

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové



**Farmakologická kardioprotekce pomocí chelátorů železa
a antracyklinová kardiotoxicita**

Olga Popelová

Autoreferát dizertační práce
Doktorský studijní program Lékařská farmakologie

Hradec Králové
2009

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

Student: Mgr. Olga Popelová
Ústav farmakologie
Lékařská fakulta v Hradci Králové
Univerzita Karlova v Praze

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

Oponenti: prof. MUDr. Josef Fusek, DrSc., Dr.h.c.
Katedra toxikologie
Fakulta vojenského zdravotnictví v Hradci Králové
Univerzita obrany Brno

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

Tato práce vznikla za podpory výzkumného záměru MŠMT 0021620820 a grantů GA UK 89/2006/C, GA UK 53107/2007/C a GA ČR 305/09/0416.

S dizertační prací je možno se seznámit na 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 dizertačních prací
v doktorském studijním programu Lékařská farmakologie

OBSAH

1.	SOUHRN	4
2.	SUMMARY	5
3.	ÚVOD DO PROBLEMATIKY	6
4.	CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE	7
5.	METODIKY	8
6.	VÝSLEDKY	10
6.1.	STUDIUM POTENCIÁLNĚ KARDIOPROTEKTIVNÍCH ÚČINKŮ CHELÁTORU ŽELEZA DEFERIPRONU NA MODELU CHRONICKÉ ANTRACYKLINOVÉ KARDIOTOXICITY U KRÁLÍKA	10
6.2.	ÚVODNÍ IN VITRO STUDIUM VÝZNAMU APOPTOTICKÉ BUNĚČNÉ SMRTI V ANTRACYKLINOVÉ KARDIOTOXICITĚ	12
6.3.	STUDIUM KARDIOPROTEKTIVNÍCH ÚČINKŮ DEXRAZOXANU VŮČI CHRONICKÉ ANTRACYKLINOVÉ KARDIOTOXICITĚ IN VIVO SE ZAMĚŘENÍM NA OCHRANU KARDIOMYOCYTŮ PŘED APOPTOTICKOU BUNĚČNOU SMRTÍ A OXIDAČNÍM STRESEM	12
6.4.	SLEDOVÁNÍ DYNAMIKY FUNKČNÍCH A MORFOLOGICKÝCH ZMĚN V PRŮBĚHU ROZVOJE CHRONICKÉ ANTRACYKLINOVÉ KARDIOTOXICITY VE VZTAHU K REMODELACI MYOKARDU A OXIDAČNÍMU STRESU	14
7.	DISKUZE	17
8.	ZÁVĚRY	27
9.	POUŽITÁ LITERATURA	28
10.	PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI	31

Zkratky

4-HNE	4-hydroxynonenal
ANT	antracyklin
DAU	daunorubicin
DEX	dexrazoxan
dP/dt	index kontraktility
ER/SR	endoplazmatické/sarkoplazmatické retikulum
FS	frakční zkrácení
GSH	redukováná forma glutathionu
GSSG	oxidovaná forma glutathionu
i.v.	intravenózní aplikace
L1	deferipron
MDA	malondialdehyd
M-mód	jednorozměrná echokardiografie
MMP	matrixová metaloproteináza
o-108	pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazon
PIH	pyridoxal isonikotinoyl hydrazon
p.o.	perorální aplikace
ROS	reaktivní formy kyslíku
SIH	salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling

1. Souhrn

V této dizertační práci byly studovány: 1) potenciálně kardioprotektivní účinky deferipronu na modelu daunorubicinem navozené chronické kardiotoxicity u králíků, 2) úloha apoptotické buněčné smrti při rozvoji antracyklinové kardiotoxicity, 3) kardioprotektivní účinky dexrazoxanu vůči chronické antracyklinové kardiotoxicitě se zaměřením na ochranu kardiomyocytů před programovanou buněčnou smrtí a oxidačním stresem a 4) časový sled změn vybraných parametrů v průběhu rozvoje chronické antracyklinové kardiotoxicity.

Na leukemické buněčné linii bylo ukázáno, že deferipron (1-300 $\mu\text{mol/l}$) nesnižuje protinádorový účinek daunorubicinu, naopak při vyšších koncentracích deferipronu byla pozorována sumace antiproliferativních účinků obou látek. Ve vlastní kardioprotektivní studii však podání deferipronu nezabránilo daunorubicinem navozené mortalitě, srdeční dysfunkci, morfologickým změnám v myokardu, nárůstu srdečního troponinu T a stejně tak peroxidaci lipidů v myokardu. Tyto výsledky kontrastují s předešlými pozitivními závěry *in vitro* studií, a tudíž značně mění dosavadní pohled na deferipron jako na potenciální kardioprotektivum vůči antracyklinové kardiotoxicitě. Získané výsledky společně s předchozími nálezy navíc naznačují, že role železa a jeho chelatace při antracyklinové kardiotoxicitě je mnohem složitější než se dosud předpokládalo a že se mohou do rozvoje tohoto patologického stavu zapojovat další mechanismy, nezávislé na železem katalyzované tvorbě reaktivních forem kyslíku.

Studium apoptotické buněčné smrti na *in vitro* modelu antracyklinové kardiotoxicity odhalilo, že již velmi nízké koncentrace antracyklinů (snadno dosažitelné v klinické praxi) spolehlivě navozují tento typ buněčné smrti. V souladu s literárními údaji bylo zjištěno, že při zvýšení koncentrace daunorubicinu nad 3 $\mu\text{mol/l}$ pravděpodobně začíná převažovat neprogramovaná (nekrotická) buněčná smrt nad apoptotickou. Byla prokázána i dávkově závislá zvýšená aktivita kaspáz 3 a 9, což naznačuje účast vnitřní (mitochondriální) apoptotické cesty a její důležitou roli v programované buněčné smrti navozené daunorubicinem u H9c2 buněk. Vnější cesta a cesta spojená s endoplazmatickým/sarkoplazmatickým retikulem se naproti tomu nezdají být zapojeny.

Podání dexrazoxanu dokázalo velmi účinně zabránit daunorubicinem navozenému předčasnému úhynu zvířat, rozvoji systolické dysfunkce a zvýšení plazmatických koncentrací srdečních troponinů. Dexrazoxan významně chránil kardiomyocyty před progresivní degenerací a jejich následným zánikem neprogramovanou smrtí. Podání dexrazoxanu též prokazatelně zabránilo rozvoji remodelace myokardu levé komory navozené daunorubicinem. Poprvé bylo ukázáno, že dexrazoxan chrání kardiomyocyty před programovanou buněčnou smrtí způsobenou antracykliny. Daunorubicin navodil komplexní apoptotickou signalizaci, přičemž dexrazoxan dokázal účinně blokovat všechny významné spouštěcí cesty apoptotické kaskády. Tato studie ukázala, že inhibice apoptózy může být významnou součástí kardioprotektivního účinku dexrazoxanu vůči antracyklinové kardiotoxicitě. Navíc bylo zjištěno, že potlačení lipoperoxidace nemusí hrát zásadní úlohu v kardioprotekci navozené dexrazoxanem. Tato data tedy podporují současnou výzvu k přehodnocení klasické "ROS and iron hypothesis" patogeneze antracyklinové kardiotoxicity a mechanismů kardioprotekce navozené dexrazoxanem.

V závěrečné části byl poprvé zdokumentován dynamický rozvoj funkčních, morfologických a dalších změn v myokardu levé komory v průběhu rozvoje daunorubicinové kardiotoxicity. Od 8. aplikace cytostatika (kumulativní dávky 400 mg/m^2) byl zaznamenán signifikantní pokles systolické funkce levé komory společně se zvýšením plazmatických koncentrací troponinů a rozvojem pokročilých degenerativních změn myokardu. Analýzy s jednotlivými substráty specifickými pro různé matrixové metaloproteinázy poskytl obdobné výsledky s tendencí ke zvýšení jejich aktivity v první fázi pokusu, následnou stabilizací a signifikantním vzestupem aktivity v závěru experimentu. Stěžejní roli lze přisoudit především aktivitě MMP-12. V polovině rozvoje chronické antracyklinové kardiotoxicity bylo zaznamenáno významné zvýšení markerů oxidačního stresu. Další vývoj parametrů oxidačního stresu naznačoval, že změny nemají kumulativní charakter a že jejich maximální nárůst předchází systolické dysfunkci levé komory a významným morfologickým změnám. Tyto výsledky tedy naznačují, že oxidační stress může být spíše spouštěcím než exekutivním činitelem v rozvoji chronické antracyklinové kardiotoxicity.

2. Summary

In this Ph.D. thesis, following aims were addressed: 1) potentially cardioprotective effects of deferiprone on the model of daunorubicin-induced chronic cardiotoxicity in rabbits, 2) the role of apoptotic cell death in the development of anthracycline cardiotoxicity, 3) cardioprotective effects of dexrazoxane against chronic anthracycline cardiotoxicity with a focus on rescue of cardiac myocytes from programmed cell death and oxidative stress, and 4) staging of myocardial changes in the time-course of chronic anthracycline cardiotoxicity development.

First, using the leukemic cell line, deferiprone (1-300 $\mu\text{mol/L}$) was shown not to blunt the antiproliferative effect of daunorubicin. Instead, at higher concentrations of deferiprone, the augmentation of antiproliferative actions of both agents was observed. However, in the cardioprotective study deferiprone failed to afford significant protection against daunorubicin-induced mortality, cardiac dysfunction, morphological cardiac deteriorations, plasma cardiac troponin T rise as well as myocardial lipoperoxidation. This finding contrasted with previous positive outcomes of *in vitro* studies. Hence, this study changes the current view on deferiprone as a potential cardioprotectant against anthracycline cardiotoxicity. In addition, these results, together with our previous findings, further suggest that the role of iron and its chelation in anthracycline cardiotoxicity is not as trivial as originally believed and/or other mechanisms unrelated to iron-catalyzed ROS production might be involved.

The study on apoptotic cell death using *in vitro* model of anthracycline cardiotoxicity revealed that at the lower (clinically relevant) concentrations of daunorubicin induced this mode of cell death. Furthermore, it has been observed that non-programmed (necrotic) cell death may prevail in the higher daunorubicin concentration (above 3 $\mu\text{mol/l}$), which is in line with previously reported data. This study revealed also dose dependent increase in the activity of caspases 3 a 9. Hence, these outcomes suggest that intrinsic (mitochondrial) apoptotic pathway is pivotal in daunorubicin-induced programmed cell death in H9c2 cell line. Extrinsic and endoplasmic/sarcoplasmic reticulum pathways seem to not be involved in this process.

Dexrazoxane was capable of fully overcoming premature death of animals, development of systolic dysfunction and plasma cardiac troponins rise. Dexrazoxane was found to rescue the cardiac myocytes from the progressive degeneration and consequently non-programmed cell death. Furthermore, this effective cardioprotection was associated with protection of the left ventricular myocardium from remodeling. For the first time, it has been demonstrated that dexrazoxane is able to protect cardiomyocytes against anthracycline-induced apoptotic cell death. Dexrazoxane was clearly shown to effectively suppress the complex apoptotic signaling triggered by daunorubicin. Hence, this study pointed out on inhibition of apoptosis as a substantial part of cardioprotective action of dexrazoxane against anthracycline cardiotoxicity. Moreover, it was revealed that overcoming of lipoperoxidation need not play a key role in dexrazoxane-afforded cardioprotection. Furthermore, these findings underline a recent call for revisiting the traditional “ROS and iron hypothesis” of pathogenesis of anthracycline cardiotoxicity and mechanisms of dexrazoxane-afforded cardioprotection.

Finally, in this work the dynamic changes in functional, morphological and other parameters in the time-course of anthracycline cardiotoxicity development were for the first time followed. Significant decrease of the left ventricular systolic function together with plasma cardiac troponins rise have been observed, starting by the 8th administration of daunorubicin (cumulative dose 400 mg/m^2). Analyses with individual substrates specific for different matrix metalloproteinases led to analogous outcomes suggesting a trend to MMPs activity elevation with the start of the study, subsequent stabilization and significant MMPs activity rise at the end of the experiment. The principal role is likely to be attributable to activity of MMP-12. In the second part of the experiment, significant elevation of oxidative stress markers was documented. The character of changes of these parameters strongly suggested that these alterations are not cumulative with the maximum being present before the left ventricular systolic dysfunction and morphological deteriorations. These outcomes suggest that oxidative stress might be rather triggering than executive factor in the development of chronic anthracycline cardiotoxicity.

3. Úvod do problematiky

Antracyklinová antibiotika (ANT) jsou považována za jedna z neúčinnějších cytostatik, která byla dosud zavedena do klinické praxe. Tato léčiva jsou užívána od začátku 60. let při léčbě řady hematologických a solidních malignit, přičemž v některých chemoterapeutických režimech stále zaujímají výhradní postavení, např. u karcinomu prsu nebo akutních leukemií^{1, 2}. Krátce po zavedení do klinické praxe se bohužel ukázalo, že kardiotoxicita představuje významnou limitaci v jejich užití³. Byly popsány čtyři základní formy kardiotoxicity antracyklinů. Mezi nejzávažnější patří chronická forma, která se objevuje ke konci terapie nebo několik týdnů až měsíců po jejím ukončení. Riziko rozvoje chronické kardiotoxicity a její závažnost závisí především na dosažené kumulativní dávce antracyklinů. Pro tuto formu je charakteristická ireverzibilní ztráta myofibril, cytoplazmatická vakuolizace a degenerace kardiomyocytů, které mohou vyústit v dilatační kardiomyopatii a městnavé srdeční selhání^{4, 5}. V posledních letech byla popsána i pozdní forma ANT kardiotoxicity, která se rozvíjí během několika let až desetiletí po ukončení chemoterapie a je obdobně závislá na dosažené kumulativní dávce antracyklinů. Vzhledem k úspěchu protinádorové léčby u řady malignit dětských pacientů představuje tento typ další závažný klinický problém, neboť může ohrožovat zdraví a/nebo kvalitu jejich života v dospělosti^{6, 7}.

Navzdory mnoha hypotézám^{8, 9} není přesný mechanismus patogeneze ANT kardiotoxicity dosud znám. Nejčastěji je spojován s nadměrnou produkcí kyslíkových radikálů (ROS), které vznikají za katalytického přispění volných, redoxně aktivních iontů železa. V literatuře jsou popsány dva základní mechanismy tvorby ROS prostřednictvím molekuly antracyklinu^{8, 10, 11}. Jedna hypotéza vychází ze schopnosti ANT vázat volné ionty železa uvnitř kardiomyocytů za tvorby komplexů ANT-Fe³⁺, které podléhají kaskádovitě reakci vedoucí k tvorbě extrémně reaktivních hydroxylových radikálů. V druhém případě molekula ANT umožňuje tvorbu superoxidových radikálů prostřednictvím redoxní cyklizace chinonového/semichinonového kruhu jejich aglykonu. Vzniklý superoxid dismutuje na peroxid vodíku, který následně vstupuje do Haber-Weissovy reakce katalyzované právě volnými ionty železa. Výsledkem je opět tvorba toxických hydroxylových radikálů, které svým působením poškozují téměř všechny buněčné struktury - lipidy, proteiny, nukleové kyseliny^{8, 12, 13}. Cyklický charakter reakcí spolu s poměrně malými zásobami přirozených antioxidantů v myokardu tak mohou být důvodem ireverzibilního poškození srdce s potenciálně fatálními následky pro pacienta¹⁴.

Vzhledem k tomu, že ANT navozují ireverzibilní poškození srdce, je vědecká pozornost soustředěna na zamezení vzniku této iatrogenní komplikace. Značné naděje byly a stále jsou vkládány do farmakologické kardioprotekce. Během uplynulých let byly testovány stovky potenciálních protektivních látek¹⁵⁻¹⁷, nicméně jediným léčivem s jednoznačně prokázaným účinkem v preklinických i v klinických studiích je dexrazoxan (DEX, ICRF-187)^{18, 19}. DEX je proléčivo, které je uvnitř kardiomyocytů enzymaticky hydrolyzováno na aktivní metabolit ADR-925, který se svojí strukturou podobá chelatačnímu činidlu EDTA. Za protektivní účinky DEX jsou považovány právě chelatační vlastnosti jeho metabolitu, díky nimž dokáže odnímat ionty železa z komplexu s ANT a/nebo vázat volné, redoxně aktivní ionty železa, čímž zabraňuje jejich účasti při tvorbě kyslíkových radikálů²⁰. V současnosti je DEX podáván pouze u malého procenta pacientů podstupujících léčbu ANT. Důvodem omezeného užívání léčiva je pravděpodobně výskyt nežádoucích účinků (především myelosuprese) a jeho vysoká cena²¹. Ze studie publikované kolektivem Swain et al. navíc vyvstala otázka, zda DEX také negativně neovlivňuje protinádorovou účinnost antracyklinů²². Ačkoliv po zpětné analýze výsledků byla tato možnost vyvrácena²³, což dokládají i nové klinické studie²⁴, obava z možné interference s protinádorovým účinkem ANT stále přetrvává. Proto je stále vysoce aktuální snaha o nalezení nového, vysoce účinného a bezpečného kardioprotektiva, které by zároveň negativně neovlivňovalo protinádorovou účinnost cytostatika.

Na základě teoretických předpokladů a předchozích výsledků *in vitro* a *ex vivo* experimentů se vhodnou alternativou k DEX jeví nový perorálně podávaný chelátor železa – deferipron (L1). Toto léčivo je registrováno v několika zemích k léčbě beta-talasemie, resp. stavů spojených s přetížením organismu železem. Jedná se o relativně malou lipofilní molekulu, která rychle proniká do kardiomyocytů a zde váže volné ionty železa a odstraňuje je z komplexů ANT-Fe³⁺²⁵. V *in vitro* podmínkách byla zjištěna protekce izolovaných neonatálních potkaních kardiomyocytů L1 vůči poškození navozeném doxorubicinem²⁶. Jeho kardioprotektivní potenciál byl dále podpořen studií provedenou na spontánně bijících síních exponovaných doxorubicinu²⁷. Přestože se L1 zdá být slibným kandidátem na užití v oblasti kardioprotekce, dosud nebyly dostupné žádné informace týkající se jeho kardioprotektivního působení na vhodném *in vivo* modelu chronické ANT kardiotoxicity.

Ještě před několika lety byla ANT kardiotoxicita hlavně spojována s navozením oxidačního stresu a z toho plynoucího poškození biomolekul ústící v progresivní degeneraci a neprogramovanou smrt kardiomyocytů^{5, 10}. Tento pohled se ale v posledních letech začal měnit. Objevuje se stále více prací poukazujících na možnou úlohu apoptózy při ANT navozeném zániku kardiomyocytů²⁸⁻³¹. V literatuře lze nalézt jednu *in vitro* studii provedenou na izolovaných potkaních kardiomyocytech, která naznačuje, že modelové kardioprotektivum DEX by mohl chránit kardiomyocyty právě i vůči tomuto způsobu buněčného zániku³². Dosud však nebyla publikovaná data z podmínek chronického, klinicky relevantního *in vivo* modelu.

