

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 $^+$	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	trifluorotetrazolium-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 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-3B (GSK-3B) 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 β-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-merkapto-4(3H)-quinazolinone.

## 2. AIM 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

- We tested whether the novel quinazolinone 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.
- We tested whether L-2286 prevented oxidative myocardial damage during isoproterenol-induced myocardial infarction by determining serum necroenzyme levels and infarct size.
- 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

- PI3-kinase/Akt pathway,
- protein kinase 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 influx and reperfused 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 INNOVA 400 WB instrument. <sup>31</sup>P measurements (161.90 MHz) of perfused hearts were run at 37°C in a ZSPEC in a 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 <sup>1</sup>H signal (w1/2=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 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 CARBONYL 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 NECROENZYME 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 IU/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 ELA 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 TellaPath 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.™ 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.™ mouse IgG blocking reagent (containing 20% normal rat serum), sections were washed in TBS, and incubated in the working solution of M.O.M.™ 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.™ diluent reacted at room temperature for 30 min, followed by two 2-minute rinses in TBS. Biotinylated Anti-Mouse IgG Reagent was applied for 10 min and sections were washed twice for 2 min in TBS. VECTASTATIN 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 BLOD 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>9</sup> (1:1000), phospho-specific extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) Thr<sup>202</sup>-Tyr<sup>204</sup> (1:1000), phospho-specific p38 mitogen-activated protein kinase (p38-MAPK) Thr<sup>180</sup>-Gly-Tyr<sup>182</sup> (1:1000), phospho-specific c-Jun N-terminal kinase (JNK) (1:1000), phospho-specific protein kinase C (PKC) (pan) Bl Ser<sup>660</sup> (1:1000), phospho-specific protein kinase C  $\alpha$ Bl (PKC $\alpha$ /Bl) Thr<sup>656</sup> (1:1000), phospho-specific protein kinase C  $\delta$  Thr<sup>393</sup> (1:1000), phospho-specific protein kinase C  $\delta$  Ser<sup>444</sup> (1:1000; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), nonphosphorylated PKC (1:1000), N-terminal domain of actin (1:1000; 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 Image<sup>+</sup> 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 postischemic 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 (1 $\alpha$  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 pronoting 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 $^+$  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 Sümegi, 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 Erzébet Ösz<sup>†</sup> 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. Katain Hantó and Dr. Zoltán Széreday gave a hand with a part of the experiments. I am grateful to Istvánné Pasztor, 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 JELÁTVITEL SZERÉPE 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

## RÖVIDÍRÉSEK JEGYZÉKE

BNP	B-típusú nátriumretikus peptid
CK	kreatin kináz
ERK1/2	extraceluláris jel-regulálta kináz
GSK-3 $\beta$	glükogén szintáz kináz-3 $\beta$
ISO	izoproterenol
JNK	c-jun N-terminalis kináz
LDH	laktát dehidrogenáz
MAPK	mitogén aktivált protein kináz
NAD $^+$	nicotinamin adenin dinucleotid
NH	National Institutes of Health
NMR	nukleáris magnénes rezonancia
PARP	poli(ADP-ribóz) polimeráz
PI3K	foszfatidil inozitol-3-kináz
PKC	protein kináz C

## I. BEVÉZETÉS

A poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) enzim aktivációja fontos szerepet játszik az oxidatív stressz által kiváltott sejt-diszfunkció és szöveti károsodások kialakulásában. A miokardialis iszkémia-reperfúzió során képződött reaktiv oxigén és nitrogén szabdgörök lipid peroxidációt, fehérje oxidációt és DNS-törést okozhatnaknak. Az egyes-szálú DNS töredék azután aktiválhatják a nukleáris PARP enzimet, mely a sejtbén található NAD $^+$ -ot hasítva különböző fehérjék ribozilacióját katalizálja. Ha az enzim működése kóros mértékben fokozódik, ez a sejt NAD $^+$  és ATP raktárainak kinerüléséhez, ezáltal sejthalálhoz vezethet. Számos tanulmány bizonyította már, hogy a PARP enzim gátolásával csökkeneti a miokardialis iszkémiareperfúzió okozta károsodásokat mind izoltált szivperfúziós modellekben, mind in vivo miokardialis infarktusban, sőt bizonyított a PARP gátlók cardioprotектив hatására az infarktust követő szíveltételestegben is.

