

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové



**Kardiotoxicita antracyklinových antineoplastických látek a možnosti
farmakologické kardioprotekce**

Eduard Jirkovský

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program *Lékařská farmakologie*

Hradec Králové

2013

Dizertační práce byla vypracována v rámci *prezenčního* studia doktorského studijního programu Lékařská farmakologie na Ústavu farmakologie Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

Autor: Mgr. Eduard Jirkovský, Ústav farmakologie

Školitel: Doc. PharmDr. Martin Štěrba, PhD.

Oponenti: Prof. MUDr. Radomír Hrdina, CSc.
Katedra farmakologie a toxikologie
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Univerzita Karlova v Praze

Prof. RNDr. František Kolář, CSc.
Oddělení vývojové kardiologie
Fyziologický ústav, v.v. i.
Akademie věd České republiky

Prostor pro doplnění místa konání a termínu obhajoby (4-6 cm k následujícímu textu) – doplní student po stanovení místa a termínu konání – před tiskem finálního počtu výtisků pro rozeslání.

Tato práce vznikla za podpory grantu (v abecedním pořadí): GAČR 305/03/1511, GAČR 13-15008S, PRVOUK P37, SVV (260907/2010, 262901/2011, 264901/2012, 266901/2013), UNCE 33/2012.

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

Prof. MUDr. Vladimír Geršl, CSc.
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací
v doktorském studijním programu Lékařská farmakologie

OBSAH

1	Souhrn	4
2	Summary	5
3	Úvod do problematiky.....	6
4	Cíle dizertační práce.....	8
5	Metodiky	9
6	Výsledky	12
7	Diskuze.....	19
8	Závěry	23
9	Použitá literatura	25
10	Publikační činnost.....	28
11	Seznam použitých zkratek.....	30

1 SOUHRN

Chronická antracyklinová (ANT) kardiotoxicita je významným klinickým problémem, který může mít podstatný vliv na morbiditu a mortalitu pacientů přeživších nádorové onemocnění. Dexrazoxan (DEX) je jediným kardioprotektivem, u kterého byl jasně popsán kardioprotektivní účinek na experimentálních modelech i v kontrolovaných klinických studiích. Navzdory intenzivnímu výzkumu však přesná patogeneze chronické ANT kardiotoxicity a molekulární mechanismus kardioprotektivního účinku DEX nejsou známy. Současná doporučení navíc předpokládají užití tohoto kardioprotektiva nikoliv s každou dávkou ANT, ale teprve po překročení rizikové kumulativní dávky 300 mg/m².

Cílem této práce tedy bylo studium funkčních, morfologických a molekulárních změn spjatých s rozvojem chronické ANT kardiotoxicity a jejich následný vývoj po ukončení expozice ANT. Pozornost byla věnována zejména oxidačnímu stresu a možné úloze protektivní antioxidační dráhy řízené Nrf2, jakož i mitochondriálnímu poškození a reakci kaskády mitochondriální biogeneze. Chronická ANT kardiotoxicita byla u králíků navozena daunorubicinem (DAU, 3 mg/kg, 1x týdně po 10 týdnů). Na konci podávání látek byla zvířata randomizována pro ukončení pokusu, nebo pro následné sledování po dalších 10 týdnů. Podávání DAU navodilo signifikantní systolickou dysfunkci již na konci expozice cytostatikem, přičemž v následujícím období byla pozorována další progresse směrem k městnavému srdečnímu selhání a dilataci levé komory. Zvýšení srdečních troponinů T v plazmě pokračovalo i několik týdnů po ukončení expozice DAU, což svědčí pro pokračující poškození kardiomyocytů. Ačkoliv v myokardu byly detekovány známky oxidačního inzultu, jejich velmi omezená či žádná asociace s parametry funkčního poškození myokardu nenasvědčuje přímé exekutivní úloze oxidačního poškození v patogenezi chronické ANT kardiotoxicity. Opakované podávání DAU nebylo spojeno s aktivací antioxidační signální dráhy řízené Nrf2 a získaná data nasvědčují tomu, že Nrf2 nehraje v rozvoji této toxicity významnou úlohu. Podávání DAU navodilo výrazné poškození mitochondriálních funkcí, což ale nebylo provázeno aktivací mitochondriální biogeneze. Naopak v období po ukončení expozice DAU byly pozorovány známky útlumu této dráhy, což by mohlo souviset s progresí srdečního poškození v tomto období.

Dalším cílem pak bylo s užitím výše uvedeného modelu porovnat kardioprotektivní účinek DEX při jeho podání s každou dávkou ANT (časná kardioprotektivní intervence) nebo při podání dle doporučeného schématu (odložená kardioprotektivní intervence). DEX (60 mg/kg) byl podáván před každou dávkou DAU, či až od 7. dávky DAU (kumulativní dávka cca 300 mg/m²). Obě schémata podávání DEX dokázala zabránit rozvoji těžkých forem městnavého srdečního selhání a předčasným úhynům pokusných zvířat, nicméně účinnost obou kardioprotektivních intervencí byla významně odlišná. Z většiny hodnocených parametrů bylo zjevné, že časná kardioprotektivní intervence dosahovala podstatně lepších výsledků. V této skupině nebyly zaznamenány v průběhu podávání ani po ukončení expozice DAU žádné změny systolické či diastolické funkce, nedošlo k významnému zvýšení plazmatických koncentrací srdečního troponinu T a morfologie myokardu většiny zvířat se prakticky nelišila od kontrolní skupiny. Naproti tomu odložená kardioprotektivní intervence byla schopna pouze zabránit další progresi subklinického myokardiálního poškození směrem k městnavému srdečnímu selhání. Získaná data také nenaznačovala, že by kardioprotektivní účinek DEX byl přímo závislý na ochraně myokardu před oxidačním stresem vyvolaným opakovanou expozicí DAU. Časné podání DEX také předešlo poškození mitochondrií a poruše exprese podjednotek dýchacího řetězce kódovaných mitochondriálním i nukleárním genomem; tato protekce nesouvisela s ochranou myokardu před tzv. běžnými delekcemi v mitochondriální DNA.

Výsledky této dizertační práce přinesly nový náhled do mechanismů zodpovídajících za rozvoj chronické ANT kardiotoxicity a přispívají k odborné diskuzi o optimalizaci schématu podávání DEX. Kardioprotektivní účinek DEX si zaslouhuje další studium, neboť může být klíčem k pochopení molekulární patogeneze ANT kardiotoxicity a mohl by přispět k vývoji nových účinných strategií pro ochranu myokardu před tímto poškozením.

2 SUMMARY

Chronic anthracycline (ANT) cardiotoxicity is an important clinical problem which can have a substantial impact on morbidity and mortality of cancer survivors. Dexrazoxane (DEX) is the only agent with clearly evidenced cardioprotective effects in both experimental models and clinical trials. Despite intensive research, precise pathogenesis of chronic ANT cardiotoxicity and molecular mechanisms of cardioprotective effects of DEX remain unknown. Current clinical guidelines recommend not using DEX from the beginning of ANT therapy, but instead only from the cumulative ANT dose of 300 mg/m².

The aim of this work was to study functional, morphological and molecular changes associated with induction of chronic ANT cardiotoxicity and their further development in the post-exposure (follow up) period. Special attention was paid on the role of oxidative stress and possible response of protective antioxidant pathway regulated by Nrf2 as well as on mitochondrial impairment and response of mitochondrial biogenesis pathway. Chronic ANT cardiotoxicity was induced in rabbits by repeated intravenous injections of daunorubicin (DAU, 3 mg/kg, once weekly for 10 weeks). At the end of the treatment, the animals were randomized for sacrifice or for 10 week post-exposure follow up. DAU administration induced significant systolic dysfunction already at the end of treatment, while further progression into congestive heart failure and left ventricle dilation was observed in the follow up period. Cardiac troponin T plasma raise persisted several weeks after the end of DAU exposure which suggests continuing cardiomyocyte damage even in the post-exposure period. Although signs of oxidative insults were detected in the myocardium, their limited or absent association with left ventricle dysfunction is not suggesting the direct and executive role of oxidative damage in the pathogenesis of chronic ANT cardiotoxicity. Repeated dosing with DAU also did not activate cytoprotective and antioxidant Nrf2 pathway and available data do not imply its significant role in this toxicity. DAU administration induced significant damage to mitochondrial functions. However, this was not associated with the activation of mitochondrial biogenesis pathway. On contrary, the pathway seemed to be suppressed, particularly in the post-exposure follow up. This may explain the progression of the cardiac damage in this period.

Another aim of this thesis was to use the above described experimental model to compare the cardioprotective effects of DEX when administered from the very first ANT dose (early cardioprotective intervention) compared to the administration following current guidelines (delayed cardioprotective intervention). DEX (60 mg/kg) was administered before each DAU dose or commencing the 7th DAU administration (cumulative DAU dose of 300 mg/m²). Both schedules prevented occurrence of premature deaths and severe congestive heart failure, but they were substantially different each other in the efficacy. Most of evaluated parameters clearly indicated that the early cardioprotective intervention achieved markedly better outcomes. In this group no changes were found in the systolic and diastolic function in both treatment and follow up period, cardiac morphology was comparable as in the controls group and no changes were observed in plasma concentrations of cardiac troponin T. This contrasted with delayed cardioprotective intervention where DEX administration only prevented further progression of the subclinical cardiac damage towards heart failure. Obtained data also did not indicate that the cardioprotective effects are directly dependent and proportional to changes in oxidative stress parameters. Early DEX administration also effectively prevented the onset of mitochondrial damage and impairment of the expression of respiratory chain subunits encoded by both mitochondrial and nuclear genome; however, this protection was not based on the common mtDNA deletions prevention.

The results of this thesis provide novel insights into the mechanisms of chronic ANT cardiotoxicity and contribute to the discussion about the optimal schedule of DEX administration. Cardioprotective effects of DEX obviously deserve further study since the mechanism of cardioprotection may hold the key to the mechanisms of ANT cardiotoxicity. Moreover, it could contribute to the development of novel effective strategies for protection of the heart from this toxicity.

3 ÚVOD DO PROBLEMATIKY

Antracyklinová antibiotika (ANT) představují i 50 let po svém objevení nepostradatelnou součást moderní protinádorové léčby, a to zejména díky svému vysokému protinádorovému účinku a širokému indikačnímu spektru. Nejpoužívanější látky jako doxorubicin a epirubicin mají své pevné místo v kombinační terapii řady hematologických i solidních nádorů (Klener a Klener 2010; Suter a Ewer 2013). Jejich použití v klinické praxi je však spojeno s rizikem rozvoje kardiotoxicity. Tento specifický nežádoucí účinek je společný všem ANT zavedeným do klinické praxe. Mezi klinicky nejvýznamnější formy patří chronická ANT kardiotoxicita s časným (do jednoho roku) nebo pozdním nástupem (s latencí až 20 let). Obě tyto formy jsou příkladem tzv. „typu I srdeční dysfunkce navozené chemoterapeutiky“ a vedou k rozvoji dilatační kardiomyopatie a srdečního selhání (Ewer a Benjamin 2006; Menna a kol. 2012; Minotti 2010). ANT jsou také často užívány v léčbě hematologických malignit v dětském věku, kde významně přispívají k dosažení dlouhodobé remise nádorového onemocnění. Nicméně expozice ANT v dětství může vést k subklinickému poškození myokardu, které může determinovat zvýšené riziko kardiovaskulární morbidity a mortality v dospělosti, jak bylo dokumentováno řadou rozsáhlých dlouhodobých studií (Aleman a kol. 2007; Armstrong a kol. 2009; Franco a kol. 2011; Lipshultz a kol. 1991). Kombinace ANT s některými biologicky cílenými protinádorovými léčivy (např. trastuzumab) navíc může zvyšovat riziko ANT kardiotoxicity i při užití relativně nižších kumulativních dávek (Gianni a kol. 2007, 2007).

Navzdory intenzivnímu experimentálnímu výzkumu nebyl přesný mechanismus vzniku ANT kardiotoxicity zatím popsán (Gianni a kol. 2008; Štěrba a kol. 2013; Šimůnek a kol. 2009). Mezi nejčastěji zmiňované mechanismy vzniku ANT kardiotoxicity patří poškození srdce volnými kyslíkovými radikály (ROS) za významného katalytického přispění iontů železa (Keizer a kol. 1990; Wallace 2003). Překvapivě ovšem nejsou k dispozici žádné relevantní informace o působení ANT na signální kaskádu Nrf2 (*Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*), zodpovídající za buněčnou antioxidační a cytoprotektivní odpověď (Baird a Dinkova-Kostova 2011). Působením oxidačního stresu dochází k uvolnění Nrf2 z vazby na KEAP protein v cytoplasmě s následnou translokací do jádra, kde slouží jako transkripční faktor indukující expresi řady antioxidačních a proaktivních proteinů – např. cytosolické a mitochondriální formy superoxidodismutázy (CuZnSOD a MnSOD), NADPH:chinonoxidoreduktázy 1 (NQO1), hemoxygenázy 1 (HO1), katalytické podjednotky γ -glutamylcysteinligázy (GCLC), glutathionperoxidázy (GPx), glutathionreduktázy (GR) či glutathion-S-transferázy (GST). Také je známo, že mitochondrie patrně představují hlavní cíl toxického působení ANT na myokard. ANT mohou přímo interferovat s komplexem I za cyklického vzniku ROS. ANT také mohou negativně zasahovat do buněčné bioenergetiky (Davies a Doroshov 1986; Wallace 2007, 2007). Další hypotéza pak předpokládá poškození mitochondriální DNA (mtDNA) s následnou poruchou exprese podjednotek dýchacího řetězce kódovaných právě mitochondriálním genomem (Lebrecht a Walker 2007; Lebrecht a kol. 2005). Pokles poměru ATP/AMP, oxidační stres a poškození mitochondrií v buňkách aktivují kaskádu mitochondriální biogeneze, která může zprostředkovat adaptaci buňky na tuto zátěž (Ventura-Clapier a kol. 2011). Uvedená kaskáda je řízená transkripčním koaktivátorem PGC1 α (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α*), který následně prostřednictvím dalších transkripčních faktorů, zejména nukleárního respiračního faktoru 1 (NRF1) a mitochondriálního transkripčního faktoru A (TFAM), koordinuje expresi mitochondriálních proteinů kódovaných nukleárním a mitochondriálním genomem. O úloze mitochondriální biogeneze v rozvoji chronické ANT kardiotoxicity ale existuje zatím pouze minimum relevantních informací.

Nejvýznamnějším rizikovým faktorem rozvoje chronické ANT kardiotoxicity je celoživotní kumulativní dávka ANT. Dávky do 300 mg/m² doxorubicinu či daunorubicinu byly považovány z hlediska kardiotoxicity za relativně „bezpečné“ (Ewer a Benjamin 2006) a nedoporučovalo se překračovat kumulativní dávku 450 mg/m², neboť zde se riziko kardiotoxicity začíná podstatně zvyšovat. Na druhou stranu v poslední době začíná být odbornou veřejností čím dále více akceptováno, že patrně neexistuje žádná zcela „bezpečná“ kumulativní dávka ANT (Menna a kol. 2012). Navíc riziko ANT kardiotoxicity vykazuje významnou interindividuální variabilitu, což znesnadňuje predikci individuálního rizika u jednotlivých pacientů. Doporučené monitorování systolické srdeční funkce pak díky své omezené citlivosti odhalí až relativně rozvinuté známky kardiotoxicity. Nejúčinnější strategií ochrany myokardu před toxickým poškozením je proto tomuto jevu předcházet.