Pro lepší pochopení multifaktoriální patogeneze chronické ANT kardiotoxicity by zajisté přispělo sledování dynamiky dějů, které nakonec vyústí v klinický obraz chronické antracyklinové kardiotoxicity. V klinické praxi to bylo dosud studováno pouze omezeně, což souvisí s obtížnou dostupností myokardiálních vzorků jedinců exponovaných různé kumulativní dávce ANT. Bioptický a histologický odběr materiálu je zatížen řadou komplikací jako např. kvalita, dostupnost, množství a reprezentativní charakter vzorku, a proto se dnes provádí jen ve výjimečných případech. S ohledem na tato fakta se jeví použití experimentálního modelu jako velmi vhodná příležitost ke studiu vlivu různé kumulativní dávky cytostatika a časového sledu funkčních, morfológických a dalších změn v myokardu levé komory v průběhu rozvoje chronické ANT kardiotoxicity. Takové schéma pokusu by mohlo významně přispět k pochopení podstaty patogeneze chronické ANT kardiotoxicity a popř. při následném vývoji nových účinných kardioprotektiv.

4. Cíle dizertační práce

- Studium potenciálně kardioprotektivních účinků klinicky užívaného chelátoru železa deferipronu na modelu chronické antracyklinové kardiotoxicity u králíka
- Úvodní *in vitro* studium významu apoptotické buněčné smrti v antracyklinové kardiotoxicitě
- Studium kardioprotektivních účinků dexrazoxanu vůči chronické antracyklinové kardiotoxicitě *in vivo* se zaměřením na ochranu kardiomyocytů před apoptotickou buněčnou smrtí a oxidačním stresem
- Sledování dynamiky funkčních a morfológických změn v průběhu rozvoje chronické antracyklinové kardiotoxicity ve vztahu k remodelaci myokardu a oxidačnímu stresu

5. Metodiky

Pokusy na úrovni *in vitro*

- **Antiproliferativní studie s buněčnou linií HL-60:** Ve spolupráci s Doc. PharmDr. T. Šimůnkem, Ph.D. (FaF HK) byl studován vliv L1 na antiproliferativní účinky DAU s užitím leukemické buněčné linie HL-60 (ATCC). L1 byl použit v koncentracích 1-300 $\mu\text{mol/l}$, zatímco u DAU byla zvolena koncentrace 12 nmol/l ($c \approx \text{IC}_{50}$). Na závěr pokusu byla stanovena viabilita buněk.
- ***In vitro* model antracyklinové kardiotoxicity:** je založen na použití buněčné linie H9c2 odvozené od potkaních srdečních myoblastů (ATCC) (Doc. PharmDr. T. Šimůnek, Ph.D., FaF HK). Růst buněk byl zastaven výměnou kultivačního média za bezsérové 24 hod před začátkem pokusu. DAU byl použit v koncentracích 0,1-3 $\mu\text{mol/l}$ ($n=4$).
- **Stanovení viability buněk:** bylo provedeno s 0,4% trypanovou modří. Počet přeživších buněk byl zjištěn pomocí Bürkerovy komůrky pod světelným mikroskopem.
- **Hodnocení apoptózy u H9c2 buněk:** Apoptotická buněčná smrt byla hodnocena pomocí imunochemické detekce fragmentace DNA (Cell Death Detection ELISA^{PLUS}, Roche Diagnostics) a pomocí stanovení aktivity jednotlivých kaspáz (viz níže).

Pokusy na úrovni *in vivo*

- **Pokusná zvířata:** králíci, Činčila velká, samci (výchozí tělesná hmotnost $\approx 3,5$ kg).
- **Anestézie:** kombinovaná anestézie ketamin (50 mg/kg i.m.) a midazolam (1,25 mg/kg i.m.), pouze v případě invazivního měření pentobarbitalová anestézie (30 mg/kg, i.v.).
- **Model chronické antracyklinové kardiotoxicity u králíka:** založen na opakovaném podání DAU (3 mg/kg i.v., 1x týdně) po dobu 10 týdnů^{33, 34}.
- **Dávkovací schémata studovaných látek:** Pro studium potenciálních kardioprotektivních účinků byl L1 p.o. podáván v 0,5% karboxymethylcelulóze v dávce 10 a 50 mg/kg vždy 45 minut před DAU ($n=8$). U nejvyšší dávky L1 (tj. 50 mg/kg) byl hodnocen i vliv samotné látky na kardiovaskulární parametry ($n=6$). Dexrazoxan byl podáván i.p. v dávce 60 mg/kg 30 minut před DAU ($n=8$). Výsledky byly porovnány s kontrolní skupinou (fyziologický roztok 1 ml/kg i.v., $n=8$). Všechny látky byly aplikovány 1x týdně po dobu 10 týdnů. Pro sledování dynamiky změn vybraných parametrů v průběhu rozvoje chronické antracyklinové kardiotoxicity („staging“) bylo utvořeno 9 skupin králíků (po $n=6$), kteří byli exponováni různé kumulativní dávce DAU (3 mg/kg, tj. 50 mg/m^2 i.v.). Zvířata byla usmrcena za 24 hodin nebo za 7 dnů po kumulativní dávce cytostatika 50, 150, 250, 400 a 500 mg/m^2 . Výsledky byly porovnány s parametry naměřenými u intaktních zvířat ($n=6$).
- **Hodnocení celkové toxicity:** V průběhu pokusu byly sledovány změny v chování zvířat, v příjmu pitné vody a potravy, přežívání, resp. předčasný úhyn zvířat. Jednou týdně byly zaznamenány aktuální hmotnosti králíků.
- **Měření funkčních kardiovaskulárních parametrů:** Echokardiograficky byla v průběhu pokusu hodnocena systolická srdeční funkce levé komory. Pomocí M-mód záznamu pořízeného z parasternálního zobrazení levé komory v dlouhé ose byly zjištěny rozměry srdce na konci diastoly a systoly, z kterých bylo spočteno frakční zkrácení levé komory. Na konci pokusu byla katetrizována levá komora cestou *a. carotis* pomocí Micro-Tip Pressure Catheter a byl hodnocen index $\text{dP/dt}_{\text{max}}$, tj. maximálního vzestupu tlaku v levé komoře v isovolumické fázi systoly. Kromě uvedeného parametru byla zaznamenána i srdeční frekvence a průměrný tlak krve v *a. femoralis*.
- **Stanovení srdečních troponinů:** Plazmatické koncentrace troponinu T a I byly stanoveny v průběhu pokusu pomocí Elecsys Troponin T STAT Immunoassay (Roche Diagnostics), popř. ADV AxSYM troponin I Immunoassay (Abbott) na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky FN HK.

- **Hematologické a biochemické vyšetření krve:** V odebrané krvi byly stanoveny na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky a Ústavu klinické hematologie FN HK základní biochemické a hematologické parametry.
- **Pitva a posmrtné ohledání:** Po předávkování zvířat pentobarbitalem, resp. u předčasně uhynulých zvířat, byla provedena pitva. Byl hodnocen výskyt výpotků v dutině břišní, hrudní a v perikardu, přítomnost makroskopicky zřetelných abnormalit. Pro histologické zpracování byl pořízen transverzální řez pravou a levou komorou srdce. Zbývající část levé komory byla šokově zmrazena a homogenizována v tekutém dusíku a uchována při -80°C.
- **Histologické vyšetření:** Odebrané vzorky byly fixovány ve 4% neutrálním formaldehydu. Byly připraveny série řezů, přičemž dva řezy byly obarveny hematoxylin-eosinem a Massonovým modrým trichromem, tři řezy byly použity pro značení TUNEL metodou. Jeden řez byl vybrán pro hodnocení kolagenu v myokardu levé komory technikou Picrosirius Red (Doc. MUDr. Y. Mazurová, CSc., Ústav histologie a embryologie LF HK)
- **Stanovení kolagenního profilu levé komory:** Byl hodnocen profil kolagenních proteinů levé komory, jenž byl vyjádřen na množství stanoveného hydroxyprolinu v jednotlivých frakcích proteinů³⁵ (Doc. MUDr. M. Adamcová, Ph.D., Ústav fyziologie LF HK).
- **TUNEL Assay:** Parafinové řezy myokardu byly použity pro značení TUNEL metodou pomocí In situ Cell Death Detection Kit AP (Roche Diagnostics). Byly pořízeny fotomikrografie tkáně (celkové zvětšení 200x) pomocí mikroskopu Olympus AX7 vybaveného digitální kamerou Pixelink PL-A642 (Vitana Corp.). Kvantitativní analýza byla provedena pomocí programu NIS-Elements (Laboratory Imaging). Výsledný počet TUNEL pozitivních jader byl vztažen na mm² tkáně levé komory.
- **Stanovení aktivity kaspáz:** Aktivity kaspáz 3/7, 8 a 9 byly stanoveny v myokardu levé komory (popř. v buněčné kultuře H9c2) pomocí setů Caspase-Glo Assays (Promega) ve spolupráci s Mgr. P. Haškovou (FaF HK). Aktivita kaspázy 12 byla stanovena pomocí setu Caspase-12 Fluorometric Assay Kit (BioVision).
- **Hodnocení markerů lipoperoxidace:** Celkový malondialdehyd v myokardu levé komory byl stanoven pomocí HPLC metody po předchozí derivatizaci 2,4-dinitrofenylhydrazinem³⁶ (Ing. M. Hroch, Ústav farmakologie LF HK). 4-HNE byl stanoven s imunohistochemickou detekcí v parafinových řezech myokardu levé komory ve spolupráci s doc. MUDr. Y. Mazurovou, CSc. (Ústav histologie a embryologie LF HK). Řezy byly značeny myší monoklonální protilátkou proti 4-HNE (Oxis Int.) a oslí sekundární protilátkou konjugovanou na biotinu (Jackson Immuno Res.)
- **Stanovení glutathionu v myokardu levé komory:** bylo provedeno pomocí HPLC metody založené na selektivní fluorescenční detekci jeho oxidované a redukované formy (Ing. M. Hroch, Ústav farmakologie LF HK).
- **Stanovení aktivity matrixových metaloproteináz v myokardu:** Aktivita želatináz byla stanovena pomocí setu MMP Gelatinase Activity Assay Kit (Chemicon) ve spolupráci s Doc. MUDr. M. Adamcovou, Ph.D. (Ústav fyziologie LF HK). Aktivita MMPs byla stanovena pomocí dvou fluorescenčních kitů SensoLyte™ 570 Generic MMP Assay Kit (Anaspec) a SensoLyte™ 520 MMP Assay Kit (Anaspec) se sérií 6 substrátů dle postupu výrobce.
- **Statistická analýza:** Statistické významnosti byly stanoveny nepárovým ANOVA testem či párovým *t*-testem (SigmaStat 3.5). Korelační analýzy byly provedeny Pearsonovou nebo Spearmanovou metodou (SigmaStat 3.5). Explorativní statistické metody byly provedeny v programu STATISTICA Cz.

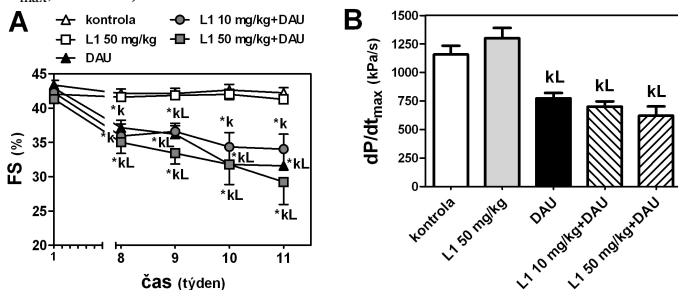
6. Výsledky

6.1. Studium potenciálně kardioprotektivních účinků chelátoru železa deferipronu na modelu chronické antracyklinové kardiotoxicity u králíka

Protože perspektivní kardioprotektivum by nemělo mít negativní vliv na protinádorovou účinnost cytostatika, byl nejprve studován účinek deferipronu (L1) na DAU navozenou inhibicí proliferace nádorové buněčné linie HL-60. Samotný L1 v nízkých koncentracích (1-30 $\mu\text{mol/l}$) nevykazoval statisticky významný účinek na proliferaci nádorové linie, zatímco ve vyšších koncentracích (>100 $\mu\text{mol/l}$) ji výrazně snižoval. Při společné inkubaci buněk s L1 v rozpětí klinicky relevantních koncentrací (1-300 $\mu\text{mol/l}$) a DAU chelátor v nízkých koncentracích statisticky významně neovlivňoval protinádorový účinek cytostatika, zatímco při vyšších koncentracích (>10 $\mu\text{mol/l}$) působil synergicky.

Na základě těchto výsledků jsme přistoupili ke studii potenciálně kardioprotektivních účinků L1. V této části byl L1 p.o. podáván ve dvou dávkách 10 a 50 mg/kg vždy 45 minut před DAU (po n=8). V našich podmínkách bylo po opakovaném podání DAU pozorována 18% mortalita. Společné podání L1 v dávce 10 mg/kg a DAU překvapivě navodilo 25% mortalitu. Další 5-násobné zvýšení dávky chelátoru vedlo k ještě časnějšímu úhynu zvířat mezi 3. a 5. týdnem pokusu. Tato mortalita pravděpodobně souvisela s výskytem extrakardiální toxicity. V DAU skupině a v kombinační skupině s vyšší dávkou L1 (50 mg/kg) byly tělesné hmotnosti signifikantně nižší v porovnání s kontrolní a deferipronovou skupinou a nebyla zaznamenána tendence ke zvýšení hmotnosti v průběhu pokusu. Po podání nižší dávky L1 (10 mg/kg) bylo u zvířat zjištěno signifikantní zvýšení tělesné hmotnosti, nicméně v porovnání s kontrolními hodnotami byly hmotnosti stále významně sníženy. Při posmrtném ohledání zvířat z DAU skupiny byly nalezeny výpotky v dutině břišní a hrudní a makroskopické změny v kůře ledvin. Pitevní nález v obou kombinačních skupinách L1+DAU neobsahoval žádné odlišné změny, které by nebyly přítomné v samotné DAU skupině.

Frakční zkrácení levé komory bylo statisticky významně sníženo v DAU skupině jak ve srovnání s počáteční hodnotou, tak i s kontrolní skupinou. U obou kombinačních skupin L1+DAU se hodnoty frakčního zkrácení levé komory v průběhu celého pokusu signifikantně nelišily od DAU skupiny (obr. 1A). Katetrizační vyšetření systolické srdeční funkce provedené na konci pokusu odhalilo obdobné výsledky v DAU skupině a L1+DAU skupinách. Mezi skupinami nebyly nalezeny žádné statisticky významné změny v indexu kontraktility levé komory (dP/dt_{max}, obr. 1B).



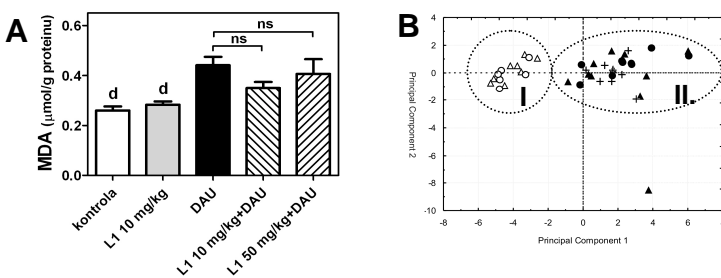
Obr. 1. Systolická funkce levé komory hodnocená A) echokardiograficky v průběhu pokusu a B) katetrizačně na konci pokusu. Statistická významnost (ANOVA, $p < 0,05$) v porovnání s kontrolní (k), deferipronovou (L) skupinou a párový t-test ($p < 0,05$) v porovnání s počáteční hodnotou (*).

Podání DAU vedlo i k postupnému nárůstu plazmatické koncentrace srdečního troponinu T, který od 8. týdne pokusu byl statisticky významně zvýšen v porovnání s počáteční hodnotou. Podobné změny v koncentracích troponinu T byly nalezeny v obou kombinačních skupinách.

Výše získaným výsledkům odpovídal histopatologický nále v myokardiálních vzorcích. V kontrolní a deferipronové skupině byl odhalen téměř srovnatelný morfologický obraz. Ojedinele byla patrná osamocená místa buněk s mírnějšími morfologickými změnami. Naopak opakované podání DAU navodilo typické ložiskové poškození myokardu levé komory vedoucí až k buněčné smrti. V obou kombinačních skupinách L1+DAU byl nalezen podobný charakter myokardiálních změn jako u DAU skupiny. Toxické poškození ve skupině s nižší dávkou L1 bylo o něco méně vyjádřené, zatímco po vyšší dávce L1 se změny v myokardu velmi podobaly změnám navozeným samotným DAU.

Bylo stanoveno významné zvýšení celkového MDA (běžně užívaného markeru lipoperoxidace) v myokardu levé komory po opakovaném podání DAU. V obou kombinačních skupinách L1+DAU jsme překvapivě zjistili pouze nesignifikantní pokles tohoto markeru v porovnání s DAU skupinou (obr. 2A).

Při stanovení obsahu železa v myokardu levé komory nebyly nalezeny žádné signifikantní rozdíly mezi DAU a kontrolní skupinou ($2,2 \pm 0,2$ $\mu\text{mol/g}$ versus $2,5 \pm 0,4$ $\mu\text{mol/g}$). Významně vyšší hodnoty byly naměřeny po podání samotného L1 v dávce 50 mg/kg anebo po jeho kombinaci s DAU ($4,2 \pm 0,7$ $\mu\text{mol/g}$ a $4,9 \pm 0,5$ $\mu\text{mol/g}$, $p < 0,05$), nicméně u kombinační skupiny s nižší dávkou L1 k významnému zvýšení nedošlo ($3,4 \pm 0,3$ $\mu\text{mol/g}$).



Obr. 2. A) Množství celkového malondialdehydu v srdeční tkáni levé komory. Statistická významnost (ANOVA, $p < 0,05$) v porovnání s DAU skupinou (d). B) Analýza hlavních komponent všech hodnocených funkčních, biochemických a hematologických parametrů (25 proměnných) u 5 skupin pokusných zvířat. Zkoumané skupiny: kontrolní (Δ), L1 (\circ), DAU (\blacktriangle), L1 10+DAU (\oplus) a L1 50+DAU (\bullet).

Po podání DAU byly zjištěny signifikantní změny u biochemických parametrů souvisejících s renálním poškozením (např. zvýšení kreatininu) a s poškozením metabolismu lipidů. Podobné výsledky byly popsány i u kombinačních skupin L1+DAU. Podání DAU vedlo i k významnému poklesu počtu erytrocytů a trombocytů a ke snížení koncentrace hemoglobinu a hematokritu. Většina hematologických parametrů měla podobný trend během studie i v kombinačních skupinách L1+DAU. Podání samotného chelátoru nemělo významný vliv na jednotlivé hematologické i biochemické parametry.