Legújabb tanulmányok azonban, úgy tűnik, megdöntik azt az eredeti elkepzelést, miszerint a PARP gátló szerek kizárolagos hatásmechanizmusa a sejt NAD $^+$  és ATP raktárainak megyárásán alapul. Ezen tanulmányok szerint a PARP enzim farmakológiai gátolása vagy hiánya befolyásolhatja a sejtbén zajló géneexpressziós és jelátviteli folyamatokat. Manapság azonban még kevés információ áll rendelkezésre arról illetően, hogy az enzim gátolása miként hat a szívizom intraceluláris jelátviteli folyamataira iszkémia-reperfúzió alatt, vagy a szívinfarktust követően kialakuló szíveltételesteg során.

### PROTEIN KINÁZ KASZKÁD RENDSZER ÉS OXIDATÍV STRESSZ

A sejtek érő oxidatív hatások számos protein kináz kaszkád aktivitását befolyásolhatják, melyek felelősek a sejt túléléséért, vagy a sejthalálért. A foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI3K)-Akt és a mitogén aktivált protein kináz (MAPK) (azaz az extraceluláris jel-regulálta kináz (ERK1/2), a c-jun N-terminalis kináz (JNK) és a p38-MAPK) jelátviteli fehérjék aktivitása jelentősen meg változik oxidatív stressz hatására, így felelősek lehetnek a sejthalál kialakulásáért. Míg az Akt és ERK fehérjék elősorban antiapoptotikus, sejtvédő szerepet tulajdonítanak, addig a JNK és p38-MAPK fehérjék aktivitása inkább az apoptosis irányába mozdítja elő az intraceluláris folyamatokat, bár ezen fehérjék proapoptotikus hatása a sejt ér stimulustól és a sejtípusról függően változhat.

Ismert tény, hogy miokardialis infarktust követően a maradék szívizom átépülése következik be. Az un. remodelling komplex folyamat, magában foglalja a szívizom inadekvát hipertrofiját, az intercelluláris matrixban kóros fehérjék lerakódását és egyéb metabolikus, géneexpressziós változásokat. Szintén számos jelztetői útvonal aktiválódásával jár. A glükogén szintáz kináz-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) (amely fehérjet 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

hypertrofikus stimulusok hatására. Ezek foszforilációja elősegítheti a szívom sejtek körös hypertrofiaját.

Tekintettel arra, hogy egy korábbi tanulmány már igazolta, hogy a PARP gátlás szerepükkel indukálta ERK 1/2, p90RSK és p38-MAPK foszforilációt, felmerült annak lehetősége, hogy ezekre az útvonalakra (melyeknek döntő szerepük van a miokardialis oxidativ körképekben a PARP gátló kezelés kedvező hatásai lehet).

### KÍSÉRLETES ÁLLATMODELLEK

A PARP gátlók kardioprotektív hatásmechanizmusának vizsgálatara három kísérletes állatmodellt alkalmaztunk. Elsöként in vitro Langendorff perfúziós rendszeren vizsgáltuk a miokardialis anyagcsere normalizálódását iszkémia-reperfúziót követően, majd a PARP gátló szer hatásait izoproterenol (ISO) által kiváltott szívizom-infarktusban követtük nyomon. Végül a vegyületek izoproterenol kiáltotta akut szívizom nekrózist követően krónikus szívelégtelenségben alkalmaztuk. Mint tudjuk, a béta-adenoceptor agonista izoproterenol szubkután alkalmazása megtartott koronária keringés mellett kiterjedt szívizomsejti ellálatot vált ki, melynek mértéke a transzmurális infarktustól a föltökben előforduló szubendokardialis nekrózisig változhat.

