

**Dr. Deres Péter**

**Doxorubicin kiváltotta akut kardiotoxicitás kivédése  
kísérleti antioxidáns és PARP gátló vegyületekkel**

PhD dolgozat

**Klinikai Orvostudomány  
doktori iskola**

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



Pécsi Tudományegyetem  
Orvostudományi és Egészségtudományi Koordinációs Központ  
Klinikai Központ  
I. sz. Belgyógyászati Klinika  
Pécs

**2008.**

# TARTALOMJEGYZÉK

<b>TARTALOMJEGYZÉK</b> .....	<b>1</b>
<b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE</b> .....	<b>2</b>
<b>BEVEZETÉS</b> .....	<b>3</b>
DOXORUBICIN.....	3
SZABADGYÖKÖS KÁROSODÁS.....	12
KÍSÉRLETI SZEREK.....	16
CÉLKITŰZÉSEK.....	20
<sup>31</sup> P NMR SPEKTROSKÓPIA.....	21
<b>KÍSÉRLETEK</b> .....	<b>32</b>
MÓDSZEREK.....	32
<i>Vegyületek</i> .....	32
<i>Állatok</i> .....	32
<i>Szívperfúziós kísérlet</i> .....	32
<i>NMR spektroszkópia</i> .....	33
<i>Szívteljesítmény meghatározása</i> .....	34
<i>Lipidperoxidáció és fehérje oxidáció</i> .....	35
<i>Western blot analízis</i> .....	35
<i>Sejt túlélési vizsgálat</i> .....	36
<i>Statisztikai analízis</i> .....	36
EREDMÉNYEK.....	37
<i>H-2545, H-2954</i> .....	37
A H-2545 és metabolitjának kardioprotektív hatása a doxorubicin kiváltotta károsodott miokardiális energia metabolizmusra.....	37
Antioxidáns kezelés utáni szívteljesítmény.....	40
Doxorubicin kiváltotta lipidperoxidáció és fehérje oxidáció kivédése H-2545 és H-2954 kezeléssel.....	44
Akt foszforiláció.....	45
Változatlan antineoplasztikus doxorubicin hatás H-2545 jelenlétében.....	47
<i>H-2641, H-2693</i> .....	49
A H-2641 és H-2693 kardioprotektív hatása a doxorubicin kiváltotta károsodott miokardiális energia metabolizmusra .....	49
A H-2641 és H-2693 kardioprotektív hatása a doxorubicin kiváltotta miokardiális pH csökkenésre.....	51
<i>4-hidroxi-kinazolin</i> .....	53
A 4-hidroxi-kinazolin kardioprotektív hatása a doxorubicin kiváltotta károsodott miokardiális energia metabolizmusra.....	53
A 4-hidroxi-kinazolin kardioprotektív hatása a doxorubicin kiváltotta miokardiális pH csökkenésre.....	55
Akt foszforiláció.....	55
Változatlan antineoplasztikus doxorubicin hatás PARP inhibitor jelenlétében.....	57
MEGBESZÉLÉS.....	59
ÚJ EREDMÉNYEK, MEGFIGYELÉSEK.....	65
<b>IRODALOMJEGYZÉK</b> .....	<b>66</b>
<b>SAJÁT KÖZLEMÉNYEK</b> .....	<b>77</b>
<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b> .....	<b>83</b>

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ATP	adenozin-trifoszfát
CrP	kreatin-foszfát
DHLA	dihidrolipoamid
DNS	dezoxi-ribonukleinsav
LVDP	left ventricular developed pressure (szisztolés nyomás – diasztolés nyomás)
MDA	malondialdehid
NAD	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NMR	magnáneses rezonancia
PAF	vérlemezke aktiváló faktor
PARP	poli(ADP-ribóz) polimeráz
PDK-1	foszfatidilinozitol-dependens-kináz-1
Pi	anorganikus foszfát
RNS	ribonukleinsav
ROS	reaktív oxigén szabadgyökök
SDS	Na-dodecil-szulfát
TBA	tiobarbitúrsav
TBARS	tiobarbitúrsav reaktív anyagok
TCA	triklór-acetát
TEMPOL	1-oxil-4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidin
4OHQ	4-hidroxi-kinazolin

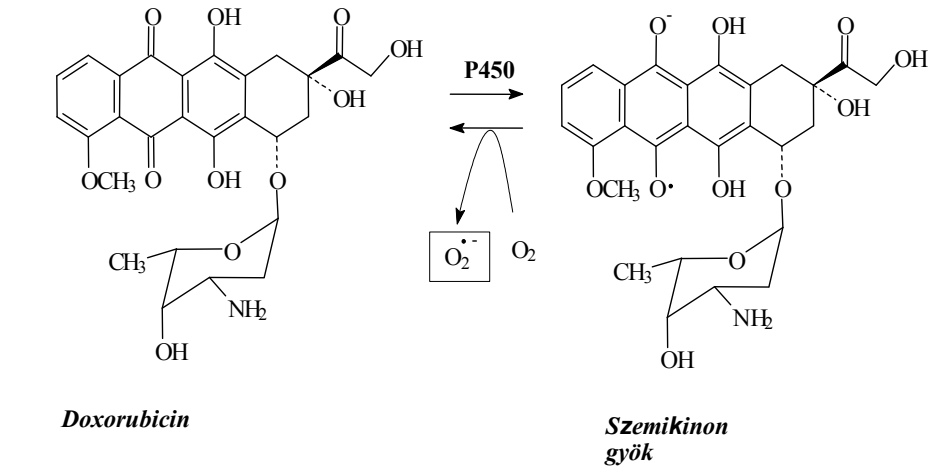
## BEVEZETÉS

### Doxorubicin

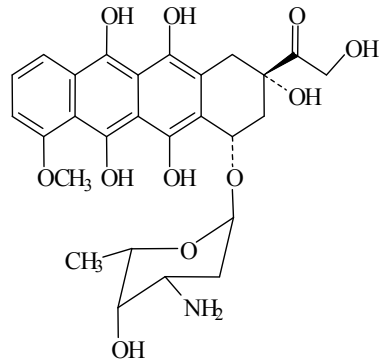
A doxorubicin, vagy más néven adriamicin, egy antraciklin antibiotikumok, az interkaláló ágensek közé tartozó kemoterápiás készítmény.

Az 1950-es években az olasz Farmitalia Research Laboratories folytatott intenzív kutatást malignus folyamatok elleni antibiotikum kifejlesztésére. A 13. századi Castel del Monte várkastélyt övező területről izoláltak egy *Streptomyces peucetius* nevű baktériumtörzsből termelődő, az akut leukémiák és limfómák kórlefolyására kedvező hatású, vörös színű vegyületet. Nagyjából ugyanezen időben francia tudósok is felfedezték ugyanezen vegyületet. A két kutatócsoport megegyezvén, hogy a vegyület első neve az olasz feltalálási helyet egykoron elfoglaló törzsek után Daunii, második összetevője pedig a francia vörös színt jelentő ruby lesz, elnevezték a vegyületet daunorubicinnek. 1967-ben a *Cancer* tudományos újságban leírták azonban a daunorubicin rendkívül kardiotoxikus hatását<sup>1,2</sup>.

A Farmitaliánál ezután egy hasonlóan jó kemoterapeutikumot kerestek, kevesebb mellékhatással. A *Streptomyces peucetius* törzsnél N-nitroso-N-metil uretán kezeléssel mutációt hoztak létre, mely mutáns sejtvonal egy ugyancsak vörös, de egy hidroxil-csoporttal kibővített struktúrájú szert termelt. Bár ez a szernek, melyet az Adriai tenger után Adriamicinnek, később a kémiai konvenciók megtartása érdekében doxorubicinnek kereszteltek el - ugyan nagyobb terápiás indexszel rendelkezett, és indikációs területe is kibővült - a kardiotoxikus hatása változatlanul megmaradt<sup>3,4</sup>. A doxorubicinnak jelenleg kb. 2000 módosított változata létezik.



NADPH-  
kinon-  
oxidáz



**Doxorubicin hidrokinon**

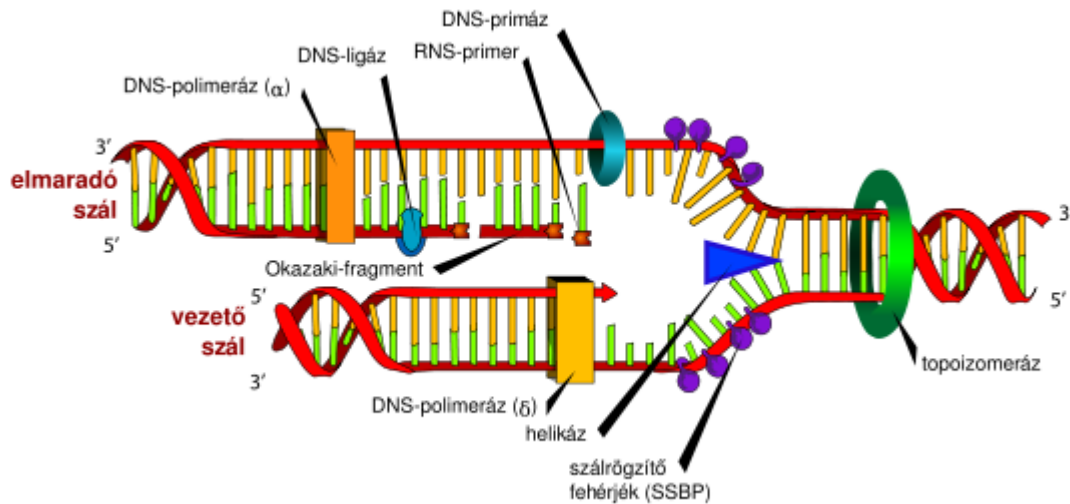
1.1 ábra: A doxorubicin struktúrája és metabolizmusa. A doxorubicin egy aminocukorból és egy naftacénkinin adriamicinon magból áll, melyeket glikozidos kötés tart össze. Az adriamicinon a citokróm P-450 segítségével szemikinonná redukálódik. Aerob körülmények közt a doxorubicin szuperoxid gyök keletkezése mellett regenerálódhat. NADPH-kinon-oxidáz révén adriamicinonból a detoxikálás folyamán hidrokinon keletkezik, mely a vizelettel választódik ki.

Arcamone és munkatársai 1969-ben hozták létre azt a mutáns törzset, a *Streptomyces peucetius subspecies cesius* ATCC 27952-t, mely termeli a doxorubicint<sup>5</sup>. Stohl munkacsoportja izolálta a *dox A* nevű gént, mely a daunorubicin doxorubicinná történő alakításáért felel. A termelés nagyipari méretének megteremtése Hutchinson nevéhez fűződik, akinek munkacsoportja a doxorubicin szintéziséhez a *Dox A* kódoló plazmidot, továbbá olyan enzimek inaktiválását eredményező mutációkat vezetett be, melyek meggátolják, hogy a keletkezett anyagból haszontalan, baumicin-szerű glikozidok képződjenek<sup>6</sup>. A doxorubicin jelenleg daunorubicinből, illetve tiszta kémiai szintézis útján egyaránt előállítható<sup>5,7,8</sup>.

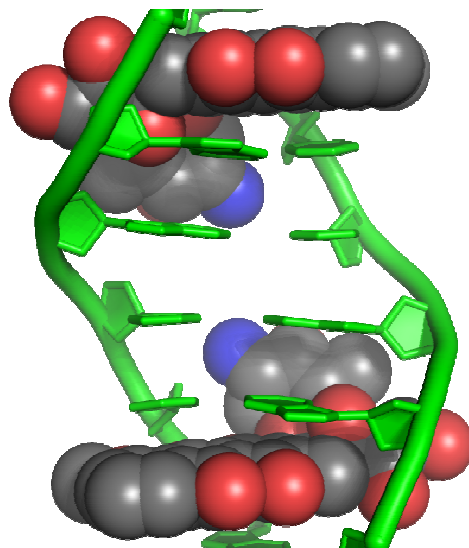
A doxorubicin molekulájában egy tetraciklusos gyűrű vörös-pigment naftacénkinin maghoz glikozidkötésen keresztül daunózamin aminocukor kapcsolódik (1.1 ábra).

Hatásmechanizmusa teljes mértékben máig felderítetlen, azonban a szakirodalom nagy része úgy véli, hogy a daganatellenes hatás a doxorubicin molekula kromofór planáris rész DNS szálak közti beékelődésének köszönhető, míg az aminocukor rész a DNS kis árkában, a beékelődési hely közvetlen szomszédságban lévő bázisokkal lép kölcsönhatásba<sup>9-11</sup>. Ezáltal a topoizomeráz II-t gátolja a következő módon:

A dupla-helix elrendeződés, mely a DNS-re jellemző, DNS, valamint RNS átíráskor elengedhetetlenül fel kell, hogy nyíljon, a bekötődő replikációs és transzkripciós fehérjék számára. A folyamatot a helikázok katalizálják. Eukarióta sejtekben a sejtmag fő fehérjéje, az alfa és béta variánssal rendelkező topoizomeráz II végzi ezt a feladatot úgy, hogy 30-90 kb távolságra felismerve a DNS ismétlődő szekvenciáit, a DNS két szálát szétválasztja mindkét DNS szál elvágásával, majd az elvágott DNS szálakat újraforrasztja (1.2 ábra).



1.2 ábra: Replikációs villa: A DNS átírásáért egy komplex struktúra összehangolt működése felelős. Ennek egyik eleme a topoizomeráz. A helikázok a két DNS szál közti hidrogén-hidakat vágják szét. Az  $\alpha$ -DNS polimeráz az elmaradó szál, a  $\delta$ -DNS-polimeráz a vezető szál átírását katalizálja. A DNS-polimerázok által nem lehetséges a DNS lánc első tagjának 5' végét az újonnan beépült rész 3' OH csoportjához kötni; ezt a folyamatot a DNS-ligáz katalizálja. A DNS-polimerázok 5'→3' irányú működése miatt az elmaradó szálon szükséges RNS primerek beépítéséért a DNS-primáz felel, melyekhez így az Okazaki-fragmentek szintetizálódhatnak. A szálrögztítő fehérjék akadályozzák meg a DNS szálak idő előtti újraegyesülését, valamint a nem kívánatos másodlagos struktúrák spontán létrejöttét.



1.3 ábra: Doxorubicin interkaláció: A doxorubicin a DNS szálak közé ékelődve a kettős helix alakját megváltoztatja, s gátolja a topoizomeráz II működését

Az enzim a DNS különböző formáit egymásba tudja alakítani, szabályozza a DNS fel- és letekerését, csomókat és gombolyagokat tud az örökítőanyagban megoldani. A topoizomeráz bármely funkciójában bekövetkező károsodása a sejtciklus és fehérjeszintézis szempontjából katasztrofális következményekkel járna. A doxorubicin a DNS kettős spirált alkotó szálak közé beékelődik, megváltozik a DNS konformációja (1.3 ábra); stabilizálja a topoizomeráz II komplexet, miután az a replikáció érdekében a DNS szálakat eltörte. Ezáltal megakadályozza, hogy a DNS kettős lánc leváljék a komplexről, megállítva a replikáció folyamatát. A sejtciklus így blokkolódik<sup>12-18</sup>. A folyamat főként a gyors sejtciklussal rendelkező sejtek (csontvelői progenitor sejtek, immun-rendszer elemei, hajhagyma sejtjei, gonádok, daganatok) esetében fejt ki sejtölő hatását.

A klinikumban nagy népszerűsége tett szert e rendkívül lipofil, a szervezetben hosszú félélettíddel rendelkező gyógyszer; a rosszindulatú daganatok számos változata ellen használatos kemoterápiás készítmény (kereskedelmi nevei: Adriablastina PFS/RDU, Caelyx, Myocet, Doxorubicin-TEVA, Adriamycin PFS/RDF, Rubex). Az akut leukémia, Wilms-tumor, neuroblasztóma, mellrák, Hodgkin és non-Hodgkin limfómák, hepatómák, pajzsmirigy daganatok, petefészekrák a doxorubicin adásának indikációs körébe tartoznak. Ezen kívül gyomor-, nyaki-, here-, endometrium és méhnyakrákoknál, valamint mielóma és azzal ekvivalens kórképekben is alkalmazható, áttét nélküli húgyhólyagránál intravesicalisan is.

Klinikai felhasználhatóságának azonban gátat szab kardiotoxikus mellékhatása<sup>19</sup>. Irodalmi adatok szerint előrehaladott malignómáknál alkalmazott többszörös doxorubicin injekciók hatására a betegek 30%-nál alakult ki nekroenzimek (CK, GOT, LDH) emelkedése mellett QRS hullám redukcióval, hipotóniával, 150/perc feletti szívfrekvenciával járó szívelégtelenség, mely kórkép pozitív inotróp szerekre refrakternek bizonyult, továbbá keringéstámogató eszközök használata sem javított a prognózison<sup>20</sup>. Ha a doxorubicin kumulatív adagja meghaladja az 550 mg/testfelszín m<sup>2</sup>-t, a dilatatív kardiomiopátia, és végül a



szívelégtelenség előfordulása meredeken nő. A károsodás sokszor a kezelés befejeztét követő 20 év elteltével jelentkezik<sup>21</sup>. A doxorubicin kiváltotta kardiomiopátiában szenvedő betegeknél tapasztalható ultrastruktúrális elváltozások közt kiemelendő a miofibrillum csökkenés, szarkoplazmatikus retikulum dilatáció, citoplazmatikus vakuolizáció, lizoszómák számának emelkedése, mitokondrium duzzadás. Ezen elváltozásokat nyúl, patkány, egér állatmodelleken is megfigyelték<sup>22-28</sup>. A doxorubicin kiváltotta szívizomkárosodás humán eseteihez nagyban hasonló (refrakteritás, szívelégtelenség) karakterisztikájú elváltozást észleltek patkány modellek esetében is; a doxorubicin kiváltotta kardiotoxicitás tanulmányozására a patkánymodellek elfogadottak, a tudományos világban széleskörűen elterjedtek<sup>29-31</sup>.

A tudomány-történelem során a doxorubicin által kiváltott szívizom károsodás kialakulására számos elmélet született: mitokondrium diszfunkció kialakulása, kalciumion-egyensúly felborulás, Na-K ATPáz, Ca-ATPáz, adenilát-cikláz funkciójának megváltozása<sup>32-38</sup>. A legelterjedtebb elméletek a következőkben foglalható össze:

A kalcium túltöltési elmélet szerint az antraciklinek az intracelluláris kalcium koncentrációjának kritikus növekedését okozzák. Olson és munkatársai<sup>24</sup>. doxorubicinnal kezelt állatok kamraizomzatában és mitokondriumában kalcium felhalmozódást figyeltek meg. A mitokondriális kalcium felszaporodás pedig az oxidatív foszforiláció során keletkező ATP vesztését okozza. Számos tanulmány közölte, hogy a doxorubicin a szívizomban kalcium transzport rendellenességeket okoz. Ezek egyrészt a Na/K ATP-áz, valamint a Na/Ca antiporter, Ca-ATP-áz, és feszültségfüggő Ca-csatornák érintettségére vonatkoznak. 2000-ben egy kutatócsoport kimutatta, hogy az adriamicin a szarkoplazmás retikulum Ca-ATP-áz-2 receptorok sűrűségének csökkenését okozta. A szerzők összekapcsolván a kalcium túltöltés elméletét a szabadgyök elmélettel, úgy gondolják, hogy a „down- reguláció” hidrogénperoxid

közvetítésével érvényesül. Valószínűnek tűnik azonban, hogy a kalcium felhalmozódás az antraciklin toxicitásnak inkább okozata, semmint kiváltója. Sőt, Jensen szerint a szívizom diszfunkció inkább a miofibrilláris aparátus relatív kalcium hiányának következménye; Ezzel összecsengenek azon vizsgálatok, ahol a doxorubicin kiváltotta kontrakció csökkenést a perfuzátum kalcium koncentrációjának növelésével védték ki<sup>39-42</sup>.

A metabolit elmélet szerint az antraciklinek C-13-as karbonil csoportja a szívben C-13 alkohollá, főként doxorubicinollá metabolizálódhat. A doxorubicinol kardiotoxikus hatását számos közlemény ismertette (gátolja a szarkoplazmás retikulum ATP-ázát, rontja a szisztolés és diasztolés funkciót), emellett doxorubicin adását követően a doxorubicinol idő- és dóziszfüggő miokardiális felhalmozódását figyelték meg. Állatkísérletes modellen adriamicin alkalmazását követő első órában, amikor az elérte a szívben mérhető csúcskoncentrációját, a doxorubicinol kimutathatatlan volt, azonban 24 óra múlva a miokardiális doxorubicinol szintje háromszorosa volt a májban mért értékekhez képest, holott a máj és szív doxorubicin koncentrációja megegyezett<sup>43,44</sup>.

Más elméletek szerint az antraciklinek arachidonsav metabolizmust befolyásoló tulajdonsága játszik a toxicitásban szerepet. Patkány modellen megfigyelhető, hogy az adriamicin növeli a prosztaglandinok és tromboxánok szintézisét. A vérlemezke aktiváló faktor (PAF) szerepét is felvetették ezen szívizom károsodás kapcsán; PAF antagonisták a doxorubicin kezelt patkányokban ultrastrukturális károsodás kialakulását segítette elő<sup>45</sup>.

A doxorubicin elősegíti a hízósejtekből történő hisztamin kiáramlást. Tekintettel arra, hogy szabad gyökök szintén hisztamin kiáramlást képesek kiváltani, az ok-okozati összefüggés bonyolult; annál is inkább, mivel a hisztamin H<sub>2</sub> receptoron keresztül növeli a kalcium influxot, H<sub>1</sub> receptoron keresztül pedig arritmogén, mely felveti a szabadgyök-hisztamin-kalcium háztartás közötti kapcsolatot.

Vannak, akik a doxorubicin kiváltotta miokardiális károsodást a daunózamin molekula részlet kardiális aktinhoz történő nagy affinitásával, így károsodott fiziológias kontrakcióval magyarázzák. Emellett a szívizom mitokondrium membrán egyik fő alkotójai a kardiolipin nevű foszfolipid. A kardiolipin nagy affinitással kötődik a doxorubicinhez, így a doxorubicin a szívizomban felhalmozódik.

A szabadgyök elmélet jelenleg a legelterjedtebb és leginkább elfogadott elmélet a doxorubicin szívizomra gyakorolt káros hatásának magyarázatára. Ezek szerint egyrészt a vas(III), antraciklinekkel történő redox reakció során, egy elektronos akceptorként viselkedve vas(II)-doxorubicin szabadgyök komplexszé alakul. A komplex, oxigént redukálva, oxigén gyökök termelődését segíti elő. Az így keletkező, főként szuperoxid és hidroxil gyökök különböző sejtalkotókat, nukleinsavat, fehérjéket, lipideket támadnak meg<sup>46</sup>. Ezen kívül a szabadgyök elmélet szerint citokróm P-450 katalizálásával a doxorubicin molekula adriamicinon részének B gyűrűje szemikinon formává redukálódik, és aerob körülmények között szuperoxid szabadgyök keletkezése mellett a molekula regenerálódik (1.1 ábra). Már kis mennyiségű doxorubicin is elég ahhoz, hogy nagy mennyiségű szabadgyök keletkezését katalizálja. Számos kinon bázisú antibiotikumról és kemoterápiás készítményről (pl.: streptonigrin, mitomycin C) tudjuk, hogy citotoxicitásuk oka a bioredukcióval történő szemikinonná alakulás következtében létrejött szabadgyök termelődés<sup>47-49</sup>.

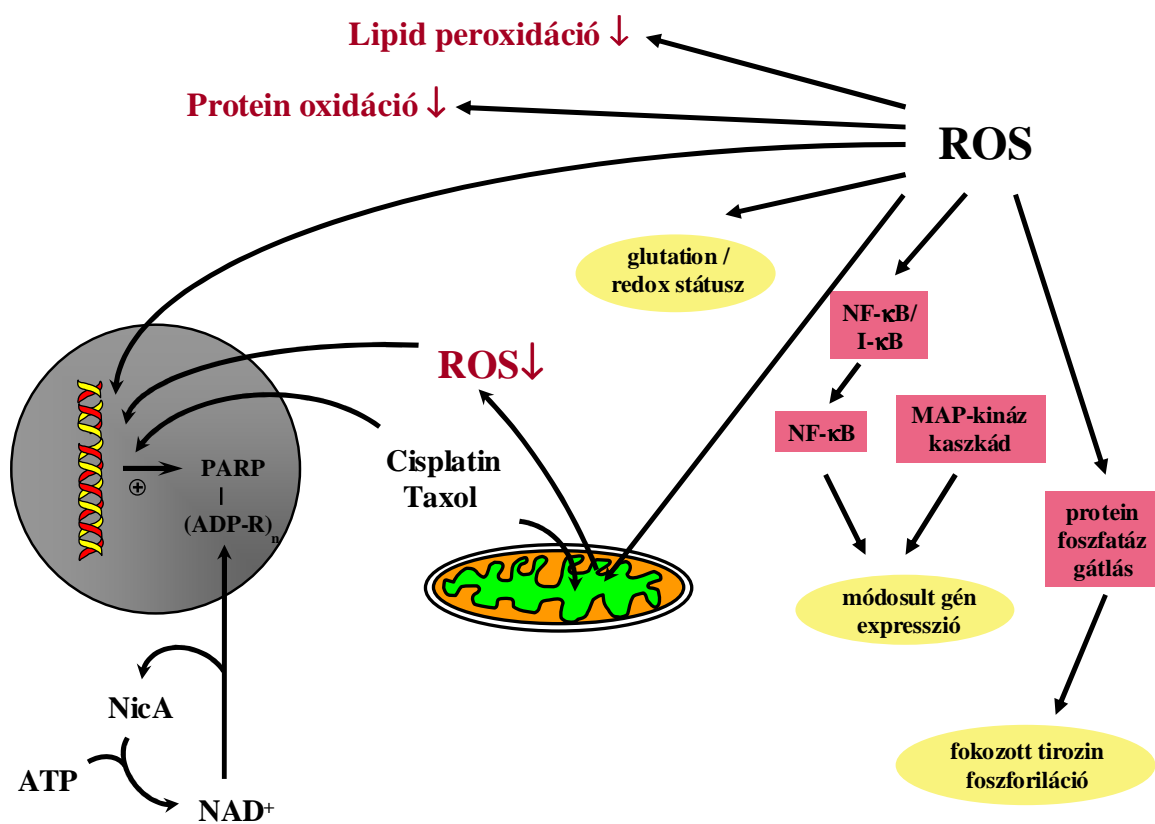
A doxorubicin kiváltotta szívizom károsodás ellen alkalmazandó szerről számos tanulmány született, melyek elsősorban a szabad gyök csapdázásán, valamint a vas komplexbe történő befogásán keresztül igyekeztek kísérleti szereikkel kardioprotektív hatást elérni.

Kiemelendők egy vaskelátorral, a dexrazoxánnal végzett tanulmányok. Mivel a flavonoidok szuperoxid-gyökfogáson túl vaskelátorok is, biztatóak voltak flavonoidokkal

folytatott kísérletek<sup>50-52</sup>. Egy diszlipidémia kezelésére használatos endogén antioxidáns molekulával, a probukollal kapcsolatos vizsgálatok kisebb-nagyobb kardioprotektív hatásról számoltak be<sup>35</sup>. N-acetilciszteinnel és E vitaminnal végzett tanulmányok ellentmondásosak. Egy munkacsoport kísérleteiben doxorubicinnal kezelt rágcsálók esetében az N-acetilcisztein és E vitamin csökkentette a letalitást, a szövettani eredményeket javította. Más munkacsoportok patkány és kutya modellen végzett megfigyelései alapján ezen szerek kardioprotektív hatással nem rendelkeztek<sup>53-57</sup>.

## Szabadgyökös károsodás

Jól ismert, hogy a szabadgyökök (ROS) számos élettani folyamatra fejthetnek ki jelentős hatást: lipidperoxidációt, fehérje oxidációt, egyes láncú DNS törést, ion csatorna gátlást, mitokondriális Ca kiáramlást okozhatnak, valamint gátolhatják a glikolízis folyamatát, a szívizom következményes energia metabolismusának és teljesítményének jelentős romlásával<sup>58-65</sup> (1.4 ábra).

