

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové



Mgr. Martin Štěrba

Antracyklinová kardiotoxicita a potenciálně kardioprotektivní
účinky látek chelatujících železo

Autoreferát dizertační práce

Doktorský studijní program: LÉKAŘSKÁ FARMAKOLOGIE
Hradec Králové
2007

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové
Ústav farmakologie

**ANTRACYKLINOVÁ KARDIOTOXICITA A
POTENCIÁLNĚ KARDIOPROTEKTIVNÍ ÚČINKY LÁTEK
CHELATUJÍCÍCH ŽELEZO**

Autoreferát dizertační práce

Mgr. Martin Štěrba

Školitel: prof. MUDr. Vladimír Geršl, CSc.
Doktorský studijní program: Lékařská farmakologie

Hradec Králové
2007

Dizertační práce byla vypracována v rámci prezenčního a kombinovaného studia doktorského studijního programu Lékařská farmakologie na Ústavu farmakologie, Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze.

Uchazeč: Mgr. Martin Štěrba
Ústav farmakologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze

Školitel: prof. MUDr. Vladimír Geršl, CSc.
Ústav farmakologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze

Oponenti:

Oponenti:
Prof. MUDr. Vladislav Eybl, DrSc.
Lékařská fakulta v Plzni

Prof. MUDr. Josef Fusek, DrSc.
FVZ, UO, Hradec Králové

Stanovisko k dizertaci bylo vypracováno vedením Ústavu farmakologie Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze.

S dizertací je možné se seznámit na děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38, Hradec Králové.

prof. MUDr. Jiřina Martínková, CSc.

Předseda komise pro obhajoby dizertačních prací
v doktorském studijním programu
Lékařská farmakologie

Obsah

I.	Úvod	5
II.	Cíle práce	7
III.	Metodika	8
IV.	Výsledky	11
V.	Diskuze.....	19
VI.	Závěr	28
VII.	Literatura	29
VIII.	Souhrn	33
IX.	Summary	35
X.	Přehled publikační činnosti	37
XI.	Přehled příloh dizertační práce	42

Autoreferát byl rozeslán dne 9.5.2007
Obhajoba se koná před komisí pro obhajoby disertačních
prací v doktorském studijním programu
lékařská farmakologie
v pondělí dne 18. června 2007 v 11.30 hodin
učebna Ústavu farmakologie Lékařské fakulty
Šimkova 870, Hradec Králové

Dizertační práce vznikla za podpory Výzkumného záměru MSM0021620820 a Grantové agentury České republiky (projekt GAČR 305/03/1511).

Seznam použitých zkratek

A	maximální rychlosť plnenia ľavej komory v pozdnej fáze
ADR-925	aktivní metabolit dexametasonu
AUC	plocha pod křivkou
ATP	adenosin trifosfát
cTnI	srdeční troponin I
cTnT	srdeční troponin T
dP/dt _{max}	maximální vzestup tlaku v isovolumické fázi systoly
dP/dt _{min}	maximální pokles tlaku v isovolumické fázi diastoly
E	maximální rychlosť plnenia ľavej komory v časnej fáze
EDTA	ethylenediamintetraoctová kyselina
i.p.	intraperitoneální aplikace
i.v.	intravenózní aplikace
LVEF	ejekční frakcia levé komory
o-108	pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazon
PEG	polyetylenglykol
PIH	pyridoxal isonikotinoyl hydrazon
ROS	reaktívne formy kyslíku (voľné kyslíkové radikály)
SERCA	sarkoendoplazmatická ATPáza
SIH	salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon

I. Úvod

Antracyklinová cytostatika (doxorubicin, daunorubicin, epirubicin atd.) patří mezi základní protinádorová léčiva. Jejich užití v onkologické praxi je ovšem významně limitováno rizikem kardiotoxických účinků (von Hoff 1979). S ohledem na klinický obraz a nástup obtíží lze antracyklinovou kardiotoxicitu rozdělit na akutní, subakutní, chronickou a pozdní (Elbl 2002). Mezi klinicky nejvýznamnější formy antracyklinové kardiotoxicity řadíme především její chronickou a pozdní variantu. V obou případech je riziko rozvoje kardiotoxického účinku závislé na celkové kumulativní dávce. Ačkoliv se uvedené typy kardiotoxicity liší časovým odstupem toxicitého účinku od ukončení chemoterapie (do 1 roku u chronické formy a 4-20 let u pozdní formy), v obou případech se jedná o irreverzibilní typ toxicity postihující difúzně levou srdeční komoru. Na buněčné úrovni dochází ke ztrátě myofibril, změnám v ultrastruktuře mitochondrií a sarkoplazmatického retikula, vakuolizaci cytoplazmy a zániku kardiomyocytů (nekrotickému popř. apoptotickému) s následným rozvojem intersticiální fibrózy a remodelace myokardu. Uvedené změny vedou k rozvoji dilatační antracyklinové kardiomyopatie, která se funkčně projeví jako levostranné městnavé srdeční selhání, které poměrně špatně odpovídá na standardní léčbu (Elbl 2002, Minotti 2004, Ewer a Benjamin 2006).

Prestože patogeneze antracyklinové kardiotoxicity není stále zcela objasněna, předpokládá se, že významnou úlohu v mechanizmu vzniku a rozvoje tohoto druhu toxicity sehrávají volné kyslíkové radikály a ionty přechodných kovů – zvláště pak železa (Keizer 1990). Antracykliny totiž mohou v srdeční tkáni produkovat volné kyslíkové radikály (ROS) jednak přímo (prostřednictvím redoxního cyklu chinon/semichinon svého aglykonu) a pak také díky redox-aktivním komplexům molekul antracyklinů s ionty železa. Mezi nejvýznamnější typ ROS produkovaný tímto způsobem patří hydroxylové radikály. Tento typ ROS patří k nejtoxičtějším vůbec. Hydroxylové radikály mohou vzhledem ke své extrémní reaktivitě výrazně poškodit téměř všechny významné biomolekuly ve svém okolí: membránové lipidy, DNA, proteiny (Keizer 1990, Minotti 2004).

Rozvinutá antracyklinová kardiomyopatie se symptomy srdečního selhání je do značné míry irreverzibilní iatrogeně navozené onemocnění, u kterého lze dostupnou terapií pouze zmírnit rychlosť další progrese (Elbl 2002). Proto je základní strategií vzniku chronické a pozdní antracyklinové kardiotoxicity předcházet. Mezi nejdůležitější opatření patří důsledné respektování rizikových faktorů. Na prvním místě je třeba jmenovat celkovou kumulativní dávku antracyklinu, neboť ta zásadním způsobem determinuje míru rizika rozvoje kardiotoxicity. Na základě von Hoffových dat (1979) bylo donedávna předpokládáno, že riziko kardiotoxicity začíná významně stoupat při kumulativní dávce cca 550 mg/m². Ve světle novějších klinických studií byl vztah kumulativní dávka antracyklinu-riziko rozvoje kardiotoxicity přehodnocen a hranice, při které dochází k výraznému nárůstu rizika byla posunuta na 400-450 mg/m² doxorubicinu (Ewer a Benjamin 2006). Ani při této dávce ovšem chemoterapie antracyklinovými cytostatiky není z hlediska poškození srdece zcela bezproblémová, neboť může docházet k subklinickému postižení, které se může za určitých okolností manifestovat v budoucnu. Navíc, omezení celkové kumulativní dávky cytostatika může mít také vliv na úspěch protinádorové léčby.

Protože riziko kardiotoxicity je mimo kumulativní dávku ovlivněno celou řadou

dalších individuálních faktorů (věk, pohlaví, iradiace mediastina atd.), výskyt této komplikace nelze vždy snadno a spolehlivě předpovědět. Proto je důležité v průběhu chemoterapie monitorovat výskyt srdeční toxicity. Pro tyto účely se především dříve užívala endokardiální biopsie, která je poměrně citlivá a nález je většinou dostatečně průkazný. Nicméně invazivní charakter této metody může být příčinou celé řady komplikací, a proto je tato metoda v současnosti využívána jen málo (Ewer a Benjamin 2006). Standardní monitorování výskytu kardiotoxicity u onkologických pacientů se dnes běžně provádí pomocí neinvazivního vyšetření systolické srdeční funkce (echokardiograficky nebo radioizotopovou ventrikulografií, Elbl 2002). Přestože uvedené vyšetřovací metody jsou pro diagnostiku antracyklinové kardiotoxicity užitečné, mezi jejich společné limitace patří omezená citlivost. Nové diagnostické metody, které by dovedly odhalit rozvíjející se kardiotoxicitu v časnější fázi, by mohly dříve identifikovat jedince se zvýšeným rizikem a včas změnit léčbu nebo nasadit kardioprotektivum. Mezi nejdiskutovanější přístupy, které se zdají být užitečné s ohledem na časnou diagnostiku antracyklinové kardiotoxicity, patří echokardiograficky hodnocená diastolická funkce (Bu'Lock 1999, Tjeerdsma 1999, Tassan-Mangina 2006, Nagy 2006) a stanovení plazmatických koncentrací srdečních troponinů (Adamcova 2005, O'Brien 2006).

Jednou z perspektivních možností ochrany myokardu před toxicitními účinky antracyklinových cytostatik je farmakologická kardioprotekce. Ačkoliv se podle všech informací na patogenezi antracyklinové kardiotoxicity podílejí ROS, podávání běžných antioxidantů a ROS scavengerů (vitamin A, E, C, acetylcystein atd.) se ukázalo být neúčinné a to jak na experimentálních modelech chronické antracyklinové kardiotoxicity (Herman 1985, Van Vleet 1980), tak i v klinické praxi (Legha 1982, Dorr 1996). Jediným léčivem, u kterého byl prokázán signifikantní kardioprotektivní účinek vůči antracyklinové kardiotoxicitě jak v experimentálních tak i klinických podmínkách, je dexrazoxan (Cvetkovic 2005). Tato látka je v podstatě prodrug, které se v kardiomyocytech enzymaticky bioaktivuje na látku ADR-925, která je strukturně podobná EDTA. Podle současných poznatků je látka ADR-925 schopna v cytoplazmě kardiomyocytů vyvázat volné nebo slabě vázané ionty železa a také odnímat ionty tohoto kovu z komplexu s antracykliny. Předpokládá se, že dexrazoxan právě tímto mechanizmem chrání srdeční buňky před antracykliny indukovanou a ionty železa katalyzovanou tvorbou ROS. Přestože je toto léčivo účinným kardioprotektivem, širšímu užití v klinické praxi brání jeho relativně vysoká cena i riziko myelotoxicity (v kombinaci s antracykliny, Cvetkovic 2005).

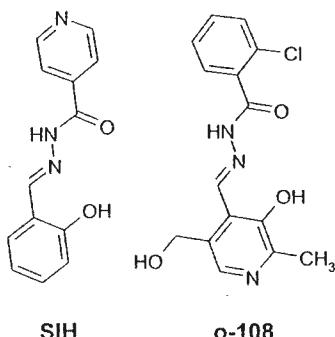
Přestože se chelatace iontů železa zdá být perspektivní kardioprotektivní strategií, zatím nebyl tento přístup důsledně prostudován. Příčinou tohoto stavu je i poměrně omezené množství vhodných selektivních biokompatibilních chelátorů, které by tvořily s ionty železa redoxně inaktivní komplexy. V klinické praxi je pro účely léčby přetížení organismu železem používán deferoxamin (Richardson a Ponka 1998). Narozdíl od dexrazoxanu toto léčivo ovšem na experimentálním modelu chronické doxorubicinové kardiotoxicity nepůsobilo kardioprotektivně (Herman 1994). Možným vysvětlením toho výsledku je nízká lipofilita deferoxamINU, která výrazně omezuje průnik tohoto chelátoru do srdečních buněk. Eventuální kardioprotektivní účinek dalších chelátorů železa byl hodnocen jen velmi omezeně a převážně pouze na akutních experimentech a v podmínkách *in vitro* (Barnabe 2002, Hasinoff 2003, Xu 2006).

Aroylhydrazonové chelátorY železa jsou novou zajímavou skupinou selektivních lipofilních chelátorů, které snadno pronikají do buněk (Buss 2002). Mateškou látkou této skupiny je pyridoxal isonikotinoyl hydrazon (PIH, Buss 2002), od

kterého byla odvozena celá řada nových analogů (např. salicyladehyd isonikotinoyl hydrazon – SIH a pyridoxal 2-chlorbenzoylhydrazon – o-108, Obr. 1) s různými farmakologickými účinky. Na *in vitro* i *in vivo* modelech přetížení organismu železem bylo prokázáno, že jsou tyto chelátory schopny navodit signifikantní mobilizaci železa z buněk a tkání (Buss 2002). Na nádorových buněčných liniích a tumorech implantovaných pokusným zvěřatům byly demonstrovány antiproliferativní a protinádorové účinky aroylhydrazonových chelátorů železa, zvláště pak analogů odvozených od salicylaldehydu a naftaldehydu (Richardson 1995). Mateřská látka skupiny (PIH) se ukázala být retinoprotektivní na *in vivo* modelu hypoxicco-reoxygenačního poškození sítnice (Bhattacharya 1997). Zajímavé antioxidační vlastnosti SIH byly demonstrovány na modelu oxidačního poškození srdečních buněk peroxidem vodíku (Horackova 2000, Simunek 2005a). Preinkubace srdečních buněk již s velmi nízkými koncentracemi SIH (3 μ M) byla schopna navodit téměř kompletní ochranu těchto buněk proti apoptotické ale i nekrotické smrti a mitochondriální dysfunkci.

Protože se uvedené mechanizmy patrně podílejí i na rozvoji antracyklinové kardiotoxicity, ochrana myokardu proti toxicním účinkům antracyklinových antineoplastik pomocí nových lipofílních chelátorů železa (o-108 a SIH) se zdá být potenciálně perspektivní strategií farmakologické kardioprotekce.

Obr. 1. Chemická struktura aroylhydrazonových chelátorů SIH a o-108



II. Cíle práce

Tato dizertační práce byla zaměřena na studium antracyklinové kardiotoxicity z hlediska možnosti její časné detekce a změn v myokardiálním zastoupení vybraných kovových prvků. V návaznosti na to byl studován účinek modelového kardioprotektiva dexrazoxanu a především pak nových lipofílních aroylhydrazonových chelátorů železa a to z hlediska jejich farmakologických, toxikologických a kardioprotektivních vlastností.

Vlastními cíli této práce bylo studium:

1. Možnosti časné detekce antracyklinové kardiotoxicity na experimentálním modelu s užitím echokardiograficky hodnocené diastolické funkce a biochemického markeru srdečního troponinu T.
2. Změn v zastoupení vybraných kovových prvků v myokardu pokusných zvířat s experimentálně navozenou chronickou antracyklinovou kardiomyopatií a modelovou kardioprotekcí pomocí chelátoru železa dexrazoxanu.
3. Bezpečnosti a potenciální toxicity opakovaného podání nového chelátoru železa pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazonu (o-108) u králíka.
4. Farmakokinetiky aroylyhydrazonových chelátorů železa salicylaldehydu isonikotinoyl hydrazonu (SIH) a pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazonu (o-108) po jednorázovém i.v. podání u králíka.
5. Potenciálně kardioprotektivních účinků dvou strukturně odlišných aroylyhydrazonových chelátorů železa (pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazonu - o-108 a salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazonu - SIH) na modelu chronické antracyklinové kardiotoxicity u králíka.

III. Metodika

1. **Pokusná zvířata:** králiči, Činčila velká, samci (hmotnost \approx 3,5 kg). Práce s laboratorními zvířaty byla schválena Odbornou komisí na ochranu zvířat proti týrání při Lékařské fakultě UK v Hradci Králové.
2. **Anestézie:** neinvazivní měření a další manipulace s pokusnými zvířaty byly prováděny v ketaminové anestézii (50 mg/kg, i.m.), nebo kombinované anestézii ketamin/xylazin (ketamin 50 mg/kg a xylazin 2 mg/kg, i.m.) viz dále. Invazivní měření bylo prováděno v pentobarbitalové anestézii (pentobarbital 30 mg/kg, i.v.).
3. **Model chronické antracyklinové kardiotoxicity u králíka:** antracyklinová kardiotoxicita byla navozena opakováním podávání daunorubicinu (Daunoblastina, 3 mg/kg, 1 x týdně po 10 týdnů). Echokardiografické měření systolické srdeční funkce bylo prováděno na začátku pokusu, ve vybraných intervalech v průběhu pokusu (9., 10. týden, vždy před další aplikací studovaných látek) a na konci experimentu (5-7 dní po poslední aplikaci). Invazivní vyšetření srdeční funkce bylo prováděno na konci pokusu. Odběry vzorků krve pro biochemickou a hematologickou analýzu byly prováděny na začátku, v polovině (5. týden) a na konci experimentu. Odběry krve pro stanovení troponinu T byly prováděny na začátku pokusu, v 5., 8., 10. týdnu a na konci pokusu, není-li dále uvedeno jinak.
4. **Dávkovací schémata studovaných látek:** **dexrazoxan** – 60 mg/kg, i.p. před každou aplikací daunorubicinu (n=5), **o-108** při studiu jeho bezpečnosti a toxicity (25, 50 a 100 mg/kg, i.p., n=5 v každé skupině), **o-108** při studiu kardioprotekce včetně daunorubicinové kardiotoxicitě (10 a 25 mg/kg, i.p. vždy 30 min před každou aplikací daunorubicinu, n=8 v každé skupině), **SIH** při studiu kardioprotekce (0,5, 1,0 a 2,5 mg/kg, i.v., vždy 10 min před každou aplikací daunorubicinu, n=9 v každé

skupině). Samotný SIH byl aplikován i.v. v dávce 1 mg/kg (n=6). Všechny uvedené látky byly aplikovány 1x týdně po 10 týdnů analogicky jako daunorubicin (n=15) a výsledky byly porovnány s kontrolní skupinou (n=11) a skupinami vehikul (10% Cremophor EL, n=11 a roztok kosolventů pro SIH, n=5).

