

# **Cardioprotective effect of Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition**

PhD thesis

**Author:** Eva Bartha, M.D.

**Program leader:** Prof. Kalman Toth, M.D., Sc.D.

**Project leader:** Prof. Balazs Sumegi Sc.D.

Robert Halmosi M.D., Ph.D.

First Department of Medicine  
University of Pécs Medical School  
Hungary

2010.

## 1. Abbreviations

AIF	apoptosis-inducing factor
BNP	B-type natriuretic peptide
BW	body weight
CFY	CFY Sprague-Dawley rat
DAP	diastolic arterial blood pressure
EF	ejection fraction
ERK 1/2	extracellular signal-regulated kinase
FS	fractional shortening
GSK-3 $\beta$	glycogen synthase kinase-3 $\beta$
HF	heart failure
IR	ischemia-reperfusion
ISO	isoproterenol hydrochloride
IVS (d)	thickness of interventricular septum in diastole
IVS (s)	thickness of interventricular septum in systole
JNK	c-jun N-terminal kinase
LVEDV	left ventricular end-diastolic volume
LVESV	left ventricular end-systolic volume
LVID (d)	left ventricular end-diastolic diameter
LVID (s)	left ventricular end-systolic diameter
MAP	mean arterial blood pressure
MAPK	mitogen activated protein kinase
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NAD <sup>+</sup>	nicotinamide adenine dinucleotide
NIH	National Institute of Health
NOS	nitric oxide synthase
PAR	poly(ADP-ribose)polymers
PARP	poly(ADP-ribose)polymerase
PI3K	phosphatidylinositol-3-kinase
PKC	protein kinase C
PW (d)	thickness of left ventricular posterior wall in diastole
PW (s)	thickness of left ventricular posterior wall in systole
PTP	permeability transition pore
ROS	reactive oxygen species
RWT	relative wall thickness
SAP	systolic arterial pressure
SEM	standard error of the mean
SHR	spontaneously hypertensive rat
TBS	TRIS-buffered saline
TL	length of right tibia
WV	weight of ventricles

## 1. Introduction

Accumulating evidence suggest that the reactive oxygen and nitrogen species are generated in cardiomyocytes and endothelial cells during myocardial infarction, various forms of HF or cardiomyopathies, circulatory shock, cardiovascular aging, diabetic complications, myocardial hypertrophy, atherosclerosis, and vascular remodelling following injury.

ROS are produced in the ischemic myocardium especially during and after reperfusion when electron transport resumes in the mitochondria after suppression by ischemia.

These reactive species induce oxidative DNA damage and consequent activation of the PARP. PARP-1 functions as a DNA damage sensor and signaling molecule binding to both single- and double-stranded DNA breaks. Upon binding to damaged DNA, PARP-1 forms homodimers and catalyzes the cleavage of  $\text{NAD}^+$  into nicotinamide and ADP-ribose to form long branches of ADP-ribose polymers.

Reactive oxygen and nitrogen species (e. g., peroxynitrite)-dependent cytotoxicity in various cardiovascular diseases is mediated by a multitude of effects including lipid peroxidation, protein nitration and oxidation, DNA oxidative damage, activation of matrix metalloproteinases, and inactivation of a series of enzymes. In the heart, ROS can evoke cytotoxicity, myocardial stunning, arrhythmia, reduction of the calcium transient and contractility, elevated diastolic calcium levels and intracellular ATP depletion.

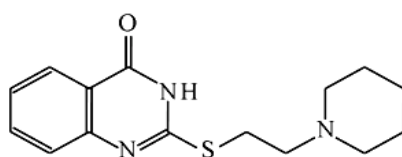
A number of physiological, pharmacological and pathological stimuli initiate cardiac hypertrophy. In addition, cardiac hypertrophy is associated with alterations in intracellular signaling transduction pathways, including alterations of G-protein-coupled receptors, small G protein, MAPK, PKC, calcineurin and calmodulin and so on. Various signaling pathways are involved in the complicated interactions that finally promote cardiac hypertrophy and HF.

Several studies suggest that PARP inhibitors can modulate these intracellular signaling pathways beneficially in various forms of HF or cardiomyopathies, circulatory shock, cardiovascular aging, diabetic complications, myocardial hypertrophy, atherosclerosis, vascular remodeling following injury and during myocardial IR.

To reveal the effect of PARP inhibitors on intracellular signaling pathways and echocardiographic parameters in rats, two experimental models were used. First, we investigated

the action of PARP inhibition in vivo in a postinfarction heart failure model, then PARP inhibitor agent was tested on non-compensated phase of SHRs.

In these studies, as PARP inhibitor L-2286 was used. L-2286 is derived from 2-mercapto-4(3*H*)-quinazolinone by alkylation with 1-(2-chloroethyl)piperidine. L-2286 was chosen, because in vitro PARP assay it exhibited significantly better PARP inhibitory activity than basic quinazolines such as 4-hydroxyquinazoline or 2-merkapto-4(3*H*)-quinazolinone (17), (Fig. 1).



**Figure 1. Chemical structure of L-2286 (2-[(2-piperidine-1-ylethyl)thio]quinazolin-4(3H)-one).**

## 2. Aims

### 3. Aims of the study

The aim of this work was provide evidence for beneficial in vivo effects of PARP inhibition.

1. To assess cardioprotection afforded by PARP inhibition

- a) We tested whether the PARP inhibitor, L-2286 can attenuate the isoproterenol-induced myocardial damage
- b) We tested whether the long-term administration of L-2286 can diminish the signs of hypertension induced-HF
- c) We compared the protective effect of PARP-inhibition to that of ACE-inhibition against the postinfarction myocardial remodelling.

2. To provide evidence for cardioprotective effects of L-2286, the following parameters were examined:

- a) interstitial fibrosis in histological samples
- b) phosphorylation state of PI3K/Akt-1<sup>Ser473</sup>/GSK-3 $\beta$ <sup>Ser9</sup>, MAPK, PKC cascades by Western blotting
- c) echocardiographic parameters with high-resolution imaging system

### **3. Material and Methods**

#### *Postinfarction heart failure model*

Male CFY Sprague-Dawley rats were involved into this study. MI was induced by subcutaneous injection of 120 mg/kg ISO, while physiological saline (1 ml/kg) was given to control rats subcutaneously, two times. 24 hours after the second injection the surviving animals were randomly assigned to receive either 5 mg/kg/day L-2286 (a gift of Prof. Dr. Kalman Hideg), a water-soluble PARP inhibitor (ISO+L) or 10 mg/kg/day enalapril maleate (ISO+E), or water (ISO). The fourth group was an age-matched control group (C).