## 2. CÉLKUTTÍZÉSEK

A tanulmányban vizsgálni kívántuk, hogy a PARP gátlók a már régóta ismert elsődleges hatásmechanizmusukon kívül befolyásolják-e az intracelluláris jelátviteli kiszáradók aktivációs állapotát, ezzel is horzájára a szívizom védelmét.

### 1. A PARP gátlók kardioprotektív hatásának megtérítésére

a) Vizsgáltuk egy új, kinazolin-származék, az L-2286 nevű PARP gátló hatását a szívizom anyagcsere normalizálódására iszkémia-reperfúziót követően in vitro Langendorff szívperfúziós rendszerben.  
b) Szérum nekroenzimek és az infarktus terület meghatározásával vizsgáltuk, hogy az L-2286 csökkenti-e az izoproterenol-indukált miokardialis nekrózist paikányokban.

c) Szovettani és metabolikus paraméterek vizsgálatával monitoroztuk a PARP gátlás védő hatását az infarktust követően kialakuló remodelling folyamatára szívelégtelen állatmodellen.

## 3. MÓDSZEREK

### 3.1 SZÍV PERFÚZIÓS MODELL

Felült 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 doktansav, Ph: 7,4, 95% oxigén, 5% CO<sub>2</sub>) 10- vagy 20 μM L-2286-jelentetében vagy anélküli. A tíz perces normoxiás perfúziós periódust 30 perc globalis iszkémiára, ezt a 15 perces reperfúziós fazis követte, a kísérletes szert normoxia alatt adtuk a perfuzionhoz. A szíveket ezt követően további feldolgozás céljából lefagyaszottuk.

### 3.2 NMR SPEKTROSZKÓPIA

A perfúziós során a szív nagyenergiájú foszfátvegyületeinek és az anorganikus foszfát mennyiségenek változását <sup>31</sup>P-NMR spektroszkópia módszerével követtük (Varian INNOVA 400 WB készülék, 161,90 MHz, 37°C-on végzett perfúzió, Nalorac Co., Martinez, CA, USA). Spektrumokat 3 percentumat kapunk (120 transzszens átlagból).

### 3.3 LIPID PEROXIDÁCIÓ ÉS FEHÉRIE OXIDÁCIÓ MÉRÉS

Lipidperoxidációt a perfundált szív mintákban a tiobarbitursav reaktív anyagok megjelenésének mértével végeztük (TBARS módszer) korábban leírt módszerről. A szívizom szövetei protein karbonil tartalmát 4%-os perklorsavban történt homogenizációt, centrifugálást követően 2,4-dinifrofenülhidrazin módszerrel határoztuk meg.

### 3.4 IN VIVO MIOKARDIALIS INFARKTUS MODELL

Miokardialis infarktust 80 mg/tkg izoproterenol (Sigma-Aldrich Kft, Budapest) szubkután alkalmazásával induktáltuk, a kontroll csoport fiziológiai sóoldatot kapott intraperitoneálisan. Az izoproterenolt kapott állatok egyik fele ezt követően csak fiziológiai sóoldatot kapott, a másik fele az izoproterenol előtt 10 perccel 10 mg/tkg, majd azt követően 5 órán keresztül

2. A PARP gátlók járulékos hatásmechanizmusának meglétése céljából olyan jelátviteli útvonalakat vizsgáltunk Western blot módszer segítségével, melyek meghatározzák a sejti tülelést/segíthetőt, illetve a szívizom hypertrofiára befolyásoló bírásokat. Vizsgáltuk tehát a

- a) PI3-kináz/Akt
- b) protein kináz C

- c) és a MAPK kaskád fehérjének aktivációs állapotát.

