

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové
Ústav farmakologie

**FARMAKOLOGICKÁ KARDIOPROTEKCE
POMOCÍ CHELÁTORŮ ŽELEZA A
ANTRACYKLINOVÁ KARDIOTOXICITA**

Dizertační práce

Mgr. Olga Popelová

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

Hradec Králové
2009

Poděkování

V první řadě poděkování patří **Prof. MUDr. Vladimíru Geršlovi, CSc.** za odborné vedení v průběhu celého doktorského studia, za možnost pracovat v jeho vědeckém týmu a za pomoc při vypracování této práce. Děkuji i svému kolegovi **PharmDr. Martinu Štěrbovi, Ph.D.** za úzkou profesionální spolupráci a cenné konzultace. Protože se jedná o týmovou práci chtěla bych dále poděkovat **Doc. PharmDr. Tomáši Šimůnkovi, Ph.D., Doc. MUDr. Yvoně Mazurové, CSc., Doc. MUDr. Michaele Adamcové, CSc., Ludmile Latýnové, Ing. Miloši Hrochovi, Mgr. Ivaně Gunčové, Mgr. Eduardu Jirkovskému a všem dalším kolegům a spolupracovníkům** za jejich spolupráci a podporu od začátku mého doktorského studia. V neposlední řadě děkuji i **pracovnímu kolektivu Ústavu farmakologie LF HK** za všestrannou pomoc a vytvoření příjemného pracovního prostředí. Tato práce by také nevznikla za podpory rodiny a přátel v průběhu celého studia.

Tato dizertační práce byla finančně podpořena výzkumným záměrem MŠMT 0021620820 a granty GA UK 89/2006/C, GA UK 53107/2007/C a GA ČR 305/09/0416.

OBSAH

ÚVOD	6
1. ANTRACYKLINOVÁ ANTINEOPLASTICKÁ ANTIBIOTIKA	7
2. KARDIOTOXICITA ANTRACYKLINŮ	9
2.1. Základní typy antracyklinové kardiotoxicity	9
2.2. Mechanismus vzniku antracyklinové kardiotoxicity	11
2.2.1. Tvorba reaktivních forem kyslíku navozená antracykliny	11
2.2.2. Další mechanismy podléjící se na rozvoji antracyklinové kardiotoxicity	14
3. MOŽNOSTI SNÍŽENÍ ANTRACYKLINOVÉ KARDIOTOXICITY	16
3.1. Farmakologická kardioprotekce.....	18
3.1.1. Antioxidanty a zhášeče volných kyslíkových radikálů	18
3.1.2. Chelátory železa	22
3.1.2.1. Dexrazoxan	23
3.1.2.2. Další chelátory železa	31
4. SHRNUTÍ LITERÁRNÍCH POZNATKŮ S OHLEDEM NA ZAMĚŘENÍ EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI DIZERTAČNÍ PRÁCE	39
CÍLE PRÁCE	41
PŘEHLED POUŽITÝCH METOD	43
VÝSLEDKY	57
1. STUDIUM POTENCIÁLNĚ KARDIOPROTEKTIVNÍCH ÚČINKŮ CHELÁTORU ŽELEZA DEFERIPRONU NA MODELU CHRONICKÉ ANTRACYKLINOVÉ KARDIOTOXICITY	58
1.1. Antiproliferativní studie s buněčnou linií HL-60.....	58
1.2. Kardioprotektivní studie u králíka.....	59
1.2.1. Hodnocení celkové toxicity	59
1.2.2. Echokardiografické hodnocení srdeční funkce	60
1.2.3. Invazivní hemodynamické měření	61
1.2.4. Stanovení srdečního troponinu T	62
1.2.5. Histologické hodnocení myokardu	62
1.2.6. Stanovení malondialdehydu v myokardu levé komory	64
1.2.7. Stanovení železa v myokardu	64
1.2.8. Biochemické a hematologické parametry	64
1.2.9. Histologické hodnocení orgánů	67
1.2.10. Explorativní statistická analýza	67
2. ÚVODNÍ <i>IN VITRO</i> STUDIUM VÝZNAMU APOPTOTICKÉ BUNĚČNÉ SMRTI V ANTRACYKLINOVÉ KARDIOTOXICITĚ	69
2.1. Viabilita buněk	69
2.2. Cell death detection assay.....	69
2.3. Stanovení aktivity kaspáz.....	70
3. STUDIUM KARDIOPROTEKTIVNÍCH ÚČINKŮ DEXRAZOXANU VŮČI CHRONICKÉ ANTRACYKLINOVÉ KARDIOTOXICITĚ <i>IN VIVO</i> SE ZAMĚŘENÍM NA OCHRANU KARDIOMYOCYTŮ PŘED APOPTOTICKOU BUNĚČNOU SMRTÍ A OXIDAČNÍM STRESEM	72
3.1. Hodnocení celkové toxicity.....	72
3.2. Hodnocení srdeční funkce	73
3.3. Stanovení plazmatické koncentrace srdečních troponinů.....	73
3.4. Histologické hodnocení myokardu levé komory	74
3.5. Hodnocení apoptózy v myokardu levé komory	75
3.5.1. TUNEL assay	75
3.5.2. Cell death Detection Assay.....	77
3.5.3. Stanovení aktivity kaspáz	77

