANALYSIS

Fifty milligrams of heart samples 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 h with 3% nonfat 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-α Ser<sup>473</sup> (1:1000), nonphosphorylated Akt/PKB (1:1000), phospho-specific glycogen synthase kinase (GSK)-3β

Ser<sup>1</sup> (1:1000), phospho-specific extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) Thr<sup>182</sup>-Tyr<sup>185</sup> (1:1000), phospho-specific p38 mitogen-activated protein kinase (p38-MAPK) Thr<sup>180</sup>-Gly<sup>182</sup> (1:1000), phospho-specific c-Jun N-terminal kinase (JNK) (1:1000), phospho-specific protein kinase C (PKC) (pan) Bil Ser<sup>609</sup> (1:1000), phospho-specific protein kinase C  $\alpha/\beta$ II (PKC $\alpha/\beta$ II) Thr<sup>630/641</sup> (1:1000), phospho-specific protein kinase C  $\delta$  Thr<sup>605</sup> (1:1000), phospho-specific protein kinase C  $\delta$  Ser<sup>649</sup> (1:1000), Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), nonphosphorylated PKC (1:1000), N-terminal domain of actin (1:10000; Sigma-Aldrich Co, Budapest, Hungary). Membranes were washed six times for 5 min in Tris-buffered saline (pH 7.5) containing 0.2% Tween (TBST) before addition of goat anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:3000 dilution; Bio-Rad, Budapest, Hungary). Membranes were washed six times for 5 min in TBST and the antibody-antigen complexes were visualized by means of enhanced chemiluminescence. The results of Western blots were quantified by NIH ImageJ program.

#### 3.12 STATISTICAL ANALYSIS

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

#### 4. SUMMARY

1. In this study the novel PARP inhibitor L-2286 was demonstrated to promote the posts ischemic recovery of myocardial energy metabolism in Langendorff heart perfusion system. L-2286 helped to preserve the high-energy phosphate intermediates during reperfusion as shown by <sup>31</sup>P NMR spectroscopic studies. Moreover, L-2286 facilitated the rapid and more complete consumption of inorganic phosphates during reperfusion. The improved metabolic recovery in the presence of L-2286 was accompanied by decreased myocardial oxidative damage, i.e. lipid peroxidation and protein oxidation.

2. In accordance with Langendorff studies, the isoproterenol-induced myocardial damage *in vivo* was also significantly attenuated by L-2286 treatment, as it was proved by reduced cardiac necroenzyme (CK and LDH) release and smaller infarct size in ISO+L-2286-treated compared to ISO-treated animals.

3. Our study investigating how PARP inhibition interferes with the progression of postinfarction heart failure found that L-2286 exerted a beneficial effect on the postinfarction remodeling by

attenuating the inadequate myocardial hypertrophy and interstitial deposition of type III collagen in the failing hearts, which induce tissue stiffness, adversely affect myocardial viscoelasticity, and can exhaust the coronary blood flow reserve. Cardiac hypertrophy and failure can also be characterized by severe dysfunction of mitochondrial energy and substrate metabolism involving impaired mitochondrial function, decline in high-energy phosphates, reduced oxygen consumption and decreased tissue content and activity of complex I through IV of the respiratory chain. Similar to literature data, the activity of complex I to III (NADH:cytochrome c oxidoreductase) has dropped in our heart failure model accompanied with unaltered expression of either complex I (43, 53, 70 subunit) or pyruvate dehydrogenase complex ( $\alpha$  subunit). Since the dysfunction of these enzymes is mainly attributed to posttranslational inactivation by reactive oxygen species, this event was efficiently prevented by PARP inhibition. The elevated plasma BNP concentration that specifically signals impaired left ventricular function and chronic heart failure was moderated by L-2286 treatment in the postinfarcted animals.

4. This study demonstrated for the first time that PARP inhibitors could promote Akt, ERK and p38-MAPK activation during cardiac ischemia-reperfusion in *ex vivo* and *in vivo* models of myocardial reperfusion injury. We found enhanced L-2286-triggered Akt and GSK-3 $\beta$  phosphorylation not only in isolated hearts, but also in isoproterenol-induced cardiac injury. To our knowledge, this is the first *ex vivo* and *in vivo* report, which attributes a critical role to Akt in the cardioprotection afforded by PARP inhibitors. L-2286 administration further increased Akt activation independently of cardiac injury, presumably exerting antiapoptotic and favorable metabolic effects. L-2286 also promoted ERK phosphorylation in both *ex vivo* and *in vivo* ischemia-reperfusion, that may also contribute to cardiac myocyte survival. The enhanced phosphorylation of p38 MAPK induced by L-2286 treatment observed in both models might be also cardioprotective under certain conditions. Finally PARP inhibition treatment reduced the isoproterenol-induced JNK phosphorylation in the *in vivo* ischemia-reperfusion model.

5. In this study eight weeks after myocardial infarction heart failure following ISO injections upregulated GSK-3 $\beta$  phosphorylation, which correlated with the activation of several PKC isoforms rather than that of Akt. Among others protein kinase C has been implicated in cardiac hypertrophy, commonly phosphorylating, thereby suppressing the antihypertrophic activity of GSK-3 $\beta$ . Most importantly, PARP inhibition in the infarcted hearts simultaneously mitigated both GSK-3 $\beta$  and PKC phosphorylation. Since GSK-3 $\beta$  can integrate a variety of antihypertrophic signals and transmit them to NF-AT and c-Jun, the L-2286-induced PKC-mediated GSK-3 $\beta$  activation may have contributed to the rescue of failing hearts in our experimental model. By contrast, no increase in ERK1/2 and JNK activity was found in the heart samples, but a two-fold elevation in Akt and p38-MAPK phosphorylation was seen. Notably, upon L-2286 administration these kinase activities remained unaltered.

