

## Az F046594-es számú OTKA kutatási projekt tudományos eredményei

### **Poli(ADP-ribóz) polimeráz gátlók protektív hatásának vizsgálata kísérletes szívelégtelenség modellekben**

Kutatásaink során különféle kísérletes szívelégtelenség modellekben vizsgáltuk a poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) gátlók hatékonyságát és a jelátviteli utakra gyakorolt hatását. Vizsgálataink során az L-2286-ot (2-[(2-Piperidine-11-yletil)thio]quinazolin-4(3H)-one) használtuk PARP-gátlóként. Ezt a specifikus és potens PARP-gátló molekulát a PTE Szerves és Gyógyszerkémiai Intézetében Prof. Dr. Hideg Kálmán fejlesztette ki. Az L-2286 adagja kísérleteinkben 5 mg/ttkg/nap volt. Számításaink szerint ezzel a mennyiséggel érhető el a korábbi in vitro kísérleteinkben maximális védő hatást kifejtő 10 µM-os koncentráció a patkányok vérében.

#### *1. A PARP-gátlók hatása a postinfarctusos myocardialis remodeling és szívelégtelenség kialakulásával szemben.*

A beta-receptor agonista isoproterenol subcutan alkalmazását követően jelentős, döntően subendocardialis myocardialis necrosis alakul ki. A sejtvesztés következményes szívizom hypertrophiát és balkamra tágulatot von maga után [1, 2]. Ez a pathológiás hypertrophia szívelégtelenséghez vezet. Egy közlemény már jelezte korábban, hogy a PARP-gátlás javíthatja a postinfarctusos patkányokban a szív következményes systoles dysfuncióját. Az ennek hátterében lévő (sub)celluláris és metabolikus mechanizmusok azonban nem voltak még ismertek [3]. Ezért meg kívántuk határozni, hogy az L-2286 kódjelű PARP-gátló milyen módon képes befolyásolni a postinfarctusos szívelégtelenség kialakulását, milyen hatása van a cardiomyocytá sejt méretre, az interstitialis matrix felszaporodására, a metabolikus paraméterekre, a gén expresszióra és az intracelluláris jelátviteli utakra.

A szívben a remodeling inadekvát szívizomsejt hypertrophiával és extracelluláris strukturális fehérjék (fibrillaris collagen, collagen I és III) lerakódásával jellemezhető, mely szöveti merevséget okoz, csökkenti a myocardium viszkoelaszticitását és végül diastoles és systoles dysfuncióhoz vezet [4-6]. Vizsgálatunkban az L-2286 mérsékelte a postinfarctusos remodelinget a myocardialis hypertrophia és a collagen III interstitialis lerakódásának csökkentése révén.

A szívelégtelenség és a szívizom hypertrophia a mitokondriumok energia metabolizmusának a jelentős károsodásával jár együtt. A károsodott mitokondriális funkció a magas energiájú foszfátok szintjének, és az oxigén felhasználás csökkenésével jár együtt. Emellett csökken a légzési láncban komponenseinek mennyisége és aktivitása is [7]. Ezzel egyezően szívelégtelenség modellünkben is csökkent a complex I-III-nak (NADH:cytochrom c oxidoreduktáz) az aktivitása, döntően az oxidatív stressz által kiváltott posttranslatios inaktiválásnak köszönhetően, ugyanakkor az alkotóelemek mennyisége változatlanul bizonyult. PARP-gátló adásával ez a kedvezőtlen hatás csökkenthető volt.

A balkamrai falfeszülés váltja ki a B-típusú natriureticus peptid (BNP) termelődését. Ezért a magas BNP koncentráció specifikus jele a csökkent balkamra funkciónak és szívelégtelenségnek [8-9]. Postinfarctusos állatokban ennek megfelelően magas BNP szintet mértünk, mely emelkedés mérsékelhető volt L-2286 kezeléssel.