óránként 3 mg/tg L-2286-öt kapott. A kísérlet kezdetén és az izoproterenol alkalmazását követően 5 órán keresztül óránként EKG felvételket készítettünk. Western blot vizsgálat céljából különböző időpontokban mélyfagyaszottuk az állatok szívét.

### 3.5 INFARKTUSOS TERÜLET MEGHATÁROZÁSA

24 órával az infarktust követően az állatokat tiláltattuk, szívüket lefagyaszottuk 12 órára -20 °C-on. Trifenil-tetrazolium klóriddal festettük meg a szívizom szövétet, az infarktusos terület meghatározása „volume/weight” módszerrel történt.

### 3.6 SZÉRUM NEKROENZIM MEGHATÁROZÁS

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

### 3.7 KRÓNIKUS SZÍVELEGETELEN ÁLLATMODELL

Felnőtt 350-380 g-os CFY Sprague-Dawley patkányok 24 órás különbséggel két alkalommal fiziológias sooldatot vagy szubkután izoproterenolt kaptak 80 mg/tg dózisban. A második oldalt követően 24 óra múlva az izopoterenolt kapott állatok egy része napi 5 mg/tg L-2286-öt kapott ivóvízben feloldva, az állatok másik részének csapvizeit adtunk. A kísérletek 8 héten át folytattak. Ez követően EKG-t készítettünk, a végtagi elvezetésekben R hullám amplitudót és J-pont eltérését néztük. Az állatokat tiláltattuk, a szíveket eltávolítottuk, lemértek a szívkarúnak összömegét, a testtömeget, a jobb tibia hosszát, majd szív/testtömeg és szív tömeg/tibia hossz arányokat számoltunk. A szíveket vagy lefagyaszottuk, vagy 10%-os formalinban fixáltuk.

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

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

### 3.10 SZÖVETTANI VIZSGÁLATOK

A formalinban fixált szívizomokat felszegeltektük, paraffinba ágyaztuk, 5 µm vastag metszeteket készítettünk a szívesüestől a bázisig, mm-enként, majd hematoxiliin-eozinnal festettük. 40x nagyításon vizsgálva sejtátmérőket számoltunk 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 metszeteket. 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 metszeteket. 10x nagyítással az intercellulárisan megfestődött III. típusú kolagén mennyiséget NIH ImageJ programmal kvantifikáltuk.

### 3.11 WESTERN BLOT VIZSGÁLATOK

Ötven mg szívizom szövét Tris bufferben homogenizáltunk, 2x SDS-polialakrilamid gél elektroforézis pufferrel elegyítettünk. 12 %-os SDS poliakrilamid gélén történt elektroforézis után nitrociklóz membrána blotoltuk fehérjéinket. Blokkolást követően membránjainkat 4°C-on éjszakán át inkubáltuk a következő抗igeneket: felesnerő antitestekkel: foszfo-specifikus Akt-1/protein kináz B-α Ser<sup>473</sup> (1:1000), nem foszforált Akt/PKB (1:1000), foszfo-specifikus glutogén szintáz kináz (GSK)-3β Ser<sup>9</sup> (1:1000), foszfo-specifikus extracelluláris jel-regulálta kináz (ERK1/2) Thr<sup>202</sup>-Tyr<sup>204</sup> (1:1000), foszfo-specifikus p38 mitogén-aktiválta protein kináz (p38-MAPK) Thr<sup>180</sup>-Gly-Tyr<sup>185</sup> (1:1000), foszfo-specifikus c-Jun N-terminalis kináz (JNK) (1:1000), foszfo-specifikus protein kináz C (PKC) (pan) BII Ser<sup>626</sup> (1:1000), foszfo-specifikus protein kináz C α/BII (PKCα/BII) Thr<sup>565</sup>-Ser<sup>566</sup> (1:1000), foszfo-specifikus protein kináz C δ Ser<sup>449</sup> (1:1000; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), nem foszforált PKC (1:1000), Aktin N-terminalis domain (1:10000; Sigma-Aldrich Kft, Budapest). Anti-nyúl torma peroxidázzal konjugált szekunder antitestet 1:3000 hígításban használtuk, kemilumineszcencia módszerrel vizualizáltuk a jelölt fehérjéket. A Western blot eredményeket NIH ImageJ programmal kvantifikáltuk.