Použití farmakologické kardioprotekce v současnosti patří mezi nejperspektivnější možnosti ochrany myokardu před ANT kardiotoxicitou (Zerra a kol. 2013). Použití klasických antioxidantů a zhášeců ROS však neumožnilo dosáhnout významného stupně kardioprotekce vůči chronické ANT kardiotoxicitě jak na experimentálních modelech, tak i v klinických studiích (Berthiaume a kol. 2005; Breed a kol. 1980; Dorr 1996; Herman a kol. 1994; Legha a kol. 1982; Popelová a kol. 2008). Taktéž použití chelátorů železa poskytlo pouze částečný protektivní účinek při použití relevantních experimentálních modelů (Šimůnek a kol. 2009). Doposud jedinou látkou schopnou navodit významnou ochranu myokardu před chronickou ANT kardiotoxicitou je dexrazoxan (DEX). Jeho kardioprotektivní účinek byl jasně zdokumentován na experimentálních modelech (Gianni a kol. 2008; Šimůnek a kol. 2009), tak i v rozsáhlých klinických studiích (Lipshultz a kol. 2010; Moghrabi a kol. 2007; Swain a Vici 2004; van Dalen a kol. 2011). DEX je proto v současnosti jediným kardioprotektivem registrovaným pro klinické užití v indikaci prevence ANT navozené kardiotoxicity. Přesný mechanismus jeho kardioprotektivního účinku doposud nebyl zcela objasněn, nicméně nejčastěji zmiňovanou hypotézou je koncept DEX jako proléčiva. Předpokládá se totiž, že DEX je uvnitř kardiomyocytů metabolizován na aktivní metabolit ADR-925, který je schopen chelatovat ionty železa, odnímat je z komplexu s ANT a předcházet tak tvorbě ROS navozené ANT (Cvetković a Scott 2005). Další hypotéza předpokládá, že DEX na základě svého antioxidačního účinku předchází vzniku tzv. běžných delečních mutací a poškození mtDNA navozenému ANT. Tímto účinkem by DEX mohl předcházet poruše exprese podjednotek dýchacího řetězce kódovaných mtDNA a tak i rozvoji mitochondriálního poškození a následného oxidačního stresu (Lebrecht a kol. 2007). Dalším mechanismem, který byl s účinkem DEX spojován je reverzibilní inhibice TOP2 β (Hasinoff a Herman 2007; Lyu a kol. 2007).

V současné klinické praxi je ale DEX používán jen zřídka a názor odborné veřejnosti na jeho optimální užití je stále nejednotný (Zerra a kol. 2013, 2013). Dle platných doporučení je DEX možné použít pouze v odloženém schématu u pacientů, kteří překročili kumulativní dávku ANT 300 mg/m² (Hensley a kol. 2009). Podání DEX od první dávky ANT (časná kardioprotektivní intervence) tedy není v současné době doporučeno, ačkoliv tento přístup vykazoval velmi dobré výsledky v experimentálních (Štěrba a kol. 2013) i klinických studiích (Swain a kol. 1997a; van Dalen a kol. 2011). Uvedené omezení vzniklo na základě sporné interpretace (Swain a kol. 1997b) výsledků jedné z klinických studií tvořících fázi III klinického hodnocení DEX. Zde byl totiž zaznamenán možný vliv DEX na jeden z parametrů protinádorové účinnosti ANT při současném podání DEX (Swain a kol. 1997b). Tyto závěry ovšem nepotvrdila žádná další studie a systematické metaanalýzy kontrolovaných klinických studií se shodují, že pro takové tvrzení neexistuje žádný důkaz (Swain a Vici 2004; van Dalen a kol. 2011). Doporučení odborných společností pro užití DEX v klinické praxi ovšem nebylo prozatím změněno, navzdory posunu interpretace výsledků výše zmíněné studie (Swain a Vici 2004). V důsledku tohoto opatření je klinické užití DEX poměrně omezené. Většina pacientů zůstává vystavena riziku plynoucímu z expozice ANT až do dosažení klíčové kumulativní dávky 300 mg/m², a to navzdory současnému názoru, že každá dávka ANT představuje určité ireverzibilní ultrastrukturální poškození myokardu, které se projeví až po kumulaci těchto změn (Ewer a Benjamin 2006; Menna a kol. 2012). Protože obě kardioprotektivní intervence pomocí DEX dosud nebyly na experimentálním modelu studovány, zůstávají molekulární, morfologické a funkční aspekty tohoto přístupu zatím nejasné (Gianni a kol. 2008; Štěrba a kol. 2013).

4 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

- Studium poškození myokardu levé komory navozeného opakovaným podáváním daunorubicinu pokusným zvířatům a sledování rozvoje tohoto poškození v období po ukončení expozice cytostatikem (tzv. *follow up*).
- Studium molekulárních mechanismů souvisejících s rozvojem chronické antracyklinové kardiotoxicity se zaměřením na oxidační stres, poškození mitochondrií a studium úlohy protektivní signální kaskády řízené Nrf2 a mitochondriální biogeneze.
- Studium kardioprotektivní účinnosti dexrazoxanu vůči chronické antracyklinové kardiotoxicitě při jeho podání s každou dávkou antracyklinu (časná kardioprotektivní intervence), nebo při zahájení jeho podávání dle současných doporučení až po překročení kumulativní dávky antracyklinu 300 mg/m² (odložená kardioprotektivní intervence).
- Studium molekulárních aspektů kardioprotektivního účinku dexrazoxanu při jeho užití v obou studovaných schématech podání na experimentálním modelu chronické antracyklinové kardiotoxicity.

5 METODIKY

Jako pokusná zvířata byli použiti dospělí samci Činčily velké, kteří byli ustájeni za standardních podmínek ve viváriu Lékařské fakulty v Hradci Králové a veškerá manipulace a experimenty byly prováděny v souladu s platnou legislativou a schváleny Odbornou komisí pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat při Lékařské fakultě v Hradci Králové. Veškeré procedury byly prováděny v lehké kombinované anestezii ketamin/midazolam (30 mg/kg / 5 mg/kg, *i.m.*). Pentobarbitalová anestézie byla použita pro invazivní hemodynamické vyšetření a pro předávkování zvířete.

Chronická antracyklinová kardiotoxicita byla navozena u pokusných králíků opakovaným podáváním daunorubicinu (DAU, 3 mg/kg, 1x týdně po 10 týdnů, n = 27), zatímco kontrolní skupina dostávala fyziologický roztok (K, 1 ml/kg, n = 19) za stejných podmínek. Týden po poslední aplikaci DAU (na začátku 11. týden) byla zvířata v obou skupinách randomizována k ukončení pokusu, nebo k dalšímu sledování a označena jako tzv. *follow up* (FU) (DAU FU, n = 11 a K FU, n = 10). Echokardiografické vyšetření bylo provedeno na začátku pokusu, před 7. – 10. aplikací DAU a každý týden v období *follow up* s výjimkou 18. a 20. týdne. Ve stejných intervalech byla odebírána i krev pro stanovení plazmatických koncentrací srdečního troponinu T. V průběhu následného sledování po ukončení expozice podávaným látkám (*follow up*) byl pokus ukončen při poklesu frakčního zkrácení levé komory (LVFS) jednotlivých zvířat pod 20 %, aby se předešlo náhlému úhynu a ztrátě vzorku myokardu pro dekompenzované srdeční selhání.

Pro studium kardioprotektivních účinků dexrazoxanu byl použit výše uvedený model chronické antracyklinové kardiotoxicity včetně následného sledování zvířat po ukončení expozice podávaným látkám. Dexrazoxan byl pokusným zvířatům podáván v dávce 60 mg/kg, *i.p.*, vždy 30 min před podáním daunorubicinu (n=31) ve dvou schématech. Ve **schématu časně kardioprotektivní intervence** bylo podávání dexrazoxanu zahájeno od první dávky daunorubicinu (DD₁, n = 16), zatímco při **odložené kardioprotektivní intervenci** bylo podávání započato až od 7. dávky daunorubicinu (DD₇, n = 15), tj. po překročení kumulativní dávky $\approx 300 \text{ mg/m}^2$ daunorubicinu. Dle výše uvedeného schématu pokusu byla zvířata v 11. týdnu randomizována do dvou skupin; v první skupině byl pokus ukončen, zatímco druhá skupina byla sledována dalších 10 týdnů (DD₁ FU, n = 8 a DD₇ FU, n = 8).

Echokardiografické vyšetření srdeční funkce bylo provedeno pomocí přístroje Vivid 4 vybaveného 10 MHz sondou (GE Healthcare, Velká Británie). S užitím levého parasternálního přístupu byla levá komora (LK) zobrazena v dlouhé a krátké ose a rozměr LK na konci systoly (LVESD) a diastoly (LVEDD) byl zjištěn z tzv. M-mód vyšetření. Frakčního zkrácení (LVFS) jako index systolické funkce byl následně vypočítán ze vzorce: $LVFS (\%) = ((LVEDD - LVESD) / LVEDD) \cdot 100$.

Invazivní hodnocení srdeční funkce bylo provedeno pomocí katetru Mikro-Tip Katetr (2.3F, Milar Instrument, TX, USA) napojeného na sběrnou stanici PowerLab/8SP (ADInstruments, Austrálie). Katetr byl zaveden do LK přes *a. carotis sin.* a změny tlaku byly zaznamenávány pomocí softwaru Chart 5.4.2 (ADInstruments), který též umožnil výpočet maximální změny tlaku v isovolumické fázi systoly a diastoly (indexy systolické a diastolické funkce - dP/dt_{\max} a dP/dt_{\min}).

Stanovení plazmatických koncentrací srdečního troponinu T bylo provedeno pomocí vysoce citlivého komerčně dostupného kitu Elecsys Troponin T hs assay kit (Roche Diagnostics, Švýcarsko) s limit detekce 0,003 $\mu\text{g/l}$ a ve spolupráci s Ing. Jaroslavou Vávrovou, PhD. (Ústav klinické biochemie a diagnostiky, FNHK).

Histologické vyšetření myokardu bylo provedeno na transversálních řezech srdcem zpracovaných pomocí standardních histologických technik. Preparáty byly barveny pomocí hematoxylinu a eosinu, a Massonovým modrým trichromem. Histologické vyšetření bylo provedeno ve spolupráci s doc. MUDr. Yvonou Mazurovovou, CSc. (Ústavu histologie a embryologie, LFHK UK).

Lipoperoxidace myokardu LK byla hodnocena pomocí stanovení obsahu malondialdehydu (MDA) metodou dle Pilze a kol. (2000) v celotkáňovém homogenátu (Jirkovsky a kol. 2012). Stanovení je založené na derivatizační reakci MDA s 2,4-dinitrofenylhydrazinem poskytující selektivně detekovatelný produkt pomocí HPLC s UV detekcí. HPLC analýza byla provedena Ing. Milošem Hrochem (Ústav farmakologie, LFHK UK).

Množství redukované (GSH) a oxidované (GSSG) formy glutathionu v myokardu LK bylo stanoveno HPLC metodou podle Kand'ára a kol. (2007) v deproteinovaném celotkáňovém homogenátu (Jirkovský a kol. 2012). Stanovení je založeno na derivatizační reakci GSH s *o*-ftaldialdehydem (OPA) poskytující produkt, který může být selektivně detekován pomocí HPLC vybavené fluorescenčním detektorem. V případě stanovení GSSG bylo nejprve nutné vzorek preinkubovat s N-ethylmaleimidem pro odstranění GSH. HPLC analýza byla provedena Ing. Milošem Hrochem, PhD..

Aktivity glutathionperoxidázy (GPx) a glutathionreduktázy (GR) byla stanovena dle metody popsané Esworthyho a kol. (2001) a Mannervika a kol. (2001) v celotkáňovém homogenátu LK (Jirkovský a kol. 2012) pomocí enzymatické reakce využívající přeměnu specifického substrátu danými enzymy za redukce NADPH a množství redukovaného NADP⁺ je detekováno spektrofotometricky. Stanovení bylo realizováno ve spolupráci s Mgr. Annou Jirkovskou, PhD. (Katedra biochemických věd, FaFHK UK).

Aktivita glutathion-S-transferázy byla stanovena v celotkáňovém homogenátu LK pomocí komerčně dostupného kitu SensoLyte GST Activity Assay Fluorimetric Kit (Anaspec Inc., CA, USA), jehož principem je konjugace nefluoreskujícího substrátu s GSH za katalytické účasti GST obsažené ve vzorku za vzniku fluoreskujícího produktu.

Aktivita citrát syntázy byla stanovena v celotkáňovém homogenátu LK spektrofotometrickou metodou dle De Sousa a kol. (1999) založenou na enzymatické reakci citrát syntázy katalyzující tvorbu kyseliny citronové z acetyl-CoA a oxalacetátu.

Respirační aktivita mitochondrií myokardu LK byla stanovována z čerstvé tkáně v celotkáňovém homogenátu LK pomocí vysokoúčinné respirometrie (Jirkovský a kol. 2012). Měření probíhalo ve spolupráci s Mgr. Pavlou Staňkovou, PhD. (Ústav fyziologie, LFHK UK), na přístroji Oroboros 2K (Oroboros, Rakousko) v respiračním pufru MiR05 (Oroboros) při 30°C a spotřeba kyslíku byla vyhodnocena pomocí programu DatLab 4.1 (Oroboros).

Aktivita mitochondriálního komplexu I (NADH:ubichinon oxidoreduktáza) byla stanovena také ve frakci celotkáňového homogenátu LK obohacené o mitochondrie (Jirkovský a kol. 2012) pomocí spektrofotometrické metody (Janssen a kol. 2007) založené na redukci NADH katalyzované komplexem I a decylubiquinon s použitím dichlorindofenolu. Specifická aktivita komplexu I byla stanovena jako rotonen senzitivní část naměřené aktivity.

Stanovení transkripčně aktivní formy Nrf2 v nukleární frakci myokardu LK bylo provedeno pomocí komerčně dostupného ELISA kitu TransAM Nrf2 (Active Motif, CA, USA) jehož principem je navázání aktivní formy Nrf2 na specifické oligonukleotidy (odpovídající sekvenci ARE) na povrchu jamek. Detekce Nrf2 byla provedena pomocí specifické protilátky s následnou spektrofotometrickou kvantifikací. Stanovení bylo provedeno ve spolupráci s PharmDr. Olgou Lenčovou, PhD. (Ústav farmakologie, LFHK UK). Nukleární frakce byla připravena podle Dignamova protokolu (1983).

RT-qPCR analýza vybraných genů byla stanovena pomocí komerčně dostupných qPCR kitů (Generi Biotech, ČR; Applied Biosystems). Celková RNA byla izolovaná z myokardu LK pomocí fenol-chloroformové extrakce s následným přepisem do cDNA pomocí komerčního kitu. Expresí cílových genů byla normalizována na expresi referenčního genu HPRT1 za použití Pfafflyovy metody (Pfaffl, 2001). Přesná metodika a podmínky reakce viz Jirkovský a kol. (2013; 2012).

Pro stanovení změny v poměru mtDNA/nDNA byla izolována celková DNA z myokardu LK pomocí DNeasy Blood&Tissue Kit (Qiagen, CA, USA). Relativní zastoupení mtDNA ve vzorcích bylo provedeno pomocí qRT-PCR stanovení abundance genů kódovaných mtDNA (ND1, ND4, COX1) a výsledky byly vztaheny na počet kopií genu pro leptin (kódovaný nDNA) za použití Pfafflyovy metody. Přesná metodika a podmínky reakce viz Jirkovský a kol. (2013; 2012).

Analýza tzv. běžných delečních mutací v mtDNA (tvz. *common deletions*) byla stanovena metodou *long range* PCR s individuálně navrženými a optimalizovanými primery (Generi Biotech) a komerčně dostupným kitem QIAGEN LongRange PCR kit (Qiagen). Stanovení bylo provedeno ve spolupráci s firmou Generi Biotech (Hradec Králové) a přesná metodika je uvedena v práci Jirkovský a kol. (2013).