Az utóbbi években jelentős mértékben nőttek ismereteink az intracelluláris jelátviteli utakkal kapcsolatban. Ezen utak közvetítik az extracelluláris növekedési szignálokat a sejtmagba. A hypertrophia folyamatát vazóaktív peptidek, növekedési faktorok, hormonok and neurotransmitterek váltják ki és tartják fenn, döntően a MAP kinázokra gyakorolt hatásán, illetve a JAK/STAT, a CaMK/calcineurin, valamint Akt-1/glikogén szintáz kináz (GSK)-3 $\beta$  [4, 10-15] útvonalon keresztül. A MAP kinázoknak a hypertrophia és szívelégtelenség folyamatában betöltött szerepe nem egyértelmű, ugyanakkor nem tartoznak a legfontosabb jelátviteli utak közé. Általában úgy vélik, hogy az ERK1/2 aktivációja fiziológias, míg a többi MAP kináz aktivációja maladaptív hypertrophiához vezet [4]. Néhány protein kináz - Akt-1, p70-S6 kináz, p90-RSK, protein kináz C (PKC) és a protein kináz A – foszforilálja és ezáltal gátolja a GSK-3 $\beta$ -t, mely ezáltal balkamra hypertrophia kialakulásához vezet [8, 16, 12, 17]. Azonban az is ismertté vált, hogy a GSK-3 $\beta$  gátlása antiapoptotikus hatású, ezáltal segíti a szívizomsejtek postinfarctusos túlélését [18]. Ugyanakkor transzgen állatokban kimutatták, hogy a túlzott GSK-3 $\beta$  aktivitás súlyos diastoles típusú szívelégtelenséget okoz az intracelluláris kalcium anyagcsere zavara révén [19]. A GSK-3 $\beta$  phosphatidylinositol-3-kináz dependens foszforilációját két protein kináz katalizálja, az Akt és az ILK [13, 17]. A növekedési faktorok nemcsak ezen az úton, hanem a PKC-n keresztül is regulálják a GSK-3 $\beta$ -t [20]. A PKC néhány isoformja, a PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ , PKC $\gamma$ , PKC $\eta$  és a PKC $\delta$  tudja foszforilálni a GSK-3 $\beta$ -t [21].

A myocardialis infarctus után nyolc héttel nem találtunk emelkedést az ERK1/2 aktivitásában, de kétszeres emelkedés alakult ki az Akt, a p38-MAPK és a JNK foszforiláltságában. L-2286 alkalmazása ezen kinázok aktivitását érdemben nem befolyásolta. Ugyanakkor a PKC foszforiláltsága infarktust követően jelentősen emelkedett, mely emelkedést a PARP-gátló kezelés mérsékelte. Ezen eredmények alapján a PKC – elsősorban a PKC $\alpha/\beta$  – csökkent foszforilációja állhatott a PARP-gátlás előnyös hatásának hátterében. Az, hogy a PARP-gátlók milyen módon csökkentik a PKC aktivitását, még nem teljesen ismert. Ismert azonban, hogy szívelégtelenség során az oxidatív stressz fokozhatja a PKC aktivitását. Először is az oxidatív stressz direkt vagy indirekt módon stimulálja a PKC-t a növekedési faktorok receptorainak foszforilálásán vagy lipid szekunder messengereken keresztül [22]. Másodsor, a PARP aktivációja is közreműködhet a PKC aktivációjában, mert a ROS-indukálta poli(ADP-ribozil)áció csökkenti a nikotinamid adenin dinukleotid (NAD<sup>+</sup>) tartalmát, illetve a direkt poli(ADP-ribozil)áció gátolja a gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) enzimet [23-24]. A GAPDH gátlása fokozza az  $\alpha$ -glicerofoszfát és a diacylglycerol (DAG) termelődését. A DAG a PKC ismert aktivátora [24]. Másfelől pedig a szabad gyökök is oxidálhatják és direkt módon is gátolhatják a GAPDH-t [25].

A PARP-gátlás elsősorban a nukleáris PARP működését befolyásolja és így megőrzi a sejt NAD<sup>+</sup> és ATP tartalmát és megelőzi a NAD<sup>+</sup>-csökkenés kiváltotta GAPDH inaktivációt. Korábban igazoltuk, hogy a PARP-gátlók megvédik a mitokondriális légzési lánc komplexeit a szabad gyökök okozta inaktiválástól és csökkentik a mitokondriális szabad gyök termelést. [26]. Mindezek alapján úgy véljük, hogy a PARP-gátlás a PKC aktivitásának mérséklését a NAD<sup>+</sup> raktárak megőrzésével, a ROS termelés mérséklésével a csökkent GAPDH inaktiváción és alacsonyabb DAG szinten keresztül fejti ki.