#### *Hypertensive heart failure model*

Male 30-week-old SHR rats a compensatory hypertrophic stage were divided randomly into two groups. One group received no treatment (SHR-C), while the other group received L-2286 (a water-soluble PARP inhibitor) 5 mg/bw in kg/d for 46 weeks (SHR-L). The third group was an age-matched normotensive control group (CFY).

The investigations conforms with 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.

#### *Gravimetric parameters*

Animals were euthanized with an overdose of ketamine hydrochloride intraperitoneally and heparinized with sodium heparin, sacrificed, their hearts were removed, the atria and great vessels were trimmed from the ventricles and weight of the ventricles was measured, which was then normalized to the body mass and to the length of the right tibia (indices of cardiac hypertrophy). The lung wet weight-to-dry weight ratio (an index of pulmonary congestion) were also measured in experimental animals.

#### *Invasive blood pressure measurements*

Five rats from each group in the heart failure model were anaesthetized with ketamine hydrochloride intraperitoneally and a polyethylen catheter was inserted into their left arteria femoralis. Blood pressure was measured by CardioMed System (CM-2005).

#### *Determination of Plasma B-type natriuretic peptide*

Blood samples were collected into the Lavender Vacutainer tubes containing EDTA. Plasma B-type natriuretic peptide-45 levels (BNP-45) were determined by enzyme immunoassay method.

#### *Histology*

Formalin-fixed ventricles were sliced and embedded in paraffin. 5 µm thick sections were cut serially from base to apex. Slices at 1 mm intervals were stained. Slices were stained with Picrosirius Red or Masson's trichrome staining to detect the interstitial fibrosis. Sections were quantified with the NIH ImageJ analyzer system.

#### *Western blot analysis*

Fifty milligrams of heart samples were homogenized in ice-cold 50mM Tris buffer, pH 8.0 (containing protease inhibitor cocktail 1:100, and 50 mM sodium metavanadate, and harvested in 2x concentrated SDS-polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. Sodium metavanadate was used as phosphatase inhibitor. Proteins were separated by 10% or 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. After blocking (2 h with 3% nonfat milk in Tris-buffered saline), membranes were probed overnight at 4°C with primary antibodies and the next day with the secondary antibodies. Complexes were visualized by means of enhanced chemiluminescence. After scanning, results were quantified by NIH ImageJ program.

#### *Noninvasive evaluation of cardiac function*

At the beginning of the experiments all animals were examined by echocardiography to exclude rats with any heart abnormalities. Transthoracic two-dimensional echocardiography was performed under inhalation anesthesia at the beginning of the experiment and on the day of sacrifice. Rats were lightly anesthetized with a mixture of 1.5% isoflurane and 98.5% oxygen. The chest of animals was shaved, acoustic coupling gel was applied and warming pad was used to maintain normothermia. Animals were imaged in the left lateral decubitus position. Cardiac dimensions and functions were measured from short- and long-axis views at the mid-papillary level by a VEVO 770 high resolution ultrasound imaging system (VisualSonics, Toronto, Canada) - equipped with a 25 MHz transducer.

## 4. Conclusions

### *4.1 Cardioprotection by PARP inhibition in postinfarction heart failure model*

Our study strengthened the previous data of our workgroup that an isoquinoline derivate PARP inhibitor had very prominent protective effect against postinfarction myocardial remodeling in rats. However our recent work demonstrated firstly, that PARP inhibitors can activate the Akt-1/GSK-3 $\beta$  prosurvival signaling pathway, during postinfarction heart failure. We also compared the efficacy of complete PARP inhibition to that of complete ACE inhibition.

Accumulated data suggest that PI3K/Akt signaling transduces adaptive cardiac hypertrophy and constitutive activation of cardiomyocytes by PI3K/Akt activation did not transit into a maladaptive hypertrophy. ACE inhibitor also influenced the activity of Akt-1. Our recent work showed, that the phosphorylation of Akt-1<sup>Ser473</sup> was elevated in ISO-treated group, and both PARP-inhibitor and ACE-inhibition caused a further growth of it. The PARP-inhibitor L-2286 caused a significantly greater activation of Akt-1, compared to enalapril. In our experiment the phosphorylation (therefore the inhibition) of GSK-3 $\beta$ <sup>Ser9</sup> was the highest in the L-2286 treated group. Enalapril exerted a significantly less inhibition of GSK-3 $\beta$ <sup>Ser9</sup>.

The MAPKs ERK, JNK, and p38 can all be activated by AngII. The exact role of MAPKs is still controversial in chronic HF. The moderate phosphorylation of ERK1/2<sup>Thr183-Tyr185</sup> was further attenuated by ISO and became more elevated by other treatments. It was reported that ERK 1/2 activation leads to a concentric form of hypertrophy with enhanced cardiac function and MEK1-ERK2 protects the heart from ischemia induced apoptotic insults in mice. In our study the ISO-treated group p38 MAPK<sup>Thr180-Gly-Tyr182</sup> was slightly phosphorylated, while all other treatments increased the phosphorylation of p38-MAPK<sup>Thr180-Gly-Tyr182</sup> significantly. In case of JNK, ISO significantly decreased its phosphorylation and both L-2286 and enalapril treatment augmented its activation.

The phosphorylation of PKC pan  $\beta$ II<sup>Ser660</sup> and PKC  $\alpha/\beta$ II<sup>Thr638/641</sup> increased after ISO-induced MI, however their phosphorylation decreased upon administering ACE or a PARP-inhibitor. The PARP-inhibitor - L-2286 decreased the activity of the prohypertrophic PKC  $\alpha/\beta$  more effectively than the ACE-inhibitor – enalapril. A very similar phosphorylation pattern was revealed in the case of PKC $\delta$  Thr<sup>505</sup> and PKC  $\zeta/\lambda$  Thr<sup>410/403</sup>.



PKC- $\epsilon^{\text{Ser729}}$  is activated by various types of stress. In our study we detected a positive effect (activation) of PARP inhibitor on PKC- $\epsilon^{\text{Ser729}}$ , which is responsible for adaptive changes in stress situations, while the levels of other PKC ( $-\alpha$ ,  $-\beta$ ,  $-\zeta$ ,  $-\delta$ ) isoforms were reduced, which are responsible for maladaptive myocardial hypertrophy and remodeling in postinfarction animals. In our postinfarction model echocardiographic parameters - systolic LV function, wall thickness, LVESV, LVEDV - worsened in ISO-group compared to control animals. This effect can be due to the evolved myocardial fibrosis and cardiomyocyte hypertrophy and partially due to the activation of several protein kinases (e.g. PKC- $\alpha/\beta^{\text{Thr638/641}}$ ). Enalapril treatment decreased significantly this worsening, however PARP-inhibitor treatment could nearly completely prevent it. Interestingly, the LVEDV was unchanged despite the ACE-inhibitor, or PARP-inhibitor treatment. The underlying mechanism whereby the PARP-inhibitor L-2286 can exert this favourable effect, is its activator effect on several prosurvival (especially Akt-1-GSK 3 $\beta$ , PKC- $\epsilon$ ) and inhibitor effect on prohypertrophic (PKC-  $\alpha/\beta$ , -  $\zeta/\lambda$ ,  $-\delta$ ) protein kinases.