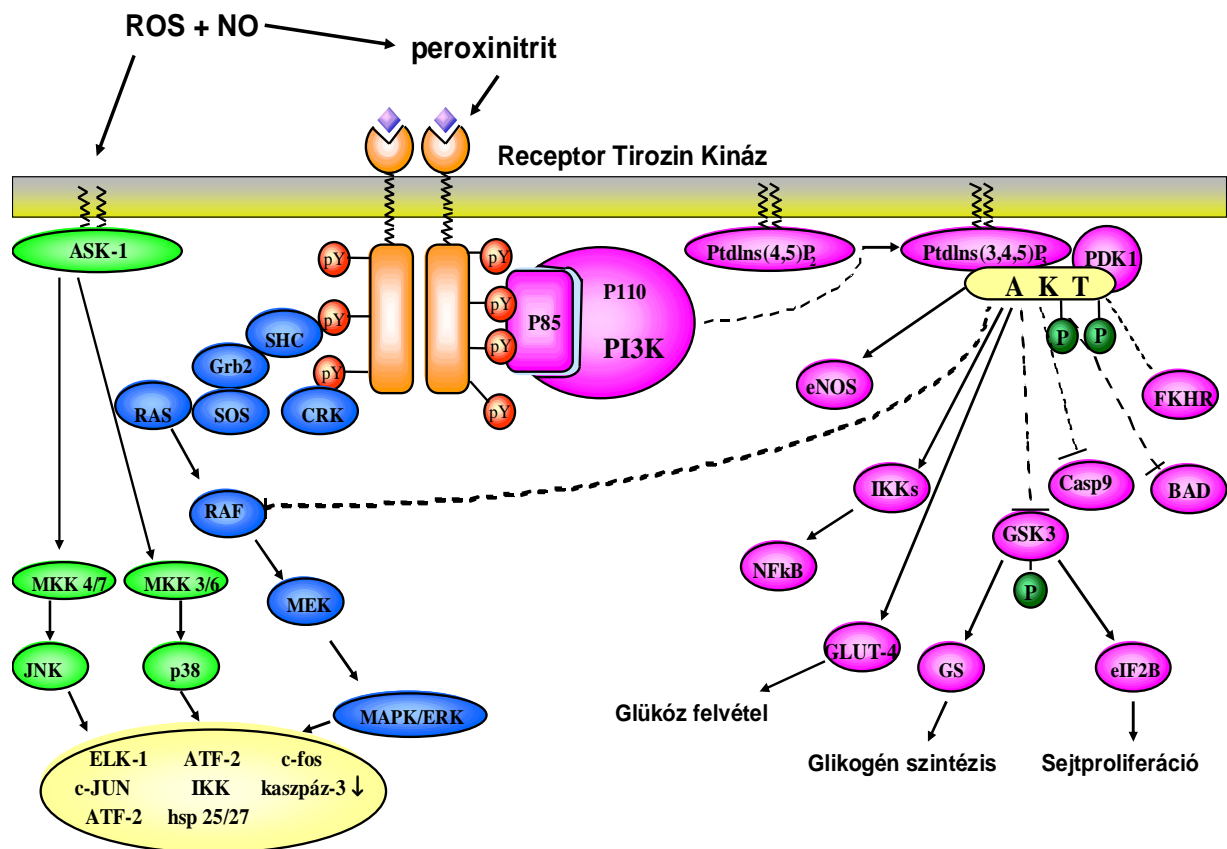


1.4 ábra: Szabadgyökök szerteágazó hatása. A reaktív szabadgyökök - számos, élettani és farmakodinámiai szempontból is jelentős - hatást gyakorolnak a sejtekben végbemenő folyamatokra.

Szuperoxid anion és nitrogén-oxid együtt peroxinitritet képezhet, mely súlyosan károsíthat számos sejtalkotót. A peroxinitrit ezen kívül a receptor-tirozin-kináz tirozin oldalláncának nitrálását is okozhatja, melynek egyik lehetséges következménye az Akt

jelátviteli kaszkád aktivációja, módosítva így az apoptotikus, metabolikus és növekedési folyamatokat<sup>66,67</sup>. A számos protein kináz kaszkád közül, amelyek az oxidatív stresszre adott válaszban jelentős szerepet játszanak, az egyik a növekedési faktor asszociált Akt kináz, másnéven protein kináz B. Az Akt oxidatív stressz hatására szívizomsejtekben foszfoinozitol-3-kinázon (PI3-kináz) keresztül foszforilálódhat. Az Akt számos egyéb jelátviteli kinázt foszforilál, mint például a glikogén szintáz kináz 3 $\beta$ -t (GSK-3 $\beta$ ), a proapoptotikus Bcl-2 családba tartozó Bad-t, kaszpáz-9-et, forkhead transzkripciós faktort, aktiválja a nukleáris faktor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) transzkripciós faktort, a riboszomális S6 kinázt és az endotheliális NO szintázt (eNOS) (1.5 ábra). Munkacsoportunk korábban megállapította, hogy a PARP gátlók aktiválják a foszfatidilinozitol-3-kináz/Akt utat<sup>68</sup>.

Az Akt összességében olyan jelentős antiapoptotikus, metabolikus szabályozó, valamint vazodilatatív hatással bír, mely kulcsfontosságú a sejt túlélése szempontjából<sup>69-76</sup>. Ismert az is, hogy a kardiomiociták apoptózisa jelentős szerepet játszik mind az akut, mind a krónikus doxorubicin kiváltotta szívizom károsodásban<sup>67,77-79</sup>.



1.5 ábra: Foszfatidilinozitol-3-kináz/Akt jelátviteli út. A peroxinitrit aktiválja a receptor tirozin kinázt, amely a foszfatidilinozitol 3 kináz aktiválásán keresztül foszforilálja, így aktiválja az Akt-t. Gátlódik többek között a proapoptotikus Bad (baed), a kaszpáz-9, a forkhead transzkripciós faktor, ezért az Akt aktiválódásnak antiapoptotikus hatása van. A glikogén szintáz kináz foszforilálódik, ebben az esetben inaktiválódik. Így a glikogén szintézis és a glükóz felvétel zavartalanul folyhat tovább.

Egy univerzális foszfoinozitol-3-kináz (PI3-kináz) gátló szer a wortmannin. A wortmannin egy szterol típusú struktúrával rendelkező, a *Penicillium funiculosum* gomba által termelt vegyület, mely szabad diffúzióval történő sejtbe jutását követően irreverzibilisen kötődik a foszfoinozitol-3-kináz 110 kDa molekulatömegű alegységéhez, gátolva annak működését. A PI3-kinázra vonatkoztatva *in vitro* IC<sub>50</sub> értéke 5nM körüli, így a közismert PI3-kináz gátló LY294002 vegyülettől erősebb, mindhárom típusú (I, II, III) PI3-kináz gátlószer.

A wortmannin ezen kívül ismert gátlószere a foszfoinozitol-4-kináznak, a miozin könnyű lánc kináznak és a polo-like kináz családnak is<sup>80</sup>.

A poli(ADP-ribóz polimeráz) (PARP) a sejtmagban nagy mennyiségben előforduló, fehérje-módosító, nukleotid-polimerizáló enzim. DNS károsodás hatására a PARP aktiválódik, nikotinamid adenin dinukleotidot ( $\text{NAD}^+$ ) hasít, majd a képződő ADP-ribóz egységekből homopolimereket épít bizonyos nukleáris fehérjékre és saját magára is. Ez a folyamat gyorsan kimeríti az intracelluláris ATP és  $\text{NAD}^+$  raktárakat; a glikolízis és mitokondriális légzési lánc lelassul. A  $\text{NAD}^+$  regenerálásához a sejt makroerg kötések tartalmazó molekulákat használ fel, s végül a sejt a PARP túlműködése következtében energiahányos állapotba kerülhet, elhalhat<sup>81-84</sup>. Kézenfekvő tehát a PARP enzimet gátolni annak érdekében, hogy a sejt az oxidatív károsodásokkal szemben ellenállóbb legyen<sup>85</sup>. Mivel a szívizomban az energiatermelés nagyrészt a mitokondriumban zajlik, a mitokondrium oxidatív károsodása elleni védelme kulcsfontosságú a szív energiatermelése szempontjából. Korábbi munkánkban kimutattuk, hogy a PARP inhibitorok scavenger hatás nélkül is képesek a sejtalkotók oxidatív károsodásának mérséklésére<sup>86</sup>.

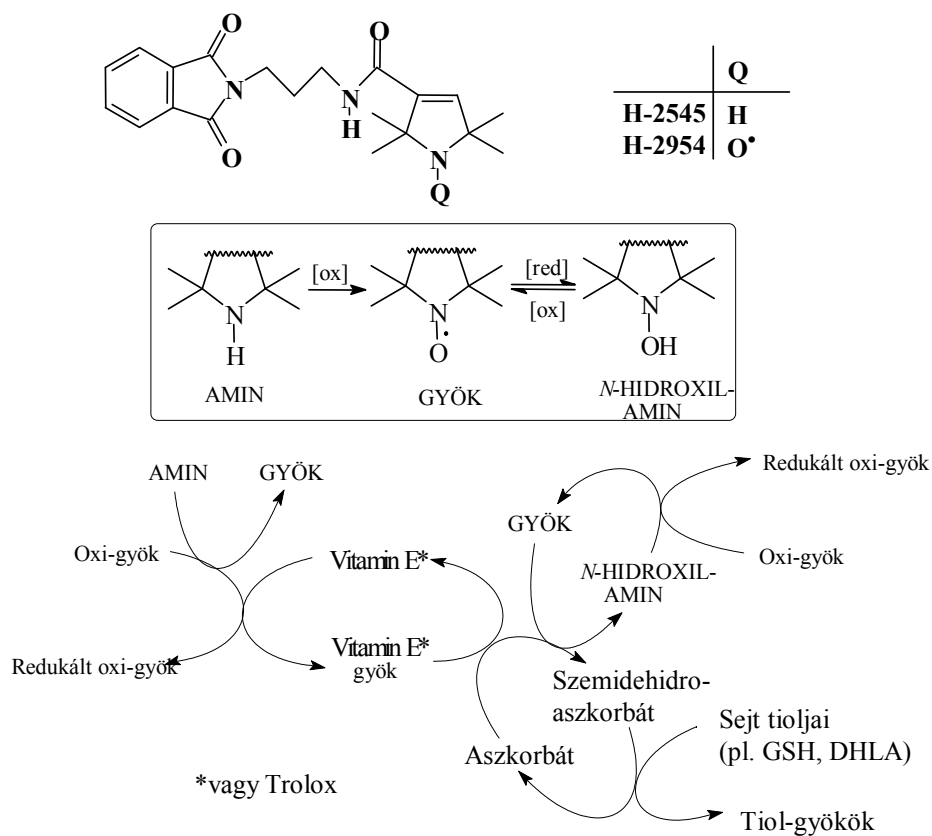


## Kísérleti szerek

Az antioxidáns molekulák és enzimek csökkenthetik ugyan a szabadgyökök kiváltotta oxidatív károsodást, de mivel legtöbbjük nem, vagy csak alig jut a sejt belsejében a gyökképződés tényleges helyére, protektív hatásukat nem tudják megfelelően kifejteni<sup>81,82</sup>.

Mind a H-2545 nevű szer (3-karboxamido-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1*H*-pirrol), mind pedig metabolitja, a H-2954 szabadgyökfogó tulajdonsággal rendelkezik. Az 1.6 számú ábra mutatja a H-2545 metabolizmusát és antioxidáns tulajdonságának mechanizmusát. A H-2545 és H-2954 molekula szerkezete lehetővé teszi, hogy a vegyületek a sejt membránjában halmozódjanak fel, és a szabadgyök keletkezés és károsítás elsődleges helyén fejtsék ki antioxidáns hatásukat, megelőzve számos sejtalkotó további károsodását<sup>47,60,87,88</sup>.

Egy másik nitroxid szabadgyök, az 1-oxil-4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidin (TEMPOL) a streptonigrin kiváltotta citotoxicitást teljesen meggátolta, de az adriamicin által a V79 kínai hörcsög sejtvonalon okozott sejtkárosodásra semmilyen hatással sem volt<sup>89</sup>. A TEMPOL 2,5 mM-os koncentrációban a 60 percen keresztül 100 µg/ml adriamicinnel Langendorff-szerint perfundált izolált patkányszíven kialakuló lipidperoxidáció mértékét és a szívteljesítmény romlását jelentős mértékben csökkentette<sup>90</sup>. Ezek az eredmények arra ösztönöztek bennünket, hogy megvizsgáljuk, vajon a H-2545 és a H-2954 képes-e a doxorubicin kiváltotta szívkárosodás kivédésére. Vizsgálatunkban izolált szív perfúziós modellben figyeltük az energia metabolizmus, kontraktilis teljesítmény, szívizom oxidatív károsodás és Akt foszforiláció jellemző paramétereit.

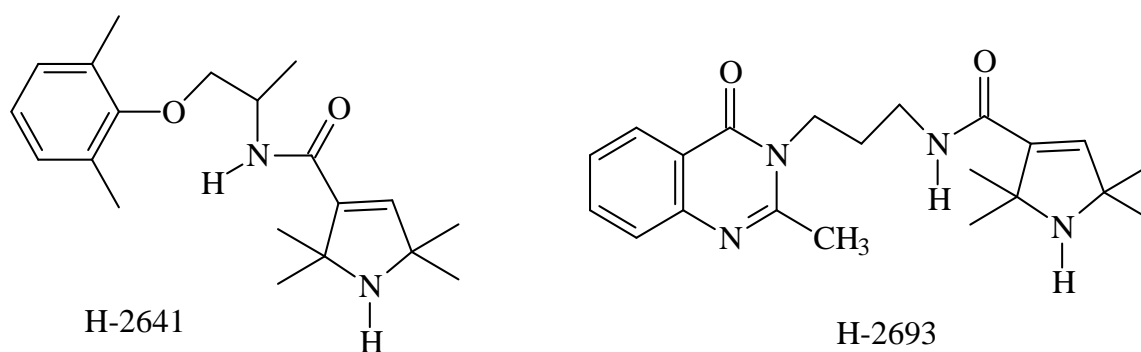


1.6 ábra: A H-2545 és H-2954 struktúrája és gyökfogásának mechanizmusa (Hideg után). Az amin vegyület H-2545 stabil nitroxid gyökké (H-2954) oxidálódhat. A gyök aszkorbinsav segítségével N-hidroxilamin formává redukálódhat, mely 1 elektron átadásával nitroxid formává alakulhat. A nitroxid molekula elég reaktív ahhoz, hogy egy másik szabadgyököt scavengeljen hidrogén atomjának transzferével.

A H-2545-nél bevált koncepciót kívántuk kiterjeszteni a H-2641 és a H-2693 vegyületekre.

Ennek a Hideg és munkatársai által kidolgozott elvnek az a lényege, hogy a H-2545-ben található szterikusan gátolt, szekunderamin molekularészlet a tetraciklinek gyökös átalakulása során képződő reaktív oxigén származékokat (ROS) képes csapdázni, elsősorban szuperoxid aniont, miközben a gyógyszermolekula nem toxikus nitroxid szabadgyökös vegyületté metabolizálódik<sup>88</sup>.

Az új vegyületek estében ugyanaz a szterikusan gátolt 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrol szerkezeti elem, azaz a szterikusan gátolt szekunderamin található, amely savamidon (mint peptid-szerű kötés) kapcsolódik egy aromás szerkezeti egységet tartalmazó molekularészlethez. A H-2693 estében a kinazolin gyűrű 3-as nitrogénatomjához kapcsolódik egy 3 szénatomos összekötő csoporton keresztül a pirrolin gyűrű. Itt a H-2545 eredeti szerkezete annyiban módosult, hogy a ftálimidgyűrű az egyik karbonilcsoportját az elektronban gazdag N=CH(CH<sub>3</sub>) szerkezeti elemmel cseréltük ki (1.6 és 1.7 ábrák). A kinazolinon vegyület tesztelésének másik oka, hogy a kinazolin származékok köztudottan PARP-gátló hatással rendelkeznek, és a közelmúltban bizonyítottuk állatkísérletekben, hogy iszkémia-reperfúzió során jelátviteli folyamatokat is befolyásolnak<sup>68</sup>.

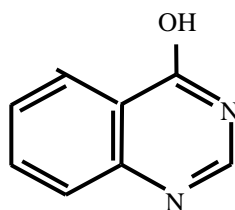


1.7 ábra A H-2641 és H-2693 struktúrája

A H-2641 esetében a már ismert, a Vaughan-Williams osztályozás szerinti I/B osztályba tartozó, a szívizom sejtek membránjában akkumulálódó antiaritmiás szert, a mexiletint a 3-karbonil-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1*H*-pirollal acilezték<sup>87</sup>. A módosított mexiletin származékok esetében már korábban igazolást nyert, hogy antioxidáns hatással rendelkeznek, az iszkémia során depletálódott organikus foszfátok regenerálódnak, mérséklék a DNS lánctörést, a protein oxidáció-gátlásán keresztül mérséklék az oxidatív stresszt és a toxikus ROS molekulák okozta károsodásokat, sokkal jobban, mint a mexiletin alapmolekula<sup>91,92</sup>.

Ezen megfontolások alapján választottuk ki a H-2641, valamint H-2693 vegyületeket és vizsgáltuk, hogy képesek-e gátolni a doxorubicin-okozta sejtkárosodást. Vizsgálatunk során a szívizom energetikai paraméterein kívül még intracelluláris pH értéket kalkuláltunk.

Kutatócsoportunk korábbi iszkémia-reperfúziós kísérleteiben igazolta, hogy PARP-inhibitorok mérséklék a szabadgyökök által kiváltott károsodást<sup>93</sup>. A doxorubicin kardiotoxikus hatásának általunk is feltételezett mechanizmusa alapján, mely szerint az főként szabadgyökök útján fejti ki káros hatását, logikusnak tűnt, hogy a PARP gátló esetleges protektív hatását vizsgáljuk doxorubicin által okozott akut kardiotoxicitásra. A kinazolinok két aromás gyűrűből (egy benzén és egy pirimidin gyűrűből) álló vegyületek, melyek közismerten PARP gátló hatással rendelkeznek. Egy, a tudományos közéletben elterjedt kinazolin származék, a kinazolin gyűrű 4-es pozíciójában hidroxilcsoporttal rendelkező kinazolin, a 4-hidroxi-kinazolin (4OHQ) (1.8 ábra) hatását vizsgáltuk a doxorubicin kiváltotta miokardiális károsodásra.



1.8 ábra: 4-hidroxi-kinazolin struktúrája

## Célkitűzések

<sup>31</sup>P NMR spektroszkóppal monitorozott Langendorff perfúziós modellünkben vizsgálni kívántuk a membránban, azaz a károsodás helyén felhalmozódni képes antioxidáns H-2545 hatását a doxorubicin indukálta akut kardiotoxicitásra a miokardium energia háztartásának, Akt jelátviteli fehérje aktivitásának vizsgálatával, továbbá a miokardiális károsodást jelző paraméterek (szív kontraktilis teljesítmény, lipidperoxidáció, fehérjeoxidáció) meghatározásával.

H-2641 és H-2693 alkalmazásával igazolni kívántuk azt a Hideg-féle paradigmát, mely szerint a gyorsan lejátszódó, oxidatív stressz okozta károsodásokat csak olyan molekulák képesek mérsékelni, melyek a bekövetkező károsodás helyéhez helyspecifikusan kapcsolódnak és az oxidatív károsodást okozó ROS molekulákat nem toxikus antioxidáns hatású molekulákká alakítják.

Tanulmányozni kívántuk, hogy az iszkémia-reperfúziós károsodásokat mérsékelni képes PARP inhibitor hatásos lesz-e a doxorubicin okozta károsodásokban is kifejteni kedvező hatását. Megvizsgáltuk, hogy a korábban megfigyelt, PARPI hatására bekövetkező protektív PI3-kináz-Akt-GSK jelátviteli út aktiváció szerepet játszik-e a PARPI feltételezeten kedvező hatásában doxorubicin kiváltotta károsodás esetén.

## <sup>31</sup>P NMR spektroszkópia

A mágneses magrezonancia-spektroszkópia (*nuclear magnetic resonance, NMR*) napjaink egyik leghatékonyabb, a természettudományok minden területén sokoldalúan alkalmazható, nagyműszeres analitikai módszere. Noha a fizikai alapjelenség még csak alig több mint hatvan éve ismert, előbb új dimenziókat nyitott a kémiai szerkezetkutatásban, majd hamarosan a biológiai folyamatok molekuláris szintű vizsgálatában és az orvosdiagnosztikában egyaránt. Folyamatosan bővülő fizikai, kémiai, biológiai és orvosi alkalmazásaival az NMR-technika napjainkra önálló, multidiszciplináris tudománnyá vált: az elmúlt években fizikai, kémiai és orvosi-élettani Nobel-díjak bizonyítják a vizsgálómódszer fontosságát.

A technika a mágneses magrezonancia jelenségén alapszik.

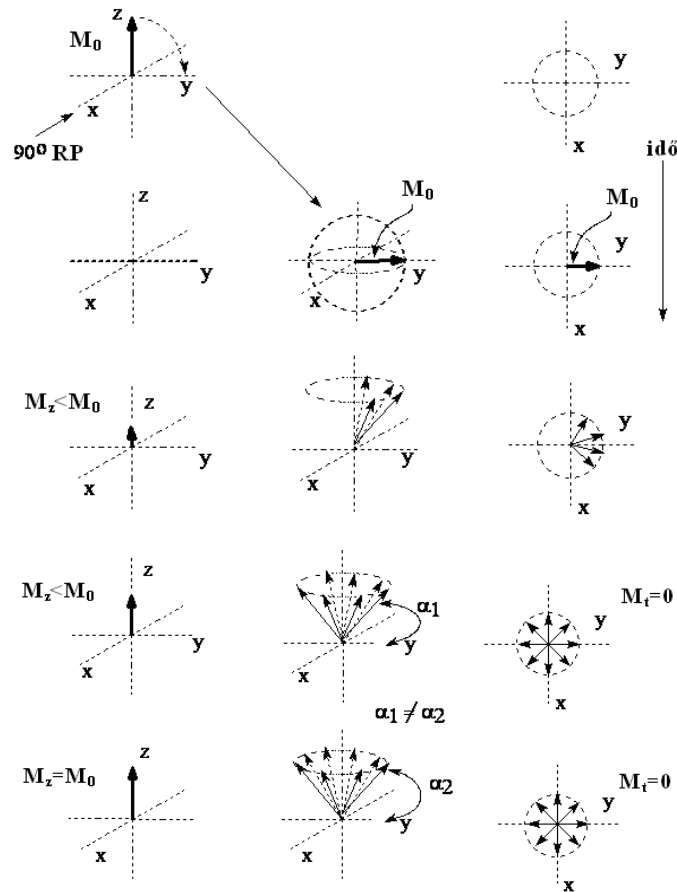
Az atommagok mágneses térben mutatott viselkedését a mágneses momentummal jellemezhetjük. A mágneses momentum, illetve a spin modellezhető például egy rúd-mágnessel. Külső mágneses tér ( $B_0$ ) hiányában a mágneses momentumok rendezetlenül állnak, míg külső mágneses tér jelenlétében beállnak a térerősség irányvektorával párhuzamosan, ahhoz képest paralel vagy antiparalel orientációban olyképpen, hogy a mágneses dipólmomentum precesszálni fog a külső statikus mágneses térerősség irányával párhuzamos tengely körül. Az elemi dipólmomentum-vektoroknak a szokásosan „Z” tengellyel jelölt külső mágneses tér irányára vetülő komponenseinek összege adja a makroszkopikus mágnesezettséget.  $\{M_z = \sum(\mu_z)_i\}$ . A spinek külső mágneses tér hatására kezdetben gyors, de egyre lassuló ütemben alakítják ki a vizsgálandó anyag adott mágneses térnek megfelelő makroszkopikus mágnesezettségét. A makroszkopikus mágnesezettség kialakulásának üteme egy exponenciális időtényezővel jellemezhető ( $T_1$  relaxációs idő), mely a maximális mágnesezettség ( $M_0$ ) 63%-nak eléréséhez szükséges.  $\{M = M_0(1 - \exp(-t/T_1))\}$ .

Lesznek olyan részecskék, melyek a külső mágneses térrel paralel, míg mások antiparalel irányba precesszálnak. Ez két energiaállapotnak felel meg. Jóllehet, a részecskék igyekeznek a stabilabb, alacsonyabb energiaszintű irányba fordulni, az egymás közti termikus energiacsere steady-state állapotot hoz létre. Ha a magasabb energiaállapotú atommag populációt  $N^+$ -al az alacsonyabb energiaállapotút pedig  $N^-$ -al jelöljük, akkor a külső mágneses tér hatására adott hőmérsékleten az atommagok Boltzmann statisztikával jellemezhetően rendeződnek.  $\{N^+/N^- = e^{-E/kT}$ ;  $E=$  a két energiaállapot közti különbség,  $k=$  Boltzmann-állandó= $1,3805 \times 10^{-23}$  J/K}. A hőmérséklet emelkedésével a hányados közelít egyhez. A klinikai képalkotó mágnesek tipikus téréreje (1,5 T) mellett pl. ennek a hányadosnak az értéke 37°C-on  $1-9,90 \times 10^{-6}$ , vagyis 200001 db spinből 100000 van a magasabb, 100001 pedig az alacsonyabb energiaállapotban.

Az alacsonyabb energetikai állapotból magasabba történő átmenet termikus energián kívül lehetséges rádiófrekvenciás sugárzás energiájának adszorbeálásán keresztül is. Energia átmenet csak meghatározott energiaszintek közt lehetséges adott mágneses térben, így a spinek egy adott mágneses térben adott frekvenciájú foton energiát nyelhetnek el.  $\{v=\gamma B$ ; „ $v$ ” a foton frekvenciája, „ $\gamma$ ” a giromágneses tényező, „ $B$ ” a külső mágneses tér erőssége}. Az elnyelhető foton energiája kvantált  $\{E=vh$ ;  $h=$  Planck állandó= $6,626 \times 10^{-34}$  Js}. A megfelelő gerjesztő frekvenciával és energiával besugárzott mintában rezonancia alakul ki. Amint a rádiófrekvenciás gerjesztés megszűnik, a protonok egy kis ideig a besugárzó frekvenciával megegyező rádiófrekvenciás sugárzást bocsátanak ki. Az idő, mely ahhoz kell, hogy a kezdeti mágneszettség 63%-t a rendszer leadja, egy exponenciális időtényező, a  $T_2$ , vagy spin-spin relaxációs idő  $\{M=M_0(\exp(-t/T_2))\}$ .

Ahogy a mintát a megfelelő energiájú rádiófrekvenciás sugárzás éri, a protonok ugyanabban a fázisban kezdenek precesszálni. Amint ezen ún. fáziskohérenca létrejön, a

makroszkopikus mágnesezettség vektorát ( $M_0$ ) a  $+z$  tengely körüli, a rezonancia frekvencia nagyságával megegyező frekvenciájú precesszióval jellemezhetjük



1.9 ábra: Makroszkopikus mágnesezettség vektorának ( $M_0$ ) tulajdonsága  $90^\circ$ -os rádiófrekvenciás impulzust (RP) követően. A vízszintes sorok fentről lefele egymás után következő időpillanatokot reprezentálnak. Középső oszlopban a magmágneses momentumok precessziójának térben ábrázolt időbeni alakulása. Bal oldali oszlopban ennek Z tengelyre vetített komponensének, a longitudinális mágnesezettségnek ( $M_z$ )  $T_1$  időállandóval energiaminimumra történő beállása, jobb oldali oszlopban a magmágneses momentumok precessziójának  $xy$  síkban ábrázolt, transzverzális mágnesezettségének ( $M_t$ ) időbeni alakulása látható, mely  $T_2$  idővel áll be az entrópiamaximumra.