Ez a munkánk igazolta először, hogy a PARP-gátlás részben a protein kináz C-re gyakorolt hatásán keresztül lassítja a postinfarctusos remodeling és szívelégtelenség kialakulását. Igazoltuk továbbá hogy a PARP-gátlók csökkentik a szívizomsejt hypertrophiát, az extracelluláris matrix lerakódását és a mitokondriális dysfunctiót. A PARP-gátlás által kiváltott jelátviteli hatások a myocardialis remodeling során tovább gyengítik az eredeti elképzelést, miszerint a PARP-gátlók által kiváltott sejtvédő hatás kizárólag a NAD<sup>+</sup> és ATP raktárak megőrzésének köszönhetőek.

## 2. PARP-gátlók és ACE-gátlók hatásának és hatékonyságának összevetése isoproterenol indukálta szívelégtelenség modellben.

Második vizsgálatunkban postinfarctusos szívelégtelenség modellben tovább igyekeztünk pontosítani a PARP-gátlók jelátvitelre gyakorolt hatásait. Mindemellett össze kívántuk vetni a PARP-gátlók hatását és hatékonyságát egy a szívelégtelenség kezelésében széles körben alkalmazott gyógyszerrel, az ACE-gátló hatású enalaprillal. Vizsgálatunkban az enalapril adagja 10 mg/ttkg/nap volt. A dózist az emberben maximálisan alkalmazható emberi adag alapján, illetve korábbi kutatásokat (2-20 mg/ttkg/nap volt a leggyakoribb alkalmazott dózis) is figyelembe véve állapítottuk meg. Lényegében mindkét gyógyszert abban a dózisban adtuk, amivel a hatóanyaggal elérhető legnagyobb gátlás elérhető.

Eredményeink megerősítették a PARP-gátlók pozitív hatását postinfarctusos remodeling során, illetve védő hatásukat a pangásos szívelégtelenség kialakulásával szemben [27]. Az interstitialis fibrosis, és a balkamra hypertrophia mérséklődött, ezen kívül mind gravimetriával, mind echocardiographiával meghatározva csökkent a szívtömeg és a szívtömegnek a testtömeghez viszonyított aránya.

Korábbi munkák igazolták, hogy a PARP-gátlók fokozzák az Akt-1 foszforiláltságát és aktivitását különböző szövetekben, így a reperfundált myocardiumban is, mely felvetette annak a lehetőségét, hogy a PARP-gátlás a védő hatását PI3K/Akt úton keresztül fejti ki [28]. Ismert ugyanis, hogy a PI3K/Akt jelátviteli út adaptív myocardialis hypertrophiát okoz és a szívműködés PI3K-ának folyamatos aktivációja nem vezet maladaptív hypertrophiához [29].

Előző vizsgálatunk során, a PARP-gátlók PKC-re kifejtett hatása tűnt döntőnek, érdemi hatást nem észleltünk a PI3K/Akt út aktivitásában [27]. Ezért megnöveltük az infarctus kiváltása miatt adott isoproterenol adagját és a postinfarctusos kezelési időszakot is (12 hétre). Ilyen körülmények között azt észleltük, hogy az Akt-1 foszforiláció mértéke, melyet az isoproterenol kezelés fokozott, a PARP-gátló kezelés mellett tovább nőtt, ami a GSK-3 $\beta$  következményes gátlásával járt együtt. Mindennek döntő jelentősége van a postinfarctusos maladaptív folyamatok kivédésében, mert ez a változás physiologiás hypertrophiát okoz, illetve antiapoptotikus hatású.

A MAP kinázok, az ERK, a JNK, és a p38 mindannyian aktiválódnak AngII hatására [30]. Azonban a MAP kinázok szerepe szívelégtelenségben még kissé ellentmondásos. Az ERK 1/2 aktivációja physiologiás balkamra hypertrophiát okoz, valamint javítja a myocardium kontraktilitását [27] és a MEK1-ERK2 védi a szívet az ischaemia indukálta apoptosissal szemben [31]. Az ERK1/2 foszforilációja ISO kezelés után csökkent valamelyest, azonban PARP-gátlás jelentősen megemelte aktivitását. Vizsgálatunkban az ISO-kezelt csoportban a p38 MAPK csak enyhén foszforilált állapotot mutatott. Azonban a PARP-gátlás megnövelte a p38-MAPK foszforilációját. Míg a szívműködés apoptosisa a p38- $\alpha$  aktivációjának tudható be, addig a p38- $\beta$  aktivációja a túlélést javító, ún. prosurvival jelátviteli utat mediál szívműködés növekedés fokozásán és az apoptosissal csökkentésén keresztül [32]. Sajnos azonban az antitestek nem tesznek különbséget a két isoform között, így nem tudjuk, hogy pontosan melyik isoform foszforiláltsága hogy változott a kezelés során [33]. Végül a JNK foszforiláltsága is emelkedett PARP-kezelés mellett.