#### *4.2. Effect of long-term L-2286 administration on hypertension induced heart failure*

The major findings of this study are that chronic inhibition of nuclear PARP enzyme reduces ADP-ribosylation of nuclear proteins and thus prevents the development of HF from cardiac hypertrophy with inducing reverse remodeling with restoration of cardiac structure and function while changing the altered patterns of signal transducing processes. We used the SHR which provides an animal model of high blood pressure that is similar to essential hypertension in humans. Our study began in the compensated phase of hypertensive cardiopathy in SHR with signs of LVH (at 30-week-old) and after 46 weeks the obvious signs of HF could be detected in SHRs. The development of HF from long-term hypertension can be explained by different mechanism in the literature, but oxidative stress and abnormal signalings are generally respected as the molecular basis of the disease.

In this study, we tested the effect of PARP inhibition in aging SHRs having cardiac hypertrophy and fibrosis related to higher mechanical and oxidative stress and had typical signs of HF (gravimetric parameters, observation daily) and impaired systolic LV function. These conditions have important role in the pathogenesis of diastolic and systolic dysfunctions in hypertensive heart disease.

Both in animal models and in humans, increased blood pressure has been associated with oxidative stress in the vasculature, i.e. with an excessive endothelial production of ROS, which may be both a cause and a consequence of hypertension.

In our experiment the level of plasma-BNP was elevated in both SHR groups. Exalted BNP production and release by cardiocytes occurs in hypertension and has been considered to be a compensatory mechanism against ventricular overload. The Framingham study demonstrated that an increase in BNP predicted the risk of death and cardiovascular events. This alteration could be mitigated by PARP-inhibition and in accordance with this, the survival rate of treated rats was also significantly better. If the heart experiences extended periods of elevated workload, it undergoes a hypertrophic enlargement in response to increased demand. A number of signalling modulators in the vasculature milieu are known to regulate heart muscle mass, including those that influence gene expression, apoptosis, cytokine release and growth factor signaling. One of them is the Akt-1-GSK-3 $\beta$  pathway, which was favorably influenced by PARP inhibitor. In our experiment the down-regulated phosphorylation of Akt-1/GSK-3 $\beta$  in SHR-C samples were increased by PARP inhibitor. Akt-1 is well known to play a central role in the development of physiologic hypertrophy, but also has an important role in cardiac angiogenesis through the activation of mammalian target of rapamycin (mTOR). It is likely that ineffective angiogenesis might contribute to the transition from LVH to HF. The protecting effect of PARP-inhibitors against the development of HF from LVH can be mediated at least partly through the Akt-1/mTOR signaling. MAPKs are ubiquitously expressed, and their specific functions in the heart have been a focus of intensive study. Growing evidence suggests, that modulation of the complex network of MAPKs cascades could be a rewarding approach to the treatment of cardiomyocyte hypertrophy and HF. In our experiment the elevated activation of p38, JNK in the SHR-C groups were decreased, while the activation of ERK was increased by L-2286. While the ERKs are particularly implicated in growth-associated responses, the p38 MAPK and JNKs are generally activated by cytotoxic stress factors.

Activation of ERK causes cardiac hypertrophy and increases survival, while inactivation of ERK contributes to myocyte apoptosis. Cardiac-specific expression of constitutively activated MEK1 promotes cardiac hypertrophy without compromised function or long-term animal survival, suggesting that activation of ERK activity promotes a compensated form of hypertrophy. In our study, the phosphorylation of PKC pan  $\beta$ II<sup>Ser660</sup>,  $\alpha/\beta$ II<sup>Thr638/641</sup>,  $\delta$ <sup>Thr505</sup> and  $\zeta/\lambda$ <sup>Thr410/403</sup> were

attenuated in SHR-L compared to SHR-C by PARP inhibitor. Several reports suggest, that PKC  $\alpha$  and  $\beta$  are involved in the development of cardiac hypertrophy and HF. The activation of PKC  $\epsilon$  was upregulated by L-2286 treatment in SHR-L group. In this experiment, there were no differences in LV systolic functions (EF, FS) at baseline (the age of 30 weeks). These parameters were preserved in the CFY and SHR-L groups, but moderated in the SHR-C group at the end of the study. L-2286 increased EF by reducing end-systolic dimensions. During the development of hypertension, alterations in LV geometry may occur as an adaptation to increasing pressure and volume load. In hypertensive patients, LV geometry can be classified into four patterns on the basis of LV mass index and RWT. In conformity with this classification eccentric hypertrophy was found in SHR-C group (increased LV mass/ BW and normal RWT), while L-2286 administration could preserve concentric hypertrophy (increased LV mass/ BW and increased RWT) state, which could be detected at the beginning of the study in both SHR groups. Therefore, the ineffectiveness of L-2286 on thickness of septum and PW can be considered as a favorable effect because it can add to the maintaining of concentric hypertrophy.

## 5 Summary

Throughout the last two decades, experimental evidences from in vitro studies and preclinical models of diseases have demonstrated that reactive oxygen and nitrogen species, including reactive oxidant peroxynitrite, are generated in parenchyma, endothelial, and infiltrating inflammatory cells during myocardial and other forms of reperfusion injury, myocardial hypertrophy, heart failure, cardiomyopathies and cardiovascular aging. In related animal models of diseases, pharmacological inhibition of PARP provides significant therapeutic benefits. Therefore, novel antioxidants and PARP inhibitors have entered into the clinical development for the experimental therapy of various cardiovascular and other diseases.

In our experiments, the common feature of the PARP-inhibitor L-2286 treatment was the beneficial action on several intracellular signaling pathways PI-3-kinase-Akt-1<sup>Ser473</sup> and PKC  $\epsilon$ <sup>Ser729</sup> pathways, it can influence favorably the gravimetric and echocardiographic parameters and cardiac fibrosis. In addition, in our last investigation (HF model), L-2286 treatment could delay the onset of hypertension-induced HF.

## 6 Acknowledgements

These studies were carried out at the Department of Biochemistry and Medical Chemistry and at the 1<sup>st</sup> Department of Medicine, Medical School of the University of Pécs between 2005 and 2008.

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

I am grateful 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 Róbert Halmosi for his excellent work and help to perform echocardiographic examinations.

Tamás Habon, Eszter Szabados, Izabella Solti, Gyöngyi Kiss, Enikő Plózer, Alíz Szabó, László Kereskai and Endre Kálmán gave a hand with a part of the experiments. I am grateful to Istvánné 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.