## 5. CONCLUSIONS

In conclusion, this study first demonstrates that PARP inhibition can beneficially influence the protein kinase signaling in isolated ischemic-reperfused hearts and isoproterenol-induced myocardial infarction by promoting Akt, ERK and p38-MAPK, but suppressing JNK activity. It is also the first report on changes in intracellular signaling during isoproterenol-induced myocardial infarction. Furthermore this work also provides evidence for the first time that PARP inhibition can halt the progression of cardiac hypertrophy into failure partially by promoting GSK-3 $\beta$  activity via direct or indirect interruption of upstream protein kinase C signaling. Finally PARP inhibition is also reported to protect against cellular changes in the postinfarcted myocardium such as fibrosis, cardiomyocyte hypertrophy, mitochondrial dysfunction and fetal gene expression. The PARP inhibition-induced alterations in intracellular signaling upon myocardial ischemia-reperfusion and postinfarction ventricular remodeling further challenge the original dogma that protection by PARP inhibitors exclusively rely on the preservation of NAD<sup>+</sup> as well as ATP stores.

## ACKNOWLEDGEMENTS

These studies were carried out at the Department of Biochemistry and at the First Department of Medicine, Medical School of the University of Pécs between 2002 and 2005.

I want to express my thanks to my teacher and project leader, Professor Kálmán Tóth, who managed my studies and gave a support and useful advises during my work.

I want to express my thanks to Professor Balázs Samegi, who taught me a biochemical way of thinking. He directed my work on the field of PARP inhibitors and he ensured the possibility of undisturbed work in his department for me.

I am really thankful to Professor Kálmán Hideg who taught me enthusiastic on free radical mediated processes and directed my work on the field of cardioprotective effects of PARP inhibitor compounds.

I convey my thanks to Erzsébet Oszl and Zoltán Berente for their excellent help to perform NMR evaluation of cardioprotective compounds.

Dr. Róbert Halmosi, Dr. Eszter Szabados, Dr. Ámbros Tóth, Dr. Péter Deres, Dr. Karalán Hamó and Dr. Zoltán Szereday gave a hand with a part of the experiments. I am grateful to Istváné Pásztor, Heléna Halász, Bertalan Horváth and László Girán, who gave much assistance in the laboratory work.

I express my gratitude and thanks to my friends for their encouraging support during my studies and work.

AZ INTRACELLULÁRIS JELÁTVITTEL SZEREPE A POLI(ADP-RIBÓZ)

POLIMERÁZ ENZIM GÁTLÓK KARDIOPROTEKTÍV

HATÁSMECHANIZMUSÁBAN

Ph.D. tézisek

Dr. Pálfi Anita

Programvezető: Prof. Dr. Tóth Kálmán

Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar

I. sz. Belgyógyászati Klinika

Pécs

2006

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

BNP	B-típusú nátriumretikus peptid
CK	kreatin kináz
ERK1/2	extracelluláris jel-regulálta kináz
GSK-3 $\beta$	glükogén szintáz kináz-3 $\beta$
ISO	izoproterenol
JNK	c-jun N-terminális kináz
LDH	laktát dehidrogenáz
MAPK	mitogén aktiválta protein kináz
NAD <sup>+</sup>	nicotinamin adenin dinucleotid
NIH	National Institutes of Health
NMR	nukleáris mágneses rezonancia
PARP	poli(ADP-ribose) polimeráz
PI3K	foszfatidil inozitol-3-kináz
PKC	protein kináz C

## 1. BEVEZETÉS

A poli(ADP-ribose) polimeráz (PARP) enzim aktivációja fontos szerepet játszik az oxidatív stressz által kiváltott sejt-diszfunkció és szöveti károsodások kialakulásában. A miokardiális iszkémia-reperfúzió során képződött reaktív oxigén és nitrogén szabadgyökök lipid peroxidációt, fehérje oxidációt és DNS-törést okozhatnak. Az egyes-szájú DNS törések azután aktiválják a nukleáris PARP enzimet, mely a sejten található NAD<sup>+</sup>-ot hasítva különböző fehérjék ribozilációját katalizálja. Ha az enzim működése kóros mértékben fokozódik, ez a sejt NAD<sup>+</sup> és ATP raktárainak kimerüléséhez, ezáltal sejthalálhoz vezethet. Számos tanulmány bizonyította már, hogy a PARP enzim gátlása csökkenti a miokardiális iszkémia-reperfúzió okozta károsodásokat mind izolált szíverfúziós modelleken, mind in vivo miokardiális infarktusban, sőt bizonyított a PARP gátlók kardioprotektív hatása az infarktus követő szívelégtelenségben is.

Legújabb tanulmányok azonban, úgy tűnik, megdöntik azt az eredeti elképzelést, miszerint a PARP gátló szerek kizárólagos hatásmechanizmusa a sejt NAD<sup>+</sup> és ATP raktárainak megővésén alapul. Ezen tanulmányok szerint a PARP enzim farmakológiai gátlása vagy hiánya befolyásolhatja a sejtben zajló géneexpressziós és jelátviteli folyamatokat. Manapság azonban még kevés információ áll rendelkezésre azt illetően, hogy az enzim gátlása miként hat a szívrozom intracelluláris jelátviteli folyamataira iszkémia-reperfúzió alatt, vagy a szívinfarktus követően kialakuló szívelégtelenség során.

### PROTEIN KINÁZ KASZKAD RENDSZER ÉS OXIDATÍV STRESSZ

A sejtet érő oxidatív hatások számos protein kináz kaszkád aktivitását befolyásolhatják, melyek felelősek a sejt túléléséért, vagy a sejtihalálért. A foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI3K)-Akt és a mitogén aktiválta protein kináz (MAPK) (azaz az extracelluláris jel regulálta kináz (ERK1/2), a c-jun N-terminális kináz (JNK) és a p38-MAPK) jelátviteli fehérjék aktiválása jelentősen megváltozik oxidatív stressz hatására, így felelősek lehetnek a sejtihalál kialakulásáért. Míg az Akt és ERK fehérjéknek elsősorban antiapoptotikus, sejtvédő szerepet tulajdonítanak, addig a JNK és p38-MAPK fehérjék aktiválása inkább az apoptózis irányába mozdítja elő az intracelluláris folyamatokat, bár ezen fehérjék proapoptotikus hatása a sejtet érő stimulustól és a sejtípustól függően változhat.