Irodalmi adatok szerint a PKC expressiója megnő nyomás-túlterhelés által kiváltott szívelégtelenségben. Postinfarctusos szívelégtelenség modellünkben ezt mi is így találtuk. Mind az össz-PKC, mind a PKC  $\alpha/\beta$  isoform foszforiláltsága megemelkedett ISO-indukálta myocardialis infarctus után, de aktivitásuk csökkent PARP-gátló kezelés mellett. A szintén maladaptív változásokat okozó PKC $\delta$  Thr<sup>505</sup> és PKC  $\zeta/\lambda$  Thr<sup>410/403</sup> aktivitása is csökkent a kezelés mellett.

A PKC- $\epsilon$ -t különféle stressz tényezők aktiválják. Igazolták korábban, hogy a PKC- $\epsilon$  egy jelátviteli komplexet képez az Akt-1-el és kooperatív módon védi meg az endothel sejteket az apoptosissal szemben [34]. A kiemelkedő  $\beta$ 1 szelektivitással bíró béta-blokkoló, a landiol is a PKC- $\epsilon$ -on keresztül fejt ki védő hatását Langendorff-perfundált patkány szívekben [35]. Vizsgálatunk során ennek a protektív jelátviteli faktornak az aktiválódását igazoltuk PARP-gátló kezelés mellett. Összességében a PARP-gátló L-2286 aktiválta a PKC- $\epsilon$ -t, de a többi PKC isoform aktivitását csökkentette, melyek maladaptív szívizom hypertrophiát és remodelinget okoznak postinfarctusos állatokban.

Postinfarctusos szívelégtelenség modellünkben az echocardiographiás paraméterek - systoles balkamra funkció, falvastagságok, LVESV, LVEDV – a kontroll állatokhoz képest jelentősen romlottak az ISO-kezelt csoportban. PARP-gátló kezelés kivédte a systoles balkamra funkció csökkenését, valamint mérséklődött a balkamra hypertrophia mértéke is. Érdekes módon az LVEDV nem csökkent a kezelés ellenére.

Az ACE-gátló enalapril is védő hatásúnak bizonyult vizsgálatunk során, mely védő hatás hátterében a fent részletezett jelátviteli utakra hasonló hatást gyakorolt, mint a PARP-gátló. Ugyanakkor az ACE-gátlással szignifikánsan kisebb védő hatás volt elérhető, mint PARP-gátlással. Összefoglalva megállapítható, hogy a PARP-gátló L-2286 egy ígéretes kísérleti molekula a szívelégtelenség kezelésében.

### *3. A PARP-gátlók hatása fiatal spontán hypertenzív patkányokban (SHR) a hypertrophiás cardiopathia kialakulásával szemben.*

Korábbi vizsgálatainkat postinfarctusos szívelégtelenség modellben végeztük, ahol a balkamra hypertrophia és a szívelégtelenség kialakulása időben nem választható jól szét egymástól, így a két folyamatot csak együtt tudtuk vizsgálni. Az SHR modell azonban alkalmas erre, hiszen irodalmi adatok szerint a balkamra hypertrophia már a 6. héten elkezd kialakulni, a hypertrophiás cardiopathia azonban csak a 30. hét után kezd el átmenni pangásos szívelégtelenségbe [36]. Ebben a vizsgálatunkban a PARP-gátlóknak (L-2286) a hypertrophiás cardiopathia kialakulásával szembeni hatását vizsgálatuk.

A szívizom hypertrophia - a folyamat elején - egy kompenzatórikus válaszreakció része, mellyel a myocardium a külső stressz tényezőkre (nyomás- vagy volumenterhelés, oxidatív stressz) válaszol [37]. Később azonban szívelégtelenség alakul ki.

Vizsgálatunk során az SHR patkányokban a kialakult balkamra hypertrophia mértéke megegyezett az irodalmi értékekkel [38,11,14], emelkedett a balkamra/testtömeg arány, a balkamra/tibiahossz arány, de gravimetria során a szívelégtelenség jeleit nem észleltük (a nedves tüdő/száraz tüdő tömegarány nem változott). Ugyanezt erősítette meg a BNP szint változása, mely ugyan egy enyhe emelkedést mutatott SHR patkányokban, de ez nem volt lényegesen magasabb, mint az megegyező korú CFY patkányokban.