# **A poli(ADP-ribóz)polimeráz gátlás kardioprotektív hatása**

Ph.D. tézis

**Szerző:** Dr. Bartha Éva

**Programvezető:** Prof. Dr. Tóth Kálmán

**Témavezető:** Prof. Dr. Sümegi Balázs  
Dr. Halmosi Róbert, Ph.D.

Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar  
I. sz. Belgyógyászati Klinika  
Pécs

2010.

## Rövidítések jegyzéke

AIF	apoptózist indukáló faktor
BNP	B-típusú nátriuretikus peptid
BW	testtömeg
CFY	CFY Sprague-Dawley rat
DAP	diasztolés artériás nyomás
EF	ejekciós frakció
ERK 1/2	extracelluláris szignál-regulált kináz
FS	frakcionális rövidülés
GSK-3 $\beta$	glikogén szintáz kináz-3 $\beta$
HF	szívelégtelenség
IR	iszkémia-reperfúzió
ISO	izoproterenol hidroklorid
IVS (d)	interventrikuláris szeptum vastagsága diasztole során
IVS (s)	interventrikuláris szeptum vastagsága szisztole során
JNK	c-jun N-terminális kináz
LVEDV	bal kamrai vég-diasztolés térfogat
LVESV	bal kamrai vég-szisztolés térfogat
LVID (d)	bal kamrai vég-diasztolés átmérő
LVID (s)	bal kamrai vég-szisztolés átmérő
MAP	átlagos artériás nyomás
MAPK	mitogén aktiválta protein kináz
MTT	3-[4,5-dimetitiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolium bromid
NAD <sup>+</sup>	nikototinamid adenin dinukleotid
NIH	National Institute of Health
NOS	nitrogén monoxid szintáz
PAR	poli(ADP-ribóz)polimerek
PARP	poli(ADP-ribóz)polimeráz
PI3K	foszfatidilinozitol-3-kináz
PKC	protein kináz C
PW (d)	bal kamra hatsó falának vastagsága diasztolében
PW (s)	bal kamra hátsó falának vastagsága szisztolében
PTP	permeabilitási tranzíciós pórus
ROS	reaktív oxigén szabadgyök
RWT	relatív falvastagság
SAP	szisztolés artériás nyomás
SEM	az átlag standard hibája
SHR	spontán hipertenzív patkány
TBS	TRIS-pufferelt sóoldat
TL	jobb tibia hossza
WV	kamrák tömege

## Bevezetés

Egyre több bizonyíték szól amellett, hogy oxigén és nitrogén szabadgyökök keletkeznek a szívizomsejtekben és az endothel sejtekben különféle betegségek során, többek között akut koronária szindrómákban, a szívelégtelenség és a kardiomiopátiák különböző formáiban, keringési sokkban, a szív és érrendszer öregedése során, a cukorbetegség szövődményeiben, szívizom hipertrófiában, ateroszklerózisban és a sérülést követő vaszkuláris remodelingben.

A ROS egyik legfontosabb forrása a szívizomban a mitokondriális légzési lánc, mely kisebb mértékben iszkémia során is, de igazán nagy mennyiségben reperfüzió során termel szabad gyököket. Ezek a szabadgyökök oxidatív DNS károsodást okoznak és ezen keresztül a PARP enzim következményes aktiválódását.

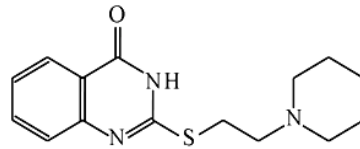
A PARP-1 enzim funkciója, hogy érzékelje a DNS károsodást és a jelátvitelben résztvevőként kötődjön mind az egyes, mind a kettős szálú DNS törésekhez. A károsodott DNS-hez kötődve a PARP-1 homodimereket formál és katalizálja a NAD<sup>+</sup> hasítását nikotinamidra és ADP-ribózra, hogy hosszú ADP-ribóz polimereket építsen fel, melyeket a sérült DNS-szakaszokhoz és különféle fehérjékhez kapcsol.

A szabadgyökök sejtkárosító hatásukat többféle úton fejtik ki: lipid peroxidációt, protein nitrációt és oxidációt, valamint oxidatív DNS károsodást okoznak, ezen kívül aktiválják a mátrix metalloproteinázok aktivitását és több enzim inaktíválnak. A szívben a ROS-ok sejtkárosítást, a szívizomzat stunningját, arrhythmiát, a kalcium tranziens és a kontraktilitás csökkenését, emelkedett diasztolés kalcium szintet és az intracelluláris ATP szint csökkenését okoznak.

Többféle fiziológiai, farmakológiai és patológiai stimulus okozhatja a szívizom hipertrófiáját, ilyen például több jelátviteli útvonal megváltozása, például a G-protein-kapcsolt receptorok változása, a small G protein, a MAPK, a PKC, a calcineurin, kalmodulin és több más jelátviteli út változása. A szívizom hipertrófiáját okozó jelátviteli útvonal pedig végül szívelégtelenséget okoznak. Több tanulmány utal arra, hogy a PARP gátlók kedvezően tudják befolyásolni ezen jelátviteli útvonalakat a HF egyes formáiban, keringési sokkban, a szív és érrendszer öregedésében, a cukorbetegség szövődményeiben, szívizom hipertrófiában, ateroszklerosisban, az erek átépülésében sérülést követően, illetve a miokardiális IR alatt.

Munkámban kétféle modellt használtam, hogy megvizsgáljam a PARP gátlók sejten belüli jelátvitelre, illetve a myocardium bizonyos morfológiai és a funkcionális paramétereire kifejtett

hatását patkányban. Először posztinfarktusos szívelégtelenség modellben vizsgáltam a PARP gátlás in vivo hatását, majd SHR-ek nem kompenzált fázisában.



1. Ábra: Az L-2286 ((2-((2-Piperidin-1-ylethil)tio)quinazolin-4(3H)-egy) szerkezeti képlete.



## **Célkitűzések**

A kísérletek célja az volt, hogy bizonyítsa a PARP gátlás in vivo protektív hatását.

1. A PARP gátlás kardioprotektív hatását a következő módszerekkel vizsgáltuk:

- a) Megvizsgáltuk, hogy a PARP gátló L-2286 csökkenti-e posztinfarktusos szívelégtelenség kialakulását, illetve ezt milyen jelátviteli utak módosításával teszi.
- b) Megvizsgáltuk, hogy vajon az L-2286 hosszan tartó alkalmazása megelőzi-e a magas vérnyomás okozta szívelégtelenség kialakulását.
- c) A PARP-gátlás kardioprotektív hatását ACE-gátlók hatásával hasonlítottuk össze posztinfarktusos szívelégtelenség kialakulásával szemben.