### 3.12 STATISZTIKA

Variancia analizist használtunk, az eredményeket átlag és standard szórás megadásával fejeztük ki. Szignifikanciat párosítatlan Student t-teszettel számoltunk, szignifikánsnak a 0,05-nél kisebb p értéket tekintetük.

### 3.9 MITOKONDRIÁLIS ENZIMAKTIVITÁS MÉRÉS

NADH:cytokrom-c oxidoreduktáz aktivitást jól ismert módszerrel mérünk. A citokrom-c redukció változást 550 nm hullámhosszon mérük, 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.

#### 4. ÖSSZEFOGLALÁS

1. Tanulmányunkban a vizsgált új PARP gátló vegyület, az L-2286 kedvezően befolyásolta a szívizom anyagszere iszkémia-reperfúziót követő normalizálódását in vitro Langendorff-szívperfúziós rendszerben. <sup>31</sup>P NMR spektroszkópia alkalmazásával kimutatható volt, hogy a PARP enzim gátlása elősegítette a nagy energiájú foszfát-végyletek felépülését és az anorganikus foszfát gyors beépülését szívizombá tapasztaltuk, hogy a metabolikus paraméterek javulásával párhuzamosan a szívizom szövetet ért oxidatív károsodás szintén szignifikánsan csökkent a PARP gátló kezelés hatására.
2. Hasonlóan Langendorff-szívperfúziós rendszerben kapott eredményeinkból in vivo állatkísérletes modellben (izoproterenol indukált miokardialis infarktusban) az általunk vizsgált PARP gátló vegyület szintén szignifikánsan csökkentette a szívizom oxidatív károsodását, melyet az L-2286-tal kezelt csoportban mértető alacsonyabb szérum nekroenzám (LDH, CK) szintek és a jelentősen csökkent necrotikus szívizom terület meghatározása alapján mondhatunk ki.
3. Krónikus szíveltégtelen állataink PARP gátló kezelést követően azt tapasztaltuk, hogy a kezelés hatására csökken a szívizom infarktust követő körös hypertrofia és a III. típusú kollagén intersticiális depozíciója, amik a szívizom körös atéplősnek, azaz a remodellingnek részei. A szívizom remodelling magában foglalja azonban a miokondriális anyagszereket, a nagy energiájú foszfátraktákok kiemelkedőt, a csökkent oxigéngyavazást és tápanyag hasznosítást is, csökken a miokondriális enzimek mennyisége és aktivitása is. Ezen ismert elteréseknek megfelelően a szíveltégtelen állatokban mértető NADH:ciokrom-c oxidoreduktáz aktivitás jelentős csökkenését észleltük, a vizsgált légszíni láncban részt vevő és egyéb fehérjék megtartott mennyisége ellenére. A miokondriális enzimek diszfunkcióját elsősorban pozitiválásos oxidativ károsodás következményének tartjaiuk, azonban a PARP gátló kezelés szignifikánsan metsztelte az enzimek aktivitásában megtérülhető, krónikus oxidatív stressz okozta csökkenést. Végül a szíveltégtelenség következetben kialakuló balkánnyi diszfunkciót jelző plazma B típusú nátriumterutikus 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 iszkémia-reperfúzió körülményei között mind ex vivo mind in vivo kísérletek során. Az Akt és GSK-3β fehérjék fokozott foszforyálását tallaltuk nemcsak izolált szíven, hanem izoproterenol-indukált miokardialis 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 antiapoptotikus 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 horzájárult a szívizom sejtek tületéshöz. A p38-MAPK fehérje L-2286 által kiváltott fokozott foszforiláltsága minden modellben cardioprotектив hatású lehet. Végül kimutattuk iv vivo modelben, hogy a PARP gátlás csökkentette a proapoptotikus hatású JNK izoproterenol által kiváltott aktivációját.