Při studiu farmakokinetiky byly chelátory o-108 a SIH rozpuštěny ve směsi kosolventů (PEG 300, ethanol a fyziologický roztok) a aplikovány králikům v dávce 10 mg/kg (n=5 a n=4) pomalou intravenózní injekcí po dobu 3 min.

5. **Hodnocení celkové toxicity:** úhyn a eventuální změny v příjmu potravy/tekutin, nápadné změny chování a vnější známky toxicity byly sledovány denně ve spolupráci s pracovnicemi Vivária LF UK HK. Hmotnost zvířat byla měřena týdně.
6. **Vyšetření funkčních kardiovaskulárních parametrů**
 - a) **neinvazivní hodnocení srdeční funkce:** na začátku pokusu a ve vybraných časových intervalech byla systolická srdeční funkce hodnocena echokardiograficky. Pomocí M-mód měření řízeného z 2D zobrazení levé komory v dlouhé ose (B-mód) byly zjištěny rozměry srdce na konci systoly a diastoly a z nich byla vypočítána ejekční frakce levé komory (EF, %). Diastolická srdeční funkce byla hodnocena pomocí pulzního (PW) Dopplerovského hodnocení toku mitrálním ústím (hodnocené parametry: maximální rychlosť plnění levé komory v E-fázi, maximální rychlosť plnění levé komory v A-fázi, poměr obou parametrů (E/A), čas od zahájení plnění levé komory v E-fázi k dosažení maximální rychlosť plnění (acceleration time) a čas od maxima do konce plnění levé komory v E-fázi (deceleration time)). Neinvazivní měření bylo prováděno vždy před aplikací daunorubicinu, resp. kombinace daunorubicinu s chelátorem.
 - b) **invazivní hodnocení srdeční funkce:** na konci pokusu byl polyetylenový katetr o definovaném průměru naplněn heparinizovaným fyziologickým roztokem a zaveden do levé komory cestou a. carotis. Změny tlaků byly zaznamenávány, derivativizovány a ukládány pomocí systému ADI vybaveného náležitými snímači a převaděči. Hlavním hodnoceným parametrem byl zejména index kontraktility dP/dt_{max} – tj. maximální vzestup tlaku v isovolumické fázi levé komory; popř. index relaxace levé komory dP/dt_{min} – tj. maximální pokles tlaku v isovolumické fázi diastoly. Simultánně byla zaznamenávána srdeční frekvence a invazivně byl měřen tlak v a. femoralis.
7. **Hodnocení biochemického markeru srdečního poškození - plazmatické hladiny troponinu T:** plazmatické koncentrace srdečního troponinu T byly stanovovány v heparinizované plazmě odebrané ve vybraných časových intervalech (kvantitativní limit = 0,010 µg/l) ve spolupráci s Ústavem klinické biochemie a diagnostiky FN HK.
8. **Hematologické a biochemické vyšetření krve/plazmy:** krev byla odebrána z centrální ušní artérie do doporučených zkumavek a transportována na Ústav klinické biochemie a diagnostiky FN HK k vyšetření.
9. **Pitva a posmrtné ohledání:** po předávkování pokusných zvířat pentobarbitalem, nebo okamžitě po zjištění předčasného úhynu vždy násleovalo posmrtné ohledání, při kterém byl proveden odběr vybraných orgánů na histologické vyšetření. Při pitvě

byla věnována pozornost přítomnosti výpotků v dutině břišní, hrudní a v perikardu. Eventuální přítomnost makroskopicky patrných abnormalit byla zaznamenána do pitevního protokolu.

10. **Hodnocení biochemických parametrů v myokardu pokusných zvířat:** vybrané biochemické parametry v myokardu byly hodnoceny ve spolupráci s Doc. MUDr. Michaelou Adamcovou, PhD. z Ústavu fyziologie LF HK UK (např. kolagen) a nebo Ústavem klinické biochemie a diagnostiky FN HK (analýza vybraných kovových prvků v myokardu pomocí atomové absorpcní spektrometrie a plamenové spektrometrie).
11. **Histologické vyšetření srdece a vybraných orgánů:** histologické vyšetření srdece a vybraných orgánů (játra, ledviny, plíce, tenké střevo) bylo provedeno ve spolupráci s Doc. MUDr. Yvonou Mazurovou, CSc. (Ústav histologie a embryologie, LF HK UK). Vzorky byly odebrány ze standardního místa, byly fixovány v 10% formaldehydu a po zpracování zality do parafinu. Připravené řezy (6 µm) byly barveny (Hematoxylin-eosin a modrý Massonův trichrom) a vyšetřeny pomocí světelné mikroskopie.
12. **Antiproliferativní a kardioprotektivní studie v podmínkách *in vitro*:** studium potenciálního vlivu aroylhydrazonových chelatačních látek na antiproliferativní vlastnosti daunorubicinu, stejně tak jako testování potenciálních protektivních účinků těchto chelátorů na buněčných kulturách bylo provedeno ve spolupráci s PharmDr. Tomášem Šimůnkem, PhD. a Mgr. Helenou Kaiserovou (Katedra biochemických věd, FaF UK). Pro účely antiproliferativních studií byla použita buněčná line HL-60 odvozená od buněk humánní promyelocytární leukémie (viz Příloha 6). Pro kardioprotektivní studie v podmínkách *in vitro* byly použity spontánně bijící izolované neonatální potkaní kardiomyocyty. Buněčná morfologie a autofluorescence daunorubicinu byly hodnoceny pomocí invertovaného mikroskopu. Buněčná toxicita byla hodnocena na základě aktivity laktát dehydrogenázy (LDH) v buněčném médiu, jak je blíže uvedeno v příloze dizertační práce (Příloha 7).
13. **HPLC analýza aroylhydrazonových chelátorů železa a farmakokinetická analýza** (viz Příloha 4 a 5): vývoj, validace a vlastní provedení HPLC analýz aroylhydrazonových chelátorů železa v plazmě pokusných zvířat bylo provedeno PharmDr. Petrou Kovaříkovou, PhD. (Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, FaF UK). Farmakokinetická analýza byla provedena s využitím softwaru Kinetica software, version 4 (Thermo Electron Corporation, USA) ve spolupráci s Ing. Jaroslavem Chládkem, PhD. (Ústav farmakologie, LF HK UK).
14. **Statistická analýza:** statistická analýza byla prováděna s užitím statistického softwaru SigmaStat 3.0 (SPSS, U.S.A.). Pro určení statistických významností byla použita hladina významnosti $p < 0,05$. Párový t-test byl použit při srovnání výsledků s úvodními hodnotami a ANOVA byla použita pro porovnání výsledků mezi jednotlivými skupinami. Pearsonova nebo Spearmanova analýza byla použita pro zjištění korelací mezi jednotlivými parametry.

IV. Výsledky

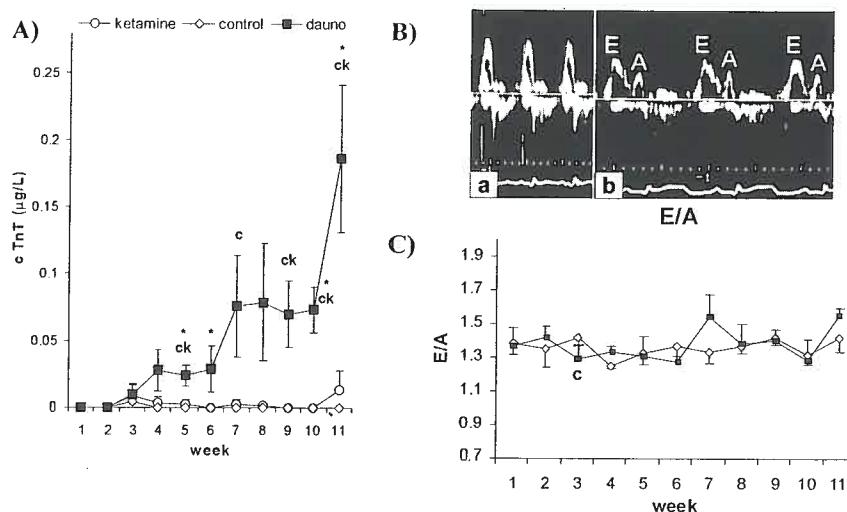
1. Antracyklinová kardiotoxicita – možnosti časné detekce na experimentálním modelu

V první části dizertační práce byl hodnocen potenciální přínos dvou nezávislých přístupů (echokardiograficky hodnocené diastolické funkce a plazmatické koncentrace srdečního troponinu) pro časnou detekci chronické antracyklinové kardiotoxicity na experimentálním modelu u králíka ($n=15$). Náležité hodnocení všech důležitých parametrů trasmittrálního toku u králíků se ukázalo být z technických důvodů možné pouze v kombinované anestézii – ketamin/xylazin. Chronická antracyklinová kardiotoxicita byla navozená aplikací daunorubicinu ve validovaném schématu (3 mg/kg, 1 x týdně po 10 týdnů). Parametry diastolické funkce, jakož i odběry plazmy pro stanovení srdečního troponinu T, byly provedeny na začátku pokusu a dále 1x týdně (před každou aplikací) až do konce pokusu (5-7 dní po 10. aplikaci). Vedle kontrolní skupiny (fyziologický roztok 1 ml/kg) hodnocené s užitím výše uvedené kombinační anestézie, byla vzhledem k možnému hemodynamickému vlivu xylazinu studována ještě ketaminová skupina, ve které byly aplikace prováděny shodně jako v kontrolní skupině, avšak jako anestetikum byl použit pouze samotný ketamin.

Ze získaných výsledků vyplývá, že hodnocení diastolické funkce je poměrně technicky obtížné, a to především s ohledem na vysokou srdeční frekvenci u králíků (až 300 tepů/min). Z tohoto důvodu jsou v anestézii navozené ketaminem hodnotitelné pouze parametry vlny E (stejné výsledky byly získány s užitím jiných injekčních anestetik jako např. midazolamu). Naproti tomu kombinovaná anestézie ketamin/xylazin umožnila kvalitní hodnocení všech standardních parametrů diastolické funkce odvozené z Dopplerovského hodnocení trasmittrálního toku (viz Obr. 2B) a naměřené hodnoty odpovídaly literárním údajům (Obr. 2C, Pennock 1997, Nagueh 2000). Nicméně takto získané parametry plnění levé srdeční komory se neukázaly být perspektivní z hlediska hodnocení antracyklinové kardiotoxicity - např. hodnoty E/A naměřené v daunorubicinové skupině na začátku pokusu ($1,37 \pm 0,11$) se významně nelišíly od hodnot v závěru pokusu ($1,55 \pm 0,04$; n.s.). Naproti tomu, citlivější katetrizační vyšetření diastolické funkce levé komory (provedené vzhledem k invazivnímu charakteru tohoto přístupu až na konci pokusu) prokázalo přítomnost diastolické dysfunkce ve srovnání s kontrolní skupinou ($dP/dt_{min} = 2395 \pm 182$ vs. 3852 ± 540 mmHg/s, daunorubicin vs. kontrola, $p < 0,05$). S tímto nálezem do značné míry korespondovaly i naměřené zvýšené koncentrace kalcia ($10,60 \pm 0,67$ a $15,79 \pm 2,05$ $\mu\text{g/g}$) a celkového kolagenu ($14,43 \pm 0,37$ a $19,74 \pm 0,79$ mg/g) v myokardu daunorubicinové skupiny, jakož i progresivní intersticiální fibrózu dokumentovaná histologickým vyšetřením. Porucha homeostázy kalcia stejně tak jako změna elastických vlastností myokardu v důsledku fibrotizace jsou známými typickými průvodními znaky diastolické dysfunkce myokardu.

Na rozdíl od náročného hodnocení diastolické funkce se hodnocení plazmatických hladin srdečního troponinu T ukázalo být užitečným a perspektivním přístupem pro časnou detekci kardiotoxicity (Obr. 2A). Detekovatelné hladiny troponinu T byly naměřeny již ve 3.-4. týdnu experimentu (kumulativní dávka daunorubicinu ≈ 100 - 150 mg/m 2). Koncentrace troponinu T v plazmě dosáhly statistické signifikance ve srovnání s kontrolní skupinou již v polovině pokusu (kumulativní dávka daunorubicinu = 200 mg/m 2), tedy v době, kdy ještě nedochází k žádným změnám ve funkci levé komory.

V druhé polovině pokusu pak koncentrace tohoto biomarkeru srdečního poškození progresivně narůstaly až k hodnotám $0,186 \pm 0,055 \mu\text{g/l}$ na konci experimentu (Obr. 2A).



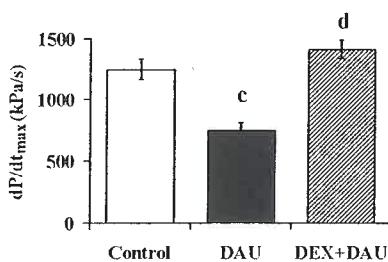
Obr. 2. A) koncentrace troponinu T v plazmě v průběhu pokusu, B) Dopplerovsky hodnocené plnění levé komory s užitím (a) ketaminové anestézie, (b) kombinované anestézie – ketamin/xylazin, „E“ časné plnění levé komory, „A“ pozdne plnění levé komory, C) index diaстolické funkce E/A v průběhu pokusu. Ketamine – ketaminová skupina, control – kontrolní skupina, dauno – daunorubicinová skupina.

2. Zastoupení vybraných kovových prvků v myokardu s experimentálně navozenou antracyklinovou kardiomyopatií a vliv chelatačního kardioprotektiva (dexrazoxanu).

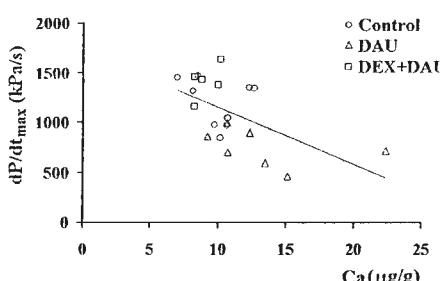
V další části dizertační práce byla zaměřena pozornost na hodnocení změn v obsahu vybraných prvků v myokardu králíků s experimentálně navozenou chronickou daunorubicinovou kardiotoxicitou (daunorubicin 3 mg/kg, i.v., 1 x týdně po 10 týdnů, n=11) viz Příloha 2. Na konci pokusu byla zjištěna kontraktilita levé komory katetetrizačním vyšlefením a po předávkování zvířete pentobarbitalem byl myokard levé komory odebrán a analyzován s ohledem na koncentrace vybraných kovových prvků (Fe, Se, Ca, Mg, K). Výsledky byly porovnány s kontrolní skupinou (fyziologický roztok, 1 ml/kg, ve stejném schématu jako daunorubicin, n=10) a dexrazoxanovou skupinou (n=5), kde bylo modelové kardioprotективum (dexrazoxan 60 mg/kg, i.p.) podáváno vždy 30 min před každou aplikací daunorubicinu.

Podávání daunorubicinu bylo spojeno s předčasnou mortalitou (37 %) a vyšetření kontraktility levé komory provedené u přežívajících zvířat na konci experimentu odhalilo významně sníženou systolickou srdeční funkci (pokles o 59,8 %). Naopak, kompletní přežití a zachovaná kontraktilita levé komory byly zjištěny v dexrazoxanové skupině - index dP/dt_{max} se statisticky významně nelišil od hodnot v kontrolní skupině

(Obr. 3) Analýza vybraných kovových prvků v myokardu daunorubicinové skupiny odhalila signifikantně vyšší koncentrace vápníku ve srovnání s kontrolní skupinou (o 52,8 %), avšak nižší koncentrace hořčíku (o 10,1 %) a draslíku (o 9,6 %). Zvýšení koncentrací selenu bylo pouze nesignifikantní. Naproti tomu, ve skupině, kde byl dexamethason podáván vždy 30 min před daunorubicinem, k žádným změnám v porovnání s kontrolní skupinou nedošlo. Koncentrace kalcia byly v této skupině signifikantně nižší než ve skupině se samotným daunorubicinem ($9,06 \pm 0,42$ vs. $16,2 \pm 2,36 \mu\text{g/g}$, $p < 0,05$). Navíc koncentrace kalcia v levé komoře statisticky významně negativně korelovala s indexem kontraktility dP/dt_{max} ($p < 0,01$, $R = -0,600$). Ačkoliv byla zjištěna signifikantní korelace mezi koncentracemi hořčíku a vápníku, nebo vápníku a selenu, tyto výsledky přímo nekorespondovaly s funkčním poškozením levé komory. Zajímavá byla také absence jakýchkoli signifikantních rozdílů v koncentraci železa u studovaných skupin.



Obr. 2. Index kontraktility levé komory (dP/dt_{max}) na konci experimentu. Kontrolní (control), daunorubicinová (DAU) a kombinacní dexamethasonová skupina (DEX+DAU).



Obr. 3. Korelace indexu kontraktility levé komory (dP/dt_{max}) a koncentrace vápníku v levé komoře.

3. Nový aroylhydrazonový chelátor železa pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazone (o-108) - bezpečnost a potenciální toxicita opakovánoho podání látky.

Bezpečnost a potenciální toxicita pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazonu byla studována (viz Příloha 3) na králících ($n=15$), ve třech dávkách (25, 50 a 100 mg/kg), podávaných ve stejném schématu, jaký byl předpokládán pro studium kardioprotektivních účinků této látky (tj. aplikace i.p., 1 x týdně po dobu 10-ti týdnů). Výsledky byly porovnány s kontrolní skupinou (fyzioligický roztok 1 ml/kg, ve stejném schématu) a skupinou, které bylo aplikováno vehikulum pro chelátor (10% vodný roztok Cremophoru EL). Hodnoceny byly: změny hmotnosti pokusních zvířat, zevní známky toxicity a eventuální nápadné změny chování, mortalita, funkční kardiovaskulární parametry (echograficky hodnocená ejekční frakce a katetrizačně hodnocená kontraktilita na konci experimentu, EKG), plazmatické koncentrace troponinu T, standardní biochemické vyšetření plazmy/séra a hematologické vyšetření krve, histologicky bylo vyšetřeno srdeč, játra, ledviny a další vybrané orgány.