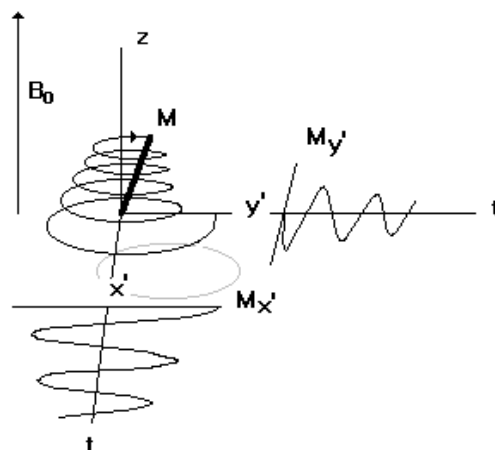
Ekkor a  $z$  tengely mentén elhelyezkedő longitudinális komponens ( $M_z$ ) mellett létrejön az  $M_0$   $xy$  síkban elhelyezkedő transzverzális komponense ( $M_t$ ) is. A rádiófrekvenciás gerjesztés idővel a transzverzális komponens nagyságát növeli, a longitudinálisét csökkenti, mivel a



protonok alacsonyabb energiájú populációjából egyre többen kerülnek a magasabb energiájú populációba, és így a paralel-antiparalel precesszáló magok aránya megváltozik. Lesz egy olyan pillanat, amikor az  $M_0$ -nak a longitudinális komponense eltűnik, és csak transzverzális komponense marad; ebben a pillanatban a paralel és antiparalel precesszáló magpopuláció száma megegyezik. Ekkor a makroszkopikus mágnesezettség vektora a  $+z$  tengelytől  $90^\circ$ -ra távolodik, és az  $xy$  síkban forog. Ezen állapot eléréséhez szükséges rádiófrekvenciás sugárzást  $90^\circ$ -os rádiófrekvenciás impulzusnak nevezzük (1.9 ábra)

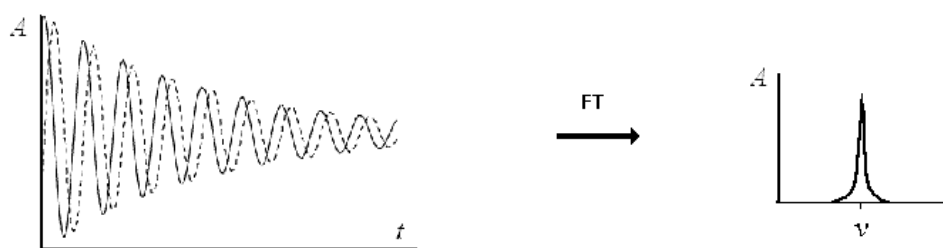
Miközben a transzverzális mágnesezettség csökken a  $90^\circ$ -os rádiófrekvenciás impulzus kikapcsolása után, addig a longitudinális komponens nő; ezt a  $T_1$  longitudinális relaxációs idővel karakterizálhatjuk (1.10 ábra). Az egyes, NMR spektrométerrel vizsgálandó anyagok  $T_1$  és  $T_2$  értékeinek eltérő volta az anyagok kémiai környezetének különbözőségéből eredeztethetőek.

Az  $xy$  síkban forgó transzverzális komponens szinusz jellel jellemezhető, mely gyors csökkenést mutat a gerjesztő frekvencia megszűnését követően, mivel a protonok koherenciájának szétesése relatíve hamar bekövetkezik.



1.10 ábra: Makroszkopikus mágnesezettség vektor térbeni ábrázolása, valamint ennek  $x$  és  $y$  tengelyirányból mért, időben csökkenő amplitudójú szinuszoid jele  $90^\circ$ -os rádiófrekvenciás impulzust követően

A transzverzális mágneszettség szinuszoid amplitudójának csökkenését a gerjesztés szabad lecsengésének (FID - „free induction decay”) nevezzük, melyet a  $T_2$  transzverzális relaxációs idővel jellemezhetjük (1.11 ábra). A  $90^\circ$  rádiófrekvenciás pulzus megszűntét követő pillanatban a transzverzális mágneszettség elérte a legmagasabb szintet, a precesszáló protonok koherensek. A koherencia azonban gyorsan csökken, mivel az egyes protonok kismértékben eltérő mágneses környezetben, így kismértékben eltérő frekvenciával precesszálnak. Ennek mértéke az eltérő fázisú anyagoknál más és más.



1.11 ábra: FID jelenség (a folyamatos vonal a szaggatott vonal megfelelő fázisba korrigált állapota), és annak Fourier transzformáltja (FT)

A FID Fourier-transzformáltja az NMR spektrum, ahol a frekvencia függvényében a relatív amplitúdó ábrázolódik. A jel alatti terület nagysága függ a FID kezdeti amplitudójától, tehát a precesszáló spin-populáció nagyságától, így – a kísérleti paraméterek megfelelő megválasztása mellett - az anyagmennyiségtől. A jel elméletileg az ún. Lorentz-görbe alakját ölti, amelynek két fontos jellemzője a jel amplitúdója (csúcsmagasság), és a jel amplitudójának felén mért szélesség (félértékszélesség). A gyakorlatban e két paraméter összeszorozásával a jel teljes spektrumon vett integráljával (a jel alatti területtel) arányos számértéket kapunk, melyből a vizsgált anyag - referencia-minta esetén abszolút, anyagcsere változások nyomon követésekor relatív - mennyiségét származtathatjuk.

Mágneses térben az atommag körül keringő elektronok a külső mágneses tér irányvektora körül keringenek, mely kisebb, a külső mágneses térrel ellentétes diamágneses

mezőket, vagy azzal megegyező paramágneses tereket generálhat, amely így összességében a magra eltérő, de általában kisebb mágneses erőhatást jelent, mely alapján a tényleges mágneses mező az ún. árnyékolási tényezővel csökkentett  $\{B_{\text{tényleges}}=B_0(1-\sigma)\}$ .

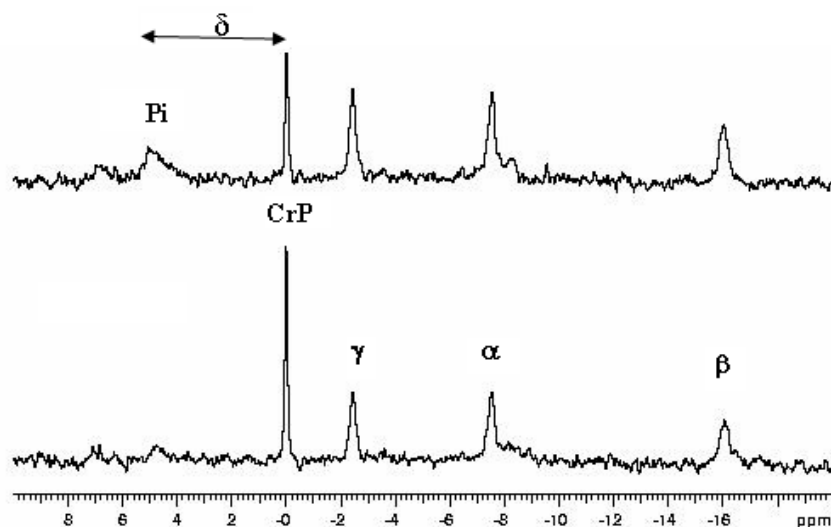
A vizsgált molekulában lévő magok körüli elektron sűrűség a molekulában lévő kémiai kötésektől, a magok fajtájától stb. függ. A nagyobb mágneses tér alkalmazásával a rezonancia frekvencia közti különbségek is nagyobbak lesznek, így a különböző erősségű mágnessel rendelkező NMR készülékekkel végzett méréseket bonyolultabb lenne összehasonlítani. Ennek kiküszöbölésére egységes rendszer került bevezetésre, mely egy referencia frekvenciától ( $\nu_{\text{REF}}$ ) történő frekvencia eltérést standardizálni tudja. Ennek értelmében a kémiai eltolódás ( $\delta$ ):  $\delta = (\nu - \nu_{\text{REF}}) \times 10^6 / \nu_{\text{REF}}$

A referencia frekvencia a tetrametil-szilán protonjainak rezonancia frekvenciája; az eltérés mértékének megjelölésére a külső mágneses tér milliomod részének megfelelő rezonanciafrekvencia alapján a ppm (pars per million) mértékegységet használjuk. A kémiai eltolódást meghatározó hatások sokfélék lehetnek (hibridizációs állapot, induktív hatások, szterikus hatások, az elektromos tér hatásai (elektromos térgrádiens), hiperkonjugációs hatások, mezomer effektusok, szomszéd csoport anizotrópia, "nehézatom" hatások (F, Cl, Br, I), izotóp effektus ( $^2\text{H}$ ,  $^{35/37}\text{Cl}$ , stb)). A kémiai eltolódás felhasználható egyebek mellett intracelluláris kémhatás detektálására is, pl  $^{31}\text{P}$  NMR esetén az anorganikus foszfát kreatin foszfáthoz viszonyított kémiai eltolódását ( $\delta$ ) ismerve a vizsgált minta kémhatása:  $\text{pH} = 6.77 + \log [(\delta - 3.23)/(5.70 - \delta)]$

Azon magok, melyek különböző kémiai környezetben vannak, vagyis más-más kémiai eltolódással rendelkeznek, nem ekvivalens magok. Egymás közelében lévő atomok egymásra hatással vannak, megváltoztatják a magokra ható tényleges mágneses erőteret. Amennyiben a nem ekvivalens magok három-négy kötés távolságon belül helyezkednek el, akkor ez a hatás NMR-rel érzékelhető. Ennek hatására eltérő energianívók jelennek meg; a spin-spin csatolás

nélkül egyazon kémiai eltolódással mutatkozó magok kismértékű, a kémiai eltolódásban bekövetkező változást szenvednek el, a jel egymástól néhány Hz távolságra eső fragmensekre hasad fel.

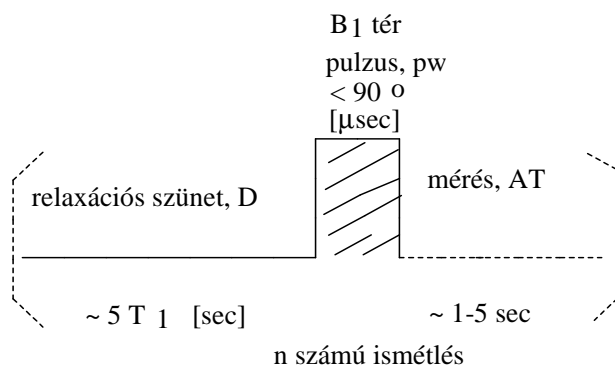
A felhasadás során létrejövő nívók számát a kölcsönhatást létrehozó spinrendszer energianívóinak szintje határozza meg a  $2nI+1$  képlet szerint, ahol  $n$  az egyenértékű magok száma,  $I$  pedig a magspin. Az energianívók populációjával, tehát az anyagmennyiséggel, a vonalak intenzitása arányos. A kémiai eltolódás és az adott csatolási állandóval megjelenő jel felhasadás, valamint a multiplicitás segít beazonosítani az egyes molekulákat és csoportjaikat. A félértékszélesség és jelamplitudó segítségével kiszámítható jel alatti terület a beazonosított molekula(részlet) kvantitatív meghatározását is lehetővé teszi. A jelhozzárendelés, a távolság jellegű kényszerfeltételek és a torziószög típusú kényszerfeltételek segítségével a vizsgált molekularészlet 3 dimenziós szerkezetének feltárása válik lehetségessé.



1.12 ábra Langendorff perfúzió alatt izolált patkányszívekből nyert  $^{31}\text{P}$  foszforspektrumok. Az alsó spektrum energetikailag kedvezőbb állapotú mintáról készült. Pi: anorganikus foszfát, CrP: kreatin foszfát,  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ : foszfátok helyét reprezentáló csúcsok,  $\delta$ : az anorganikus foszfát kreatin foszfáthoz viszonyított kémiai eltolódása

Langendorff perfúziós rendszerekben a spin-spin kölcsönhatásból származó felhasadások nem jelennek meg, tekintettel egyrészt arra, hogy az *in situ* rendszerben sokkal kevésbé homogén mágneses tér alakítható ki, másrészt arra, hogy pl. az ATP a szívben javarészt magnéziumkomplex formájában van jelen, ami szintén jelszélesedést okoz a szabad ATP-molekulához képest. Langendorff perfúziós rendszerben detektálható *in situ*  $^{31}\text{P}$  spektrumot mutat a 1.12 ábra.

A legegyszerűbb NMR-kísérlet egy rádiófrekvenciás impulzusból, majd a minta válaszeléne azonnali detektálásából áll (lásd 1.13 ábra).



1.13 ábra: Egydimenziós, modulálatlan NMR-spektrumok felvételére alkalmas impulzusszekvencia;  $D$  (delay): relaxációs szünet vagy várakozási idő;  $AT$  (aquisition time): mérési idő

A pulzushossz a kívánt kitérítési szög függvényében változhat. A mérések számának (tranziensek) ismétlésével a jel-zaj arány négyzetgyökös mértékben növelhető (pl. egy kísérlet 16-szori ismétlése a jel/zaj viszonyt négyszeresére növeli).

Bizonyos méréseknél a részletesebb vizsgálat érdekében szükségünk lehet spin-spin kölcsönhatások megszüntetésére. Ez NMR készülékkel technikailag kivitelezhető; ekkor nagyobb energiájú rádiófrekvenciás pulzusokat viszünk a mintába, hogy a spin-spin kölcsönhatás mérés szempontjából irreleváns résztvevőjének spin-irányát gyors

előjelváltozásra kényszerítsük, így a kölcsönhatás releváns résztvevője a gyors előjelváltozások miatt nem érzékel szomszédos spin állapotokat, a kölcsönhatás látszólag megszűnik (spin lecsatolás; WALTZ-16, GARP-1, CHIRP stb.).

Kiemelendő a módszer *neminvazív* és *nemdestruktív* tulajdonsága, s mivel szinte a periódusos rendszer minden eleme rendelkezik nullától különböző magspinű izotóppal, sokféle anyag analizálására alkalmas. NMR spektroszkópia segítségével számos élettani szempontból jelentős atommag vizsgálható, mint a  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{23}\text{Na}$  és  $^{19}\text{F}$ , így az élettudományok is előszeretettel alkalmazzák a technikát:

Az NMR lehetőséget teremt a vegyületek hatásának *in vivo* vizsgálatára szöveteken, célszerveken, élő állatokon és emberen, ami a metabolitkutatásban, illetve a gyógyszerfejlesztés állatkísérletes (esetleg klinikai) stádiumaiban is hasznos információkkal szolgál. Az alábbiakban néhány kurrens alkalmazást említek meg.

A szívizom energia metabolizmusának vizsgálata során monitorizált két leggyakoribb atommag a  $^{31}\text{P}$  és a  $^{13}\text{C}$ .  $^{13}\text{C}$  NMR spektroszkópiával vizsgálható például a citrátkör aktivitása, nyomon követhető a glükóz felvétel és a glükóz anyagcsere változása számos patológiás állapot során.  $^{31}\text{P}$  NMR spektroszkópiával meghatározható az ATP, a kreatin-foszfát, szervetlen foszfát és cukorfoszfátok szintje.

NMR segítségével 1999. óta tudjuk, hogy izolált szívperfúzió alatt a puffer ozmolaritás megváltoztatja az intracelluláris pH-t, a szívteljesítményt, és hatással van a miokardium iszkémiás károsodására<sup>94</sup>. Valerij Kupriyanov munkacsoportja  $^{87}\text{Rb}$  és  $^{31}\text{P}$  NMR segítségével megállapította, hogy a hipozmotikus sokk stimulálja a  $\text{Rb}^+/\text{K}^+$  effluxot részben dimetil-amilorid szenzitív kation/ $\text{H}^+$  antiporterén keresztül<sup>95</sup>.

Izolált szívek NMR kísérletében a spontán hipertenzív patkányok szívelégtelenségének vizsgálatakor a szívelégtelenség okának az energia-metabolizmusban

bekövetkezett kedvezőtlen változást tették felelőssé. A spontán hipertenzív patkányok szívének teljesítménye romlott az életkor előrehaladtával és a bal kamrai hipertrófia mértékével. A miokardiális diszfunkció a csökkent kreatin foszfát/ATP hányadossal, így csökkent energiatartalékkal volt összefüggésbe hozható<sup>96</sup>. Szívelégtelenségben szenvedő egerek szíveiben alacsonyabb ATP és kreatin foszfát koncentrációt állapított meg egy másik kutatócsoport. Vizsgálatukban a szívelégtelen és normál egér szívekben is fellelhető a kalcineurin közvetített ATP termelés<sup>97</sup>.

NMR-rel végzett kísérletben megállapítható volt, hogy a laktát a GLUT 1 és GLUT 4 receptorok plazma membránhoz történő transzlokációját indukálja, s ez nem PI3-kináz dependens úton valósul meg, ráadásul az indukció a dezoxi-glükóz és a 18-F-fluoro-2-dezoxi-glükóz felhalmozódásának csökkenésével járt együtt<sup>98</sup>.

Francia kutatók azokban a kísérletekben, melyekben az ATP és kreatin foszfát szubcelluláris áramlását vizsgálták, kifejlesztettek egy <sup>31</sup>P NMR módszert, mely szubcelluláris szinten képes 3 különböző kinetikájú kreatin kináz működését elkülöníteni, illetve kreatin kináz inga létét bizonyítani. A kísérlet szerint az energiaszállítás az egész szívben a mitokondriumból az ATPázokhoz kreatin foszfátokon keresztül valósul meg (kreatin foszfát inga). Cianid hatására a sejt megváltoztatja az energiaszállítási útvonalakat, az ATP a mitokondriumból egyenesen a citoszólba megy<sup>99,100</sup>.

A <sup>31</sup>P NMR felhasználható intakt szervek oxidatív foszforilációja szétkapcsolásának mérésére; így megállapítható, hogy az oktánsav nagy mennyiségben a mitokondriumban szétkapcsolja a terminális oxidációt az oxidatív foszforilációtól, mely lehet a szabad zsírsavak káros hatásának része; mindamellet az oktanoát nem okoz nagymértékű ATP felhasználást az izolált szívben<sup>101</sup>.

Langendorff perfundált, iszkémia-reperfúziós károsodásnak kitett szíveken vizsgálták L-karnitin, acetyl-L-karnitin, propionil-L-karnitin szívizom energia metabolizmusra kifejtett

hatását. Úgy találták, hogy az L-karnitin és származékai az iszkémia alatti pH csökkenésre protektív hatással vannak. Az L-karnitin növeli a szív iszkémiás toleranciáját. Az L-karnitin és észterei protektív hatással vannak a reperfúziós károsodásokra is, mely előrevetíti az iszkémiás szívbetegségek kezelésének újfajta aspektusát<sup>102</sup>. Langendorff perfundált szíveken <sup>23</sup>Na NMR és <sup>31</sup>P NMR-rel megállapították, hogy az iszkémia reperfúziós károsodás legfőbb oka a reverz működésű Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> antiporterén keresztüli Ca<sup>2+</sup> áramlás<sup>103</sup>. Egy másik kísérletben a perfundált szíveket iszkémia-reperfúziós károsítás alatt <sup>31</sup>P NMR spektroszkóppal monitorozták, s megállapították, hogy az eritropoetin iszkémia-reperfúzió alatt ATP konzerváló, így kardioprotektív hatással rendelkezik<sup>104</sup>.

Az NMR forradalmasította a gyógyászati képalkotást, mivel nem igényli kontrasztanyag szervezetbe juttatását, a röntgensugárzáson alapuló módszerektől eltérően nem használ ionizáló sugárzást, diagnosztikus használati feltételek mellett az elektromágneses sugárzás elhanyagolhatóan kis adagban nyelődik el a szervezetben, és a grádiens mágneses terek alkalmazása lehetővé teszi a képalkotás és lokalizált spektroszkópia alapját jelentő térben feloldott vizsgálatok elvégzését. Az NMR klinikailag elfogadott módszer a szívfunkció és miokardiális viabilitás mérésére, akár egy légvételyi idő alatt is<sup>105</sup>.



# KÍSÉRLETEK

## Módszerek

### Vegyületek

A H-2545 és H-2954, valamint a H-2641 és H-2693 szintézisét korábban közöltük<sup>87,88</sup>. A malondialdehid-bisz (diethylacetal) vegyületet a Merck-től (Darmstadt, Németország) vásároltuk. Minden egyéb kémiai anyagot a kereskedelemben elérhető legtisztább formájában szereztük be.

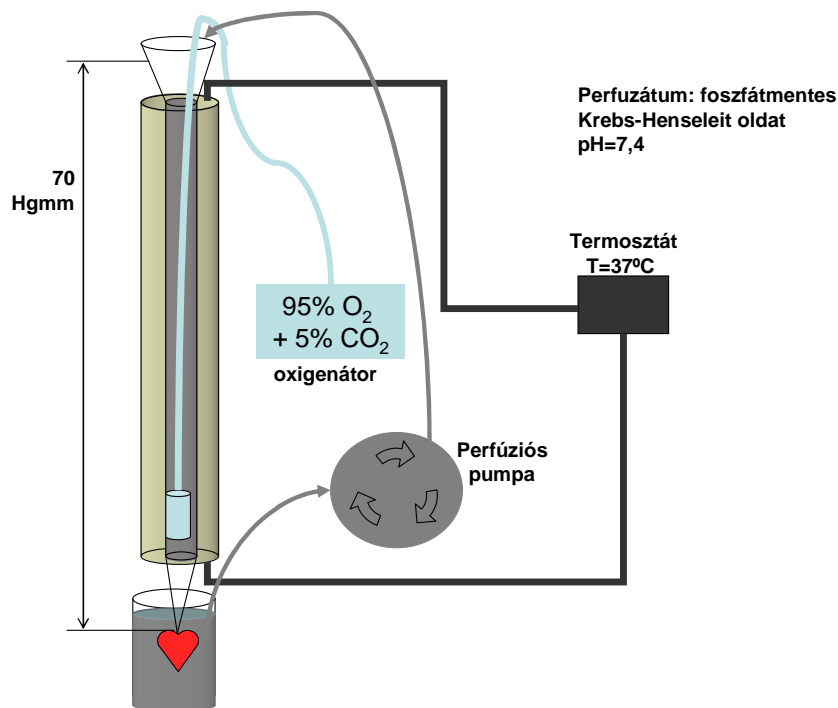
### Állatok

Felnőtt, hím, 250-300 g-os CFY patkányok izolált szívét használtuk Langendorff-perfúziós kísérleteinkben. Minden állatkísérletet az 1998. évi, az állatok védelméről és kíméletéről szóló XXVIII. törvény és az ezzel összhangban lévő 86/609/EGK irányelvnek a betartásával végeztünk.

### Szívperfúziós kísérlet

A patkányokat 200 mg/ttkg ketamin intraperitoneális adásával altattuk, Na-heparinnal (100 NE/patkány, i.p.) antikoaguláltuk. Az állatok szívét izoláltuk, és Langendorff szerint az aortán keresztül retrográd úton 70 Hgmm-es nyomással, 37°C-os állandó hőmérsékleten perfundáltuk. A perfúzióhoz módosított, foszfátmentes Krebs-Henseleit oldatot használtunk, melynek összetétele: 118 mM NaCl, 5mM KCl, 1,25 mM CaCl<sub>2</sub>, 12 mM MgSO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 11 mM glükóz, 0,6 mM oktánsav, valamint 100 µM doxorubicin és/vagy H-2545, H-2954 (5, 10, 20 µM), H-2641, H-2693 (20 µM), valamint 4-hidroxi-kinazolin (100 µM). A perfúziós folyadék kémhatását pH 7,4 értékre állítottuk be, és a kísérlet alatt üveg

oxigenátoron keresztül 5% CO<sub>2</sub>-t tartalmazó oxigénnel áramoltattuk át (2.1 ábra). Az egy órás perfúzió végén a szíveket lefagyasztottuk<sup>59</sup>.



2.1. ábra: Langendorff perfúziós rendszer sematikus ábrázolása

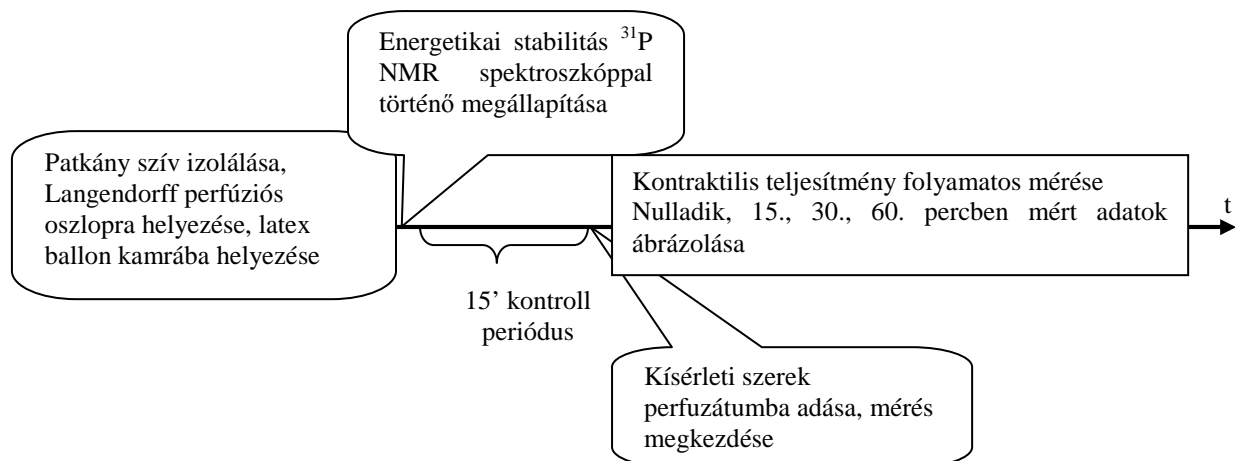
## NMR spektroszkópia

Az NMR spektrumok Varian UNITY INOVA 400 WB (Varian Inc, Palo Alto, CA) készüléken készültek. A perfundált patkányszívekről <sup>31</sup>P spektrumot (194,9 MHz) 37 C-on Z•SPEC® 20 mm „broadband” mintavételi fejjel nyertünk (Nalorac Co., Martinez, CA, USA) WALTZ-16 proton lecsatolást alkalmazva az adatgyűjtés ideje alatt ( $\gamma B_2=1,2$  kHz). A mágneses mező homogenitását a <sup>1</sup>H jel segítségével állítottuk be ( $w_{1/2}=10-15$  Hz). A <sup>31</sup>P spektrumokat 3 perces időközönként vettük fel a következő paramétereket alkalmazva: 120 tranziens, 1,25 s várakozási idő, 45 fokos kitérítési szögű impulzus, 10 kHz spektrális ablak, 0,25 s adatgyűjtési idő. Ezen kísérleti körülmények között az impulzusok közötti késés nagyobb a vizsgált metabolitok T<sub>1</sub> értékének ötszörösénél, és a különféle molekulák relatív

koncentrációi arányosak a jel alatti terület nagyságával<sup>59</sup>. A foszfátot tartalmazó molekulák (kreatin foszfát, ATP, anorganikus foszfát) mennyiségét a szívperfúziók foszforspektrumaiban az adott molekulát reprezentáló görbe alatti terület nagyságából számítottuk ki. A perfúzió kezdetén az így kiszámított mennyiségeket 100%-nak vettük, és a perfúzió alatt a molekulák mennyiségét a perfúzió kezdetén mért értékekhez viszonyítva százalékosan adtuk meg (az anorganikus foszfátnál önkényes mértékegységet választottunk). A miokardiális pH érték az anorganikus foszfát kreatin foszfáthoz viszonyított kémiai eltolódásából ( $\delta$ ) számítható ki az alábbi képlet alapján:  $\text{pH} = 6.77 + \log [(\delta - 3.23)/(5.70 - \delta)]$

### Szívteljesítmény meghatározása

Az izolált patkányszívek bal kamrájába latex ballont helyeztünk, majd felfújtuk úgy, hogy a végdiasztolés nyomás 8-12 Hgmm között legyen. Minden mérést azonos ballon nagysággal végeztünk. A nagy energiájú foszfátok stabilitásának NMR spektroszkóppal történt megállapítása után, a 15 perces kontroll periódust követően a kísérleti szereket a perfuzátumba adtuk (2.2 ábra). A szívfrekvencia, a szisztolés és diasztolés nyomások monitorizálásán túl származtatott paramétereket is meghatároztunk, úgymint: LVDP (left ventricular developed pressure; szisztolés és diasztolés nyomás különbsége) kettős szorzat és  $dp/dt$  ami a nyomásgörbe-függvény időre vetített első fokú deriváltja.