U DAU skupiny bylo v porovnání s kontrolní a deferipronovou skupinou nalezeno závažné poškození parenchymu ledvin v podobě intersticiální tubulární nefritidy. Podobný morfologický nále byl nalezen i u obou kombinačních skupin L1+DAU, přičemž ve skupině s nižší dávkou chelátoru byly změny menšího rozsahu i intenzity, i když jizevnatá tkáň byla přítomna i u této skupiny. Histologické vyšetření jater odhalilo převážně méně významné změny u DAU skupiny. U některých zvířat byla nalezena tuková degenerace a jen místy centroacinózní nekróza hepatocytů. Při srovnání experimentálních skupin nebyly shledány významné rozdíly mezi DAU a oběma kombinačními skupinami L1+DAU.

Na závěr byly výsledky podrobeny analýze hlavních komponent a hierarchické shlukovací analýze. V závislosti na 25 proměnných byly sledované objekty ($n=42$) ze všech pěti skupin rozděleny do dvou zřetelně oddělených shluků. V prvním shluku (I) byli zahrnuti králíci

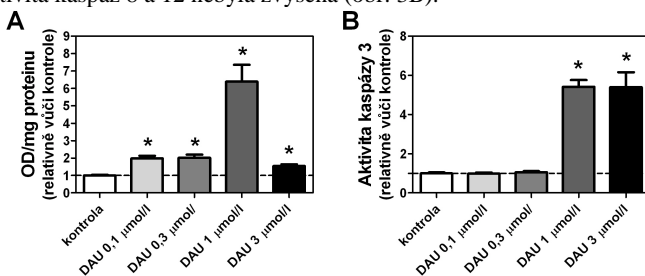
z kontrolní a deferipronové skupiny, zatímco králíky z kombinačních skupin L1+DAU a DAU skupiny jsme našli v druhém shluku (II) (obr. 2B).

6.2. Úvodní *in vitro* studium významu apoptotické buněčné smrti v antracyklinové kardiotoxicitě

Dávkově závislá cytotoxicita byla zjištěna po 24-hod inkubaci buněčné kultury H9c2 s DAU v klinicky relevantních koncentracích (0,1-3 $\mu\text{mol/l}$). Nejvýraznější pokles v důsledku cytotoxického vlivu DAU byl pozorován mezi koncentracemi 0,3 a 1 $\mu\text{mol/l}$. U nejvyšší zvolené koncentrace DAU (3 $\mu\text{mol/l}$) dosahovala viabilita buněk $25,0 \pm 2,7$ % hodnoty kontrolní skupiny. Hodnota IC_{50} byla spočtena na 0,48 $\mu\text{mol/l}$.

Byl zaznamenán statisticky významný nárůst fragmentace DNA u této buněčné linie inkubované 24 hod s různými koncentracemi DAU, přičemž nejvyšší počet fragmentů DNA byl zjištěn při inkubaci buněk s koncentrací 1 $\mu\text{mol/l}$ DAU. Při následném zvýšení koncentrace DAU na 3 $\mu\text{mol/l}$ byl sledovaný prudký pokles imunochemického signálu (obr. 3A).

S užitím buněčné linie H9c2 byla provedena i analýza aktivit čtyř kaspáz majících zásadní úlohu při intracelulární signalizaci vedoucí k apoptotické buněčné smrti. 24-hod inkubace H9c2 buněk s DAU (v koncentracích 1 a 3 $\mu\text{mol/l}$) vedla k signifikantnímu zvýšení aktivit kaspáz 3 a 9, zatímco aktivita kaspáz 8 a 12 nebyla zvýšena (obr. 3B).



Obr. 3. Stanovení apoptózy pomocí A) imunochemické detekce fragmentace DNA a B) stanovení aktivity kaspázy 3 po 24-hodinové inkubaci H9c2 buněk s daunorubicinem (0,1 – 3 $\mu\text{mol/l}$). Statistická významnost (ANOVA, $p < 0,05$) v porovnání s kontrolní skupinou (*).

6.3. Studium kardioprotektivních účinků dexrazoxanu vůči chronické antracyklinové kardiotoxicitě *in vivo* se zaměřením na ochranu kardiomyocytů před apoptotickou buněčnou smrtí a oxidačním stresem

Studium bylo uskutečněno u následujících skupin: daunorubicinová (DAU 3 mg/kg, i.v., 1x týdně po 10 týdnů, $n=11$), kontrolní (fyziologický roztok 1 ml/kg, i.v., 1x týdně po 10 týdnů, $n=8$) a dexrazoxanová (DEX+DAU), které bylo podáváno klinicky užívané kardioprotektivum dexrazoxan (60 mg/kg, i.p. 30 min před DAU, 1x týdně po 10 týdnů, $n=8$).

V kontrolní skupině nebyl zaznamenán úhyn zvířat a jejich dobré prospívání se projevilo postupným nárůstem tělesné hmotnosti v průběhu pokusu ($3,50 \pm 0,03$ a $4,64 \pm 0,13$ kg, začátek versus konec pokusu; $p < 0,01$). Opakované 10-týdenní podávání DAU vedlo naopak v 11-ti členné skupině ke dvěma předčasným úhynům. U této skupiny nebyly sledovány ani významné změny v tělesné hmotnosti ($3,45 \pm 0,07$ a $3,47 \pm 0,23$ kg, začátek versus konec pokusu; ns.). Během pitvy byly nalezeny známky městnání krve, tj. přítomnost masivního výpotku v dutině hrudní (přibližně 60 ml u dvou zvířat) i břišní (25 a 35 ml). Všechna zvířata z DEX+DAU skupiny přežila až do konce pokusu. I v této skupině se tělesná hmotnost statisticky významně zvyšovala v průběhu pokusu v porovnání s počáteční hodnotou

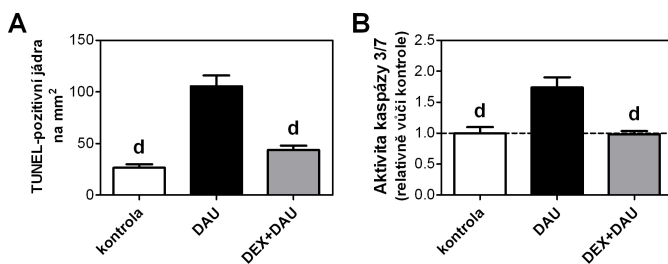
($3,50 \pm 0,07$ a $3,99 \pm 0,07$ kg, začátek versus konec pokusu; $p < 0,05$). Při pitvě nebyl nalezen žádný výpotek v dutině břišní ani hrudní.

Od 8. týdne pokusu byl echokardiograficky odhalen progresivní a statisticky významný pokles frakčního zkrácení levé komory v DAU skupině ($37,1 \pm 1,1$ % po 8. aplikaci DAU, $31,6 \pm 2,3$ % na konci pokusu vs. počáteční hodnota $42,9 \pm 0,5$ %, $p < 0,05$). V této skupině byl zjištěn i pokles kontraktility levé komory ($773,6 \pm 46,4$ vs. $1158,3 \pm 76$ kPa/s v kontrolní skupině, $p < 0,05$). Na druhou stranu výsledky obou měření srdeční funkce dokumentovaly u DEX+DAU skupiny obdobnou systolickou funkci levé komory jako u kontrolních zvířat (dP/dt_{max} : $1145,7 \pm 76,1$ vs. $1158,3 \pm 76$ kPa/s v kontrolní skupině, FS: $41,9 \pm 1,1$ vs. $42,3 \pm 0,6$ % počáteční hodnota, ns.).

Opakované podání DAU vedlo k statisticky významnému zvýšení plazmatických koncentrací troponinu T a I stanovených na konci pokusu v porovnání s kontrolní skupinou (cTnT: $0,172 \pm 0,042$ vs. $0,014 \pm 0,010$ ng/ml v kontrolní skupině, $p < 0,05$ a cTnI: $1,792 \pm 0,301$ vs. $0,278 \pm 0,096$ ng/ml v kontrolní skupině, $p < 0,05$). Naproti tomu kardioprotekce navozená DEX byla spojená i se signifikantním poklesem obou srdečních markerů k hodnotám zjištěným u kontrolní skupiny (cTnT: $0,005 \pm 0,003$ ng/ml, ns., cTnI: $0,255 \pm 0,061$, ns.).

Histologické hodnocení myokardu DAU zvířat zdokumentovalo typické ložiskové poškození levé komory. Tyto změny zahrnovaly různé stupně buněčné degenerace vedoucí k neprogramované buněčné smrti. Takto postižené kardiomyocyty podléhaly buněčnému edému a progresivní desintegraci. Byla patrná i významná fibrotizace tkáně. Reparativní proces se vyznačoval tvorbou kolagenu I a III, přičemž typ III byl tvořen zejména na začátku hojení, zatímco typ I kolagenu byl typický pro pokročilé stádium reparace. Podání DEX zřetelně zabránilo všem výše uvedeným změnám navozených DAU, histologický nález v levé komoře se významně nelišil od kontrolních zvířat.

U kontrolních zvířat byl zaznamenán pouze velmi malý počet TUNEL-pozitivních jader v hodnocené ploše myokardu. Na druhou stranu 10-týdenní podávání DAU jednoznačně navodilo nárůst počtu TUNEL-pozitivních jader oproti kontrolní skupině. Většina TUNEL pozitivních jader byla nalezena v kardiomyocytech, u kterých nebyly pozorovány typické degenerativní změny, popř. tyto změny byly přítomné jen v počátečním stádiu. V DEX+DAU skupině byl pozorován pokles počtu TUNEL-pozitivních jader téměř k hodnotám stanoveným u kontrolních zvířat (obr. 4A). Korelační analýza odhalila významný vztah mezi tímto parametrem apoptózy a systolickou funkcí levé komory ($R = 0,665$, $p < 0,0001$).



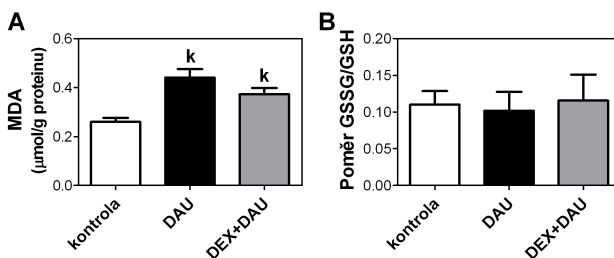
Obr. 4. A) Kvantitativní analýza TUNEL assay. B) Aktivita kaspázy 3/7 v myokardu levé komory. Statistická významnost (ANOVA, $p < 0,05$) v porovnání s DAU skupinou (d).

Ve shodě s výsledky TUNEL assay bylo zjištěno, že podání DAU vedlo k statisticky významnému zvýšení aktivity exekutivních kaspáz 3/7 v porovnání s kontrolní skupinou, přičemž podání DEX před každou dávkou ANT dovedlo kompletně těmto změnám zabránit (obr. 4B). Podání samotného DAU významně ovlivnilo i všechny hlavní apoptotické signalizační cesty v myokardu levé komory. Byla zjištěna aktivace kaspáz reprezentujících vnitřní cestu (kaspáza 9), vnější cestu (kaspáza 8) i cestu spojenou se ER/SR stresem (kaspáza

12). DEX velmi účinně zabránil aktivaci všech uvedených apoptotických cest. Nebyly zjištěny žádné rozdíly v proteolytické aktivitě jednotlivých kaspáz mezi kontrolní a DEX+DAU skupinou. Obdobně jako u TUNEL metody aktivity kaspáz signifikantně a velmi těsně korelovaly se systolickou srdeční funkcí.

U DAU zvířat byla stanovena zvýšená koncentrace celkového MDA v myokardu levé komory. Podání DEX nebylo překvapivě spojeno s významným poklesem celkového množství MDA. U této skupiny byly hodnoty MDA téměř srovnatelné s hodnotami naměřenými u samotné DAU skupiny (obr. 5A). Při korelační analýze nebyl nalezen významný vztah mezi myokardiální koncentrací MDA a levokomorovou systolickou funkcí ($R=-0,224$, $p=0,258$). Tyto výsledky potvrdilo i hodnocení dalšího markeru peroxidace lipidů (4-HNE). V DAU skupině byla nalezena významně zvýšená imunoreaktivita na 4-HNE v porovnání s kontrolní skupinou. Srovnatelná intenzita signálu jako u DAU skupiny byla pozorována také v DEX+DAU skupině.

V DAU skupině byla zjištěna signifikantně zvýšená koncentrace GSH v porovnání s kontrolní skupinou, nicméně množství GSSG zůstalo zachováno na hodnotách srovnatelných s kontrolními zvířaty. V souladu se zvýšeným množstvím redukované formy narůstalo v DAU skupině i množství celkového glutathionu. Obdobný trend jako u DAU skupiny byl nalezen i ve skupině, kde byl podáván DEX společně s DAU. Při analýze výsledků s glutathionem jsme se zaměřili i na poměr jeho GSSG/GSH, který může naznačovat míru tendence ke tvorbě ROS. Mezi experimentálními skupinami nebyl nalezen žádný rozdíl (obr. 5B).



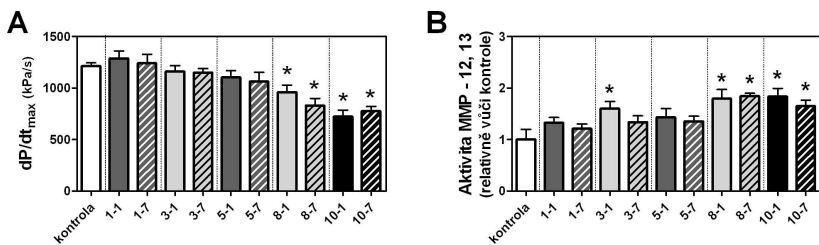
Obr. 5. A) Množství celkového malondialdehydu a B) poměr GSSG/GSH u jednotlivých zvířat v srdeční tkáni levé komory. Statistická významnost (ANOVA, $p<0,05$) v porovnání s kontrolní skupinou (k).

V závislosti na hodnocené systolické funkci levé komory, plazmatických koncentrací srdečních troponinů, markerů apoptózy a lipoperoxidace byla všechna hodnocená zvířata rozdělena pomocí explorativních statistických analýz do dvou zřetelně oddělených shluků. V prvním shluku byli zahrnuti králci z kontrolní a DEX+DAU skupiny, zatímco zvířata z DAU skupiny jsme mohli nalézt v druhém shluku. Téměř všechna zvířata z DAU skupiny se vyskytovala v tomto shluku až na výjimku dvou předčasně uhynulých jedinců, u kterých bylo sledováno nejvýznamnější srdeční poškození. Explorativní statistická analýza identifikovala aktivity kaspáz jako parametr s největším vlivem na shlukování zvířat.

6.4. Sledování dynamiky funkčních a morfologických změn v průběhu rozvoje chronické antracyklinové kardiotoxicity ve vztahu k remodelaci myokardu a oxidačnímu stresu

Během studie byl přítomen progresivní pokles parametru kontraktility levé komory (index dP/dt_{max}). U zvířat, která byla usmrcena 24 hod po 8. aplikaci DAU (kumulativní dávka 400 mg/m^2), byl již pokles indexu dP/dt_{max} statisticky významný v porovnání s kontrolní skupinou (obr. 6A). Byl nalezen i významný vztah mezi systolickou funkcí levé komory a dosaženou kumulativní dávkou DAU ($R=-0,745$, $p<0,0001$).

S poklesem funkce levé komory korespondovaly i plazmatické koncentrace srdečního troponinu T a I, které se významně zvyšovaly od stejného časového intervalu (8. týden) oproti kontrolním hodnotám (cTnT: $0,047 \pm 0,020$ ng/ml vs. $0,002 \pm 0,001$ ng/ml a cTnI: $1,41 \pm 0,60$ ng/ml vs. $0,22 \pm 0,07$ ng/ml, $p < 0,01$). Na závěr provedená korelační analýza odhalila i významný vztah mezi oběma srdečními markery ($R = 0,817$, $p < 0,0001$).



Obr. 6. A) Kontraktilita levé komory a B) celková aktivita MMP-12 a 13 v průběhu rozvoje chronické antracyklinové kardiotoxicity. Statistická významnost (ANOVA, $p < 0,05$) v porovnání s kontrolní skupinou (*).

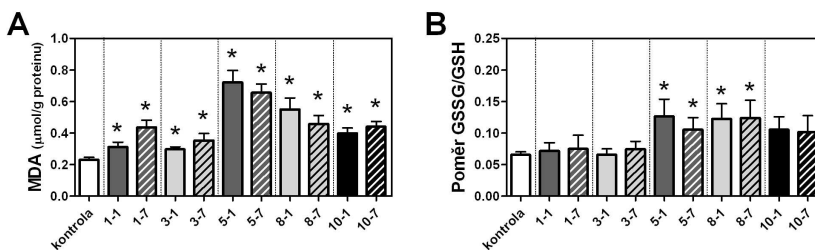
Do 5. týdne (kumulativní dávka DAU 250 mg/m^2) byly zaznamenány mírné změny v morfologii srdce v porovnání s kontrolní skupinou. Ojedinele se vyskytovalo jemné intersticiální vazivo, které bylo tvořeno oběma typy kolagenu I a III. K výraznějším morfologickým změnám docházelo až od 8. aplikace DAU. V myokardech levé komory, které byly odebrány za 24 hod po 8. aplikaci DAU (kumulativní dávka 400 mg/m^2), byly zaznamenány různé stupně buněčné degenerace. Vyšší přítomnost zelených retikulárních vláken ukazovala na počátek procesu hojení, které je typické pro typ III kolagenu. V některých místech byla patrná žlutě zbarvená čerstvá kolagenní vlákna odpovídající pokročilemu stádiu reparace. Při porovnání myokardů odebraných za 24 hod a za týden po 8. aplikaci DAU byl zjištěn nepatrný rozdíl v histologickém nálezu. Zvyšoval se počet buněk podléhající degeneraci a následně neprogramované buněčné smrti. Polarizované světlo odhalilo i postupné vyzrávání kolagenu. Byla častěji patrná silnější žlutá kolagenní vlákna. Další zvýšení kumulativní dávky vedlo k vystupňování změn v morfologii levé komory (kumulativní dávka DAU 500 mg/m^2). Na konci pokusu bylo již zdokumentováno typické ložiskové poškození levé komory charakteristické pro chronické podávání ANT. Rozsáhlejší ložiska odumřelých buněk byly nahrazována fibrotickou tkání, což se v polarizovaném světle projeвило zvýšenou přítomností červených kolagenních vláken (typ I kolagenu).