3.6.	<i>Hodnocení lipoperoxidace v myokardu levé komory</i>	79
3.6.1.	Stanovení celkového malondialdehydu	79
3.6.2.	Imunohistochemické hodnocení 4-hydroxynonenalu	80
3.6.3.	Stanovení glutathionu v myokardu levé komory	80
3.6.4.	Hematologické a biochemické parametry	82
3.7.	<i>Histologické hodnocení orgánů</i>	84
3.8.	<i>Explorativní statistická analýza</i>	84
4.	SLEDOVÁNÍ DYNAMIKY FUNKČNÍCH A MORFOLOGICKÝCH ZMĚN V PRŮBĚHU ROZVOJE CHRONICKÉ ANTRACYKLINOVÉ KARDIOTOXICITY VE VZTAHU K REMODELACI MYOKARDU A OXIDAČNÍMU STRESU 86	
4.1.	<i>Hodnocení srdeční funkce</i>	86
4.2.	<i>Stanovení plazmatické koncentrace srdečních troponinů</i>	87
4.3.	<i>Histologické hodnocení</i>	88
4.4.	<i>Profil kolagenních proteinů levé komory</i>	91
4.5.	<i>Stanovení aktivity matrixových metaloproteináz</i>	92
4.6.	<i>Stanovení malondialdehydu v myokardu levé komory</i>	95
4.7.	<i>Stanovení glutathionu v myokardu levé komory</i>	95
4.8.	<i>Biochemické a hematologické parametry</i>	97
	DISKUZE	99
	ZÁVĚRY	125
	SOUHRN	128
	SUMMARY	131
	LITERATURA	134
	PŘÍLOHA I	154
	PŘÍLOHA II	166