A szövettani vizsgálat jelentős interstitialis kollagén felszaporodást és a szívizomsejtek megnagyobbodását igazolta, mely a hypertoniás szívkárosodás ismert jelei [19]. PARP-gátlás szignifikánsan csökkentette mind a szívizomsejtek méretét, mind az intersticiális kollagén lerakódás mértékét.

A vizsgálat elején végzett echocardiographia a CFY és SHR patkányok között nem mutatott különbséget a systoles balkamra funkció, a balkamrai falvastagságokat és az üregméretek vonatkozásában. A 26 hetes vizsgálat után elvégzett echocardiographia azonban jelentősen emelkedett balkamrai falvastagságokat és végdiasztolés volument (LVEDV) mutatott az SHR patkányokban a CFY csoporthoz képest. A systoles balkamrafunkció azonban nem különbözött a két csoport között. PARP-gátló kezelés mellett a balkamrai falvastagság jelentősen alacsonyabb volt, mint a kezeletlen SHR csoportban. A LVEDV azonban nem különbözött szignifikánsan a két csoport között.

A jelátviteli utak aktivitása jelentősen megváltozott SHR patkányokban a CFY patkányokhoz képest. Az Akt-1/GSK-3 $\beta$  jelátviteli út foszforilációja emelkedett, emellett a PKC, elsősorban a PKC  $\alpha/\beta$ , és a PKC  $\lambda/\zeta$ , valamint diszkrétebb módon a PKC  $\delta$ , a PKC  $\varepsilon$  aktivitása nőtt meg. PARP-gátlás a protektív jelátviteli utak (Akt-1/GSK-3 $\beta$ , PKC  $\varepsilon$ ) foszforiláltságát tovább emelte, azonban a maladaptív hypertrophiához vezetőket (PKC  $\alpha/\beta$ , PKC  $\lambda/\zeta$ ) csökkentette. A MAP kinázok is aktiválódtak kissé a spontán hipertenzív patkányokban, azonban ezek aktivitását a PARP-gátló kezelés nem befolyásolta érdemben.

Összefoglalva a PARP-gátló jelentős védelmet nyújtott hipertenzív patkányokban a hypertoniás cardiopathia kialakulásával szemben antihypertenzív hatás nélkül is, döntően az Akt-1/GSK-3 $\beta$  jelátviteli útra, illetve bizonyos PKC isoformok aktivitására kifejtett hatása révén.

#### *4. A PARP-gátlók hatása idős spontán hipertenzív patkányokban (SHR) a pangásos szívelégtelenség kialakulásával szemben.*

Előzetes eredményeink szerint a PARP-gátló kezelés lényegesen javította az SHR patkányok túlélését. Míg a kezelt állatok esetén mintegy 10 %-os mortalitást észleltünk a 26 hetes kezelés során, addig a kezeletlen SHR patkányoknál ez az érték mintegy 75 % volt. Echocardiographiás paraméterek közül a systoles balkamra funkció lényegesen jobb volt az L-2286-al kezelt csoportban, mint a kezeletlenben. A szövettani és a jelátviteli vizsgálatok még folyamatban vannak.

#### *5. A PARP-gátlás hatása doxorubicinnel kiváltott szívelégtelenség modellben.*

Ebben a vizsgálatban hím CD-1 egereket kezeltünk összesen 4 hétig hetente két alkalommal 3 mg/kg doxorubicinnel. A doxorubicinnel kezelt állatok egy része PARP-gátlót, míg mások scavenger hatású Trolox kezelésben részesültek. Ebből a vizsgálatból származó mintáink még jelenleg is feldolgozás alatt állnak.