Semikvantitativní hodnocení obsahu proteinu HIF1 α v nukleární frakci myokardu LK bylo provedeno pomocí Western blot analýzy s chemiluminiscenční detekcí specifické protilátky po separaci proteinů pomocí gelové elektroforézy. Přesná metodika je uvedena v práci Jirkovský a kol. (2013)

Stanovení koncentrace proteinu ve vzorcích bylo provedeno pomocí komerčně dostupného Bicinchronic Acid Protein Assay Kit (BCA; Sigma-Aldrich) dle návodu výrobce.

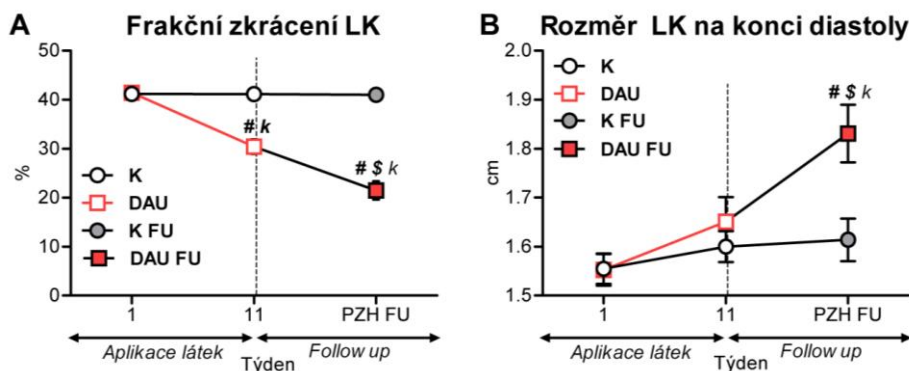
Statistická analýza výsledků byla provedena pomocí programu SigmaStat 3.5 for Windows (Systat Software, CA, USA) a statistická signifikance byla určena na hladině $p < 0,05$. Pro porovnání skupin mezi sebou byla použita jednofaktorová analýza rozptylu, případně její neparametrická modifikace. Pro porovnání párových dat byl použit párový *t*-test, případně Wilcoxonův párový test pro neparametrická data. Vztah mezi jednotlivými parametry byl stanoven Pearsonovou parametrickou nebo Spearmanovou neparametrickou korelační metodou. Jestliže není uvedeno jinak, data jsou prezentována jako jednotlivé hodnoty a průměr/medián, nebo jako krabičkový graf s 5. - 95. percentilem pro přehlednou prezentaci dat z více skupin ve studii s dexrazoxanem (GraphPad Software, Inc., CA, USA).

6 VÝSLEDKY

6.1 Studium poškození srdce vyvolané chronickou ANT kardiotoxicitou a jeho další vývoj po ukončení expozice ANT (*follow up*)

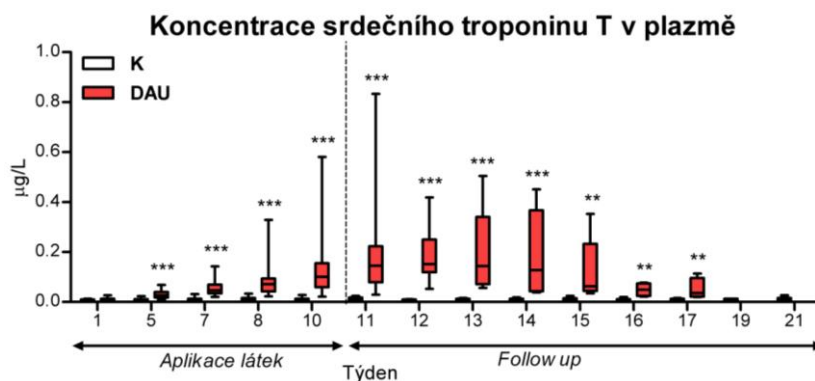
Celková toxicita, srdeční funkce a poškození myokardu

Na rozdíl od kontrolní skupiny byla v DAU skupině v průběhu podávání látek pozorována signifikantní, ale přiměřená mortalita (18,5%). V následujícím období po ukončení expozice látkám (*follow up*, FU) musel být pokus ukončen u 82 % zvířat z DAU skupiny dle protokolu studie pro pokles LVFS pod 20 % indikující těžkou systolickou dysfunkcí s vysokou pravděpodobností předčasného úhynu a ztráty vzorku myokardu. Při pitvě zvířat z DAU skupiny byly pozorovány časté známky oběhového městnání a dilatace srdce (zvláště LK), jejichž četnost byla významně častější v období po ukončení expozice látkám (FU) a u zvířat uhynulých či ukončených dle protokolu studie. V kontrolní skupině všechna zvířata přežila do konce pokusu a pitevní nálezy byly bez patologických změn. Echokardiografické vyšetření systolické srdeční funkce odhalilo signifikantní dysfunkci LK již na konci podávání DAU s významnou další progresí v období FU (obr.1A). Přítomnost výrazné systolické, ale i diastolické dysfunkce, byla v období FU potvrzena i pomocí katetrizačního vyšetření (indexy dP/dt_{max} a dP/dt_{min} byly o 41,5 a 36,7 % nižší než u kontrolní skupiny, $p \leq 0,001$). V tomto období také byla echokardiograficky potvrzena významná dilatace LK (obr. 1B), která na konci podávání látek ještě nebyla signifikantní.



Obr. 1 Echokardiograficky stanovené (A) frakční zkrácení LK a (B) rozměr LK na konci diastoly. Data prezentována jako průměr skupiny \pm SEM. Statistická signifikance (párový t-test/Wilcoxonův párový test, $p \leq 0,01$) v porovnání s (#) počáteční nebo hodnotou (\$) na konci podávání látek. Statistická signifikance (ANOVA, $p \leq 0,01$) v porovnání s kontrolní skupinou (k). PZH – poslední zaznamenaná hodnota.

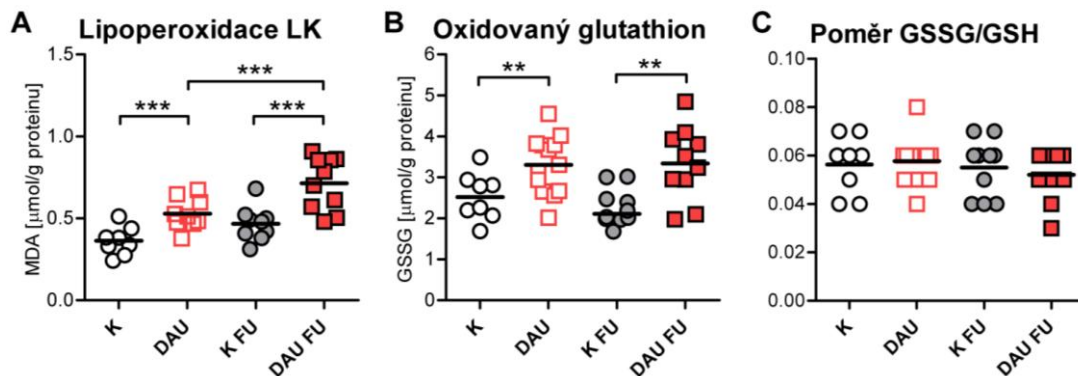
Postupný rozvoj kardiotoxicity v závislosti na kumulativní dávce DAU byl v průběhu podávání DAU dokumentován prostřednictvím zvýšených koncentrací srdečního troponinu T, které přetrvávaly signifikantně zvýšené ještě řadu týdnů po ukončení expozice DAU (obr. 2).



Obr. 2 Koncentrace srdečního troponinu T v plazmě. Statistická signifikance (ANOVA) v porovnání s kontrolní skupinou: *** ($p \leq 0,001$), ** ($p \leq 0,01$) a * ($p \leq 0,05$).

Markery oxidačního stresu

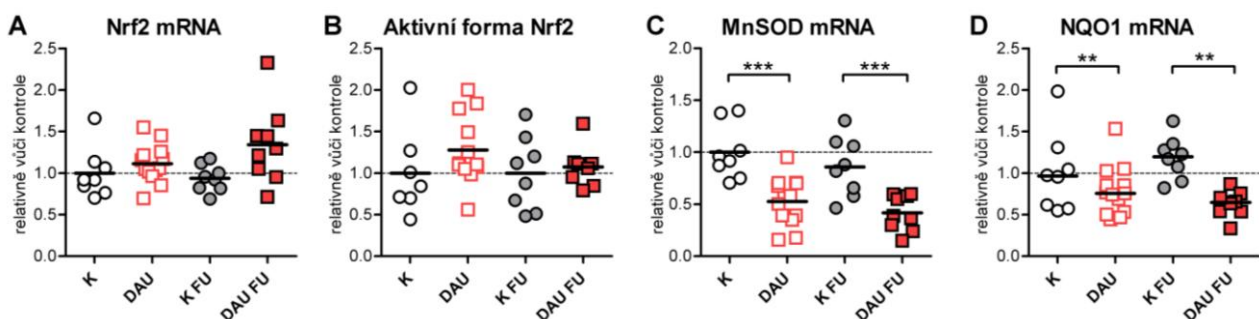
Stanovení MDA v myokardu LK indikovalo mírné, ale významné zvýšení lipoperoxidace na konci podávání DAU, nicméně k dalšímu významnému zvýšení došlo v období FU (obr. 3A). Ačkoliv opakované podávání DAU zvýšilo množství oxidovaného glutathionu (GSSG) v LK a tato změna zůstala signifikantní i v období FU (obr. 3B), klíčový parametr, poměr oxidovaného a redukovaného glutathionu (GSSG/GSH), zůstal beze změny (obr. 3C), což naznačuje, že glutathionový systém zůstal navzdory DAU toxicitě relativně kompetentní. Při korelačních analýzách byla u jednotlivých zvířat zjištěna signifikantní, ale velmi málo těsná asociace míry lipoperoxidace (MDA) a systolické dysfunkce (LVFS) ($p = 0.016$; $R = -0.417$) a žádný vztah nebyl shledán při korelační analýze vztahu GSSG/GSH a LVFS ($p > 0.05$).



Obr. 3 (A) HPLC stanovení malondialdehydu jako markeru lipoperoxidace v myokardu LK a (B) obsahu oxidované formy glutathionu (GSSG) v myokardu LK. (C) Výsledný poměr oxidované a redukované formy glutathionu v myokardu LK. Statistická signifikance (ANOVA) v porovnání s kontrolní skupinou: ** ($p \leq 0,01$) a *** ($p \leq 0,001$).

Úloha cytoprotektivní a antioxidační signální dráhy řízené Nrf2

Stanovení genové exprese Nrf2, jakož i hodnocení množství transkripčně aktivního Nrf2 v nukleární frakci myokardu LK neodhalilo žádné změny tohoto parametru v důsledku podávání DAU (obr. 4A,B). Podávání DAU také nenavodilo významnou indukci exprese či enzymové aktivity většiny významných antioxidačních a cytoprotektivních proteinů, které jsou řízeny prostřednictvím Nrf2 ($p > 0.05$, např. CuZnSOD, GCLC, GPx, GR, GST). Naopak u některých z cílových genů Nrf2 kaskády (MnSOD, NQO1, obr. 4C,D) byla zjištěna snížená exprese, která významně korelovala s tíží systolické dysfunkce (v případě MnSOD $p < 0,001$, $R = 0,751$; v případě NQO1 $p < 0,001$, $R = 0,631$).

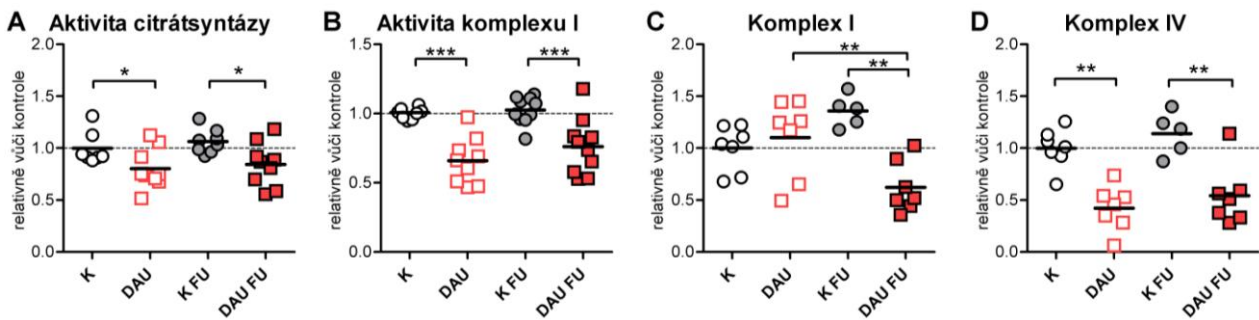


Obr. 4 (A) Relativní genová exprese Nrf2 a (B) množství transkripčně aktivní formy Nrf2 v nukleární frakci myokardu LK. Relativní genová exprese (C) mitochondriální superoxidodismutázy (MnSOD) a (D) NADPH:chinonoxidoreduktázy 1 (NQO1). Statistická signifikance (ANOVA) v porovnání s kontrolní skupinou: ** ($p \leq 0,01$) a *** ($p \leq 0,001$).

Poškození mitochondrií

Stanovení aktivity citrát syntázy v myokardu LK odhalilo významný pokles zastoupení mitochondrií v myokardu LK již na konci podávání DAU a tato změna přetrvávala i v období FU (obr. 5A). Dále byl zjištěn významný pokles enzymatické aktivity komplexu I dýchacího řetězce jak pomocí spektrofotometrického stanovení jeho enzymatické aktivity ve frakci tkáňového homogenátu bohaté na mitochondrie (obr. 5B), tak i pomocí respirometrického stanovení v celotkáňovém homogenátu (obr. 5C). Nicméně zatímco první stanovení zjistilo významnou změnu již na konci podávání DAU, v případě

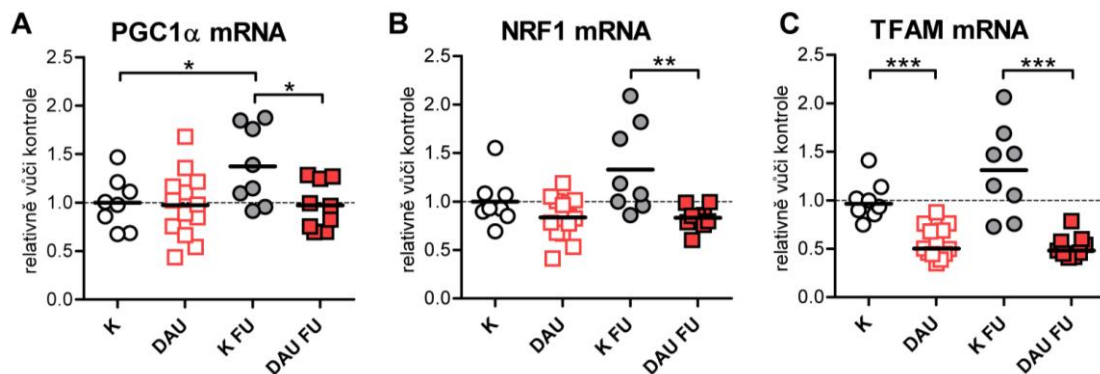
respirometrie byla identifikována významná změna až v období FU. Respirometrické vyšetření komplexu IV pak odhalilo významný pokles aktivity v obou hodnocených intervalech (obr. 5D).



Obr. 5 (A) Stanovení aktivity citrátsyntázy jako biomarkeru celkového množství mitochondrií v myokardu LK. (B) Stanovení enzymatické aktivity komplexu I ve frakci bohaté na mitochondrie. Respirometrické stanovení aktivity (C) komplexu I a (D) komplexu IV. Statistická signifikance (ANOVA) v porovnání s kontrolní skupinou: * ($p \leq 0,05$) a ** ($p \leq 0,01$).