2.2 ábra: Langendorff perfúziós

rendszerben végzett szívteljesítmény mérés folyamatábrája

## Lipidperoxidáció és fehérje oxidáció

A lipidperoxidáció mértékét a tiobarbitursav reaktív anyagok (TBARS) képződésével becsültük meg a Tzeng és munkatársai által leírt módszer módosításával<sup>106</sup>. A szívizom szövetet 6,5% TCA-ban homogenizáltunk, majd 15% TCA-t, 0,375% TBA-t és 0,25% HCl-t tartalmazó reagenst adtunk hozzá, forrásban lévő vízfürdőbe helyeztük 15 percre, majd lehűtöttük. Centrifugálást követően a felülúszó abszorbanciáját 535 nm-en mértük. Malondialdehid (MDA) standardot használva a TBARS mennyiséget nmol/g nedves szövetben adtuk meg.

A fehérjeoxidáció kimutatására 50 mg fagyasztott szívizom mintát 1 ml 4%-os perklórsavban homogenizáltunk. Az oldat fehérje tartalmát centrifugálással gyűjtöttük össze. A fehérjék karbonil csoport tartalmát 2,4-dinitrofenil hidrazinnal határoztuk meg<sup>106,107</sup>.

## Western blot analízis

50 mg-os szívizomszövetet jéghideg Tris pufferban (50 mM, pH 8,0) homogenizáltuk, majd kétszeres SDS-poliakrilamid minta pufferben oldottuk. A fehérjéket 12%-os SDS-poliakrilamid gélben választottuk szét, nitrocellulóz membránra átblottoltuk. Blokkolás után (2 óra inkubáció 3%-os zsírtalanított tejes Tris oldatban) a nitrocellulóz membránokat egy éjszakán keresztül inkubáltuk jelöletlen antitestekkel (pAkt-1/Protein kináz B- $\alpha$  Ser<sup>473</sup> (1:1000 higításban), Akt/PKB (1:1000 higításban, Cell Signaling Technology, Beverly, MA), foszfo-specifikus glikogén-szintáz-kináz (GSK)-3 $\beta$  Ser<sup>9</sup> (1:1000 higításban)). A membránokat 6x5 percig 0,2% Tween-t tartalmazó Tris pufferben (pH 7,5) mostuk, majd 1:3000 arányban higított, tormagyökér peroxidázzal konjugált kecske anti-nyúl második antitesttel (BioRad, Budapest) inkubáltuk. A membránokat 6x5 percig mostuk, majd kemilumineszcencia (ECL) segítségével röntgenfilmen előhívtuk. Az optikai sűrűséget az ImageJ 1.31v (National Institutes of Health, Bethesda, MD) szoftverrel határoztuk meg.

## **Sejt túlélési vizsgálat**

Méhnyak epitheloid carcinoma (HeLa), humán hasnyálmirigy carcinoma (PANC-1), és humán hepatocelluláris carcinoma (HEPG-2) eredetű sejtvonalakból származó sejteket 96-lyukú plate-ekbe osztottunk szét úgy, hogy a sejt sűrűség  $2,5 \times 10^4$  sejt/lyuk legyen, majd egy éjszakán keresztül tenyésztettük őket. A következő nap doxorubicint és/vagy H-2545-t vagy H-2954-t, vagy 4-hidroxi-kinazolint adtunk a médiumhoz megfelelő koncentrációban. 24 óra múlva a sejteket 0,5%-os vízdékony mitokondriális festéssel, MTT<sup>+</sup>-vel 3 órán keresztül inkubáltuk, majd a médium eltávolítása után az MTT<sup>+</sup>-ből savas izopropanol hatására sztöchiometrikusan formazánt állítottunk elő. Az optikai sűrűséget 550 nm-es hullámhosszúságon ELISA olvasóval (Antos Labtech 2010) regisztráltuk. Minden kísérleti körülménnyel, mely szerint adott sejtvonalat adott típusú és koncentrációjú szerrel kezeltünk, 4 azonos időben végzett párhuzamos kísérlettel végeztünk, melyet háromszor megismételtünk.

## **Statisztikai analízis**

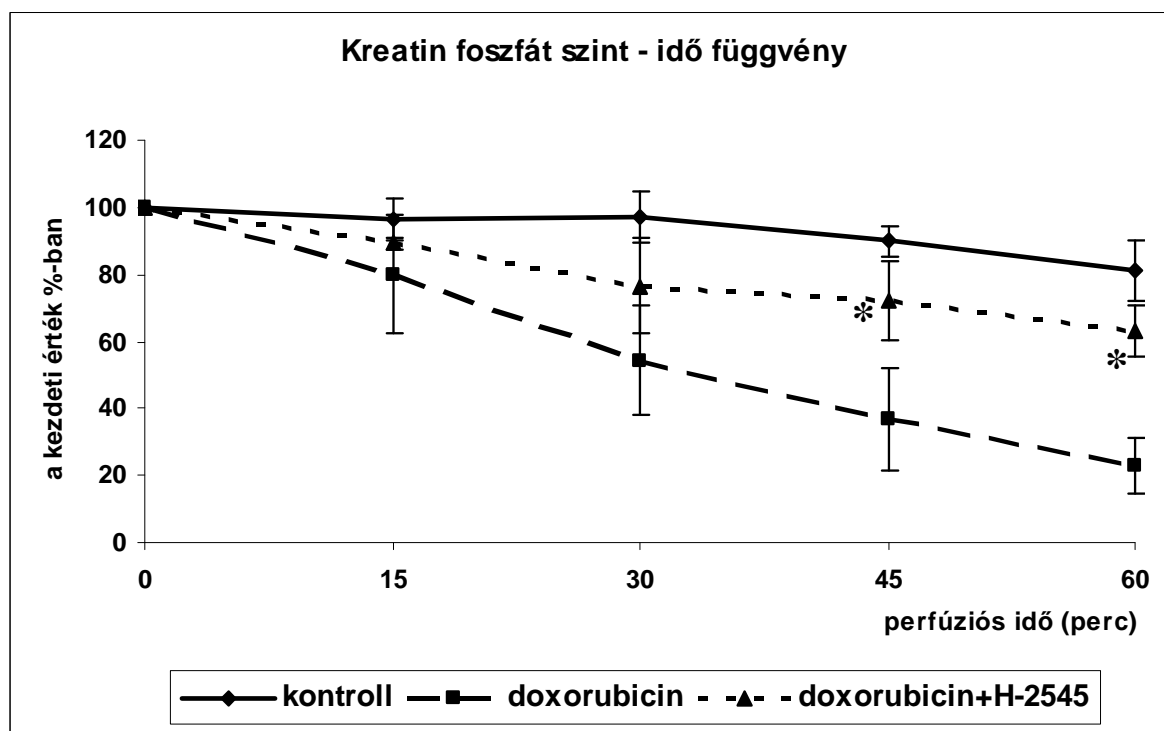
Az eredmények szignifikáns ( $p < 0,05$ ) különbözőségének megállapítására F próbát követően kétmintás  $t$  próbát alkalmaztunk.

## Eredmények

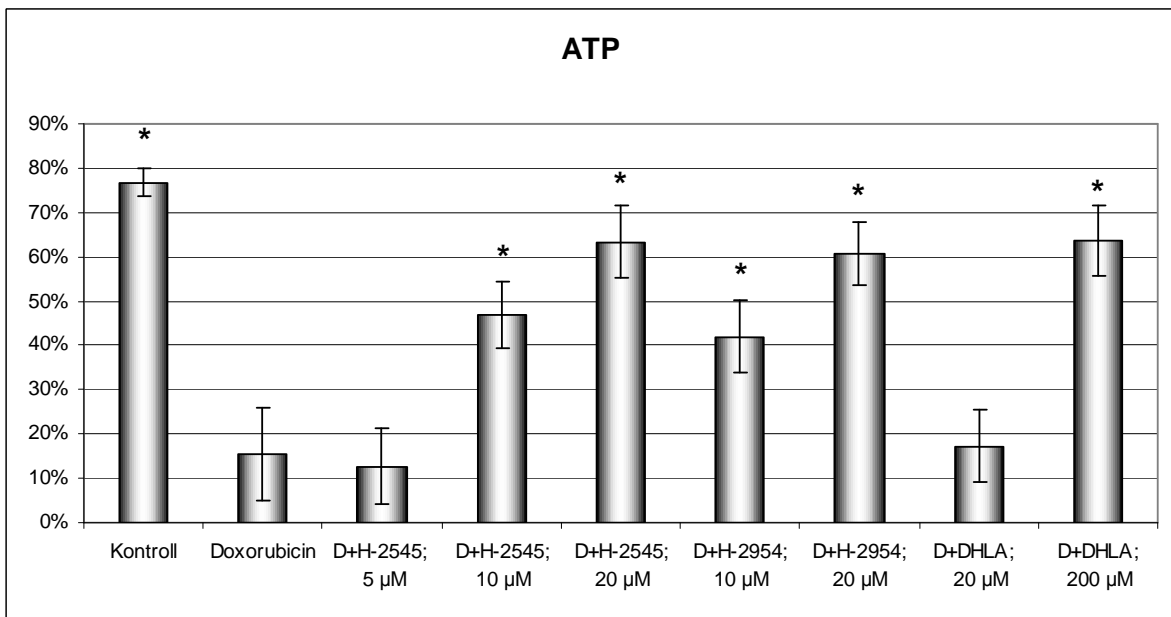
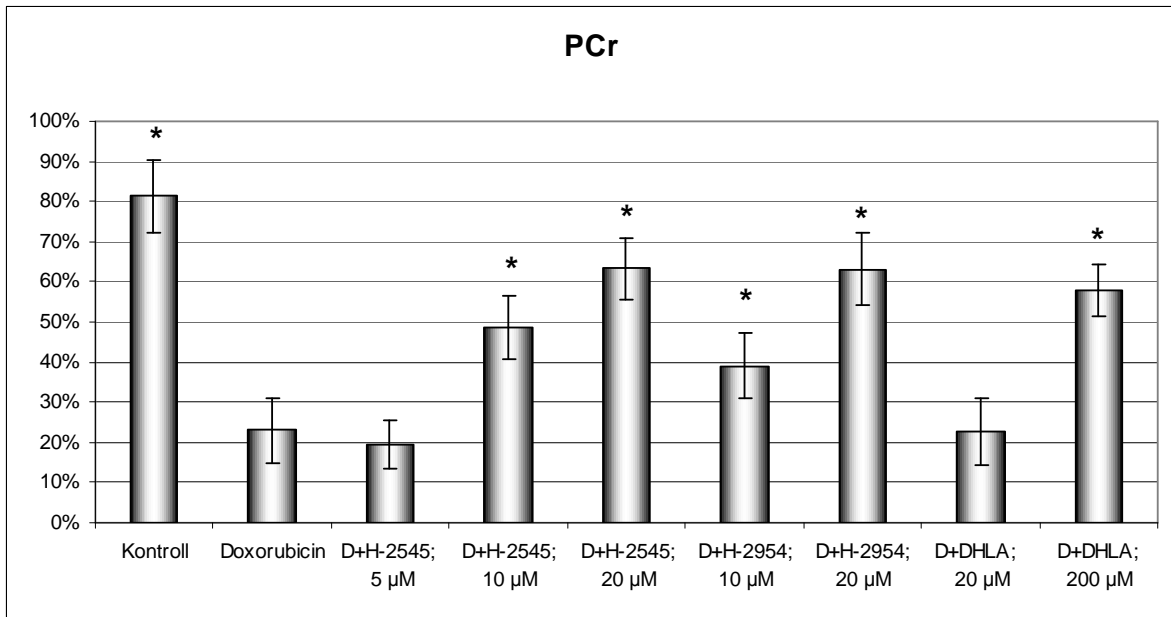
### H-2545, H-2954

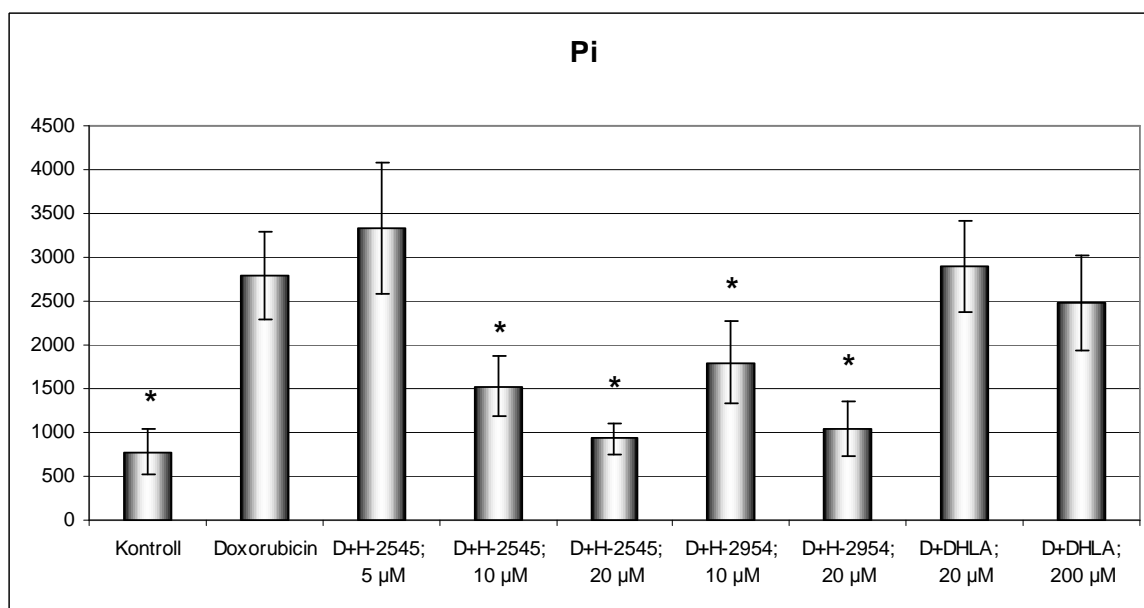
#### A H-2545 és metabolitjának kardioprotektív hatása a doxorubicin kiváltotta károsodott miokardiális energia metabolizmusra

Az egy órás perfúzió végén a kreatin-foszfát (PCr) szintje a doxorubicin kezelt szívekben jelentősen csökkent (2.3 ábra).



2.3 ábra: Kreatin foszfát szint időbeni alakulása a perfúzió alatt. Az ábrán a 15., 30., 45., 60. percben mért értékek kerültek ábrázolásra \* a csak doxorubicinnel kezelt csoporttól eltérés:  $p < 0,05$ . Az értékeket a mért értékek átlaga  $\pm$  középérték szórása formában adtuk meg.





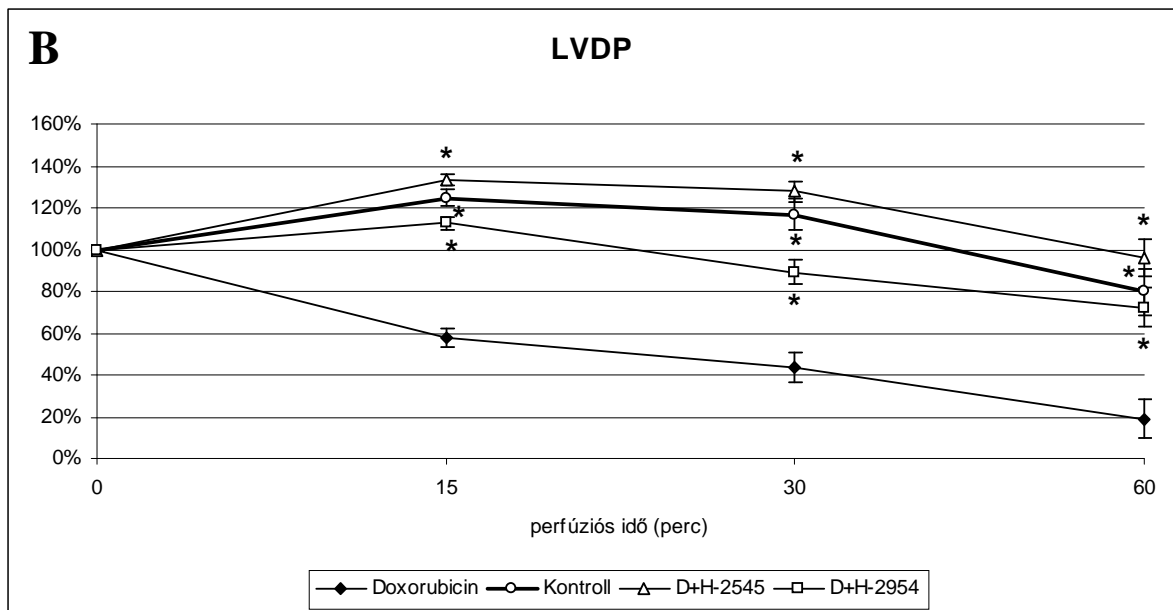
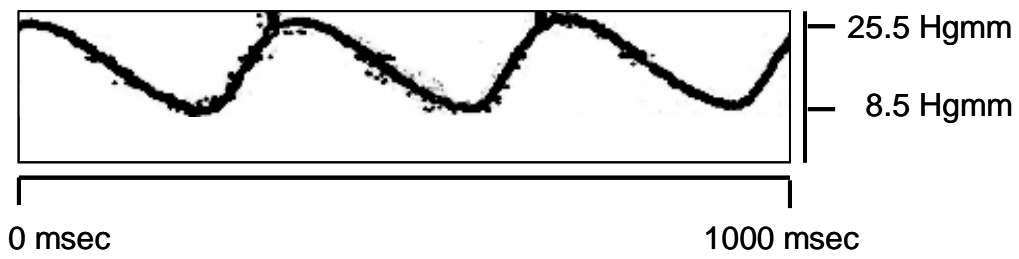
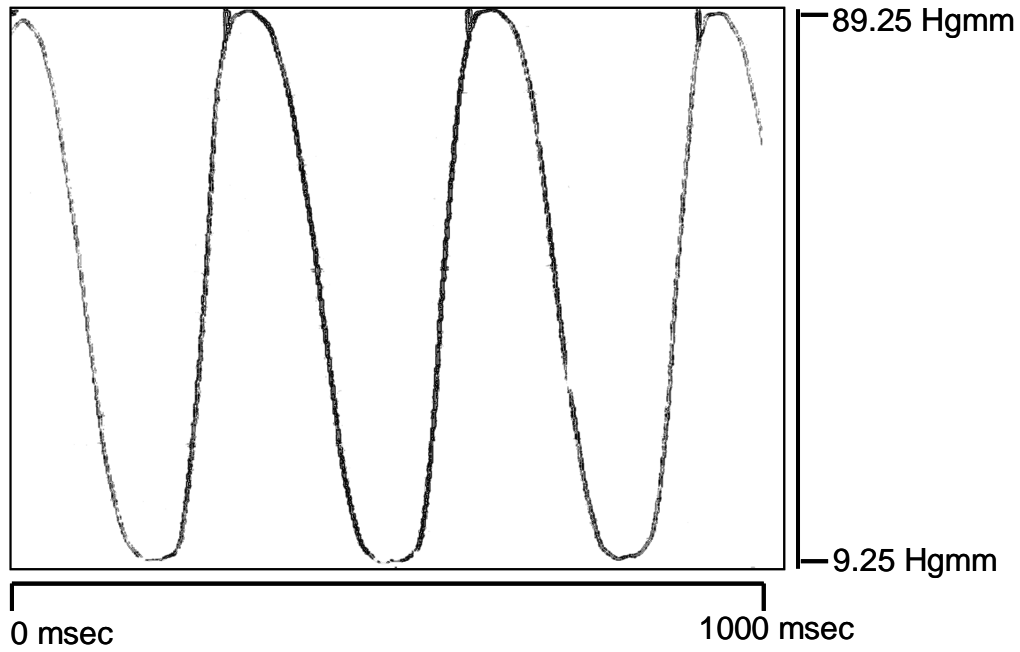
2.4 ábra: A H-2545 és metabolitjának (H-2954) dózis függő hatása a kreatin foszfát (PCr), ATP (ATP) és az anorganikus foszfát (Pi) szintekre. Az egy órás perfúzió végén mért kreatin foszfát és ATP koncentrációkat a kiindulási érték százalékában, az anorganikus foszfátszintet önkényes egységben adtuk meg. \* a csak doxorubicinnel kezelt csoporttól eltérés:  $p < 0,05$ . D: doxorubicin, DHLA: dihidrolipoamid. Az értékeket a mért értékek átlaga  $\pm$  középérték szórása formában adtuk meg.

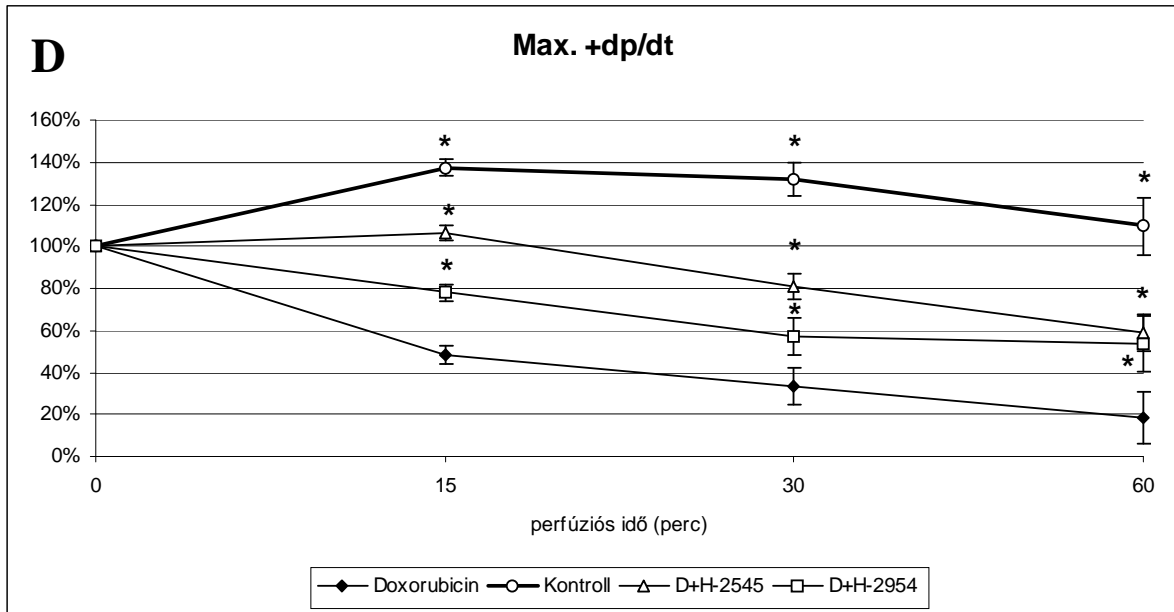
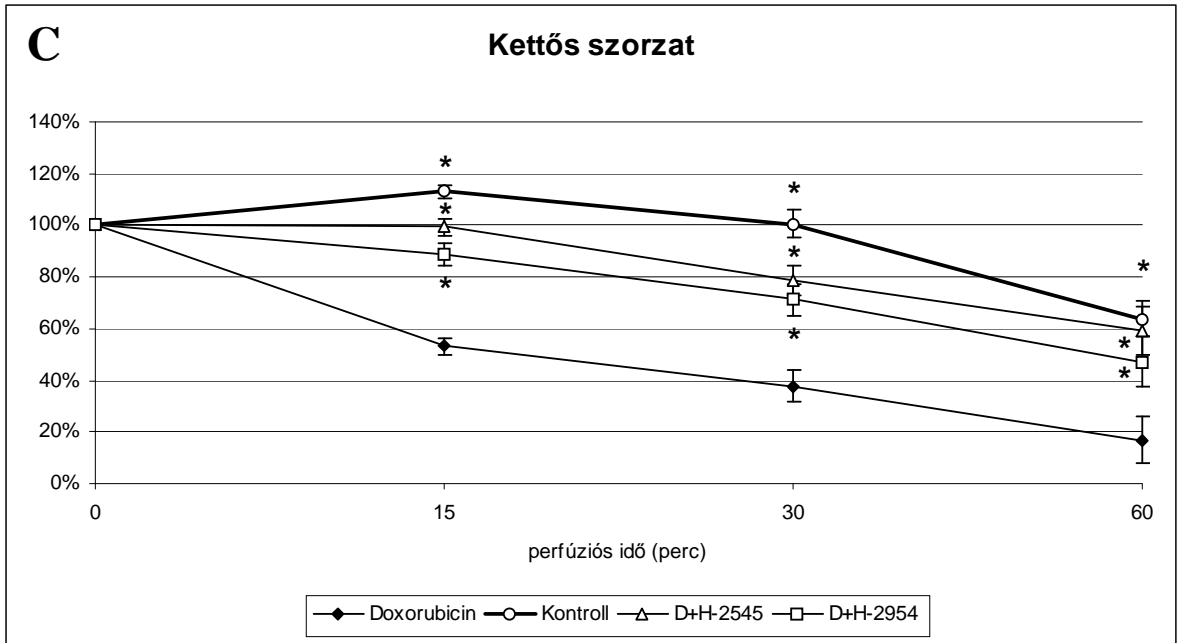
A nagy energiájú foszfátok szintjének csökkenését mind a H-2545, mind a H-2954 10 és 20  $\mu\text{M}$  koncentrációban képes volt gátolni (2.4 ábra). A közismert antioxidáns dihidrolipoamid (DHLA) 20  $\mu\text{M}$  koncentrációban nem, csak 200  $\mu\text{M}$  koncentrációban tudta megakadályozni a kreatin-foszfát lebomlását. Hasonló eredmények születtek az ATP szint vizsgálatokor is. A doxorubicin kezelt szívekben anorganikus foszfát akkumulálódott, amely kedvezőtlen energiaállapotot a H-2545 és H-2954 kezelés megelőzött (2.4 ábra).

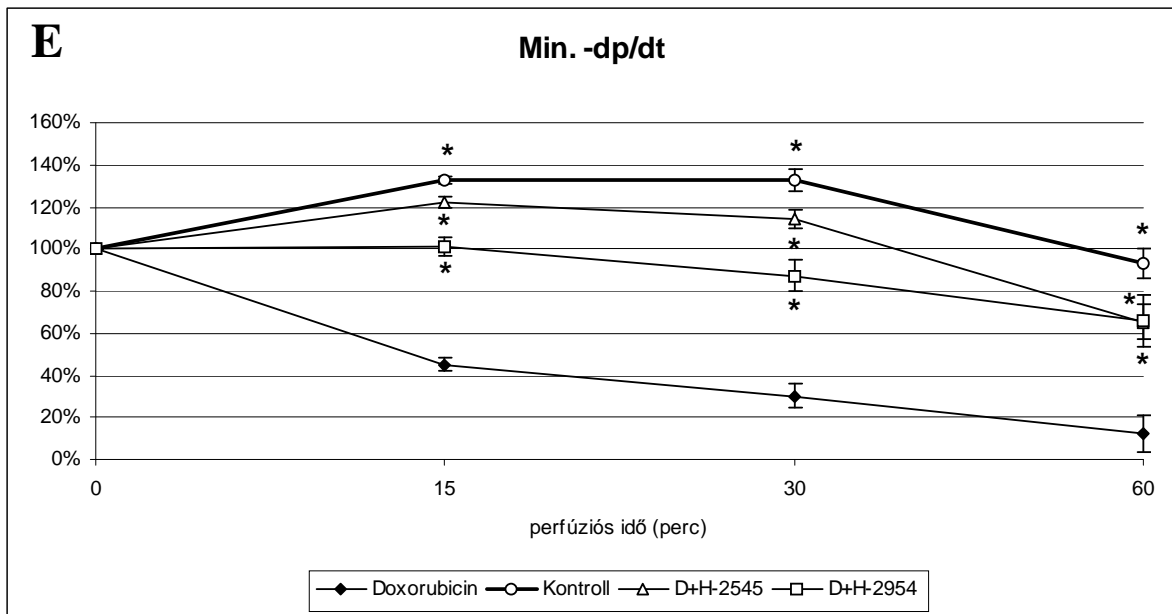


### **Antioxidáns kezelés utáni szívteljesítmény**

Az adaptációs periódust követően az LVDP  $78,9 \pm 5,1$  Hgmm, a kettős szorzat  $22,3 \pm 1,44 \times 10^3$  Hgmm/perc,  $dP/dt_{\max}$   $2479 \pm 207$  Hgmm/s,  $dP/dt_{\min}$   $1756 \pm 71$  Hgmm/s volt átlagosan  $197 \pm 19$  ütés/perc szívfrekvenciával. Az egyórás doxorubicin perfúzió alatt az LVDP a kezdeti értékhez képest csökkent, a H-2545 és metabolitja  $20 \mu\text{M}$ -os koncentrációban azonban a teljesítményromlást kivédte (2.5 ábra). A doxorubicin a kettős szorzat mérésekor a kontroll csoporthoz képest jelentős teljesítménybeli romlást okozott, melyet azonban kísérleti szereink (H-2545, H-2954) kivédtek ( $p < 0,05$ ) (2.5 ábra). Kísérleti körülményeink között a doxorubicin a másik két kontraktilis teljesítményre jellemző paramétert is csökkentette. Ahogy a 2.5 ábrán is látható, a  $dP/dt_{\max}$  és a  $dP/dt_{\min}$  perfúzió végén mért értékei jelentősen csökkentek doxorubicin adásakor, melyet mind a H-2545, mind a H-2954 mérsékelte.