## Irodalomjegyzék

1. Teerlink JR, Pfeffer JM and Pfeffer MA. Progressive ventricular remodeling in response to diffuse isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats. *Circ Res.* 1994; 75: 105-13.
2. Grimm D, Elsner D, Schunkert H, Pfeifer M, Griesse D, Bruckschlegel G et al. Development of heart failure following isoproterenol administration in the rat: role of the renin-angiotensin system. *Cardiovasc Res.* 1998; 37: 91-100.
3. Pacher P, Liaudet L, Mabley J, Komjati K, Szabo C. Pharmacologic inhibition of poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase may represent a novel therapeutic approach in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2002; 40: 1006-16.
4. Lips DJ, deWindt LJ, van Kraaij DJ, Doevendans PA. Molecular determinants of myocardial hypertrophy and failure: alternative pathways for beneficial and maladaptive hypertrophy. *Eur Heart J.* 2003; 24: 883-96.
5. Tan FL, Moravec CS, Li J, Apperson-Hansen C, McCarthy PM, Young JB et al. The gene expression fingerprint of human heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99: 11387-92.
6. Sun Y, Zhang JQ, Zhang J, Lamparter S. Cardiac remodeling by fibrous tissue after infarction in rats. *J Lab Clin Med.* 2000; 135: 316-23.
7. van Bilsen M, Smeets PJ, Gilde AJ, van der Vusse GJ. Metabolic remodelling of the failing heart: the cardiac burn-out syndrome? *Cardiovasc Res.* 2004; 61: 218-26.
8. Antos CL, McKinsey TA, Frey N, Kutschke W, McAnally J, Shelton JM et al. Activated glycogen synthase-3 beta suppresses cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99: 907-12.
9. Clerico A, Emdin M. Diagnostic accuracy and prognostic relevance of the measurement of cardiac natriuretic peptides: a review. *Clin Chem.* 2004; 50: 33-50.
10. Yamazaki T, Yazaki Y. Molecular basis of cardiac hypertrophy. *Z Kardiol.* 2000; 89: 1-6.
11. Kim S, Iwao H. Activation of mitogen-activated protein kinases in cardiovascular hypertrophy and remodeling. *Jpn J Pharmacol.* 1999; 80: 97-102.
12. Hardt SE, Tomita H, Katus HA, Sadoshima J. Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2Bepsilon by glycogen synthase kinase-3beta regulates beta-adrenergic cardiac myocyte hypertrophy. *Circ Res.* 2004; 94: 926-35.
13. Haq S, Choukroun G, Kang ZB, Ranu H, Matsui T, Rosenzweig A et al. Glycogen synthase kinase-3beta is a negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy. *J Cell Biol.* 2000; 151: 117-30.
14. Liao P, Georgakopoulos D, Kovacs A, Zheng M, Lerner D, Pu H et al. The in vivo role of p38 MAP kinases in cardiac remodeling and restrictive cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98: 12283-8.

15. Molkenkin JD. Calcineurin and beyond: cardiac hypertrophic signaling. *Circ Res.* 2000; 87: 731-8.
16. Haq S, Choukroun G, Lim H, Tymitz KM, del Monte F, Gwathmey J et al. Differential activation of signal transduction pathways in human hearts with hypertrophy versus advanced heart failure. *Circulation.* 2001; 103: 670-7.
17. Condorelli G, Drusco A, Stassi G, Bellacosa A, Roncarati R, Iaccarino G et al. Akt induces enhanced myocardial contractility and cell size in vivo in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99: 12333-8.
18. Kaga S, Zhan L, Altaf E, Maulik N. Glycogen synthase kinase-3beta/beta-catenin promotes angiogenic and anti-apoptotic signaling through the induction of VEGF, Bcl-2 and survivin expression in rat ischemic preconditioned myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 40, 138-147, 2006.
19. Michael A, Haq S, Chen X, Hsieh E, Cui L, Walters B, Shao Z, Bhattacharya K, Kilter H, Huggins G, Andreucci M, Periasamy M, Solomon RN, Liao R, Patten R, Molkenkin JD, Force T. Glycogen synthase kinase-3beta regulates growth, calcium homeostasis, and diastolic function in the heart. *J Biol Chem.* 279, 21383-93, 2004
20. Ballou LM, Tian PY, Lin HY, Jiang YP, Lin RZ. Dual regulation of glycogen synthase kinase-3beta by the alpha1A-adrenergic receptor. *J Biol Chem.* 2001; 276: 40910-6.
21. Fang X, Yu S, Tanyi JL, Lu Y, Woodgett JR, Mills GB. Convergence of multiple signaling cascades at glycogen synthase kinase 3: Edg receptor-mediated phosphorylation and inactivation by lysophosphatidic acid through a protein kinase C-dependent intracellular pathway. *Mol Cell Biol.* 2002; 22: 2099-110.
22. Gopalakrishna R, Jaken S. Protein kinase C signaling and oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2000; 28: 1349-61.
23. Du X, Matsumura T, Edelstein D, Rossetti L, Zsengeller Z, Szabo C et al. Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *J Clin Invest.* 2003; 112: 1049-57.
24. Minchenko AG, Stevens MJ, White L, Abatan OI, Komjati K, Pacher P et al. Diabetes-induced overexpression of endothelin-1 and endothelin receptors in the rat renal cortex is mediated via poly(ADP-ribose) polymerase activation. *FASEB J.* 2003; 17: 1514-6.
25. Janero DR, Hreniuk D, Sharif HM. Hydroperoxide-induced oxidative stress impairs heart muscle cell carbohydrate metabolism. *Am J Physiol.* 1994; 266: C179-88.
26. 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 cell damage and mitochondrial metabolism in Langendorff heart perfusion system. *Mol Pharmacol.* 2001; 59: 1497-505.