Ismert tény, hogy miokardiális infarktus követően a maradék szívrozom átépülése következik be. Az ún. remodeling komplex folyamat, magában foglalja a szívrozom inadekvát hipertrofiáját, az intercelluláris matrixban kóros fehérjék lerakódását és egyéb metabolikus, géneexpressziós változásokat. Szintén számos jelátviteli útvonal aktiválásával jár. A glükogén szintáz kináz-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) (amely fehéjtét az Akt, protein kináz C (PKC), p70-S6 kináz, p90-RSK és a protein kináz A fehérjék is foszforilálhatják, azaz inaktiválhatják) és a MAPK fehérjék aktivációs állapota egyaránt megváltozik



hypertophias stimulusok hatására. Ezek foszforilációja elősegíteti a szívtizom sejtek körös hipertrofiáját.

Tekintettel arra, hogy egy korábbi tanulmány már igazolta, hogy a P-ARP gátlás szepikus sokkos állammóellen megváltoztatja az Akt fehérje aktivációját, csökkentette a lipopoliszacharid indukálta ERK1/2, p90RSK és p38-MAPK foszforilációt, felmerült annak lehetősége, hogy ezekre az útvonalakra (melyeknek döntő szerepük van a miokardiális iszkémia-reperfúzió, vagy a szívtizom hipertrofia folyamataiban is) miokardiális oxidatív körkötpekben a P-ARP gátló kezelés kedvező hatással lehet.

#### KISÉRLETES ÁLLATMODELLEK

A P-ARP gátlók kardioprotektív hatásmechanizmusának vizsgálatára három kísérletes állatmodellt alkalmaztunk. Elsőként in vitro Langendorff perfúziós rendszeren vizsgáltuk a miokardiális anyagcsere normalizálódását iszkémia-reperfúzió követően, majd a P-ARP gátló szer hatását izoproterenol (ISO) által kiváltott szívtizom-infarctusban követük nyomon. Végül a vegyületet izoproterenol kiváltotta akut szívtizom nekrotízist követően krónikus szívtelenségben alkalmaztunk. Mint tudjuk, a béta-adrenoceptor agonista izoproterenol szubkután alkalmazása megartott koronária keringés mellett kiterjedt szívtizomszeji elhalást vált ki, melynek mértéke a transzmurális infarctusú a foltokban előforduló szubendokardialis nekrotízisig változhat.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

A tanulmányban vizsgálni kívántuk, hogy a P-ARP gátlók a már régóta ismert elsődleges hatásmechanizmusokon kívül befolyásolják-e az intracelluláris jelátviteli kaskádok aktivációs állapotát, ezzel is hozzájárulva a szívtizom védelméhez.

### 1. A P-ARP GÁTLÓK KARDIOPROTEKTÍV HATÁSÁNAK MEGÍTÉLÉSÉRE

a) Vizsgáltuk egy új, kinazolín-származék, az L-2286 nevű P-ARP gátló hatását a szívtizom anyagcsere normalizálódására iszkémia-reperfúzió követően in vitro Langendorff szívtelenségi rendszerben.

b) Szérum nektroenzimek és az infarctusos terület meghatározásával vizsgáltuk, hogy az L-2286 csökkenti-e az izoproterenol-indukálta miokardiális nekrotízist patkányokban.

c) Szöveti és metabolikus paraméterek vizsgálatával monitoroztuk a P-ARP gátlás védő hatását az infarctust követően kialakuló remodeling folyamataira szívtelenségi állatmodellen.

2. A P-ARP gátlók járulékos hatásmechanizmusának megítélése céljából olyan jelátviteli útvonalakat vizsgáltunk Western blot módszer segítségével, melyek meghatározzák a sejt túlélését/sejthalált, illetve a szívtizom hipertrofiára befolyással bírnak. Vizsgáltuk tehát a

- a) PI3-kináz/Akt
- b) protein kináz C
- c) és a MAPK kaskád fehérjéinek aktivációs állapotát.

## 3. MÓDSZEREK

### 3.1 SZÍVTELENSÉGI MODELL

Felölt 300-380 g-os CFY Sprague-Dawley patkányok szívét Langendorff-perfúziós rendszerben perfundáltuk foszfát-mentes Krebs-Henseleit oldatban (118 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, 25 mM CaHCO<sub>3</sub>, 11 mM glükóz, 0,6 mM oktanav, Ph: 7,4, 95% oxigén, 5% CO<sub>2</sub>), 10- vagy 20 µM L-2286 jelenlétében vagy anélkül. A tíz perces normoxiás perfúziós periódust 30 perc globális iszkémia, ezt a 15 perces reperfúziós fázis követte, a kísérletes szert normoxia alatt adtuk a perfúzióhoz. A szívetek ezt követően további feldolgozás céljából lefagyaszottuk.

### 3.2 NMR SPEKTROSKÓPIA

A perfúziós során a szívtelenségi foszfátvegyületeinek és az anorganikus foszfát mennyiségének a változását <sup>31</sup>P NMR spektroszkópia módszerrel követük (Varian UNITYNOVA 400 WB készlet, 161,90 MHz, 37°C-on végzett perfúzió, Nalorac Co., Martinez, CA, USA). Spektromokar 3 percenként kapunk (120 transziens átlagból).

### 3.3 LIPID PEROXIDÁCIÓ ÉS FEHÉRJE OXIDÁCIÓ MÉRÉS

Lipidperoxidációt a perfundált szívtelenségi reakciókban a tiobarbitursav reaktív anyagok megjelenésének mértékével végeztük (TBARS módszer) korábban leírt módszer szerint. A szívtelenségi szövetek protein karbonil tartalmát 4%-os perklorosavban történt homogenizációt, centrifugálást követően 2,4-dinitrofenilhidrazin módszerrel határoztuk meg.