A következő paramétereket vizsgáltuk, hogy bizonyítsuk az L-2286 kardioprotektív hatását:

- a) az intersticiális fibrózis mennyiségét szövettani metszeteken
- b) a PI3K/Akt-1/GSK-3 $\beta$ , MAPK, PKC kaszkádok foszforilációját (aktivitását) Western blottal
- c) a szív funkcionális paramétereit nagy felbontású ultrahangos készülékkel

## 2. Eszközök és módszerek

### *Posztinfarktusos szívelégtelenség model*

Hím CFY Sprague-Dawley patkányokat alkalmaztunk a kísérletben. A MI-t 120 mg/kg ISO subcutan adásával idéztük elő (két egymást követő napon adva), míg a kontroll állatok fiziológias sóoldatot kaptak (1ml/kg). 24 órával a második injekció után a túlélő patkányokat véletlenszerűen két csoportra osztottuk, az egyik csoport 5 mg/kg/nap L-2286-ot kapott (Prof. Dr. Hideg Kálmán ajándéka), mely egy vízoldékony PARP-gátló (ISO+L) vagy 10 mg/kg/d enalapril maleátot (ISO+E), vagy vizet (ISO). A negyedik csoport kortárs kontroll volt (C).

### *Hipertenzív szívelégtelenség modell*

Hím 30 hetes, hipertrófiás - még a kompenzatórikus fázisban lévő - SHR-eket véletlenszerűen két csoportra osztottunk. Az egyik csoport nem kapott kezelést (SHR-C), míg a másik csoport L-2286-ot kapott (vízoldékony PARP-gátló) 5 mg/kg/nap 46 hétig (SHR-L). A harmadik csoport kortárs normotenzív kontroll volt (CFY).

A kísérletek megfeleltek az U.S. National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, felülvizsgált 1996) által előírt Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, valamint a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Állatkísérleteket Vizsgáló Bizottsága által elfogadottak voltak.

### *Gravimetriás paraméterek*

Az állatokat ketamin hidroklorid túladagolásával altattuk túl, melyet intraperitonealisan adtuk nátrium heparinnal együtt. A pitvarokat és a nagy ereket leválasztottuk a kamrákról, megmértük a kamrák tömegét, ezt normalizáltuk a testtömegre és a jobb sípcsont hosszára (szívizom hipertrófia mértékét jelzi). A nedves tüdő/száraz tüdő hányadosát is megmértük (tüdőpangást jelzi).

### *Invazív vérnyomásmérés*

Minden kezelési csoportból öt patkányt a hipertenzív szívelégtelenség modellben ketamin hidrokloriddal (i.p.) elaltattunk és polietilén katétert vezetünk a bal comb artériába. A vérnyomást CardioMed Systemmel mértük meg (CM-2005).

### *Plazma B-típusú nátriuretikus peptid szint meghatározása*

A vérmintákat EDTA-t tartalmazó Lavender Vacutainer csövekbe vettük le. A plazma B-típusú nátriuretikus peptid-45 szintjét (BNP-45) enzimátikus immunoassay módszerrel mértük meg.

### *Szövettan*

Formalinban fixált kamrákat lemetszettük és paraffinba ágyasztuk. 5 µm vastagságú metszeteket vágunk a bázistól a csúcsig. Az 1 mm-enként nyert szeleteket megfestettük. A metszeteket pikroszirusz vörössel vagy Masson trikróm festésével festettük meg, hogy detektáljuk az intersticiális fibrózis mértékét. A metszeteket NIH ImageJ program segítségével elemeztük.

### *Western blot analízis*

A szív mintákból 50 mg-ot jéghideg homogenizáló pufferben dolgoztuk fel, amely 8-as pH-ju 50 mM-os Tris puffert tartalmazott (valamint 1:100-szoros hígításban 50 mM nátrium metavanadátot) és 2x-es töménységű SDS-poliakrilamid gél elektroforézis minta pufferben folytattuk tovább a feldolgozást. A nátrium metavanadátot foszfatáz inhibitoroként használtuk. A fehérjéket 10 vagy 12%-os SDS-poliakrilamid gélben választottuk szét. Blokkolás után (2h 3%-os zsírmentes tejjel Tris pufferált sóoldatban) a membránokat egy éjszakán át 4°C-on az elsődleges antitesttel inkubáltuk, majd másnap a másodlagos antitesttel. A kialakult komplexeket az „enhanced” kemilumineszcencia módszerével tettük láthatóvá. Szkennelés után az eredményeket a NIH ImageJ program segítségével értékeltük.

### *A szívfunkciók noninvazív mérése*

A kísérletek elején az összes patkányt megvizsgáltuk szívultrahanggal, hogy az esetleges kardiális abnormalitással bíró állatokat kizárjuk a vizsgálatból. A mellkason keresztüli kétdimenziós szívultrahangos vizsgálatokat inhalációs anesztézia segítségével végeztük a kísérlet kezdetén és az eutanázia napján. A patkányokat 1,5% izoflurán és 98,5% oxigén keverékével altattuk. A mellkasukat leszórtelenítettük, akusztikus gélt tettünk rá és melegítő padot használtunk, hogy fenntartsuk a normális hőmérsékletüket. Az állatokat bal oldali oldalfekvő pozícióban vizsgáltuk. A szív dimenzióit és funkcióit a rövid és hossz tengelyi metszetekből vizsgáltuk a középső papilláris szintjében VEVO 770 nagy felbontású ultrahang rendszerrel (VisualSonics, Toronto, Canada) 25 MHz-es transzducerrel.

### 3. Következtetések

#### 3.1. A PARP gátlás kardioprotektív hatása posztinfarktusos szívelégtelenség modellben

Kísérletünk megerősítette a munkacsoportunk által korábban már leírt eredményt, hogy a PARP-gátlóknak védő hatása van posztinfarktusos remodelinggel szemben. Jelenlegi tanulmányunk írta azonban le először, hogy a PARP gátlás aktiválhatja az Akt-1/GSK-3 $\beta$  túlélést segítő jelátviteli útvonalat a posztinfarktusos szívelégtelenségben. Ezen kívül összehasonlítottuk a PARP gátlás hatását az ACE gátlás hatásával is.

Egyre több eredmény szól amellett, hogy a PI3K/Akt jelátviteli útvonal elősegíti az adaptív szívizom hipertrófia kialakulását úgy, hogy a szívizom sejtek aktivációja a PI3K/Akt aktiválása által nem vezet maladaptív hipertrófiához. Az ACE gátlás szintén befolyásolta az Akt-1 aktivációját. Kísérletünkben az ISO az Akt-1<sup>Ser473</sup> foszforilációját fokozta és ezt a PARP és ACE gátlás tovább növelte. Az L-2286-os PARP gátló szignifikánsan nagyobb Akt-1 aktivációt okozott, mint az enalapril. A GSK-3 $\beta$ <sup>Ser9</sup> legnagyobb foszforilációja (tehát a gátlása) az L-2286-tal kezelt csoportban volt. Az enalapril szignifikánsan kisebb GSK-3 $\beta$ <sup>Ser9</sup> gátlást okozott.