V průběhu studie nebyl zaznamenán předčasný úhyn v žádné ze sledovaných skupin. Nebyly zaznamenány žádné zjevné vnější známky toxicity (jako např. křeče nebo

krvácení). S výjimkou skupiny, které byla podávána nejvyšší dávka chelátoru, byl u všech zvířat pozorován v průběhu celého experimentu signifikantní nárůst tělesné hmotnosti ve srovnání se začátkem pokusu. Ve skupině, které byla aplikována nejvyšší dávka o-108 (100 mg/kg), byla v polovině sledovaných intervalů změna tělesné hmotnosti nevýznamná. U této skupiny byla též místy pozorována nižší tendence přijímat potravu a tekutiny a také omezená motorická aktivita (zejména ve dnech po aplikaci chelátoru). U žádného ze sledovaných funkčních kardiovaskulárních parametrů nedošlo k výrazné a statisticky významné změně. Překvapivě byly ovšem ve skupinách, kterým byl aplikován chelátor, naměřené zvýšené plazmatické koncentrace srdečního troponinu T. Ke zvýšení koncentrací tohoto biomarkeru docházelo až od 8. resp. 10. týdne experimentu. Uvedený nález byl nejnápadnější a také statisticky významný zejména ve skupinách s vyššími dávkami chelátoru – nejvyšší koncentrace srdečního troponinu T v plazmě ($0,106 \pm 0,024 \mu\text{g/l}$) byly naměřeny na konci experimentu ve skupinách s nejvyšší dávkou chelátoru. Podrobné histologické vyšetření myokardu, ale ve shodě s funkčními kardiovaskulárními parametry, neshledalo žádný rozdíl v porovnání se skupinou, které bylo podáváno samotné vehikulum pro chelátor. Morfologická analýza dalších orgánů (játra, ledviny, plic, střevo) odhalila pouze mírné změny, které se kvalitativně ani kvantitativně nelišily od nálezů ve skupině, které bylo aplikované samotné vehikulum. Standardní biochemický rozbor plazmy zvířat odhalil pouze mírný pokles celkového proteinu v závěru experimentu a přechodné zvýšení některých parametrů 24 hodin po první aplikaci chelátoru (např. vzestup celkového cholesterolu $1,87 \pm 0,22$ vs. $2,86 \pm 0,20 \mu\text{M}$), nicméně tyto mírné abnormality se normalizovaly v další části pokusu. V průběhu experimentu též došlo k určitému zvýšení hodnot kreatininu, ovšem bez zjevné dávkové závislosti. K žádnému z uvedených nálezů nebyl zjištěn morfologický korelat svědčící o eventuální orgánové toxicitě. V důsledku podávání chelátoru železa nedošlo k významnému poklesu koncentrací celkového plazmatického železa ani dalších vícemocných biogenních prvků (např. kalcia). Hematologické vyšetření nezjistilo žádné významné změny související s podáváním chelátoru (nebyly nalezeny známky anémie či jiných hematologických anomalií).

4. Pilotní studium farmakokinetiky aroylhydrazonových chelátorů železa SIH a o-108.

Vzhledem k tomu, že dosud nebyly známy žádné údaje o farmakokinetice studovaných látek, v této části dizertace byla v pilotních experimentech poprvé studována farmakokinetika aroylhydrazonových chelátorů železa po jednorázovém intravenózním podání. Kalibrace a validace analytické metody, stejně tak jako časové intervaly pro odběr vzorků, byly odvozeny z přípravných pokusů, které předcházely vlastním farmakokinetickým studiům. Salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (SIH) a pyridoxal 2-chlorbenzyol hydrazon (o-108) byly rozpuštěny v roztoku kosolventů (PEG 300/ethanol/fyziologický roztok) a aplikovány pomalou intravenózní injekcí (3 min) dvěma pilotním skupinám zvířat (n=4 a n=5) v dávce 10 mg/kg. Plazmatické koncentrace postupně stoupaly v průběhu aplikace a v těchto intervalech byla též podle očekávání zjištěna nejvyšší interindividuální variabilita naměřených koncentrací. V případě obou látek byla následně pozorována poměrně rychlá distribuce a také eliminace těchto látek. Plazmatické koncentrace chelátoru klesly pod kvantitativní limit po 60-ti (SIH) resp. 90-ti (o-108) minutách od aplikace a dále již nebylo možné koncentrace chelátoru hodnotit.

Pomocí farmakokinetického softwaru byly určeny základní farmakokinetické parametry obou látek (Tab. 1). Maximální koncentrace (c_{max}) studovaných chelátorů byly výrazně vyšší v případě o-108 (4,2 krát, při porovnání na molární bázi). Vedle maximálních koncentrací byl shledán i výrazný rozdíl ve zdánlivém distribučním objemu obou látek (4,12 krát, při porovnání na molární bázi) a celkové clearance. Nicméně, u obou studovaných látek byl zjištěn do značné míry srovnatelný a poměrně krátký biologický poločas eliminace.

Tab. 1. Souhrn vybraných základních farmakokinetických parametrů SIH a o-108 po jednorázovém i.v. podání

Parametr	SIH 10 mg/kg i.v.	o-108 10 mg/kg i.v.
c_{max} ($\mu\text{mol/l}$)	$108,1 \pm 11,8$	$336,2 \pm 35,8$
t_{max} (min)	$2,25 \pm 0,25$	$2,4 \pm 0,4$
V_d (l/kg)	$1,48 \pm 0,08$	$0,352 \pm 0,028$
Cl_{tot} (l/min. kg^{-1})	$0,067 \pm 0,013$	$0,0092 \pm 0,0009$
AUC ($\mu\text{mol/l}\cdot\text{min}^{-1}$)	$705,5 \pm 146,4$	$3598 \pm 454,3$
$t_{1/2}$ (min)	$16,9 \pm 2,8$	$27,7 \pm 2,98$

5. Kardioprotektivní účinky aroylhydrazonových chelátorů železa pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazonu (o-108) a salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazonu (SIH) na modelu chronické antracyklinové kardiotoxicity u králíka.

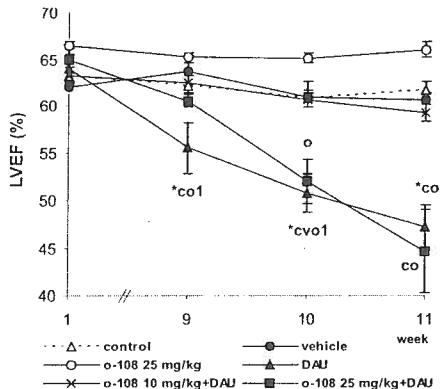
Nejdříve byla věnována pozornost potenciálně kardioprotektivnímu účinku chelátoru železa o-108. Vlastnímu studiu kardioprotektivního účinku o-108 předcházelo testování potenciálního vlivu této látky na antiproliferativní účinek daunorubicinu, protože perspektivní kardioprotektivum by nemělo mít negativní vliv na protinádorový účinek antracyklinového cytostatika. S užitím nádorové linie HL-60 bylo zjištěno, že studovaná látka nemá v nižších koncentracích (0,1-10 μM) signifikantní vliv na antiproliferativní účinek daunorubicinu, ba opakem ve vyšších dávkách (30-300 μM) bylo zaznamenáno aditivní synergické působení studované látky. Na základě těchto výsledků následovalo studium potenciálně kardioprotektivního účinku chelátoru železa o-108 na modelu chronické daunorubicinové kardiotoxicity u králíka. V této části byla látka o-108 aplikována v dávkách 10 a 25 mg/kg dvěma skupinám pokusných zvířat ($n=8$, v každé skupině) vždy 30 min před každou aplikací daunorubicinu ve standardním schématu (tj. daunorubicin 3 mg/kg, i.v., 1 x týdně po 10 týdnů). Hodnoceny byly tyto parametry: mortalita, změna tělesné hmotnosti, parametry systolické funkce levé komory (ejekční frakce, dP/dt_{max}), plazmatické koncentrace troponinu T, histologické vyšetření srdece a dalších orgánů, standardní biochemické a hematologické výsledky. Výsledky byly porovnány se skupinou daunorubicinu (samotný daunorubicin 3 mg/kg, i.v., $n=15$), kontrolní skupinou (fyziologický roztok 1 ml/kg, i.v., $n=11$), skupinou vehikula (10% Cremophor EL, 2 ml/kg, i.p., $n=11$) a skupinou o-108 (samotný chelátor 25 mg/kg, i.p.,

n=5), přičemž uvedené látky byly podávány ve shodném dávkovacím schématu.

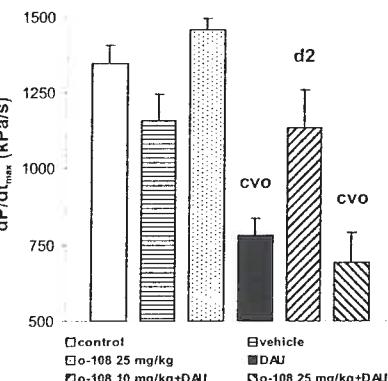
Bыло zjištěno, že chelátor o-108 je v nižší dávce (10 mg/kg) schopen kompletně zabránit daunorubicinem indukovanému předčasnemu úhynu pokusních zvířat (celková mortalita pozorovaná v daunorubicinové skupině dosáhla 33%). Navíc, narozdíl od daunorubicinové skupiny v této kombinační skupině nebyl v průběhu celého pokusu zaznamenaný žádný signifikantní pokles ejekční frakce levé komory ($63,2 \pm 0,05$ % na začátku pokusu vs. $59,23 \pm 0,98$ %, n.s.). Citlivější katetraizační vyšetření systolické srdeční funkce provedené na konci experimentu odhalilo signifikantně vyšší kontraktilitu levé komory u zvířat, kterým byl podáván chelátor železa o-108 (10 mg/kg), než ve skupině se samotným daunorubicinem (1131 ± 125 vs. 783 ± 53 kPa/s). Výsledky obou nezávislých vyšetření srdeční kontraktility vzájemně dobře korelovaly ($p<0,001$, $R=0,880$). Uvedený nález byl dále podpořen závěry histologického vyšetření myokardu levé komory poukazujícího na nižší rozsah a intenzitu poškození srdečního svalu levé komory u zvířat, kterým byl současně podáván chelátor železa o-108 a dále také nižším nárůstem troponinu T v této skupině.

Naproti tomu ve skupině, které byla ve shodném schématu podávána vyšší dávka studovaného chelátora, byla pozorována výrazná předčasná mortalita (50%). Předčasný úhyn v této skupině ovšem nastal výrazně dříve než v daunorubicinové skupině (již při nízkých kumulativních dávkách antracyklínu $\approx 200-300$ mg/m²). Uvedenému úhynu nepředcházíl pokles ejekční frakce levé komory ani výrazná elevace troponinu T (v pátém týdnu cTnT = $0,013 \pm 0,006$ µg/l) a histologické vyšetření myokardu uhynulých zvířat shledalo pouze mírné poškození myokardu. Překvapivě ovšem nebyly shledány žádné významné známky kardioprotektivního působení u zvířat, která přežila do konce experimentu – došlo k signifikantnímu poklesu ejekční frakce levé komory ve srovnání se začátkem pokusu ($64,9 \pm 0,4$ vs. $44,7 \pm 4,4$ %; $p<0,05$) a ve shodě s katetraizačním vyšetřením byl v porovnání s kontrolní skupinou zjištěn signifikantní pokles systolické srdeční funkce (EF= $44,7 \pm 4,4$ vs. $61,6 \pm 0,9$ %; dP/dt_{max} = 691 ± 101 kPa/s vs. 1345 ± 61 kPa/s $p<0,05$). Ani většina dalších kardiovaskulárních parametrů se v této skupině nelíšila od nálezu ve skupině samotného daunorubicinu.

V další fázi byl studován kardioprotektivní potenciál strukturálně odlišného arylhydrazonového chelátora SIH. Potenciálně kardioprotektivní účinky tohoto chelátora železa odvozeného od salicylaldehydu byly studovány *in vitro* s užitím izolovaných ventrikulárních kardiomyocytů (daunorubicin 10 µM, inkubace 48 h) a dále na modelu daunorubicinem indukované chronické kardiotoxicity (daunorubicin 3 mg/kg, i.v., 1 x týdně po dobu 10-ti týdnů) u králíka. Ve studiu kardioprotektivních vlastností SIH v podmírkách *in vitro* byly použity koncentrace 3-100 µM, přičemž v podmírkách *in vivo* byly použity 3 dávky (0,5, 1,0 a 2,5 mg/kg, i.v.) podané 10 min před každou aplikací daunorubicinu (n=9, v každé skupině). *In vitro* byla hodnocena změna buněčné morfologie, aktivita laktátdehydrogenázy v buněčném médiu a kumulace daunorubicinem indukované fluorescence uvnitř kardiomyocytů. *In vivo* byly hodnoceny obdobné parametry jako v předcházející studii zaměřené na chelátor o-108. Výsledky byly porovnány s daunorubicinovou skupinou (samotný daunorubicin, 3 mg/kg, i.v., 1 x týdně po 10 týdnů, n=15), kontrolní skupinou (fyziologický roztok 1 ml/kg, i.v., n=11), skupinou samotného chelátora (SIH 1,0 mg/kg, i.v., n=6) a skupinou vehikula (roztok farmaceutických kosolventů PEG 300/ethanol ve fyziologickém roztoku, n=5).



Obr. 4. Ejekční frakce levé komory (LVEF) v průběhu pokusu. DAU – daunorubicin. Statistická signifikance (ANOVA) při srovnání s „c“ kontrolní, „v“ vehikulovou, „o“ samotným chelátorem a „1“ kombinační skupinou 10 mg/kg o-108+DAU. „*“ porovnání s výchozími hodnotami (párový t-test).



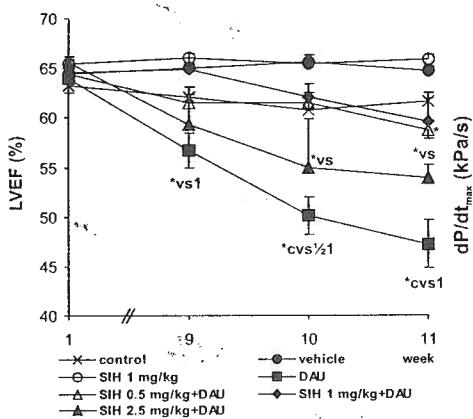
Obr. 5. Index kontraktility levé komory (dP/dt_{max}) na konci experimentu. Statistická signifikance (ANOVA) při srovnání s „c“ kontrolní, „v“ vehikulovou, „o“ samotným chelátorem a „2“ kombinační skupinou 25 mg/kg o-108+DAU.

In vitro bylo zjištěno, že reinkubace srdečních buněk s chelátorem SIH je schopna částečně, avšak signifikantně potlačit (22–25 %, $p<0,05$) buněčnou toxicitu daunorubicinu (hodnocenou jako aktivitu LDH v buněčném mediu) a do určité míry též zmírnit změny buněčné morfologie navozené daunorubicinem. Měřením autofluorescence daunorubicinu byla zaznamenána nápadná kumulace tohoto cytostatika uvnitř srdečních buněk. Protektivní působení nemělo žádný vliv na kumulaci daunorubicinové autofluorescence uvnitř kardiomyocytů. Přestože měl studovaný chelátor signifikantní protektivní vliv na daunorubicinem navozenou toxicitu, tento efekt v rozmezí koncentrací očekávatelných *in vivo* (tj. cca do 100 μ M SIH), nevykazoval významnou dávkovou závislost.

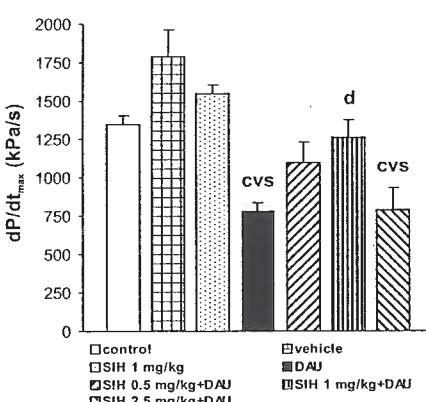
Intravenózní podání chelátoru SIH v dávce 0,5 a 1 mg/kg mělo významný pozitivní vliv na celkovou mortalitu navozenou daunorubicinem. Zatímco v daunorubicinové skupině byl pozorován celkový předčasný úhyn 33 %, ve skupině s nejnižší dávkou SIH byla mortalita snížena (11 %). Dvojnásobná dávka SIH (1 mg/kg) pak byla dokonce schopna kompletně zamezit úhynu pokusných zvířat. Vedle vlivu na předčasný úhyn měl studovaný chelátor též významný vliv na srdeční funkci. V nižší studované dávce byl zaznamenaný významný pokles ejekční frakce levé komory u zvířete, které předčasně uhynulo a v celé skupině pak došlo k poklesu tohoto parametru na konci pokusu (Obr. 6). Uvedený pokles byl ale relativně malý, a proto nesignifikantní ve srovnání s kontrolní skupinou ($EF = 58,8 \pm 0,9$ vs. $61,7 \pm 0,9$ %, n.s.), na rozdíl od daunorubicinové skupiny kde byl pokles signifikantní již od 9. týdne pokusu. Ve skupině s vyšší dávkou chelátoru (1 mg/kg) byl protektivní účinek této látky na srdeční funkci ještě více vyjádřen. V této skupině nebyl v průběhu celé studie zaznamenán signifikantní

pokles ejekční frakce levé komory (Obr. 6) a naměřené hodnoty se významně nelišily od nálezu v kontrolní skupině ($59,6 \pm 2,3$ vs. $61,7 \pm 0,9$ %, n.s.). Hodnoty ejekční frakce byly navíc ve většině sledovaných intervalů významně vyšší než v daunorubicinové skupině. Signifikantně vyšší kontraktilita levé komory v této skupině byla též potvrzena prostřednictvím indexu kontraktility dP/dt_{max} (Obr. 7) získaného katetrazačním vyšetřením. Snížený byl též výskyt pleurálního výpotku a ascitu v pitevním nálezu (22% vs. 67% v daunorubicinové skupině). Histologické vyšetření myokardu levé komory odhalilo známky snížené progrese srdečního poškození s převažujícími časnými změnami jako je zvýšená eosinofilie cytoplazmy či začínající degenerace kardiomyocytů. Naproti tomu v daunorubicinové skupině byly patrné známky nejen masivní fokální degenerace srdečních buněk, ale i výrazná intersticiální fibrotizace jako důsledek dlouhodobého toxickeho poškození srdečního svalu daunorubicinem. V souladu s tímto pozorováním byl i nález nižší progrese vzestupu plazmatických hladin srdečního troponinu T, ačkoliv tyto hodnoty v závěru dosáhly statistické významnosti.