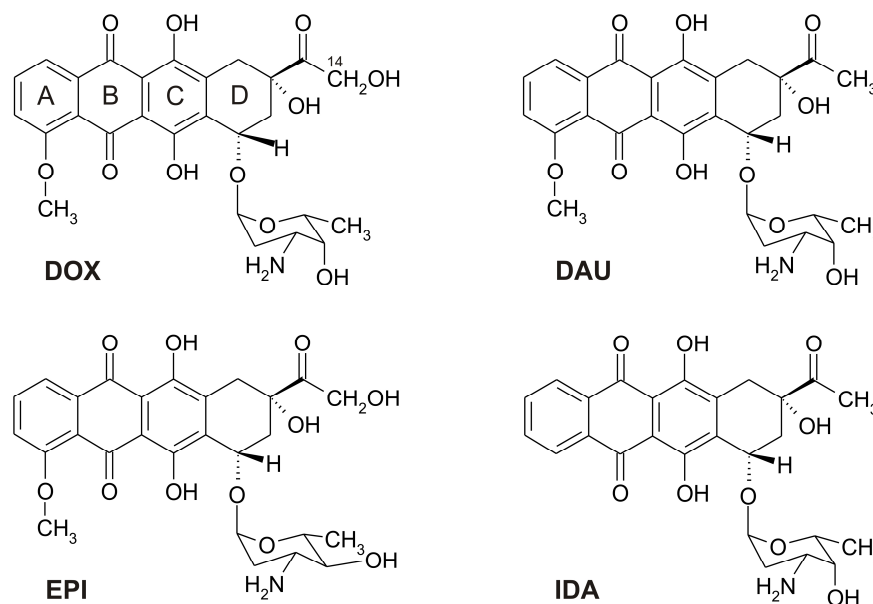
Seznam použitých zkratk

ABTS	kyselina 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonová
4-HNE	4-hydroxynonenal
ALT	alaninaminotransferáza
ANT	antracyklin
AST	aspartátaminotransferáza
cTnI	plazmatické koncentrace troponinu I
cTnT	plazmatické koncentrace troponinu T
DAB	3,3'-diaminobenzidin-tetrahydrochlorid
DAU	daunorubicin
DEX	dexrazoxan
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
dP/dt	index kontraktility
DTT	1,4-dithiothreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ER/SR	endoplazmatické/sarkoplazmatické retikulum
FS	frakční zkrácení
ICL670	deferasirox
i.p.	intraperitoneální aplikace
i.v.	intravenózní aplikace
L1	deferipron
MDA	malondialdehyd
M-mode	jednorozměrná echokardiografie
MMP	matrixová metaloproteináza
NBT/BCIP	nitrobenzentetrazolium/5-brom-4-chlor-3-indolylfosfát
o-108	pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazon
PBS	fosfátový fyziologický roztok
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

ÚVOD

1. Antracyklinová antineoplastická antibiotika

Antracyklinová antibiotika (obr. 1) jsou považována za jedna z nejúčinnějších cytostatik, která byla dosud zavedena do klinické praxe. Tato léčiva jsou úspěšně užívaná více než 40 let, přičemž v některých chemoterapeutických režimech jsou stále nezastupitelná (Jones & Smith, 2004; Klener, 1996). Nejdéle používaným antracyklinem je **daunorubicin** (synonyma rubidomycin, daunomycin), fermentační produkt plísní *Streptomyces peuceutius* a *Streptomyces ceruleorubidus*, který byl poprvé izolován v roce 1962. V roce 1969 byl ze *Streptomyces peuceutius* var. *caesius* izolován **doxorubicin** (adriamycin). Přestože se tyto dva antracykliny značně liší ve spektrech svých indikací, chemicky jsou si velmi podobné. Odlišnost je pouze v hydroxylové skupině na C-14 na jejich tetracyklickém aglykonu. Daunorubicin je téměř výhradně užíván v terapii akutní lymfoblastické a myeloblastické leukémie, zatímco doxorubicin se řadí mezi léčiva s velmi širokým cytostatickým spektrem zahrnujícím akutní leukémie, Hodgkinovu chorobu, nehodgkinské lymfomy, mnohočetné myelomy a v neposlední řadě i solidní nádory (karcinom prsu, vaječníků, malobuněčný karcinom plic, sarkomy měkkých tkání aj.).



Obr. 1. Strukturní vzorce vybraných antracyklinových antineoplastických léčiv. DOX - doxorubicin, DAU - daunorubicin, EPI - epirubicin, IDA - idarubicin.

▪ Farmakodynamika

Přestože jsou antracykliny v klinické praxi úspěšně používány již přes 40 let, přesný mechanismus jejich účinku není znám. Porozumění mechanismů cytostatického účinku je však důležité nejen s ohledem na co nejefektivnější užití těchto látek, ale musí se vzít úvahu i při vývoji nových protektivně působících látek. Antracykliny byly dlouho

tradičně řazeny mezi tzv. interkalační cytostatika (Pigram *et al*, 1972). **Interkalací** se rozumí nekovalentní vazba cytostatika na DNA. Molekula antracyklinu se specificky zasune mezi páry C-G dvojspirály DNA, kde se váže vodíkovými můstky nebo van der Waalsovými silami. Výsledkem je **inhibice replikace i transkripce**. Dnes však převládá názor, že hlavní roli v protinádorovém působení antracyklinů hraje především **inhibice topoisomerázy II**, což je enzym se zásadním významem pro replikaci a transkripci. Antracykliny se řadí mezi ireverzibilní inhibitory topoisomerázy II („topoisomerase II poisons“), které se kovalentně vážou na DNA řetězce a molekulu topoisomerázy za vzniku stabilního komplexu. Tato interakce následně zamezuje zpětnému spojení obou vláken DNA. Důsledkem tohoto jevu je vyvolání zlomů v DNA (Minotti *et al*, 2004). Dalším mechanismem podílejícím se na cytotoxickém působení antracyklinů může být také **zvýšená tvorba volných kyslíkových radikálů**, které působí poškození okolních molekul v buňce. Z dostupných informací je však patrné, že tento mechanismus k celkovému cytostatickému účinku přispívá jen minoritně (Wu & Hasinoff, 2005) narozdíl od jejich kardiotoxicity, kde patrně hraje významnou roli (Keizer *et al*, 1990). Podrobněji jsou zmíněné mechanismy popsány v části zabývající se kardiotoxicitou antracyklinů.