A MAPK közé tartozó ERK, JNK, és p38 aktiválható az AngII által. A MAPK pontos szerepe még mindig vitatott a krónikus HF-ben. Az ERK1/<sup>2</sup>Thr183-Tyr185 mérsékelt foszforilációját csökkentette az ISO kezelés, az összes többi kezelés viszont növelte. Korábbi eredmények leírták, hogy az ERK1/2 aktivációja koncentrikus szívizom hipertrófiát okoz megnövekedett szívfunkcióval és egerekben a MEK1-ERK2 megvédi a szívet az iszkémia által indukált apoptózistól. Kísérletünkben az ISO kezelt csoportban a p38<sup>Thr180-Gly-Tyr182</sup> kissé volt csak foszforilálva és a többi kezelés szignifikánsan növelte a p38<sup>Thr180-Gly-Tyr182</sup> foszforilációját. A JNK esetében az ISO alkalmazása szignifikánsan csökkentette a foszforilációt és mind az L-2286, mind az enalapril kezelés növelte a JNK aktivációját.

A PKC pan  $\beta$ II<sup>Ser660</sup> és a PKC  $\alpha$ / $\beta$ II<sup>Thr638/641</sup> foszforilációja fokozódott az ISO okozta MI-ben, de ez csökkent PARP vagy ACE gátlás alkalmazásával. A PARP gátló L-2286 hatásosabban csökkentette a prohipertrófikus PKC  $\alpha$ / $\beta$  aktivációját, mint az ACE-inhibitor enalapril. Nagyon hasonló foszforilációs eredményeket kaptunk a PKC $\delta$ <sup>Thr505</sup> és a PKC $\zeta$ / $\lambda$ <sup>Thr410/403</sup> esetében. A PKC $\epsilon$ <sup>Ser729</sup> többféle stressz hatására is aktiválódhat. Tanulmányunkban a PARP

gátlás pozitív hatást (aktivációt) gyakorolt, ami a stressz helyzetekben az adaptív változásokért felelős, míg más PKC ( $-\alpha$ ,  $-\beta$ ,  $-\zeta$ ,  $-\delta$ ) izoformák szintje csökkent, amelyek a maladaptív hipertrófiáért és a remodelingért felelősek a posztinfarktuszos állatokban.

Az általunk használt posztinfarktuszos modellben a szívultrahangos paraméterek - szisztolés LV funkció, fal vastagság, LVESV, LVEDV - rosszabbodtak voltak az ISO kezelt csoportban, mint a kontrol állatokban. Ezt a különbséget a kialakult miokardiális fibrózis és a szívizom sejtek hipertrófiája okozhatta. Az enalapril kezelés is szignifikánsan csökkentette ezt a rosszabbodást, de a PARP-gátló kezelés sokkal kedvezőbben hatott rá. Érdekes módon, a LVEDV változatlan maradt az ACE és a PARP gátló kezelés ellenére. A PARP inhibitor L-2286 valószínűleg a túlélést segítő jelátviteli útvonalak (különösen az Akt-1/GSK-3 $\beta$ , PKC- $\epsilon$ ) aktiválásával és a prohipertrófikus útvonalak gátlása révén (PKC  $-\alpha/\beta$ ,  $-\zeta/\lambda, \delta$ ) fejti ki kedvező hatását.

### *3.2. L-2286 hosszantartó alkalmazásának hatása a magas vérnyomás okozta szívelégtelenségre*

Második kísérletünk legfőbb eredménye az volt, hogy bizonyítottuk, a nukleáris PARP enzim gátlásával csökkenthető a nukleáris proteinek ADP-ribozilációja, kedvezően befolyásolhatóak a megváltozott jelátviteli útvonalak és ezzel megelőzhető a hipertenzív kardiopathia végstádiumú szívelégtelenségbe való átmenete, mert megtartható a szív struktúrája és funkciója is. SHR-t használtunk kísérletünkben, amely a magas vérnyomás állatmodellje és sok tekintetben hasonló az emberi esszenciális hipertóniához. Kísérletünket az SHR-ekkel a hipertenzív kardiopátia kompenzált fázisában kezdtük, amikor a balkamra hypertrophia markáns jelei voltak már észlelhetők (30 hetes korukban) és a vizsgálat végén, 46 hét elteltével a szívelégtelenség nyilvánvaló jeleit detektáltuk bennük. A hosszantartó magas vérnyomás hatására kialakuló szívelégtelenség az irodalom alapján különböző mechanizmusokkal magyarázható, de az oxidatív stressz és a jelátviteli utak abnormális változásai állnak a betegség hátterében az általánosan elfogadott magyarázatok szerint. Emberi mintákban és állat modellekben is a magas vérnyomás együtt jár az oxidatív stressz kialakulásával az érrendszerben, azaz a ROS nagyobb mennyiségű termelésével, ami lehet az oka és a következménye is a hipertóniának.

Tanulmányunkban megvizsgáltuk a PARP gátlás hatását SHR-ken, akik kardiális hipertrófiával, fibrózissal rendelkeztek már a magas mechanikus és oxidatív stressznek köszönhetően, de a vizsgálat elején szívelégtelenség még nem alakult ki náluk, azonban a vizsgálat végére a kezeletlen csoportban a szívelégtelenség típusos jeleit (gravimetriás paraméterek, naponta megfigyelés) mutatták.