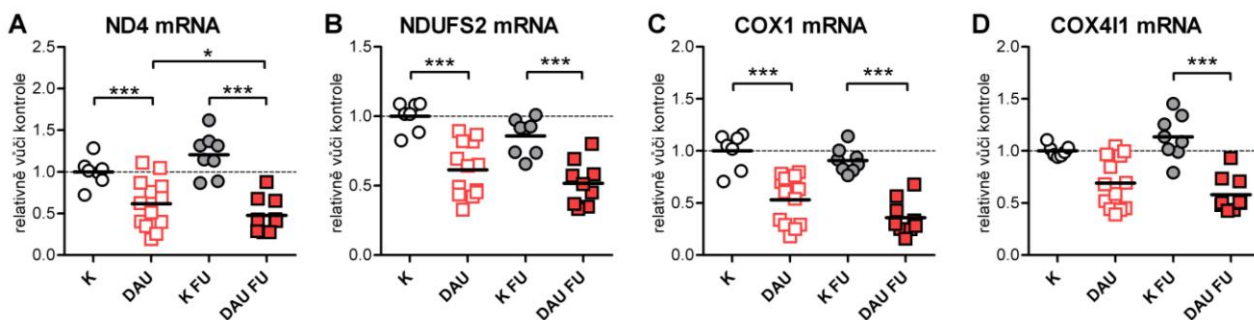
Analýza komponent mitochondriální biogeneze a exprese podjednotek komplexu I a IV

Analýza genové exprese PGC1 α , klíčového regulátoru procesu mitochondriální biogeneze, nezaznamenala významnou indukci jeho exprese vlivem opakovaného podávání DAU. U zvířat z kontrolní skupiny v období FU pozorován mírný, ale statisticky významný nárůst exprese PGC1 α (obr.6A) a obdobná změna byla zjištěna i u transkripčního faktoru NRF1 navazujícího člena této kaskády (obr.6B). Expres tohoto faktoru měla ovšem opačnou tendenci v DAU skupině, což způsobilo vznik signifikantního rozdílu v porovnání s příslušnou kontrolní skupinou. Na rozdíl od PGC1 α a NRF1 byl další transkripční faktor TFAM velmi významně ovlivněn již na konci podávání DAU (obr. 6C) a výrazné potlačení jeho exprese přetrvávalo i v následujícím období FU.



Obr. 6 Relativní genová exprese (A) klíčového regulátoru mitochondriální biogeneze PPAR- γ koaktivátoru 1- α (PGC1 α) a jeho cílových transkripčních faktorů (B) nukleárního respiračního faktoru 1 (NRF1) a (C) mitochondriálního transkripčního faktoru A (TFAM). Statistická signifikance (ANOVA) mezi jednotlivými skupinami: * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$) a *** ($p \leq 0,001$).

Při studiu genové exprese jednotlivých podjednotek komplexu I a IV dýchacího řetězce bylo zaznamenáno významné snížení exprese podjednotek obou komplexů kódovaných jak mitochondriálním (ND4 a COX1 viz obr. 7A a 7C), tak i nukleárním (NDUFS2 a COX4, obr. 7B a 7D) genomem.



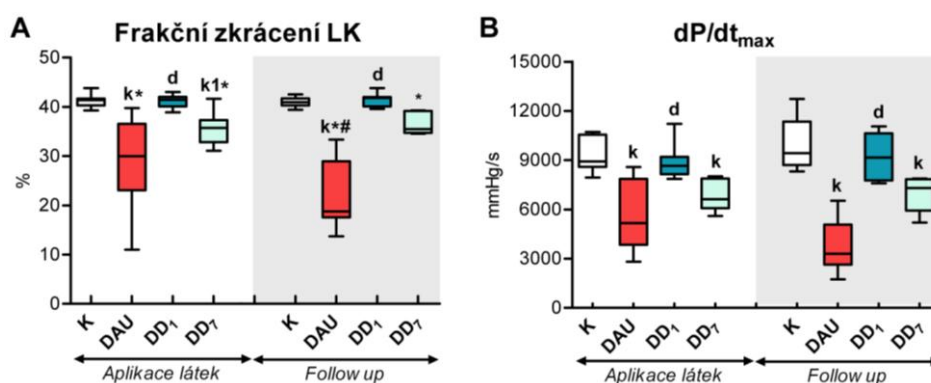
Obr. 7 Relativní genová exprese podjednotek komplexu I a IV dýchacího řetězce kódovaných mitochondriálním a nukleárním genomem. (A) Mitochondriálně (ND4) a (B) nukleárně (NDUFS2) kódované podjednotky komplexu I. (C) mitochondriálně (COX1) a (D) nukleárně (COX4I1) kódované podjednotky komplexu IV. Statistická signifikance (ANOVA, $p \leq 0,05$) v porovnání s (k) kontrolní skupinou, (d) DAU skupinou a (#) v porovnání s hodnotami na konci podávání látek v dané skupině.

6.2 Studium kardioprotektivního účinku dexrazoxanu vůči chronické ANT kardiotoxicitě při jeho podání s každou dávkou cytostatika a při odloženém podání dle současných klinických doporučení

Celková toxicita, srdeční funkce a poškození myokardu

Podání DEX v obou schématech zcela zabránilo předčasným úhynům v průběhu podávání látek a všechna zvířata se bez zjevných známek zhoršeného zdravotního stavu dožila plánovaného konce pokusu i v období FU, což výrazně kontrastovalo s nálezem u skupiny se samotným DAU, kde se konce období FU dožilo pouze 18,5 % zvířat. Na rozdíl od DAU skupiny nebyly v pitevních nálezech zvířat dostávající DEX pozorovány žádné makroskopické známky dilatace LK či oběhového městnání. Přírůstek tělesné hmotnosti byl ve skupině s časnou kardioprotektivní intervencí na konci podávání látek nesignifikantní (6 %, $p > 0,05$), významně nižší než v kontrolní skupině ($p < 0,05$) a významně se nelišil od DAU skupiny ($p > 0,05$). Naproti tomu ve skupině zvířat s odloženou kardioprotektivní intervencí byly výsledky v tomto ohledu poněkud lepší a přírůstek tělesné hmotnosti (15 %) byl významně vyšší než v DAU skupině ($p < 0,05$). V období po ukončení expozice látkám (FU) ale u zvířat s časnou kardioprotektivní intervencí došlo k významnému nárůstu tělesné hmotnosti. Tyto výsledky se významně lišily od hodnot v DAU skupině ($p < 0,05$) a při porovnání s kontrolní skupinou již nebyl nalezen významný rozdíl. Přírůstek tělesné hmotnosti ve skupině s odloženou kardioprotektivní intervencí ale stagnoval a rozdíl oproti DAU skupině nebyl signifikantní.

Obě schémata podání DEX se ovšem významně lišila ve schopnosti zachovat normální systolickou srdeční funkci experimentálních zvířat. Zatímco časná kardioprotektivní intervence byla schopna v obou sledovaných intervalech předejít poklesu systolické funkce hodnocené echokardiograficky (obr. 8A) i katetrizačně (obr. 8B), odložené podání DEX bylo spojeno s významně horším výsledkem. Časné podání DEX také kompletně zabránilo signifikantnímu nárůstu plazmatických koncentrací srdečního troponinu T, a to v průběhu podávání látek i v následném období FU. Při odložené kardioprotektivní intervenci došlo v období bez podání DEX k významnému nárůstu koncentrací srdečního troponinu T a hodnoty před začátkem podávání DEX (tj. před 7. aplikací DAU, kumulativní dávka DAU $\approx 300 \text{ mg/m}^2$) byly totožné jako v DAU skupině. Odložené podání DEX, ale účinně zabránilo dalšímu nárůstu koncentrací srdečního troponinu T v následujícím období navzdory další expozici DAU. Na konci podávání látek, jakož i během následného období FU pak byly koncentrace tohoto biomarkeru významně nižší než v DAU skupině.



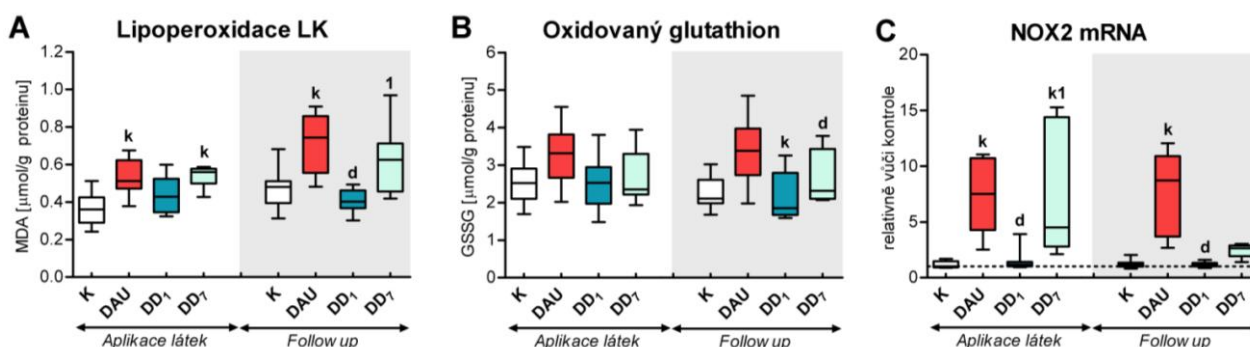
Obr. 8 Vyšetření systolické funkce LK. (A) Echokardiografické vyšetření frakčního zkrácení LK. (B) Index dP/dt_{max} získaný katetizační vyšetření LK. Statistická signifikance v rámci dané skupiny (párový t -test, $p \leq 0,05$) v porovnání s počáteční hodnotou (*) nebo hodnotou na konci podávání látek (#) v rámci dané skupiny. Statistická signifikance (ANOVA, $p \leq 0,05$) v porovnání s (k) kontrolní, (d) DAU skupinou a časnou DEX intervencí (1). PZH – poslední zaznamenaná hodnota.

Histologické vyšetření myokardu LK

Opakované podávání DAU vedlo k rozvoji charakteristických degenerativních změn v kardiomyocytech myokardu LK a mezikomorového septa (zejména vakuolizace cytoplazmy a ztráta myofibril). Na konci podávání látek tyto změny dominovaly u většiny pokusných zvířat, zatímco náhradová fibróza byla obvykle jen omezeně rozvinutá. Naopak v období FU byly degenerativní změny již poněkud méně nápadné na úkor pokročilé náhradové fibrózy, která byla zvláště nápadná u zvířat s delším přežitím po ukončení expozice DAU. Časná kardioprotektivní intervence spolehlivě zabránila rozvoji degenerativních změn v myokardu LK i mezikomorového septa. V obou časových intervalech studie byly degenerativní změny v myokardu těchto zvířat přítomny jen velmi vzácně, v minimální intenzitě a ve většině případů se nález nelišil od kontrolní skupiny. Naopak významné morfologické změny v myokardu LK byly pozorovány při užití odložené kardioprotektivní intervence. Známky degenerativních změn kardiomyocytů, jakož i rozvinutá náhradová fibróza, byly přítomny již na konci podávání látek a v období FU pak došlo k další progresi hojení ve smyslu náhradové fibrózy a tvorbě žizev.

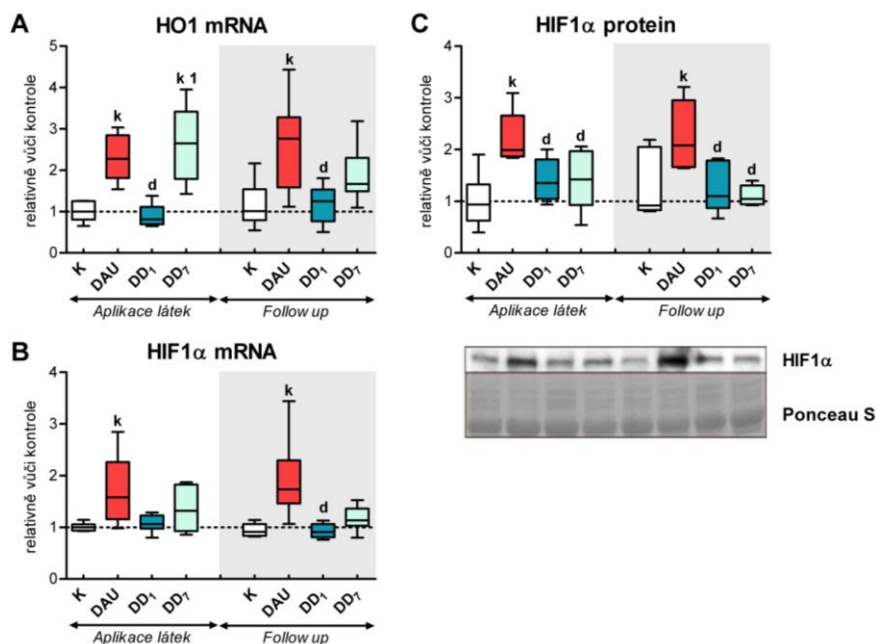
Markery oxidačního stresu, exprese NOX a Nrf2

Ačkoliv podání DEX mělo nesporný kardioprotektivní účinek již na konci podávání léčiv, hodnoty lipoperoxidace myokardu LK se v tomto období významně nelišily od DAU skupiny (obr. 9A). Účinek DEX na lipoperoxidaci myokardu LK se ale významně projevil až v období FU, kde bylo u časného podávání dosaženo významného rozdílu v porovnání s DAU skupinou. Obdobně vykazovalo podávání DEX v období FU významnější účinek také na snížení množství oxidovaného glutathionu (obr. 9B). Klíčový poměr GSSG/GSH ale zůstal v průběhu pokusu u všech skupin beze změny. Podání DEX také v závislosti na užitém schématu podání dovedlo zabránit výraznému zvýšení exprese NADPH-oxidázy 2 a 4 (NOX2 a NOX4) v myokardu LK, které dosahovalo v DAU skupině až osminásobku kontrolních hodnot a přetrvávalo i v FU (obr. 9C).



Obr. 9. HPLC stanovení (A) MDA jako markeru lipoperoxidace myokardu LK a (B) obsahu oxidované formy glutathionu (GSSG) v myokardu LK. (C) Relativní exprese NADPH oxidázy 2 (NOX2) v myokardu LK. Statistická signifikance (ANOVA, $p \leq 0,05$) v porovnání s (k) kontrolní, (d) DAU skupinou a časnou DEX intervencí (1).

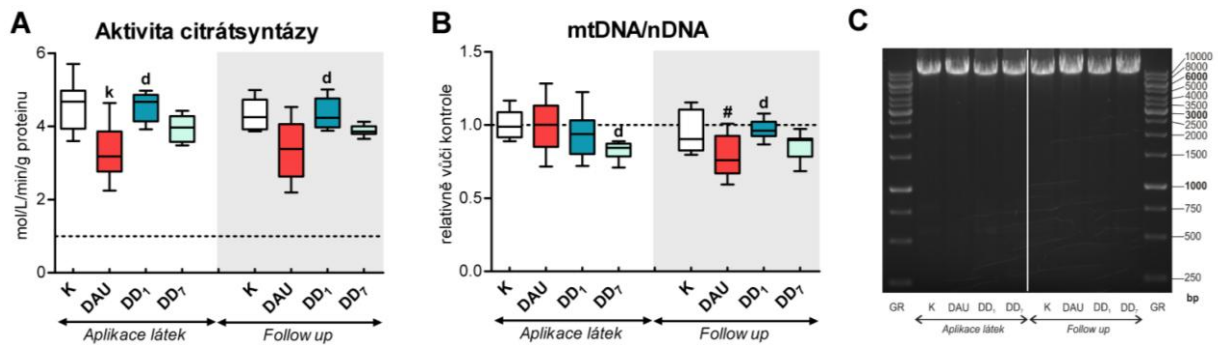
U žádné z hodnocených skupin ale nebyla zjištěná koordinovaná aktivace Nrf2 signální dráhy. Množství aktivního Nrf2 v nukleární frakci myokardu LK nezaznamenalo žádnou koordinovanou změnu a nebylo zjištěno ani významné zvýšení exprese cílových genů tohoto transkripčního faktoru. Jedinou výjimkou byla HO1, jejíž exprese byla významně indukována DAU na konci podávání látek a tato změna přetrvávala až do konce FU. Podání DEX tomuto jevu dokázalo zabránit (obr. 10), přičemž i na tomto parametru byl patrný rozdíl mezi časnou a odloženou kardioprotektivní intervencí. Obdobné výsledky byly zjištěny u BVR A, jako dalšího člena této kaskády. Protože podle získaných dat nebyla indukce exprese HO1 řízená prostřednictvím Nrf2, studovali jsme i možné uplatnění HIF1 α – jako dalšího transkripčního faktoru, který expresi HO1 řídí. Zjistili jsme významnou DAU navozenou indukcí genové exprese HIF1 α i množství jeho proteinu v nukleární frakci přetrvávající v obou případech i v období FU. Podávání DEX dokázalo tomuto zvýšení zabránit (obr. 10B,C). Studium exprese ALAS1, klíčového enzymu pro syntézu hemu uvnitř mitochondrií, byla výrazně snížena po podávání DAU ($p < 0,05$) a kardioprotektivní intervence pomocí DEX této změně dokázala zabránit ($p < 0,05$). Další analýzy pak potvrdily, že časná kardioprotektivní intervence je schopna významně ($p < 0,05$) zabránit snížení exprese dalších antioxidantních a cytoprotektivních molekul jako jsou MnSOD, peroxiredoxin 3 či NQO1.