**A**



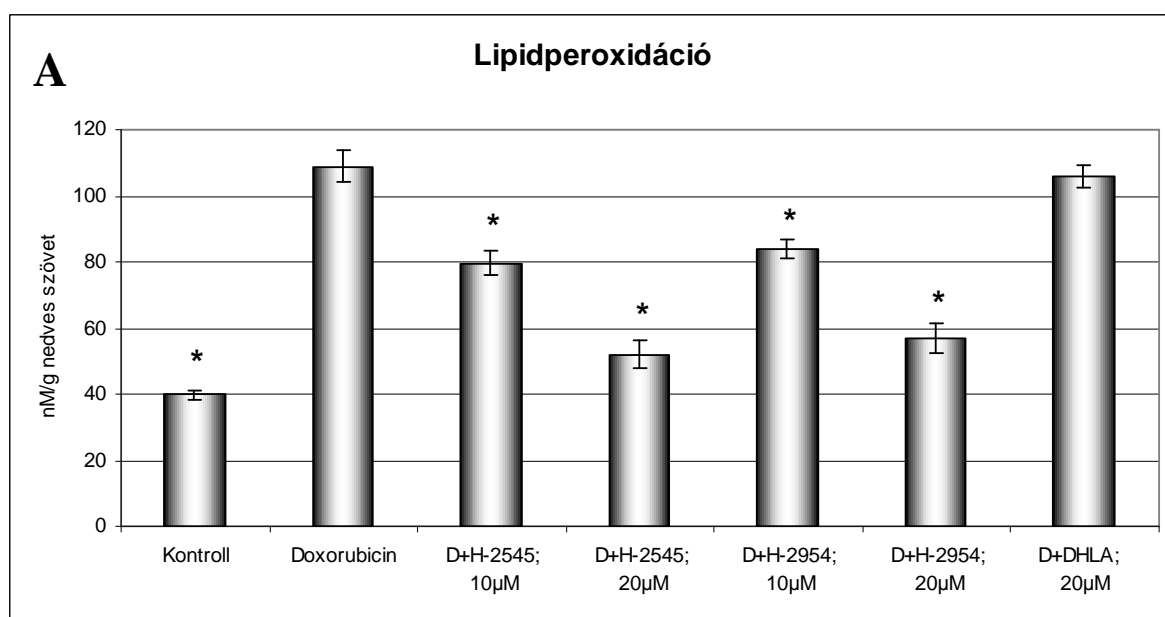


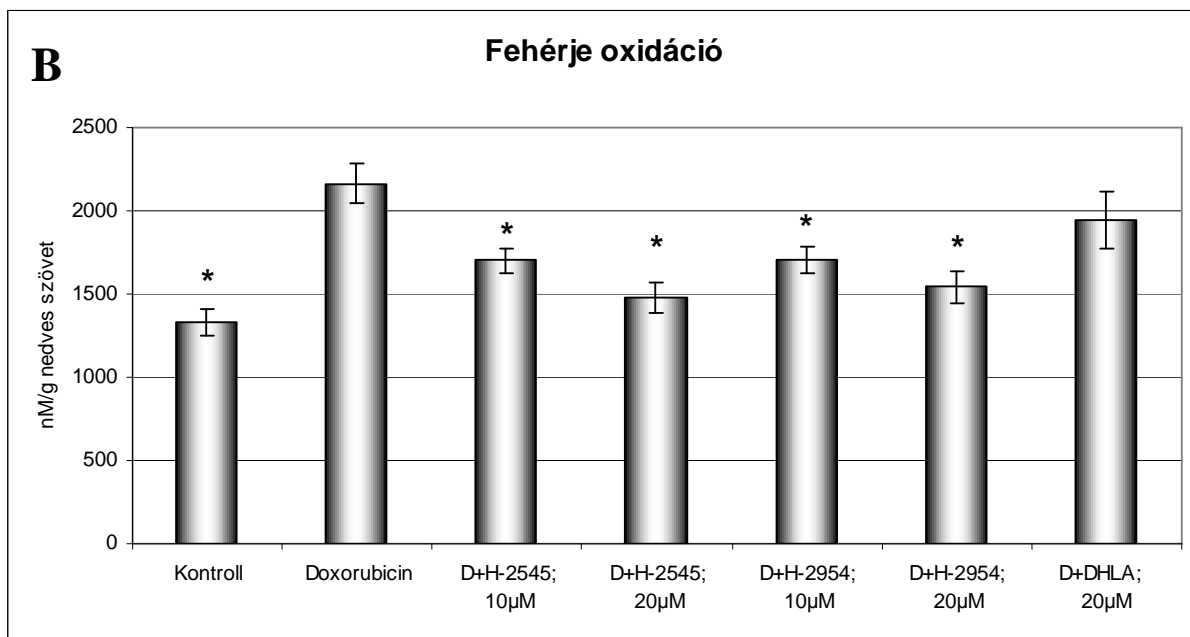
2.5 ábra: A H-2545 és metabolitjának (H-2954) hatása a bal kamrai teljesítményre. A mérések a nulladik, tizenötödik, harmincadik és hatvanadik percben készültek. Az eredményeket a nulladik percben mért értékek százalékos arányában adtuk meg. A: bal kamrai nyomásgörbe a doxorubicin okozta teljesítményromlás érzékeltetésére az egy órási doxorubicin ( $100 \mu\text{M}$ ) perfúzió előtt (fent) és után (lent); B: LVDP (szisztolés nyomás-diasztolés nyomás) C: kettős szorzat, D:  $+dP/dt_{max}$ ; E:  $+dP/dt_{min}$  \* a csak doxorubicinnel kezelt csoporttól eltérés:  $p < 0,05$ . D: doxorubicin, DHLA: dihidrolipoamid. Az értékeket a mért értékek átlaga  $\pm$  középérték szórása formában adtuk meg.

## Doxorubicin kiváltotta lipidperoxidáció és fehérje oxidáció kivédése H-2545 és H-2954 kezeléssel

A doxorubicin különféle sejtalkotókra kifejtett káros hatását már ismerjük<sup>19,108,109</sup>. Jelen kísérletünkben a miokardiális károsodás olyan paraméterei, mint a lipidperoxidáció és fehérje oxidáció doxorubicin hatására jelentősen emelkedtek. A lipidperoxidáció mértékét jellemző tiobarbitursav reaktív anyagok (TBARS) mennyisége háromszorosára nőtt a kontroll csoporthoz képest, amikor a doxorubicint önmagában alkalmaztuk, melyet a H-2545 vagy H-2954 együttes adásával kivédtünk. A DHLA-t hasonló nagyságrendű koncentrációban (20  $\mu$ M) alkalmazva az emelkedett lipidperoxidáció szintjét nem tudtuk csökkenteni (2.6 ábra).

A szabadgyökök, melyek a doxorubicin adását követően keletkeznek, fehérje oxidációt is indukálnak, melyet a fehérje karbonil tartalmának meghatározásával tudunk jellemezni. A 2.6/B ábra mutatja, hogy a doxorubicin szignifikáns mértékben ( $p < 0,05$ ) megemelte a fehérjék karbonil csoportjának mennyiségét, míg H-2545 illetve H-2954 hozzáadásával a fehérje oxidáció csökkent.

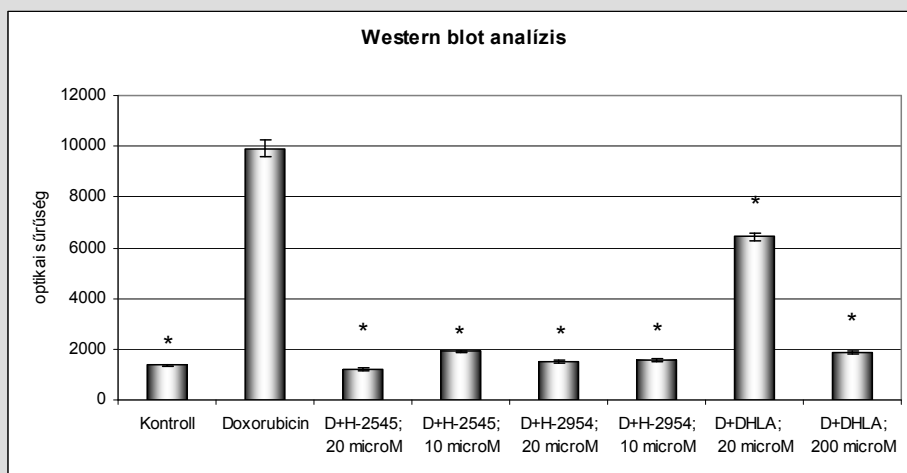
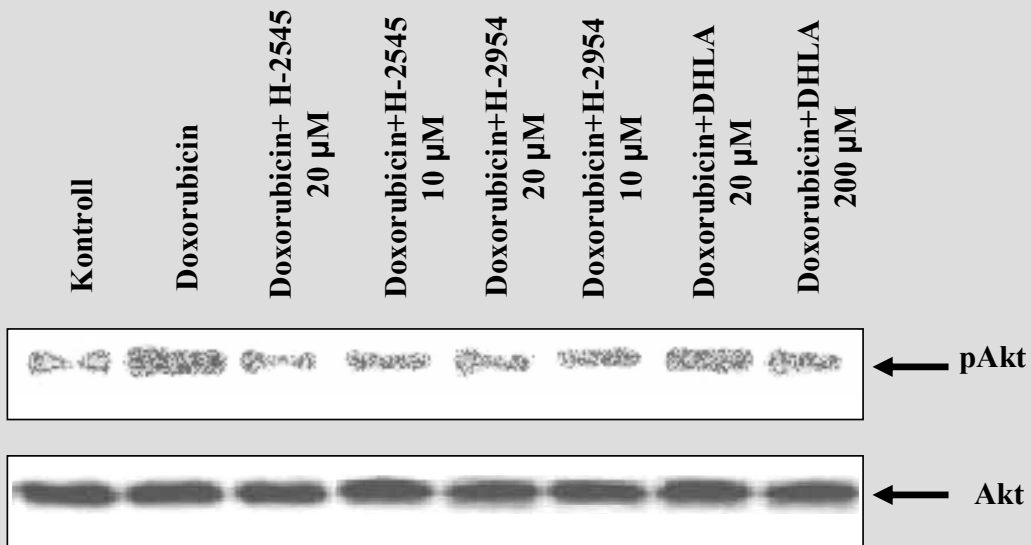




2.6 ábra: A H-2545 és metabolitjának (H-2954) dózis függő hatása a lipidperoxidációra (A) és fehérje oxidációra (B). Az egy órás perfúzió végén mértük a TBARS (A) és a fehérje aldehid (B) mennyiségét. \* a csak doxorubicinnel kezelt csoporttól eltérés:  $p < 0,05$ . D: doxorubicin, DHLLA: dihidrolipoamid. Az értékeket a mért értékek átlaga  $\pm$  középérték szórása formában adtuk meg.

### Akt foszforiláció

Doxorubicin kezelés hatására, a kezeletlen csoporttal összehasonlítva, jelentős Akt foszforiláció figyelhető meg, mely azt sugallja, hogy a szabadgyökök hatást gyakoroltak a tirozin-kináz/Akt jelátviteli útra. Ez az aktivitás csökkenthető volt, ha a doxorubicinnel kezelt szívekhez H-2545/H-2954-t adtunk, feltételezhetően azért, mert az antioxidáns anyagok a szabadgyökök befogása révén csökkentik az Akt kináz kaskád aktivációját. A DHLLA 20  $\mu$ M-os koncentrációban nem, csak jóval nagyobb, 200  $\mu$ M-os koncentrációban csökkentette az Akt aktivációt (2.7 ábra).



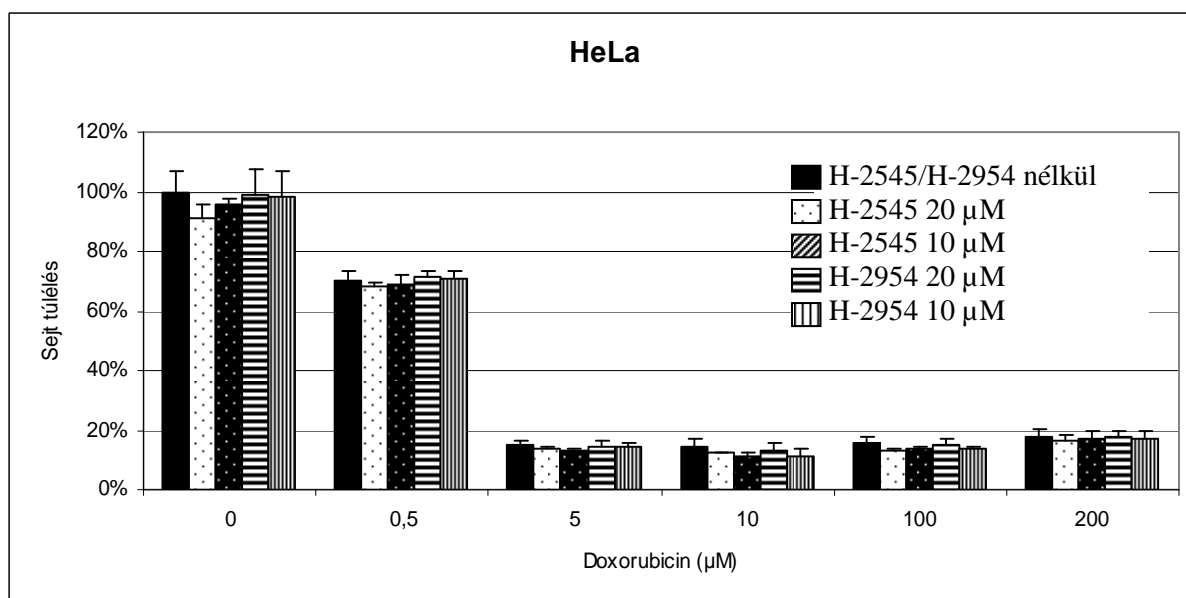
2.7 ábra: A H-2545, H-2954 és a dihidrolipoamid dóziszfüggő hatása az Akt foszforilációra. Fent: Reprezentatív immunoblot 6 hasonló eredményt mutató kísérletből. Lent: A foszforilált Akt denzitása.

pAkt: Akt Ser473-n foszforilálva D: doxorubicin, DHHLA: dihidrolipoamid.

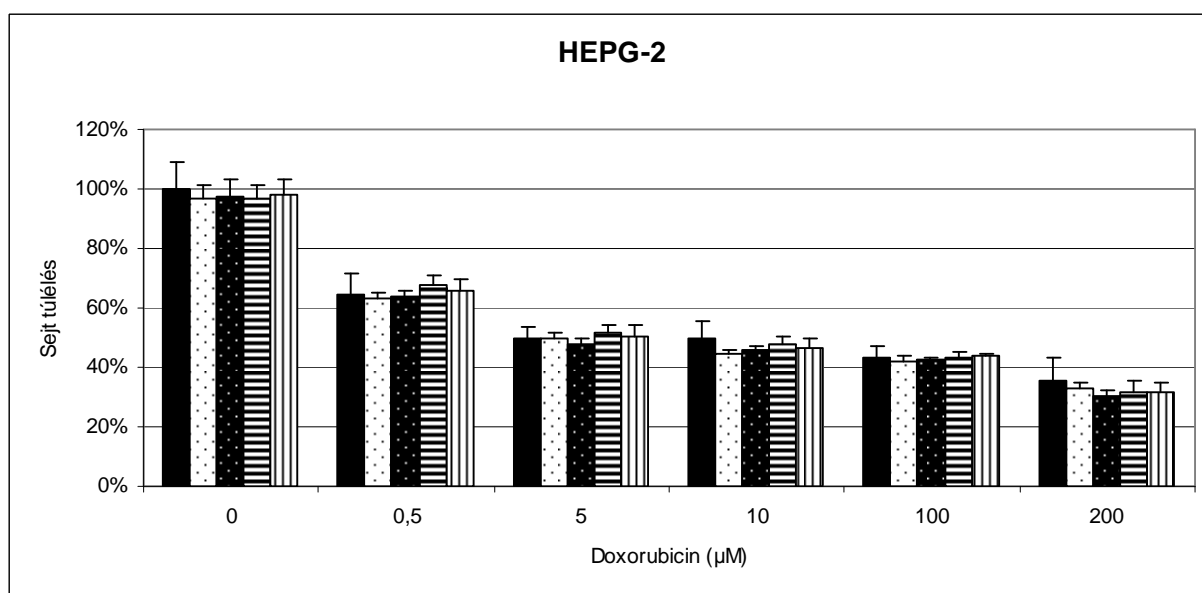
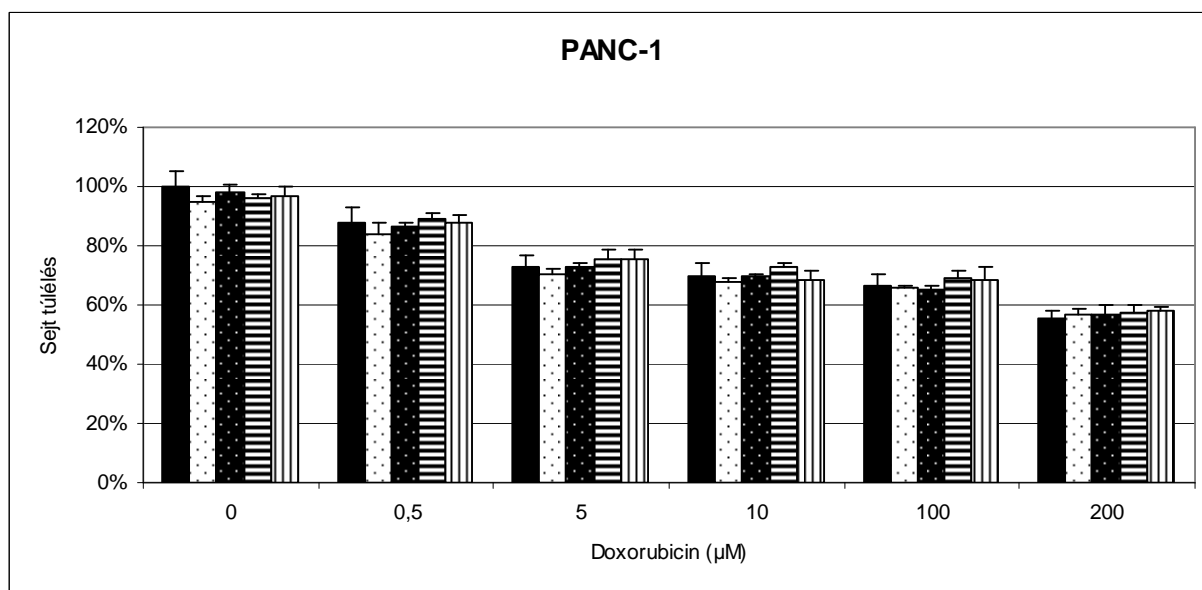
\* A doxorubicin kezelt csoportoktól szignifikáns ( $p < 0,01$ ) eltérés

## Változatlan antineoplasztikus doxorubicin hatás H-2545 jelenlétében

Mivel a doxorubicin a rosszindulatú daganatok kezelésére alkalmazott gyógyszer, a szer mellékhatásaira adott hatóanyagoktól elvárható, hogy a doxorubicin daganatellenes hatásait ne csökkentsék. Ennek vizsgálatára változó koncentrációban alkalmazott doxorubicinnel együtt H-2545-t és H-2954-t adtunk daganatos sejt kultúrákhoz (HeLa, PANC-1, HEPG-2). Ahogy a 2.8. ábra is mutatja, az antioxidáns szerek alkalmazása nem befolyásolta a doxorubicin daganatölő tulajdonságait.





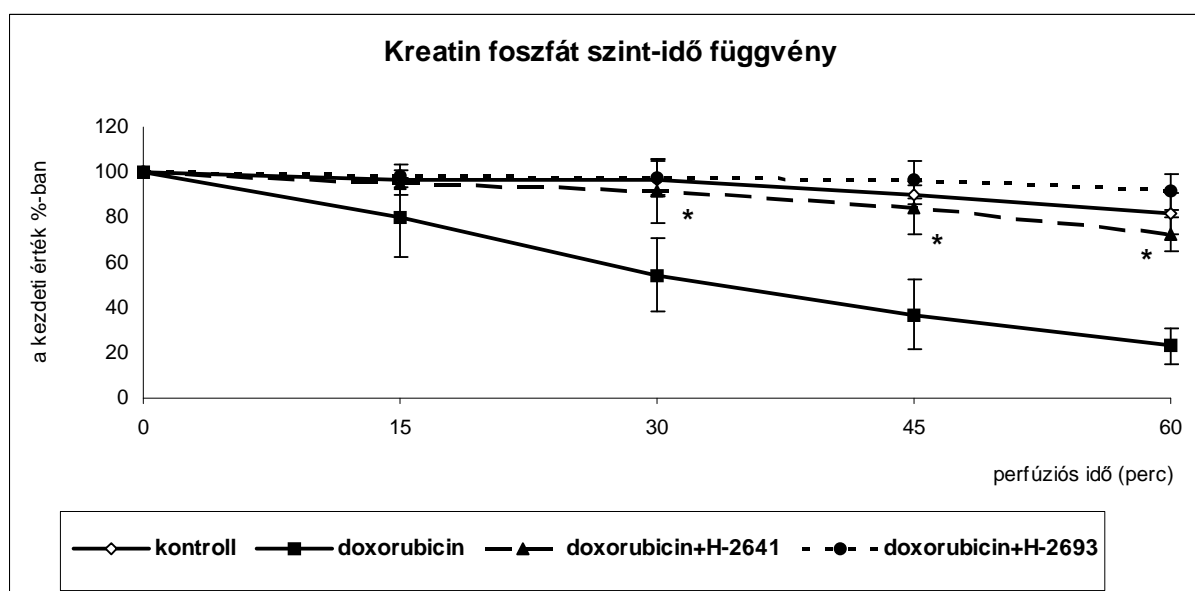


2.8 ábra: A doxorubicin változatlan antineoplasztikus tulajdonsága H-2545, valamint H-2954 jelenlétében különböző malignus sejtvonalakra. A sejteket különböző koncentrációjú doxorubicin (vízszintes tengely) károsításnak tettük ki H-2545 és H-2954 nélkül, és jelenlétében (20 µM, 10 µM). Az adott koncentráció tartományokban nem volt változás a doxorubicin daganatölő hatásában H-2545/H-2954 kezelés mellett sem.

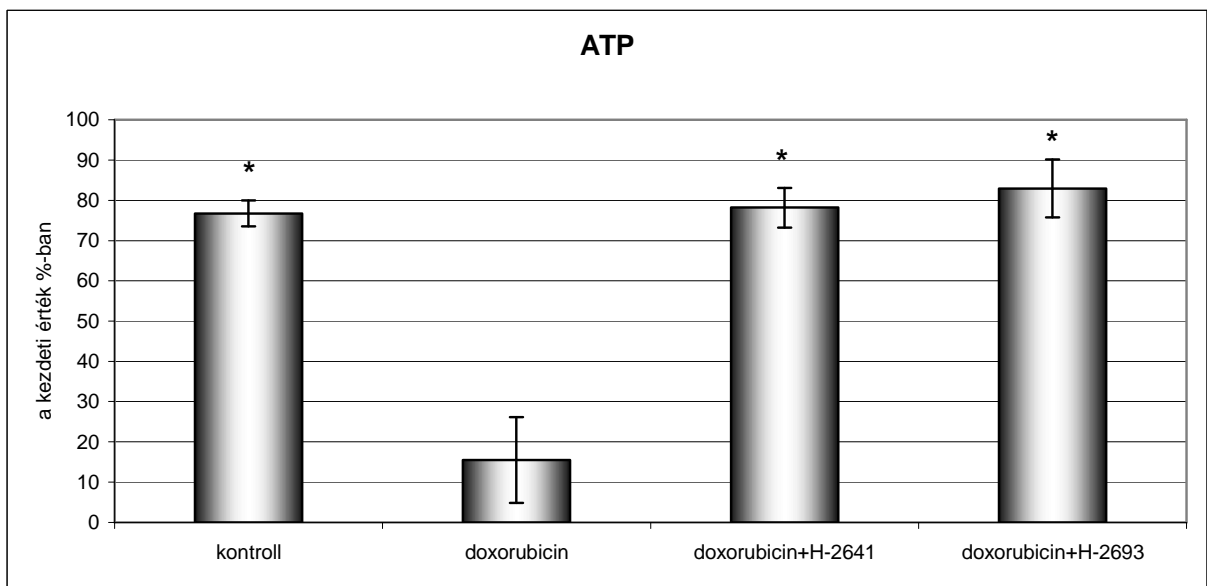
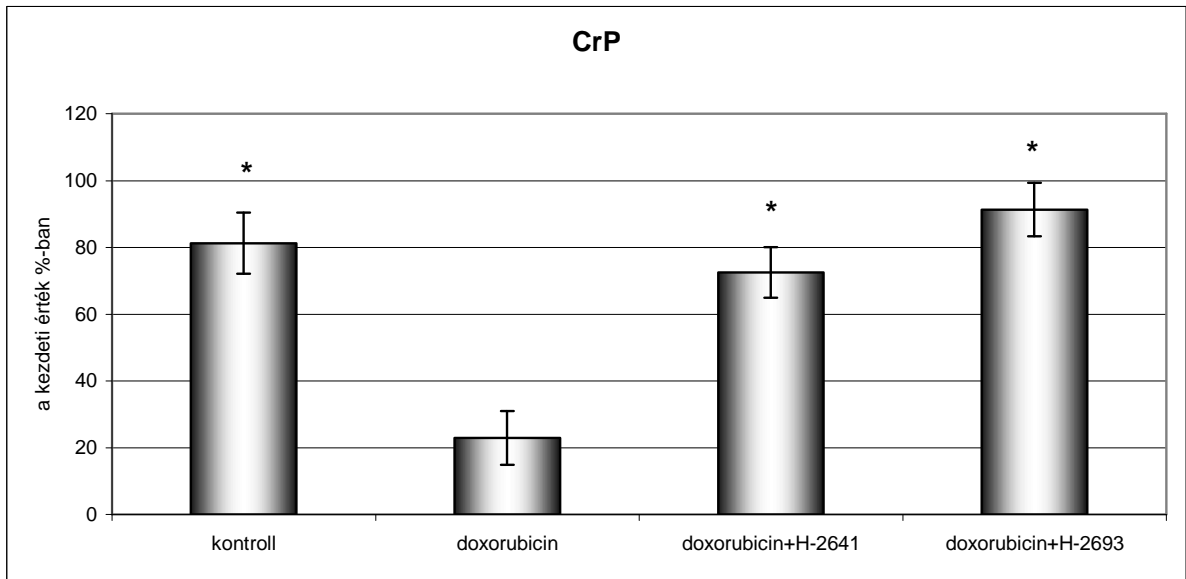
## H-2641, H-2693

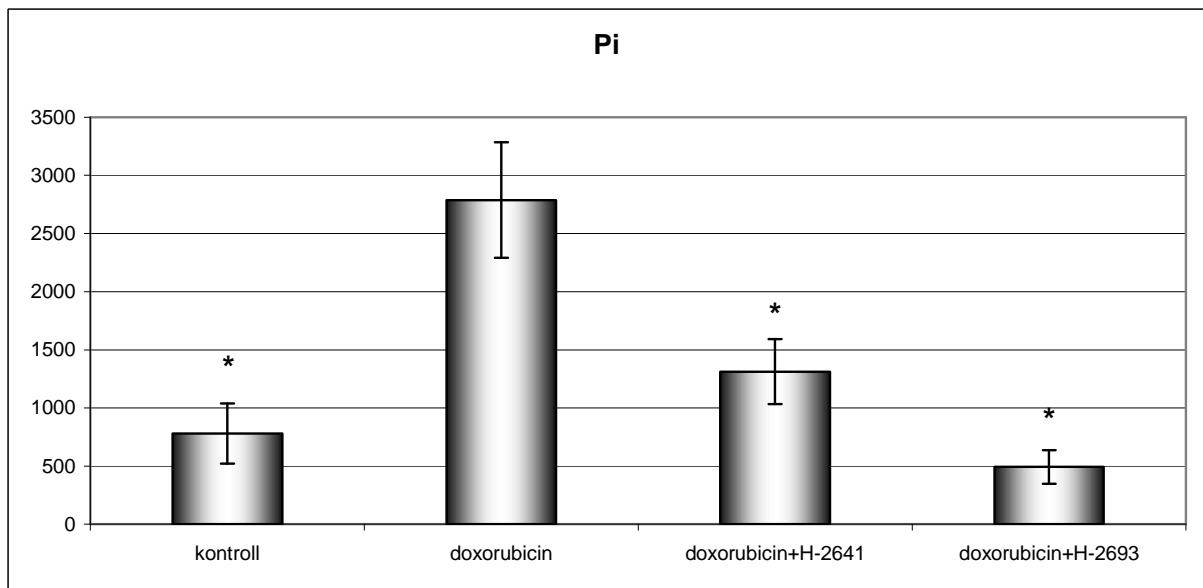
### A H-2641 és H-2693 kardioprotektív hatása a doxorubicin kiváltotta károsodott miokardiális energia metabolizmusra

Az egy órás perfúzió alatt a kreatin-foszfát (PCr) szintje a doxorubicin kezelt szívekben jelentősen csökkent (2.9 és 2.10 ábra). A nagy energiájú foszfátok szintjének csökkenését mind a H-2641, mind a H-2693 képes volt gátolni. Hasonló eredmények születtek az ATP szint vizsgálatakor is (2.10 ábra). A doxorubicin kezelt szívekben anorganikus foszfát akkumulálódott, amely kedvezőtlen energiaállapotot a H-2641 és H-2693 kezelés képes volt megelőzni.