Na rozdíl od výše diskutovaných výsledků získaných v obou skupinách s nižšími dávkami SIH, ve skupině s nejvyšší podávanou dávkou ($2,5$ mg/kg) nebyly shledány žádné známky významného protektivního působení. Předčasný úhyn (33%) a funkční parametry levé komory (EF na konci experimentu = $53,9 \pm 1,3$ %, $dP/dt_{max} = 811 \pm 115$ kPa/s) se významně nelišily od skupiny samotného daunorubicinu. Histologické vyšetření levé komory též odhalilo poškození blížící se co do rozsahu i intenzity náležům v daunorubicinové skupině.



Obr. 6. Ejekční frakce levé komory (LVEF) v průběhu pokusu. DAU – daunorubicin. Statistická signifikance (ANOVA) při srovnání s „c“ kontrolní, „v“ vehikulovou, „s“ samotným chelátorem, „1/2“ kombinacní skupinou 0,5 mg/kg SIH+DAU a „1“ 1 mg/kg SIH+DAU. „*“ porovnání s výchozími hodnotami (párový t-test).



Obr. 7. Index kontraktility levé komory (dP/dt_{max}) na konci experimentu. Statistická signifikance (ANOVA) při porovnání s „c“ kontrolní, „v“ vehikulovou, „s“ samotným chelátorem a „d“ daunorubicinovou skupinou.

V. Diskuze

Kardiotoxicita patří mezi méně běžné, avšak velmi závažné toxicické účinky komplikující protinádorovou chemoterapii. Tento druh toxicitého účinku je nejvíce vyjádřen (a již dlouhou dobu znám) u antracyklinových cytostatik, nicméně v nedávné době byly překvapivě odhaleny známky kardiotoxicity i u nových protinádorových léčiv s odlišnými mechanizmy účinku jako např. trastuzumab a imatinib (Ewer 2005, Kerkera 2006). Protože antracyklinová kardiotoxicita je do značné míry irreverzibilní, je důležité odhalit známky kardiotoxicity v co nejčasnější fázi. Ačkoliv je echografické hodnocení systolické srdeční funkce nejčastěji užívaným přístupem pro monitorování antracyklinové kardiotoxicity, tento přístup je schopen odhalit až relativně pokročilé znaky antracyklinové kardiotoxicity (Shan 1996, Suter 2002), čemuž také odpovídají experimentální výsledky obsažené v této dizertaci (Obr. 4. a 6.), jakož i výsledky našich dalších prací (Simunek 2004). Z dostupných informací vyplývá, že neinvazivní vyšetření diastolické funkce prostřednictvím Dopplerovského hodnocení plnění levé komory by mohlo být vhodnou, citlivou a neinvazivní metodou, která by mohla dříve identifikovat pacienty s výrazným rizikem rozvoje kardiotoxicity (Bu'Lock 1999, Tjeerdsma 1999, Tassan-Mangina 2006, Nagy 2006). V experimentálním uspořádání by tento přístup mohl pomoci lépe hodnotit kardiotoxicité účinky antracyklinových cytostatik a přesněji posoudit kardioprotektivní potenciál případných nových kardioprotektiv.

Nicméně, jak je zřejmé z obrázku 2B, řádné hodnocení diastolické funkce je vzhledem k vysoké srdeční frekvenci u králíka možné pouze s užitím kombinované anestézie ketamin/xylazin. Tako hodnocené parametry plnění levé komory se ovšem ukázaly být nepříenosné pro hodnocení antracyklinové kardiotoxicity (Obr. 2C), přestože citlivější katetrizační vyšetření provedené na konci experimentu identifikovalo diastolickou dysfunkci. Jedním z možných vysvětlení by mohl být hemodynamický vliv xylazinu jako součást anestézie, který byl také i v této studii dokumentován. Vliv xylazinu na kardiovaskulární parametry (srdeční frekvenci, tlak krve) by totiž do určité míry mohl maskovat daunorubicinem navozenou diastolickou dysfunkci, o čemž nasvědčuje i rozdíl v indexu relaxace (dP/dt_{min}) mezi kontrolní skupinou (hodnocenou s užitím kombinované anestézie) a skupinou, kde byl použit pouze samotný ketamin. Hodnocení plnění levé komory u králíka je tedy limitováno poměrně vysokou srdeční frekvencí na jedné straně a hemodynamickými změnami navozenými xylazinem na straně druhé. Kombinovaná anestézie obsahující xylazin (nebo jiné α_2 -mimetikum), je však při echokardiografickém vyšetření na malých laboratorních zvířatech poměrně často využívána (Rungwert 2004; Bull 2003; Derumeaux 2002; Nagueh 2000; Pennock 1997; Hoit 1995; Young 1990). Nicméně, z našich výsledků vyplývá, že v těchto případech nelze vyloučit vliv anestetika na výsledky získané tímto přístupem. Tato hypotéza odpovídá i dalším zprávám z poslední doby. Např. Chaves et al. (2001) zjistil, že xylazin jako součást anestézie pro echokardiografické měření má signifikantní vliv na systolickou srdeční funkci (ejekční frakci levé komory) měřenou tímto způsobem. Velmi recentní práce pak dále dokumentuje, že anestézie obsahující xylazin má signifikantní vliv i na Dopplerovský hodnocené parametry diastolické funkce (Stypmann 2007). Z těchto zkušeností se tedy zdá, že s využitím standardního přístrojového vybavení není z technických důvodů možné využít echografické hodnocení pro časný záchyt antracyklinové kardiotoxicity.

Ve výše diskutované práci byl demonstrován nárůst koncentrací troponinu T nad detekční limit již ve čtvrtém týdnu pokusu a signifikantní nárůst oproti kontrolní

skupině byl zjištěn již o týden později – tj. při relativně nízké kumulativní dávce daunorubicinu (200 mg/m^2). V následujících intervalech byl zaznamenán progresivní nárůst hladin troponinu T, což odpovídá kumulativnímu charakteru antracyklinové kardiotoxicity. Protože v této pilotní skupině bylo studováno pouze omezené množství pokusných zvířat, není možné spolehlivě usuzovat na individuální predikční hodnotu hladin troponinu T. Nicméně v předchozí studii jsme poukázali na to, že hladiny troponinu T negativně korelují s kontraktilitou levé komory (Simunek 2003). V našich experimentálních podmínkách se tedy troponin T zdá být nejcitlivějším v současnosti dostupným markerem antracyklinové kardiotoxicity, přičemž jeho signifikantní elevace předchází i poklesu systolické funkce levé komory, jako stále nejčastěji doporučovanému parametru pro hodnocení a monitorování antracyklinové kardiotoxicity (Elbl 2002, Gersl 1994, Simunek 2004). Uvedená studie též potvrdila vhodné zvolené odběrové intervaly (1., 5., 8., 10. a 11. týden) pro stanovení troponinu T pro další experimentální studium kardioprotektivních vlastností chelatačních látek. Získané výsledky též naznačují, že troponin T si zasluhuje další zkoumání, jak v experimentálním uspořádání, kde může napomoci objektivněji a přesněji hodnotit kardiotoxiccké a potenciální kardioprotективní působení léčiv, ale i v klinické praxi, kde by mohl s předstihem určit pacienty, u nichž dochází k subklinickým známkám kardiotoxicity.

Protože se soudí, že v patogenezi antracyklinové kardiotoxicity sehrávají důležitou úlohu ionty kovů (zvláště pak železa), byla dále věnována pozornost studiu změn v obsahu vybraných kovových prvků v myokardu pokusných zvířat s experimentálně navozenou antracyklinovou kardiomyopatií. Přestože některé studie naznačují výrazné změny v homeostáze železa v srdečních buňkách exponovaných antracyklínem (Kotamraju 2002), v této studii nebyla na našem klinicky relevantním modelu antracyklinové kardiotoxicity zaznamenána žádná změna v zastoupení tohoto prvku. I když některé práce naznačují, že interakce antracyklinu s tzv. „iron-regulatory proteins“ (IRP) může vést ke zvýšení exprese transferinového receptoru v srdečních buňkách (Kotamraju 2002, Xu 2005) a tak následně zvýšit celkové množství tohoto prvku v kardiomyocytech, závěry námi provedené studie tuto hypotézu nepodporují. Naopak, tyto výsledky spíše naznačují, že zásah antracyklinů do homeostázy železa v kardiomyocytech je na první pohled méně nápadný a ve své molekulární podstatě výrazně komplexnější. Tyto výsledky jsou také v souladu s nálezy dalších autorů (Xu 2005). Na základě všech těchto nálezů se zdá být pravděpodobnější, že spíše než ke změnám celkového absolutního obsahu železa v srdečních buňkách může vlivem antracyklinových cytostatiků docházet k indukcí změn v relativním zastoupení iontů železa v jednotlivých buněčných kompartmentech.

Nejvýznamnější změna v zastoupení prvků v myokardu levé komory po opakování podávání daunorubicinu byla nalezena při hodnocení koncentrací kalcia. Ve světle signifikantní negativní korelace tohoto parametru s indexem kontraktility levé komory (dP/dt_{max}) se zdá být tento poznamek ještě zajímavější. Kauzální vztah tohoto pozorování k daunorubicinové kardiotoxicitě dál podporuje nepřítomnost signifikantní změny v myokardiální koncentraci kalcia ve skupině, u které bylo dosaženo účinné kardioprotekce pomocí dexrazoxanu. Z literárních pramenů (Minotti 2004, Olson 2005) je známo, že antracykliny významně interferují s homeostázou kalcia v kardiomyocytech, což ve svém důsledku může vyústit v přetížení buňky kalcitem (tzv. „calcium overload“). Dlouhodobě zvýšené hladiny vápníku v cytoplazmě vedou mimojiné k aktivaci kalcium-dependentních proteáz, které mohou být zodpovědné za řadu dalších patologických dějů odehrávajících se v kardiomyocytech. Relativně nedávno bylo na modelu izolovaných

adultních kardiomyocytů demonstrováno, že doxorubicin je schopen významným způsobem navodit aktivaci kalpainu, a to již v relativně nízkých koncentracích (Lim 2004). Tato specifická Ca-dependentní proteáza je schopna vysoce efektivně štěpit několik významných substrátů – např. tropomíny (významné myofilamentární regulační proteiny), titin (strukturální protein důležitý pro stabilitu sarkomery) nebo ankyrin a fodrin (proteiny důležité pro správnou funkci a ukotvení Na^+/K^+ -ATPázy, Inserte 2005). Zvýšené koncentrace cytozolického kalcia mimo jiné vedou k hromadění tohoto prvku uvnitř mitochondrií a tímto způsobem je dále regulována signalizace vedoucí k buněčné smrti (apoptotické nebo nekrotické) (Wallace 2003).

V našem pozorování dexrazoxan dokázal plně zabránit nejen daunorubicinem navozeným změnám v myokardiálním zastoupení jednotlivých prvků, ale v souladu s tím také navodil účinnou kardioprotekci a zabránil předčasnemu úhynu pokusných zvířat. Významný kardioprotektivní účinek dexrazoxanu byl opakován dokumentován na klinicky relevantních experimentálních modelech (Herman 1985), ale i v četných klinických studiích (např. Swain 2004). Dexrazoxan je tak dosud jedinou látkou s jasně prokázaným kardioprotektivním účinkem jak v experimentálních podmínkách, tak v klinické praxi. Na základě dostupných informací se kardioprotekce pomocí dexrazoxanu zdá být výrazně perspektivnější než podávání klasických antioxidantů (např. vitamin C, E, acetylcystein; Legha 1982, Dresdale 1982, Myers 1983). Hlavním mechanizmem kardioprotektivního působení dexrazoxanu je, alespoň podle současného stavu poznání, chelatace volných iontů železa prostřednictvím svého aktivního metabolitu (ADR-925). Uvedený rozdíl v účinku scavenger/antioxidantů a dexrazoxanu je poměrně zajímavý s ohledem na to, že oba kardioprotektivní přístupy jsou zaměřeny na stejný patogenetický mechanismus antracyklinové kardiotoxicity – produkci volných kyslíkových radikálů (Minotti 2004). Možný rozdíl v praktické účinnosti obou kardioprotektivních intervencí může přímo souviset se strategií, jakou tyto látky proti ROS působí. Zatímco scavangery a látky posilující přirozenou antioxidační kapacitu myokardu inaktivují již utvořené ROS, principem účinku dexrazoxanu (resp. jeho aktivního metabolitu) je tvorbě ROS předcházet (Cvetkovic 2005). Vzhledem k tomu, že antracyklinová cytostatika produkuje především hydroxylové radikály, které jsou známé svou extrémně vysokou reaktivitou a ultrakrátkým poločasem (Keizer 1990), je možné, že potlačení cyklické tvorby ROS je z kardioprotektivního hlediska výrazně výhodnější.

Nové chelátory železa tudíž zasluhují pozornost a studium také z hlediska jejich potenciálně kardioprotektivních vlastností. Vzhledem k tomu byly studovány bezpečnostní aspekty a eventuální orgánová toxicita opakovávaného podání nového chelátoru železa pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazonu u králíka ve třech dávkách 25, 50 a 100 mg/kg. Uvedené dávky byly zvoleny s ohledem na přecházející studii indukce exkrece železa u hypertransfundovaných potkanů (25-200 mg/kg) (Link 2003). Dávkovací schéma a způsob podání použité v naší studii (i.p., 1 x týdně po dobu 10-ti týdnů) byly vybrány s ohledem na zamýšlené studium kardioprotektivních vlastností této látky na modelu daunorubicinem indukované kardiotoxicity u králíka (Gersl 1994, Simunek 2004). Také při studiu exkrece železa pomocí chelátoru o-108 byla hodnocena celková kumulativní exkrece tohoto prvku v horizontu jednoho týdne po jednorázovém podání uvedené látky (Link 2003). Při použití chelátoru o-108 jak pro eventuální kardioprotektivní účinky, tak i pro případnou léčbu přetížení organismu železem, je z principu nutné opakování podávání této látky. Před dalším studiem farmakologických vlastností o-108 tedy bylo třeba aspoň předběžně zjistit jeho tolerabilitu, případně

neočekávané farmakodynamické účinky (ve smyslu „safety pharmacology“) a potenciální orgánovou toxicitu po opakovaném podávání této látky. Vzhledem k tomu, že v obou případných indikacích je patologicky postižen kardiovaskulární systém (Richardson a Ponka 1998, Minotti 2004), zvláštní pozornost byla věnována právě kardiovaskulárním parametrem.

V průběhu celé studie nebyl zaznamenán žádný úhyn a nebyly pozorovány ani zjevné vnější známky toxicity. Ačkoliv se jedná o chelátor železa s účinkem prokázaných v podmínkách *in vitro* i *in vivo*, v průběhu celé studie nebyl zaznamenán pokles celkového sérového železa ani anemické obtíže s tímto související. Toto pozorování není podezřelé, neboť aroylhydrazonové chelátory jsou schopny vázat pouze volné ionty železa, kterých je v intaktním organizmu, oproti organizmu přetíženého železem, pouze velmi omezené množství (Aisen 2000). Studovaný chelátor není schopen vyvazovat ionty železa vázané v zásobních (feritin) či transportních proteinech (transferin), a tak mohl své železo-chelatační vlastnosti uplatnit pouze v tzv. labilní části intracelulárních zásob železa („labile iron pool“) (Buss 2002). Vzhledem k omezenému množství iontů železa v tomto kompartmentu, jeho vysokému stupni mobility a dávkovacímu schématu chelátoru, lze očekávat, že uvedené ztráty byly bez problému kompenzovány zvýšenou expresí transferinového receptoru, popř. přechodně zvýšenou střevní absorpcí železa. Plazmatické hladiny dalších významných bioģenních prvků (např. kalcia) nebyly podáváním chelátoru o-108 ovlivněny, což opět ukazuje na relativně vysokou chelatační selektivitu této látky vůči iontům železa uváděnou v literatuře (Richardson a Ponka 1998, Buss 2002).