Obr. 10 Relativní exprese (A) hemoxygenázy 1 a (B) HIF1 α v myokardu LK. (C) Stanovení relativního množství proteinu HIF1 α v nukleární frakci v homogenátu myokardu LK. Statistická signifikance (ANOVA, $p \leq 0,05$) v porovnání s (k) kontrolní, (d) DAU skupinou a časnou DEX intervencí (1). Nanáška proteinu byla kontrolována barvením Ponceau S.

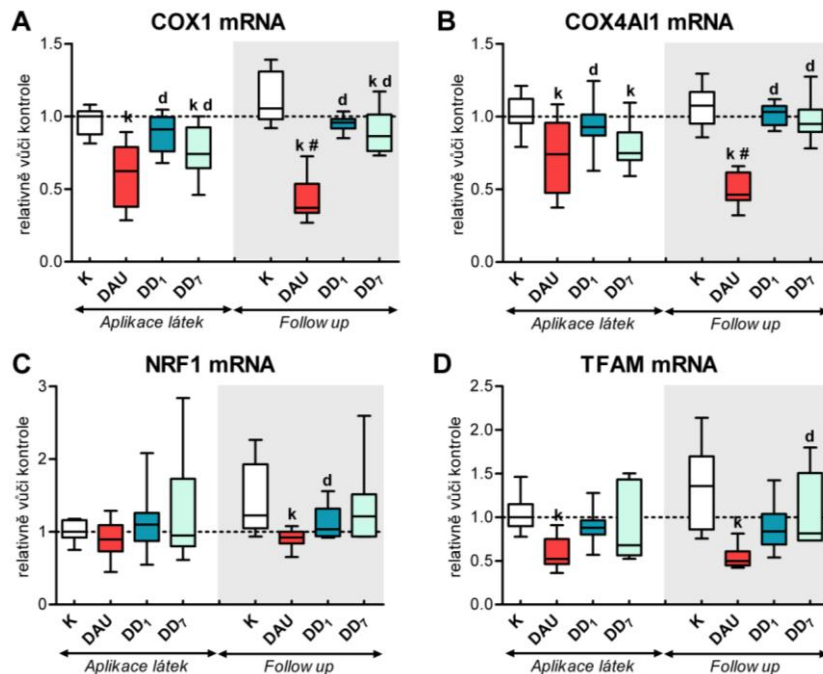
Ochrana před poškozením mitochondrií

Rozdílný účinek obou kardioprotektivních intervencí byl zjištěn též na úrovni ochrany před poškozením mitochondrií navozeným podáváním DAU. Například stanovení aktivity citrát syntázy naznačilo, že pouze časná kardioprotektivní intervence umožňuje účinně zabránit ztrátě mitochondrií v myokardu LK (obr. 11A). Analýza relativního zastoupení mtDNA pak identifikovala významnou změnu studovaného parametru (mtDNA/nDNA) v důsledku expozice DAU až v období FU. Časná kardioprotektivní intervence tomuto ději dovedla zcela zabránit (obr. 11B), což ale nebyl případ odložené kardioprotektivní intervence. Studium výskytu tzv. běžných delecí v mtDNA pomocí *long range* PCR neshledal významný výskyt těchto a obdobných mutací v myokardu zvířat exponovaných ANT a podání DEX nemělo na tento parametr žádný vliv.



Obr. 11 (A) Hodnocení aktivity citrátasyntázy, (B) relativní poměr množství mitochondriální DNA a nukleární DNA a (C) analýza tzv. běžných delečních mutací (common deletion) v mitochondriálním genomu myokardu LK. Statistická signifikance (ANOVA, $p \leq 0,05$) v porovnání s (k) kontrolní, (d) DAU skupinou a časnou DEX intervencí (1). Long-range PCR reakce amplifikující 9460 bp dlouhý úsek mtDNA, ve kterém se vyskytují tzv. běžné deleční mutace. Produkty byly separovány na agarózovém gelu a detekovány pomocí ethidium bromidu. Pro určení velikosti produktu byl použit standard GeneRuler 1 kb DNA Ladder (GR). V případě výskytu tzv. běžných delečních mutací, nebo jiných delečních změn v analyzovaném úseku mtDNA by byl normálního PCR produktu detekován i PCR produkt o výrazně nižším množství páru bází (bp).

Podání DEX také zabránilo poruše genové exprese podjednotek komplexu IV dýchacího řetězce navozené DAU. Tento účinek byl stejně vyjádřen u podjednotek kódovaných mitochondriálním (COX1) i nukleárním genomem (COX4) (obr. 12A,B). Obdobné výsledky byly získány i u podjednotek komplexu I, přičemž poněkud lepší výsledky byly opět dosaženy při užití časné kardioprotektivní intervence. Tyto výsledky byly spojeny s prevencí změn v transkripčních faktorech NRF1 a TFAM (obr. 12C,D), které řídí expresi podjednotek dýchacího řetězce z mitochondriálního a nukleárního genomu v rámci procesu mitochondriální biogeneze.



Obr. 12 Hodnocení exprese podjednotek komplexu IV dýchacího řetězce a transkripčních faktorů kaskády mitochondriální biogeneze v myokardu LK. Podjednotky komplexu IV kódované (A) mitochondriálním (COX1) a (B) nukleárním (COX4) genomem. Relativní genová exprese transkripčních faktorů (C) nukleární respiračního faktoru 1 (NRF1) a (D) mitochondriálního transkripčního faktoru A (TFAM). Statistická signifikance (ANOVA, $p \leq 0,05$) v porovnání s (k) kontrolní, (d) DAU skupinou a (#) v porovnání s hodnotami na konci podávání látek v dané skupině.

7 DISKUZE

Kardiotoxicita způsobená antracyklinovými (ANT) antibiotiky představuje již bezmála půl století závažný klinický problém. Navzdory riziku rozvoje kardiotoxicity představují ANT díky své vysoké terapeutické účinnosti a šíři protinádorového spektra nepostradatelnou součástí moderní onkologické léčby. ANT jsou v klinické praxi většinou i kombinovány s jinými protinádorovými léčivy, která však mohou mít taktéž kardiotoxický potenciál, což se týká i novější biologické léčby (např. trastuzumab). Při jejich kombinaci s ANT pak může dojít k rozvoji vážného srdečního selhání, i když užitá kumulativní dávka ANT byla relativně nízká (Force a kol. 2007; Gianni a kol. 2007). Navzdory několika dekadám klinického a experimentálního výzkumu se však dosud nepodařilo popsat molekulární mechanismy zodpovědné za rozvoj chronické ANT kardiotoxicity. Nejčastěji bývá tato toxicita spojována s indukcí oxidačního stresu a přímým oxidačním poškozením jednotlivých biomolekul kardiomyocytů (Menna a kol. 2012).

V této dizertační práci byla chronická ANT kardiotoxicita navozena opakovaným podáváním DAU u králíka (3 mg/kg, 1x týdně po 10 týdnů) a zvířata byla sledována dalších 10 týdnů po ukončení expozice, tzv. *follow up* (FU). Výhodou tohoto prodloužení je možnost hodnotit komplexně vývoj cytostatikem navozených změn, možnost zapojení kompenzačních mechanismů a určit charakter kardioprotektivního účinku studované látky. Podávání DAU vedlo k signifikantnímu rozvoji systolické dysfunkce již v průběhu aplikace látek a u většiny pokusných zvířat došlo v průběhu následného sledování (FU) k další progresi poškození směrem k městnavému srdečnímu selhání. Tato progresi poškození si u většiny zvířat vyžádala předčasné ukončení pokusu dle protokolu studie (tj. při poklesu LVFS < 20%). Nárůst plazmatických koncentrací srdečního troponinu T již v průběhu podávání DAU svědčil o degenerativním poškození kardiomyocytů, které pokračovalo i několik týdnů po ukončení expozice DAU v období FU a tento děj patrně souvisels progresí dysfunkce LK.

V této dizertační práci byl zjištěn výrazný vzestup markeru lipoperoxidace (MDA) v myokardu LK na konci podávání ANT, který se dále zvyšoval v období FU. Toto pozorování naznačuje, že nezanedbatelná část peroxidačního poškození lipidů probíhá až po vyloučení ANT z organismu, tj. dle všeho až sekundárně bez přímého působení ANT. Ačkoliv byla zjištěna významná asociace mezi obsahem MDA a mírou systolické dysfunkce v myokardu LK, nízký korelační koeficient svědčí pouze o velmi slabé závislosti, který nenaznačuje přímou a exekutivní roli peroxidačního poškození lipidů myokardu LK v rozvoji ANT kardiotoxicity, jak je předpokládáno ve většině dostupné literatury (Keizer a kol. 1990; Minotti a kol. 2004; Štěrbá a kol. 2013). Přítomnost oxidačního inzultu naznačuje také pozorované zvýšené množství oxidovaného glutathionu (GSSG) přetrvávající i v období FU. Avšak absence jakékoliv změny v poměru oxidované a redukované formy glutathionu (GSSG/GSH) svědčí o tom, že glutathionový systém zůstává relativně kompetentní. Proti přímé účasti dysfunkčního glutathionového systému v rozvoji funkčního poškození LK svědčí i závěry provedených korelačních analýz, které nenašly žádnou souvislost mezi daným poškozením a poměrem GSSG/GSH. Toto pozorování patrně do značné míry zpochybňuje i patogenetický význam oxidačního stresu na rozvoji chronické ANT kardiotoxicity, neboť za těchto podmínek by ke změně v inkriminovaném poměru GSSG/GSH mělo dojít. Tyto výsledky odpovídají závěrům naší nedávné práce hodnotící účinek DAU kardiotoxicity na homeostázu glutathionu v podmínkách *in vitro* a *in vivo* (Vávrová a kol. 2011). Také v této studii nebyl nalezen žádný vliv ANT na klíčový poměr GSSG/GSH, ačkoliv byla pro analýzu použita zcela odlišná metoda (enzymatická metoda vs. HPLC stanovení použité v této dizertační práci). V práci Vávrová a kol. (2011) jsme také prokázali, že deplece glutathionu *in vitro* neměla žádný vliv na toxicitu ANT vůči H9c2 kardiomyoblastům. Výsledky obou těchto prací tak mohou vysvětlit absenci kardioprotektivního účinku acetylcysteinu na modelech chronické ANT kardiotoxicity (Herman a kol. 1985), jakož i v klinických studiích (Dresdale a kol. 1982).

V případě významného oxidačního stresu lze předpokládat aktivaci antioxidantní a cytoprotektivní kaskády řízené pomocí Nrf2 (Baird a Dinkova-Kostova 2011). V našich experimentech jsme však po opakovaném podávání ANT nezjistili žádnou aktivaci Nrf2 kaskády a stejně tak ani zvýšenou expresi jeho cílových genů. Naopak u řady z nich (např. MnSOD, NQO1 a peroxiredoxin 3) jsme pozorovali významné snížení exprese, což naznačuje, že Nrf2 signální kaskáda nehraje významnou úlohu v rozvoji chronické ANT kardiotoxicity. Lze samozřejmě uvažovat i o časnější aktivaci této kaskády v rozmezí hodin či několika dnů po podání ANT, což v této práci nebylo s ohledem na použité schéma experimentu studováno, nicméně naše pilotní data (dosud nepublikované výsledky) nenaznačují ani tuto variantu.

Je tedy možné, že buď oxidační inzult navozený ANT nedosahuje takové intenzity, aby aktivoval Nrf2 kaskádu, nebo by mohl oxidační stres primárně probíhat v některém z buněčných kompartmentů (např. v mitochondriích) s minimálním přesahem na úroveň celé buňky, což s ohledem na dostupné informace nelze vyloučit.

Mitochondrie jsou známým cílem ANT kardiotoxicity, kde mohou významně poškozovat jednotlivé součásti dýchacího řetězce (Davies a Doroshov 1986; Lebrecht a Walker 2007; Lebrecht a kol. 2003; Ohkura a kol. 2003; Štěrbá a kol. 2011). V souladu s tím jsme pozorovali významnou poruchu mitochondriální respirace na úrovni komplexu I, III a IV. V případě prvních dvou komplexů bylo ovšem při respirometrickém stanovení zjištěno signifikantní snížení jejich aktivity až v období FU po ukončení expozice DAU. Nicméně při enzymatickém stanovení aktivity komplexu I v tkáňové frakci bohaté na mitochondrie byla pozorována snížená aktivita již na konci expozice DAU. Tento výsledek více odpovídá literárním údajům (Ohkura a kol. 2003) a výsledkům, které jsme na našem modelu získali v předchozí proteomické studii (Štěrbá a kol. 2011). Spolu s poškozením oxidační fosforylace byla pozorována i snížená exprese klíčového transportního proteinu pro makroergní fosfáty (ANT1), který zajišťuje jejich transport z mitochondriální matrix do cytoplazmy, což je v souladu s naší předchozí proteomickou studií a dalšími pracemi (Cheneval a kol. 1983; Štěrbá a kol. 2011; Tokarska-Schlattner a kol. 2006) a svědčí o komplexním poškození celé buněčné energetiky vlivem chronické ANT kardiotoxicity.

Přesná příčina pozorovaného poškození mitochondrií a buněčné energetiky po expozici ANT zůstává zatím nejasná. V pracích Lebrechta a kol. (Lebrecht a Walker 2007; Lebrecht a kol. 2003, 2010) byl tento děj opakovaně spojován s poškozením mtDNA tzv. běžnými delečními mutacemi a následným negativním ovlivněním exprese podjednotek komplexu I kódovaných mitochondriálním genomem. Výsledky uvedené v této dizertační práci ovšem naznačují, že tento mechanismus patrně nehraje v rozvoji časných forem chronické ANT kardiotoxicity zásadní roli, neboť v našich podmínkách došlo nejenom ke snížení exprese mitochondriálně kódovaných podjednotek, ale i těch kódovaných nukleárním genomem. Tento fakt potvrzuje i část naší studie s DEX, kde jsme se pokusili vyskyt běžných delečních mutací v mtDNA hodnotit přímo pomocí PCR amplifikace dlouhého úseku mtDNA, ve kterém byly dané mutace po expozici DAU opakovaně popisovány v pracích Lebrechta a kol.. Získané výsledky pak ukázaly, že chronická ANT kardiotoxicita nemusí být spojena se vznikem běžných delecí v mtDNA ani jiných rozsáhlých mutačních změn v analyzovaném úseku. V našich pokusech jsme však zjistili pokles relativního zastoupení mtDNA v myokardu LK, nicméně tento jev byl významný až v následném období po ukončení expozice DAU, tedy v době, kdy již byla ANT kardiotoxicita značně rozvinuta a snížena exprese mtDNA i nDNA kódovaných podjednotek dýchacího řetězce. Naše výsledky proto naznačují, že poškození mtDNA patrně nehraje ústřední úlohu v mechanismu rozvoje časných forem ANT kardiotoxicity.