2.9 ábra: Kreatin foszfát szint időbeni alakulása a perfúzió alatt. Az ábrán a 15., 30., 45., 60. percben mért értékek kerültek ábrázolásra \* a csak doxorubicinnel kezelt csoporttól eltérés:  $p < 0,05$ . Az értékeket a mért értékek átlaga  $\pm$  középérték szórása formában adtuk meg.

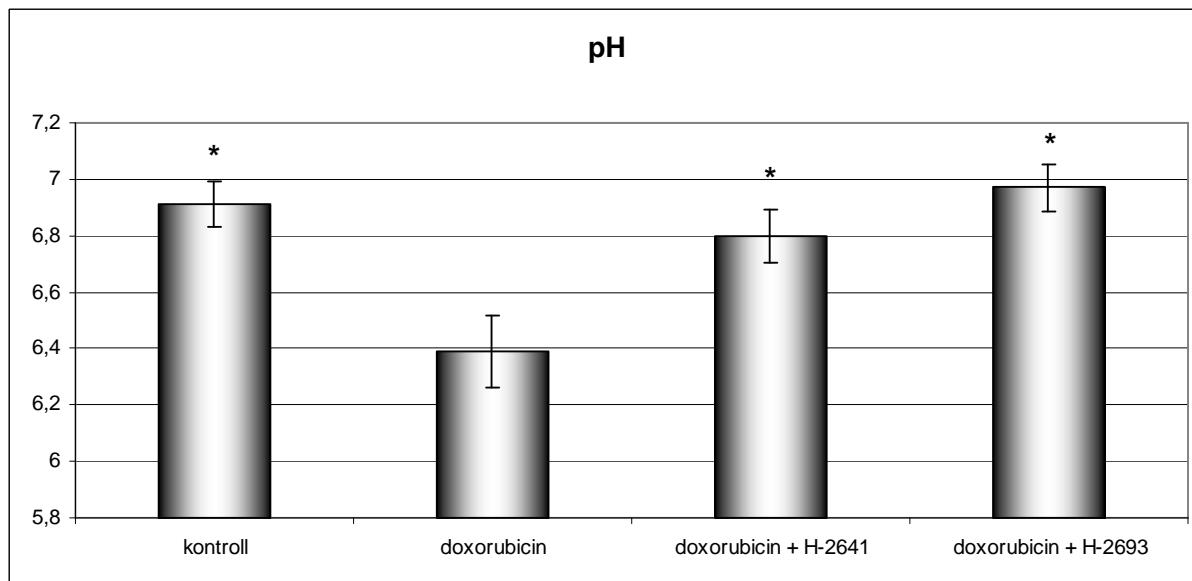




2.10 ábra: A H-2641 és H-2693 hatása a kreatin foszfát, az ATP és az anorganikus foszfát szintekre. Az egy órás perfúzió végén mért kreatin foszfát és ATP koncentrációját a kiindulási érték százalékában, az anorganikus foszfát értéket önkényes egységben adtuk meg. \* a csak doxorubicinnel kezelt csoporttól eltérés:  $p < 0,05$ . Az értékeket a mért értékek átlaga  $\pm$  középérték szórása formában adtuk meg.

### A H-2641 és H-2693 kardioprotektív hatása a doxorubicin kiváltotta miokardiális pH csökkenésre

Az egy órás perfúzió alatt a miokardiális pH doxorubicin hatására szignifikáns mértékben csökkent. A kémhatás nem változott doxorubicinnel egyidejűleg alkalmazott H-2641, valamint H-2693 kezelés hatására (2.11 ábra).

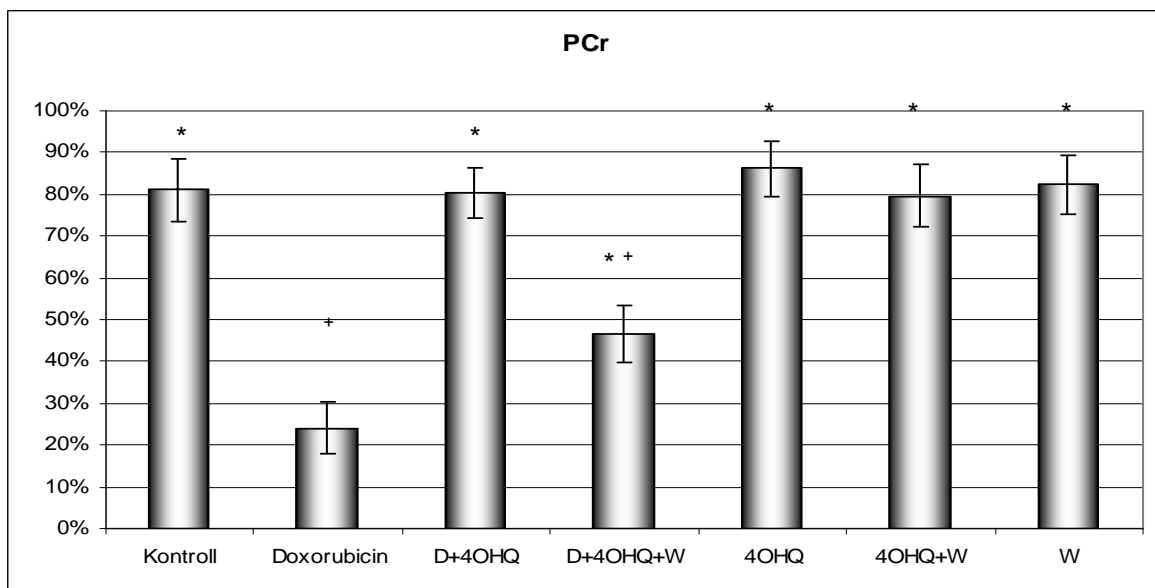


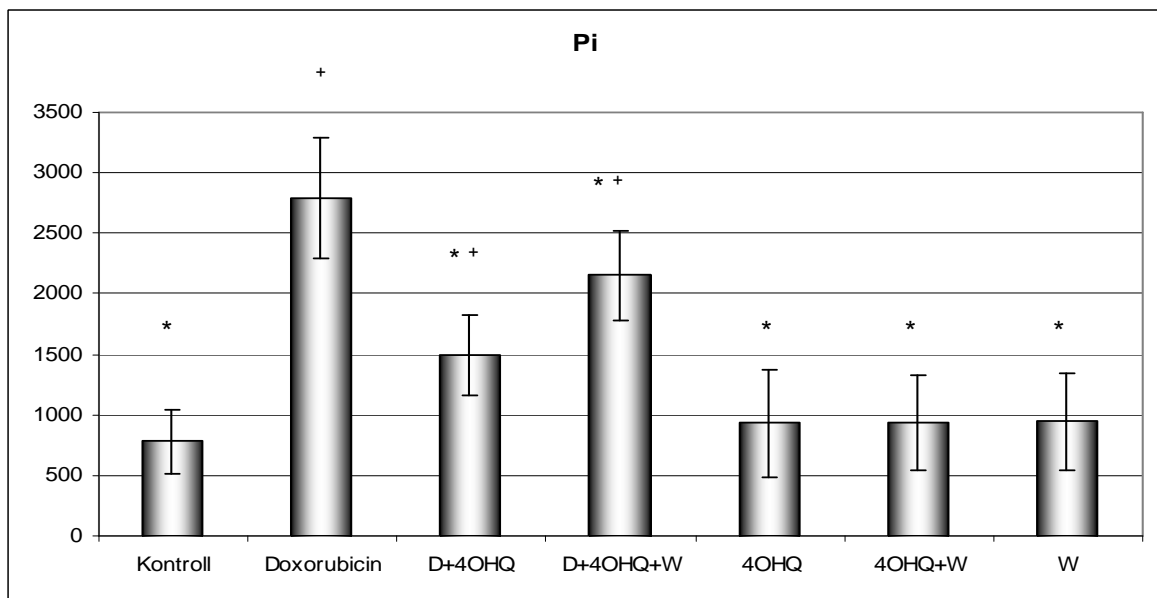
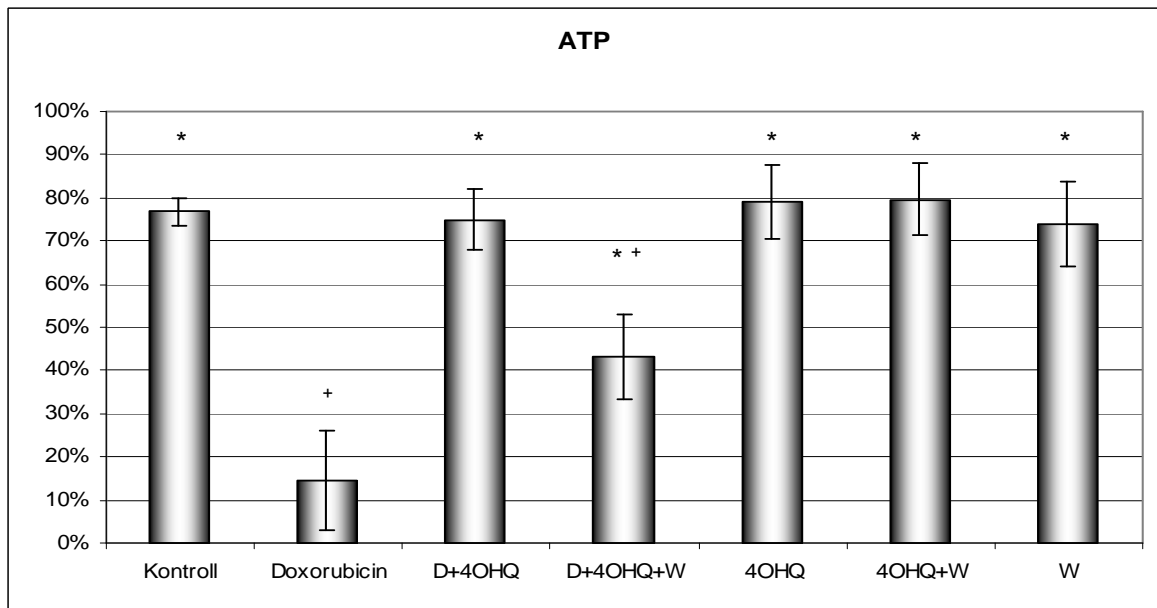
2.11 ábra: A H-2641 és H-2693 hatása a miokardiális pH szintre. Az egy órás perfúzió végén mértük a miokardiális pH szintet. \* a csak doxorubicinnal kezelt csoporttól eltérés:  $p < 0,05$ . Az értékeket mért értékek átlaga  $\pm$  középérték szórása formában adtuk meg.

## 4-hidroxi-kinazolin

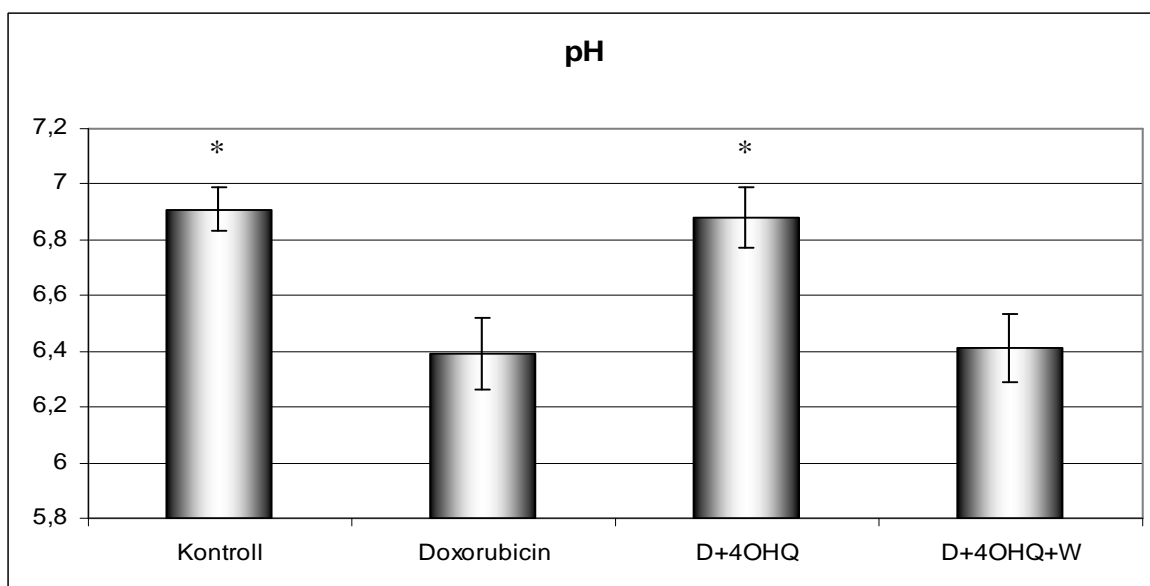
### **A 4-hidroxi-kinazolin kardioprotektív hatása a doxorubicin kiváltotta károsodott miokardiális energia metabolizmusra**

Az egy órás perfúzió végén a nagy energiájú foszfátok szintje a doxorubicin kezelt szívekben jelentősen csökkent. A kreatin foszfát, valamint ATP szintjében bekövetkező csökkenést a 4-hidroxi-kinazolin, a doxorubicinnal kezelt csoporthoz képest, szignifikáns mértékben mérsékelte. A protektív PI3-kináz gátlásával, wortmannin hozzáadásával a 4 OHQ nagy energiájú foszfátokra gyakorolt kedvező hatása csökkent. Önmagában adott 4OHQ, wortmannin, valamint ezek együttes adásakor a kontroll értékhez képest nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést (2.12 ábra). Az izolált patkányszívekben anorganikus foszfát halmozódott fel doxorubicinnal kezelt szívek esetén, mely 4-hidroxi-kinazolinnal mérsékelhető volt (2.12 ábra).





2.12 ábra: A 4-hidroxi-kinazolin hatása a kreatin foszfát, ATP és anorganikus foszfát szintekre. Az egy órás perfúzió végén mért kreatin foszfát és ATP koncentrációkat a kiindulási érték százalékában, az anorganikus foszfát értékeket önkényes egységben adtuk meg. \* a csak doxorubicinnel kezelt csoporttól eltérés:  $p < 0,05$ . D: doxorubicin, 4OHQ: 4-hidroxi-kinazolin, W: wortmannin. Az értékeket a mért értékek átlaga  $\pm$  középérték szórása formában adtuk meg.



2.13 ábra: A 4-hidroxi-kinazolin hatása a miokardiális pH szintre. Az egy órás perfúzió végén mértük a miokardiális pH szintet. \* a csak doxorubicinnel kezelt csoporttól eltérés:  $p < 0,05$ . Az értékeket a mért értékek átlaga  $\pm$  középérték szórása formában adtuk meg.

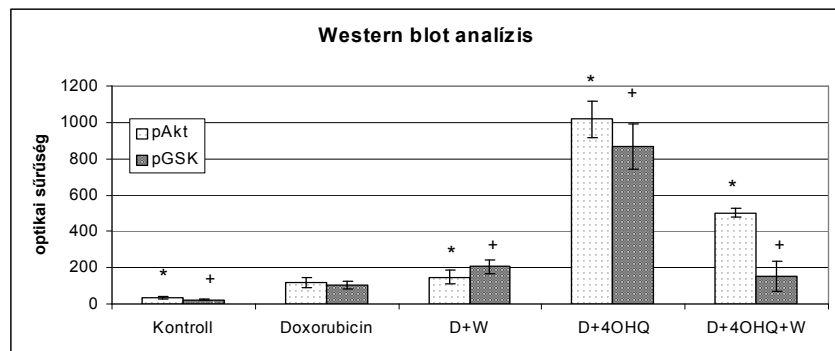
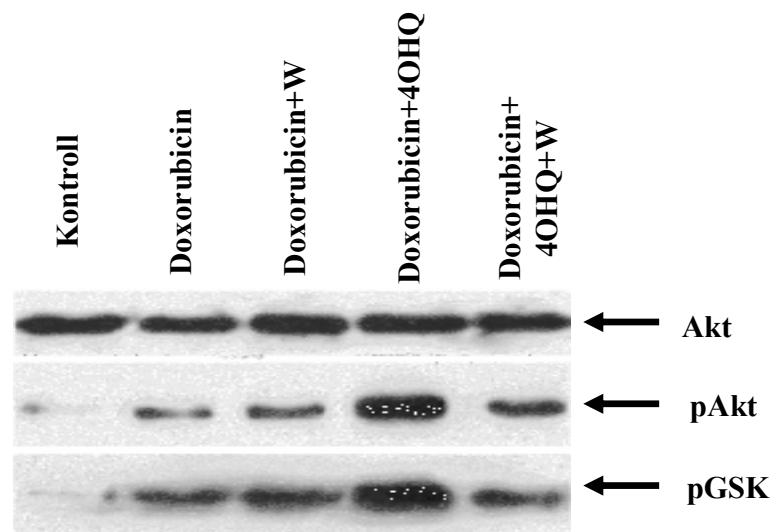
A 4-hidroxi-kinazolin kardioprotektív hatása a doxorubicin kiváltotta miokardiális pH csökkenésre

Az egy órás perfúzió alatt a miokardiális pH doxorubicin hatására szignifikáns mértékben csökkent. A kémhatás nem változott doxorubicinnel egyidejűleg alkalmazott 4OHQ hatására, azonban, a protektív jelátviteli útvonal gátlásával, a 4OHQ, doxorubicin által kiváltott, pH csökkenést kivédő hatása elmaradt (2.13 ábra).

### Akt foszforiláció

Doxorubicin kezelés hatására, a kezeletlen csoporttal összehasonlítva, korábbi kísérletünkkel összhangban Akt, valamint GSK foszforiláció figyelhető meg. Az aktivitás nem volt csökkenthető wortmanninnal, mely arra enged következtetni, hogy a doxorubicin kiváltotta Akt foszforiláció egy, a PI3-kináztól független úton valósul meg. PARP gátló erőteljesen növelte az Akt és GSK foszforiláltságát, melyet a PI3-kináz gátló mérsékelte (2.14 ábra).





2.14 ábra: PARP inhibitor hatása az Akt és GSK foszforilációra

Fent: Reprezentatív immunoblot 6 hasonló eredményt mutató kísérletből.

Lent: A foszforilált Akt és GSK denzitása.

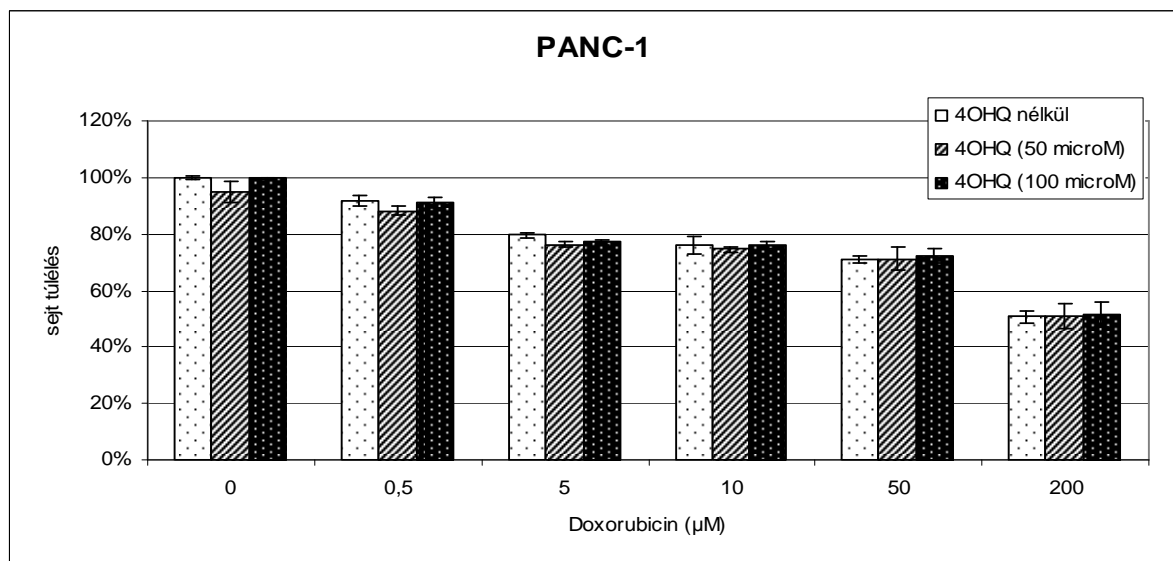
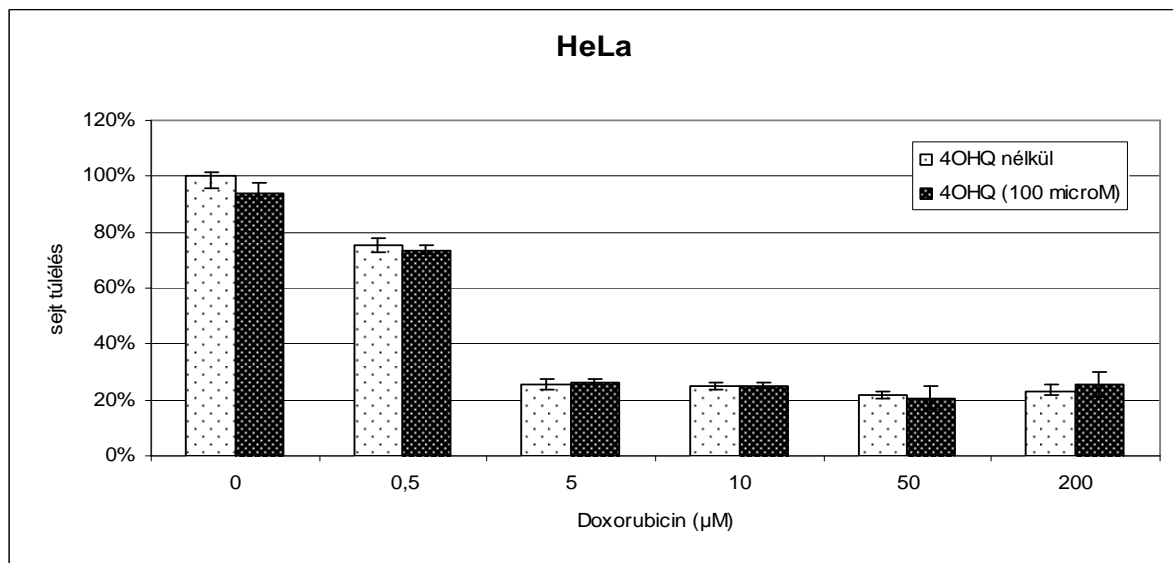
\* A doxorubicin kezelt csoportoktól történő szignifikáns ( $p < 0,01$ ) eltérés pAkt esetében

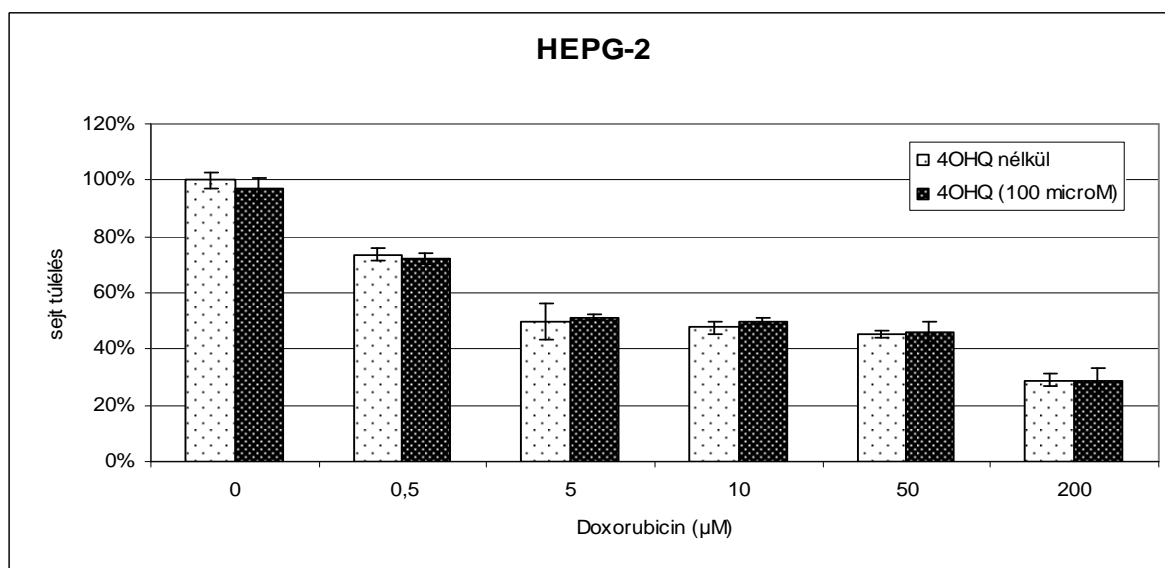
+ A doxorubicin kezelt csoportoktól történő szignifikáns ( $p < 0,01$ ) eltérés pGSK esetében

D: doxorubicin, W: wortmannin, 4OHQ: 4-hidroxi-kinazolin

## Változatlan antineoplasztikus doxorubicin hatás PARP inhibitor jelenlétében

A PARP inhibitor 4-hidroxi-kinazolin és doxorubicin együttadásakor nem észleltünk - a 4OHQ 100  $\mu\text{M}$ -os koncentrációval történő alkalmazásakor sem - a doxorubicin HeLa, PANC-1, HEPG-2 daganatos sejtvonalakra kifejtett antineoplasztikus tulajdonságában károsodást (2.15 ábra).





2.15 ábra: A doxorubicin változatlan antineoplasztikus tulajdonsága 4-hidroxi-kinazolin (4OHQ) jelenlétében különböző malignus sejtvonalakra. A sejteket különböző koncentrációjú doxorubicin (vízszintes tengely) károsításnak tettük ki 4-hidroxi-kinazolin nélkül, és jelenlétében (50 µM, 100 µM). Az adott koncentráció tartományokban nem volt változás a doxorubicin daganatölő hatásában 4-hidroxi-kinazolin kezelés mellett sem.