5. Ebben a tanulmányban 8 bétel a miokardialis infarktus után a GSK-3β fehérje fokozott foszforilációját találtuk a szíveltégtelen szívizomban, mely elsősorban a PKC fehérjék aktivációs állapotával függött össze, mintsem az Akt fehérjével. Számos egéb fehérje mellett a PKC fehérje több izoenzimje szerepet játszhat a szívizom hypertrofia kialakulásában, melyek az antihypertrofias hatású GSK-3β fehérjet foszforilálják, ezáltal inaktiválják. A PARP gátlás kísérletes modellünkben minden PKC, minden a GSK-3β fehérjet foszforilálta. Az antihypertrofias jeleket integráló és azokat a NF-AT, c-Jun és egyéb fehérjék felé továbbító GSK-3β fehérje PKC mediátor aktiválása jelentősen hozzájárult a szíveltégtelenség, remodelling progressziójának gátlásához. Kísérleteinkben a PARP gátlás azonban nem bírt jelentős befolyással az ERK1/2, JNK, p38-MAPK fehérjék foszforiláltsági állapotára.

#### 5. KÖVETKEZETÉSEK

Összefoglalásul elmondható, hogy tanulmányunk igazolta először, hogy a PARP enzim gátlása kedvezően befolyásolhatja a protein kináz rendszer aktivitását izolált szíven iszkémia-reperfúzió körülményei között és izoproterenol-indukált miokardialis infarktusban, amely védehetőbben jelentős szerepe lehet az Akt, ERK, p38-MAPK fehérjék kifejtett aktiváló, és a JNK fehérjen megfigyelhető gátló hatásának. Szintén ez az első tanulmány, mely az izoproterenol indukált miokardialis infarktus alatt megtérülhető jelátviteli változásokkal foglalkozik. Továbbá kísérleteinkkel először mutattuk ki, hogy a PARP gátlás képes a krónikus szíveltégtelenség progresszióját megtagadni feltételezve a GSK-3β fehérje PKC mediálta aktiválásával. Végül a PARP gátlás szintén védelmet nyújthat a pozitivalfarkasos szíveltégtelenségeben megtérülhető fibrosis, szívizom hypertrofia, miokondriális diszfunkció, fótalis genexpressziós változások ellen. A PARP gátlás hatására megtérülhet jelátviteli változások további bizonyítékok jelentenek arra vonatkozóan, hogy a PARP gátlók hatása az ATP és NAD<sup>+</sup> raktárak megvárában túl egyéb jelentős intracelluláris hatásokkal is bír.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

### PUBLICATION OF THE AUTHOR

#### Additional papers

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

Mindeneketől témavezetőmnek, Dr. Tóth Kálmán Professorr Úrnak szeretnem hálámat kifejezni, aki irányított, támogatott munkámban és hasznos tanácsokkal járt el.

Köszönettel tartozom Sumegi Balázs Professorr Úrnak, aki biokémiai szemléletmódra tanított engem. Felkeltette érdeklődésemet a PARP gátlók iránt, és lehetővé tette számomra, hogy intézetében nyugodt oldalon léjtörben végezhessem kísérleteimet.

Ezután szeretnem hálámat kifejezni Hideg Kálmán Professorr Úrnak, aki nek a szabadgyökök reakciói, és PARP gátló vegyületek kémiai természetének jobb megismerést köszönhetem.

Köszööm Ösz Erzsébetnek<sup>†</sup> és Berente Zoltánnak, hogy készségesen segítettek az NMR műszerrel végezett vizsgálatokban.

Dr. Halmosi Róbert, Dr. Szabados Eszter, Dr. Tóth Ambrus, Dr. Deres Péter, Dr. Hantó Katain és Dr. Szerecsay Zoltán igen sok segítséget nyújtottak számos feladat megoldásában. Külön köszönet illeti Pásztor Istvánét, Halász Helénát, Horváth Bertalant és Girán Lászlót, aikik asszisztenciájukkal jártak hozzá munkám eredményességéhez.