Pozorované rozsáhlé poškození mitochondrií a buněčné energetiky obvykle aktivuje proces mitochondriální biogeneze, který by mohl pozorovaný deficit kompenzovat (Rimbaud a kol. 2009; Ventura-Clapier a kol. 2011). Překvapivě jsme v našich pokusech nezaznamenaly žádný náznak koordinované aktivace mitochondriální biogeneze a exprese několika základních členů této kaskády vykazovala naopak pokles, zejména v období po ukončení expozice ANT. Nejvýznamnější snížení exprese, které se jako jediné významně projevilo již na konci podávání DAU, bylo pozorováno v případě transkripčního faktoru TFAM, zodpovědného za koordinaci exprese podjednotek dýchacího řetězce mtDNA i nDNA a podílí se též na udržování počtu kopií mtDNA. Je možné, že významný pokles mtDNA v období po ukončení expozice cytostatikem může se sníženou expresí TFAM souviset. Klíčové regulátory celé kaskády, PGC1 α a nukleární respirační faktor 1 (NRF1) vykazovaly menší změnu, která se projevila pouze při porovnání s kontrolní skupinou v období FU, kdy byl pozorován mírný vzestup exprese těchto proteinů, který patrně souvisí s významným prodloužením experimentu (a stářím pokusných zvířat). Ve skupinách zvířat dostávajících DAU však žádné takové zvýšení pozorováno nebylo. Vzhledem k tomu, že mitochondriální funkce byla předchozím podáváním DAU již významně poškozena, je možné, že by se tento relativní deficit mitochondriální biogeneze v období FU mohl podílet na progresi kardiotoxicity a srdečního selhání právě díky nemožnosti adekvátní kompenzace tohoto poškození. Tuto naši domněnku potvrzuje i recentní práce Zhang a kol. (2012), která spojuje ANT navozené poškození nukleárního genomu kardiomyocytů s poruchou mitochondriální biogeneze a rozvojem mitochondriálního poškození, avšak detaily tohoto procesu zatím zůstávají neznámé.

Naše výsledky tedy potvrdily, že rozvinutá chronická ANT kardiotoxicita představuje ireverzibilní poškození myokardu směřující k těžkému srdečnímu selhání, což je v souladu s údaji z klinické praxe. Možnosti léčby tohoto stavu jsou velmi omezené s nepříznivou prognózou pacientů, i přes intenzivní léčbu srdečního selhání (Menna a kol. 2012; Minotti 2010). Mezi nejperspektivnější strategie ochrany myokardu před ANT kardiotoxicitou v klinické praxi patří farmakologické kardioprotekce. Použití klasických antioxidantů a zhášeců ROS (jako je acetylcystein, vitamín E nebo různé deriváty flavonoidů) však nepřineslo významný protektivní účinek při hodnocení na modelech chronické ANT kardiotoxicity, jakož i v klinických podmínkách (Berthiaume a kol. 2005; Breed a kol. 1980; Dorr 1996; Herman a kol. 1994; Legha a kol. 1982; Popelová a kol. 2008). Další studovanou skupinou látek byly chelátory železa (deferoxamin, deferipron, aroylhydrazony), které by mohly vyvázáním redoxaktivních iontů železa předejít produkci vysoce toxických hydroxylových radikálů (Keizer a kol. 1990; Štěrba a kol. 2013; Šimůnek a kol. 2009). Tato strategie se zdála být efektivnější než relativně obtížné zhášení vysoce reaktivních forem ROS již v myokardu vzniklých. Studované chelátory železa jako deferoxamin (Saad a kol. 2001, 2001) nebo deferipron (Xu a kol. 2006) vykazovaly protektivní působení proti ANT v *in vitro* experimentech, ale při použití relevantního modelu chronické ANT kardiotoxicity nebyl zjištěn žádný kardioprotektivní účinek (Herman a kol. 1994; Popelová a kol. 2008). Naše laboratoř také v minulosti zkoumala kardioprotektivní účinek aroylhydrazonových chelátorů železa (PIH, SIH a o-108). Ačkoliv tyto látky vykazovaly významný protektivní účinek proti modelovému oxidačnímu stresu navozenému u izolovaných kardiomyocytů inkubací s peroxidem vodíku, měly pouze omezený kardioprotektivní účinek vůči ANT kardiotoxicitě *in vitro* (Šimůnek a kol. 2008) a *in vivo* (Štěrba a kol. 2006, 2007) bez zjevné dávkové závislosti.

Jedinou látkou s jasně prokázaným kardioprotektivním účinkem vůči chronické ANT kardiotoxicitě v experimentálních (Herman a Ferrans 1998; Štěrba a kol. 2013) i klinických podmínkách (Lipshultz a kol. 2010; van Dalen a kol. 2011; Zerra a kol. 2013) tak zůstává dexrazoxan (DEX). Současná klinická doporučení však omezují použití DEX pouze na pacienty, u kterých byla překročena riziková kumulativní dávka ANT 300 mg/m² (Hensley a kol. 2009). Toto doporučení souvisí s výsledky III. fáze klinického hodnocení DEX (Swain a kol. 1997b), kde bylo pozorováno ovlivnění jednoho z parametrů protinádorové účinnosti ANT. Pozdější analýza těchto výsledků ale naznačila, že k tomuto výsledku došlo díky neobvykle vysoké odpovědi u skupiny s placebem neodpovídající předchozím nálezům (Swain a Vici 2004). Navíc ani metaanalýzy rozsáhlých klinických studií žádné ovlivnění protinádorové účinnosti nepotvrdily (van Dalen a kol. 2011; Zerra a kol. 2013). Klinická doporučení ovšem zůstávají beze změny, navzdory tomu, že je čím dál více akceptován názor, že k určitému ultrastrukturálnímu poškození kardiomyocytů dochází s každou dávkou ANT (Ewer a Benjamin 2006; Menna a kol. 2012).

V další části této dizertační práce jsme se proto zabývali hodnocením kardioprotektivního účinku DEX při jeho podání s každou dávkou ANT (časná kardioprotektivní intervence) v porovnání s podáním DEX dle současných doporučení, tj. po překročení kumulativní dávky DAU 300 mg/m² (odložená kardioprotektivní intervence). Získané výsledky potvrdily, že obě schémata podání DEX jsou schopná zabránit rozvoji těžkého srdečního selhání, což potvrdilo zejména kompletní přežití zvířat do konce celého pokusu (FU) a absence výrazných patologických změn v pitevním nálezu. Časná kardioprotektivní intervence byla ale schopna dlouhodobě a kompletně zabránit rozvoji systolické dysfunkce v průběhu celého pokusu, zatímco odložené schéma podání vykazovalo významně nižší účinnost. Významný kardioprotektivní potenciál časně kardioprotektivní intervence potvrzuje i schopnost zcela předejít nárůstu plazmatických koncentrací srdečního troponinu T v průběhu celého pokusu. Naproti tomu výsledky odložené kardioprotektivní intervence pak zřetelně dokládají, že expozice myokardu dávkám do 300 mg/m² DAU je u králíka spojena s významným poškozením myokardu. Nicméně nasazením DEX od zmíněné kumulativní dávky bylo možné zamezit progresi tohoto poškození, a to i v průběhu následného dlouhodobého sledování po ukončení expozice oběma látkám. Histopatologická analýza myokardu LK pak potvrzuje přednosti časně kardioprotektivní intervence, která dovedla téměř kompletně zabránit typickým histopatologickým změnám navozeným DAU. Naproti tomu použití odložené kardioprotektivní intervence nezabránilo rozvoji degenerativního poškození myokardu navozeného DAU a z dosažených výsledků lze usuzovat na to, že doporučené schéma podávání DEX bylo schopno pouze zabránit dalšímu rozvoji degenerativních změn. Podání DEX také umožnilo částečné odhojení pokročilých degenerativních změn v myokardu a tento děj byl završen v období FU. Vzhledem k tomu, že v současnosti neexistuje žádný solidní důkaz o významném ovlivnění účinnosti ANT chemoterapie působením DEX, lze konstatovat,

že současná doporučení pro užití DEX v klinické praxi by zasluhovala další diskuzi a eventuální přehodnocení.

Dexrazoxan lze považovat za klíč k pochopení podstaty chronické ANT kardiotoxicity a analýza vzorků myokardu s téměř úplnou a částečnou protekcí by mohla pomoci identifikovat mechanismy, na kterých je ochrana myokardu pomocí DEX založena. Hodnocení lipoperoxidace a následné korelační analýzy ukázalo, že vynikající ochrana myokardu DEX vykazuje pouze velmi slabou souvislost s mírou lipoperoxidace na konci podávání látek, což příliš nesvědčí o přímém a kauzálním vztahu tohoto jevu ke kardiotoxicitě, která je ve stejném období v DAU skupině již evidentní. V naší předchozí studii nebyla dokonce mezi těmito parametry nalezena žádná souvislost (Popelová a kol. 2009). Pozorovaný protektivní účinek DEX vůči DAU navozené lipoperoxidaci myokardu i nárůstu oxidovaného glutathionu v následujícím období FU naznačují, že prooxidační změny mají spíše pozdní a sekundární charakter, než aby byly přímými a primárními determinanty rozvoje poškození myokardu v časnějších fázích rozvoje kardiotoxicity. Odložená kardioprotektivní intervence byla v prevenci výše zmíněných patologických jevů méně účinná, což by mohlo vysvětlovat i zaznamenané vyšší hodnoty markerů oxidačního stresu.

Dále jsme zjistili, že v závislosti na užitém schématu podávání byl DEX schopen zabránit ANT navozené aktivaci genové exprese HO1 a dalších enzymů a proteinů spojených s degradací hemu v myokardu LK, přičemž zároveň inhiboval i negativní vliv cytostatika na mitochondriální syntézu hemu. Expresce HO1 může být aktivována oxidačním stresem prostřednictvím Nrf2 kaskády (Baird a Dinkova-Kostova 2011). Protože však tato kaskáda nebyla v našich experimentech významně ovlivněna, zaměřili jsme se na možnou roli transkripčního faktoru HIF1 α v indukci exprese potenciálně protektivního HO1 (Peers a Steele 2011). Naše výsledky ukazují, že exprese HIF1 α i jeho množství v nukleární frakci je při opakovaném podávání ANT výrazně zvýšená a protekce pomocí DEX tomuto jevu předchází.

Časná kardioprotektivní intervence byla též účinnější v ochraně myokardu před DAU navozeným poklesem množství mitochondrií, poklesem mtDNA a poruchou exprese podjednotek dýchacího řetězce (mtDNA i nDNA kódovaných). Na rozdíl od studie Lebrechta a kol. (Lebrecht a kol. 2007) jsme ovšem nepotvrdili, že by kardioprotektivní účinek DEX souvisel s protekcí mitochondriální DNA před navozením tzv. běžných delečních mutací. Protože DEX předešel i změnám v expresi transkripčního faktoru TFAM a v období FU i NRF1, nelze vyloučit, že kardioprotektivní účinek je spojen s prevencí poruchy v mitochondriální biogenezi. Nedávná průlomová práce pak naznačila přímou souvislost patogeneze chronické ANT kardiotoxicity s molekulou Top2 β a následnou poruchou mitochondriální biogeneze (Zhang a kol. 2012). Genetická delece Top2 β totiž navodila rezistenci myokardu vůči toxicitě ANT a předešla poruše v mitochondriální biogenezi. V tomto kontextu je třeba poznamenat, že DEX je známým inhibátorem obou izoform Top2 a předchozí experimenty ukázaly, že expozice DEX vede ke snížení množství proteinu Top2b v buňkách (Lyu a kol. 2007). Tato data tedy naznačují možný alternativní mechanismus kardioprotektivního účinku DEX.

Výsledky dosažené v rámci této dizertační práce poskytují nové důležité poznatky o molekulárních dějích, které souvisejí s rozvojem chronické ANT kardiotoxicity a DEX navozené kardioprotekce. Další detailní studium těchto dějů by mohlo významně posunout hranice porozumění mechanismům zodpovědných za vznik chronické ANT kardiotoxicity a kardioprotekce pomocí DEX, a přispět tak k optimalizaci možnosti farmakologické ochrany myokardu v klinické praxi.

8 ZÁVĚRY

- Opakované podávání daunorubicinu vedlo k rozvoji systolické dysfunkce, která v období následného sledování po ukončení expozice cytostatikem (*follow up*) progredovala do městnavého srdečního selhání spojeného s významnou dilatací levé komory. Tato data tedy potvrzují, že poškození myokardu antracykliny je do značné míry ireverzibilní.
- Vzestup plazmatických koncentrací srdečního troponinu T pozorovaný v průběhu podávání daunorubicinu dokládá postupné poškození kardiomyocytů v závislosti na kumulativní dávce cytostatika, zatímco přetrvávající zvýšené koncentrace v následném období nasvědčují tomu, že toxické poškození myokardu pokračuje i několik týdnů po ukončení expozice daunorubicinem.
- Podávání daunorubicinu bylo spojeno s prooxidačním působením v myokardu, zvláště pak v období po ukončení expozice daunorubicinem, nicméně málo těsná či chybějící asociace markerů oxidačního stresu s parametry toxicity nenasvědčuje přímé exekutivní úloze globálního oxidačního stresu v rozvoji chronické antracyklinové kardiotoxicity.
- Chronická daunorubicinová kardiotoxicita nebyla spojena s koordinovanou aktivací antioxidační a cytoprotektivní dráhy řízené Nrf2; tento transkripční faktor patrně nesehrává významnou roli v rozvoji toxického poškození myokardu antracykliny.
- Daunorubicinem navozené poškození mitochondrií, oxidační fosforylace a snížení exprese podjednotek komplexů dýchacího řetězce, jakož i dalších mitochondriálních proteinů nebylo provázeno aktivací protektivní kaskády mitochondriální biogeneze. Naopak byly patrné známky útlumu této dráhy, zvláště v průběhu následného sledování, což by mohlo souviset s progresí toxického poškození a rozvojem srdečního selhání v tomto období.
- Obě schémata podávání dexrazoxanu dokázala zabránit rozvoji těžkých forem městnavého srdečního selhání a předčasným úhynům pokusných zvířat, nicméně účinnost obou kardioprotektivních intervencí byla významně odlišná.
- Časná kardioprotektivní intervence pomocí dexrazoxanu byla schopna zcela zabránit vzniku degenerativních změn v myokardu, vzestupu srdečních troponinů T v plazmě a rozvoji systolické i diastolické dysfunkce levé komory.
- Odložená kardioprotektivní intervence pomocí dexrazoxanu (od kumulativní dávky 300 mg/m² daunorubicinu) byla proti tomu významně méně účinná z hlediska většiny studovaných parametrů. Získané výsledky dokumentují, že tento přístup pouze brání další progresi uvedených změn směrem k městnavému srdečního selhání, nicméně myokard již může trpět významným subklinickým poškozením.
- Kardioprotektivní účinek dexrazoxanu nebyl asociován s významnou změnou markeru oxidačního stresu na konci expozice daunorubicinem, nicméně signifikantní účinek dexrazoxanu na lipoperoxidaci myokardu byl pozorován až v období po ukončení expozice cytostatikem. Tato data napovídají tomu, že mechanismus kardioprotektivního účinku dexrazoxanu nemusí přímo souviset s ochranou před oxidačním stresem navozeným daunorubicinem a že tento děj může mít spíše sekundární význam v rozvoji chronické antracyklinové kardiotoxicity.
- V závislosti na použitém schématu podávání dexrazoxanu bylo možné předejít daunorubicinem navozenému zvýšení exprese hemoxygenázy 1 v myokardu levé komory, přičemž tento jev by mohl souviset s aktivací transkripčního faktoru HIF1 α . Úloha HIF1 α a hemoxygenázy 1 proto zasluhuje další studium.
- Dexrazoxan byl schopen zabránit daunorubicinem navozenému poškození mitochondrií a poruchám v expresi podjednotek dýchacího řetězce kódovaných nukleárním i mitochondriálním genomem. Výsledky této práce nepodporují hypotézu, že by mechanismus kardioprotektivního účinku dexrazoxanu byl založen na prevenci poškození mitochondriální DNA před tzv. běžnými delekcemi navozenými opakovaným podáváním antracyklinů.
- Odložená kardioprotektivní intervence dle současných klinických doporučení může být proto z hlediska kardiiovaskulárního rizika suboptimální a evidentně nedovoluje plně využít kardioprotektivní potenciál dexrazoxanu. Vzhledem k tomu, že dostupné informace nepotvrzují

negativní vliv dexrazoxanu na protinádorový účinek antracyklinů v klinické praxi, data obsažená v této dizertační práci by mohla přispět k odborné diskuzi o optimalizaci schématu podání dexrazoxanu.