Jediným statisticky významným a zároveň překvapivým nálezem spojeným s opakovaným podáváním chelátoru o-108 s ohledem na kardiovaskulární systém bylo zvýšení plazmatických koncentrací troponinu T. Přestože tento nález nejevil jasnu závislost na dávce chelátoru, nejvyšší a statisticky signifikantní hodnoty byly pozorovány ve skupině s nejvyšší dávkou chelátoru. K témtu výsledkům ovšem nebyl nalezen žádný morfologický nebo funkční korelat (Simunek 2003, 2004). Podrobné histopatologické vyšetření myokardu v této skupině pouze ukázalo na velmi mírné změny, přičemž nebylo možné nalézt kvalitativní nebo kvantitativní rozdíl v závislosti na dávce chelátoru. Navíc obdobné změny, dokonce i o něco nápadnější, byly pozorovány i ve skupině vehikula, kde ke zvýšení plazmatických koncentrací troponinu nedošlo. Funkční vyšetření (ejekční frakce levé komory stejně tak jako index kontraktility dP/dt_{max}) dokumentovaly zcela normální systolickou funkci levé komory bez náznaku podezřelých změn v porovnání s kontrolní i vehikulovou skupinou. Dále nebyl pozorován vliv chelátoru na vybrané funkční parametry kardiovaskulárního systému (arteriální krevní tlak, srdeční frekvence a EKG). Zvýšené plazmatické koncentrace troponinu T tedy v tomto případě nebyly asociovány s žádnými výraznými kardiovaskulárními abnormalitami, takže příčina a význam tohoto pozorování zůstává nejasná. Druhý studovaný chelátor - salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (SIH) - byl podáván intravenózně králíkům v dávce 1 mg/kg. Narodil od výše diskutovaného chelátoru o-108, opakované podávání SIH nevedlo k významnému zvýšení plazmatických koncentrací troponinu T, přičemž naměřené hodnoty plně odpovídaly výsledkům získaným v kontrolní skupině. SIH ve studované dávce nevykazoval žádné významné známky orgánové toxicity (obdobně jako o-108). Podobné nálezy byly dokumentovány v předchozí studii, kde byl tento chelátor podáván ve stejném schématu v dávce 50 mg/kg, i.p. (Klimtova 2003). Výsledky této práce tedy mj. naznačují poměrně nízkou orgánovou toxicitu aroylhydrazonových chelátorů železa, což koresponduje s nálezy ze studia akutní toxicity těchto látek (prof. Květina et al., ÚEBF, ProMed s.r.o.)

V literatuře však nebyly dostupné v podstatě žádné informace o osudu těchto látek v organizmu. Na osud aroylhydrazonových chelátorů v živém organizmu bylo tedy dosud možné usuzovat pouze nepřímo na základě studií exkrece železa po jejich podání. Z těchto údajů plyne, že uvedené látky navozují po perorálním podání významnou a dávkově závislou exkreci železa (Hoy 1979, Buss 2002). Proto u nich lze tedy očekávat poměrně dobrou biologickou dostupnost. Aroylhydrazony navozená exkrece iontů železa probíhala téměř výlučně žluči do stolice (nárůst exkrece moči byl zanedbatelný) (Blaha 1998, Buss 2002). Signifikantní nárůst exkrece byl pozorován cca do šesté hodiny po perorálním podání chelátorů, s maximem během prvních tří hodin (Blaha 1998). Příčinou absence základních farmakokinetických údajů, charakterizujících osud těchto potenciálních léčiv v organizmu, byla především nedostupnost moderních selektivních a přesných analytických metod vhodných pro hodnocení těchto látek.

Pro účely pilotních farmakokinetických studií bylo použito intravenózní podání obou léčiv a relativně vyšší podávaná dávka (10 mg/kg) tak, aby citlivost metody dovolila dostačně dlouhé sledování průběhu plazmatických koncentrací (kvantifikační limity pro SIH a o-108 byly 1,08 a 2,51 μ M). Vzhledem k přítomnosti nevodních složek vehikula bylo podání studovaných látek provedeno formou pomalé intravenózní injekce. Maximální koncentrace chelátoru bylo dosaženo v obou případech ke konci aplikace (2-3 min), ale c_{\max} obou chelátorů se v přepočtu na ekvimolární dávku významně lišila - c_{\max} o-108 byla cca. 4,2 krát vyšší než v případě SIH. Poměrně značný rozdíl mezi oběma chelátorům byl též pozorován v případě zdánlivého distribučního objemu. Zdánlivý distribuční objem SIH (cca 1,5 l/kg) signalizující významnou distribuci do celkové tělesné vody (tedy do extracelulárního i intracelulárního kompartmentu) a určitou retenci ve tkáních nebyl zásadním překvapením, protože tento údaj odpovídá fyzikálně-chemickým vlastnostem tohoto chelátoru a předcházejícím experimentům na *in vitro* i *in vivo* úrovni. Na druhou stranu určitým překvapením byl relativně malý distribuční objem o-108 (0,35 l/kg), neboť tato hodnota sice přesahuje celkový extracelulární objem (cca 0,2 l/kg), ale zdaleka neodpovídá předpokládaným hodnotám. Chelátor o-108 je totiž ještě významně lipofilyjnější než výše diskutovaný SIH – $\log P$ (SIH) = 1,75 a $\log P$ (o-108) = 2,74 (tj. rozdíl v rozdělovacím koeficientu je přibližně 10-ti násobný). Navíc v *in vitro* studiích o-108 jednoznačně prokazoval výraznou schopnost průniku do intracelulárního kompartmentu a to dokonce i lépe než SIH (Buss 2002). Jedním z možných vysvětlení je významnější vazba o-108 na plazmatické bílkoviny. Na tento jev by mimo jiné mohla ukazovat již zmíněná vyšší lipofilita tohoto chelátoru. Kromě toho, ačkoliv byly v obou případech použity pro formulaci chelátorů shodné kosolventy, SIH byl pro účely těchto studií použit jako sůl (hydrochlorid), což usnadnilo jeho rozpustnost ve vodných roztocích. Příprava soli o-108 se ovšem ukázala být z chemických důvodů nemožná, a proto musel být tento chelátor podáván jako volná báze. Není vyloučeno, že se ve vodném systému obtížně rozpustný chelátor o-108 po pomalém intravenózním podání významnou měrou solubilizoval za účasti vysoké vazby látky na plazmatické proteiny. Tomu by také mohla nasvědčovat shoda v poměru naměřených maximálních koncentrací o-108 a SIH (4,12) s poměrem zdánlivých distribučních objemů těchto látek (4,21). Nepřímým dokladem distribuce chelátoru o-108 do intracelulárního kompartmentu byl ovšem především kardioprotektivní účinek této látky, který vykazoval obdobnou dávkovou závislost jako SIH (viz dále).

V případě obou chelátorů byl zjištěn rychlý pokles koncentrací těchto látek v plazmě korespondující s poměrně rychlou distribucí. Relativně rychlý pokles

plazmatických koncentrací ovšem následoval i v další fázi, což svědčí o rychlé eliminaci uvedených látek. Rozdíl v biologických poločasech obou chelátorů je sice signifikantní ($p<0,05$), ale nikoliv zásadně odlišný. V obou případech byl biologický poločas eliminace relativně krátký. Je třeba podotknout, že se patrně nejedná o náhodné pozorování, ale spíše o vlastnost mající určitý vztah k chemické struktuře aroylyhydrazonových chelátorů, neboť také v úvodních pokusech s představitelem další série aroylyhydrazonových analogů (PCTH) byla nalezena obdobně rychlá eliminace jako v případě o-108 (nepublikované výsledky). Tyto pilotní farmakokinetické studie jsou prvními údaji o farmakokinetice aroylyhydrazonových chelátorů vůbec. Nicméně je zřejmé, že zde diskutované experimenty spíše představují úvod do studia farmakokinetiky těchto chelatačních látek. Pro kompletní objasnění farmakokinetiky těchto potenciálních léčiv a určení všech důležitých farmakokinetických parametrů (biologická dostupnost, vazba na plazmatické proteiny, koncentrace v klíčových tkáních jako např. myokard, exkrece atd.) je však nutné vyvinout ještě řádově citlivější analytickou metodu.

V návaznosti na předchozí studie byl sledován potenciálně kardioprotektivní účinek chelátoru železa o-108 po intraperitoneálním podání u králika. Studiu kardioprotektivního účinku o-108 předcházela analýza vlivu této látky na antiproliferativní účinek daunorubicinu. Bylo prokázáno, že samotný chelátor o-108 působí antiproliferativně, což koresponduje s přeházejícími zprávami o protinádorovém účinku aroylyhydrazonových chelátorů (Richardson 1995, Buss 2003). Mechanizmus tohoto účinku není zcela jasný, nicméně se předpokládá, že jsou tyto látky schopny inhibovat ribonukleotid reduktázu a indukovat programovaný zánik nádorových buněk (Buss 2003, Kalinowski 2005). Z hlediska potenciálního kardioprotektivního užití této látky však bylo nejdůležitějším zjištěním, že o-108 nijak neomezoval antiproliferativní účinek daunorubicinu, naopak ve vyšších dávkách chelátor vykazoval aditivní antiproliferativní účinek k působení daunorubicinu. Přestože v případě SIH nebyl vliv látky na antiproliferativní účinek daunorubicinu studován, lze očekávat, že výsledky by se neměly výrazně lišit od studie provedené s o-108. Naopak, je spíše pravděpodobné, že aditivní antiproliferativní účinek SIH by mohl být ještě významnější a to již při nižších koncentracích chelátoru (Richardson 1995, Buss 2003).

Při studiu kardioprotektivních účinků chelátoru o-108 bylo zjištěno, že je tato látka schopna kompletně zabránit daunorubicinem navozenému předčasnemu úhynu a signifikantně zmírnit postižení funkce levé komory. Tyto nálezy dobře korespondovaly s nižším výskytem známek městnání, nižším rozsahem a intenzitou morfologických změn v levé komoře a mírnějším nárůstem srdečního troponinu T v plazmě. Vedle dexrazoxanu se jedná o vůbec první studii, která demonstriuje kardioprotektivní účinek chelátoru železa na relevantním chronickém modelu antracyklinové kardiomyopatie. Tyto výsledky mimo jiné dokumentují významnou účast iontů železa na vzniku a rozvoji antracyklinové kardiotoxicity (Keizer 1990). Zvýšení dávky (na 2,5 násobek) však mělo za následek předčasný úhyn pokusných zvířat (50 %), který ovšem (vzhledem ke kumulativní dávce cytostatika, koncentracím troponinu T v plazmě před úhynem, výsledkům posmrtného ohledání a histologického vyšetření myokardu uhynulých zvířat) nesouvisel s poškozením myokardu. Přičinu úhynu nebylo možné z dostupných informací spolehlivě určit. Nicméně vzhledem k absenci výrazné orgánové toxicity po opakováném podání samotného chelátoru a dávkové závislosti úhynu při kombinaci s daunorubicinem by se mohlo jednat o potenciaci některého z toxických účinků daunorubicinu (např. hematotoxicity nebo nefrotoxicity, Herman 1988). Ještě překvapivější než pozorovaný předčasný úhyn však byla absence známek kardioprotekce u přežívajících zvířat, která

byla zřejmá jak z funkčního tak morfologického vyšetření levé komory. Toto pozorování není možné vysvětlit kvalitou zvířat nebo sezónními vlivy, neboť uvedené experimenty byly prováděny ve stejném časovém období a zvířata byla do skupin randomizována. Uvedená dávková závislost kardioprotektivního účinku se jevila jako neobvyklá a v literatuře dosud nebyla popsána (Minotti 2004, Wouters 2005). S ohledem na zvýšené hladiny troponinu T v plazmě pokusných zvířat po podávání samotné látky, ovšem nebylo možné vyloučit, že se jedná o specifickou vlastnost tohoto jediného chelátoru.

Pro další studium kardioprotektivních vlastností aroylhydrazonových chelátorů železa byl tedy vybrán strukturně odlišný analog salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (SIH), který reprezentuje odlišnou sérii nových analogů mateřské látky PIH (Buss 2002, Buss 2003). Tento analog byl v předcházejících experimentech vysoce účinný při ochraně srdečních buněk vůči modelovému oxidačnímu stresu navozenému *in vitro* pomocí peroxidu vodíku (Horackova 2000, Simunek 2005a). Tento chelátor, dovedl zabránit nejen oxidačnímu stresu navozené mitochondriální dysfunkci, ale nekrotické, jakož i apoptotické smrti srdečních buněk (Simunek 2005a). Předpokládá se, že tyto klíčové děje se též podílejí na patogenezi antracyklinové kardiotoxicity (Minotti 2004, Wallace 2003). Z pilotních experimentů, také vyplývalo, že SIH je účinnějším antioxidantem než PIH a jeho analog o-108 (nepublikované výsledky). Z těchto důvodů se SIH zdál být vhodným kandidátem pro další studium jako potenciální kardioprotektivum proti antracyklinové kardiotoxicitě. S ohledem na vyloučení možného vlivu pomalé či proměnlivé absorpcie na kardioprotektivní účinek nebo jeho dávkovou závislost bylo v tomto experimentu zvoleno intravenózní podání studované látky. Pro detailní popsání dávkové závislosti eventuálního kardioprotektivního účinku byly použity tři dávky chelátoru, které byly zvoleny s přihlédnutím k výsledkům předpokusů zaměřených na opakované podávání SIH a jeho kombinaci s daunorubicinem.

V obou nižších studovaných dávkách SIH působil kardioprotektivně se známkami zvyšování kardioprotektivního účinku v závislosti na dávce chelátoru. Zatímco v kombinační skupině s nejnižší studovanou dávkou SIH (0,5 mg/kg) došlo k jednomu předčasnemu úhynu, kterému předcházel pokles systolické funkce, při použití dvojnásobně vyšší dávky SIH již bylo dosaženo kompletního přežití. Ve skupině s nejnižší dávkou došlo nakonec u přežívajících zvířat k mírnému, ale signifikantnímu poklesu ejekční frakce. S užitím vyšší dávky nebyl v průběhu celého pokusu zaznamenán signifikantní pokles ejekční frakce a tyto hodnoty byly významně vyšší než v daunorubicinové skupině, což bylo prokázáno i v závěru experimentu pomocí katetrizačního vyšetření kontraktility levé komory. Morfologické vyšetření i hladiny troponinu T ve shodě naznačily sníženou progresi srdeční toxicity. Při dalším zvýšení dávky na 2,5 mg/kg, sice nebyly pozorovány známky extrakardiální toxicity (narozdíl od o-108), nicméně obdobně jako v pokusu s o-108 v podstatě vymizely známky kardioprotektivního účinku SIH.

Všechny dosud studované aroylhydrazonové chelátoru železa (o-108, SIH a do určité míry i dříve studovaný PIH, Simunek 2005b, Gersl 2004) tedy vykazují do značné míry paradoxní dávkovou závislost kardioprotektivního účinku a to bez ohledu na strukturu aroylhydrazonu, způsob podání a časový odstup od antracyklinu. Příčinu tohoto jevu nelze z provedených experimentů přímo určit, nicméně nabízí se několik možných hypotéz. V případě o-108 se jako podezřelé mohlo jevit zvýšení plazmatických hladin troponinu T po opakovaném podání samotného chelátoru. Nejenže tento jev nekorespondoval s dalšími kardiovaskulárními parametry, ale žádné známky podobného

účinku nebyly pozorovány u dalších studovaných aroylhydrazonů (SIH a PIJ) (Simunek 2001, Klimtova 2003), u kterých byla zjištěna obdobná dávková závislost kardioprotektivního účinku. Tento jev též nemůže souviset s proměnlivou absorpcí nebo biologickou dostupností chelátorů, protože SIH byl podáván intravenózně a odpověď na podávanou dávku byla obdobná jako u dalších aroylhydrazonů (o-108 a PIH podávaných i.p.). Ze studia farmakokinetiky aroylhydrazonových chelátorů železa též vyplynul poměrně značný rozdíl ve zdánlivém distribučním objemu mezi SIH a o-108, nicméně ani tento údaj evidentně neměl žádný vliv na kardioprotektivní účinek studovaných látek. Naproti tomu u obou chelátorů byl zjištěn mnohonásobně kratší biologický poločas než je udávaný pro antracykliny (Danesi 2002). Tento nepoměr by za určitých okolností mohl mít praktický dopad na kardioprotektivní účinek studovaných látek. Několikanásobně kratší biologický poločas je ovšem udávaný i u klinicky ověřeného kardioprotektiva dexrazoxanu (Hochster, 1998), takže tento fakt nemusí být hlavním problémem. Na druhou stranu je dexrazoxan je uvnitř buněk bioaktivován na aktivní metabolit (látku ADR-925), který je (narodíl od parentní látky) relativně značně hydrofilní a lze předpokládat, že by uvnitř srdečních buněk mohl setrvávat a účinkovat delší dobu. Tato vlastnost aroylhydrazonovým chelátorům chybí a není vyloučeno, že to může představovat i určitou limitaci z hlediska kardioprotektivního účinku těchto látek. Je tedy možné, že spíše než zvýšení dávky chelátoru by ke zlepšení kardioprotektivního přispělo prodloužení expozice myokardu nižším dávkám chelátoru. Toho by bylo možné dosáhnout podáváním chelátoru formou déle trvajících infuzí nebo optimalizací chemické struktury vedoucí k delšímu biologickému poločasu.

Jak již bylo diskutováno výše, antracykliny významným a velmi komplexním způsobem zasahují do buněčné homeostázy železa (Xu 2005). V nižších dávkách námi podávaných chelátorů může docházet k žádoucímu vyvážání omezeného množství volného železa přítomného v cytoplazmě kardiomyocytů a tím je navozen kardioprotektivní účinek. Vyšší dávky chelátoru, ačkoliv jsou dobře tolerovány samotné, by ale v kombinaci s daunorubicinem mohly do určité míry přispět k poruše jemně regulované homeostázy iontů železa v srdečních buňkách. I mírné prohloubení dysbalance buněčné homeostázy železa primárně navozené antracyklínou by pak, vzhledem k esenciálnímu významu tohoto prvku pro normální funkci kardiomyocytů, mohlo být zodpovědné za zvrat pozitivního kardioprotektivního účinku chelátoru. Jak bylo opakováno prokázáno *in vitro* i *in vivo*, tyto chelátory rychle pronikají buněčnými membránami a vyvazují volné ionty železa a určitou měrou je i mobilizují z buněk ven. V tomto ohledu je třeba vzít v potaz, že se chelatační účinek aroylhydrazonů může lišit od dexrazoxanu. Nástup intracelulární chelatace volných iontů železa patrně bude v případě dexrazoxanu spíše pozvolnější, neboť je zprostředkován látkou až ADR-925, která z dexrazoxanu vzniká postupnou enzymatickou bioaktivací. Eventuální zásah dexrazoxanu do homeostázy železa by tedy mohl být méně výrazný. Aroylhydrazonové chelátory mohou navíc také mobilizovat ionty železa ven z kardiomyocytů, zatímco v případě hydrofilního ADR-925 je spíše pravděpodobnější, že tato látka uvnitř buněk jen dočasně vyváže volné ionty železa, což nemusí nutně způsobit závažnější změny v celkovém bilanci tohoto prvku. Dále bylo nepřímo prokázáno, že mobilizace iontů železa prostřednictvím aroylhydrazonových chelátorů je do určité míry aktivní a tedy na energii závislý proces (Buss 2002). S přihlédnutím k tomuto poznatku, nelze vyloučit, že tento jev nabývá na významu při vyšších dávkách (koncentracích) chelátoru a ve svém důsledku by pro srdeční buňky mohl být i určitou metabolickou zátěží. Samotné antracykliny totiž výrazným negativním způsobem zasahují do aerobního energetického

metabolizmu srdečních buněk a významně snižují buněčné koncentrace ATP (Minotti 2004).