### 3.4 IN VIVO MIOKARDIÁLIS INFARCTUS MODELL

Miokardiális infarctust 80 mg/tkg izoproterenol (Sigma-Aldrich Kft, Budapest) szubkután alkalmazásával indukáltunk, a kontroll csoport fiziológias sóoldatot kapott intraperitoneálisan. Az izoproterenolt kapott állatok egyik fele ezt követően csak fiziológias sóoldatot kapott, a másik fele az izoproterenol előtti 10 perccel 10 mg/tkg, majd ezt követően 5 óráig keresztl

óránként 3 mg/tkg L-2286-ot kapott. A kísérlet kezdetén és az izoprotenerol alkalmazását követően 5 órán keresztül óránként EKG felvételeket készítettünk. Western blot vizsgálat céljából különböző időpontokban mélyfagyaszottuk az állatok szívét.

### 3.5 INFARKTUSOS TERÜLET MEGHATÁROZÁSA

24 órával az infarktust követően az állatokkal találtak, szívüket lefagyaszottuk 12 órára -20 °C-on. Trifeni-neutrózium klorid módszerrel festettük meg a szívizom szövetet, az infarktusos terület meghatározása „volume/weight” módszerrel történt.

### 3.6 SZÉRUM NEKROENZIM MEGHATÁROZÁS

Standard módszerekkel mértük a szérumban laktát dehidrogenáz (LDH) és kreatin kináz (CK) enzimek szintjét 24 órával az infarktust követően.

### 3.7 KRÓNIKUS SZÍVELÉGTELEN ÁLLATMODELL

Fehérről 350-380 g-os CFY Sprague-Dawley patkányok 24 óráig különböző mennyiségű két alkalommal fiziológiás sóoldatot vagy szubkután izoprotenerolt kaptak 80 mg/tkg dózisban. A második oldatot követően 24 óra múlva az izoprotenerolt kaptak állatok egy része napi 5 mg/tkg L-2286-ot kapott ivóvízben feloldva, az állatok másik felének csapvizet adtunk. A kísérletet 8 héten át folytattuk. Ezt követően EKG-t készítettünk, a végtagi elvezetésekben R hullám amplitúdót és J-pont elterést néztünk. Az állatokkal találtak, a szívet eldávoltottuk, lemértük a szívkamrák össztömegét, a testtömeget, a jobb v. bal hosszát, majd szív-/testtömeg és szív-tömeg/tbba hossz arányokat számoltunk. A szívet vagy lefagyaszottuk, vagy 10%-os formalinban fixáltuk.

### 3.8 PLAZMA B-TÍPUSÚ NÁTRIURETIKUS PEPTID (BNP) MEGHATÁROZÁS

Az állatok véréből EDTA-t tartalmazó vérvételi csövekbe gyűjtöttük, proteáz gátló aprotinint adtunk hozzá (0,6 TIU/ml vér), lecentrifugáltuk (4°C, 1600 g, 15 perc). A plazma B-típusú natriuretikus peptid szintjét ELISA technikával határoztuk meg (BNP-45, Rat EIA Kit, Phoenix Pharmaceuticals Inc., CA, USA).

### 3.9 MITOKONDRIALIS ENZIMAKTIVITÁS MÉRÉS

NADH:citokrom-c oxidoreduktáz aktivitást jól ismert módszerrel mértük. A citokrom-c redukció változást 550 nm hullámhosszon mértük, 7,5 pH-jú, 50 mM Na-foszfát, 1 mM Na-azid, 1,5 mM NADH és 50-75 µg mitokondriális fehérjét tartalmazó oldatban, ebből kiszámítottuk az enzimaktivitást.

### 3.10 SZÖVEGTANI VIZSGÁLATOK

A formalinban fixált szívműveket felszeleteltük, paraffinba ágyaztuk, 5 µm vastag metszeteket készítettünk a szívcsücsőtől a bázisig, mm-enként, majd hematoxilín-eozinnal festettük. 40x nagyításon vizsgálva sejtméretüket számoltuk a TelPath számítógépes programmal (bollman.com, 2000). III. típusú kollagén meghatározása céljából 5 µm vastag fagyaszott metszeteket készítettünk. Vector M.O.M™ Kit (Vector Laboratories, CA, USA) segítségével készítettük metszeteinket. Primer egér III-típusú kollagén antitestet használtunk 1:1000 hígításban (Monoclonal Anti-Collagen, Type III, Sigma-Aldrich Kft. Budapest). Biotinilált anti-egér IgG reagens, majd Vector NOVARED Substrate felhasználásával festettük metszeteinket. 10x nagyítással az intercellulárisan megfestődött III. típusú kollagén mennyiségét NIH ImageJ programmal kvantifikáltuk.

### 3.11 WESTERN BLOT VIZSGÁLATOK

Örven mg szívizom szövetet Tris pufferben homogenizáltuk, 2x SDS-poliakrilamid géli elektroforézis pufferrel elegyítettük. 12 %-os SDS poliakrilamid gélen történt elektroforézis után nitrocellulóz membránra blotoltuk fehérjéinket. Blokkolást követően membránjainkat 4°C-on éjszaka 48 óráig inkubáltuk a következő antigénekkel felismerő antitestekkel: foszfo-szpecifikus Akt-1/protein kináz B-α Ser<sup>473</sup> (1:1000), nem foszforilált Akt/PKB (1:1000), foszfo-szpecifikus glükogén szintáz kináz (GSK)-3β Ser<sup>9</sup> (1:1000), foszfo-szpecifikus extracelluláris jel-reguláló kináz (ERK1/2) Thr<sup>183</sup>-Tyr<sup>185</sup> (1:1000), foszfo-szpecifikus p38 mitogén-aktiváló protein kináz (p38-MAPK) Thr<sup>180</sup>-Gly-Tyr<sup>182</sup> (1:1000), foszfo-szpecifikus c-Jun N-terminális kináz (JNK) (1:1000), foszfo-szpecifikus protein kináz C (PKC) (pan) BII Ser<sup>600</sup> (1:1000), foszfo-szpecifikus protein kináz C α/βII (PKCα/βII) Thr<sup>630/641</sup> (1:1000), foszfo-szpecifikus protein kináz C δ Thr<sup>305</sup> (1:1000), foszfo-szpecifikus protein kináz C δ Ser<sup>443</sup> (1:1000), Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), nem foszforilált PKC (1:1000), Aktin N-terminális domain (1:10000), Sigma-Aldrich Kft., Budapest). Anti-nyúl torna peroxidázal konjugált szekunder antitestet 1:3000 hígításban használtunk, kemilumineszcencia módszerrel vizualizáltuk a jelölt fehérjéket. A Western blot eredményeket NIH ImageJ programmal kvantifikáltuk.