V myokardu levé komory byl hodnocen i profil kolagenních proteinů. Celkové množství hydroxyprolinu se zvyšovalo v průběhu rozvoje antracyklinové kardiotoxicity, přičemž již po první aplikaci DAU bylo statisticky významně vyšší v porovnání s kontrolní skupinou. Při analýze jednotlivých frakcí nebyla odhalena změna v množství hydroxyprolinu u rozpustných kolagenních proteinů, zatímco ve frakci nerozpustných kolagenních proteinů docházelo k jeho zvyšování. Množství hydroxyprolinu v této frakci bylo statisticky významně zvýšeno opět již po první aplikaci DAU.

Byl překvapivě odhalen signifikantní pokles celkové aktivity želatináz od 3. týdne podání DAU. Mezi aktivitami stanovenými ve vzorcích odebraných za 24 hod a za týden po dané aplikaci DAU byl nalezen rozdíl, přičemž u vzorků odebraných v pozdějším intervalu byl patrný určitý rostoucí trend v jejich aktivitě. Aktivita dalších MMPs byla stanovena s užitím SensoLyte™ 570 MMP Assay Kit, který zahrnuje specifitu pro MMP-1, 2, 7, 8, 9, 10, 13, 14. V průběhu rozvoje chronické DAU kardiotoxicity jsme nezaznamenali pokles v celkové aktivitě MMPs, naopak aktivita výše uvedených MMPs stagnovala a až na konci pokusu došlo k jejímu signifikantnímu zvýšení. Vedle toho jsme použili i SensoLyte™ 520 MMP Assay Kit

se sérií 6 substrátů. Díky substrátu specifickému pouze pro MMP-13 jsme zaznamenali signifikantní změnu v její aktivitě až na úplném konci pokusu, ačkoliv v první fázi experimentu se také jevila určitá tendence k jejímu zvýšení. S použitím dalšího substrátu s rozšířenou substrátovou specifitou o MMP-12 se stala změna v 3. týdnu v celkové aktivitě MMPs signifikantní a především byla nově detekována konzistentně zvýšená aktivita na konci pokusu (od 8. týdne). Substrát se specifitou dále rozšířenou o MMP-7 poněkud pozměnil charakter detekovaných změn. Trend ve zvýšení aktivity v první fázi pokusu vymizel a došlo k signifikantnímu zvýšení celkové aktivity MMPs v druhé polovině experimentu. Navíc byl poprvé rozpoznán určitý rozdíl mezi aktivitami naměřenými ve vzorcích odebraných za 24 hod. Další substrát se specifitou rozšířenou o MMP-1 a 8 poskytl téměř identické výsledky s předchozím substrátem, což nenaznačuje zásadní podíl těchto MMPs. Poslední dva použité substráty s již poměrně širokou substrátovou specifitou poskytl obdobné výsledky s tendencí ke zvýšení aktivity v první fázi pokusu, následnou stabilizací a signifikantním vzestupem v závěru pokusu. Celkový trend připomínal změny v aktivitě hodnocené pomocí substrátů specifického pro MMP-12 a 13 (obr. 6B).

V průběhu rozvoje chronické ANT kardiotoxicity byly hodnoceny některé markery oxidačního stresu. Již po 1. aplikaci DAU docházelo k statisticky významnému nárůstu množství MDA v srdeční tkáni levé komory oproti kontrolním hodnotám. Nejvyšší zvýšení peroxidace lipidů bylo zaznamenáno již po 5. aplikaci DAU (kumulativní dávka 250 mg/m²). S dalšími zvyšujícími se kumulativními dávkami DAU docházelo k poklesu celkového množství tohoto markeru, nicméně jeho hodnoty zůstaly po celou dobu statisticky významně vyšší v porovnání s kontrolní skupinou (obr. 7A). V průběhu rozvoje chronické ANT kardiotoxicity nebyla zjištěna žádná změna v koncentraci GSH v myokardu levé komory při porovnání s kontrolní skupinou, naopak rozdíly byly zaznamenány u koncentrace GSSG. Od 5. aplikace DAU (kumulativní dávka 250 mg/m²) docházelo ke zvýšení tohoto parametru, které od 8. týdne pokusu (kumulativní dávka DAU 400 mg/m²) bylo statisticky významné. Na konci pokusu byl opět detekován pokles GSSG na hodnotu, která již nebyla statisticky významná v porovnání kontrolní skupinou. Obdobný trend byl nalezen i u stanoveného poměru GSSG/GSH (obr. 7B).



Obr. 7. A) Množství celkového malondialdehydu a B) poměr GSSG/GSH v srdeční tkáni levé komory v průběhu rozvoje chronické antracyklinové kardiotoxicity. Statistická významnost (ANOVA, $p < 0,05$) v porovnání s kontrolní skupinou (*).

Hodnocení základních biochemických parametrů odhalilo nejvýznamnější změny v koncentraci kreatininu a celkového proteinu v odebrané krvi. V porovnání s kontrolními hodnotami byla první statistická významnost stanovena u zvířat, kterým byla odebrána krev 24 hod po 5. aplikaci DAU (kumulativní dávka 250 mg/m²). Od 8. aplikace cytostatika se také významně zvyšovala hladina cholesterolu a triacylglyceridů. Byl stanoven snížený počet leukocytů a erytrocytů a snížená koncentrace hemoglobinu a hematokritu téměř u všech DAU skupin až na výjimku první skupiny, která byla končena 24 hod po 1. aplikaci cytostatika.

7. Diskuze

Kardiotoxicita patří mezi významné limitace užití ANT cytostatik v klinické praxi. Vzhledem k tomu, že ANT navozují ireverzibilní poškození srdce, je pozornost soustředěna na předcházení této komplikaci. Značné naděje byly a stále jsou vkládány do farmakologické kardioprotekce pomocí chelátorů železa. Jediným léčivem s jednoznačně prokázaným účinkem v preklinických i v klinických studiích je DEX^{18, 19}. Za protektivní účinky DEX jsou považovány právě chelatační vlastnosti jeho hydrolytického metabolitu ADR-925, díky nimž dokáže odnímat ionty železa z komplexu s ANT a/nebo vázat volné, redoxně aktivní ionty železa a tak zabraňovat jejich účasti při tvorbě ROS²⁰. V současnosti je DEX podáván pouze u malého procenta pacientů podstupujících léčbu ANT pravděpodobně z důvodu výskytu nežádoucích účinků a jeho vysoké ceny²¹.

Na základě teoretických předpokladů a předchozích výsledků *in vitro* a *ex vivo* experimentů^{26, 27} byl jako vhodná alternativa k DEX zvolen nový perorálně podávaný chelátor železa – deferipron. Jedná se o klinicky užívané léčivo, které je v několika zemích registrováno k léčbě beta-talasemie, resp. stavů spojených s přetížením organismu ionty železa³⁷. U této látky byl prokázán ochranný účinek před cytotoxickým působením doxorubicinu na izolovaných neonatálních kardiomyocytech²⁶. Kardioprotektivní potenciál L1 byl dále podpořen studií provedenou na spontánně bijících sních exponovaných ANT²⁷.

Protože potenciální kardioprotektivum by nemělo negativně ovlivňovat protinádorový účinek ANT cytostatika, byla nejprve provedena studie zaměřená na ovlivnění antiproliferativních účinků ANT. Podání samotného L1 mělo významný antiproliferativní účinek v koncentracích snadno dosažitelných v *in vivo* podmínkách²⁵. Při inkubaci buněk s DAU ($c \approx IC_{50}$) a různými koncentracemi L1 chelátor nesnižoval protinádorový účinek cytostatika. Při vyšších koncentracích L1 byla naopak pozorována sumace antiproliferativních účinků obou látek. Tyto výsledky byly v souladu s předchozími studiemi zaměřenými na protinádorové účinky L1³⁸, jakož i dalších látek chelatujících ionty železa³⁹.

Na podkladě výše uvedených výsledků byla následně provedena kardioprotektivní studie. Jejím hlavním cílem bylo zjistit, zda je L1 schopný zabránit nebo alespoň významně omezit rozvoj chronické ANT kardiotoxicity. Ve studii byl L1 podáván p.o. ve dvou dávkách 10 a 50 mg/kg 45 min před každou aplikací DAU. Podávání ani jedné ze studovaných dávek L1 překvapivě nezabránilo mortalitě navozené ANT. Při vyšší dávce L1 byl zaznamenán časnější úhyn, který lze pravděpodobně vysvětlit výskytem extrakardiální toxicity. Povahu této extrakardiální toxicity se nám bohužel ze získaných dat nepodařilo odhalit. Hematologické a biochemické vyšetření krve zvířat totiž neodhalilo žádné zásadní rozdíly ve studovaných parametrech v porovnání s DAU skupinou a objektivní histologické vyšetření orgánů uhybnulých zvířat bylo v mnoha případech nemožné výraznými posmrtnými změnami. Na druhou stranu nízké koncentrace srdečního troponinu T, které předcházely jednotlivým úhynům, důvodně naznačují extrakardiální charakter toxicity.

Ještě významnější a překvapivější bylo zjištění, že podání L1 neochránilo myokard před ANT navozeným oxidačním stresem, levokomorovým poškozením a srdečním selháním. Při hodnocení lipoperoxidace byl nalezen statisticky významný nárůst MDA po opakovaném podávání DAU. Získané výsledky byly v souladu s dostupnou literaturou a tradičním konceptem antracyklinové kardiotoxicity⁴⁰⁻⁴². L1 ani v jedné studované dávce prokazatelně nesnižoval navozenou lipoperoxidaci. Tato data se tedy evidentně lišila od výsledků získaných v předešlých *in vitro* a *ex vivo* studiích^{26, 27}. Obě citované studie mohou mít však významné limitace s ohledem na přenositelnost získaných dat do klinicky relevantní situace. V první studii bylo s použitím EPR spektroskopie ukázáno, že L1 snížil tvorbu ROS navozenou ANT, nicméně platnost tohoto nálezu nebyla potvrzena v biologickém systému a především v chronickém schématu. V druhém případě je třeba zdůraznit, že myokardiální poškození bylo navozeno akutní expozicí izolovaných srdečních síní relativně vysoké a klinicky nedosažitelné

koncentraci doxorubicinu (30 $\mu\text{mol/l}$). Síně navíc nepatří mezi významné cíle toxického účinku ANT, protože kardiotoxicita těchto cytostatik postihuje zejména levou komoru srdeční.

Neschopnost L1 efektivně snížit DAU navozenou kardiotoxicitu byla potvrzena též funkčním vyšetřením levé komory. Společné podání L1 s cytostatikem vedlo, obdobně jako u DAU skupiny, k progresivnímu a signifikantnímu zvyšování plazmatických koncentrací troponinu T, který je považován za citlivý a selektivní marker srdečního poškození⁴³⁻⁴⁵. Shoda těchto výsledků byla dále podpořena histopatologickým vyšetřením myokardu levé komory. Opakované podávání samotného L1 ve vyšší studované dávce (50 mg/kg) bylo na druhou stranu velmi dobře tolerováno a u většiny hodnocených parametrů nebyly zjištěny žádné abnormality, což korespondovalo s řadou preklinických hodnocení provedených u mnoha jiných živočišných druhů⁴⁶. Výše uvedená tvrzení byla ověřena i pomocí dvou explorativních statistických analýz, které prokázaly, že samotný L1 neovlivňuje kardiovaskulární, hematologické a biochemické parametry a obdobně i parametry obecné toxicity.

Výsledky této studie tedy naznačují, že L1 nechrání před chronickou antracyklinovou kardiotoxicitou. V souvislosti s tímto zjištěním tu vyvstává několik otázek. Lze namítat, že selhání L1 může souviset s jeho malou nebo kolísavou biologickou dostupností. U L1 byla však prokázána velmi dobrá biologická dostupnost po p.o. podání. L1 se dobře vstřebává z gastrointestinálního traktu u lidí stejně tak i u králíků^{47, 48}. Dávka a časový odstup mezi aplikacemi obou látek byly zvoleny v souladu s farmakokinetickou studií provedenou u králíků⁴⁷. Z této studie jsme odvodili, že koncentrace L1 navozující signifikantní protekci vůči ANT kardiotoxicitě na *in vitro* úrovni²⁶ jsou v králíčí plazmě detekovány po více než 12 hod po jeho p.o. podání. V našich experimentech musíme vzít v úvahu i potenciální farmakokinetické interakce. Design studie a farmakokinetické parametry obou použitých látek však tuto možnost s velkou pravděpodobností vylučují^{49, 50}.

V předešlých pokusech bylo prokázáno, že „klasický“ chelátor železa, deferoxamin (DFO) nechrání vůči chronické ANT toxicitě u spontánně hypertenzních potkanů⁵¹. Toto selhání lze připisat jeho hydrofilní povaze, která omezuje jeho vstup do kardiomyocytů. Na druhou stranu s použitím našeho *in vivo* modelu jsme prokázali, že lipofilní arolylhydrazonové chelátory železa, odvozené od mateřské látky pyridoxal isonikotinoyl hydrazonu, byly schopny zabránit rozvoji antracyklinové kardiotoxicity, i když pouze ve velmi úzkém dávkovém rozmezí⁵²⁻⁵⁴. Obdobně jako u DEX a arolylhydrazonových látek byl po podání L1 prokázán rychlý vstup do kardiomyocytů^{20, 25} a zde efektivní odstraňování iontů železa z komplexů ANT-Fe³⁺²⁶, nicméně narozdíl od nich nechránil před poškozením vyvolaným cytostatikem. Nesoulad našich výsledků s výše uvedenými údaji nás přivedl ke srovnání L1 s dalším chelátorem studovanými na podobném schématu. Například lipofilní selektivní chelátor železa deferasirox (ICL670), navzdory své schopnosti rychlého prostupu do buňky a účinnému odnámání iontů železa z komplexu ANT-Fe³⁺, nenavodil protektivní účinek na stejném *in vitro* modelu, který byl použit i při kardioprotektivní studii s L1⁵⁵. Toto zjištění může vést k myšlence, že schopnost látky chelátovat ionty železa nemusí být jediným rozhodujícím činitelem pro protektivní účinek. Rozdíl v kardioprotektivních vlastnostech mohou být přičítány i odlišnému poměru, ve kterém chelátory vážou volné ionty železa. L1 tvoří s ionty železa komplexy v poměru 3:1, a tím i daná větší pravděpodobnost nedostatečného obsazení všech vazebných míst pro Fe³⁺ by mohla být jednou z limitací použití L1 v kardioprotektivní oblasti. Dále nelze vyloučit, že L1 přes svoji dobrou prostupnost do srdečních buněk nemusí dosáhnout žádoucího intracelulárního kompartmentu a/nebo zde nemusí setrvat po celou dobu potřebnou k navození účinné kardioprotekce. Pozorovaný nedostatečný kardioprotektivní účinek L1 může též znamenat, že železem katalyzovaná tvorba ROS nemusí být klíčovým a konečným exekutorem zodpovědným za chronickou ANT kardiotoxicitu. ROS mohou vznikat i bez přítomnosti iontů železa¹⁰. Proto tyto výsledky společně s předešlými nálezy podporují možnost, že role železa a jeho chelatace při ANT kardiotoxicitě je mnohem složitější než se dosud předpokládalo.

Nesoulad našich výsledků s pracemi jiných autorů také poukazuje na obtížnost přenosu dat z *in vitro* a *ex vivo* kardioprotektivních studií do chronických *in vivo* podmínek, které blíže odrážejí ANT kardiotoxicitu pozorovanou v klinické praxi.

Naše výsledky naznačují, že patogeneze ANT kardiotoxicity může být mnohem složitější než se doposud myslelo. V naprosté většině přehledových prací a učebnic je ANT kardiotoxicita tradičně spojována s navozením oxidačního stresu a z toho plynoucí progresivní degenerací a neprogramovanou smrtí kardiomyocytů^{55, 56, 57}. S hlubším pochopením role programované buněčné smrti u onemocnění srdce se však tento pohled v posledních letech zásadně změnil^{58, 59}. V odborné literatuře se objevuje stále více prací poukazujících na možnou úlohu apoptózy v rozvoji ANT kardiotoxicity^{28-32, 60}, i když historicky první studie zaměřená na tuto oblast dospěla k opačnému výsledku⁶¹.

Úvahy o podílu apoptózy u ANT kardiotoxicity jsme chtěli nejprve potvrdit na našem *in vitro* modelu, který je založen na použití buněčné linie H9c2 odvozené od potkaních embryonálních srdečních myoblastů. DAU v klinicky relevantních koncentracích vykazoval dávkově závislou cytotoxicitu, přičemž nejvýraznější pokles viability buněk byl pozorován mezi koncentrací 0,3 a 1 $\mu\text{mol/l}$. Postupné snižování viability bylo doprovázené statisticky významným nárůstem fragmentace DNA. Již velmi nízké koncentrace ANT spolehlivě navozovaly apoptotickou buněčnou smrt, zatímco následné zvýšení koncentrace do oblasti hraničních a supratherapeutických koncentrací vedlo k poklesu fragmentace DNA. Tento náález může být vysvětlen tím, že při takto vysoké koncentraci ANT již převažuje nekrotická buněčná smrt nad apoptotickou, což je v souladu s výsledky předchozích prací^{32, 62}. S užitím H9c2 buněk byla provedena i analýza aktivit čtyř kaspáz majících zásadní úlohu při intracelulární signalizaci vedoucí k apoptotické buněčné smrti. V *in vitro* podmínkách nebyla prokázána aktivace vnější apoptotické cesty, což může souviset s nepřítomností aktivovaných buněk intersticia a infiltrujících buněk imunitního systému. Obdobně nebyla zdokumentována účast ani recentně popsané cesty spouštěné tzv. ER/SR stresem, který je spojován s aktivací kaspázy 12. Výsledky z *in vitro* úrovně nicméně prokázaly dávkově závislou zvýšenou aktivitu kaspáz 3 a 9, což naznačuje účast vnitřní (mitochondriální) apoptotické cesty a její důležitou roli v programované buněčné smrti navozené DAU u této buněčné linie.

S ohledem na získané výsledky z *in vitro* úrovně jsme se v následující části zaměřili na úlohu programované a neprogramované buněčné smrti u chronické ANT kardiotoxicity *in vivo* a na jejich možné ovlivnění podáním modelového kardioprotektiva DEX. DEX podávaný před každou aplikací DAU zcela ochránil zvířata před předčasným úhynem a srdečním selháním. Získaná data tak potvrzují významný kardioprotektivní potenciál DEX, který je v souladu s výsledky z předchozích preklinických a klinických studií¹⁹.