▪ **Farmakokinetika**

Antracykliny jsou obvykle **aplikovány intravenózně**. Výjimku představuje pouze novější derivát idarubicin, u něhož je také možné perorální podávání. Po intravenózním podávání se antracykliny rychle distribuují do celého těla, zvláště do srdce, ledvin, plic, jater a sleziny. Hematoencefalickou bariérou antracykliny neprostupují. **Biotransformovány jsou především v játrech** za účasti aldo-ketoreduktáz na **alkoholické metabolity** (doxorubicinol, daunorubicinol, aj.). Tyto metabolity mají mnohem nižší cytostatickou aktivitu, na druhou stranu však disponují značným toxickým potenciálem. Uvedená biotransformace probíhá i v jiných orgánech (např. myokard), kde se může podílet na orgánové toxicitě. Největší část léčiva je z organismu vylučována játry, pouze menší část je exkretována ledvinami. Eliminace nejužívanějšího doxorubicinu se odehrává ve třech fázích s poločasy eliminace 4,8 minut, 2,6 hodin a 48 hodin (Danesi *et al*, 2002).

▪ **Nežádoucí účinky**

Několik let po jejich zavedení do klinické praxe byly popsány nežádoucí účinky antracyklinů. Antracykliny obdobně jako většina ostatních protinádorových léčiv vykazují

pouze relativně selektivní cytostatický účinek. Pro antracykliny je charakteristická **myelosuprese**, která může významně ovlivnit dávku podaného léčiva. Méně často se vyskytuje **trombocytopenie a anémie**. Jako u většiny cytostatik se může přechodně objevit **nauzea, zvracení, mukositida a alopecie**. Při paravenózním podání dochází k těžkým **kožním nekrotám a zánětu v okolní tkáni** (Jensen *et al*, 2003; Klener, 1996). Moderní antiemetická terapie a hematopoetické růstové faktory dokáží snížit klinickou významnost těchto nežádoucích účinků antracyklinů a učinit podávání i vysokých dávek antracyklinů pro pacienty snesitelným. Stále však přetrvává jeden významný limitující faktor v jejich užití - **kardiotoxicita**. Ta nebyla zjištěna v preklinických studiích na zvířatech a poprvé se o ní objevují zmínky až ve zprávách z úvodních klinických studií daunorubicinu (Tan *et al*, 1967). S narůstajícím množstvím pacientů podstupujících chemoterapii s antracykliny, začalo být zjevné, že poškození srdce spojené s jejich aplikací, představuje závažné omezení klinického přínosu antracyklinů.

2. Kardiotoxicita antracyklinů

Antracyklinová kardiotoxicita je s ohledem na etiologii a charakter ultrastrukturních změn označována termínem „**typ I srdeční dysfunkce vyvolané chemoterapií**“ (Ewer & Benjamin, 2006). Naproti nežádoucím účinkům (nauzea, zvracení), které jsou běžně pozorované během chemoterapie, často zpočátku probíhá subklinicky. Po manifestaci však představuje klinicky významnou komplikaci léčby, jež může značně ovlivnit kvalitu života pacienta a prognózu onemocnění (Ewer & Yeh, 2006; Gianni *et al*, 2008; Von Hoff *et al*, 1979). Studium kardiotoxicity antracyklinů komplikuje fakt, že většina léčebných protokolů je založena na kombinační terapii antracyklinů s dalšími cytostatiky (cyklofosfamidem, 5-fluorouracilem, trastuzumabem, imatinib aj.), které se také mohou podílet na toxickém působení na srdce (Ewer *et al*, 2005; Gianni *et al*, 2007; Chu *et al*, 2007; Kerkela *et al*, 2006; Routledge *et al*, 2006). Výčet těchto několika skutečností potvrzuje, že antracyklinová kardiotoxicita představuje závažný problém jak v oblasti onkologické tak i kardiologické.