Prestože studované aroylhydrazonové chelátory železa byly schopny navodit signifikantní protekci vůči antracyklinové kardiotoxicitě, tento kardioprotektivní činek je ve srovnání s modelovým léčivem (dexrazoxanem) méně vyjádřen. Zatímco dexrazoxan na našem modelu dovedl v podstatě téměř kompletně ochránit myokard před vznikem chronické antracyklinové kardiotoxicity (Simunek 2004), v případě aroylhydrazonových chelátorů se jedná sice o významné zlepšení ve srovnání se samotnými antracykliny, ale protekce byla ve všech studovaných případech pouze částečná (přede vším s ohledem na nejcitlivější parametry jako je troponin T nebo histologické vyšetření). Na podkladě těchto zjištění se tedy nabízí otázka, zda-li je účinek dexrazoxanu dán pouze chelatací iontů železa (Hasinoff 1998, Minotti 2004) nebo se na kardioprotektivním účinku tohoto léčiva podílejí i další mechanizmy. Je totiž možné, že účinek aktivního metabolitu dexrazoxanu (látky ADR-925), který se strukturně podobá EDTA, se neomezuje pouze na ionty železa, ale určitou měrou může tato látka uvnitř buněk ovlivňovat i další vícemocné biogenické prvky (jako například vápník). Porucha buněčné homeostázy vápníku byla opakováně pozorována (Minotti 2004, Olson 2005) v souvislosti s kardiotoxickým působením antracyklinu a abnormální zastoupení tohoto prvku bylo také demonstrováno v této dizertační práci. Navíc kardioprotektivní účinek dexrazoxanu v našem pokusu evidentně souvisejí s absencí těchto patologických změn. Uvedená hypotéza by tedy znamenala, že dexrazoxan prostřednictvím chelatace iontů železa zabraňuje rozvoji daunorubicinem navozeného oxidačního stresu a zároveň též určitou měrou vyvazuje vápenaté ionty (v cytoplazmě a eventuálně v mitochondriích) a tímto mechanismem zabraňuje i patologické buněčné signalizaci spojené se zvýšenými koncentracemi kalcia. Dexrazoxanem navozená chelatace cytoplazmatického kalcia uvnitř kardiomyocytů by také za určitých okolností mohla vést k inhibici aktivity kalpainu a tím chránit myokard před závažným poškozením plynoucím z účinku této proteázy (Lim 2004).

Námi studované aroylhydrazonové chelátory železa mají za fyziologických podmínek narozdíl od látky ADR-925 zanedbatelnou afinitu k iontům vápníku. Protože bylo ale prokázáno, že jsou schopny navodit signifikantní kardioprotektivní účinek, je vysoko pravděpodobné, že ionty železa sehrávají v patogenezi antracyklinové kardiotoxicity významnou úlohu. Na základě dostupných údajů ovšem nelze vyloučit, že pro maximální kardioprotektivní účinek může být také důležitá intracelulární chelatace vápenatých iontů. Pro vyvrácení nebo potvrzení těchto hypotéz, stejně jako pro hlubší pochopení patogeneze antracyklinové kardiotoxicity a pro úspěšný vývoj nových účinných kardioprotektiv je tudíž nutné další studium zaměřené na látky chelatující ionty železa a popř. také vápníku. Nicméně lze doufat, že i námi získané výsledky mohou být určitým příspěvkem k dalšímu studiu jak mechanismů zodpovědných za rozvoj antracyklinové kardiotoxicity, tak i účinné kardioprotekce.

VI. Závěry

- Echokardiografické hodnocení plnění levé komory se narozdíl od stanovení plazmatických koncentrací troponinu T neukázalo být přínosné z hlediska časné detekce chronické daunorubicinové kardiotoxicity na experimentálním modelu.
- Bylo demonstrováno, že troponin T je vysoce citlivým biomarkerem antracyklinové kardiotoxicity, který si zaslhuje další pozornost.
- Antracyklinová kardiotoxicita je spojena se změnami koncentrací některých kovových prvků v myokardu levé komory (Ca, Mg, K), přičemž jiné (např. Fe) zůstávají nezměněny.
- Signifikantně zvýšené koncentrace vápníku v myokardu pokusných zvířat významně korelovaly s mírou systolické dysfunkce levé komory.
- Dexrazoxan dovedl spolehlivě zabránit nejen předčasnemu úhynu a srdeční dysfunkci navozené daunorubicinem, ale dovedl také zamezit i změnám v myokardiálním zastoupení kovových prvků.
- Opakované podávání nového aroylhydrazonového chelátoru železa o-108 se ukázalo být poměrně dobře snášeno a nebyla detekována žádná výrazná orgánová toxicita.
- Chelátory o-108 a SIH něměly negativní vliv na srdeční funkci ani morfologii, ačkoliv při vyšších dávkách o-108 byl stanoven signifikantní nárůst troponinu T.
- Pro zvýšené koncentrace troponinu T v plazmě nebyl nalezen žádý kardiovaskulární korelat a tento nález nebyl přítomen ani u dalších aroylhydrazonových chelátorů (SIH, PIH) studovaných za obdobných podmínek.
- Pilotní studium farmakokinetiky aroylhydrazonových chelátorů železa u králíka poukázalo mj. na rychlou distribuci, ale i eliminaci studovaných látek. Detailnější studium osudu těchto chelátorů v organismu ovšem vyžaduje citlivější analytickou metodu.
- Krátký plazmatický poločas se zdá být společnou vlastností aroylhydrazonových chelátorů železa a jeho příčiny a možnost optimalizace farmakokinetických vlastností těchto látek vyžadují další studium.
- Aroylhydrazonové chelátory železa (o-108 a SIH) jsou na experimentálním modelu schopny navodit signifikantní stupeň kardioprotekce vůči chronické antracyklinové kardiotoxicitě.
- Uvedený kardioprotektivní účinek ovšem vykazuje neobvyklou dávkovou závislost a to bez ohledu na chemickou strukturu aroylhydrazonových chelátorů a způsob jejich podání.
- Ačkoliv jsou aroylhydrazonové chelátory železa schopny navodit významný stupeň kardioprotekce, v porovnání s dexrazoxanem se jednalo pouze o částečnou ochranu myokardu před kardiotoxicitou daunorubicinu.
- Vzhledem k dosaženým výsledkům není vyloučeno, že pro plný kardioprotektivní účinek je významná nejen intracelulární chelatace iontů železa, ale potenciálně i dalších vicemocných biogenních prvků (např. kalcia).
- Hlubší poznání antracyklinové kardiotoxicity, vysvětlení dávkové závislosti kardioprotektivního účinku aroylhydrazonových chelátorů, jakož i eventuální úloha dalších kovů v patogenezi antracyklinové kardiotoxicity vyžaduje další studium.

VII. Literatura

- Aisen P, Enns C, Wessling-Resnick M. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001 Oct;33(10):940-59.
- Bhattacharya M., Ponka P., Hardy P., Hanna N., Varma D.R., Lachapelle P., Chemtob S., 1997. Prevention of postasphyxia electroretinal dysfunction with a pyridoxal hydrazone. *Free Radic. Bio. Med.* 22, 11-16.
- Blaha K, Cikrt M, Nerudova J, Ponka HF. Biliary iron excretion in rats following treatment with analogs of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone. *Blood.* 1998 Jun 1;91(11):4368-72.
- Bu'Lock FA, Mott MG, Oakhill A, Martin RP. Left ventricular diastolic filling patterns associated with progressive anthracycline-induced myocardial damage: A prospective study. *Pediatr Cardiol.* 1999 Jul-Aug;20(4):252-63.
- Bull DA, Bailey SH, Rentz JJ, Zebrack JS, Lee M, Litwin SE, Kim SW. Effect of Terplex/VEGF-165 gene therapy on left ventricular function and structure following myocardial infarction. VEGF gene therapy for myocardial infarction. *J Control Release.* 2003 Dec 5;93(2):175-81.
- Buss JL, Hermes-Lima M, Ponka P. Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and its analogues. *Adv Exp Med Biol.* 2002;509:205-29.
- Buss JL, Neuzil J, Gellert N, Weber C, Ponka P. Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone analogs induce apoptosis in hematopoietic cells due to their iron-chelating properties. *Biochem Pharmacol.* 2003 Jan 15;65(2):161-72.
- Cvetkovic RS, Scott LJ. Dexrazoxane: a review of its use for cardioprotection during anthracycline chemotherapy. *Drugs.* 2005;65(7):1005-24.
- Danesi R, Fogli S, Gennari A, Conte P, Del Tacca M. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of the anthracycline anticancer drugs. *Clin Pharmacokinet.* 2002; 41(6): 431-44.
- Derumeaux G, Mulder P, Richard V, Chagraoui A, Nafeh C, Bauer F, Henry JP, Thuillez C. Tissue Doppler imaging differentiates physiological from pathological pressure-overload left ventricular hypertrophy in rats. *Circulation.* 2002 Apr 2;105(13):1602-8.
- Dresdale AR, Barr LH, Bonow RO, Mathisen DJ, Myers CE, Schwartz DE, d'Angelo T. Prospective randomized study of the role of N-acetyl cysteine in reversing doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Am J Clin Oncol.* 1982 Dec;5(6):657-63.
- Elbl L et al., Poškození srdeč protinádorovou léčbou, Grada, Praha, 2002, 19-38.
- Ewer and Benjamin. Doxorubicin cardiotoxicity: Clinical Aspects, Recognition, Monitoring, Treatment and prevention in: Cancer and the Heart, Eds. Ewer MS and Yeh E. BC Decker Inc, Hamilton 2006, pp. 9-33.
- Ewer MS, Vooletich MT, Durand JB, Woods ML, Davis JR, Valero V, Lenihan DJ, 2005. Reversibility of trastuzumab-related cardiotoxicity: new insights based on clinical course and response to medical treatment. *J Clin Oncol.* 23, 7820-26
- Gersl V, Hrdina R. Noninvasive polygraphic cardiac changes in daunorubicin-induced cardiomyopathy in rabbits. *Sb Ved Pr Lek Fak Karlovy Univerzity Hradci Kralove.* 1994;37(2):49-55.
- Gersl V, Sterba M, Simunek T, Kaplanova J, Adamcova M, Klimtova I, Cermakova E, and Mazurova Y. Study of the effects of PIH in daunorubicin-induced cardiomyopathy in rabbits. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004 31:A197.

- Hasinoff BB, Hellmann K, Herman EH, Ferrans VJ. Chemical, biological and clinical aspects of dextrazoxane and other bisdioxopiperazines. *Curr Med Chem.* 1998 Feb;5(1):1-28.
- Hasinoff BB, Patel D, Wu X. The oral iron chelator ICL670A (deferasirox) does not protect myocytes against doxorubicin. *Free Radic Biol Med.* 2003 Dec 1;35(11):1469-79.
- Herman EH, el-Hage A, Ferrans VJ. Protective effect of ICRF-187 on doxorubicin-induced cardiac and renal toxicity in spontaneously hypertensive (SHR) and normotensive (WKY) rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1988 Jan;92(1):42-53.
- Herman EH, Ferrans VJ, Myers CE, Van Vleet JF. Comparison of the effectiveness of (+/-)-1,2-bis(3,5-dioxopiperazinyl-1-yl)propane (ICRF-187) and N-acetylcysteine in preventing chronic doxorubicin cardiotoxicity in beagles. *Cancer Res.* 1985 Jan;45(1):276-81.
- Herman EH, Zhang J, Ferrans VJ. Comparison of the protective effects of desferrioxamine and ICRF-187 against doxorubicin-induced toxicity in spontaneously hypertensive rats. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1994;35(2):93-100.
- Hoit BD, Khouri SF, Kranias EG, Ball N, Walsh RA. In vivo echocardiographic detection of enhanced left ventricular function in gene-targeted mice with phospholamban deficiency. *Circ Res.* 1995 Sep;77(3):632-7.
- Hochster H, Liebes L, Wadler S, Oratz R, Wernz JC, Meyers M, Green M, Blum RH, Speyer JL. Pharmacokinetics of the cardioprotector ADR-529 (ICRF-187) in escalating doses combined with fixed-dose doxorubicin. *J Natl Cancer Inst.* 1992 Nov 18;84(22):1725-30.
- Horackova M, Ponka P, Byczko Z. The antioxidant effects of a novel iron chelator salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone in the prevention of H₂O₂ injury in adult cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 2000 Aug 18;47(3):529-36.
- Hoy T, Humphrys J, Jacobs A, Williams A, Ponka P. Effective iron chelation following oral administration of an isoniazid-pyridoxal hydrazone. *Br J Haematol.* 1979 Nov;43(3):443-9.
- Chaves AA, Weinstein DM, Bauer JA. Non-invasive echocardiographic studies in mice: influence of anesthetic regimen. *Life Sci.* 2001 Jun 1;69(2):213-22.
- Kalinowski DS, Richardson DR. The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. *Pharmacol Rev.* 2005 Dec;57(4):547-83.
- Keizer HG, Pinedo HM, Schuurhuis GJ, Joenje H. Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmacol Ther.* 1990;47(2): 219-31.
- Kerkela R, Grazette L, Yacobi R, Iliescu C, Patten R, Beahm C, Walters B, Shevtsov S, Pesant S, Clubb FJ, Rosenzweig A, Salomon RN, Van Etten RA, Alroy J, Durand JB, Force T. Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate. *Nat Med.* 2006 Aug;12(8): 908-16.
- Kotamraju S, Chitambar CR, Kalivendi SV, Joseph J, Kalyanaraman B. Transferrin receptor-dependent iron uptake is responsible for doxorubicin-mediated apoptosis in endothelial cells: role of oxidant-induced iron signaling in apoptosis. *J Biol Chem.* 2002 May 10;277(19):17179-87.
- Klimtova I, Simunek T, Mazurova Y, Kaplanova J, Sterba M, Hrdina R, Gersl V, Adamcova M, Ponka P. A study of potential toxic effects after repeated 10-week administration of a new iron chelator-salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH) to rabbits. *Acta Medica (Hradec Kralove).* 2003;46(4):163-70.
- Legha SS, Wang YM, Mackay B, Ewer M, Hortobagyi GN, Benjamin RS, Ali MK. Clinical and pharmacologic investigation of the effects of alpha-tocopherol on adriamycin cardiotoxicity. *Ann N Y Acad Sci.* 1982;393:411-8.

- Lim CC, Zuppinger C, Guo X, Kuster GM, Helmes M, Eppenberger HM, Suter TM, Liao R, Sawyer DB. Anthracyclines induce calpain-dependent titin proteolysis and necrosis in cardiomyocytes. *Biol Chem.* 2004 Feb 27;279(9):8290-9.
- Link G, Ponka P, Konijn AM, Breuer W, Cabantchik ZI, Hershko C. Effects of combined chelation treatment with pyridoxal isonicotinoyl hydrazone analogs and deferoxamine in hypertransfused rats and in iron-loaded rat heart cells. *Blood* 2003 May 15;101(10):4172-9.
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev.* 2004 Jun;56(2):185-229.
- Myers C, Bonow R, Palmeri S, Jenkins J, Corden B, Locker G, Doroshow J, Epstein S. A randomized controlled trial assessing the prevention of doxorubicin cardiomyopathy by N-acetylcysteine. *Semin Oncol.* 1983 Mar;10(1 Suppl 1):53-5.
- Nagueh SF, Kopelen HA, Lim DS, Zoghbi WA, Quinones MA, Roberts R, Marian AJ. Tissue Doppler imaging consistently detects myocardial contraction and relaxation abnormalities, irrespective of cardiac hypertrophy, in a transgenic rabbit model of human hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation.* 2000 Sep 19;102(12):1346-50.
- Nagy AC, Tolnay E, Nagykalnai T, Forster T. Cardiotoxicity of anthracycline in young breast cancer female patients: the possibility of detection of early cardiotoxicity by TDI. *Neoplasma.* 2006;53(6):511-7.
- Olson RD, Gamblie HA, Vestal RE, Shadle SE, Charlier HA Jr, Cusack BJ. Doxorubicin cardiac dysfunction: effects on calcium regulatory proteins, sarcoplasmic reticulum, and triiodothyronine. *Cardiovasc Toxicol.* 2005;5(3):269-83.
- O'Brien PJ. Blood cardiac troponin in toxic myocardial injury: Archetype of a translational safety biomarker. *Expert Rev Mol Diagn.* 2006 Sep;6(5):685-702.
- Pennock GD, Yun DD, Agarwal PG, Spooner PH, Goldman S. Echocardiographic changes after myocardial infarction in a model of left ventricular diastolic dysfunction. *Am J Physiol.* 1997 Oct;273(4 Pt 2):H2018-29.
- Richardson DR, Ponka P. Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and its analogs: potential orally effective iron-chelating agents for the treatment of iron overload disease. *J Lab Clin Med.* 1998 Apr;131(4):306-15.
- Richardson DR, Tran EH, Ponka P. The potential of iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class as effective antiproliferative agents. *Blood.* 1995 Dec 1;86(11):4295-306.
- Rungwerth K, Schindler U, Gerl M, Schafer S, Licher T, Busch AE, Ruetten H. Inhibition of Na⁺-H⁺ exchange by cariporide reduces inflammation and heart failure in rabbits with myocardial infarction. *Br J Pharmacol.* 2004 Aug;142(7):1147-54.
- Shan K, Lincoff AM, Young JB. Anthracycline-induced cardiotoxicity. *Ann Intern Med.* 1996 Jul 1;125(1):47-58.
- Simunek T, Boer C, Bouwman RA, Vlasblom R, Versteilen AM, Sterba M, Gersl V, Hrdina R, Ponka P, de Lange JJ, Paulus WJ, Musters RJ. SIH -a novel lipophilic iron chelator-protects H9c2 cardiomyoblasts from oxidative stress-induced mitochondrial injury and cell death. *J Mol Cell Cardiol.* 2005 Aug;39(2):345-54.
- Simunek T, Klimtova I, Adamcova M, Gersl V, Hrdina R, Sterba M, Kaplanova J, Mazurova. Cardiac troponin T as an indicator of reduced left ventricular contractility in experimental