Histologické hodnocení v DAU skupině odhalilo závažné ložiskové poškození myokardu levé komory. Tyto změny zahrnovaly různé stupně buněčné degenerace (převážně cytoplazmatickou vakuolizaci a progresivní ztrátu myofibril). Pokročilé degenerativní změny pak vedly k neprogramované buněčné smrti. Pro takto postižené kardiomyocyty byl typický buněčný edém a pozvolná buněčná desintegrace. Ve stejném čase byly významně zvýšené i plazmatické koncentrace srdečního troponinu T a I. Histologicky byla zdokumentována významná fibrotizace tkáně. V místech, kde odumřelé buňky tvořily rozsáhlejší ložiska, byly jejich zbytky následně nahrazeny fibrotickou tkání. Reparativní proces se vyznačoval tvorbou obou typů kolagenu, přičemž typ III byl tvořen zejména na začátku hojení, zatímco tvorba kolagenu typu I byla typická pro pokročilé stádium reparace. DEX dokázal těmto morfologickým změnám zřetelně zabránit, a to ve srovnatelném rozsahu jako v dříve publikovaných pracích^{51, 63, 64}. DEX dále nárůstu plazmatické koncentrace obou srdečních troponinů. Přestože přesný mechanismus uvolňování troponinů do krevního řečiště dosud nebyl ještě zcela objasněn, je tradičně spojován s nekrotickou smrtí kardiomyocytů, kde integrita cytoplazmatické membrány je narušena⁶⁵⁻⁶⁷. Na základě nízkých koncentrací troponinů

a zmírnění degenerativních změn lze tedy odvodit, že DEX zabránil i výskytu neprogramované smrti kardiomyocytů navozené DEX. Tyto výsledky tak velmi dobře korespondují s široce akceptovaným konceptem kardioprotekce navozené DEX^{63, 68}.

Vedle tradiční cesty opírající se o ANT navozenou a ROS zprostředkovanou buněčnou degeneraci, která může vést k neprogramovanému zániku kardiomyocytů, jsme se zaměřili i na možnou úlohu programované (apoptotické) buněčné smrti v tomto procesu. Na našem experimentálním modelu bylo chronické podávání DEX spojeno se signifikantním zvýšením počtu TUNEL-pozitivních buněk myokardu levé komory a nárůstem aktivit exekutivních kaspáz 3 a 7, což potvrzuje indukci apoptózy kardiomyocytů. Oba hodnocené apoptotické parametry dobře korelovaly s levokomorovou systolickou funkcí u jednotlivých zvířat.

Ve vztahu k intracelulární apoptotické signalizaci bylo v dříve publikovaných pracích naznačeno, že klíčovou apoptotickou cestou u antracyklinové kardiotoxicity je hlavně vnitřní mitochondriální cesta (kaspáza 9)⁶⁹ a popřípadě jinými autory zmiňovaná vnější receptorová cesta (kaspáza 8)³⁰. Naše hodnocení ukázalo na současnou aktivaci obou signálních cest při chronické ANT kardiotoxicitě. Navíc se nám podařilo popsat zapojení další signální cesty vedoucí k apoptotickému zániku kardiomyocytů. Jednalo se o cestu zprostředkovanou kaspázou 12, která je v literárních pramenech spojována s přítomností ER/SR stresu. Aktivace této cesty byla již dříve popsána u ANT kardiotoxicity, nicméně i v tomto případě byla navozena podáním jedné supratherapeutické dávky doxorubicinu⁷⁰. Naše výsledky byly v souladu i s dostupnými daty, která poukazují na závažný ultrastrukturální a funkční účinek opakovaného podání antracyklinů na ER/SR⁸.

V naší studii bylo zjištěno, že znaky významné buněčné degenerace a zvýšená TUNEL pozitivita byly velmi výjimečně lokalizovány ve stejných myocytech. Ačkoliv oba děje vedoucí k buněčné smrti se vyskytují současně v celém myokardu levé komory, typicky postihují rozdílné kardiomyocyty. Obecně se ukazuje, že apoptóza sehrává méně významnou úlohu uvnitř ložisek myocytů s pokročilými degenerativními změnami. Ačkoliv se zdají být pokročilé degenerativní změny více vyjádřené u zvířat s rozvinutější kardiotoxicitou, míru přispění obou procesů k rozvoji srdečního selhání navozeného ANT nelze na základě dostupných dat objektivně posoudit. Je třeba podotknout, že zatímco apoptóza je kompletně ukončena během několika hodin, degenerativní změny probíhají zřetelně pozvolněji (několik týdnů až měsíců).

Na podkladě výše diskutovaných výsledků i dostupných literárních údajů lze konstatovat, že k dispozici jsou poměrně jednoznačné důkazy o apoptóze navozené ANT. Nicméně stále zůstává nezodpovězená důležitá otázka, zda-li kardioprotektivní účinek DEX zahrnuje také ochranu před apoptotickou smrtí kardiomyocytů. DEX je tradičně považován za prolečivo, které je uvnitř kardiomyocytů enzymaticky aktivováno na chelatačně účinný metabolit ADR-925. Doposud byl protektivní účinek DEX spojován s ochranou kardiomyocytů před tvorbou ROS a následnými degenerativními změnami kardiomyocytů, které mohou vyústit v jejich spontánní zánik^{63, 68}. Jediná *in vitro* studie provedená na izolovaných potkaních kardiomyocytech naznačuje, že při klinicky relevantních koncentracích ANT může být hlavní část protektivního účinku DEX spojena i s ochranou srdečních buněk před apoptózou³⁷. Protože nebylo možné v tomto směru formulovat definitivní závěry s ohledem na známé problémy s přenositelností dat ze studií provedených na buněčných kulturách a absencí dat z chronického, klinicky relevantního *in vivo* modelu, věnovali jsme se této otázce na našem *in vivo* modelu. Zde jsme pomocí TUNEL metody jasně prokázali, že DEX snižuje počet TUNEL-pozitivních jader, které vykazovaly přítomnost fragmentace DNA, na úroveň hodnot kontrolní skupiny. Tento výsledek byl významně podpořen stanovením aktivity kaspáz 3 a 7, které sehrávají „exekutivní“ úlohu v apoptotické kaskádě. Shoda obou výsledků tedy naznačila, že DEX je schopen velmi účinně zabránit apoptotické buněčné smrti navozené ANT. V následující fázi nás také zajímalo, jakým způsobem DEX ovlivnil apoptotickou signalizaci spuštěnou DEX. Naše výsledky překvapivě ukázaly, že DEX zabránil aktivaci všech výše zmiňovaných cest

(zprostředkované kaspázou 8, 9 a 12). Tato schopnost DEX zabránit spuštění hned několika signálních cest pravděpodobně vysvětluje jeho celkovou antiapoptickou účinnost a patrně významným způsobem přispívá i k jeho celkově vysokému kardioprotektivnímu potenciálu. Zjištění, že všechny parametry apoptózy signifikantně a úzce korelovaly s levokomorovou systolickou funkcí u jednotlivých zvířat, dále podpořilo výše uvedený závěr. Další informace určující vztah mezi parametry apoptózy a ostatními studovanými parametry byly získány pomocí dvou explorativních statistických analýz. Tyto analýzy odhalily, že DEX měl jasnou tendenci k omezení apoptotické i neapoptotické buněčné smrti. Aktivity kaspáz byly navíc určeny jako významní činitelé v přirozeném shlukování jednotlivých zvířat, což tak vyzdvihlo apoptózu na velmi důležitý cíl pro kardioprotektivní zásah DEX.

Ačkoliv výsledky přesvědčivě prokazují, že DEX chrání myocyty před neprogramovanou a programovanou buněčnou smrtí, mechanismy zodpovědné za tyto účinky zůstávají neznámé. Tradičně se hlavní úloha v rozvoji ANT kardiotoxicity připisovala tvorbě ROS za katalytického příspěvní volných iontů železa^{10, 11}. Tuto teorii podporuje zjištění, že aktivní metabolit DEX (ADR-925) odnímá ionty železa z ANT-Fe³⁺ komplexu a účinně tak brání tvorbě toxických hydroxylových radikálů²⁰. Naše předchozí pokusy však ukázaly, že strukturně odlišné látky, které snadno vstupují do buněk, s vyšší účinností a selektivitou než ADR-925 chelatují volné ionty železa a které účinně odnímají ionty železa z komplexu ANT-Fe³⁺, mají překvapivě nižší či žádnou kardioprotektivní účinnost^{52-54, 71}. Tato data nás ještě více vedla k závěru, že samotná chelatace iontů železa nemusí být jediným a/nebo hlavním ukazatelem úspěšné kardioprotekce.

Proto jsme se v další části studie snažili zjistit, zda-li protektivní účinek DEX před ANT navozenou programovanou i neprogramovanou smrtí kardiomyocytů zahrnuje i ochranu před poškozením vyvolaným ROS. V souvislosti s ANT je věnována největší pozornost peroxidaci lipidů vedoucí ke vzniku velkého množství vysoce cytotoxických aldehydů, jako např. MDA. Pro stanovení tohoto markeru lipoperoxidace byla použita HPLC metoda³⁶, kterou byly zjištěny zvýšené hladiny MDA v myokardu zvířat po opakovaném podávání DAU. Tento výsledek byl v souladu s mnoha literárními údaji a poměrně jasně ukazoval na přítomnost oxidačního stresu po podání cytotatika a následné lipoperoxidační poškození. Novým a zároveň značně překvapivým nálezem však bylo, že DEX tomuto ději nezabránil. Obdobné výsledky byly získány i s imunohistochemickou detekcí dalšího markeru lipoperoxidace, kterým byl 4-HNE. Pomocí tohoto přístupu jsme pozorovali zřetelně vyšší signál 4-HNE v myokardu DAU zvířat. Obdobné výsledky byly získány i u DEX+DAU skupiny. Obě metody tedy shodně poukazují na zjevný nesoulad mezi téměř úplným protektivním účinkem DEX na většinu kardiovaskulárních parametrů a absencí jeho významného vlivu na ANT navozenou peroxidaci lipidů. Tento nepoměr částečně potvrdila i korelační analýza, která nenalezla významný vztah mezi celkovým množstvím MDA v myokardu pokusných zvířat a systolickou srdeční funkcí levé komory. Hodnoty MDA také velmi slabě korelovaly s aktivitou kaspázy 3 a nebyl nalezen žádný vztah mezi mírou lipoperoxidace a aktivitami kaspáz vnější i vnitřní cesty.

V naší studii jsme stanovili MDA v celotkáňovém homogenátu myokardu levé komory. Na základě našich výsledků tedy nemůžeme vyloučit možnost, že ochrana DEX před poškozením navozeným ROS není primárně spojená jen s některým z buněčných kompartmentů. Na druhou stranu výsledky imunohistochemické detekce 4-HNE nenaznačovaly, že by tomu tak mělo být. Proto se přikláníme k možnosti, že účinná kardioprotekce navozená DEX primárně nemusí záviset na ochraně před lipoperoxidací navozenou ANT. Nelze však vyloučit, že existuje kompartment, který významně nepřispívá k celkové hodnotě tkáňového MDA, ale přitom může být klíčový pro osud srdečních buněk z hlediska ochrany před tvorbou ROS a následnou lipoperoxidací membrán.

S užitím izolovaných potkaních kardiomyocytů jsme v předešlých studiích ukázali, že chelátor železa SIH ze skupiny aroylhydrazonů je schopný navodit signifikantní, nicméně jen částečnou protekci před buněčnou smrtí navozenou DAU. Je zajímavé, že tento protektivní

účinek nebyl doprovázen významným snížením lipoperoxidace⁷². Toto pozorování bylo též v kontrastu s výsledky získanými se stejnou látkou při navození oxidačního stresu inkubací buněk s peroxidem vodíku^{73, 74}. Za těchto podmínek bylo dosaženo nejen vyššího protektivního účinku, ale i téměř kompletní ochrany před lipoperoxidací. V další studii bylo ukázáno, že DEX nezmírnil ani oxidační poškození vyvolané doxorubicinem u buněčná linie A549⁷⁵. I tato data ukazují, že ochrana srdečních buněk před ANT kardiotoxicitou nemusí být jednoznačně závislá na ochraně před lipoperoxidací.

V návaznosti na výše uvedená fakta jsme se zaměřili na stanovení množství glutathionu v myokardu levé komory jako jedné z hlavních endogenních látek, které slouží k udržení redoxní homeostázy buňky. V DAU skupině byla zjištěna signifikantně zvýšená koncentrace GSH, což naznačuje zvýšenou syntézu glutathionu, nicméně množství GSSG zůstalo zachované na hodnotách srovnatelných s kontrolní skupinou. Podání DEX přitom nenavodilo významné změny v obou parametrech a hodnoty se velmi blížily DAU skupině. Zaměřili jsme se i na poměr GSSG/GSH, který může být důležitým ukazatelem tvorby ROS v buňce⁷⁶. Mezi experimentálními skupinami nebyl však nalezen žádný rozdíl. Jako možné vysvětlení se nabízí, že glutathionu, i když se v buňkách vyskytuje v dostatečném množství, nemusí zde být rovnoměrně rozložený. Velká část glutathionu z celkového množství se především nachází v cytoplazmě, kde se také syntetizuje, nicméně určitý malý podíl lze nalézt i v mitochondriích a jádře⁷⁷. Proto drobnější změny v množství glutathionu v rámci těchto dvou kompartmentů se nemusí projevit na jeho celkovém obsahu v buňce.

S ohledem na výše diskutovaná data si objasnění úlohy ROS v ANT kardiotoxicitě zajisté zaslouží další pozornost. Nicméně shrnutí všech dosavadních výsledků nás zatím vede k závěru, že ochrana před tvorbou ROS a následnou lipoperoxidací nemusí hrát jedinou zásadní úlohu v kardioprotekci navozené DEX. Toto zjištění může vysvětlit selhání dřívějších pokusů s celou řadou antioxidantů (např. vitamin E, acetylcystein) zaměřených na protektivní intervenci před antracyklinovou kardiotoxicitou na chronických experimentálních modelech^{64, 68, 78} a v randomizovaných klinických studiích⁷⁹⁻⁸². Naše data tímto také podporují současnou výzvu k přehodnocení „klasické“ a možná až příliš zjednodušené verze “ROS and iron hypothesis” patogeneze ANT kardiotoxicity a mechanismu kardioprotekce navozené DEX¹⁴.

Za těchto okolností zde vyvstává řada otázek ohledně konkrétních mechanismů zodpovědných za protektivní účinek DEX vůči ANT kardiotoxicitě. ANT a jejich metabolity mohou vyvolat řadu dalších buněčných dějů, které nejsou přímo zprostředkovány ROS⁸³. ANT například významně interferují s buněčnou homeostázou vápníku ovlivněním funkce kalciových transportů a iontových kanálů^{8, 84-86}, což může ve svém důsledku vyústit v přetížení buňky vápníkem. Narozdíl od dříve studovaných látek^{52, 53, 71} aktivní metabolit DEX díky své strukturální podobnosti s EDTA může chelatovat i vápenaté ionty. Schopnost DEX zabránit poruše homeostázy vápníku byla v minulosti prokázána i na našem modelu⁸⁴, což může vysvětlovat rozdíl v kardioprotektivních účincích námi studovaných látek. S přetížením buněk vápenatými ionty souvisí i rozvoj ER/SR stresu, jehož přítomnost jsme naznačili stanovením zvýšené aktivity kaspázy 12 po opakovaném podání DAU, přičemž DEX ji dokázal významně potlačit. Vápenaté ionty zvyšují aktivitu řady enzymů, např. Ca²⁺-dependentní proteázy, kalpainu⁸⁷, který se např. účastní štěpení řady cytoskeletárních a myofilamentárních proteinů, což by mohlo vést k progresi rozvoje kardiomyopatie^{88, 89}. Kalpain je také spojován s apoptózou prostřednictvím štěpení pro-kaspázy 12 a pro-apoptické molekuly Bid, která je součástí mitochondriální signální cesty. Na jeho případnou úlohu v ANT kardiotoxicitě poukazuje i jeho značně zvýšená aktivita po inkubaci izolovaných kardiomyocytů s klinicky relevantními koncentracemi ANT⁹⁰. Naše pilotní výsledky též naznačují zvýšenou aktivitu této proteázy v myokardu zvířat, kterým byl podáván opakovaně DAU (data nejsou prezentována), proto si význam této cesty pro ochranu myokardu vyžádá další studium.

Vedle výše diskutovaných hypotéz, které výhradně vycházely z předpokladu, že DEX je proléčivo chelatačně aktivní látky ADR-925, můžeme v recentní literatuře nalézt indicie poukazující na možnost přímého kardioprotektivního působení DEX^{91, 92}. DEX patří mezi kompetitivní katalytické inhibitory topoisomerázy II, které uzamykají enzym v jeho stabilní a uzavřené konformaci obklopující DNA⁹³. Tento účinek je tradičně spojován s protinádorovým působením DEX. ANT se naopak řadí mezi ireverzibilní inhibitory topoisomerázy II („topoisomerase II poisons“), které se kovalentně vážou na DNA řetězce a molekulu topoisomerázy za vzniku stabilního komplexu, což následně vede k vyvolání zlomů v DNA⁸. Nově se proto objevily informace, že DEX jako katalytický inhibitor by mohl působit kardioprotektivně vůči účinkům látek řadících se k „topoisomerase II poisons“⁹². Tyto výsledky byly částečně podpořeny experimenty s novým DEX derivátem (ICRF-161), který má obdobně jako DEX chelatační aktivitu, ale je prostý inhibiční aktivity vůči topoisomeráze II. Užitím této chelatačně aktivní látky na chronickém *in vivo* modelu se ukázalo, že absence vlivu na topoisomerázu II vedla ke ztrátě kardioprotektivního účinku⁹⁴.

V této práci jsme se též zaměřili na lepší pochopení patogenese chronické ANT kardiotoxicity, což by významně přispělo k racionálnějšímu „designu“ účinných kardioprotektiv. Jednou z klíčových otázek, které stále nebyly vyřešeny, je sledování dynamiky dějů, které nakonec vyústí v klinický obraz chronické ANT kardiotoxicity. V klinické praxi to bylo dosud studováno pouze omezeně, což souvisí s obtížnou dostupností myokardiálních vzorků jedinců exponovaných různě kumulativní dávkou ANT. Bioptický stejně jako postmortální odběr myokardu jsou zatíženy řadou komplikací jako např. kvalita, dostupnost, množství a reprezentativní charakter vzorku. S ohledem na tento fakt se jeví použití experimentálního modelu jako velmi vhodná příležitost ke studiu vlivu různé kumulativní dávky cytostatika a časového sledu funkčních, morfologických a dalších změn v myokardu levé komory v průběhu rozvoje chronické ANT kardiotoxicity.