### 3.12 STATISZTIKA

Variancia analízist használtunk, az eredményeket átlag és standard szórással megadással fejeztük ki. Szignifikanciát párosítatlan Student t-tesztrel számoltunk, szignifikánsnak a 0,05-nél kisebb p értéket tekintettük.

#### 4. ÖSSZEFOGLALÁS

1. Tanulmányunkban a vizsgált új PARP gátló vegyület, az L-2286 kedvezően befolyásolta a szívtrombancsereget iszkémiát követő normalizálódását *in vivo* Langendorff-szívtrombancsereget rendszerben. <sup>31</sup>P NMR spektroszkópia alkalmazásával kimutatható volt, hogy a PARP enzim gátlása elősegítette a nagy energiájú foszfát-vegyületek felépülését és az anorganikus foszfát gyors beépülését szívtrombancsereget követően. A szöveti lipid peroxidáció és a fehérje oxidáció meghatározása alapján tapasztaltuk, hogy a metabolikus paraméterek javulásával párhuzamosan a szívtrombancsereget követő oxidatív károsodás szintén szignifikánsan csökkent a PARP gátló kezelés hatására.

2. Hasonlóan Langendorff-szívtrombancsereget rendszerben kapott eredményeinkhez *in vivo* állatkísérletes modellben (izoproterenol indukálta miokardiális infarktusban) az általunk vizsgált PARP gátló vegyület szintén szignifikánsan csökkentette a szívtrombancsereget követő oxidatív károsodását, melyet az L-2286-tal kezelt csoportban mérték alacsonyabb szívtrombancsereget (LDH, CK) szintek és a jelentősen csökkent nekrotikus szívtrombancsereget terület meghatározása alapján mondhatunk ki.

3. Krónikus szívtrombancsereget állatoknál PARP gátló kezelést követően azt tapasztaltuk, hogy a kezelés hatására csökkent a szívtrombancsereget követő káros hipertrofiája és a III. típusú kollagén intersticiális deposíciója, amik a szívtrombancsereget követő káros hipertrofiája és a III. típusú kollagén intersticiális deposíciója magában foglalja azonban a mitokondriális anyagcsere súlyos károsodását, a nagy energiájú foszfát raktárak kimerülését, a csökkent oxigénfogyasztást és tépányag hasznosítást is, csökken a mitokondriális enzimnek mennyisége és aktivitása is. Ezen ismert eltéréseknek megfelelően a szívtrombancsereget követően állatokban mérték NADH:citokrom-c oxidoreduktáz aktivitás jelentős csökkenését észleltük, a vizsgált lézetsi láncban részt vevő és egyéb fehérjék megtartott mennyisége ellenére. A mitokondriális enzimnek diszfunkcióját elsősorban posztranszlációs oxidatív károsodás következményének tarthatjuk, azonban a PARP gátló kezelés szignifikánsan mérsékelte az enzimnek aktivitásában megfigyelhető, krónikus oxidatív stressz okozta csökkenést. Végül a szívtrombancsereget követően kialakuló balkamrai diszfunkciót jelző plazma B-típusú nátriumionok peptid szintjét az L-2286 kezelés szintén jelentősen csökkentette.

4. Kísérleteinkkel először mutattuk ki, hogy a PARP gátlók elősegítik az Akt, ERK és p38-MAPK fehérjék aktiválódását iszkémiareperfúzió körülményei között mind *ex vivo* mind *in vivo* kísérletes körülmények között. Az Akt és GSK-3 $\beta$  fehérjék fokozott foszforilációját találtuk nemcsak izolált szívtrombancsereget követően, hanem izoproterenol-indukálta miokardiális infarktusban is. Ez az első tanulmány, mely igen kiemelkedő kardioprotektív hatást tulajdonít az *ex vivo* és *in vivo* kísérletes körülmények között

megfigyelhető PARP gátlás indukálta Akt aktivációnak. Ezekben a kísérletes modellekben az L-2286 a kedvező metabolikus és antiapoptikus hatásairól ismert Akt fehérje oxidatív inzulins okozta aktivációját tovább fokozta. Az L-2286 szintén elősegítette az ERK1/2 fehérje foszforilációját *ex vivo* és *in vivo* modellekben, amely hatás szintén szignifikánsan hozzájárult a szívtrombancsereget követő túléléshez. A p38-MAPK fehérje L-2286 által kiváltott fokozott foszforiláltsága mindkét modellben kardioprotektív hatású lehet. Végül kimutattuk *in vivo* modellben, hogy a PARP gátlás csökkentette a proapoptikus hatású JNK izoproterenol által kiváltott aktivációját.

5. Ebben a tanulmányban 8 hetel miokardiális infarktus után a GSK-3 $\beta$  fehérje fokozott foszforilációját találtuk a szívtrombancsereget követően, mely elsősorban a PKC fehérjék aktivációs állapotával függött össze, minsem az Akt fehérjével. Számos egyéb fehérje mellett a PKC fehérje több izoenzimje szerepet játszhat a szívtrombancsereget követő hipertrofiára kialakulásában, melyek az antihipertrofiás hatású GSK-3 $\beta$  fehérjét foszforilálják, ezáltal inaktíválják. A PARP gátlás kísérletes modellünkben mind a PKC, mind a GSK-3 $\beta$  fehérjét foszforilálta. Az antihipertrofiás jeleket integráló és azokat a NF- $\kappa$ B, c-Jun és egyéb fehérjék fele továbbító GSK-3 $\beta$  fehérje PKC mediálta aktiválása jelentősen hozzájárulhatott a szívtrombancsereget követő progressziójának gátlásához. Kísérleteinkben a PARP gátlás azonban nem bír jelentős befolyással az ERK1/2, JNK, p38-MAPK fehérjék foszforiláltsági állapotára.