2.1. Základní typy antracyklinové kardiotoxicity

S ohledem na nástup a charakter klinických příznaků je antracyklinová kardiotoxicita obvykle dělena na čtyři typy: akutní, subakutní, chronickou a pozdní (Elbl, 2002; Gharib & Burnett, 2002; Hrdina *et al*, 2000; Jones *et al*, 2006). Všechny antracykliny užívané v onkologické praxi mohou vyvolávat určitý typ poškození srdce

v závislosti na dosažené kumulativní dávce. Přechodná **akutní kardiotoxicita** se manifestuje jako elektrokardiografické změny (prodloužení ST úseku, QT intervalu a vlny T, snížení QRS voltáže), supraventrikulární arytmie, komorové extrasystoly, vazodilatace a hypotenze, které se objevují několik hodin po podání léčiva. Obvykle nejví závislost na podané dávce antracyklinu, dávkovacích schématu a patrně ani nemá vztah k rozvoji antracyklinové kardiomyopatie. Klinicky méně běžná **subakutní kardiotoxicita** je popisována jako „pericarditis-myokarditis“ syndrom, který se může objevit v průběhu dnů, popř. několika týdnů od začátku podávání antracyklinů (Allen, 1992; Elbl, 2002). Mezi nejzávažnější komplikaci patří především **chronická** ireverzibilní forma, která se objevuje ke konci terapie antracykliny nebo několik týdnů až měsíců po jejím ukončení (Gharib & Burnett, 2002; Iarussi *et al*, 2005; Jones *et al*, 2006). Riziko rozvoje kardiotoxicity závisí na dosažené kumulativní dávce antracyklinů a dalších faktorech (např. věk pacienta, iradiace mediastina). Zpočátku byla maximální kumulativní dávka odhadnuta empiricky na 550 mg/m^2 (Von Hoff *et al*, 1979). Retrospektivní analýzy však zjistily, že již kumulativní dávka $400\text{-}450 \text{ mg/m}^2$ u doxorubicinu a daunorubicinu je spojována s 5% incidencí srdečního selhání. Při vyšších dávkách (nad 550 mg/m^2) se závislost kumulativní dávka-vznik kardiomyopatie mění z lineární na exponenciální, a proto při překročení dávky 700 mg/m^2 je incidence srdečního selhání již 48 % (Ewer & Benjamin, 2006; Swain & Vici, 2004). Existují však doklady, že selhání srdce se vyvinulo i po jediné dávce doxorubicinu (50 mg/m^2) (Von Hoff *et al*, 1979). Dále je potřeba podotknout, že myokard dítěte je mnohem citlivější na poškození antracykliny v porovnání s myokardem dospělého, proto se doporučuje zohlednit tuto skutečnost při odhadu terapeutického schématu. Příznaky kardiotoxicity nemusí být zpočátku klinicky manifestovány, ale monitorování funkce levé komory může subklinickou kardiotoxicitu odhalit (Nagy *et al*, 2006; Swain & Vici, 2004). Chronická kardiotoxicita se manifestuje jako dilatační kardiomyopatie, jež se vyznačuje progresivním postižením levé komory a rozvojem městnavého srdečního selhání (Ewer & Benjamin, 2006; Shan *et al*, 1996). Histologický nálezný poukazuje na změny fokálního charakteru postihující převážně levou komoru a mezikomorové septum. Tato lokalizace toxického účinku patrně souvisí se zátěží a metabolickou aktivitou těchto částí srdce. Dále je popisována buněčná degenerace charakterizovaná cytoplazmatickou vakuolizací a ztrátou myofibril, jenž může vyústit ve spontánní zánik buněk s následnou progresí intersticiální fibrózy (Billingham *et al*, 1978; Lewis & Silver, 2001). **Pozdní kardiotoxicita**, která se vyvíjí během několika let až desetiletí po ukončení chemoterapie, představuje vzhledem k úspěchu protinádorové léčby

u řady dětských malignit a k dlouhodobému přežívání dětských pacientů v kompletní remisi závažný klinický problém (Aleman *et al*, 2007; Elbl, 2002; Lipshultz *et al*, 2008). Tento typ je charakterizován vývojem dilatační kardiomyopatie a obdobně závisí na celkové kumulativní dávce.