Současná úvaha předpokládá, že každá dávka ANT může vyvolat určité poškození myokardu. Toto poškození zpočátku probíhá skrytě až do doby, kdy nakumulované poškození myokardu překročí jeho funkční rezervu⁹⁵. Se zvyšující se kumulativní dávkou ANT se stupňují změny v ultrastruktuře myokardu, které mohou vyústit v ireverzibilní ztrátu myofibril, v degeneraci kardiomyocytů a až v jejich smrt^{3, 5}. Takto vzniklá ANT kardiomyopatie se dále manifestuje jako levostranné srdeční selhání s velmi špatnou prognózou pro pacienta^{1, 14}. Dle nových informací je hranice 5% výskytu kardiotoxicity překročena již při kumulativní dávce doxorubicinu 400-500 mg/m²⁹⁵. Původní údaje vycházející z klasické studie kolektivu von Hoff et al. z roku 1979 udávaly 7% riziko rozvoje kardiotoxicity po překročení kumulativní dávky 550 mg/m²³. Z těchto údajů vychází i současná doporučení pro podávání kardioprotektiva DEX, která navrhuji jeho podání až při překročení určité kumulativní dávky ANT (např. 300 mg/m² u doxorubicinu), i když je velmi pravděpodobné, že k poškození myokardu dochází s každou podanou dávkou cytostatika.

Pro účely této studie bylo tedy vytvořeno několik skupin zvířat, která byla exponovaná různě kumulativní dávkou ANT a končena za 24 hod nebo za 7 dnů po dané kumulativní dávce cytostatika. Záměrně jsme zvolili schéma, které nám umožní zachytit jak změny chronického rázu, tak i související s poslední podanou dávkou cytostatika. Během studie jsme byli svědky progresivního snižování kontraktility levé komory, přičemž první statisticky významný pokles byl spjat s kumulativní dávkou DAU 400 mg/m² (přesněji s 24 hod odstupem od 8. aplikace DAU). S poklesem funkce levé komory korespondovaly i hodnoty srdečního troponinu T. Od tohoto intervalu byly zaznamenány i rozdíly mezi plazmatickými koncentracemi troponinu T stanovenými 24 hod nebo týden po dané aplikaci DAU, což poukazuje na jeho pozvolné uvolňování do krevního řečiště, nicméně změny nedosahovaly statistických významností. Zaměřili jsme se i na stanovení plazmatických koncentrací srdečního troponinu I, které obdobně jako u troponinu T progresivně narůstaly od druhé poloviny pokusu, což odpovídá

kumulativnímu charakteru ANT kardiotoxicity. Tento fakt nám tedy dále potvrzuje, že stanovení koncentrací troponinu T a I je vhodným markerem hodnocení chronické ANT kardiotoxicity⁴⁵.

Jak už bylo zmíněno, hlavní úloha v rozvoji chronické antracyklinové kardiotoxicity je tradičně přisuzována tvorbě ROS. Naše předchozí studie i recentní literární údaje však naznačují, že situace nemusí být tak jednoduchá. Proto nás zajímal časový průběh těchto změn. Nejprve jsme se zaměřili na hodnocení lipoperoxidace prostřednictvím stanovení MDA v průběhu celého rozvoje srdečního poškození. Bylo zajímavé, že již po 1. aplikaci DAU jsme zaznamenali významný nárůst množství MDA. Pozoruhodný byl i celkový charakter vývoje lipoperoxidace v celém experimentu. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny po 5. aplikaci DAU (kumulativní dávka 250 mg/m²). Poté byl zaznamenán progresivní pokles jeho hladin, které zůstaly nadále významně zvýšené oproti kontrole. Hodnoty MDA odrážející aktuální stav lipoperoxidace neměly evidentně kumulativní charakter.

Stanovení změn v GSSG a GSH v průběhu rozvoje ANT kardiotoxicity přineslo další zajímavé informace. I když se hodnoty celkového a redukováného glutathionu měnily pouze nevýznamně, poměr GSSH/GSH byl signifikantně zvýšen v 5. a 8. týdnu pokusu, přičemž hodnoty v závěru experimentu opět klesaly a již se nelišily od kontrol. Z hlediska časového trendu vývoje tohoto parametru lze shledat určitou podobnost se stanovením MDA, na což poukázala i korelační analýza. O kauzální souvislosti obou parametrů napovídají i teoretické argumenty, neboť právě glutathion je známým substrátem pro enzymatické reakce katalyzované glutathionperoxidázou směřující k odbourávání toxických produktů lipoperoxidace⁷⁶. Oba tyto parametry naznačují, že průběh oxidačního stresu v průběhu ANT kardiotoxicity je dynamický, ale překvapivě nemá kumulativní charakter. Vzhledem k tomu, že oxidační stres předchází systolické dysfunkci o několik týdnů a vzhledem k celkovému trendu vývoje obou markerů, by tento fakt mohl znamenat, že oxidační stres je spíše spouštěčem než exekutivním činitelem v rozvoji chronické ANT kardiotoxicity.

Výše uvedeným výsledkům odpovídal i histologický nález myokardu levé komory. Do kumulativní dávky DAU 250 mg/m² byly zaznamenány pouze mírné změny v morfologii srdce v porovnání s kontrolní skupinou, přestože parametry oxidačního stresu zde významně narůstaly. Na úrovni světelné mikroskopie jsme nenalezli žádný významný rozdíl mezi odběrem myokardu 24 hod či týden po poslední aplikaci DAU v daném intervalu sledování. K výraznějším morfologickým změnám docházelo až od 8. aplikace DAU (kumulativní dávka 400 mg/m²). V myokardech levé komory, které byly odebrány za 24 hod po 8. aplikaci cytostatika, byly zaznamenány různé stupně buněčné degenerace, která se vyznačovala přítomností cytoplazmatické vakuolizace a postupnou ztrátou myofibril. U kardiomyocytů, které byly v konečném stádiu buněčné degenerace, byl patrný buněčný edém a progresivní buněčná desintegrace. Sledovaný počátek procesu hojení byl spojen především s přítomností kolagenu III. Při porovnání myokardů odebraných za 24 hod a za týden po 8. aplikaci DAU byl zjištěn nepatrný rozdíl v histologickém nálezu. Zvyšoval se počet buněk podléhajících degeneraci a následně neprogramované buněčné smrti. S použitím polarizovaného světla bylo odhaleno i postupné vyzrávání kolagenu. Právě v této fázi toxického poškození jsme zaznamenali i signifikantní pokles systolické srdeční funkce, takže vzájemná souvislost obou dějů je zřejmá. Při hledání souvislosti s oxidačním stresem v jednotlivých intervalech jsme nezjistili přímý vztah se změnami funkce ani morfologie levé komory. Další zvýšení kumulativní dávky vedlo k vystupňování změn v morfologii levé komory, přičemž na konci byly změny nejvýraznější (kumulativní dávka DAU 500 mg/m²). V této fázi bylo již zdokumentováno typické ložiskové poškození levé komory charakteristické pro chronické podávání ANT^{5,57}.

V průběhu rozvoje chronické ANT kardiotoxicity jsme zaznamenali, že nově syntetizovaný kolagen představoval z velké části kolagen typu III, který tvořil jemná retikulární vlákna. V průběhu chronického pokusu podléhal tento typ kolagenu postupné degradaci a

náhradě za typ I v důsledku vyžívání pojivové tkáně ve fibrotickou jizvu. Výše popsané změny ve struktuře kolagenní sítě vedly k rozvoji rozsáhlé fibrózy, která typicky doprovází dilatační kardiomyopatii. Histologicky zdokumentovaná fibrotizace tkáně byla potvrzena i biochemicky zvýšenou koncentrací hydroxyprolinu jako markeru fibrózy³⁵.

Remodelace myokardu není děj samovolný, ale ze všech informací je zřejmé, že se na něm podílí řada signálních a exekutivních molekul. Proto jsme se v další části zaměřili na hodnocení úlohy matrixových metaloproteináz, které jsou obecně považovány za klíčové regulátory a vykonavatele remodelace extracelulární matrix. Údaje o možném podílu MMPs na remodelaci myokardu u ANT kardiomyopatie jsou však omezené. Dosud byly publikované práce, kde byla úloha MMPs hodnocena jen po jednorázové aplikaci vysoké dávky ANT^{96, 97}. Nejprve jsme se zaměřili na hodnocení aktivity želatináz (MMP-2, 9) v myokardiálních vzorcích, protože právě tyto dvě formy MMPs jsou nejvíce zmiňované v souvislosti s remodelací myokardu. Mezi jejich známé degradační substráty patří želatina, kolagen I a kolagen III⁹⁸. Významné zapojení těchto MMP bylo popsáno např. u ischemicko/reperfúzního poškození a následné myokardiální remodelace⁹⁹. Obdobně zvýšená jejich aktivita byla prokázána i po jednorázové vysoké dávce ANT^{96, 97}. Při použití našeho modelu jsme překvapivě pozorovali významný pokles celkové aktivity obou želatináz od 3. aplikaci DAU (kumulativní dávka 150 mg/m²). Při srovnání s dalšími pracemi jsme našli, že se nejedná o náhodný jev. Snížená aktivita želatináz byla popsána i u experimentálně navozené diabetické kardiomyopatie či u modelu L-NAME deficientní hypertenze^{100, 101}. Tyto výsledky tedy naznačují, že hlavní želatinázy (MMP-2 a 9) se zřejmě významně nepodílejí na remodelaci myokardu v důsledku ANT kardiomyopatie.

Rodina MMP je dle dnešního stavu znalostí velmi široká, a proto jsme na základě těchto výsledků nemohli vyloučit, že se do tohoto procesu nezapojují některé z dalších MMP. Proto jsme použili dostupný fluorescenční kit SensoLyte™ 570 MMP Assay Kit. S použitím tohoto kitu, který obsahuje substrát specifický pro MMP-1, 2, 7, 8, 9, 10, 13, 14, jsme získali odlišné výsledky. Celková aktivita výše uvedených MMPs v průběhu rozvoje chronické daunorubicinové kardiotoxicity stagnovala a až na konci pokusu došlo k jejímu signifikantnímu zvýšení. Vedle toho jsme použili i kit SensoLyte™ 520 MMP Assay Kit se sérií 6 různých substrátů, které vykazují různou specifitu vůči MMP-1, 2, 3, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14. Z těchto experimentů bylo možné alespoň částečně odvodit, která z MMP sehrává významnější roli v remodelaci myokardu navozené antracykliny. Pro jednotlivou MMP byl z nabídky dostupných substrátů selektivní pouze jeden, který nám umožnil specificky hodnotit aktivitu MMP-13. Tato MMP je syntetizována zejména aktivovanými myokardiálními fibroblasty (často v odpovědi na oxidační stres)⁹⁸. V průběhu celého rozvoje ANT kardiotoxicity jsme ovšem nezaznamenali žádné signifikantní změny v aktivitě MMP-13, ačkoliv v první fázi experimentu se jevila určitá tendence k jejímu zvýšení. Kromě prvního týdne studie výsledky nenaznačovaly ani souvislost s mírou oxidačního stresu v myokardu pokusných zvířat. S použitím substrátu s rozšířenou substrátovou specifitou o MMP-12 se stala změna v 3. týdnu v celkové aktivitě MMPs signifikantní a především byla zcela nově detekována konzistentně zvýšená aktivita na konci pokusu (přesněji kumulativní dávka DAU 400 mg/m²). Právě v této fázi dochází k poklesu systolické srdeční funkce, zvýšení plazmatických hladin troponinů, rozvoji morfologického poškození myokardu a významné remodelaci levé komory. Tomuto nálezu předcházeli i nárůst lipoperoxidace, přičemž hodnoty MDA v tomto intervalu zůstávaly stále významně zvýšené. Také množství GSSG a poměr GSSG/GSH byly v tomto okamžiku významně zvýšeny, což signalizuje přítomnost oxidačního stresu. V porovnání s předešlými výsledky lze tyto změny přiřadit aktivitě MMP-12, která je sekretována výhradně infiltrujícími makrofágy a štěpí zejména elastin, fibronektin a kolagen IV⁹⁸. Těmto výsledkům odpovídal i histologický nález, který ukazoval na nástup pokročilejších degenerativních změn právě od 8. týdnu pokusu, s postupným výskytem „úklidové reakce“ (byť relativně omezené) v podobě infiltrace makrofágů.

Naše nálezy dokazují, že patogeneze chronické ANT kardiotoxicity je velmi komplikovaný děj, který může být výsledkem několika po sobě, ale i paralelně jdoucích procesů. V tomto ohledu je třeba podotknout, že úspěch při vývoji nových účinných kardioprotektiv bude do značné míry záviset na schopnosti pochopit podstatu tohoto děje. Nicméně stále zde zůstává mnoho nejasností týkajících se především reálného významu jednotlivých mechanismů, jejich vzájemné kauzální a časové souslednosti a propojení. Proto je potřebné upřít další pozornost k analýze molekulárních dějů ovlivňující mechanismy ANT kardiotoxicity. K identifikaci klíčových molekul a signálních cest by mohla přispět probíhající proteomická analýza myokardu chronicky exponovaného ANT (ve spolupráci s Ústavem molekulární patologie FVZ UO), na kterou bude zajímavé dále navázat analýzou takto vybraných molekul ve vzorcích z pokusů realizovaných v rámci této dizertační práce.

Další oblastí, která podle našeho názoru zasluhuje pozornost, je role programované buněčné smrti v průběhu chronické ANT kardiotoxicity. V návaznosti na naše výsledky se nabízí zaměřit se na časový průběh programované buněčné smrti v závislosti na kumulativní dávce cytostatika a době od podání poslední dávky. Pilotní data např. ukazují, že s rostoucí kumulativní dávkou ANT se zvyšuje i aktivita exekutivní kaspázy 3. Pro komplexnější porozumění role apoptózy je potřebné analyzovat i další důležité signální cesty vedoucí k aktivaci právě exekutivní kaspázy 3 a popř. jejich vztah k oxidačnímu stresu.

V souvislosti s ANT kardiotoxicitou je v literatuře vedle ROS zmiňována úloha nitračního stresu¹⁰². Antracykliny mohou indukovat tvorbu NO v kardiomyocytech v důsledku zvýšené exprese a aktivity inducibilní NO syntázy (iNOS)¹⁰³. Vzniklý NO může společně se superoxidovým radikálem vést ke tvorbě vysoce reaktivních forem dusíku (převážně peroxynitritu)⁷⁶. V mnoha studiích byly zaznamenány vysoké koncentrace nitrotyrosinu (markeru nitračního stresu) v myokardu zvířat akutně exponovaných ANT^{104, 105}. Naše pilotní data naznačují, že obdobně tomu je také za chronických, klinicky relevantních podmínek. Pokračující výzkum by tedy pomohl zjistit, zda-li vlastní destruktivní účinek vůči kardiomyocytům nesouvisí významněji s nitračním stresem než oxidačním a zda-li tomu není obdobně i u účinné kardioprotekce navozené DEX.

Stále aktuální oblastí výzkumu je tudíž pochopení mechanismů a dalších souvislostí kardioprotekce navozené DEX. Je s podivem, jak malá pozornost byla dosud věnována vztahu mezi jeho strukturou a kardioprotektivním účinkem, přičemž cílená obměna struktury DEX by s velkou pravděpodobností mohla přispět k optimalizaci kardioprotektivního účinku a zároveň k snížení toxicity, která je patrně dána inhibicí topoisomerázy II. Dále lze důvodně očekávat, že farmakologické hodnocení těchto nových derivátů DEX by též mohlo identifikovat klíčové molekuly a následně i molekulární mechanismy nezbytné pro výsledný protektivní efekt.

Současná doporučení navrhují podání DEX až při překročení určité kumulativní dávky antracyklinu⁴, i když je velmi pravděpodobné, že k poškození myokardu dochází s každou podanou dávkou cytostatika. V tomto ohledu lze považovat za zajímavá naše pilotní data, která naznačují, že DEX v odloženém schématu dokáže zabránit předčasnému úhynu zvířat navozenému DAU. Z výsledků také vyplývá, že DEX je schopen do značné míry ochránit myokard před toxicitou ANT v krátkodobém výhledu, nicméně eventuální zhoršení srdeční funkce a dalších parametrů v následujícím období po vysazení léčby nelze vyloučit. V této spojitosti bude zajímavé zjistit, zda DEX dokáže některým následkům podávání ANT zcela zabránit, nebo zda budou jeho protektivní vlastnosti omezeny pouze na oddálení některých aspektů antracyklinové kardiotoxicity.

Přestože množství otázek v této oblasti zůstává nezodpovězených, věříme, že výsledky získané v rámci této dizertační práce přinesly nové podněty do studia ANT kardiotoxicity a účinné farmakologické kardioprotekce.

8. Závěry

- Deferipron nesnižuje protinádorový účinek daunorubicinu *in vitro*, naopak ve vyšších, klinicky stále relevantních koncentracích, působí synergicky.
- Narozdíl od předešlých *in vitro* a *ex vivo* studií se ukazuje, že chelatace železa pomocí deferipronu není schopna ochránit myokard vůči lipoperoxidaci, kardiomyopatii a srdečnímu selhání navozenému opakovaným podáním daunorubicinu.
- Dosažené výsledky tedy naznačují, že role železa a jeho chelatace u chronické antracyklinové kardiotoxicity může být složitější než se doposud myslelo, a že se mohou do rozvoje tohoto patologického stavu zapojovat další mechanismy nezávislé na železem katalyzované tvorbě ROS.
- Klinicky relevantní koncentrace daunorubicinu navozují programovanou smrt H9c2 buněk, přičemž apoptotická signalizace je převážně závislá na vnitřní (mitochondriální) cestě.
- Dexrazoxanem navozená kardioprotekce vůči chronické antracyklinové kardiotoxicitě *in vivo* je založená na ochraně kardiomyocytů před degenerativními změnami a následnou neprogramovanou buněčnou smrtí.
- Daunorubicin spouští komplexní apoptotickou signalizaci v kardiomyocytech.
- Dexrazoxan velmi účinně blokuje všechny významné cesty vedoucí k programovanému zániku kardiomyocytů.
- Ochrana srdečních buněk před antracykliny navozenou apoptózou se zdá být významnou součástí kardioprotektivního účinku dexrazoxanu.
- Zdá se, že účinná kardioprotekce navozená s dexrazoxanem primárně nezávisí na ochraně před antracykliny navozenou lipoperoxidací. Naše nálezy ukazují, že vztah mezi ROS, antracyklinovou kardiotoxicitou a účinnou kardioprotekcí není tak jednoduchý a kauzální, jak se doposud předpokládalo.
- Rozvoj chronické antracyklinové kardiotoxicity je spjat s progresivní systolickou dysfunkcí levé komory, morfologickými změnami v myokardu a s postupným nárůstem plazmatických koncentrací srdečních troponinů. Závažnost sledovaných změn těsně koreluje s dosaženou kumulativní dávkou antracyklinu.
- Proces remodelace myokardu ve vztahu k úloze matrixových metaloproteináz je patrně mnohem komplexnější, než se dosud předpokládalo. Významnou úlohu v daném modelu pravděpodobně hraje MMP-12 spolu s dalšími MMPs.
- V průběhu rozvoje chronické antracyklinové kardiotoxicity se mění profil kolagenních proteinů. Reparativní proces se vyznačuje tvorbou obou typů kolagenu, přičemž typ III je zejména tvořen na začátku hojení, zatímco tvorba kolagenu typu I je typická pro pokročilé stádium reparače.
- Během rozvoje chronické antracyklinové kardiotoxicity se dynamicky rozvíjí oxidační stres, který překvapivě nemá kumulativní charakter a který předchází systolické dysfunkci levé komory. Tyto výsledky naznačují, že oxidační stress může být spíše spouštěcím než exekutivním činitelem v rozvoji chronické antracyklinové kardiotoxicity.
- V návaznosti na získaná data se ukazuje, že detailnější pochopení molekulárních mechanismů zodpovědných za rozvoj chronické antracyklinové kardiotoxicity a dexrazoxanem navozené kardioprotekce si vyžádá další studium.