#### 5. KÖVETKEZTETÉSEK

Összefoglalásul elmondható, hogy tanulmányunk igazolta először, hogy a PARP enzim gátlása kedvezően befolyásolhatja a protein kináz rendszer aktivitását izolált szívtrombancsereget követő káros hipertrofiája és a III. típusú kollagén intersticiális deposíciója magában foglalja azonban a mitokondriális anyagcsere súlyos károsodását, a nagy energiájú foszfát raktárak kimerülését, a csökkent oxigénfogyasztást és tépányag hasznosítást is, csökken a mitokondriális enzimnek mennyisége és aktivitása is. Ezen ismert eltéréseknek megfelelően a szívtrombancsereget követően állatokban mérték NADH:citokrom-c oxidoreduktáz aktivitás jelentős csökkenését észleltük, a vizsgált lézetsi láncban részt vevő és egyéb fehérjék megtartott mennyisége ellenére. A mitokondriális enzimnek diszfunkcióját elsősorban posztranszlációs oxidatív károsodás következményének tarthatjuk, azonban a PARP gátló kezelés szignifikánsan mérsékelte az enzimnek aktivitásában megfigyelhető, krónikus oxidatív stressz okozta csökkenést. Végül a szívtrombancsereget követően kialakuló balkamrai diszfunkciót jelző plazma B-típusú nátriumionok peptid szintjét az L-2286 kezelés szintén jelentősen csökkentette.

Összefoglalásul elmondható, hogy tanulmányunk igazolta először, hogy a PARP enzim gátlása kedvezően befolyásolhatja a protein kináz rendszer aktivitását izolált szívtrombancsereget követő káros hipertrofiája és a III. típusú kollagén intersticiális deposíciója magában foglalja azonban a mitokondriális anyagcsere súlyos károsodását, a nagy energiájú foszfát raktárak kimerülését, a csökkent oxigénfogyasztást és tépányag hasznosítást is, csökken a mitokondriális enzimnek mennyisége és aktivitása is. Ezen ismert eltéréseknek megfelelően a szívtrombancsereget követően állatokban mérték NADH:citokrom-c oxidoreduktáz aktivitás jelentős csökkenését észleltük, a vizsgált lézetsi láncban részt vevő és egyéb fehérjék megtartott mennyisége ellenére. A mitokondriális enzimnek diszfunkcióját elsősorban posztranszlációs oxidatív károsodás következményének tarthatjuk, azonban a PARP gátló kezelés szignifikánsan mérsékelte az enzimnek aktivitásában megfigyelhető, krónikus oxidatív stressz okozta csökkenést. Végül a szívtrombancsereget követően kialakuló balkamrai diszfunkciót jelző plazma B-típusú nátriumionok peptid szintjét az L-2286 kezelés szintén jelentősen csökkentette.

## KÖSZÖNETNYILVÁNTÁS

Ph.D. tanulmányaimat a PTE ÁOK Biokémiai- és Orvosi Kémiai Intézetben valamint az I. sz. Belgyógyászati Klinikán végeztem 2002 és 2005 között.

Mindenekelőtt témavezetőmnek, Dr. Tóth Kálmán Professor Úrnak szeretném hálámat kifejezni, aki irányított, támogatott munkámban és hasznos tanácsokkal látott el.

Köszönettel tartozom Simegi Balázs Professor Úrnak, aki biokémiai szemléletmódra tanított engem. Felkelte érdeklődésemet a PARP gátlók iránt, és lehetővé tette számomra, hogy intézetben nyugodt, oldott légkörben végzhessem kísérleteimet.

Ezúton szeretném hálámat kifejezni Hídeg Kálmán Professor Úrnak, akinek a szabaddíjűkös reakciók, és PARP gátló vegyületek kémiai természetének jobb megismerését köszönhetem.

Köszönöm Ösz Erzsébetnek<sup>1</sup> és Berente Zoltánnak, hogy készségesen segítettek az NMR műszerrel végzett vizsgálatokban.

Dr. Halmosi Róbert, Dr. Szabados Eszter, Dr. Tóth Ámbusz, Dr. Deres Péter, Dr. Hantó Katalin és Dr. Szereday Zoltán igen sok segítséget nyújtottak számos feladat megoldásában. Külön köszönet illeti Pásztor Istvánét, Halmos Helénát, Horváth Bertalant és Girán Lászlót, akik asszisztenciájukkal járultak hozzá munkám eredményességéhez.

Végezetül, de nem utolsósorban házával tartozom barátaimnak, akik mindvégig mellettem álltak és támogatták tanulmányaimat.

## PUBLICATION OF THE AUTHOR

### Additional papers

SZAPÁRY L, SZÓTS M, HORVÁTH B, MÁRTON Z, ALEXY T, KESMÁRKY G, JURICSKAY I, NAGY F, GAAL V, PÁLELA, KOLTAI K, TÓTH K. [Effects of cardiovascular risk factors on hemorheologic parameters in cerebrovascular patients] *Orv Hetil* 144, 1085-90, 2003.

BOGAR L, TÓTH K, JURICSKAY I, KESMÁRKY G, PÁLELA. Az áramlási szempontból optimális hematokritérték meghatározása. *Transzfúzió* 36, 13-18, 2003.

ALEXY T, STEF GY, MÁRTON ZS, HORVÁTH B, KOLTAI K, PÁLELA, FEHÉR G, BÓCSA Z, PUSCH G, SZAPÁRY L, KESMÁRKY G, VERESS G, TÓTH K. A rutinszerűen alkalmazott tromboitica aggregáció gátló kezelés hatékonyságának felmérése érterekben. *Kardiológus* 2, 5-24, 2003.

SZAPÁRY L, HORVÁTH B, MÁRTON Z, ALEXY T, KESMÁRKY G, SZÓTS M, PUSCH G, GAAL V, PÁLELA, KOLTAI K, JURICSKAY I, TÓTH K. A krónikus ischaemiás agyérterek haemoreológiai jellemzői. *Agyérbetegségek* 9, 2-7, 2003.