Végezetül, de nem utolsósorban hálával tartozom barátaimnak, akik mindenügy mellettem áltak és támogatták tanulmányaimat.

SZAPÁRY L, HORVÁTH B, MÁRTON Z, ALEXY T, KÉSMÁRKY G, SZŐTS M, PUSH G, GAÁL 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.

BOGÁR L, TÓTH K, JURICSKAY I, KÉSMÁRKY G, PÁLELA. Az áramlástaní szempontból optimális hemotokritérték 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, KÉSMÁRKY G, VERESS G, TÓTH K. A rutinszerű alkalmazott trombocita aggregáció gátló kezelés hatékonyságának felnérése érbetegségen. Kardiológus 2, 5-24, 2003.

SZAPÁRY L, HORVÁTH B, MÁRTON Z, ALEXY T, KÉSMÁRKY G, SZŐTS M, PUSH G, GAÁL V, PÁLELA, KOLTAI K, JURICSKAY I, TÓTH K. A krónikus ischaemias agyérbetegek haemorheológiai jellemzői. Agyérbetegesek 9, 2-7, 2003.

DERES P, HALMOSIR, TOTH A, KOVACS K, PÁLELA, HABON T, CZOPFL, KALAI T, HIDEK K, SUMEGI B, TOTH K. Prevention of doxorubicin-induced acute cardiotoxicity by an experimental antioxidant compound. J Cardiovasc Pharmacol 45, 36-43, 2005. (IF: 1,313)

KÁLAI T, VÁRBIRÓ G, BOGNÁR Z, PÁLELA, HANTÓ K, BOGNÁR B, ÖSZ E, SÜMEGI B, HIDEK K. Synthesis and evaluation of the permeability transition inhibitory 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, HALMOSIR, SZABADOS E, CZOPFL, KÁLAI T, HIDEK 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, HALMOSIR, SZABADOS E, SZEREDAY Z, KULCSÁR G, KÁLAI T, HIDEK 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, HANTÓ K, BOGNAR B, MARK L, SZABO Z, TAPODI A, RADNAJ B, SARSZEGI Z, SZANTÓ A, GALLYAS F JR, HIDEK K, SUMEGI B, VARBIRO 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 kardiotokicitás 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, HIDEK K, SÜMEGI B, TÓTH K. Antioxidans vegyületek hatása az Akt protektív jelátviteli út aktivitására 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, KOLTAJ K, PÁLELA, KÉSMÁRKY G, HIDEK K, SÜMEGI B, TÓTH K. Poli(ADP-ribóz) polimeráz gátló 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, ALEXY T, MARTON Z, HORVATH B, KOLTAJ K, PÁLELA, KESMARKY G, KALAI T, HIDEK K, SUMEGI B, TÓTH K. Inhibition of platelet aggregation by poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. XVth 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. Foszfolipáz-D által indukált mitokondriális szabadgyökök képződés. XII. Sejt és Fejlesztésbioológiai Kongresszus, 2004. április 16-18., Pécs PÁLELA, TÓTH A, DERES P, HANTÓ K, RESKÓ Á, HALMOSI R, SZABADOS E, SZEREDAY Z, HIDEK K, SÜMEGI B, TÓTH K. Krónikus szívelégtelenség progressziójának lassítása poly(ADP-ribóz) polimeráz gátló vegyüettel palkányban. Magyar Kardiológusok Társasága 2004. évi tudományos Kongresszusa, 2004. május 14-17., Balatonfüred, Card. Hung. Suppl. C, C33, 34, 2004.