9. Použitá literatura

1. Jones, R.L.; Swanton, C.; Ewer, M.S., *Expert Opin Drug Saf*, **2006**, *5*, (6), 791-809.
2. Klener, P. *Protinádorová chemoterapie*. Galén: Praha, **1996**.
3. Von Hoff, D.D.; Layard, M.W.; Basa, P.; Davis, H.L., Jr.; Von Hoff, A.L.; Rozenweig, M.; Muggia, F.M., *Ann Intern Med*, **1979**, *91*, (5), 710-717.
4. Ewer, M.S.; Yeh, E. *Cancer and the heart*. BC Decker Inc: Hamilton, Ont, **2006**.
5. Billingham, M.E.; Mason, J.W.; Bristow, M.R.; Daniels, J.R., *Cancer Treat Rep*, **1978**, *62*, (6), 865-872.
6. Aleman, B.M.; van den Belt-Dusebout, A.W.; De Bruin, M.L.; van 't Veer, M.B.; Baaijens, M.H.; de Boer, J.P.; Hart, A.A.; Klokman, W.J.; Kuenen, M.A.; Ouwens, G.M.; Bartelink, H.; van Leeuwen, F.E., *Blood*, **2007**, *109*, (5), 1878-1886.
7. Scully, R.E.; Lipshultz, S.E., *Cardiovasc Toxicol*, **2007**, *7*, (2), 122-128.
8. Minotti, G.; Menna, P.; Salvatorelli, E.; Cairo, G.; Gianni, L., *Pharmacol Rev*, **2004**, *56*, (2), 185-229.
9. Chen, B.; Peng, X.; Pentassuglia, L.; Lim, C.C.; Sawyer, D.B., *Cardiovasc Toxicol*, **2007**, *7*, (2), 114-121.
10. Keizer, H.G.; Pinedo, H.M.; Schuurhuis, G.J.; Joenje, H., *Pharmacol Ther*, **1990**, *47*, (2), 219-231.
11. Simunek, T.; Sterba, M.; Popelova, O.; Adamcova, M.; Hrdina, R.; Gersl, V., *Pharmacol Rep*, **2009**, *61*, (1), 154-171.
12. Liochev, S.I., *Met Ions Biol Syst*, **1999**, *36*, 1-39.
13. Emerit, J.; Beaumont, C.; Trivin, F., *Biomed Pharmacother*, **2001**, *55*, (6), 333-339.
14. Gianni, L.; Herman, E.H.; Lipshultz, S.E.; Minotti, G.; Sarvazyan, N.; Sawyer, D.B., *J Clin Oncol*, **2008**, *26*, (22), 3777-3784.
15. Saad, S.Y.; Najjar, T.A.; Al-Rikabi, A.C., *Pharmacol Res*, **2001**, *43*, (3), 211-218.
16. Oliveira, P.J.; Bjork, J.A.; Santos, M.S.; Leino, R.L.; Froberg, M.K.; Moreno, A.J.; Wallace, K.B., *Toxicol Appl Pharmacol*, **2004**, *200*, (2), 159-168.
17. Bast, A.; Haenen, G.R.; Bruynzeel, A.M.; Van der Vijgh, W.J., *Cardiovasc Toxicol*, **2007**, *7*, (2), 154-159.
18. Wouters, K.A.; Kremer, L.C.; Miller, T.L.; Herman, E.H.; Lipshultz, S.E., *Br J Haematol*, **2005**, *131*, (5), 561-578.
19. Cvetkovic, R.S.; Scott, L.J., *Drugs*, **2005**, *65*, (7), 1005-1024.
20. Hasinoff, B.B.; Hellmann, K.; Herman, E.H.; Ferrans, V.J., *Curr Med Chem*, **1998**, *5*, (1), 1-28.
21. van Dalen, E.C.; van der Pal, H.J.; Caron, H.N.; Kremer, L.C., *Cochrane Database Syst Rev*, **2006**, (4), CD005008.
22. 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.; Bianchini, J.R.; Gams, R.A., *J Clin Oncol*, **1997**, *15*, (4), 1318-1332.
23. Swain, S.M.; Vici, P., *J Cancer Res Clin Oncol*, **2004**, *130*, (1), 1-7.
24. Marty, M.; Espie, M.; Llombart, A.; Monnier, A.; Rapoport, B.L.; Stahalo, V., *Ann Oncol*, **2006**, *17*, (4), 614-622.
25. Glickstein, H.; El, R.B.; Link, G.; Breuer, W.; Konijn, A.M.; Hershko, C.; Nick, H.; Cabantchik, Z.I., *Blood*, **2006**, *108*, (9), 3195-3203.
26. Barnabe, N.; Zastre, J.A.; Venkataram, S.; Hasinoff, B.B., *Free Radic Biol Med*, **2002**, *33*, (2), 266-275.
27. Xu, L.J.; Jin, L.; Pan, H.; Zhang, A.Z.; Wei, G.; Li, P.P.; Lu, W.Y., *Acta Pharmacol Sin*, **2006**, *27*, (10), 1333-1339.
28. Arola, O.J.; Saraste, A.; Pulkki, K.; Kallajoki, M.; Parvinen, M.; Voipio-Pulkki, L.M., *Cancer Res*, **2000**, *60*, (7), 1789-1792.
29. Kotamraju, S.; Kalivendi, S.V.; Konorev, E.; Chitambar, C.R.; Joseph, J.; Kalyanaraman, B., *Methods Enzymol*, **2004**, *378*, 362-382.
30. Nakamura, T.; Ueda, Y.; Juan, Y.; Katsuda, S.; Takahashi, H.; Koh, E., *Circulation*, **2000**, *102*, (5), 572-578.
31. Yamaoka, M.; Yamaguchi, S.; Suzuki, T.; Okuyama, M.; Nitobe, J.; Nakamura, N.; Mitsui, Y.; Tomoiike, H., *J Mol Cell Cardiol*, **2000**, *32*, (6), 881-889.
32. Sawyer, D.B.; Fukazawa, R.; Arstall, M.A.; Kelly, R.A., *Circ Res*, **1999**, *84*, (3), 257-265.
33. Simunek, T.; Klimtova, I.; Kaplanova, J.; Mazurova, Y.; Adamcova, M.; Sterba, M.; Hrdina, R.; Gersl, V., *Eur J Heart Fail*, **2004**, *6*, (4), 377-387.
34. Gersl, V.; Hrdina, R., *Sb Ved Pr Lek Fak Karlovy Univerzity Hradci Kralove*, **1994**, *37*, (2), 49-55.
35. Pelouch, V.; Milerova, M.; Ostadal, B.; Samanek, M.; Hucin, B., *Physiol Res*, **1993**, *42*, (4), 235-242.
36. Pilz, J.; Meineke, I.; Gleiter, C.H., *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, **2000**, *742*, (2), 315-325.
37. Kontoghiorghes, G.J.; Pattichis, K.; Neocleous, K.; Kolnagou, A., *Curr Med Chem*, **2004**, *11*, (16), 2161-2183.
38. Yasumoto, E.; Nakano, K.; Nakayachi, T.; Morshed, S.R.; Hashimoto, K.; Kikuchi, H.; Nishikawa, H.; Kawase, M.; Sakagami, H., *Anticancer Res*, **2004**, *24*, (2B), 755-762.
39. Yu, Y.; Wong, J.; Lovejoy, D.B.; Kalinowski, D.S.; Richardson, D.R., *Clin Cancer Res*, **2006**, *12*, (23), 6876-6883.

40. Doroshow, J.H.; Locker, G.Y.; Myers, C.E., *J Clin Invest*, **1980**, *65*, (1), 128-135.
41. Sarvazyan, N., *Am J Physiol*, **1996**, *271*, (5 Pt 2), H2079-2085.
42. Zhou, S.; Palmeira, C.M.; Wallace, K.B., *Toxicol Lett*, **2001**, *121*, (3), 151-157.
43. Adamcova, M.; Simunek, T.; Kaiserova, H.; Popelova, O.; Sterba, M.; Potacova, A.; Vavrova, J.; Malakova, J.; Gersl, V., *Toxicology*, **2007**, *237*, (1-3), 218-228.
44. Sterba, M.; Simunek, T.; Popelova, O.; Potacova, A.; Adamcova, M.; Mazurova, Y.; Holeckova, M.; Gersl, V., *Physiol Res*, **2007**, *56*, (5), 535-545.
45. Bryant, J.; Picot, J.; Levitt, G.; Sullivan, I.; Baxter, L.; Clegg, A., *Health Technol Assess*, **2007**, *11*, (27), iii, ix-x, 1-84.
46. Porter, J.B.; Morgan, J.; Hoyes, K.P.; Burke, L.C.; Huehns, E.R.; Hider, R.C., *Blood*, **1990**, *76*, (11), 2389-2396.
47. Fredenburg, A.M.; Wedlund, P.J.; Skinner, T.L.; Damani, L.A.; Hider, R.C.; Yokel, R.A., *Drug Metab Dispos*, **1993**, *21*, (2), 255-258.
48. Kontoghiorghes, G.J.; Goddard, J.G.; Bartlett, A.N.; Sheppard, L., *Clin Pharmacol Ther*, **1990**, *48*, (3), 255-261.
49. Yokel, R.A.; Fredenburg, A.M.; Meurer, K.A.; Skinner, T.L., *Drug Metab Dispos*, **1995**, *23*, (10), 1178-1180.
50. Danesi, R.; Fogli, S.; Gennari, A.; Conte, P.; Del Tacca, M., *Clin Pharmacokinet*, **2002**, *41*, (6), 431-444.
51. Herman, E.H.; Zhang, J.; Ferrans, V.J., *Cancer Chemother Pharmacol*, **1994**, *35*, (2), 93-100.
52. Sterba, M.; Popelova, O.; Simunek, T.; Mazurova, Y.; Potacova, A.; Adamcova, M.; Guncova, I.; Kaiserova, H.; Palicka, V.; Ponka, P.; Gersl, V., *Toxicology*, **2007**, *235*, (3), 150-166.
53. Sterba, M.; Popelova, O.; Simunek, T.; Mazurova, Y.; Potacova, A.; Adamcova, M.; Kaiserova, H.; Ponka, P.; Gersl, V., *J Pharmacol Exp Ther*, **2006**, *319*, (3), 1336-1347.
54. Simunek, T.; Klimentova, I.; Kaplanova, J.; Sterba, M.; Mazurova, Y.; Adamcova, M.; Hrdina, R.; Gersl, V.; Ponka, P., *Pharmacol Res*, **2005**, *51*, (3), 223-231.
55. Hasinoff, B.B.; Patel, D.; Wu, X., *Free Radic Biol Med*, **2003**, *35*, (11), 1469-1479.
56. Godfraind, T., *Arch Toxicol Suppl*, **1984**, *7*, 1-15.
57. Lewis, W.; Silver, M.D. In *Cardiovascular Pathology*. Silver, M.D.; Gotlieb, A.I.; Schoen, F.J., Eds.; Churchill Livingstone: Philadelphia, **2001**, pp 546-550.
58. Dorn, G.W., 2nd, *Cardiovasc Res*, **2009**, *81*, (3), 465-473.
59. Lee, Y.; Gustafsson, A.B., *Apoptosis*, **2009**, *14*, (4), 536-548.
60. Konorev, E.A.; Vanamala, S.; Kalyanaraman, B., *Free Radic Biol Med*, **2008**, *45*, (12), 1723-1728.
61. Zhang, J.; Clark, J.R., Jr.; Herman, E.H.; Ferrans, V.J., *J Mol Cell Cardiol*, **1996**, *28*, (9), 1931-1943.
62. Newman, R.A.; Hacker, M.P.; Krakoff, I.H., *Cancer Res*, **1981**, *41*, (9 Pt 1), 3483-3488.
63. Herman, E.H.; Ferrans, V.J.; Jordan, W.; Ardalán, B., *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, **1981**, *31*, (1), 85-97.
64. Herman, E.H.; Ferrans, V.J.; Myers, C.E.; Van Vleet, J.F., *Cancer Res*, **1985**, *45*, (1), 276-281.
65. Arbustini, E.; Brega, A.; Narula, J., *Heart Fail Rev*, **2008**, *13*, (2), 121-135.
66. Horenstein, M.S.; Vander Heide, R.S.; L'Ecuyer, T.J., *Mol Genet Metab*, **2000**, *71*, (1-2), 436-444.
67. Wallace, K.B.; Hausner, E.; Herman, E.; Holt, G.D.; MacGregor, J.T.; Metz, A.L.; Murphy, E.; Rosenblum, I.Y.; Sistare, F.D.; York, M.J., *Toxicol Pathol*, **2004**, *32*, (1), 106-121.
68. Van Vleet, J.F.; Ferrans, V.J.; Weirich, W.E., *Am J Pathol*, **1980**, *99*, (1), 13-42.
69. Childs, A.C.; Phaneuf, S.L.; Dirks, A.J.; Phillips, T.; Leeuwenburgh, C., *Cancer Res*, **2002**, *62*, (16), 4592-4598.
70. Jang, Y.M.; Kendaiah, S.; Drew, B.; Phillips, T.; Selman, C.; Julian, D.; Leeuwenburgh, C., *FEBS Lett*, **2004**, *577*, (3), 483-490.
71. Popelova, O.; Sterba, M.; Simunek, T.; Mazurova, Y.; Guncova, I.; Hroch, M.; Adamcova, M.; Gersl, V., *J Pharmacol Exp Ther*, **2008**, *326*, (1), 259-269.
72. Simunek, T.; Sterba, M.; Popelova, O.; Kaiserova, H.; Adamcova, M.; Hroch, M.; Haskova, P.; Ponka, P.; Gersl, V., *Br J Pharmacol*, **2008**, *155*, (1), 138-148.
73. Simunek, T.; Kaiserova, H.; Sterba, M.; Popelova, O.; Adamcova, M.; Ponka, P.; Gersl, V., *Circulation Research*, **2007**, *101*, (5), E72-E72.
74. Simunek, T.; Boer, C.; Bouwman, R.A.; Vlasblom, R.; Versteilen, A.M.; Sterba, M.; Gersl, V.; Hrdina, R.; Ponka, P.; de Lange, J.J.; Paulus, W.J.; Musters, R.J., *J Mol Cell Cardiol*, **2005**, *39*, (2), 345-354.
75. Kaiserova, H.; den Hartog, G.J.; Simunek, T.; Schroterova, L.; Kvasnickova, E.; Bast, A., *Br J Pharmacol*, **2006**, *149*, (7), 920-930.
76. Stipek, S. In *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. Stipek, S., Ed.; Grada Publishing: Praha, **2000**, pp 41-108.
77. Schafer, F.Q.; Buettner, G.R., *Free Radic Biol Med*, **2001**, *30*, (11), 1191-1212.
78. Bruynzeel, A.M.; Vormer-Bonne, S.; Bast, A.; Niessen, H.W.; van der Vijgh, W.J., *Cancer Chemother Pharmacol*, **2007**, *60*, (4), 509-514.

79. Bruynzeel, A.M.; Niessen, H.W.; Bronzwaer, J.G.; van der Hoeven, J.J.; Berkhof, J.; Bast, A.; van der Vijgh, W.J.; van Groenigen, C.J., *Br J Cancer*, **2007**, *97*, (8), 1084-1089.
80. Dresdale, A.R.; Barr, L.H.; Bonow, R.O.; Mathisen, D.J.; Myers, C.E.; Schwartz, D.E.; d'Angelo, T.; Rosenberg, S.A., *Am J Clin Oncol*, **1982**, *5*, (6), 657-663.
81. Legha, S.S.; Wang, Y.M.; Mackay, B.; Ewer, M.; Hortobagyi, G.N.; Benjamin, R.S.; Ali, M.K., *Ann N Y Acad Sci*, **1982**, *393*, 411-418.
82. Myers, C.; Bonow, R.; Palmeri, S.; Jenkins, J.; Corden, B.; Locker, G.; Doroshow, J.; Epstein, S., *Semin Oncol*, **1983**, *10*, (1 Suppl 1), 53-55.
83. Menna, P.; Recalcati, S.; Cairo, G.; Minotti, G., *Cardiovasc Toxicol*, **2007**, *7*, (2), 80-85.
84. Simunek, T.; Sterba, M.; Holeckova, M.; Kaplanova, J.; Klimtova, I.; Adamcova, M.; Gersl, V.; Hrdina, R., *Biometals*, **2005**, *18*, (2), 163-169.
85. Wallace, K.B., *Cardiovasc Toxicol*, **2007**, *7*, (2), 101-107.
86. Solem, L.E.; Henry, T.R.; Wallace, K.B., *Toxicol Appl Pharmacol*, **1994**, *129*, (2), 214-222.
87. Singh, R.B.; Dandekar, S.P.; Elimban, V.; Gupta, S.K.; Dhalla, N.S., *Mol Cell Biochem*, **2004**, *263*, (1-2), 241-256.
88. Barta, J.; Toth, A.; Edes, I.; Vaszily, M.; Papp, J.G.; Varro, A.; Papp, Z., *Mol Cell Biochem*, **2005**, *278*, (1-2), 1-8.
89. Papp, Z.; van der Velden, J.; Stienen, G.J., *Cardiovasc Res*, **2000**, *45*, (4), 981-993.
90. Lim, C.C.; Zuppinger, C.; Guo, X.; Kuster, G.M.; Helmes, M.; Eppenberger, H.M.; Suter, T.M.; Liao, R.; Sawyer, D.B., *J Biol Chem*, **2004**, *279*, (9), 8290-8299.
91. Hasinoff, B.B.; Herman, E.H., *Cardiovasc Toxicol*, **2007**, *7*, (2), 140-144.
92. Lyu, Y.L.; Kerrigan, J.E.; Lin, C.P.; Azarova, A.M.; Tsai, Y.C.; Ban, Y.; Liu, L.F., *Cancer Res*, **2007**, *67*, (18), 8839-8846.
93. Roca, J.; Ishida, R.; Berger, J.M.; Andoh, T.; Wang, J.C., *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1994**, *91*, (5), 1781-1785.
94. Martin, E.; Thougard, A.V.; Grauslund, M.; Jensen, P.B.; Bjorkling, F.; Hasinoff, B.B.; Tjornelund, J.; Sehested, M.; Jensen, L.H., *Toxicology*, **2009**, *255*, (1-2), 72-79.
95. Ewer, M.S.; Benjamin, R.S. In *Cancer and the Heart*. Ewer, M.S.; Yeh, E., Eds.; BC Decker: Hamilton, **2006**, pp 9-32.
96. Bai, P.; Mabley, J.G.; Liaudet, L.; Virag, L.; Szabo, C.; Pacher, P., *Oncol Rep*, **2004**, *11*, (2), 505-508.
97. Pacher, P.; Liaudet, L.; Bai, P.; Virag, L.; Mabley, J.G.; Hasko, G.; Szabo, C., *J Pharmacol Exp Ther*, **2002**, *300*, (3), 862-867.
98. Spinale, F.G., *Physiol Rev*, **2007**, *87*, (4), 1285-1342.
99. Lalu, M.M.; Pasini, E.; Schulze, C.J.; Ferrari-Vivaldi, M.; Ferrari-Vivaldi, G.; Bachetti, T.; Schulz, R., *Eur Heart J*, **2005**, *26*, (1), 27-35.
100. Van Linthout, S.; Seeland, U.; Riad, A.; Eckhardt, O.; Hohl, M.; Dhayat, N.; Richter, U.; Fischer, J.W.; Bohm, M.; Pauschinger, M.; Schultheiss, H.P.; Tschope, C., *Basic Res Cardiol*, **2008**, *103*, (4), 319-327.
101. Spanikova, A.; Simoncikova, P.; Ravingerova, T.; Pechanova, O.; Barancik, M., *Mol Cell Biochem*, **2008**, *312*, (1-2), 113-120.
102. Fogli, S.; Nieri, P.; Breschi, M.C., *FASEB J*, **2004**, *18*, (6), 664-675.
103. Liu, B.; Li, H.; Qu, H.; Sun, B., *J Biochem Mol Biol*, **2006**, *39*, (6), 759-765.
104. Andreadou, I.; Sigala, F.; Iliodromitis, E.K.; Papaefthimiou, M.; Sigalas, C.; Aligiannis, N.; Savvari, P.; Gorgoulis, V.; Papalabros, E.; Kremastinos, D.T., *J Mol Cell Cardiol*, **2007**, *42*, (3), 549-558.
105. Pacher, P.; Liaudet, L.; Bai, P.; Mabley, J.G.; Kaminski, P.M.; Virag, L.; Deb, A.; Szabo, E.; Ungvari, Z.; Wolin, M.S.; Groves, J.T.; Szabo, C., *Circulation*, **2003**, *107*, (6), 896-904.