- Kardioprotektivní účinek dexrazoxanu si zasluhuje další studium, neboť může být klíčem k pochopení mechanismů zodpovědných za rozvoj antracyklinové kardiotoxicity a mohl by přispět k vývoji nových účinných strategií pro ochranu myokardu před tímto poškozením.

9 POUŽITÁ LITERATURA

- Aleman B.M.P., van den Belt-Dusebout A.W., De Bruin M.L., van 't Veer M.B., Baaijens M.H.A., de Boer J.P., Hart A.A.M., Klokman W.J., Kuenen M.A., Ouwens G.M., Bartelink H., van Leeuwen F.E. 2007. Late cardiotoxicity after treatment for Hodgkin lymphoma. *Blood* 109(5):1878–1886.
- Armstrong G.T., Liu Q., Yasui Y., Neglia J.P., Leisenring W., Robison L.L., Mertens A.C. 2009. Late mortality among 5-year survivors of childhood cancer: a summary from the Childhood Cancer Survivor Study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27(14):2328–2338.
- Baird L., Dinkova-Kostova A.T. 2011. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch. Toxicol.* 85(4):241–272.
- Berthiaume J.M., Oliveira P.J., Fariss M.W., Wallace K.B. 2005. Dietary vitamin E decreases doxorubicin-induced oxidative stress without preventing mitochondrial dysfunction. *Cardiovasc. Toxicol.* 5(3):257–267.
- Breed J.G.S., Zimmerman A.N.E., Dormans J.A.M.A., Pinedo H.M. 1980. Failure of the Antioxidant Vitamin E to Protect against Adriamycin-induced Cardiotoxicity in the Rabbit. *Cancer Res.* 40(6):2033–2038.
- Cvetković R.S., Scott L.J. 2005. Dexrazoxane : a review of its use for cardioprotection during anthracycline chemotherapy. *Drugs* 65(7):1005–1024.
- Davies K.J., Doroshow J.H. 1986. Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. I. Anthracycline radical formation by NADH dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 261(7):3060–3067.
- De Sousa E., Veksler V., Minajeva A., Kaasik A., Mateo P., Mayoux E., Hoerter J., Bigard X., Serrurier B., Ventura-Clapier R. 1999. Subcellular creatine kinase alterations. Implications in heart failure. *Circ. Res.* 85(1):68–76.
- Dorr R.T. 1996. Cytoprotective agents for anthracyclines. *Semin. Oncol.* 23(4 Suppl 8):23–34.
- Dresdale A.R., Barr L.H., Bonow R.O., Mathisen D.J., Myers C.E., Schwartz D.E., d' Angelo T., Rosenberg S.A. 1982. Prospective randomized study of the role of N-acetyl cysteine in reversing doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Am. J. Clin. Oncol.* 5(6):657–663.
- Esworthy R.S., Chu F.-F., Doroshow J.H. 2001. Analysis of Glutathione-Related Enzymes, in: Bus, J.S., Costa, L.G., Hodgson, E., Lawrence, D.A., Reed, D.J. (Eds.), *Current Protocols in Toxicology*.
- Ewer M.S., Benjamin R.S. 2006. Chapter 2. Doxorubicin cardiotoxicity: Clinical Aspects, Recognition, Monitoring, Treatment and prevention., in: *Cancer and the Heart*.
- Force T., Krause D.S., Van Etten R.A. 2007. Molecular mechanisms of cardiotoxicity of tyrosine kinase inhibition. *Nat. Rev. Cancer* 7(5):332–344.
- Franco V.I., Henkel J.M., Miller T.L., Lipshultz S.E. 2011. Cardiovascular effects in childhood cancer survivors treated with anthracyclines. *Cardiol. Res. Pr.* 2011134679.
- Gianni L., Herman E.H., Lipshultz S.E., Minotti G., Sarvazyan N., Sawyer D.B. 2008. Anthracycline Cardiotoxicity: From Bench to Bedside. *J. Clin. Oncol.* 26(22):3777–3784.
- Gianni L., Salvatorelli E., Minotti G. 2007. Anthracycline cardiotoxicity in breast cancer patients: synergism with trastuzumab and taxanes. *Cardiovasc. Toxicol.* 7(2):67–71.
- Hasinoff B.B., Herman E.H. 2007. Dexrazoxane: how it works in cardiac and tumor cells. Is it a prodrug or is it a drug? *Cardiovasc. Toxicol.* 7(2):140–144.
- Hensley M.L., Hagerty K.L., Kewalramani T., Green D.M., Meropol N.J., Wasserman T.H., Cohen G.I., Emami B., Gradishar W.J., Mitchell R.B., Thigpen J.T., Trotti A., von Hoff D., Schuchter L.M. 2009. American Society of Clinical Oncology 2008 Clinical Practice Guideline Update: Use of Chemotherapy and Radiation Therapy Protectants. *J. Clin. Oncol.* 27(1):127–145.
- Herman E., Ferrans V. 1998. Preclinical animal models of cardiac protection from anthracycline-induced cardiotoxicity. *Semin. Oncol.* 25(4):15–21.
- Herman E.H., Ferrans V.J., Myers C.E., Van Vleet J.F. 1985. 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.* 45(1):276.
- Herman E.H., Zhang J., Ferrans V.J. 1994. Comparison of the protective effects of desferrioxamine and ICRF-187 against doxorubicin-induced toxicity in spontaneously hypertensive rats. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 35(2):93–100.
- Cheneval D., Müller M., Carafoli E. 1983. The mitochondrial phosphate carrier reconstituted in liposomes is inhibited by doxorubicin. *FEBS Lett.* 159(1-2):123–126.
- Janssen A.J.M., Trijbels F.J.M., Sengers R.C.A., Smeitink J.A.M., van den Heuvel L.P., Wintjes L.T.M., Stoltenborg-Hogekamp B.J.M., Rodenburg R.J.T. 2007. Spectrophotometric Assay for Complex I of the Respiratory Chain in Tissue Samples and Cultured Fibroblasts. *Clin. Chem.* 53(4):729–734.
- Jirkovský E., Lenčová-Popelová O., Hroch M., Adamcová M., Mazurová Y., Vávrová J., Mičuda S., Šimůnek T., Geršl V., Štěrba M. 2013. Early and delayed cardioprotective intervention with dexrazoxane each show

- different potential for prevention of chronic anthracycline cardiotoxicity in rabbits. *Toxicology* 311(3):191–204.
- Jirkovsky E., Popelová O., Kriváková-Stanková P., Vávrová A., Hroch M., Hasková P., Brcáková-Dolezelová E., Micuda S., Adamcová M., Šimůnek T., Cervinková Z., Gersl V., Sterba M. 2012. Chronic anthracycline cardiotoxicity: molecular and functional analysis with focus on nuclear factor erythroid 2-related factor 2 and mitochondrial biogenesis pathways. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 343(2):468–478.
- Kand'ár R., Záková P., Lotková H., Kucera O., Cervinková Z. 2007. Determination of reduced and oxidized glutathione in biological samples using liquid chromatography with fluorimetric detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43(4):1382–1387.
- Keizer H.G., Pinedo H.M., Schuurhuis G.J., Joenje H. 1990. Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmacol. Ther.* 47(2):219–231.
- Klener P., Klener P. jr. 2010. *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*, 1. vydání. ed.
- Lebrecht D., Geist A., Ketelsen U.-P., Haberstroh J., Setzer B., Walker U.A. 2007. Dexrazoxane prevents doxorubicin-induced long-term cardiotoxicity and protects myocardial mitochondria from genetic and functional lesions in rats. *Br. J. Pharmacol.* 151(6):771–778.
- Lebrecht D., Kirschnner J., Geist A., Haberstroh J., Walker U.A. 2010. Respiratory chain deficiency precedes the disrupted calcium homeostasis in chronic doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiovasc. Pathol.* 19(5):e167–e174.
- Lebrecht D., Kokkari A., Ketelsen U.-P., Setzer B., Walker U.A. 2005. Tissue-specific mtDNA lesions and radical-associated mitochondrial dysfunction in human hearts exposed to doxorubicin. *J. Pathol.* 207(4):436–444.
- Lebrecht D., Setzer B., Ketelsen U.-P., Haberstroh J., Walker U.A. 2003. Time-Dependent and Tissue-Specific Accumulation of mtDNA and Respiratory Chain Defects in Chronic Doxorubicin Cardiomyopathy. *Circulation* 108(19):2423–2429.
- Lebrecht D., Walker U.A. 2007. Role of mtDNA lesions in anthracycline cardiotoxicity. *Cardiovasc. Toxicol.* 7(2):108–113.
- Legha S.S., Wang Y.M., Mackay B., Ewer M., Hortobagyi G.N., Benjamin R.S., Ali M.K. 1982. Clinical and pharmacologic investigation of the effects of alpha-tocopherol on adriamycin cardiotoxicity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 393:411–418.
- Lipshultz S.E., Colan S.D., Gelber R.D., Perez-Atayde A.R., Sallan S.E., Sanders S.P. 1991. Late cardiac effects of doxorubicin therapy for acute lymphoblastic leukemia in childhood. *N. Engl. J. Med.* 324(12):808–815.
- Lipshultz S.E., Scully R.E., Lipsitz S.R., Sallan S.E., Silverman L.B., Miller T.L., Barry E.V., Asselin B.L., Athale U., Clavell L.A., Larsen E., Moghrabi A., Samson Y., Michon B., Schorin M.A., Cohen H.J., Neuberg D.S., Orav E.J., Colan S.D. 2010. Assessment of dexrazoxane as a cardioprotectant in doxorubicin-treated children with high-risk acute lymphoblastic leukaemia: long-term follow-up of a prospective, randomised, multicentre trial. *Lancet Oncol.* 11(10):950–961.
- Lyu Y.L., Kerrigan J.E., Lin C.-P., Azarova A.M., Tsai Y.-C., Ban Y., Liu L.F. 2007. Topoisomerase II β -Mediated DNA Double-Strand Breaks: Implications in Doxorubicin Cardiotoxicity and Prevention by Dexrazoxane. *Cancer Res.* 67(18):8839–8846.
- Mannervik B. 2001. Measurement of Glutathione Reductase Activity, in: Bus, J.S., Costa, L.G., Hodgson, E., Lawrence, D.A., Reed, D.J. (Eds.), *Current Protocols in Toxicology*.
- Menna P., Paz O.G., Chello M., Covino E., Salvatorelli E., Minotti G. 2012. Anthracycline cardiotoxicity. *Expert Opin. Drug Saf.* 11 Suppl 1S21–36.
- Minotti G. 2010. *Cardiotoxicity of Non-Cardiovascular Drugs*, 1st ed.
- Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., Gianni L. 2004. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.* 56(2):185–229.
- Moghrabi A., Levy D.E., Asselin B., Barr R., Clavell L., Hurwitz C., Samson Y., Schorin M., Dalton V.K., Lipshultz S.E., Neuberg D.S., Gelber R.D., Cohen H.J., Sallan S.E., Silverman L.B. 2007. Results of the Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium Protocol 95-01 for children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 109(3):896–904.
- Ohkura K., Lee J.D., Shimizu H., Nakano A., Uzui H., Horikoshi M., Fujibayashi Y., Yonekura Y., Ueda T. 2003. Mitochondrial complex I activity is reduced in latent adriamycin-induced cardiomyopathy of rat. *Mol. Cell. Biochem.* 248(1):203–208.
- Peers C., Steele D.S. 2011. Carbon monoxide: A vital signalling molecule and potent toxin in the myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* .
- Popelová O., Šterba M., Hašková P., Šimůnek T., Hroch M., Gunčová I., Nachtigal P., Adamcová M., Geršl V., Mazurová Y. 2009. Dexrazoxane-afforded protection against chronic anthracycline cardiotoxicity in vivo: effective rescue of cardiomyocytes from apoptotic cell death. *Br. J. Cancer* 101(5):792–802.