- anthracycline-induced cardiomyopathy. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2003 Nov;52(5):431-4.
- Simunek T., Klimtova I., Hrdina R., Gersl V., Mazurova Y., Machackova J., Ponka P., Holeckova M. The effects of repeated administration of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone on cardiovascular system in rabbits. *Biomarkers and Environment* 2001; 4 (Suppl. 1): 93-97.
- Simunek T, Klimtova I, Kaplanova J, Mazurova Y, Adamcova M, Gersl V, Hrdina R, Sterba M, Hrdina R., Gersl V. Rabbit model for in vitro study of anthracycline-induced heart failure and for the evaluation of protective agenets. *Eur J Heart Fail.* 2004 Jun;6(4):377-387.
- Stympmann J, Engelen MA, Breithardt AK, Milberg P, Rothenburger M, Breithardt OA, Breithardt G, Eckardt L, Cordula PN. Doppler echocardiography and tissue Doppler imaging in the healthy rabbit: differences of cardiac function during awake and anaesthetised examination. *Int J Cardiol.* 2007 Feb 7;115(2):164-70.
- Suter TM, Meier B. Detection of anthracycline-induced cardiotoxicity: is there light at the end of the tunnel? *Ann Oncol.* 2002 May;13(5):647-9.
- Swain SM, Vici P. The current and future role of dextrazoxane as a cardioprotectant in anthracycline treatment: expert panel review. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2004 Jan;130(1):1-7.
- Tassan-Mangina S, Codorean D, Metivier M, Costa B, Himberlin C, Jouannaud C, Blaise AM, Elaerts J, Nazyeyrolles P. Tissue 'Doppler' imaging and conventional echocardiography after anthracycline treatment in adults: early and late alterations of left ventricular function during a prospective study. *Eur J Echocardiogr.* 2006 Mar;7(2):141-6.
- Tjeerdsma G, Meinardi MT, van Der Graaf WT, van Den Berg MP, Mulder NH, Crijns HJ, de Vries EG, van Veldhuisen DJ. Early detection of anthracycline induced cardiotoxicity in asymptomatic patients with normal left ventricular systolic function: autonomic versus echocardiographic variables. *Heart.* 1999 Apr;81(4):419-23.
- Van Vleet and V.J. Ferrans , Evaluation of vitamin E and selenium protection against chronic adriamycin toxicity in rabbits. *Cancer Treat. Rep.* 1980a, 64: 315-17.
- Von Hoff DD, Layard MW, Basa P, Davis HL Jr, Von Hoff AL, Rozencweig M, Muggia FM. Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. *Ann Intern Med.* 1979 Nov;91(5):710-7.
- Wallace KB. Doxorubicin-induced cardiac mitochondrionopathy. *Pharmacol Toxicol.* 2003 Sep;93(3):105-15.
- Xu X, Persson HL, Richardson DR. Molecular Pharmacology of the Interaction of Anthracyclines with Iron. *Mol. Pharmacol.* 2005, 68, 261-271.
- Xu LJ, Jin L, Pan H, Zhang AZ, Wei G, Li PP, Lu WY. Deferiprone protects the isolated atria from cardiotoxicity induced by doxorubicin. *Acta Pharmacol Sin.* 2006 Oct;27(10):1333-9.
- Young MS, Magid NM, Wallerson DC, Godwit RS, Devereux RB, Carter JN, Im J, Hall MA, Borer JS. Echocardiographic left ventricular mass measurement in small animals: anatomic validation in normal and aortic regurgitant rabbits. *American Journal of Noninvasive Cardiology* 4: 145 - 153, 1990.

VIII. Souhrn

V této dizertační práci byly studovány: 1/ možnosti časné detekce antracyklinové kardiotoxicity pomocí echokardiografický hodnocení diastolické funkce a biochemického markeru troponinu T na experimentálním modelu u králíka, 2/ změny v zastoupení vybraných kovových prvků v myokardu levé komory zvířat s navozenou antracyklinovou kardiotoxicitou a kardioprotekcí pomocí dexametasonu, 3/ bezpečnost a eventuální toxicita opakovaného podání nových aroylhydrazonových chelátorů železa - pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazonu (o-108) a salicylaldehyd isonicotinoyl hydrazonu (SIH), 4/ farmakokinetika obou chelátorů železa po jednorázovém intravenózním podání králíkům v pilotním experimentu, 5/ potenciálně kardioprotektivní účinky o-108 a SIH na modelu daunorubicinem indukované chronické kardiotoxicity u králíka, včetně dávkové závislosti.

Bylo zjištěno, že Dopplerovské hodnocení levé komory u králíka je poměrně technicky náročné vzhledem k relativně vysoké fyziologické srdeční frekvenci u králíka. Kvalitní hodnocení všech standardních parametrů bylo možné pouze v kombinované anestézii obsahující xylazin. Tento echografický přístup narozdíl od citlivějšího katetrizačního vyšetření nebyl schopen odhalit diastolickou dysfunkci navozenou daunorubicinem, přičemž tento fakt může souviseť s hemodynamickými účinky xylazinu. Srdeční troponin T se narozdíl od náročného echografického vyšetření ukázal být vhodným a citlivým biomarkerem chronické antracyklinové kardiotoxicity. Signifikantní elevace troponinu T byly naměřeny již před polovinou experimentu v nízké kumulativní dávce daunorubicinu (200 mg/m^2) a koncentrace progresivně stoupaly až do konce experimentu.

V další části práce bylo zjištěno, že antracyklinová kardiotoxicita je spojena se signifikantními změnami v koncentracích vybraných kovových prvků v myokardu levé komory. Jedním z nejvýznamnějších nálezů se ukázalo být signifikantní zvýšení myokardiálních koncentrací vápníku, přičemž tento nález jako jediný významně koreloval s katetrizačně hodnocenou systolickou dysfunkcí levé komory. Modelové kardioprotективum dexametason dovedlo zamezit nejen předčasnemu úhynu a systolické srdeční dysfunkci, ale i změnám v zastoupení kovových prvků v levé komoře. Opakování podání daunorubicinu ani jeho kombinace s dexametasonem neměla vliv na myokardiální koncentrace iontů železa.

Opakování podávání nových chelátorů železa o-108 a SIH nebylo spojeno s výraznou orgánovou toxicitou ani změnami funkčních kardiovaskulárních parametrů. Nebyly pozorovány známky sideropenie, anémie nebo jiných změn v krevním obrazu. Pozorované změny biochemických parametrů byly převážně mírné, nevykazovaly dávkovou závislost, což odpovídá absenci významných změn v morfologii studovaných orgánů (např. játra, ledviny). Ve skupině s vyšší dávkou o-108 byly stanoveny zvýšené koncentrace troponinu T, nicméně k tomu nebyl nalezen žádný morfologický nebo funkční korelat.

Pilotní studium farmakokinetiky aroylhydrazonových chelátorů železa po intravenózním podání u králíka odhalilo poměrně rychlou distribuci, ale i eliminaci obou chelátorů. Maximální koncentrace chelátoru přepočtené na ekvimolární dávku byly u o-108 oproti SIH více jak čtyřnásobně vyšší, zatímco distribuční objem o-108 byl stejným poměrem nižší. U obou chelátorů byl zjištěn relativně krátký biologický poločas eliminace. Detailnější studium farmakokinetiky stejně tak jako příčiny krátkého

biologického poločasu, jakož i možnost jejich cíleného ovlivnění vyžadují ještě citlivější analytickou metodu a další podrobné studium.

V poslední části této práce bylo zjištěno, že jak o-108 tak SIH kompletně zabraňují daunorubicinem navozenému předčasnemu úhynu pokusných zvířat a zabránit rozvoji systolické srdeční dysfunkce. Tyto látky též významně snížily intenzitu a progresi morfologických změn navozených daunorubicinem, jakož i vzestup koncentraci troponinu T. Při 2,5 násobném zvýšení dávky o-108 se vyskytla zatím blíže neurčená toxicita nesouvisející s poškozením myokardu. Překvapivě ale v této skupině u přežívajících zvířat nebyly zaznamenány žádné známky kardioprotekce. Obdobně také v nejvyšší dávce chelátoru SIH, který byl narozdíl od o-108 podáván i.v., nebyly zjištěny žádné kardioprotektivní účinky. Oba chelátory tedy bez evidentního vztahu k chemické struktuře a způsobu podání byly schopny navodit signifikantní kardioprotekci proti antracyklinové kardiotoxicitě, nicméně jejich neobvyklá dávková závislost, stejně jako mechanizmy za ni zodpovědné, vyžadují další studium.

IX. Summary

In this Ph.D. thesis, following aims were addressed: 1/ early detection of anthracycline cardiotoxicity on the experimental rabbit model using echocardiographically examined diastolic function and biomarker troponin T, 2/ changes in concentrations of selected metals in the left ventricular myocardium of animals with experimentally induced anthracycline cardiotoxicity and dexrazoxane afforded cardioprotection, 3/ safety and possible toxicity of repeated administration of novel arylhydrazone chelators – pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone (*o*-108) and salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH), 4/ pharmacokinetics of both iron chelators after single dose i.v. administration to rabbits 5/ potentially cardioprotective effects of *o*-108 and SIH on the model of daunorubicin-induced chronic cardiotoxicity in rabbits including the dose response relationships.

It was revealed that Doppler evaluation of the left ventricular filling is technically demanding with respect to the relatively high heart rate which is physiological in rabbits. High quality evaluation of all standard parameters was feasible only in the combined anaesthesia containing xylazin. In contrast to more sensitive examination of the left ventricular diastolic function performed via catheterisation measurement this echocardiographic approach was unable to identify diastolic dysfunction induced by daunorubicin. This fact might be related to the haemodynamic effects of xylazin. Unlike complicated echographic examination, cardiac troponin T was shown as useful and sensitive biomarker of chronic anthracycline cardiotoxicity. Significant elevation of troponin T was determined even before the middle of the study, i.e., at the low cumulative dose of daunorubicin (200 mg/m^2) and concentrations were progressively increasing until the end of the experiment.

Furthermore, it was revealed that anthracycline cardiotoxicity is associated with significant changes in concentration of selected metals in the left ventricular myocardium. One of the most significant findings was the increase in myocardial calcium concentrations. This was the only finding which significantly correlated with the left ventricular dysfunction. Model cardioprotectant dexrazoxane was able not only to prevent the premature mortality and systolic dysfunction but also changes in metal concentrations in the left ventricle. Repeated administration of neither daunorubicin nor its combination with dexrazoxane had no impact on myocardial total iron levels.

Repeated administration of novel iron chelators (*o*-108 and SIH) was not associated with the significant organ toxicity or changes in functional cardiovascular parameters. No signs of sideropenia, anaemia or blood count changes were observed. The changes in biochemical parameters were mostly mild, without dose-response relationship which corresponded with the absence of distinct changes in morphology of studied organs (e.g., liver, kidney). In the group with the highest dose of *o*-108, the increased concentrations of troponin T were determined, however, no functional or morphological correlate was found.

Pilot study of pharmacokinetics of arylhydrazone iron chelators after i.v. single dose administration in rabbits revealed quite rapid distribution as well as elimination of both chelators under study. In the equimolar dose, maximum concentrations of the chelator were more than four times higher in the *o*-108, whereas volume of distribution of this chelator was in the same ratio lower than in SIH. In both chelators, relatively short biological half-life of elimination was observed. More detailed study of pharmacokinetics

and reason of their short biological half-lives as well as the possibility to optimize them through targeted modification of the chemical structure deserve more sensitive analytical methods and further study.

In the final part of this thesis it was revealed that both chelators o-108 and SIH are able to completely prevent the premature mortality and significantly mitigated left ventricular dysfunction induced by daunorubicin. Both chelators also decreased the progression and intensity of morphological signs of daunorubicin cardiotoxicity as well as plasma troponin T raise. However, using 2,5-fold higher dose, an unknown toxicity (unrelated to the myocardial damage) appeared. Surprisingly, in the surviving animals no cardioprotection was observed. Analogically, in the case of SIH, which was administered i.v. (in contrast to o-108), no cardioprotective effects were detectable in the highest studied dose. Both chelators, irrespectively to their chemical structures or routes of administration, were able to afford significant cardioprotection against chronic anthracycline cardiotoxicity. Nevertheless, unusual dose-dependence and mechanisms involved in this observation merit further study.

X. Strukturovaný přehled publikací činnosti

A) Původní práce in extenso v recenzovaných odborných časopisech (celkem 17, z toho 11 s IF)

Štěrba M, Popelová O, Šimůnek T, Mazurová Y, Potáčová A, Adamcová M, Gunčová I, Kaiserová H, Palička V, Poňka P, Geršl V. Iron chelation-afforded cardioprotection against chronic anthracycline cardiotoxicity: a study of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH). TOXICOLOGY 2007. Accepted 13. 3. 2007. In press.

Štěrba M, Šimůnek T, Popelová O, Potáčová A, Adamcová M, Mazurová Y, Holečková M, Geršl V. Early detection of anthracycline cardiotoxicity in a rabbit model: left ventricle filling pattern versus troponin T determination. PHYSIOL RES. 2007. Accepted 27. 9. 2006. In Press.

Štěrba M, Popelová O, Šimůnek T, Mazurová Y, Potáčová A, Adamcová M, Kaiserová H, Poňka P, Geršl V. Cardioprotective effects of a novel iron chelator, pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone, in the rabbit model of daunorubicin-induced cardiotoxicity. J PHARMACOL EXP THER. 2006 Dec;319(3):1336-47.

Štěrba M, Šimůnek T, Mazurová Y, Adamcová M, Popelová O, Kaplanová J, Poňka P, Geršl V. Safety and tolerability of repeated administration of pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone in rabbits. HUM EXP TOXICOL. 2005 Nov;24(11):581-9.

Štěrba M, Šimůnek T, Mazurová Y, Popelová O, Adamcová M, Poňka P, Geršl V. Study of organ toxicity of repeated administration of novel iron chelator o-108 in rabbits. BIOMARKERS ENVIRONMENT. 2004;5(5):40-2.

Štěrba M, Kaplanová J, Šimůnek T, Klimtová I, Mazurová Y, Adamcová M, Čermáková E, Hrdina R, Geršl V, Poňka P. The effects of iron chelators (pyridoxal isonicotinoyl hydrazone, salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone) on selected parameters in rabbits. BIOMARKERS ENVIRONMENT. Suppl 1, 10-13, 2003.

Šimůnek T, **Štěrba M**, Holečková M, Kaplanová J, Klimtová I, Adamcová M, Geršl V, Hrdina R. Myocardial content of selected elements in experimental anthracycline-induced cardiomyopathy in rabbits. BIOMETALS. 2005 Apr;18(2):163-9.

Adamcová M, **Štěrba M**, Klimtová I, Šimůnek T, Hrdina R, Geršl V, Poňka P. Cardiac troponins following repeated administration of an iron chelator-salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH)-in rabbits. ACTA MEDICA (HRADEC KRALOVE). 2003;46(4):171-4.

Šimůnek T, **Štěrba M**, Popelová O, Hrdina R, Poňka P, Geršl V. Iron chelation for protection against oxidative stress-induced myocardial injury. BIOMARKERS ENVIRONMENT. 2004; 5(5):35-37.

Kovaříková P, Klimeš J, **Štěrba M**, Popelová O, Geršl V, Poňka P. HPLC determination of novel aryl hydrazone iron chelator (o-108) in rabbit plasma and its application to a pilot pharmacokinetic study. J. CHROM B ANALYT TECHNOL BIOMED LIFE SCI. 2006 Jul 11;838(2):107-12.

Kovaříková P, Klimeš J, **Štěrba M**, Popelová O, Mokré M, Geršl V, Poňka P. Development of high-performance liquid chromatographic determination of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone in rabbit plasma and the application of this method to an in vivo study. J. SEP. SCI. 2005 Aug;28(12):1300-6.

Šimůnek T, Klimtová I, Kaplanová J, **Štěrba M**, Mazurová Y, Adamcová M, Hrdina R, Geršl V, Poňka P. Study of daunorubicin cardiotoxicity prevention with pyridoxal isonicotinoyl hydrazone in rabbits. PHARMACOL RES. 2005 Mar;51(3):223-31.

Adamcová M, Potáčová A, Čajnáková H, Hrbatová L, **Štěrba M**, Popelová O, Šimůnek T, Poňka P,

Geršl V. Evaluation od ECG time intervals in a rabbit model of anthracycline-induced anthracycline-induced cardiomyopathy: a useful tool for assessment of cardioprotective agents. PHYSIOL RES. 2007, In Press.

Klimtová I, Šimůnek T, Mazurová Y, Kaplanová J, Štěrba M, Hrdina R, Geršl V, Adamcová M, Poňka P. A study of potential toxic effects after repeated 10-week administration of a new iron chelator--salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH) to rabbits. ACTA MEDICA (HRADEC KRALOVE). 2003;46(4):163-70.

Šimůnek T, Klimtová I, Kaplanová J, Mazurová Y, Adamcová M, Štěrba M, Hrdina R, Geršl V. Rabbit model for in vitro study of anthracycline-induced heart failure and for the evaluation of protective agents. EUR J HEART FAIL. 2004 Jun;6(4):377-87.

