

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických věd

Kandidát: Mgr. Pavlína Hašková
Školitel: doc. PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D.

Název disertační práce:

Studium patobiochemie katecholaminové kardiotoxicity: Role volných iontů železa a jejich chelatace jako možnosti farmakologické kardioprotekce.

Katecholaminová kardiotoxicita je známa již dlouhou dobu, avšak její patogeneze stále není dostatečně objasněna. Ačkoliv se tradičně přisuzuje nadměrné β -adrenergní stimulaci, existuje hypotéza, že do katecholaminovými navozeného poškození srdečních buněk jsou zahrnuty oxidační produkty katecholaminů, které mohou vznikat díky spontánní oxidaci katecholaminů za aerobních podmínek. **Spontánní oxidace katecholaminů** je sledem redoxních reakcí vedoucích k tvorbě řady reaktivních meziproductů, jako jsou *o*-semichinony a *o*-chinony včetně aminochromů, které podléhají redoxní cyklizační reakci generující reaktivní formy kyslíku (ROS). Vytvořené ROS i aminochromy jsou pro buňky toxické. Navíc může být tato autooxidace katalyzována přechodnými kovy, z čehož vyplývá, že **volné vnitrobuněčné ionty železa (Fe)** – nejhodnějšího přechodného kovu v organismu – mohou podporovat nejen Haber-Weissovou reakci ROS, ale také katalyzovat přeměnu katecholaminů na aminochromy, a tím zhoršovat poškození srdečních buněk. **Chelatace Fe** se pak nabízí jako opodstatněná možnost kardioprotekce srdečních buněk před katecholaminovou kardiotoxicitou.

Tato práce si kladla za cíl vytvořit odpovídající experimentální modely pro **komplexní studium vlastností katecholaminů**, přičemž byla hodnocena spontánní oxidace katecholaminů v pufovaném roztoku spektrofotometrickým měřením a HPLC analýzou, tvorba peroxidu vodíku, redoxní aktivita a oxidační účinky původních i oxidovaných katecholaminů a jejich komplexů s Fe stanovením oxidovaného askorbátu, produkce ROS v buňkách potkaní kardiomy-

oblastové buněčné linie H9c2 stanovením dichlorofluoresceinu, toxicita katecholaminů a jejich oxidačních produktů vůči buňkám H9c2 vitálním barvením neutrální červení a mikroskopii s fluorescenčním barvením buněčných jader a nakonec i schopnost katecholaminů spustit apoptotickou kaskádu stanovením aktivit kaspáz. Dalším cílem bylo prostudovat pomocí těchto modelů **rolí volných iontů Fe** v patobiochemii katecholaminové kardiotoxicity a zhodnotit možnosti její **protektce chelatací Fe** s tím, že bude porovnáván ochranný potenciál různých chelátorů – nejen experimentálních, ale i zavedených do klinické praxe.

Výsledky našich *in vitro* experimentů podporují předpoklad, že v patobiochemickém procesu katecholaminy-navozené kardiotoxicity hraje roli oxidační poškození srdečních buněk, neboť prokázaly spontánní pokles koncentrace katecholaminů (adrenalinu a isoprenalinu) v pufovaném roztoku během 24 h, stejně tak prokázaly postupnou oxidaci obou katecholaminů na jejich blíže nesespecifikované oxidační produkty. Tato oxidace byla statisticky významně podpořena přítomností iontů Fe, se kterými byly katecholaminy i jejich oxidační produkty schopné vytvářet komplexy. Komplexy Fe s oxidovanými katecholaminy měly navíc významnou redoxní aktivitu vůči askorbátu. Navazující experimenty s buňkami potkaní kardiomyoblastové linie H9c2 odhalily vyšší toxicitu oxidačních produktů než původních katecholaminů a potvrdily vnitrobuněčnou tvorbu ROS po expozici buněk H9c2 oxidovaným katecholaminům.

Chelatace Fe dokázala významně omezit spontánní oxidaci katecholaminů a tvorbu oxidačních produktů v roztoku, stejně jako redoxní aktivitu jejich komplexu s Fe. Dále byla schopna poskytnout významnou ochranu srdečním buňkám H9c2, zachovat jejich životaschopnost a potlačit tvorbu ROS uvnitř buněk. Ukázalo se, že významný ochranný potenciál mají malé lipofilní chelátory Fe, které jsou schopné pronikat do buněk v dostatečně účinných koncentracích, jako jsou experimentální slicylaldehydisonikotinoylhydrazon (SIH) a klinicky používaný deferipron (L1) a deferasirox (ICL670A). Velmi slibně se projevil i prochelátor boronylester SIH (BSIH), který je navíc oproti klasickým chelátorům minimálně toxický.

Všechny tyto výsledky potvrzují, že katecholaminy jsou schopné Fe-podporované oxidace, které dává vzniknout nestabilním a toxickým oxidačním

produktům, a redoxnímu cyklické reakci, které je příčinou tvorby volných radikálů. Vzniklé oxidační produkty jsou společně s ROS zodpovědné za kardiotoxicitu katecholaminů a nekrotickou smrt buněk. Na všech redoxních reakcích vedoucích ke vzniku oxidovaných katecholaminů i ROS se přitom významně podílejí volné ionty Fe.

Chelatace Fe se ukázala jako vhodný nástroj kardioprotekce, která má značný potenciál chránit srdeční buňky před kardiotoxicitou katecholaminů jak inhibicí vlastní přeměny katecholaminů, tak ochranou srdečních buněk před poškozením zprostředkovaným ROS.