- Popelová O., Štěřba M., Šimůnek T., Mazurová Y., Gunčová I., Hroch M., Adamcová M., Geršl V. 2008. Deferiprone Does Not Protect against Chronic Anthracycline Cardiotoxicity in Vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 326(1):259–269.
- Rimbaud S., Garnier A., Ventura-Clapier R. 2009. Mitochondrial biogenesis in cardiac pathophysiology. *Pharmacol. Reports PR* 61(1):131–138.
- Saad S.Y., Najjar T.A., Al-Rikabi A.C. 2001. The preventive role of deferoxamine against acute doxorubicin-induced cardiac, renal and hepatic toxicity in rats. *Pharmacol. Res.* 43(3):211–218.
- Štěřba M., Popelová O., Vávrová A., Jirkovský E., Kovaříková P., Geršl V., Šimůnek T. 2013. Oxidative stress, redox signaling, and metal chelation in anthracycline cardiotoxicity and pharmacological cardioprotection. *Antioxidants Redox Signal.* 18(8):899–929.
- Suter T.M., Ewer M.S. 2013. Cancer drugs and the heart: importance and management. *Eur. Heart J.* 34(15):1102–1111.
- Swain S.M., Vici P. 2004. The current and future role of dexrazoxane as a cardioprotectant in anthracycline treatment: expert panel review. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 130(1):1–7.
- Swain S.M., Whaley F.S., Gerber M.C., Ewer M.S., Bianchine J.R., Gams R.A. 1997a. Delayed administration of dexrazoxane provides cardioprotection for patients with advanced breast cancer treated with doxorubicin-containing therapy. *J. Clin. Oncol.* 15(4):1333–1340.
- Swain S.M., Whaley F.S., Gerber M.C., Weisberg S., York M., Spicer D., Jones S.E., Wadler S., Desai A., Vogel C., Speyer J., Mittelman A., Reddy S., Pendergrass K., Velez-Garcia E., Ewer M.S., Bianchine J.R., Gams R.A. 1997b. Cardioprotection with dexrazoxane for doxorubicin-containing therapy in advanced breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 15(4):1318–1332.
- Šimůnek T., Štěřba M., Popelová O., Adamcová M., Hrdina R., Geršl V. 2009. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol. Reports PR* 61(1):154–171.
- Šimůnek T., Štěřba M., Popelová O., Kaiserová H., Adamcová M., Hroch M., Hašková P., Poňka P., Geršl V. 2008. Anthracycline toxicity to cardiomyocytes or cancer cells is differently affected by iron chelation with salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone. *Br. J. Pharmacol.* 155(1):138–148.
- Štěřba M., Popelová O., Lenčo J., Fučíková A., Brčáková E., Mazurová Y., Jirkovský E., Šimůnek T., Adamcová M., Mičuda S., Stulík J., Geršl V. 2011. Proteomic insights into chronic anthracycline cardiotoxicity. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 50(5):849–862.
- Štěřba M., Popelová O., Šimůnek T., Mazurová Y., Potáčová A., Adamcová M., Gunčová I., Kaiserová H., Palička V., Poňka P. 2007. Iron chelation-afforded cardioprotection against chronic anthracycline cardiotoxicity: a study of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH). *Toxicology* 235(3):150–166.
- Štěřba M., Popelová O., Šimůnek T., Mazurová Y., Potáčová A., Adamcová M., Kaiserová H., Poňka P., Geršl V. 2006. Cardioprotective Effects of a Novel Iron Chelator, Pyridoxal 2-Chlorobenzoyl Hydrazone, in the Rabbit Model of Daunorubicin-Induced Cardiotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319(3):1336–1347.
- Tokarska-Schlattner M., Zaugg M., Zuppinger C., Wallimann T., Schlattner U. 2006. New insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: the critical role of cellular energetics. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 41(3):389–405.
- Van Dalen E.C., Caron H.N., Dickinson H.O., Kremer L.C. 2011. Cardioprotective interventions for cancer patients receiving anthracyclines. *Cochrane Database Syst. Rev. Online* (6):CD003917.
- Vávrová A., Popelová O., Štěřba M., Jirkovský E., Hašková P., Mertlíková-Kaiserová H., Geršl V., Šimůnek T. 2011. In vivo and in vitro assessment of the role of glutathione antioxidant system in anthracycline-induced cardiotoxicity. *Arch. Toxicol.* 85(5):525–535.
- Ventura-Clapier R., Garnier A., Veksler V., Joubert F. 2011. Bioenergetics of the failing heart. *Biochim. Biophys. Acta* 1813(7):1360–1372.
- Wallace K.B. 2003. Doxorubicin-induced cardiac mitochondrionopathy. *Pharmacol. Toxicol.* 93(3):105–115.
- Wallace K.B. 2007. Adriamycin-induced interference with cardiac mitochondrial calcium homeostasis. *Cardiovasc. Toxicol.* 7(2):101–107.
- Xu L., Jin L., Pan H., Zhang A., Wei G., Li P., Lu W. 2006. Deferiprone protects the isolated atria from cardiotoxicity induced by doxorubicin. *Acta Pharmacol Sin* 27(10):1333–1339.
- Zerra P., Cochran T.R., Franco V.I., Lipshultz S.E. 2013. An expert opinion on pharmacologic approaches to reducing the cardiotoxicity of childhood acute lymphoblastic leukemia therapies. *Expert Opin. Pharmacother.* 14(11):1497–1513.
- Zhang S., Liu X., Bawa-Khalife T., Lu L.-S., Lyu Y.L., Liu L.F., Yeh E.T.H. 2012. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat. Med.* 18(11):1639–1642.

10 PUBLIKAČNÍ ČINNOST

Původní články (celkem - 6, jako první autor - 2, kumulativní IF = 23,757)

Jirkovský E., Lenčová-Popelová O., Hroch M., Adamcová M., Mazurová Y., Vávrová J., Mičuda S., Šimůnek T., Geršl V. and Štěrbá M. Early and delayed cardioprotective intervention with dexrazoxane show different potential for prevention of chronic anthracycline cardiotoxicity and reveal molecular events involved. *Toxicology*. 2013 Sep 15;311(3):191-204. **IF = 4,017**

Jirkovský E., Popelová O., Křiváková-Staňková P., Vávrová A., Hroch M., Hašková P., Brčáková-Doleželová E., Mičuda S., Adamcová M., Šimůnek T., Červinková Z., Geršl V., Štěrbá M. Chronic anthracycline cardiotoxicity: molecular and functional analysis with focus on nuclear factor erythroid 2-related factor 2 and mitochondrial biogenesis pathways. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012 Nov;343(2):468-78. **IF = 3,891**

Vávrová A, Popelová O, Štěrbá M, **Jirkovský E**, Hašková P, Kaiserová H, Geršl V, Šimůnek T. In vivo and in vitro assessment of the role of glutathione antioxidant system in anthracycline-induced cardiotoxicity. *Arch Toxicol*. 2011 May;85(5):525-35. **IF = 4,041**

Nachtigal P, Štěrbá M, Popelová O, Večeřová L, Kudláčková Z, **Jirkovský E**, Geršl V. Daunorubicin does not induce immunohistochemically detectable endothelial dysfunction in rabbit aorta and femoral artery. *Histol Histopathol*. 2011 May;26(5):551-62. **IF = 2,502**

Štěrbá M, Popelová O, Lenčo J, Fučíková A, Brčáková E, Mazurová Y, **Jirkovský E**, Šimůnek T, Adamcová M, Mičuda S, Stulík J, Geršl V. Proteomic insights into chronic anthracycline cardiotoxicity. *J Mol Cell Cardiol*. 2011 Jan 31. 50(5):849-62. **IF = 5,166**

Bendová P, Macková E, Hašková P, Vávrová A, **Jirkovský E**, Štěrbá M, Popelová O, Kalinowski DS, Kovaříková P, Vávrová K, Richardson DR, Šimůnek T. Comparison of Clinically Used and Experimental Iron Chelators for Protection against Oxidative Stress-Induced Cellular Injury. *Chem Res Toxicol*. 2010 Jun 21;23(6):1105-14. **IF = 4,140**

Přehledové články (celkem 1, jako první autor 0, kumulativní IF=7,189)

Štěrbá M, Popelová O, Vávrová A, **Jirkovský E**, Kovaříková P, Geršl V, Šimůnek T. Oxidative stress, redox signaling and metal chelation in anthracycline cardiotoxicity and pharmacological cardioprotection. *Antioxid Redox Signal*. 2013 Mar 10;18(8):899-929. **IF = 7,189**

Statě ve sbornících (celkem 0, jako první autor 0, kumulativní IF=0)

Přednášky a postery na odborných setkáních (celkem - 44, jako hlavní autor 18, z toho přednášek 10)

Jirkovský E, Vávrová A, Hašková P, Šimůnek T. Role of iron in hydrogen peroxide- and tert-butyl hydroperoxide-induced cardiomyoblast cell death. *New Frontiers in Cardiovascular Research, 8th Meeting of France – New EU Members, 16th JMRC Symposium, Krakow, Polsko, 5. – 7. 6. 2008, (posterové sdělení)*

Jirkovský E, Vávrová A, Hašková P, Štěrbá M, Poňka P, Geršl V, Šimůnek T. Iron chelation as an effective cardioprotective strategy against hydrogen peroxide- and tert-butyl hydroperoxide-induced cardiomyoblast cell death. *18th International Conference On Chelation (ICOC) for the Treatment of Thalassaemia, Cancer and other Diseases related to Metal and Free Radical Imbalance and Toxicity, Atény, Řecko, 13. - 16. 12. 2008 (posterové sdělení)*

Jirkovský E, Štěrbá M, Popelová O, Hroch M, Vávrová A, Adamcová M, Geršl V. Chronic anthracycline cardiotoxicity and its follow up. *XXth World Congress of the International Society for Heart Research 2010, 13. - 16. 5. 2010, Kyoto, Japonsko (posterové sdělení)*

Jirkovský E, Štěrbá M, Popelová O, Hroch M, Adamcová M, Vávrová A, Mazurová Y, Šimůnek T, Geršl V. Chronická antracyklinová kardiotoxicita na experimentálním modelu u králíka – studium změn v myokardu levé komory v průběhu a po ukončení expozice cytostatika. *Květinův den – nultý ročník, 3. 6. 2010, Brno (ústní sdělení)*

Jirkovský E, Štěrbá M, Popelová O, Hroch M, Vávrová A, Šimůnek T, Adamcová M, Mazurová Y, Geršl V. Chronic anthracycline cardiotoxicity and its post-treatment follow up on the experimental model in rabbits. *60. Česko-Slovenské farmakologické dny, Hradec Králové, 15. – 17. 9. 2010 (posterové sdělení)*

Jirkovský E., Štěrba M., Popelová O., Hroch M., Vávrová A., Šimůnek T., Adamcová M., Mazurová Y., Geršl V. Study of chronic anthracycline cardiotoxicity on experimental model: focus on changes occurring during long term post-exposure follow up. *9th New Frontiers in Basic Cardiovascular Research Meeting, Toulouse, France, 14. – 17. 10. 2010 (posterové sdělení)*

Jirkovský E., Štěrba M., Popelová O., Hroch M., Adamcová M., Vávrová A., Mazurová Y., Šimůnek T., Geršl V. Chronická antracyklinová kardiotoxicita a studium následných změn v myokardu levé komory po ukončení expozice daunorubicinem. *38. pracovní konference Komise experimentální kardiologie, Dunajská Streda, Slovenská republika, 27. – 29. 10. 2010 (ústní sdělení)*

Jirkovský E., Popelová O., Štěrba M., Adamcová M., Vávrová A., Mazurová Y., Geršl. myocardial alterations in post-exposure follow up of chronic anthracycline cardiotoxicity. *XXX. ISHR European Section Meeting, Haifa, Izrael, 26. – 29. 6. 2011 (posterové sdělení)*

Jirkovský E., Štěrba M., Popelová O., Hroch M., Brčáková E., Mičuda S., Vávrová A., Šimůnek T., Adamcová M., Mazurová Y., Geršl V. Chronic anthracycline cardiotoxicity – persisting molecular and functional changes in post-exposure follow-up period. *61. Česko-Slovenské farmakologické dny, Brno, 14. – 16. 9. 2011 (ústní sdělení)*

Jirkovský E., Štěrba M., Popelová O., Hroch M., Adamcová M., Doleželová-Brčáková E., Staňková P., Vávrová A., Červinková Z., Mičuda S., Šimůnek T., Geršl V. Chronická antracyklinová kardiotoxicita a její vývoj po ukončení léčby: úloha signalizačních cest řízených nrf2 a PGC1-alpha. *39. pracovní konference Komise experimentální kardiologie při České a Slovenské fyziologické společnosti ČLS JEP, Kubova Huť, 12. – 14. 10. 2011 (ústní sdělení)*

Jirkovský E., Popelová O., Hroch M., Doleželová-Brčáková E., Mičuda S., Vávrová A., Šimůnek T., Adamcová M., Geršl V., Štěrba M. Chronic anthracycline cardiotoxicity: Molecular and functional alterations in the post-treatment follow up. *7th Postgraduate Medical Students Conference, Hradec Králové, 17. 10. 2011 (ústní sdělení)*

Jirkovský E., Popelová O., Hroch M., Doleželová-Brčáková E., Mičuda S., Vávrová A., Šimůnek T., Adamcová M., Geršl V., Štěrba M. Chronic anthracycline cardiotoxicity: Molecular and functional alterations in the post-treatment follow up. *8th International Medical Postgraduate Conference Hradec Kralove, Hradec Králové, 10. - 12. 11. 2011 (ústní sdělení)*

Jirkovský E., Popelová O., Hroch M., Adamcová M., Mičuda S., Vávrová A., Šimůnek T., Červinková Z., Geršl V., Štěrba M. Význam Nrf2 a PGC-1a signálních kaskád v rozvoji chronické antracyklinové kardiotoxicity. *88. Fyziologické dny, Hradec Králové, 7. – 9. 2. 2012 (ústní sdělení)*

Jirkovský E., Popelová O., Hroch M., Adamcová M., Mičuda S., Geršl V., Štěrba M.: Vliv schématu podávání dexrazoxanu na jeho kardioprotektivní účinek na modelu chronické antracyklinové kardiotoxicity u králíka při dlouhodobém sledování po ukončení expozice. *Květinův den - 2. ročník, Brno, 31. 5. 2012 (ústní sdělení)*

Jirkovský E., Popelová O., Hroch M., Adamcová M., Mičuda S., Geršl V., Štěrba M. Dexrazoxane dosage schedule and outcomes of cardioprotective interventions on experimental model of chronic anthracycline cardiotoxicity. *10th New Frontiers in Basic Cardiovascular Research: France - New EU Members Meeting, Hradec Králové, 12. – 15. 6. 2012 (posterové sdělení)*

Jirkovský E., Popelová O., Hroch M., Adamcová M., Mičuda S., Geršl V., Štěrba M. Kardioprotektivní účinek dexrazoxanu na experimentálním modelu chronické antracyklinové kardiotoxicity – význam schématu podání. *62. Česko-Slovenské Farmakologické dny, Košice, Slovensko, 25. – 27. 6. 2012 (ústní sdělení)*

Jirkovský E., Popelová O., Hroch M., Vávrová A., Adamcová M., Mičuda S., Šimůnek T., Geršl V., Štěrba M. Chronická antracyklinová kardiotoxicita a vliv schématu podávání dexrazoxanu na kardioprotektivní účinnost u králíka. *40. pracovní konference Komise experimentální kardiologie při České a Slovenské fyziologické společnosti ČLS JEP, Vranovská Ves, 17. – 19. 10. 2012. (ústní sdělení)*

Jirkovský E., Lenčová O., Stariat J, Bureš J, Chládek J, Kovaříková P, Geršl V, Štěrba M. Pharmacokinetics of dexrazoxane and its putative active metabolite in rabbits in relationship to the cardioprotective effects of the drug. *63. Česko-Slovenské farmakologické dny, 11. – 13. 9. 2013, Olomouc (posterové sdělení)*

11 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ALAS1 - γ -aminolevulátsyntáza 1; ARE - *Antioxidant Response Elements*; ANT - antracyklinová antibiotika; ANT1 - adeninnukleotidtranslokáza 1; BVR A - biliverdinreduktáza A; COX1 - mtDNA kódovaná podjednotka komplexu IV dýchacího řetězce; COX4A1 - DNA kódovaná podjednotka komplexu IV dýchacího řetězce; cTnT - plazmatické koncentrace srdečního troponinu T; CuZnSOD - cytosolická forma superoxid-dismutázy; DAU – daunorubicin; DEX – dexrazoxan; DOX – doxorubicin; dP/dt_{max} - index kontraktility LK získaný katetrizačním vyšetřením levé komory; dP/dt_{min} - index relaxace LK získaný katetrizačním vyšetřením levé komory; FU - *follow up* – období následného sledování po ukončení expozice cytostatikem; GLCC - katalytická podjednotka γ -glutamylcysteinyligázy; GPx – glutathionperoxidáza; GR – glutathionreduktáza; GSH - redukovaná forma glutathionu; GSSG - oxidovaná forma glutathionu; GST - glutathion-S-transferáza; HIF1 α - *hypoxia inducible factor 1 alfa*; HO1 - hemoxygenáza 1; KEAP - *Kelch-like ECH-associated protein 1*; LK - levá komora; LVFS - frakční zkrácení levé komory; LVEDD - rozměr levé komory na konci diastoly; LVESD - rozměr levé komory na konci systoly; MDA – malondialdehyd; MnSOD - mitochondriální forma superoxid-dismutázy; mtDNA - mitochondriální deoxyribonukleová kyselina; ND1, ND4 - mtDNA kódovaná podjednotka komplexu I dýchacího řetězce; nDNA - nukleární deoxyribonukleová kyselina; NDUFS2 - nDNA kódovaná podjednotka komplexu I dýchacího řetězce; NOX - NADPH-oxidáza; NQO1 - NAD(P)H: chinonoxidoreduktáza 1; Nrf2 - *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*; NRF1 - nukleární respirační faktor 1; o-108 - pyridoxal 2-chlorbenzoylhydrazon; PGC1 α - PPAR γ koaktivátor 1 α ; PIH - pyridoxal 2-chlorbenzoylhydrazon; PPAR - *peroxisome proliferator-activated receptor*; ROS - reaktivní formy kyslíku; SIH – salicylaldehydisonikotinoylhydrazonu; TFAM - mitochondriální transkripční faktor A; Top2 α a β - topozomeráza II – izoformy α a β