DERES P, HALMOSI R, TÓTH A, KOVACS K, PÁLELA, HABON T, CZOPF L, KALAI T, HIDEG K, SUMEGI B, TÓTH K. Prevention of doxorubicin-induced acute cardiotoxicity by an experimental antioxidant compound. *J Cardiovasc Pharmacol* 45, 36-43, 2005. (IF: 1,313)

KALAI T, VÁRBIRÓ G, BOGNÁR Z, PÁLELA, HANTÓ K, BOGNÁR B, ÖSZ E, SÜMEGI B, HIDEG K. Synthesis and evaluation of the permeability transition inhibitor characteristics of paramagnetic and diamagnetic amiodarone derivatives. *Bioorg Med Chem* 13, 2629-36, 2005. (IF: 2,478)

PÁLELA, TÓTH A, KULCSÁR G, HANTÓ K, DERES P, BARTHA É, HALMOSI R, SZABADOS E, CZOPF L, KALAI T, HIDEG K, SÜMEGI B, TÓTH K. The role of Akt and MAP kinase systems in the protective effect of PARP inhibition in Langendorff perfused and in isoproterenol damaged rat hearts. *J Pharmacol Exp Ther* 315, 273-282, 2005. (IF: 4,098)

PÁLELA, TÓTH A, HANTÓ K, DERES P, HALMOSI R, SZABADOS E, SZEREDAY Z, KULCSÁR G, KALAI T, HIDEG K, SUMEGI B, TÓTH K. PARP inhibition prevents postinfarction myocardial

remodeling and heart failure via the protein kinase C/glycogen synthase kinase-3 $\beta$  pathway. *J Mol Cell Cardiol* 41, 149-59, 2006. (IF: 3,872)

BOGNAR Z, KALAI T, PÁLELA HANTO K, BOGNAR B, MARK L, SZABO Z, TAPODI A, RADNAI B, SÁRSZEGI Z, SZANTO A, GALLYAS F JR, HIDEG K, SÜMEGI B, VÁRBIRO G. A novel SOD-mimetic permeability transition inhibitor agent protects ischemic heart by inhibiting both apoptotic and necrotic cell death. *Free Radic Biol Med* 41, 835-48, 2006. (IF: 4,971)

#### Published abstracts

DERES P, TÓTH A, HALMOSI R, KOVÁCS K, PÁLELA HABON T, SÜMEGI B, TÓTH K. Doxorubicin okozta akut kardiotoxicitás kivédése poli(ADP-ribóz) polimeráz gátló vegyülettel Magyar Kardiológusok Társasága 2003. évi Tudományos Kongresszusa, 2003. május 14-17., Balatonfüred, Card. Hung. Suppl. 2, 33, A63, 2003.

TÓTH A, KOVÁCS K, DERES P, PÁLELA HANTÓ K, HALMOSI R, HIDEG K, SÜMEGI B, TÓTH K. Antioxidáns vegyületek hatása az Akt protektív jelátviteli út aktiválására myocardialis ischaemia-reperfúzió során. Magyar Kardiológusok Társasága 2003. évi Tudományos Kongresszusa, 2003. május 14-17., Balatonfüred, Card. Hung. Suppl. 2, 33, A29, 2003.

ALEXY T, TÓTH A, MÁRTON ZS, HORVÁTH B, KOLTAI K, PÁLELA KÉSMÁRKY G, HIDEG K, SÜMEGI B, TÓTH K. Poli(ADP-ribóz) polimeráz gátlók trombocita aggregáció gátló hatásának vizsgálata. Magyar Kardiológusok Társasága 2003. évi tudományos Kongresszusa, 2003. május 14-17., Balatonfüred, Card. Hung. Suppl. 2, 33, A63, 2003.

TÓTH A, KOVÁCS K, DERES P, PÁLELA HANTO K, HALMOSI R, HIDEG K, SÜMEGI B, TÓTH K. Impact of an antioxidant compound on the activity of the protective Akt pathway during myocardial ischemia-reperfusion. June 22-24, 2003, Strasbourg, France, *Eur J Heart Fail* 2/1, 58-59, 2003.

ALEXY T, STEF GY, MÁRTON ZS, HORVÁTH B, KOLTAI K, PÁLELA, FEHÉR G, BÓCSA Z, PUSH G, SZAPÁRY L, KÉSMÁRKY G, VERESS G, TÓTH K. A rutinszerűen alkalmazott trombocita aggregáció gátló kezelés hatékonyságának felmérése érbetegekben. A Magyar Belgyógyász Társaság 50. Nagygyűlése, 2003. június 26-28., Pécs, Magyar Belorv. Arch. Suppl. 1, 24, 370, 2003.

TÓTH K, TÓTH A, HALMOSI R, SZABADOS E, HABON T, DERES P, PÁLELA, SÜMEGI B, HIDEG K. Az oxidatív stressz szerepe a kardiovaszkuláris betegségekben – Az antioxidánsok és poli(ADP-ribóz) polimeráz gátlók lehetséges terápiás alkalmazása. Magyar Belgyógyász Társaság Dunántúli Szekciójának 50. Vándorgyűlése, 2003. június 26-28., Pécs, Magyar Belorv. Arch. Suppl. 2, 110-111, 2003.

MÁRTON ZS, ALEXY T, KOLTAI K, HORVÁTH B, PÁLELA, GYEVNAR ZS, FEHÉR G, KESMARKY G, TÓTH K. Examination of drug effects in "in vitro" rheological models. 12<sup>th</sup> European Conference on Clinical Hemorheology, June 22-26, 2003, Sofia, Bulgaria. Abstract book 34-35.

SÜMEGI B, KOVÁCS K, TÓTH A, DERES P, PÁLELA. 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.

TÓTH A, ALEXY T, MÁRTON Z, HORVÁTH B, KOLTAI K, PÁLELA, KESMARKY G, KALAI T, HIDEG K, SÜMEGI B, TÓTH K. Inhibition of platelet aggregation by poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. IVth International Symposium on Myocardial Cytoprotection: From basic science to clinical perspectives, September 25-27, 2003, Pécs, Hungary, *J Exp Clin Cardiol* 8, 50, 2003.