Šimůnek T, Boer C, Bouwman RA, Vlasblom R, Versteilen AM, Štěrba M, Geršl V, Hrdina R, Poňka P, de Lange JJ, Paulus WI, Musters RJ. SIH - a novel lipophilic iron chelator - protects H9c2 cardiomyoblasts from oxidative stress-induced mitochondrial injury and cell death. J MOL CELL CARDIOL. 2005 Aug;39(2):345-54.

Šimůnek T, Klimtová I, Adamcová M, Geršl V, Hrdina R, Štěrba M, Kaplanová J, Mazurová Y. Cardiac troponin T as an indicator of reduced left ventricular contractility in experimental anthracycline-induced cardiomyopathy. CANCER CHEMOTHER PHARMACOL. 2003 Nov;52(5):431-4.

Manuskripty t.č. v recenzním řízení (2)

Šimůnek T, Štěrba M, Popelová O, Kaiserová H, Potáčová A, Adamcová M, Mazurová Y, Poňka P, Geršl V. Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) and its analogs protectants against anthracycline-induced cardiotoxicity. HEAMOGLOBIN.

Kaiserová H, Šimůnek T, Štěrba M, den Hartog GJM, Schröterová L, Popelová O, Geršl V, Kvasničková E, Bast A. New iron chelators in anthracycline-induced cardiotoxicity. CARDIOVASC. TOXICOLOGY.

B) Přehledové publikace (3 z toho 1 v časopise s IF)

Adamcová M, Štěrba M, Šimůnek T, Potáčová A, Popelová O, Geršl V. Regulatory proteins of the myocardium and heart failure. EUR J HEART FAIL. 2006 Jun;8(4):333-42.

Adamcová M, Štěrba M, Šimůnek T, Potáčová A, Popelová O, Mazurová Y, Geršl V. Troponin as a marker of myocardial damage in drug-induced cardiotoxicity. EXPERT OPIN DRUG SAF. 2005;4(3):457-72.

Potáčová A, Adamcová M, Štěrba M, Popelová O, Geršl V. Role matrixových metaloproteináz při srdečním selhání. ČS.FYZIOL. 2005;54(4):168-175.

C) Studijní texty (1)

Geršl V, Štěrba M. Vegetativní nervový systém (4 kapitoly) - Fendrich et al. Farmakologie pro farmaceuty II, t.č. v tisku.

D) Abstrakty (39)

Štěrba M, Lenčo J, Pavková I, Studničková K, Geršl V. Aplikace proteomické analýzy do studia antracyklinem-indukované kardiomyopatie na experimentálním modelu. X. Vědecká konference LF a FN HK, Hradec Králové, 25. 1. 2006. Sborník abstraktů z konference str. 67.

Štěrba M, Popelová O, Šimůnek T, Mazurová Y, Potáčová A, Adamcová M, Kaiserová H, Poňka P,

Geršl V. Pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazon jako kardioprotektívum u antracykliny indukované kardiotoxicity. 56. Farmakologické dny. Bratislava 6.-8. 9. 2006, Slovenská republika. Sborník abstraktů z konference str. 28.

Štěrba M, Kaplanová J, Popelová O, Adamcová M, Mazurová Y, Šimůnek T, Čermáková E, Geršl V, Poňka P. Study of potential cardioprotective effects of a novel group of aroylhydrazone iron chelators in daunorubicin cardiotoxicity in rabbits. ACTA MEDICA (HRADEC KRÁLOVÉ). 2005; 48(2):117.

Štěrba M, Šimůnek T, Popelová O, Geršl V. Echografické hodnocení diastolické funkce u králíka – nástroj pro časnou detekci chronické kardiotoxicity daunorubicinu na experimentálním modelu? XXXIII. Den mladých kardiologů ČKS. Praha, 6. 5. 2005. Sborník abstraktů z konference str. 18.

Štěrba M, Popelová O, Kovaříková P, Šimůnek T, Vávrová K, Poňka P, Geršl V: Pilot study on plasma pharmacokinetics of a novel iron chelator salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone. 1st Congress of the International Biology Society, Praha (BIOIRON 2005), ČR, May 22-26, 2005; P237. Sborník abstraktů z konference str. 98.

Štěrba M, Popelová O, Šimůnek T, Adamcová M, Geršl V: Study on prediction of anthracycline-induced heart failure using doppler evaluation of left ventricular filling. J MOL CELL CARDIOL. 2005; 38(6):1070.

Štěrba M, Popelová O, Šimůnek T, Potáčová A, Adamcová M, Mazurová Y, Poňka P, Geršl V: Studium nových potenciálně kardioprotektivních chelátorů železa na modelu daunorubicinem indukované chronické kardiomyopatie u králíka. ČS. FYZIOL. 2005; 54(4):213.

Štěrba M, Šimůnek T, Kaplanová J, Adamcová M, Mazurová Y, Geršl V. Otázka časné predikce antracyklinové kardiomyopatie na experimentálním in vivo modelu. FOLIA PHOENIX 2005, suppl. 1:38.

Štěrba M, Adamcová M, Mazurová Y, Šimůnek T, Kaplanová J, Geršl V, Ponka P. A study of repeated 10 week administration of new iron chelating agent (pyridoxal o-chlorobenzoyl hydrazone) in rabbits in vivo. FUNDAM. CLIN. PHARMACOL. 2004; 14 (1 suppl):117.

Štěrba M, Šimůnek T, Mazurová Y, Adamcová M, Kaplanová J, Čermáková E, Geršl V, Ponka P. Tolerability study of repeated administration of pyridoxal o-chlorobenzoyl hydrazone (a novel iron chelator) in rabbits. 7th International Symposium on Chelating Agents in Biomedicine, Toxicology and Therapeutic, Plzeň, 3. - 8. 7. 2004. 2004; 8(2):60.

Štěrba M, Klimtová I, Šimůnek T, Kaplanová J, Adamcová M, Mazurová Y, Ponka P, Geršl V. Otázka kardioprotektivního působení PIH (pyridoxal isonicotinoyl hydrazone) i antracyklinové kardiomyopatie u králíků in vivo. ČS. FYZIOL 2003;52:A24.

Štěrba M, Kaplanová J, Šimůnek T, Klimtová I, Mazurová Y, Adamcová M, Čermáková E, Hrdina R, Geršl V, Poňka P. The effects of iron chelators (pyridoxal isonicotinoyl hydrazone, salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone) on selected parameters in rabbits BIOMARKERS AND ENVIROMENT. SUPP 2003; 1:10-13.

Lenčo J, Štěrba M, Brychta M, Mazurová Y, Popelová O, Geršl V and Stulík J. Proteomic analysis in the study of anthracycline-induced cardiomyopathy. MOL CEL PROTEOMICS 2006, 5 (10 supp.), S83.

Šimůnek T, Štěrba M, Popelová O, Kaiserová H, Potáčová A, Adamcová M, Mazurová Y, Poňka P, Geršl V. Assessent of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) and its analogs as cardioprotectans in anthracycline-induced cardiomyopathy. 16th International conference on Chelators (ICOC). October 25-31, 2006, Limassol, Cyprus, Abstract book p.53.

Popelová O, Štěrba M, Potáčová A, Šimůnek T, Adamcová M, Mazurová Y, Poňka P, Geršl V. Iron chelation as promising strategy of cardioprotection against anthracycline-induced cardiotoxicity. France - New EU members 7th meeting, New Frontiers in Cardiovascular Research, Debrecen 5th - 8th October 2006, Hungary. Abstract book p. 80.

Popelová O, Štěrba M, Kovaříková P, Šimůnek T, Vávrová K, Poňka P, Geršl V. pilotní studie farmakokinetiky salicylaldehyd isonicotinoyl hydrazonu a pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazonu. 56. Farmakologické dny. Bratislava 6.-8. 9. 2006, Slovenská republika. Sborník abstraktů z konference str. 28.

Popelová O, Štěrba M, Kovaříková P, Adamcová M, Mazurová Y, Kaplanová J, Šimůnek T, Poňka P, Geršl V: Study of potential cardioprotective effects of a novel iron chelator (pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone; o-108) in daunorubicin cardiotoxicity in rabbits. X. Vědecká konference LF a FN HK, Hradec Králové, 24. 4. 2006. Sborník abstraktů z konference.

Šimůnek T, Štěrba M, Klimentová I, Kaplanová J, Popelová O, Adamcová M, Mazurová Y, Hrdina R, Geršl V: Model srdečního selhání navozeného opakovou aplikací antracyklinů u králíka. COR VASA. 2005; 47(9):K143.

Šimůnek T, Štěrba M, Klimentová I, Kaplanová J, Popelová O, Adamcová M, Mazurová Y, Hrdina R, Geršl V: Model srdečního selhání navozeného opakovou aplikací antracyklinů u králíka. XXXI. Den mladých kardiologů. Praha, ČR, 28. 6. 2005;16-17. Sborník abstraktů z konference str. 89.

Šimůnek T, Štěrba M, Popelová O, Boer C, Musters RJP, Poňka P, Geršl V. Iron chelation for protection against oxidative stress-induced myocardial injury. Ist Congress of the International Biology Society (BIOIRON 2005), Praha, 22. - 27. 5. 2005. Sborník abstraktu z konference str. 89.

Adamcová M, Štěrba M, Šimůnek T, Potáčová A, Popelová O, Mazurová Y, Geršl V: Cardiac troponins as markers of myocardial damage in experimental studies. J MOL CELL CARDIOL. 2005; 38(6):1000.

Šimůnek T, Štěrba M, Popelová O, Adamcová M, Holečková M, Geršl V: Treatment with dextrazoxane (ICRF-187) reduces myocardial calcium overload in the experimental anthracycline-induced heart failure in rabbits. J MOL CELL CARDIOL. 2005; 38(6):1067.

Popelová O, Štěrba M, Kovaříková P, Šimůnek T, Vávrová K, Poňka P, Geršl V. Nové chelátory železa (arylhyclazony) – pilotní studie farmakokinetiky. Čs. FYZIOL. 2005; 54(4):207.

Šimůnek T, Štěrba M, Holečková M, Kaplanová J, Adamcová M, Klimentová I, Geršl V, Hrdina R. Myocardial profile of selected elements in experimental anthracycline-induced cardiomyopathy in rabbits. 6th meeting France - New CEE members-New Frontiers in Basic Cardiovascular Research, 24. - 27. 9.2004. Sborník abstraktů z konference str. 41.

Geršl V, Štěrba M, Šimůnek T, Kaplanová J, Adamcová M, Klimentová I, Čermáková E, Mazurová Y. Study of the effects of PIH in daunorubicin-induced cardiomyopathy in rabbits. CLIN EXP PHARMACOL PHYSIOL 2004 suppl;31:A197.

Adamcová M, Štěrba M, Šimůnek T, Geršl V, Kaplanová J, Mazurová Y, Poňka P. Cardiac troponin T levels following new iron chelator on a rabbit model of daunorubicin-induced cardiomyopathy. 6th meeting France - New CEE members-New Frontiers in Basic Cardiovascular Research, 24. - 27. 9.2004. Sborník abstraktů z konference str. 13.

Šimůnek T, Štěrba M, Klimentová I, Kaplanová J, Mazurová Y, Adamcová M, Hrdina R, Geršl V, Čermáková E, Poňka P. Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone – a potent lipophilic iron chelator – reduces daunorubicin- induced toxicity in rabbits. 7th International Symposium on Chelating Agents in Biomedicine. Toxicology and Therapeutic, Plzeň, 3. - 8. 7. 2004. Sborník abstraktů z konference.

Šimůnek T, Štěrba M, Holečková M, Kaplanová J, Klimentová I, Adamcová M, Geršl V, Hrdina R.

Myocardial content of selected elements in experimental daunorubicin-induced cardiomyopathy in rabbits - effects of dextrazoxane pre-treatment. 7th International Symposium on Chelating Agents in Biomedicine, Toxicology and Therapeutic, Plzeň, 3. - 8. 7. 2004. Sborník abstraktů z konference.

Potáčová A, Adamcová M, Štěrba M, Popelová O, Šimůnek T, Mazurová Y, Geršl V.: Cardiac remodeling and the role of matrix metalloproteinases in chronic anthracycline cardiotoxicity. J MOL CELL CARDIOL. 2006; 40:1001.

Potáčová A, Adamcová M, Štěrba M, Popelová O, Mazurová Y, Geršl V. Remodelace myokardu na modelu daunorubicinové kardiomyopatie. ČS. FYZIOL. 2005;54(4):213.

Šimůnek T, Adamcová M, Štěrba M, Popelová O, Klimtová I, Hrdina R, Geršl V: Left ventricular contractility and cardiac troponin T plasma concentrations in experimental anthracycline-induced cardiomyopathy in rabbits. Joint International Meeting of the Physiological Society and FEPS, Bristol, UK, 20-23.7. 2005; Sborník abstraktů z konference str. 131P.

Adamcová M, Geršl V, Štěrba M, Klimtová I, Šimůnek T. Changes of cardiac troponin T in daunorubicin-induced cardiomyopathy. J MUSCLE RES CELL MOTIL 2003;24:342.

Kovaříková P, Klimeš J, Štěrba M, Popelová O, Mokré M, Geršl V, Poňka P. Development of HPLC determination of a novel drug candidate -salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone – in rabbit plasma and its application to in vivo study. Pokroky v chromatografii a elektroforéze 2005 & Chiranal 2005, Olomouc, 7. - 10. 2. 2005. Sborník abstraktů z konference str. 79.

Kaiserová H, Šimůnek T, den Hartog, Štěrba M, Schröterová L, Popelová O, Kvasničková E, Geršl V, Bast A. New Iron chelators in doxorubicin-induced cardiotoxicity. International Workshop on Anthracycline Cardiotoxicity: Molecular Mechanisms and Clinical Correlates. October 20th - 21th, 2006, Como (Italy), Abstract book p. 42-44.

Šimůnek T, Bouwman RA, Boer C, Štěrba M, Geršl V, Hrdina R, Paulus W, de Lange JJ, Poňka P, Musters RJP. The novel lipophilic iron chelator salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone protects cardiomyocytes against H₂O₂-induced mitochondrial depolarization 7th International Symposium on Chelating Agents in Biomedicine, Toxicology and Therapeutic, Plzeň, 3. - 8. 7. 2004. Sborník abstraktů z konference.

Šimůnek T, Musters RJP, Boer C, Poňka P, Štěrba M, Geršl V. Prevence poškození myokardu volnými kyslíkovými radikály pomocí různých chelátorů železa. ČS. FYZIOL. 2005; 54(4):212.

Adamcová M, Potáčová A, Šimůnek T, Kaiserová H, Štěrba M, Popelová O, Geršl V. Activation of matrix metalloproteinases following anthracycline exposure of H9C2 rat cardiomyoblasts. France - New EU members 7th meeting, New Frontiers in Cardiovascular Research, Debrecen 5th - 8th October 2006, Hungary, Abstract book p. 83.

Šimůnek T, Adamcová M, Kaiserová H, Potáčová A, Štěrba M, Popelová O, Kvasničková E, Geršl V. In vitro study of cardiac troponins as biochemical markers of anthracycline-induced cardiotoxicity. France - New EU members 7th meeting, New Frontiers in Cardiovascular Research, Debrecen 5th - 8th October 2006, Hungary, Abstract book p. 83.

Klimtová I, Šimůnek T, Hrdina R, Geršl V, Macháčková J, Mazurová Y, Kaplanová J, Štěrba M. Srovnání toxicických účinků daunorubicinu a doxorubicinu po opakováném podání u králíku. ČS. FYZIOL. 2001; 50 (4): 164.

E) Sdělení na sjezdech, konferencích a odborných akcích

celkem 47, z toho 20 zahraničních/ s mezinárodní účastí, jako první autor 14.

XI. Přehled příloh dizertační práce

Příloha 1

Štěrba M, Šimůnek T, Popelová O, Potáčová A, Adamcová M, Mazurová Y, Geršl V. Early detection of anthracycline cardiotoxicity in a rabbit model: left ventricle filling pattern versus troponin T determination. *Physiol Res.* 2007. Accepted 27. 9. 2006. In press.

Příloha 2

Šimůnek T, Štěrba M, Holečková M, Kaplanová J, Klimtová I, Adamcová M, Geršl V, Hrdina R. Myocardial content of selected elements in experimental anthracycline-induced cardiomyopathy in rabbits. *Biometals* 2005 Apr;18(2):163-9.

Příloha 3

Štěrba M, Šimůnek T, Mazurová Y, Adamcová M, Popelová O, Kaplanová J, Poňka P, Geršl V. Safety and tolerability of repeated administration of pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone in rabbits. *Hum Exp Toxicol.* 2005 Nov;24(11):581-9.

Příloha 4

Kovaříková P, Klimeš J, Štěrba M, Popelová O, Geršl V, Poňka P. HPLC determination of a novel aroylhydrazone iron chelator (o-108) in rabbit plasma and its application to a pilot pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2006 Jul 11;838(2):107-12.

Příloha 5

Kovaříková P, Klimeš J, Štěrba M, Popelová O, Mokrý M, Geršl V, Poňka P. Development of high-performance liquid chromatographic determination of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone in rabbit plasma and application of this method to an in vivo study. *J Sep Sci.* 2005 Aug;28(12):1300-6.

Příloha 6

Štěrba M, Popelová O, Šimůnek T, Mazurová Y, Potáčová A, Adamcová M, Kaiserová H, Poňka P, Geršl V. Cardioprotective effects of a novel iron chelator, pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone, in the rabbit model of daunorubicin-induced cardiotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006 Dec;319(3):1336-47.

Příloha 7

Štěrba M, Popelová O, Šimůnek T, Mazurová Y, Potáčová A, Adamcová M, Gunčová I, Kaiserová H, Palíčka P, Poňka P, Geršl V. Iron chelation-afforded cardioprotection against chronic anthracycline cardiotoxicity: a study of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH). *Toxicology* 2007. Accepted 13. 3. 2007. In press.