Kísérletünkben a plazma-BNP szintje mindkét SHR csoportban magasabb volt. A szívizom sejtek általi megemelkedett BNP termelés és kibocsátás a hipertóniában kompenzatórikusnak tűnik a kamrai túlterhelés miatt. A Framingham tanulmány kimutatta azonban, hogy az emelkedett plazma-BNP fontos prognosztikai faktor szívelégtelenségben. Ezt az eltérést a PARP gátlás képes volt csökkenteni és ezzel együtt a kezelt csoport túlélése is javult. Ha a szív hosszabb periódusokon át emelkedett terheléssel találkozik, akkor hipertrófiás megnagyobbodással válaszol a megnövekedett követelményekre. Sokféle jelátviteli szabályozó képes befolyásolni a szívizom tömegét, beleértve olyanokat is, amelyek képesek befolyásolni a gén expressziót, az apoptózist, citokinek felszabadulását és a növekedési hormonok/faktorok jelátvitelét. Egyikük az Akt-1/GSK-3 $\beta$  útvonal, melyet a PARP-gátló kezelés kedvezően befolyásolta. Tanulmányunkban az SHR-C csoport kisebb mértékű Akt-1/GSK-3 $\beta$  foszforilációját növelte a PARP-inhibitor. Az Akt-1 közismerten központi szerepet játszik a fiziológias hipertrófia kifejlődésében, de fontos szerepe van a kardiális angiogenezisben is, a „mammalian target of rapamycin” (mTOR) aktiválásán keresztül. Valószínűleg a nem megfelelő angiogenezis alapvető fontosságú LVH szívelégtelenséggé alakulásához. A PARP-gátlók védő szerepe a LVH szívelégtelenséggé fejlődésében részben az Akt-1/mTOR útvonalon történhet. A MAPK-ok általánosan expresszált és a szívben kifejtett hatásukat intenzíven tanulmányozzák. Egyre több kísérlet arra utal, hogy a MAPK kaskád komplex befolyásolása eredményes megközelítés lehet a szívizom sejtek hipertrófiája és a HF kezelésében. Tanulmányunkban az SHR-C-ben található emelkedett p38, JNK aktiváció csökkent, míg az ERK aktivációja növekedett az L-2286 hatására. Míg az ERK-et leginkább növekedési válaszokkal kapcsolatba hozzák összefüggésbe, addig a p38 és a JNK-ot sejtkárosító hatásokkal.

Az ERK aktivációja szívizom hipertrófiát és nagyobb túlélést eredményez, a gátlása szívizomsejtek apoptózisához járul hozzá. A szívspecifikus, folyamatosan aktivált MEK1 segíti a szívizom hipertrófia kifejlődését a szívfunkciók gyengülése nélkül, vagy az állatok

hosszú távú túlélését, ez arra utal, hogy az ERK aktivitása a kompenzált hipertrófia kialakulását okozza. Tanulmányunkban, a PKC pan $\beta^{\text{Ser660}}$ ,  $\alpha/\beta^{\text{Thr638/641}}$ ,  $\delta^{\text{Thr505}}$  és a  $\zeta/\lambda^{\text{Thr401/403}}$  foszforilációja csökkent a PARP gátlás miatt az SHR-L csoportban, az SHR-C csoporthoz viszonyítva. Számos tanulmány szerint a PKC  $\alpha$  és  $\beta$  szerepet játszik a kardiális hipertrófia és a HF kialakulásában. A PKC  $\epsilon$  aktivitását növelte az L-2286 kezelés. Kísérletünkben nem volt különbség a LV szisztolés funkciókban (EF, FS) kezdetben (30 hetes korban). Ezek a paraméterek megmaradtak a CFY és az SHR-L csoportban, de csökkentek az SHR-C csoportban a kísérlet végére. Az L-2286 növelte az EF-et a vég-szisztolés átmérők csökkentésével. A hipertónia kialakulása során a balkamra geometriája megváltozik a megnövekedett nyomás és térfogat terhelés miatt, adaptációként. A magas vérnyomásban szenvedőknek az LV geometriája négyféle osztályba sorolható az LV tömeg index és az RWT alapján. Az osztályozás alapján excentrikus hipertrófiát figyelhettünk meg az SHR-C csoportban (nagyobb LV tömeg/BW és normál RWT), míg az L-2286 adása megőrizte a koncentrikus hipertrófia (nagyobb LV tömeg/BW és nagyobb RWT) állapotát, amit a kísérlet kezdetén mindkét SHR csoportban tapasztaltunk. Tehát, az L-2286 hatástalansága a szeptum és a PW vastagság csökkentésére kedvező hatásként fogható fel, mert így hozzájárult a koncentrikus hipertrófia fenntartásához.

#### 4. Összefoglalás

Az elmúlt két évtized során in vitro tanulmányok és preklinikai betegségmodellek eredményei azt mutatták, hogy a reaktív oxigén és nitrogén szabad gyökök alapvető fontosságúak szívizom hipertrófia, szívelégtelenség, kardiomiopátiák és kardiovaszkuláris öregedés során a károsodások kialakításában. Ezen állatmodellekben az antioxidáns hatású PARP-gátló kezelésnek szignifikáns védő hatása volt. Ezért újabb és újabb antioxidánsok és PARP-gátlók fejlesztése, valamint preklinikai vizsgálatai indultak el különféle kardiovaszkuláris és egyéb betegség modellekben.

Kísérleteinkben a PARP-gátló L-2286 kedvezően befolyásolta posztinfarktusos remodellinget és lassította a hypertenzív szívelégtelenség kialakulását. Ezen hatások hátterében pedig a PI-3-kináz-Akt-1<sup>Ser473</sup> és a PKC  $\epsilon^{\text{Ser729}}$  jelátviteli utakra kifejtett kedvező hatás áll.

## **Köszönetnyilvánítás**

Kísérleteinket a Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetben, valamint az I. sz. Belgyógyászati Klinikán végeztük, a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karán 2005 és 2008 között.

Szeretnék köszönetet mondani tanáromnak és programvezetőmnek, Prof. Dr. Tóth Kálmánnak, aki irányította tanulmányaimat, támogatott és hasznos tanácsokkal látott el.

Köszönetet mondok Prof. Sümegi Balázsnak, aki a biokémiai gondolkodásra tanított. A PARP gátlók terén segítette munkámat és zavartalan körülményeket biztosított számomra intézetében.

Igazán hálás vagyok Prof. Hideg Kálmánnak, aki a szabadgyökök okozta károsodások kialakulására tanított meg és irányította a munkámat a PARP gátlók kardioprotektív hatásának tanulmányozásában.

Köszönettel tartozok Dr. Halmosi Róbertnek kitűnő munkájáért és az echokardiográfiás vizsgálatokban végzett segítségéért.

Köszönettel tartozok még Dr. Habon Tamásnak, Dr. Szabados Eszternek, Solti Izabellának, Dr. N. Kiss Gyöngyinek, Plózer Enikőnek, Szabó Alízna, Bognár Eszternek, Dr. Kereskai Lászlónak, Dr. Kálmán Endrének. Hálás vagyok Horváth Bertalannak, Girán Lászlónak, Pásztor Istvánnának, Halász Helénának a laboratóriumi munkában nyújtott segítségért.

Köszönöm az összes barátomnak, a családomnak a bátorítást, melyet tanulmányaim és munkám során nyújtottak.