KOVÁCS K, DERES P, PÁLELA HANTÓ K, GALLYAS F, SÜMEGI B. Foszfólipid-D által indukált mitokondriális szabadyok képződés. XII. Sejt és Fejlődéshiológiai Kongresszus, 2004. április 16-18., Pécs PÁLELA, TÓTH A, DERES P, HANTÓ K, RESKÓ Á, HALMOSI R, SZABADOS E, SZEREDAY Z, HIDEG K, SÜMEGI B, TÓTH K. Krónikus szívelégtelenség progressziójának lassítása poly(ADP-ribóz) polimeráz gátló vegyülettel paktányban. Magyar Kardiológusok Társasága 2004. évi tudományos Kongresszusa, 2004. május 14-17., Balatonfüred, Card. Hung. Suppl. C, C33, 34, 2004.

KOLTAI K, FEHÉR G, PÁLELA, KÉSMÁRKY G, KALAI T, HIDEG K, SÜMEGI B, TÓTH K. Poli(ADP-ribóz) polimeráz inhibitorok vizsgálata in vitro reológiai modelleken. Magyar Kardiológusok Társasága 2004. évi tudományos Kongresszusa, 2004. május 14-17., Balatonfüred, Card. Hung. Suppl. C, C34, 34, 2004.

DERES P, KISS GY, POZSGAI É, TÓTH A, HALMOSI R, KOVÁCS K, PÁLELA, HIDEG K, SÜMEGI B, TÓTH K. Doxorubicin okozta akut kardiotoxicitás kivédése kísérleti antioxidáns

- vegyülettel Magyar Kardiológusok Társasága 2004. évi tudományos Kongresszusa, 2004. május 14-17., Balatonfüred, Card. Hung. Suppl. C, C66, 34, 2004.
- BOGNÁR Z, VÁRBIRO G, PÁLELA VERES B, TAPODI A, RADNAI B, SÜMEGI B. An amiodarone analogue, HO3538 protects ischemic hearts by inhibiting the mitochondrial apoptotic pathway. 4<sup>th</sup> European Workshop on Cell Death, May 11-16, 2004, Istanbul, Turkey
- PÁLELA TÓTH A, DERES P, HANTÓ K, KOVÁCS K, RESKÓ A, HALMOSI R, SZABADOS E, SZEREDAY Z, HIDEG K, SÜMEGI B, TÓTH K. Effect of poly(ADP-ribose) polymerase inhibition on the prohypertrophic signaling in postinfarction heart failure. FEBS Lecture Course on Cellular Signaling & 4th Dubrovnik Signaling Conference, May 21-27, 2004, Cavtat, Croatia
- DERES P, HANTÓ K, KOVÁCS K, HALMOSI R, PÁLELA KISS GY, RESKÓ A, POZSGAY É, SÜMEGI B, TÓTH K. Akut kardiotoxicitás kivédése poli(ADP-ribóz) polimeráz gátló vegyületei; XXXIV. Membran Transzport Konferencia, 2004. június 1-4., Sümeg.
- VÁRBIRO G, BOGNÁR Z, PÁLELA HANTÓ K, KALAI T, HIDEG K, SÜMEGI B. The effect of anti-oxidant analogues on the mitochondrial apoptotic process. 3<sup>rd</sup> European Conference and Course - Advanced Methods for Industrial production Purification and Characterization of Gene Vectors, June 14-26, 2004, Evry, France
- KOLTAI K, FEHER G, ALEXY T, MARTON ZS, HORVATH B, PÁLELA KESMÁRKY G, KALAI T, HIDEG K, SÜMEGI B, TÓTH K. Effect of poly (ADP) ribose polymerase inhibitors in red blood cell filtration and platelet aggregation models. 7<sup>th</sup> Congress of the ISEM, September 1-4, 2004, Debrecen, Hungary. Abstract book: 125.
- PÁLELA TÓTH A, DERES P, HANTÓ K, HALMOSI R, HIDEG K, SÜMEGI B, TÓTH K. A poly(ADP-ribóz) polimeráz enzim gátlás hatása a jelátviteli folyamatokra szívizom ischaemia-reperfüzió során. Magyar Kardiológusok Társasága 2005. évi Tudományos Kongresszusa, 2005. május 11-14., Balatonfüred, Card. Hung. Suppl. A, A25, 35, 2005.
- PÁLELA TÓTH A, HANTÓ K, HOCSAK E, HALMOSI R, SZABADOS E, HIDEG K, SÜMEGI B, TÓTH K. Contribution of intracellular signaling cascades to the cardioprotective effect of poly(ADP-

ribose) polymerase inhibitors in myocardial ischemia-reperfusion. 30<sup>th</sup> FEBS Congress and 9<sup>th</sup> IUBMB Conference, July 2-7, 2005, Budapest, Hungary, J. FEBS Suppl. 1, 3111, 272, 2005.

KOVÁCS K, PÁLELA BERENTE Z, GALLYAS F, SÜMEGI B. Jelátviteli folyamatok szerepe a poli-(ADP-ribóz) polimerázok gátlószereinek kardioprotektív hatásában. A Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi vándorgyűlése, 2006. augusztus 30-szeptember 2., Pécs, Biokémia 62, 3, 2006.

GALLYAS F, BOGNÁR Z, KALAI T, PÁLELA HIDEG K, SÜMEGI B, VÁRBIRÓ G. Ischemiás szívkárosodások kivédése egy új, SOD-mimeticus mPT-inhibitorral. A Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi vándorgyűlése, 2006. augusztus 30-szeptember 2., Pécs, Biokémia 63, 3, 2006.

PÁLELA TÓTH A, HALMOSI R, SZABADOS E, HIDEG K, SÜMEGI B, TÓTH K. A protein kináz-kaszád rendszer szerepe a poli-(ADP-ribóz) polimeráz-gátlás kardioprotektív hatásmechanizmusában. A Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi vándorgyűlése, 2006. augusztus 30-szeptember 2., Pécs, Biokémia 76, 3, 2006.