## Megbeszélés

A tanulmányban igazoltuk, hogy a H-2545 és metabolitja kivédte a doxorubicin kiváltotta akut kardiotoxicitást Langendorff perfúziós rendszerben. A doxorubicin fontos antineoplasztikus készítmény, a klinikumban számos tumorfajta ellen is sikerrel használható szer. Másrészt viszont, jelentős mellékhatásként, akut kardiotoxikus hatása van, hosszú távon alkalmazva pedig irreverzibilis kardiomiopátiát, következményes szívelégtelenséget okozhat. Akut kardiotoxicitás részeként a doxorubicin beadásakor, vagy nem sokkal utána tachikardia, szupraventrikuláris arritmia, atrioventrikuláris blokk léphet fel, és akár perikardiális folyadékgyülemmel együtt járó akut szívelégtelenség is kialakulhat<sup>19</sup>. A doxorubicin akut mellékhatása nagy valószínűséggel a szabadgyök generáló képességén alapul<sup>110-113</sup>. Bár néhány készítményről már leírták, hogy mérsékelni képesek a doxorubicin kiváltotta kardiotoxicitást<sup>113</sup>, az alkalmazott szerek csak korlátozott mértékben jutottak el az oxidatív károsodás feltételezett helyére. A H-2545 és H-2954 molekula-szerkezete lehetővé teszi, hogy az oxidatív károsodás elsődleges helyére eljussanak, és ott fejtsék ki gyökfogó tulajdonságukat<sup>58-60</sup>. A doxorubicinnal perfundált szívek energetikailag kedvezőtlen állapotba kerültek, melyet NMR készülékünk csökkent kreatin foszfát és ATP szint, valamint magasabb anorganikus foszfát szint mérésével igazolt. Az emelkedett anorganikus foszfát szint a mitokondriális permeabilitási pórusok megnyitásához vezethet, akár sejthalált is okozva<sup>114,115</sup>. A doxorubicin különféle sejtalkotókra kifejtett káros hatását már több helyen is közölték<sup>19</sup>. Tanulmányunkban az oxidatív sejtkárosodás indikátorai, úgymint lipidperoxidáció és fehérje oxidáció, jelentősen emelkedtek doxorubicin adásakor. Az egy órás, doxorubicinnal történt perfúzió alatt a szív működés minden aspektusában (miokardiális energia metabolizmus, szívizom teljesítmény, oxidatív szöveti károsodás) károsodott.

A kapcsolat az akut és krónikus doxorubicin károsodás között még nem teljesen tisztázott. A doxorubicin toxicitás idült klinikai tünetei között szerepel a hányinger, mucositis, mieloszupresszió, alopecia és irreverzibilis szívelégtelenség. A legjelentősebb, doxorubicin toxicitás kialakulásának mechanizmusát magyarázó elméletek mindegyike (egyes jelátviteli utak aktivációja, apoptózis, oxidatív stressz, metabolikus hipotézis) a doxorubicin szabadgyök-generáló képességével van kapcsolatban. A doxorubicin daganatölő tulajdonsága azonban más mechanizmus útján valósul meg. Lehetséges, hogy szabadgyökök is szerepelnek a doxorubicin antineoplasztikus hatásának kialakulásában, azonban a doxorubicin a DNS láncok közé ékelődve gátolja a topoizomeráz II-t, így gátolva a DNS és RNS szintézisét. Nagy valószínűséggel ez utóbbi mechanizmusnak nincs szerepe az idült kardiotoxicitás kialakulásában, hisz egyes esetekben a szívelégtelenség közvetlenül a doxorubicin beadását követően is kialakul<sup>116,117</sup>.

Kísérletünkben H-2545 vagy H-2954 doxorubicinnal történő együtt adásakor mind az energetikai, mind a funkcionális mutatók kedvezően alakultak. Az oxidatív károsodást jelző paraméterek (lipidperoxidáció, fehérje oxidáció) H-2545/H-2954 adásával koncentráció-függő módon javultak. A jól ismert antioxidáns dihidrolipoamid (DHLLA) a H-2545 és H-2954 koncentrációjának megfelelő nagyságrendű koncentráció-tartományban nem javította a doxorubicin által kiváltott károsodást; a DHLLA csak 10-20-szoros koncentrációban volt képes kifejteni protektív hatását. A H-2545 és H-2954 viszonylag kis koncentrációban (10  $\mu$ M) is hatékonyan védte ki a káros hatásokat, ami magyarázható azzal, hogy protektív szereink a sejtmembránban képesek felhalmozódni és mind sztöchiometrikus, mind katalitikus úton keresztül *in statu nascendi* reakcióban szabadgyök befogására alkalmasak. Mindemellett a H-2954, a H-2545 metabolitja, stabil nitroxil gyök, és a rendkívül káros szuperoxid anion dizmutálására is képes<sup>118</sup>.

A PI-3-kináz/Akt jelátviteli út szerepet játszik az apoptózis gátlásában. A PI-3-kináz egy p85 regulatórikus és egy p110 katalitikus alegységből áll, mely a receptor tirozin oldallánc autofoszforilációjával aktiválódik. Aktivációkor a p110 a foszfatidilinozitol-4,5-bifoszfátból foszfatidilinozitol-3,4,5-trifoszfát keletkezését katalizálja, mely a membránban felhalmozódva a foszfatidilinozitol-dependens-kináz-1 (PDK-1) és Akt számára dokkoló helyet képez. Dokkolás után az Akt a Thr<sup>308</sup> és Ser<sup>437</sup> helyen foszforilálódva aktiválódik<sup>68,119-122</sup>, és a Bad, Forkhead transzkripciós faktorok, valamint a kaszpáz-9 gátlásán keresztül gátlódik az apoptózis is. A reaktív oxigén gyökök keletkezése e kaszkád aktiválásához vezethet úgy, hogy a peroxinitrit nitrálja a receptor tirozin kinázt; ez, korábbi feltételezésünk szerint, magyarázatul szolgálhatott a doxorubicin adása után megfigyelt Akt foszforiláció növekedésére. Kísérleti szereink azzal a képességgel rendelkeztek, hogy a doxorubicin adásával keletkezett szabadgyököket scavengeljék, és így az Akt aktivációt (foszforilációt) mérsékeljék. Fontos, hogy a H-2545 és metabolitja nem befolyásolta a doxorubicin antineoplasztikus tulajdonságát, ezért a doxorubicin a H-2545-tel együtt adva is megtartja daganatellenes hatását.

Szem előtt tartva azt a Hideg-féle paradigmát, mely szerint a gyökös károsodást a gyökös károsodás helyén felhalmozódni képes scavenger vegyületek képesek kivédeni, Langendorff perfúziós rendszerünkben a doxorubicin kiváltott szívizom energetikai károsodást Hideg és mtsai által szintetizált H-2641 és a H-2693 vegyületekkel is kivédtük. A paradigmának megfelelően egy aromás szerkezeti egységhez savamid kötéssel keresztül sztérikusan gátolt szekunderamint tartalmazó molekulát kellett a doxorubicin károsítással egyidőben alkalmaznunk. A <sup>31</sup>P NMR-rel végzett méréseink H-2641 és H-2693 alkalmazásakor azt mutatták, hogy kísérleti szereink hatására magasabb volt a nagy energiájú foszfátok koncentrációja, javult a szívizom energetikai állapota. Az egy órás perfúzió végén H-2693 alkalmazásakor a kreatin foszfát és ATP, H-2641 esetében az ATP szintjében a

kontrollnál magasabb átlagértékeket mértünk, mely ugyan nem szignifikáns, mégis a jelenség miatt feltételeznünk kell, hogy a kontroll perfúzió is gyakorlatilag relatív iszkémiás környezetben történik, melynek káros hatásait vegyületeink ki tudtak védeni. A Langendorff perfúziós rendszer megfelel különböző élettani folyamatok követésére, de tökéletesen nem modellezheti azt. Például a szállított oxigén modellünkben fizikailag oldott állapotban transzportálódik, szemben a haemoglobinhoz kötött fiziológiás oxigénszállítással. Ezen kívül a Langendorff perfúziós rendszerben a szív mentesül a neurohormonális behatások alól.

Az energetikailag kedvezőtlen állapotot reprezentáló anorganikus foszfát szintje a szívizomban H-2693 és H-2641 hatására mérséklődött, megerősítve az általunk alkalmazott kísérleti szerek kardioprotektív hatását. A vegyületek protektív hatását a szív intracelluláris kémhatásának vizsgálatakor is tapasztalhatjuk, mivel a doxorubicin hatására csökkenő pH szintje H-2641 és H-2693 kezelt esetekben a kontroll csoporthoz viszonyítva szignifikáns mértékben nem változott. H-2693 hatására a kontroll csoport átlagától magasabb átlagértékeket kaptunk. Ez alátámasztja azt a feltevésünket, hogy Langendorff perfúziós modellünkben a kontroll perfúzió relatív iszkémiát is jelent, hiszen az iszkémia hatására a kedvezőtlenebb energetikai státusszal párhuzamosan a laktát fermentáció számottevő szerephez jut, savanyítva az intracelluláris környezetet, mely folyamat azonban H-2693 vegyülettel mérsékelhető.

Munkacsoportunk korábbi vizsgálataiban megfigyeltük, hogy a lipopoliszacharid kezelt egerek májában, tüdejében, lépében a PARP inhibitorok az Akt-t foszforilálják, mely felveti, hogy a PARP inhibitorok protektív hatásukat, ha csak részben is, a PI3-kináz-Akt jelátviteli utak aktiválásán keresztül valósítják meg<sup>123</sup>. Mivel az Akt kináz számos regulatórikus fehérjét szabályoz (GSK-3 $\beta$ , kaszpáz-9, BAD, FKHR), felvetődik, hogy a PARP inhibitorok protektív hatása nem csak a NAD<sup>+</sup> és ATP kimerülés megakadályozásában keresendő. A proapoptotikus Bad fehérje foszforilálásával (inaktiválásával) a mitokondriális

membránstabilizáló rendszer erősítésével gátolható a proapoptotikus fehérjék citoplazmába történő kiürülése. Az Akt foszforilálja, így inaktíválja a kaszpáz-9 fehérjét is, gátolva a citokróm c/Apaf-1/kaspáz-9/kaspáz-3 útvonalat<sup>124,125</sup>.

Mivel kísérleti antioxidáns szereinkkel a doxorubicin kiváltotta kardiotoxicitást modellünkben kivédjük, és így megerősítést nyert az elmélet, mely szerint a doxorubicin akut kardiotoxikus hatását szabadgyök generáló képességének köszönheti, célszerűnek mutatkozott az iszkémia-reperfúziós szívizom károsodásokat – ahol a szívizom károsodásban szabadgyökös mechanizmusok szintúgy kulcsszerepet játszanak - mérsékelni képes PARP inhibitor alkalmazása. Az ismert PARP inhibitor 4-hidroxi-kinazolin kivédte a doxorubicin hatására előidéztet kedvezőtlen energetikai státuszt, és intracelluláris pH csökkenést. A 4OHQ kedvező hatása wortmanninnal csökkenthető volt.

PARP inhibitorok hatására Western bloton szimultán Akt és GSK-3 $\beta$  aktivációt figyeltünk meg. Wortmannin hatására a PARP inhibitor kiváltotta Akt és GSK-3 $\beta$  foszforiláció csökkent, melyből következtethetünk, hogy az Akt aktiváció részben a PI3-kináz útvonalon keresztül történt. PI3-kináz gátló a 4OHQ jelenlétében a nagy energiájú foszfátokban, valamint az anorganikus foszfát felhalmozódásban, intracelluláris kémhatásban tapasztalható kedvező hatásokat csökkentette, felhívva a figyelmet az Akt jelátviteli útnak az energia-homeosztázisban betöltött érdemi szerepére. A jelenségben fontos lehet az Akt-nak a mitokondrium membrán integritás megtartásában betöltött szerepe.

A wortmannin ugyan csökkentette a 4OHQ kardioprotektív hatását, azonban a PI3-kináz gátló hatására ezek a paraméterek nem romlottak a doxorubicinnel kezelt csoportok értékeire, melyre magyarázatként szolgálhat munkacsoportunk korábbi megfigyelése, mely szerint a wortmannin jelen kísérletünkben alkalmazott koncentrációjától ötször magasabb koncentrációban alkalmazva sem védte ki teljesen az Akt foszforilációt, nem gátolta a



protektív jelátviteli utak aktivációját. Hasonló eredmények születtek egy másik potens PI3-kináz inhibitor, az LY294002 esetében is<sup>93</sup>. Lehetséges, hogy egy, a PI3-kináz úttól független, kisebb mértékű Akt foszforilációt kiváltó jelátviteli út is szerepet játszik a kardioprotekcióban.

Ennek ellenére nyilvánvaló, hogy a 4OHQ kiváltotta Akt foszforiláció PI3-kinázon keresztül történik, mivel PI3-kináz inhibitor a PARP inhibitor által kiváltott fokozott Akt foszforilációt csökkentette. Mivel wortmannin hatására a csökkent Akt aktiváció a PARP gátló kezelést követő csökkent protektív hatásokkal járt együtt, úgy gondoljuk, hogy a PARP inhibitorok által kiváltott Akt aktiváció kulcsszerepet játszik a doxorubicin indukálta szívizom károsodás PARP gátlókkal történő kivédésének mechanizmusában. A doxorubicin antineoplasztikus hatását kísérleti antioxidáns szereinkhez hasonlóan a PARP gátló 4-hidoxikinazolin sem csökkentette, jelezvén a doxorubicin kardiotoxikus és daganatellenes hatásmechanizmusa közötti különbséget.

## Új eredmények, megfigyelések

1. Az antioxidáns H-2545 párhuzamos adásával a doxorubicin indukálta akut kardiotoxicitás mérséklődött, anélkül, hogy a doxorubicin daganatellenes hatása károsodott volna.
2. A H-2545 és metabolitja, a H-2954 a kardiovaszkuláris védelem általunk vizsgált minden szempontjából jobbnak bizonyult, mint a közismert antioxidáns dihidrolipoamid.
3. Megerősítettük azt a Hideg-féle paradigmát mind az antioxidáns hatású kísérletes kardioprotektív H-2545 molekulával és metabolitjával, mind pedig a H-2641 és H-2693 molekulával végzett vizsgálatainkkal, hogy a gyorsan lejátszódó, oxidatív stressz okozta károsodásokat csak olyan molekulák képesek mérsékelni, szerencsés esetben kivédeni/megelőzni, melyek a bekövetkező károsodás helyéhez helyspecifikusan kapcsolódnak és az oxidatív károsodást okozó ROS molekulákat nem toxikus antioxidáns hatású molekulákká alakítják.
4. Igazoltuk, hogy a PARP gátló 4-hidroxi-kinazolin az iszkémia-reperfúziós kísérletekhez hasonlóan csökkenti a doxorubicin kiváltotta miokardiális károsodást, és aktiválta, részben a PI3-kináz útvonalon keresztül, a protektív Akt-GSK útvonalat anélkül, hogy a doxorubicin daganatellenes hatása károsodott volna.
5. Megerősítettük azt az álláspontot, mely szerint a doxorubicin akut kardiotoxikus mellékhatásában szabad gyökös mechanizmusok kulcsszerepet játszanak.

## IRODALOMJEGYZÉK

- (1) Weiss Raymond B: The anthracyclines: Will we ever find a better doxorubicin? *Semin Oncol*;19:670–86(1992)
- (2) Tan C, Tasaka H, Kou-Ping Y: Daunomycin, an antitumor antibiotic, in the treatment of neoplastic disease. Clinical evaluation with special reference to childhood leukemia. *Cancer*;20:333–53(1967)
- (3) Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G: Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol Bioeng*;11:1101–10(1969)
- (4) Di Marco, A, Gaetani M, Scarpinato B: Adriamycin (NSC-123,127): A new antibiotic with antitumor activity. *Cancer Chemotherapy Reports*;53:33–37(1969)
- (5) Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G: Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol Bioeng*;11:1101-10(1969)
- (6) Lomovskaya N, Otten SL, Doi-Katayama Y.: Doxorubicin overproduction in *Streptomyces peucetius*: cloning and characterization of the *dnrU* ketoreductase and *dnrV* genes and the *doxA* cytochrome P-450 hydroxylase gene. *J Bacteriol*;181:305-18(1999)
- (7) Arcamone F, Casinelli G, Franceschi G: Structure and physicochemical properties of adriamycin (doxorubicin). In: S.K. Carter, A. di Marco and M. Ghione (eds.) *Int. Symp. Adriamycin*. Springer, New York, 9-22(1972)
- (8) Arcamone F, Penco S: Synthesis of new doxorubicin analogs. In: Lown (ed). *Anthracycline and anthracycline-based anticancer agents*. Elsevier, Amsterdam, 1-53(1988)
- (9) Fornari FA, Randolph JK, Yalowich JC, Ritke MK, Gewirtz DA: Interference by Doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells. *Mol Pharm*;45:649–56(1994)
- (10) Frederick CA, Williams LD, Ughetto G, van der Marel GA, van Boom JH, Rich A, Wang AH: Structural comparison of anticancer drug-DNA complexes: Adriamycin and Daunomycin. *Biochemistry*;29:2538–49(1990)
- (11) Pigram WJ, Fuller W, Hamilton LD: Stereochemistry of intercalation: Interaction of Daunomycin with DNA. *Nature New Biology*;235:17–19(1972)

- (12) Champoux JJ: DNA Topoisomerases: Structure, function, and mechanism. *Ann Rev Biochem*;70:369-413(2001)
- (13) Berger JM: Structural similarities between topoisomerases that cleave one or both DNA strands. *Proc Natl Acad Sci*;95:7876-81(1998)
- (14) Kampranis SC: A model for the mechanism of strand passage by DNA gyrase. *Proc Natl Acad Sci*;96:8414-19(1999)
- (15) Redinbo MR: Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA. *Science*;279:1504(1998)
- (16) Stock J: Signal transduction: Gyating protein kinases. *Current Biology*;9:R364-67(1999)
- (17) Watt PM, Hickson ID: Structure and function of type II DNA topoisomerases. *Biochem J*;303:681-95(1994)
- (18) Berger JM: Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature*;379:225-32(1996)
- (19) Danesi R, Fogli S, Gennari A, Conte P, Del Tacca M: Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of the anthracycline anticancer drugs. *Clin Pharmacokinet*;41:431-44(2002)
- (20) Lefrak EA, Pitha J, Rosenheim S, Gottlieb JA: A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. *Cancer*;32: 302-14(1973)
- (21) Steinherz LJ, Steinherz PG, Tan CTC, Heller G, Murphy L: Cardiac toxicity 4 to 20 years after completing anthracycline therapy. *JAMA*;266:1672-77(1991)
- (22) Bristow MR, Thomson PD, Martin PR, Mason JW, Bollingham ME, Harrison DC: Early anthracycline cardiotoxicity. *Am J Med*;65: 823-32(1978)
- (23) Jaenke RS, Fajardo LF: Adriamycin-induced myocardial lesions: Report of a workshop. *Am J Surg Pathol*;1:55-60(1977)
- (24) Olson HM, Young DM, Prieur DJ, LeToy AF, Reagan RL: Electrolyte and morphologic alterations of myocardium in adriamycin-treated rabbits. *Am J Pathol*;77:439-54(1974)
- (25) Jaenke RS: An anthracyclin antibiotic-induced cardiomyopathy in rabbits. *Lab Invest*;30:292-303(1974)
- (26) Rosenhof SH, Olso HM, Young DM, Bostic F, Young RC: Adriamycin-induced cardiac damage in the mouse: A small animal model of cardiotoxicity. *J Nat Cancer*;I 55:191-94(1975)

- (27) Lambertenghi-Deliliers G, Zanon PL, Pozzoli EF, Bellini O: Myocardial injury by a single dose of adriamycin: An electron microscopic study. *Tumori*;62:517-28(1976)
- (28) Singal PK, Iliskovic N, Li T, Kumar D: Adriamycin cardiomyopathy: pathophysiology and prevention. *FASEB J*;11:931-36(1997)
- (29) Tong J, Ganguly PK, Singal PK: Myocardial adrenergic changes at two stages of heart failure due to adriamycin treatment in rats. *Am J Physiol*;260:H909-16(1991)
- (30) Mettler FP, Young DM, Ward JM: Adriamycin-induced cardiotoxicity (Cardiomyopathy and Congestive Heart Failure) in rats. *Cancer Res*;37:2705-13(1977)
- (31) Zbinden G, Bachmann E, Holderegger C: Model systems for cardiotoxic effects of anthracyclines. Fundamentals in Cancer Chemotherapy. *Antibiot Chemother*;23:255-70(1978)
- (32) Gosalvez M, van Rossum GDV, Blanco MF: Inhibition of sodium-potassium activated adenosine 5'-triphosphate and ion transport by adriamycin. *Cancer Res*;39:257-61(1979)
- (33) Singal PK, Segstro RJ, Singh RP, Kutryk MJ: Changes in lysosomal morphology and enzyme activities during the development of adriamycin-induced cardiomyopathy. *Can J Cardiol*;1:139-47(1985)
- (34) Singal PK, Pierce GN: Adriamycin stimulated low-affinity Ca<sup>2+</sup> binding and lipid peroxidation but depressed myocardial function. *Am J Physiol*;250:H419-25(1986)
- (35) Siveski-Iliskovic N, Kaul N, Singal PK: Probucol promote endogenous antioxidants and provides protection against adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Circulation*;89:2829-2835(1994)
- (36) Odom AL, Hatwig CA, Stanley JS, Benson AM: Biochemical determinants of adriamycin toxicity in mouse liver, heart and intestine. *Biochem Pharmacol*;43:831-36(1992)
- (37) Kumar D, Kirshenbaum L, Li T, Danelisen I, Singal PK: Apoptosis in isolated adult cardiomyocytes exposed to adriamycin. *Ann N Y Acad Sci*;874:156-68(1999)
- (38) Zhang J, Clark JR Jr, Herman EH, Ferrans VJ: Doxorubicin-induced apoptosis in spontaneously hypertensive rats: differential effects in heart, kidney and intestine, and inhibition by ICRF-187. *J Mol Cell Cardiol*;28:1931-43(1996)
- (39) Boucek Jr., RJ, Dodd DA, Atkinson JB, Oquist N, Olson RD: Contractile failure in chronic doxorubicin-induced cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*;29:2631-40(1997)

- (40) Caroni P, Villani F, Carafoli E: The cardiotoxic antibiotic doxorubicin inhibits the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange of dog heart sarcolemmal vesicles. *FEBS Lett* 130:184-86(1981)
- (41) Boucek Jr., RJ, Buck SH, Scott F, Oquist N, Fleischer S, Olson RD: Antracycline-induced tension in permeabilized cardiac fibers: evidence for the activation of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum. *J Mol Cell Cardiol*;25:249-59(1993)
- (42) Dodd DA, Atkinson JB, Olson RD, Buck S, Cusack BJ, Fleischer S, Boucek Jr. RJ: Doxorubicin cardiomyopathy is associated with a decrease in calcium release channel of the sarcoplasmic reticulum in a chronic rabbit model. *J Clin Invest*;91:1697-705(1993)
- (43) Danesi R, Del TM, Bernardini C, Penco S: Exogenous doxorubicinol induces cardiotoxic effects in rats. *Eur J Cancer Clin Oncol*;23:907-13(1987)
- (44) Del TM, Danesi R, Ducci M, Bernardini C, Romanini A: Might adriamycinol contribute to adriamycin-induced cardiotoxicity? *Pharmacol Res Commun*;17:1073-84(1985)
- (45) Bristow MR, Kantrowitz NE, Harrison WD, Minobe WA, Sageman WS, Billingham ME: Mediation of subacute anthracycline cardiotoxicity in rabbits by cardiac histamine release. *J Cardiovasc Pharmacol*;5:913-19(1983)
- (46) Cheeseman KH, Slater TF: An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*;49:481-93(1993)
- (47) Doroshow JH: Effect of antracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. *Cancer Res*;43:460-72(1983)
- (48) Bachur NR, Gee MV, Friedman RN: Nuclear catalyzed antibiotic free radical formation. *Cancer Res*;42:1078-81(1983)
- (49) Mitchell JB, Krishna MC, Samuni A: Clinical uses of nitroxides as superoxide-dismutase mimics in *Toxicology of Human Environment* (Rhodes, C. J. ed.), Taylor and Francis; London; 113-38(2000)
- (50) Haenen GRMM, Bast A: Protection against lipid peroxidation by a microsomal glutathione-dependent labile factor. *FEBS Lett*;159:24-28(1983)
- (51) Van Acker FAA, Hageman JA, Haenen GRMM, Van der Vijgh WJF, Bast A, Menge WMPB: Synthesis of novel 3,7-substitued-2(3',4'-dihydroxyphenyl)flavones with improved antioxidant activity. *J Med Chem*;43:3752-60(2000)

- (52) Von Hoff DD: Phase I trials of dexrazoxane and other potential applications for the agent. *Semin Oncol*;25:31-36(1998)
- (53) Myers C, Bonow R, Palmeri S, Jenkins J, Cordon B, Locker G, Doroshow J, Epstein S: A randomized controlled trial assessing the prevention of doxorubicin cardiomyopathy by N-Acetylcysteine. *Semin Oncol*;10:53-55(1991)
- (54) Pritsos CA, Sokoloff M, Gustafson DL: PZ-51 (Ebselen) In vivo protection against adriamycin-induced mouse cardiac and hepatic lipid peroxidation and toxicity. *Biochem Pharmacol*;44:839-41(1992)
- (55) Breed JG, Zimmermann AN, Dormans JA, Pinedo HM: Failure of the antioxidant vitamin E to protect against adriamycin-induced cardiotoxicity in the rabbit. *Cancer Res*;40:2033-38(1980)
- (56) Legha SS, Wang YM, Mackay B, Ewer M, Hortobagay GN, Benjamin RS, Ali MK: Clinical and pharmacologic investigation of the effects of  $\alpha$ -tocopherol and adriamycin cardiotoxicity. *Ann NY Acad Sci*;393:411-18(1982)
- (57) Van Fleet JF, Ferrans VJ, Weirich WE: Cardiac disease induced by chronic adriamycin administration in dogs and an evaluation of vitamin E and selenium as cardioprotectants. *Am J Pathol*;99:13-42(1980)
- (58) Marton Zs, Halmosi R, Horvath B, Alexy T, Kesmarky G, Vekasi J, Battyany I, Hideg K, Toth K: Scavenger effect of experimental and clinically used cardiovascular drugs. *J Cardiovasc Pharmacol*;38:745-53(2001)
- (59) Toth A, Kovacs K, Deres P, Halmosi R, Czopf L, Hanto K, Kalai T, Hideg K, Sumegi B, Toth K: Impact of a novel cardioprotective agent on the ischaemia-reperfusion-induced Akt kinase activation. *Biochem Pharmacol*;66:2263-72(2003)
- (60) Halmosi R, Deres P, Toth A, Berente Z, Kalai T, Sumegi B, Hideg K, Toth K: 2,2,5,5-Tetramethylpyrroline-Based Compounds in Prevention of Oxyradical-induced Myocardial Damage. *J Cardiovasc Pharmacol*;40:854-67(2002)
- (61) Halliwell B, Gutteridge JMC, eds. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, 1999.
- (62) Szabados E, Fischer MG, Gallyas F Jr., Kispal G, Sumegi B: Enhanced ADP-ribosylation and its diminution by lipoamide after ischemia-reperfusion in perfused rat heart. *Free Radic Biol Med*; 27:1103-13(1999)