10. Přehled publikační činnosti

Původní práce *in extenso* v recenzovaných odborných časopisech

Popelová O, Štěrba M, Hašková P, Šimůnek T, Hroch M, Gunčová I, Nachtigal P, Adamcová M, Geršl V, Mazurová Y. Dextrazoxane-afforded protection against chronic anthracycline cardiotoxicity in vivo: effective rescue of cardiomyocytes from apoptotic cell death. *Br J Cancer*. 2009 (16. 6. 2009 přijato k publikaci) **IF=4,846**

Popelová O, Štěrba M, Šimůnek T, Mazurová Y, Gunčová I, Hroch M, Adamcová M, Geršl V. Deferiprone does not protect against chronic anthracycline cardiotoxicity in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008;326(1):259-69. **IF=4,309**

Popelová O, Štěrba M, Šimůnek T, Mazurová Y, Adamcová M, Gunčová I, Geršl V. Anthracycline cardiotoxicity and the possibility of the pharmacological cardioprotection. *Biomedical Papers*. 2007;151(Supl. 1):69-71.

Štěrba M, **Popelová O**, Šimůnek T, Mazurová Y, Potáčová A, Adamcová M, Kaiserová H, Poňka P, Geršl V. Cardioprotective effects of a novel iron chelator - pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone - in the rabbit model of daunorubicin-induced cardiotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;319(3):1336-47. **IF=3,956**

Štěrba M, **Popelová O**, Šimůnek T, Mazurová Y, Potáčová A, Adamcová M, Gunčová I, Kaiserová H, Palička V, Poňka P, Geršl V. Iron chelation-afforded cardioprotection against chronic anthracycline cardiotoxicity: A study of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH). *Toxicology*. 2007;235(3):150-66. **IF=2,919**

Šimůnek T, Štěrba M, **Popelová O**, Kaiserová H, Adamcová M, Hroch M, Hašková P, Poňka P, Geršl V. Anthracycline toxicity to cardiomyocytes or cancer cells is differently affected by iron chelation with salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone. *Br J Pharmacol*. 2008;155(1):138-48. **IF=4,902**

Štěrba M, Šimůnek T, **Popelová O**, Potáčová A, Adamcová M, Mazurová Y, Holečková M, Geršl V. Early detection of anthracycline cardiotoxicity in a rabbit model: left ventricle filling pattern versus troponin T determination. *Physiol Res*. 2007;56(5):535-545. **IF=1,505**

Šimůnek T, Štěrba M, **Popelová O**, Kaiserová H, Potáčová A, Adamcová M, Mazurová Y, Poňka P, Geršl V. Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) and its analogs as protectants against anthracycline-induced cardiotoxicity. *Heamoglobin* 2008;32(1-2):207-215. **IF=0,941**

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

Adamcová M, Šimůnek T, Kaiserová H, **Popelová O**, Štěrba M, Potáčová A, Vávrová J, Maláková J, Geršl V. In vitro and in vivo examination of cardiac troponins as biochemical markers of drug-induced cardiotoxicity. *Toxicology*. 2007;237(1-3):218-28. **IF=2,919**

Kovaříková P, Klimeš J, Štěrba M, **Popelová O**, Geršl V, Poňka P. HPLC determination of a novel aroylhydrazone iron chelator (o-108) in rabbit plasma and its application to a pilot pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2006;838(2):107-12. **IF=2,647**

Kovaříková P, Klimeš J, Štěrba M, **Popelová O**, Mokry M, Geršl V, Poňka P. Development of high-performance liquid chromatographic determination of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone in rabbit plasma and application of this method to an in vivo study. *J Sep Sci*. 2005;28(12):1300-6. **IF=1,829**

Štěrba M, Šimůnek T, Mazurová Y, **Popelová O**, Adamcová M, Poňka P, Geršl V. Study of organ toxicity of repeated administration of novel iron chelator o-108 in rabbits. *Biomarkers Environment*. 2004; 5(5):40-42.

Potáčová A, Adamcová M, Štěrba M, **Popelová O**, Šimůnek T, Mazurová Y, Gunčová I, Geršl V. A pilot study of matrix metalloproteinases on the model of daunorubicin-induced cardiomyopathy in rabbits. *Acta Medica (Hradec Králové)*. 2007;50(2):109- 111.

Štěrba M, Šimůnek T, Mazurová Y, Adamcová M, Popelová O, Kaplanová J, Poňka P, Geršl V. Safety and tolerability of repeated administration of pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone in rabbits. *Hum Exp Toxicol.* 2005;24(11):581-9. **IF=1,189**

Potáčková A, Adamcová M, Čajňáková H, Hrbatová L, Štěrba M, Popelová O, Šimůnek T, Poňka P, Geršl V. Evaluation of ECG time intervals in a rabbit model of anthracycline-induced cardiomyopathy: a useful tool for assessment of cardioprotective agents. *Physiol Res.* 2007;56(2):251-4. **IF=1,505**

Kaiserová H, Šimůnek T, Štěrba M, den Hartog GJ, Schröterová L, Popelová O, Geršl V, Kvasničková E, Bast A. New iron chelators in anthracycline-induced cardiotoxicity. *Cardiovasc Toxicol.* 2007;7(2):145-50. **IF=2,222**

Přehledové publikace

Šimůnek T, Štěrba M, Popelová O, Adamcová M, Hrdina R., Geršl V. Anthracycline-induced cardiotoxicity: Overview of studies examining the role of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Rep.* 2009;61: 154–171. **IF= 2,167**

Potáčková A, Adamcová M, Štěrba M, Popelová O, Geršl V. Role matrixových metaloproteináz při srdečním selhání. *Čs. fyziologie.* 2005;54(4):168-175.

Adamcová M, Štěrba M, Šimůnek T, Potáčková A, Popelová O, Geršl V. Myocardial regulatory proteins and heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2006;8(4):333-42. **IF=3,242**

Adamcová M, Štěrba M, Šimůnek T, Potáčková A, Popelová O, Mazurová Y, Geršl V: Troponin as a marker of myocardial damage in drug-induced cardiotoxicity. *Expert Opin Drug Saf.* 2005; 4(3):457-72.

Abstrakty (13 jako první autor, celkem 82)

Popelová O, Štěrba M, Kovaříková P, Adamcová M, Mazurová Y, Kaplanová J, Šimůnek T, Poňka P, Geršl V. Study of potential cardioprotective effects of a novel iron chelator (pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone;o-108) in daunorubicin cardiotoxicity in rabbits. *Acta medica (Hradec Králové).* 2006;49(2):149-150.

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

Popelová O, Štěrba M, Kovaříková P, Šimůnek T, Vávrová K, Poňka P, Geršl V. Pilotní studie farmakokinetiky salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazonu a pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazonu. *Farmakológia 2006 – Zborník prác 56. Farmakologické dni 2006 v Bratislave*, Ed.: M. Kuželová, J. Kyselovič, Š. Mátyás, E. Račanská, T. Stankovičová, P. Švec, I. Tumová; p. 133 (ISBN 80-89197-52-3).

Popelová O, Štěrba M, Potáčková A, Šimůnek T, Adamcová M, Mazurová Y, Poňka P, Geršl V. Iron chelation as promising strategy of cardioprotection against anthracycline-induced cardiotoxicity. *New Frontiers in Cardiovascular Research, 7th Meeting of France – New EU Members*, 5. – 8. 10. 2006, Debrecen, Maďarsko. Abstract book p. 80.

Popelová O, Štěrba M, Gunčová I, Mazurová Y, Geršl V. Dexrazoxane as cardioprotectant against chronic anthracycline cardiotoxicity. *Acta Medica (Hradec Králové).* 2007;50(1):80.

Popelová O, Štěrba M, Šimůnek T, Adamcová M, Mazurová Y, Geršl V. Iron chelation as an effective cardioprotective strategy against anthracyclines cardiotoxicity: dexrazoxane as a model drug. *Am J Hematol.* 2007;82(6):557.

Popelová O, Štěrba M, Šimůnek T, Gunčová I, Mazurová Y, Adamcová M, Geršl V. Study of potential cardioprotective effect of deferiprone in chronic anthracycline cardiotoxicity in rabbit. *Acta Medica (Hradec Králové).* 2008;51(1):82-83.

Popelová O, Štěrba M, Šimůnek T, Gunčová I, Mazurová Y, Hroch M, Adamcová M, Geršl V. Kardioprotektivní účinky chelátorů železa u chronické antracyklinové kardiotoxicity: porovnání dexrazoxanu a deferipronu. *Cor Vasa.* 2008;50(7-8):K124.

Popelová O, Štěrba M, Šimůnek T, Mazurová Y, Gunčová I, Hroch M, Adamcová M, Geršl V. Can deferiprone (a novel intracellular iron chelator) afford significant protection against chronic anthracycline cardiotoxicity in vivo? *New Frontiers in Cardiovascular Research, 8th Meeting of France – New EU Members, 16th JMRC Symposium, 5. – 7. 6. 2008, Krakow, Polsko, Abstract book p. 71 – 72.*

Popelová O, Adamcová M, Štěrba M, Mazurová Y, Gunčová I, Hroch M, Šimůnek T, Geršl V: Study of matrix metalloproteinases on the Model of Chronic anthracycline cardiomyopathy. *J Muscle Res Cell Motil.* 2008;29: 281.

Popelová O, Štěrba M, Šimůnek T, Gunčová I, Mazurová Y, Hroch M, Adamcová M, Geršl V. Comparison of protective effects of two iron chelating compounds – deferiprone and dexrazoxane – against chronic anthracycline cardiotoxicity. *Toxicology Letters.* 2008;180S:S56.

Popelová O, Potáčová A, Štěrba M, Geršl V, Adamcová M. Role of matrix metalloproteinases during the development of chronic anthracycline cardiotoxicity in rabbits. XIII. Vědecká konference LF a FN HK, 21. 1. 2009, Hradec Králové, Abstract book.

Popelová O, Štěrba M, Hašková P, Jirkovský E, Mazurová Y, Šimůnek T, Adamcová M, Geršl V. Apoptotic cell death in dexrazoxane-afforded protection against chronic anthracycline cardiotoxicity in vivo. *Eur J Heart Fail Suppl.* 2009;8(2):ii145.

Odborná sdělení (16 jako první autor, celkem 61)

Popelová O, Štěrba M, Šimůnek T, Potáčová A, Adamcová M, Geršl V. Role kalpainu při vzniku a rozvoji onemocnění kardiovaskulárního systému a možnosti farmakologického ovlivnění. 34. *pracovní konference Komise experimentální kardiologie, 25. - 27. 10. 2006, Kozov (ústní sdělení)*

Popelová O, Štěrba M, Šimůnek T, Mazurová Y, Gunčová I, Adamcová M, Geršl V. Deferipron (nový chelátor železa) jako potenciální kardioprotektivum vůči chronické antracyklinové toxicitě. 57. *Farmakologické dny, 12. - 14. 9. 2007, Olomouc (ústní sdělení)*

Popelová O, Štěrba M, Šimůnek T, Gunčová I, Mazurová Y, Adamcová M, Geršl V. Studium účinků deferipronu z hlediska potenciálního protektivního působení u experimentálně navozené antracyklinové kardiotoxicity. XII. *Vědecká konference LF a FN HK, 22. 1. 2008, Hradec Králové (ústní sdělení)*

Popelová O, Štěrba M, Šimůnek T, Gunčová I, Mazurová Y, Hroch M, Adamcová M, Geršl V. Kardioprotektivní účinky chelátorů železa u chronické antracyklinové kardiotoxicity: porovnání dexrazoxanu a deferipronu. *Den mladých kardiologů, 11. 6. 2008, Hradec Králové (ústní sdělení)*

Popelová O, Štěrba M, Šimůnek T, Mazurová Y, Gunčová I, Hroch M, Adamcová M, Jirkovský E, Geršl V. Možnosti farmakologické protekce pomocí chelatačních látek u chronické antracyklinové kardiotoxicity. 36. *pracovní konference Komise experimentální kardiologie, Harrachov, 15. – 17. 10. 2008 (ústní sdělení)*

Popelová O, Štěrba M, Šimůnek T, Gunčová I, Mazurová Y, Hroch M, Adamcová M, Geršl V. Kardioprotektivní účinky chelátorů železa u chronické antracyklinové kardiotoxicity. *Kardiologické dny 2008, 20. 11. 2008, Praha (ústní sdělení)*

Popelová O, Potáčová A, Štěrba M, Mazurová Y, Jirkovský E, Geršl V, Adamcová M. Změny matrixových metalloproteinas a jejich inhibitorů na modelu chronické kardiotoxicity antracyklinů. XIII. *Vědecká konference LF a FN HK, 21. 1. 2009, Hradec Králové (ústní sdělení)*

Popelová O, Štěrba M, Kovaříková P, Šimůnek T, Vávrová K, Poňka P, Geršl V. Nové chelátory železa (aroylhydrazony) – pilotní studie farmakokinetiky. 55. *Česko-slovenské farmakologické dny, Hradec Králové, 31.8. - 2. 9. 2005 (posterové sdělení)*

Popelová O, Štěrba M, Kovaříková P, Šimůnek T, Vávrová K, Poňka P, Geršl V. Pilotní studie farmakokinetiky nových aroylhydrazonových chelátorů železa. X. *Vědecká konference LF a FN HK, Hradec Králové, 24. 1. 2006 (posterové sdělení)*

- Popelová O**, Štěrba M, Kovaříková P, Šimůnek T, Vávrová K, Poňka P, Geršl V. pilotní studie farmakokinetiky salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazonu a pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazonu. 56. *Farmakologické dny*, 6. - 8. 9. 2006, Bratislava, Slovenská republika (posterové sdělení)
- Popelová O**, Štěrba M, Potáčová A, Šimůnek T, Adamcová M, Mazurová Y, Poňka P, Geršl V. Iron chelation as promising strategy of cardioprotection against anthracycline-induced cardiotoxicity. *New Frontiers in Cardiovascular Research, 7th Meeting of France – New EU Members*, 5. – 8. 10. 2006, Debrecen, Maďarsko. (posterové sdělení)
- Popelová O**, Štěrba M, Šimůnek T, Adamcová M, Mazurová Y, Geršl V. Iron chelation as an effective cardioprotective strategy against anthracyclines cardiotoxicity: dexrazoxane as a model drug. *The Second Congress of the International BioIron Society*, 1. – 6. 4. 2007, Kyoto, Japonsko (posterové sdělení)
- Popelová O**, Štěrba M, Šimůnek T, Mazurová Y, Gunčová I, Hroch M, Adamcová M, Geršl V. Can deferiprone (a novel intracellular iron chelator) afford significant protection against chronic anthracycline cardiotoxicity in vivo? *New Frontiers in Cardiovascular Research, 8th Meeting of France – New EU Members, 16th JMRC Symposium*, 5. – 7. 6. 2008, Krakow, Polsko (posterové sdělení)
- Popelová O**, Štěrba M, Mazurová Y, Šimůnek T, Gunčová I, Hroch M, Nachtigal P, Adamcová M, Geršl V. Analýza kardioprotektivních účinků dexrazoxanu u chronické antracyklinové kardiotoxicity. 58. *Česko-slovenské farmakologické dny*, 3. - 5. 9. 2008, Praha (posterové sdělení)
- Popelová O**, Štěrba M, Šimůnek T, Gunčová I, Mazurová Y, Hroch M, Adamcová M, Geršl V. Comparison of protective effects of two iron chelating compounds – deferiprone and dexrazoxane – against chronic anthracycline cardiotoxicity. *45th Congress of the European Societies of Toxicology*, 5. - 8. 10. 2008, Rhodos, Řecko (posterové sdělení)
- Popelová O**, Štěrba M, Hašková P, Jirkovský E, Mazurová Y, Šimůnek T, Adamcová M, Geršl V. Apoptotic cell death in dexrazoxane-afforded protection against chronic anthracycline cardiotoxicity in vivo. *Heart Failure Congress 2009*, 29. 5. – 2. 6. 2009, Nice, Francie (posterové sdělení)