### **A disszertációval kapcsolatos közlemények**

BARTHA E, KISS GN, KALMAN E, KULCSÁR G, KÁLAI T, HIDEG K, HABON T, SUMEGI B, TOTH K, HALMOSI R. Effect of L-2286, a poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor and enalapril on myocardial remodeling and heart failure. J Cardiovasc Pharmacol 2008;52:253-61. (IF: 2.023)

BARTHA E, SOLTI I, KERESKAI L, LANTOS J, PLOZER E, MAGYAR K, SZABADOS E, KÁLAI T, HIDEG K, HALMOSI R, SUMEGI B, TOTH K. PARP inhibition delays transition of hypertensive cardiopathy to heart failure in spontaneously hypertensive rats. Cardiovasc Res 2009; 83:501-510. (IF: 5.947)

### **Egyéb közlemények**

PÁLFI A, TÓTH A, KULCSÁR G, HANTÓ K, DERES P, BARTHA É, HALMOSI R, SZABADOS E, CZOPF L, KÁLAI 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 2005;315:273-82. (IF: 4,335)

PALFI A, BARTHA E, CZOPF L, MARK L, GALLYAS F Jr, VERES B, KALMAN E, PAJOR L, TOTH K, OHMACHT R, SUMEGI B. Alcohol-free red wine inhibits isoproterenol-induced cardiac remodeling in rats by the regulation of Akt1 and protein kinase C alpha/beta II. J Nutr Biochem 2009;6:418-425. (IF:3.507)

## Előadáskivonatok

GY N KISS, P DERES, K HANTO, E BOGNAR, E BARTHA, B SUMEGI, Z BERENTE: Do PARP inhibitors affect myocardial metabolism? Barcelona, Spain, Annual Congress of European Society of Cardiology and World Congress of Cardiology, Sep 2-6., 2006, Barcelona, Spain. Abstract book 199.

BARTHA E, PALFI A, MARK L, KISS GN, HALMOSI R, SZABADOS E, KALMAN E, TOTH K, SUMEGI B. Effect of alcohol-free red wine extract on isoproterenol induced cardiac remodeling in rats. Pecs, Hungary, Vth Congress of International Symposium on Myocardial Cytoprotection, Sept 27-30, 2006, Pécs, Hungary.

BARTHA É, PÁLFI A, MÁRK L, KISS GN, HALMOSI R, SZABADOS E, SÜMEGI B. Alkoholmentes vörösbor-kivonat hatása az isoproterenol által kiváltott miokardiális remodellingre és egészséges patkányszívre. Magyar Kardiológusok Társasága 2007. évi Tudományos Kongresszusa, 2007. május 9-12., Balatonfüred, Card. Hung. Suppl. A, 2007;37:A34.

HALMOSI R, BARTHA É, PÁLFI A, KÁLMÁN E, HIDEG K, SÜMEGI B, TÓTH K. PARP-gátlók és ACE-inhibitorok hatása az isoproterenol-indukálta szívelégtelenség progressziójára. Magyar Kardiológusok Társasága 2007. évi Tudományos Kongresszusa, 2007. május 9-12., Balatonfüred, Card. Hung. Suppl. A, 2007;37:A17.

E BARTHA, R HALMOSI, GY Kulcsár, GY N KISS, E KALMAN, B SUMEGI, T KÁLAI, K HIDEG, K Toth: Effect of PARP inhibitors and ACE inhibitors on the progression of isoproterenol-induced heart failure. Annual Congress of European Society of Cardiology, Sept 1-5, 2007, Vienna, Austria. Abstract book 59.

BARTHA É, HALMOSI R, SOLTI I, PÁLFI A, KÁLMÁN E, SÜMEGI B, KÁLAI T, HIDEG K, TÓTH K. PARP- és ACE-gátlók kedvező hatása az isoproterenol-indukálta szívelégtelenség progressziójára. Magyar Szabadgyök Kutató Társaság IV. Kongresszusa, 2007. október 11-13., Pécs, Folia Hepatologica Suppl. 3, 2008:11:10.

BARTHA É, MAGYAR K, SOLTI I, KOVÁCS K, HIDEG K, SÜMEGI B, HALMOSI R, TÓTH K. Poli(ADP-ribóz)polimeráz enzim gátlásának hatása fiatal spontán hipertenzív patkány szívekre. Magyar Kardiológusok Társasága 2008. évi Tudományos Kongresszusa, 2008. május 7-10., Balatonfüred, Card. Hung. Suppl. B, 2008;38:B8.

E. BOGNAR, GY. N. KISS, ZS. SARSZEGI, E. BARTHA, I. SOLTI, B. SUMEGI, Z. BERENTE. Ploy(ADP-ribose)Polymerase (PARP) inhibitor HO3089 enhanced post ischemic, myocardial glucose uptake mostly by activation of AMP-activated protein kinase (AMPK)., World Congress of Cardiology 2008, May 18-21., 2008, Buenos Aires, Argentina. Circulation 2008;e162-e413, 73, P410.

E. BARTHA, R. HALMOSI, I. SOLTI, E. BOGNAR, K. KOVACS, T. HABON, T. KÁLAI, B. SUMEGI, K. HIDEG, K. TOTH. Effect of PARP inhibition on young spontaneously

hypertensive rat (SHR) hearts. Buenos Aires, Argentina, World Congress of Cardiology 2008, May 18-21., 2008, Buenos Aires, Argetina. Circulation;e162-e413, 84, P468.

BARTHA E, MAGYAR K, SOLTI I, KERESKAI L, KALAI T, HALMOSI R, HIDEG K, SUMEGI B, TOTH K. Protective effect of a quinazoline-type poly(ADP-Ribose)polymerase inhibitor against the development of hypertensive cardiomyopathy and heart failure. Scientific Session 2008 of American Heart Association, November 8-12, 2008, New Orleans, USA, Circulation, 2008;118:S\_946, Abstract book 359.

RÁBAI M, PÁLFI A, BARTHA É, TÓTH A, MAGYAR K, SÜMEGI B, TÓTH K. Vörösbor és alkoholmentes vörösbor-kivonat protektív hatásai állatkísérletes és in vitro hemoreológiai modellekben. Magyar Kardiológusok Társasága 2009. évi Tudományos Kongresszusa, 2009. május 6-9., Balatonfüred, Card. Hung. Suppl. B, 2009;39:A74.

BARTHA É, SOLTI I, KERESKAI L, PLÓZER E, MAGYAR K, LANTOS J, KÁLAI T, HIDEG K, SÜMEGI B, TÓTH K. A PARP-gátlás késlelteti a szívelégtelenség kialakulását spontán hipertenzív patkánymodellben. Magyar Kardiológusok Társasága 2009. évi Tudományos Kongresszusa, 2009. május 6-9., Balatonfüred, Card. Hung. Suppl. B, 2009;39:A39.

BARTHA E, SOLTI I, KERESKAI L, PLOZER E, MAGYAR K, KALAI T, HIDEG K, SUMEGI B, TOTH K, HALMOSI R. Protective effect of a quinasoline-type poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor against the development of hypertensive cardiopathy. Barcelona, Spain, Annual Congress of European Society of Cardiology, Aug 29- Sep 2., 2009, Barcelona, Spain. Abstract book 141.