KOLTAJ K, FEHÉR G, PÁLELA, KÉSMÁRKY G, KÁLAI T, HIDEK K, SÜMEGI B, TÓTH K. Poli(ADP-ribóz) polimeráz inhibitorok vizsgálata in vitro reológiai modellekben. 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, HIDEK K, SÜMEGI B, TÓTH K. Doxorubicin okozta akut kardiotokicitás kivédése kísérleti antioxidáns

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

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

MARTON ZS, ALEXY T, KOLTAJ K, HORVATH B, PÁLELA, GYEVNAR ZS, FEHER 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.

vegyülettel. Magyar Kardiológusok Társasága 2004. évi tudományos Kongresszusa, 2004. május 14.-17., Balatonfüred, Card. Hung. Suppl. C, C66, 34, 2004.

BOGNAR Z, VÁRBIRO G, PÁLELA A, VERES B, TAPODI A, RADNAI B, SUMEGI B. An amiodarone analogue, HO-538 protects ischemic hearts by inhibiting the mitochondrial apoptotic pathway. 4<sup>th</sup> European Workshop on Cell Death, May 11-16, 2004, İstanbul, Turkey

PÁLELA, TÓTH A, DERES P, HANTÓ K, KOVÁCS K, RESKÓ A, HALMOSI R, SZABADOS E, SZEREDAY Z, HÍDEG K, SUMEGI B, TÓTH K. Effect of poly(ADP-ribose) polymerase inhibition on the prohypertrophic signaling in postinfarction heart failure. FEBS Lecture Course on Cellular Signaling & 4<sup>th</sup> Dubrovnik Signaling Conference, May 21-27, 2004, Cavtat, Croatia

DERES P, HANTÓ K, KOVÁCS K, HALMOSI R, PÁLELA, KISS GY, RESKÓ Á, POZSGAY É, SÜMEGI B, TÓTH K. Akut kardiotoxicitás kivételese poli(ADP-ribisz) polimerrel gátoló vegyülettel; XXXIV. Membrán Transport Konferencia, 2004. június 1-4., Szeged.

VÁRBIRO G, BOGNAR Z, PÁLELA, HANTÓ K, KALAI T, HÍDEG K, SUMEGI B. The effect of amiodarone 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, KESMARKY G, KALAI T, HÍDEG K, SUMEGI 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, HÍDEG K, SUMEGI B, TÓTH K. A poly(ADP-ribisz) polimeraz enzim gátolás hatása a jelátviteli folyamatokra szívizom ischaemia-reperfúzió során. Magyar Kardiológusok Társasága 2005. évi Tudományos Kongresszusa, 2005. május 11-14., Balatonfüred, Card. Hung. Suppl. A, A25, 35, 2005.

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, 31, 272, 2005.

KOVÁCS K, PÁLELA, BERENTE Z, GALLYAS F, SÜMEGI B. Jelátviteli folyamatok szerepe a poli(ADP-ribisz) polimerázok gátolására kardioprotектив hatásban. A Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi vándorgyűlésé, 2006. augusztus 30-szeptember 2., Pécs, Biokémia 62, 3, 2006.

GALLYAS F, BOGNAR Z, KALAI T, PÁLELA, HÍDEG K, SUMEGI B, VÁRBIRO G. Ischemias szívkarotodások kivédése egy új, SOD-mimétikus mPT-inhibitorral. A Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi vándorgyűlésé, 2006. augusztus 30-szeptember 2., Pécs, Biokémia 63, 3, 2006.

PÁLELA, TÓTH A, HALMOSI R, SZABADOS E, HÍDEG K, SUMEGI B, TÓTH K. A protein kináz-kaszál rendszer szerepe a poli(ADP-ribisz) polimeráz-gátolás kardioprotектив hatásmechanizmusában. A Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi vándorgyűlésé, 2006. augusztus 30-szeptember 2., Pécs, Biokémia 76, 3, 2006.

PÁLELA, TÓTH A, HANTÓ K, HOCSAK E, HALMOSI R, SZABADOS E, HÍDEG K, SUMEGI B, TÓTH K. Contribution of intracellular signaling cascades to the cardioprotective effect of poly(ADP-