- (63) Szabados E, Fischer GM, Toth K, Csete B, Nemeti B, Trombitas K, Habon T, Endrei D, Sumegi B: Role of reactive oxygen species and poly-ADP-ribose polymerase in the development of AZT-induced cardiomyopathy in rat. *Free Radic Biol Med*;26:309-17(1999)
- (64) Habon T, Szabados E, Kesmarky G, Halmosi R, Past T, Sumegi B, Toth K: The effect of carvedilol on enhanced ADP-ribosylation and red blood cell membrane damage caused by free radicals. *Cardiovasc Res*;54:153-60(2001)
- (65) Sato Y, Eddy L, Hochstein P: Comparative cardiotoxicity of doxorubicin and a morpholino anthracycline derivative (KRN8602). *Biochem Pharmacol*;42(12):2283-7(1991)
- (66) Toth A, Halmosi R, Kovacs K, Deres P, Kalai T, Hideg K, Toth K, Sumegi B: Akt activation induced by an antioxidant compound during ischemia-reperfusion. *Free Radic Biol Med*;35:1051-63(2003)
- (67) Klotz LO, Schieke SM, Sies H, Holbrook N J: Peroxynitrite activates the phosphoinositide-3-kinase/Akt pathway in human skin primary fibroblasts. *Biochem J*;352:219-25(2000)
- (68) Palfi A, Toth A, Kulcsar G, Hanto K, Deres P, Bartha E, Halmosi R, Szabados E, Czopf L, Kalai T, Hideg K, Sumegi B, Toth K: The role of Akt and mitogen-activated protein kinase systems in the protective effect of poly(ADP-ribose) polymerase inhibition in Langendorff perfused and in isoproterenol-damaged rat hearts. *J Pharmacol Exp Ther*;315:273-82(2005)
- (69) Mockridge JW, Marber MS, Heads RJ: Activation of Akt during simulated ischemia / reperfusion in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Comm*;270:947-52(2000)
- (70) Fujio Y, Nguyen T, Wencker D, Kitsis RN, Walsh K: Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart. *Circulation*;101:660-67(2000)
- (71) Scheid MP, Woodgett JR: PKB/Akt: functional insight from genetic models. *Nature Reviews*;2:760-68(2001)
- (72) Aikawa R, Nawano M, Gu Y, Katagiri H, Asano T, Zhu W, Nagai R, Komuro I: Insulin prevents cardiomyocytes from oxidative stress-induced apoptosis through activation of PI3 kinase/Akt. *Circulation*;102:2873-79(2000)
- (73) Cardone MH., Roy N, Stennicke HR., Salvesen GS., Franke TF., Stombridge E, Frisch S, Reed JC: Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*;282:1318-21(1998)
- (74) Romashkova JA., Makarov SS: NF- $\kappa$ B is a target of Akt in antiapoptotic PDGF signaling. *Nature*;401:86-89(1999)



- (75) Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM: Activation of nitric oxide synthase by Akt dependent phosphorylation. *Nature*;399:601-05(1999)
- (76) Gao F, Gao E, Yue TL, Ohlstein EH, Lopez BL, Christopher TA, Ma XL: Nitric oxide mediates the antiapoptotic effect of insulin in myocardial ischemia-reperfusion: the roles of PI3-kinase, Akt and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation. *Circulation*;105:1497-502(2002)
- (77) Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Henriksen K, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM: Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation*;95:320-23(1997)
- (78) Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Di Loreto C, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, Anversa P: Apoptosis in failing human heart. *N Eng J Med*;336:1131-41(1997)
- (79) Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Heikkila P, Laine P, Mattila S, Nieminen MS, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM: Cardiomyocyte apoptosis and progression of heart failure to transplantation *Eur J Clin Invest*;29:380-86(1999)
- (80) Liu Y: Polo-like Kinases Inhibited by Wortmannin: Labeling Site and Downstream Effects. *J Biol Chem*;282:2505-11(2007)
- (81) Jolly SR, Kane WJ, Bailie MB, Abrams GD, Lucchesi BR: Canine myocardial reperfusion injury: Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase. *Circ Res*;54:277-85(1984)
- (82) Omar BA, Flores SC, McCord JM: Superoxide dismutase: pharmacological developments and applications. *Adv Pharmacol*;21:109-61(1992)
- (83) Zingarelli B, O'Connor M, Wong H, Salzman AL, Szabo C: Peroxynitrite-mediated DNA strand breakage activates poly-ADP ribosyl synthetase and causes cellular energy depletion in macrophages stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol*;156:350-58(1996)
- (84) D'Silva I, Pelletier JD, Langeneux J, D'Amours D, Chandhry MA, Weinfeld M, Lees-Miller SP., Poirier GG: Relative affinities of poly(ADP-ribose) polymerase and DNA-dependent protein kinases for DNA strand interruptions. *Biochim Biophys Acta*;1430:119-26(1999)
- (85) Thiemermann C, Bowes J, Myint FP., Vane JR: Inhibition of the activity of poly(ADP-ribose) synthetase reduces ischemia-reperfusion injury in the heart and skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci*;94:679-83(1997)

- (86) Halmosi R, Berente Z, Osz E, Toth K, Literati-Nagy P, Sumegi B: Effect of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors on the ischemia-reperfusion induced oxidative cardiac injury and mitochondrial metabolism in Langendorff heart perfusion system. *Mol Pharmacol*;59:1497-505(2001)
- (87) Hankovszky OH, Hideg K, Bodi I, Frank L: New antiarrhythmic agents. 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrroline-3-carboxamides and 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-3-carboxamides. *J Med Chem*;29:1138-52(1986)
- (88) Twomey P, Taira J, DeGraff W, Mitchell JB, Russo A, Krishna MC, Hankovszky OH, Frank L, Hideg K: Direct evidence for in vivo nitroxide free radical production from a new antiarrhythmic drug by EPR spectroscopy. *Free Radic Biol Med*;22:909-16(1997)
- (89) DeGraff W, Hahn SM, Mitchell JB, Krishna MC: Free radical modes of cytotoxicity of adriamycin and streptonigrin. *Biochem Pharmacol*;48:1427-35(1994)
- (90) Monti E, Cova D, Guido E, Morelli R, Oliva C: Protective effect of the nitroxide TEMPOL against the cardiotoxicity of adriamycin. *Free Radic Biol Med*;21:463-70(1996)
- (91) Krishna MC, DeGraff W, Hankovszky OH, Sar CP, Kalai T, Jeko J, Russo A, Mitchell JB, Hideg K: Studies of structure-activity relationship of nitroxide free radicals and their precursors as modifiers against oxidative damage. *J Med Chem*;41:3477-92(1998)
- (92) Li H, Xu KY, Zhou L, Kalai T, Zweier JL, Hideg K, Kuppusamy P: A pyrroline derivative of mexiletine offers marked protection against ischemia/reperfusion-induced myocardial contractile dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther*;295:563-71(2000)
- (93) Kovacs K, Toth A, Deres P, Kalai T, Hideg K, Gallyas F Jr, Sumegi B: Critical role of PI3-kinase/Akt activation in the PARP inhibitor induced heart function recovery during ischemia-reperfusion. *Biochem Pharmacol*;71:441-52(2006)
- (94) Befroy DE, Powell T, Radda GK, Clarke K: Osmotic shock: modulation of contractile function, pHi, and ischemic damage in perfused guinea pig heart. *Am J Physiol*;276:H1236-44(1999)
- (95) Jilkina O, Kuzio B, Kupriyanov VV: Hyposmotic shock: effects on rubidium/potassium efflux in normal and ischemic rat hearts, assessed by <sup>87</sup>Rb and <sup>31</sup>P NMR. *Biochim Biophys Acta*;1637:20-30(2003)
- (96) Perings SM, Schulze K, Decking U, Kelm M, Strauer BE: Age-related decline of PCr/ATP-ratio in progressively hypertrophied hearts of spontaneously hypertensive rats. *Heart Vessels*;15:197-202(2000)

- (97) Pinz I, Ostroy SE, Hoyer K, Osinska H, Robbins J, Molkentin JD, Ingwall JS: Calcineurin induced energy wasting in a transgenic mouse model of heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*;294:H1459-66(2008)
- (98) Medina RA, Southworth R, Fuller W, Garlick PB.: Lactate-induced translocation of GLUT1 and GLUT4 is not mediated by the phosphatidyl-inositol-3-kinase pathway in the rat heart. *Basic Res Cardiol*;97:168-76(2002)
- (99) Joubert F, Mazet JL, Mateo P, Hoerter JA: Identification of subcellular energy fluxes by P NMR spectroscopy in the perfused heart: contractility induced modifications of energy transfer pathways. *Mol Biol Rep*;29:171-76(2002)
- (100) Joubert F, Mazet JL, Mateo P, Hoerter JA: <sup>31</sup>P NMR detection of subcellular creatine kinase fluxes in the perfused rat heart: contractility modifies energy transfer pathways. *J Biol Chem*;277:18469-76(2002)
- (101) Kingsley-Hickman PB, Sako EY, Uğurbil K, From AH, Foker JE: <sup>31</sup>P NMR measurement of mitochondrial uncoupling in isolated rat hearts. *J Biol Chem*;265:1545-50(1990)
- (102) Löster H, Keller T, Grommisch J, Gründer W: Effects of L-carnitine and its acetyl and propionyl esters on ATP and PCr levels of isolated rat hearts perfused without fatty acids and investigated by means of <sup>31</sup>P-NMR spectroscopy. *Mol Cell Biochem*;200:93-102(1999)
- (103) Imahashi K, Pott C, Goldhaber JJ, Steenbergen C, Philipson KD, Murphy E: Cardiac-specific ablation of the Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger confers protection against ischemia/reperfusion injury. *Circ Res*;97:916-21(2005)
- (104) Wright GL, Hanlon P, Amin K, Steenbergen C, Murphy E, Arcasoy MO: Erythropoietin receptor expression in adult rat cardiomyocytes is associated with an acute cardioprotective effect for recombinant erythropoietin during ischemia-reperfusion injury. *FASEB J*;18:1031-33(2004)
- (105) Wieben O, Francois C, Reeder SB: Cardiac MRI of ischemic heart disease at 3T: Potential and challenges. *Eur J Radiol*;65:15-28(2008)
- (106) Tzeng WF, Lee JL, Chiou TJ: The role of lipid peroxidation in menadione-mediated toxicity in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*;27:1999-2008(1995)
- (107) Butterfield DA, Howard BJ, Yatin S, Allen KL, Carney JM: Free radical oxidation of brain proteins in accelerated senescence and its modulation by N-tert-butyl-alpha-phenylnitron. *Proc Natl Acad Sci*; 94:674-78(1997)

- (108) Fukuda F, Kitada M, Horie T, Awazu S: Evaluation of Adriamycin-induced lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol*;44:755(1992)
- (109) Goodman J, Hochstein P: Generation of free radicals and lipid peroxidation by redox cycling of adriamycin and daunomycin. *Biochem Biophys Res Commun*;77:797-803(1977)
- (110) Siveski-Iliskovic N, Hill M, Chow DA, Singal PK: Probucol protects against adriamycin cardiomyopathy without interfering with its anti-tumor properties. *Circulation*;91:10-5(1995)
- (111) Myers C: The role of iron in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Semin Oncol*;25:10(1998)
- (112) Rajagopalan S, Politi PM, Sinha BK, Myers CE: Adriamycin-induced free radical formation in the perfused rat heart: implications for cardiotoxicity. *Cancer Res*;48:4766(1988)
- (113) De Beer EL, Bottone AE, Voest EE. Doxorubicin and mechanical performance of cardiac trabeculae after acute and chronic treatment: a review. *Eur J Pharmacol*;415:1-11(2001)
- (114) Savage MK, Reed DJ: Release of mitochondrial glutathione and calcium by a cyclosporin A-sensitive mechanism occurs without large amplitude swelling. *Arch Biochem Biophys*;315:142-52(1994)
- (115) Zhou HZ, Malhotra D, Shapiro JI: Contractile dysfunction during metabolic acidosis: role of impaired energy metabolism. *Am J Physiol*;261:H1481-86(1991)
- (116) den Hartog GJ, Haenen GR, Boven E, van der Vijgh WJ, Bast A: Lecithinized copper, zinc-superoxide dismutase as a protector against doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*;194:180-88(2004)
- (117) Mordente A, Meucci E, Martorana GE, Giardina B, Minotti G: Human heart cytosolic reductases and anthracycline cardiotoxicity. *IUBMB Life*;52:83-88(2001)
- (118) Krishna MC, Russo A, Mitchell JB, Goldstein S, Dafni H, Samuni A: Do nitroxides antioxidants act as scavengers of superoxide or as SOD mimics? *J Biol Chem*;271:26026-31(1996)
- (119) Brazil DP, Hemmings BA: Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *TiBS*;26:657-64(2001)
- (120) Madge LA, Pober JS: A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway, activated by tumor necrosis factor or interleukin-1, inhibits apoptosis but does not activate NF $\kappa$ B in human endothelial cells. *J Biol Chem*;275:15458-65(2000)

- (121) Miao W, Luo Z, Kitsis RN, Walsh K: Intracoronary, adenovirus-mediated Akt gene transfer in heart limits infarct size following ischemia-reperfusion injury in vivo. *J Mol Cell Cardiol*;32:2397-402(2000)
- (122) Hong F, Kwon SJ, Jhun BS, Kim SS, Ha J, Kim SJ, Sohn NW, Kang C, Kang I: Insulin-like growth factor-1 protects H9c2 cardiac myoblasts from oxidative stress-induced apoptosis via phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways. *Life Sci*;68:1095-105(2001)
- (123) Veres B, Gallyas F Jr, Varbiro G, Berente Z, Osz E, Szekeres G, Szabo C, Sumegi B: Decrease of the inflammatory response and induction of the Akt/protein kinase B pathway by poly-(ADP-ribose) polymerase 1 inhibitor in endotoxin-induced septic shock. *Biochem Pharmacol*;65:1373-82(2003)
- (124) Hong SJ, Dawson TM, Dawson VL: Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. *Trends Pharmacol Sci*;25:259-64(2004)
- (125) Zhou H, Li XM, Meinkoth J, Pittman RN: Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level. *J Cell Biol*;151:483-94(2000)

## Saját közlemények

### Könyvfejezet:

KOVACS, K., TOTH, A., DERES, P., HANTO, K., HIDEG, K., SUMEGI, B. Effect of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors on the activation of ischemia-reperfusion induced inflammatory processes in Langendorff perfused hearts. In: Proceedings of the 37th Congress of the European Society for Surgical Research (Szeged, Hungary, May 23-25, 2002). Ed.: Boros, M. Monduzzi Editore, 63-68, 2002.

T. ALEXY, ZS. MARTON, P. DERES, A. TOTH, K. TOTH Biological rhythms of the circulatory system, blood pressure and heart rate variability. In: Rhythmic biological processes. Ed.:V. Csernus, B. Mess Dialóg Campus Kiadó, 27-42, 2003.

### Teljes közlemények:

TÓTH A., HALMOSI R., HABON T., SZABADOS E., DERES P., SÜMEGI B., HIDEG K., TÓTH K. Az antioxidáns kezeléstől a poli(ADP-ribóz) polimeráz gátlókig – a kardioprotekció új lehetőségei ischaemia-reperfúzió során. Magyar Belorv. Arch. 2001;54:107-11.

HALMOSI, R., DERES, P., TOTH, A., BERENTE, Z., KALAI, T., SUMEGI, B., HIDEG, K., TOTH, K. 2,2,5,5-Tetramethylpyrroline-based compounds in prevention of oxyradical-induced myocardial damage. J. Cardiovasc. Pharmacol. 2002;40:854-67.

Impact factor: 1,553

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

Impact factor: 5,063

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

Impact factor: 2,993

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

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

Impact factor: 1,31

PALFI, A., TOTH, A., KULCSAR, G., HANTO, K., DERES, P., BARTHA, E., HALMOSI, R., SZABADOS, E., CZOPF, L., KALAI, T., HIDEG, K., SUMEGI, B., TOTH, K. The role of Akt and mitogen-activated protein kinase systems in the protective effect of poly(ADP-ribose) polymerase inhibition in Langendorff perfused and in isoproterenol-damaged rat hearts. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2005;315:273-82.

Impact factor: 4,1

KOVACS, K., TOTH, A., DERES, P., KALAI, T., HIDEG, K., GALLYAS, F. JR, SUMEGI, B. Critical role of PI3-kinase/Akt activation in the PARP inhibitor induced heart function recovery during ischemia-reperfusion.

Biochem. Pharmacol. 2006;71:441-52.

Impact factor: 3,581

PALFI, A., TOTH, A., HANTO, K., DERES, P., SZABADOS, E., SZEREDAY, Z., KULCSAR, G., KALAI, T., HIDEG, K., GALLYAS, F. Jr, SUMEGI, B., TOTH, K., HALMOSI, R. PARP inhibition prevents postinfarction myocardial remodeling and heart failure via the protein kinase C/glycogen synthase kinase-3beta pathway. J. Mol. Cell. Cardiol. 2006; 41:149-59.

Impact factor: 4,859

DERES P., TÓTH A., HALMOSI R., KOVÁCS K., PÁLFI A., KÁLAI T., HABON T., CZOPF L., HIDEG K., SÜMEGI B., TÓTH K. Doxorubicin kiváltotta akut kardiotoxicitás kivédése egy kísérleti antioxidáns vegyülettel. Card. Hung. 2006; 36:104-111.

## **Citálható absztraktok:**

EGYED, R., LUKATS B., DERES P., FRIEDSZAM E., PAST T., KARADI Z.: Diabetes (type-II)-Like Metabolic Deficits Elicited by Microelectrophoretic Kainate Lesions of the Globus Pallidus in the Rat. ICPFFI XII - SSIB '98, 1998. July 5-8, Pecs, Hungary. Appetite 1998;31:267.

KARADI, Z., EGYED R., LUKATS B., DERES P., LÉNÁRD L.: Differential Anorexigenic and Hyperthermic Consequences of Bilateral IL-1 Microinjection into the Ventral-Lateral Prefrontal Cortex (OBF) in the Rat. ICPFFI XII - SSIB '98, 1998. July 5-8, Pecs, Hungary. Appetite 1998;31:233.

HALMOSI, R., MARTON, ZS., DERES, P., HABON, T., SUMEGI, B., HIDEG, K., TOTH, K. Cardioprotective effect of a novel antiarrhythmic drug with antioxidant property. 3rd International Symposium on Myocardial Cytoprotection, 2000. September 28-30, Pecs, Hungary, Perfusion 2000;8:360.

HALMOSI R., DERES P., HABON T., TOTH K., HIDEG K., SUMEGI B. Scavenger hatással rendelkező antiarrhythmias szer, a H-2545 protektív hatása szabad gyökök által mediált szivizom-károsodásban. Magyar Kardiológusok Társasága 2000. évi Tudományos Kongresszusa, 2000. május 11-13, Balatonfüred. Card. Hung. Suppl. 2000;3:45.

HALMOSI, R., DERES, P., BERENTE, Z., KALAI, T., TOTH, K., SUMEGI, B., HIDEG, K. 2,2,5,5-Tetramethylpyrroline-based cardioprotective compounds in the prevention of oxyradical-induced myocardial damage. Hungarian-German-Italian-Polish Joint Meeting on Medicinal Chemistry, 2001. September 2-6, Budapest, Hungary. Abstract book: 66.

HALMOSI R., DERES P., TÓTH A., LITERÁTI-NAGY B., TÓTH K., SÜMEGI B. Poli(ADP-ribóz) polimeráz gátlók hatása postischaemiás myocardiumban az oxidatív sejtkárosodásra és a mitokondrium metabolizmusára. Magyar Kardiológusok Társasága 2001. évi Tudományos Kongresszusa, 2001. május 9-12. Balatonfüred. Card. Hung. Suppl. 2001;2:61.

TÓTH A., HALMOSI R., KOVÁCS K., DERES P., HANTÓ K., SZABADOS E., HABON T., SÜMEGI B., HIDEG K., TÓTH K. Antioxidánsok és a poli(ADP-ribóz) polimerázt gátlók aktiválják a protektív jelátviteli utakat myocardialis ischaemia-reperfúzió során - lehetséges klinikai vonatkozások. A Magyar Belgyógyász Társaság XXXIX. Nagygyűlése, 2002. november 21-23, Budapest Magyar Belorv. Arch., 2002;Suppl 3:55,132.

DERES, P., HALMOSI, R., TOTH, A., KOVACS, K., BERENTE, Z., HIDEG, K., TOTH, K., SUMEGI, B. Protective effect of H-2545 on doxorubicin-induced acute cardiotoxicity. 22nd Meeting of the International Society for Heart Research – European Section, 2002. July 3-6, Szeged, Hungary, J. Mol. Cell Cardiol., 2002;34:A35.

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

TÓTH A., HALMOSI R., DERES P., KOVÁCS K., HIDEG K., SÜMEGI B., TÓTH K. Kardioprotektív heterociklikus vegyületek hatása az intracelluláris jelátviteli folyamatokra ischaemia-reperfúzió során Langendorff perfundált szíveken. Magyar Kardiológusok Társasága 2002. évi Tudományos Kongresszusa, 2002. április 30-május 3, Balatonfüred. Card. Hung. Suppl. 2002;1:72.



SÜMEGI, B., KOVÁCS, K., TAPODI, A., DERES, P., TOTH, A., BERENTE, Z., OSZ, E., KALAI, T., HIDEG, K. Effect of PARP inhibitors on the activation of MAP kinases in Langendorff perfused hearts. Eur. J. Biochem., 2002;269Suppl 1:PS5-152.

TÓTH K., TÓTH A., HALMOSI R., SZABADOS E., HABON T., DERES P., PÁLFI A., SÜMEGI B., HIDEG K. Az oxidatív stressz szerepe a kardiovaszkuláris betegségekben - az antioxidánsok és poli(ADP-ribóz)-polimerázt gátlók lehetséges terápiás alkalmazása In: A Magyar Belgyógyász Társaság Dunántúli Szekciójának 50. jubileumi vándorgyűlése. Pécs, 2003. június 26-28. Magyar Belorv. Arch. Suppl.. 2003;2:p110-111.

KOVÁCS K., TÓTH A., DERES P., ŐSZ E., JAKUS P., HIDEG K., SÜMEGI B. PARP inhibitorok hatása az Akt-1 protektív jelátviteli útvonal aktivitására szívizom ischaemia-reperfúzió során XXXIII. Membrán Transzport konferencia, Sümeg, 2003;P-33:A-100.

KOVÁCS, K., TOTH, A., DERES, P., OSZ, E., VERES, B., RADNAI, B., SÜMEGI, B. Impact of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors on the activation of PI3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways in postischemic myocardium. Free Radic. Res., 2003;37 Suppl.1:99.

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

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

SÜMEGI, B., KOVÁCS, K., TAPODI, A., DERES, P., BERENTE, Z., ŐSZ, E., TÓTH, A. Role of poly(ADP-ribose) polymerase in the pathomechanism of oxidative cell damage IV. International Symposium on Myocardial Cytoprotection, 2003. Sept 25-27, Pécs, Hungary Exp. Clin. Cardiol., 2003;8:p:49,A53.

KOVÁCS, K., TÓTH, K., DERES, P., SÜMEGI, B. Differential effect of metoprolol, verapamil and 4-hydroxyquinazoline on the ischaemia-reperfusion-induced myocardial processes. IV. International Symposium on Myocardial Cytoprotection, 2003. Sept 25-27, Pécs, Hungary Exp. Clin. Cardiol., 2003;8:p:43,A33.

SÜMEGI, B., KOVÁCS, K., TOTH, A., DERES, P., PÁLFI, A. Impact of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors on the activation of PI3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways in postischemic myocardium. Special FEBS 2003 Meeting on Signal Transduction, 2003. July 3-8, Brussels, Belgium. Eur. J. Biochem., 2003;270Suppl.1:PS01-0867.

KOVACS, K., TOTH, A., DERES, P., OSZ, E., VERES, B., RADNAI, B., SUMEGI, B. Impact of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors on the activation of PI3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways in postischemic myocardium. SFRR-Europe Meeting 2003. June 26-29, Ioannina, Greece. Free Radic. Res. Suppl., 2003;37:101.

TÓTH, A., KOVÁCS, K., DERES, P., PÁLFI, A., HANTÓ, K., HALMOSI, R., HIDEG, K., SÜMEGI, B., TÓTH, K. Impact of an antioxidant compound on the activity of the protective Akt pathway during myocardial ischemia-reperfusion. Heart Failure/International Society for Heart Research – European Section Meeting, 2003. June 22-24, Strasbourg, France, Eur. J. Heart Fail. 2003;2/1:58-9.

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

PÁLFI A., TÓTH A., DERES P., HANTÓ K., RESKÓ Á., HALMOSI R., SZABADOS E., SZEREDAY Z., HIDEG K., SÜMEGI B., TÓTH K. Krónikus szívelégtelenség progressziójának lassítása poly(ADP-ribóz) polimeráz gátló vegyülettel patkányban Magyar Kardiológusok Társasága 2004. évi Tudományos Kongresszusa, 2004. május 12-15., Balatonfüred. Card. Hung. Suppl. 2004;34:C33.

DERES P., HANTÓ K., KOVÁCS K., HALMOSI R., PÁLFI A., KISS GY., RESKÓ A., POZSGAY E., SÜMEGI B., TÓTH K. Akut kardiotoxicitás kivédése poli(ADP-ribóz) polimeráz gátló vegyülettel XXXIV. Membrán Transzport Konferencia, 2004. június 1-4, Sümeg, P-09, A43.

DERES P., KISS GY., POZSGAY E., TÓTH A., HALMOSI R., KOVÁCS K., PÁLFI A., HIDEG K., SÜMEGI B., TÓTH K. Prevention of doxorubicin-induced acute cardiotoxicity by a novel antioxidant compound. Magyar Kardiológusok Társasága 2004. évi Tudományos Kongresszusa, 2004. május 12-15, Balatonfüred. Card. Hung. Suppl. 2004;34:C66.

## **Egyéb közlemények:**

DERES P., KOLTAI K., KESZTHELYI ZS., TÓTH K. Speciális szempontok a metabolikusan érintett iszkémiás szívbetegek kezelésében. Háziorvos Továbbképző Szemle, 2003;8:503-7.

DERES P., TÓTH K. Az ischaemiás szívbetegség és a diabetes – speciális szempontok a gyógyszeres kezelésben. Diab. Hung. 2003;11:79-85.

ALEXY, T., MARTON, ZS., DERES, P., TOTH, A., TOTH, K. Biological rhythms of the circulatory system, blood pressure and heart rate variability. Acta Biol. Hung.

Impact factor: 0.416

BORONKAI, A., THAN, NG., MAGENHEIM, R., BELLYI, S., SZIGETI, A., DERES, P., HARGITAI, B., SUMEGI, B., PAPP, Z., RIHO, J. JR. Extremely high maternal alkaline phosphatase serum concentration with syncytiotrophoblastic origin. J. Clin. Pathol. 2005;58:72-6.

Impact factor: 2,966

DERES P., TÓTH K. „Az ISZB metabolikus megközelítése a bal kamra diszfunkciós és iszkémiás dilatált kardiomiopátiás koronáriabetegyek körében” Webdoki 2005. október 16.

<<http://www.webdoki.hu/cikk.php?cid=26407>>

## **Köszönetnyilvánítás**

Elsőként szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Prof. Dr. Tóth Kálmánnak, a téma iránti elkötelezettségem megteremtéséért, támogatásáért, türelméért. Köszönöm Prof. Dr. Hideg Kálmánnak, hogy kutatócsoportjával együttműködhettünk, és a kísérleti szereket számunkra biztosította. Tanácsaiért, kutatási eszközök és anyagok biztosításáért, valamint intézetének nagyszerű kollektívájáért Prof. Dr. Sümegi Balázsnak szeretnék köszönetet mondani.

Hálás vagyok továbbá közvetlen munkatársaimnak, Dr. Halmosi Róbertnek, Dr. Tóth Ambrusnak, Dr. Kovács Krisztinának, Dr. Pálfi Anitának, Dr. Hantó Katalinnak, Dr. Kiss Gyöngyinek, akik kutatásaimban közvetlen és nélkülözhetetlen segítséget nyújtottak.

A munkám kapcsán is hálával és szeretettel gondolok Dr. Ősz Erzsébet NMR operátorra. Meg kívánom köszönni mind gyakorlati, mind elméleti munkáját Dr. Berente Zoltán NMR operátornak.

A sok-sok segítségért itt is köszönetet szeretnék mondani a Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet dolgozóinak, Gyöngyinek, Heninek, Irmának, Girán Lacinak, Berci bátyónak.

Külön köszönetemet szeretném e sorokban jelezni családomnak, akik fáradtságot, anyagi áldozatot nem kímélve támogaták tanulmányaimat, valamint a rengeteg türelmet és kitartást, mely e dolgozat megszületéséhez szükségeltetett.