27. Palfi A, Toth A, Hanto K, Deres P, Szabados E, Szereday Z, et al. PARP inhibition prevents postinfarction myocardial remodeling and heart failure via protein kinase C/glycogen synthase kinase-3 $\beta$  pathway. *J Mol Cell Cardiol* 2006;41:149-159.
28. Tapodi A, Debreceni B, Hanto K, Bogнар Z, Wittmann I, Gallyas F Jr., et al. Pivotal role of Akt activation in mitochondrial protection and cell survival by poly(ADP-ribose)polymerase-1 inhibition in oxidative stress. *J Biol Chem* 2005;280:35767-75.
- 29 Penela P, Murga C, Ribas C, Tutor SA, Peregrin S, Mayor F Jr. Mechanisms of regulation of G protein-coupled receptor kinases (GRKs) and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2006;69:46-56.
30. Li D, Shinagawa K, Pang L, Leung TK, Cardin S, Wang Z, et al. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on the development of the atrial fibrillation substrate in dogs with ventricular tachy-pacing-induced congestive heart failure. *Circulation* 2001;104:2608-2614.
31. Lips DJ, Bueno OF, Wilkins BJ, Purcell NH, Kaiser RA, Lorenz JN, et al. MEK1-ERK2 Signaling pathway protects myocardium from ischemic injury in vivo. *Circulation* 2004;109:1938-1941.
32. See F, Thomas W, Way K, Tzanidis A, Kompa A, Lewis D, et al. p38 Mitogen-Activated protein kinase inhibition improves cardiac function and attenuates left ventricular remodeling following myocardial infarction in the rat. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:1679-89.
33. Kyoі S, Otani H, Matsuhisa S, Akita Y, Tatsumi K, Enoki C, et al. Opposing effect of p38 MAP kinase and JNK inhibitors on the development of heart failure in the cardiomyopathic hamster. *Cardiovasc Res* 2006;69:888-898.
34. Steinberg R, Harari OA, Lidington EA, Boyle JJ, Nohadani M, Samarel AM, et al. A protein kinase Cepsilon/anti-apoptotic kinase signalling complex protects human vascular endothelial cell against apoptosis through induction of Bcl-2. *J Biol Chem* 2007;282:32288-32297.
35. Takeishi Y, Bhagwat A, Ball AN, Kirkpatrick DL, Periasamy M, Walsh RA. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on protein kinase C and SR protein in heart failure. *Am J Physiol* 1999;276:H53-62.
36. Mujumdar, V.S., Smiley, L.H., Tyagi, S.C. Activation of matrix metalloproteinase dilates and decreases cardiac tensile strength. *Int. J. Cardiol* 79, 277-286, 2001.
37. Wang Y. Mitogen-Activated Protein Kinases in heart development and diseases. *Circulation* 2007;116:1413-1423.Review
38. Meurrens K, Ruf S, Ross G, Schleeф R, van Holt K, Schlüter K-D. Smoking accelerates the progression of hypertension-induced myocardial hypertrophy to heart failure in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res* 2007;76:311-22.



39. McCrossan ZA, Billeter R, White E. Transmural changes in size, contractile and electrical properties of SHR left ventricular myocytes during compensated hypertrophy. *Cardiovasc Res* 2004;63:283-292.

40. de Bold MLK. Atrial Natriuretic factor and brain natriuretic peptide gene expression in the spontaneously hypertensive rat during postnatal development. *Am J Hypertens* 1998;11:1006-1018.