2.2. Mechanismus vzniku antracyklinové kardiotoxicity

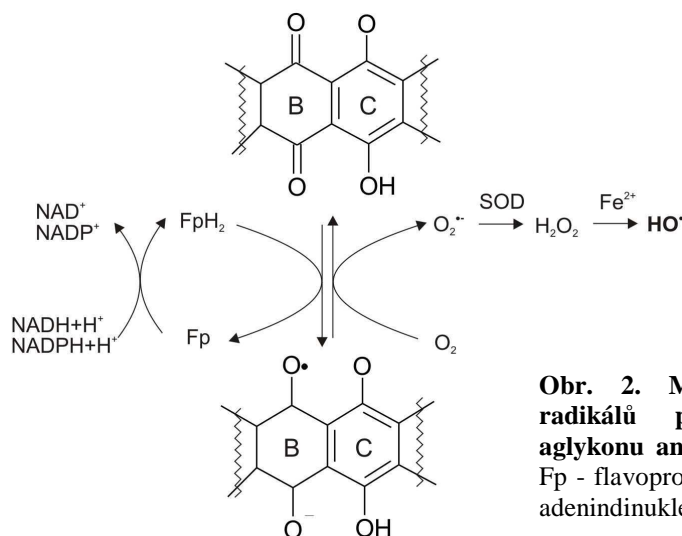
Přestože antracykliny zaujímají významné postavení v léčbě řady hematologických malignit i solidních nádorů, mechanismus vzniku a rozvoje antracyklinové kardiotoxicity není dosud objasněn. Existuje několik hypotéz vysvětlujících její podstatu, které se vzájemně nevylučují a mohou se tak teoreticky doplňovat. Dosavadní znalosti naznačují, že se jedná o poměrně komplexní proces (Chen *et al*, 2007; Minotti *et al*, 2004; Simunek *et al*, 2009).

2.2.1. Tvorba reaktivních forem kyslíku navozená antracykliny

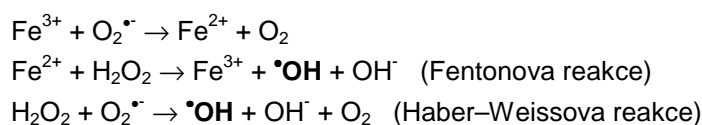
Nejčastěji zmiňovaný je mechanismus patogeneze spojovaný s „**ROS and iron hypothesis**“ (Keizer *et al*, 1990; Minotti *et al*, 2004; Simunek *et al*, 2009). Nadměrná produkce reaktivních forem kyslíku vedoucí k poškození myokardu byla opakovaně prokázána v experimentech *in vitro* (DeAtley *et al*, 1999; Link *et al*, 1996) i *in vivo* (Berthiaume *et al*, 2005; Luo *et al*, 1997). V literatuře jsou popsány dva základní mechanismy tvorby kyslíkových radikálů primárně se zapojující do vzniku a rozvoje antracyklinové kardiotoxicity. Jedná se o **redoxní cyklizaci kruhu B** molekuly antracyklinů a dále o tvorbu **komplexu antracyklin-Fe³⁺** v kardiomyocytech (Hrdina *et al*, 2000; Keizer *et al*, 1990; Minotti *et al*, 2004; Simunek *et al*, 2009). V obou případech hrají stěžejní roli volné, redoxně aktivní ionty železa.

a) Tvorba volných radikálů na podkladě redoxní cyklizace antracyklinů

Chinonová část molekuly antracyklinů umožňuje příjem elektronu s následným přechodem do semichinonové formy (Olson *et al*, 1981). Semichinon okamžitě reaguje s molekulou kyslíku za vzniku superoxidového radikálu (O₂^{•-}), který spontánně nebo v přítomnosti superoxidodismutázy dismutuje na peroxid vodíku. Superoxidy, stejně tak i peroxidy, nejsou příliš reaktivní a při zachované aktivitě antioxidačních enzymů nepředstavují pro buňky nebezpečné formy kyslíku. Pokud se však zapojí do **Haber-Weissovy reakce** katalyzované dvojmocným železem, mohou vést ke vzniku vysoce reaktivních hydroxylových radikálů ([•]OH) (obr. 2) (Hrdina *et al*, 2000; Keizer *et al*, 1990; Minotti *et al*, 2004; Simunek *et al*, 2009).



Obr. 2. Mechanismus vzniku hydroxylových radikálů prostřednictvím redoxní cyklizace aglykonu antracyklinů. SOD - superoxididismutáza, Fp - flavoproteinové enzymy, NAD(P) - nikotinamid-adenindinukleotid(fosfát).

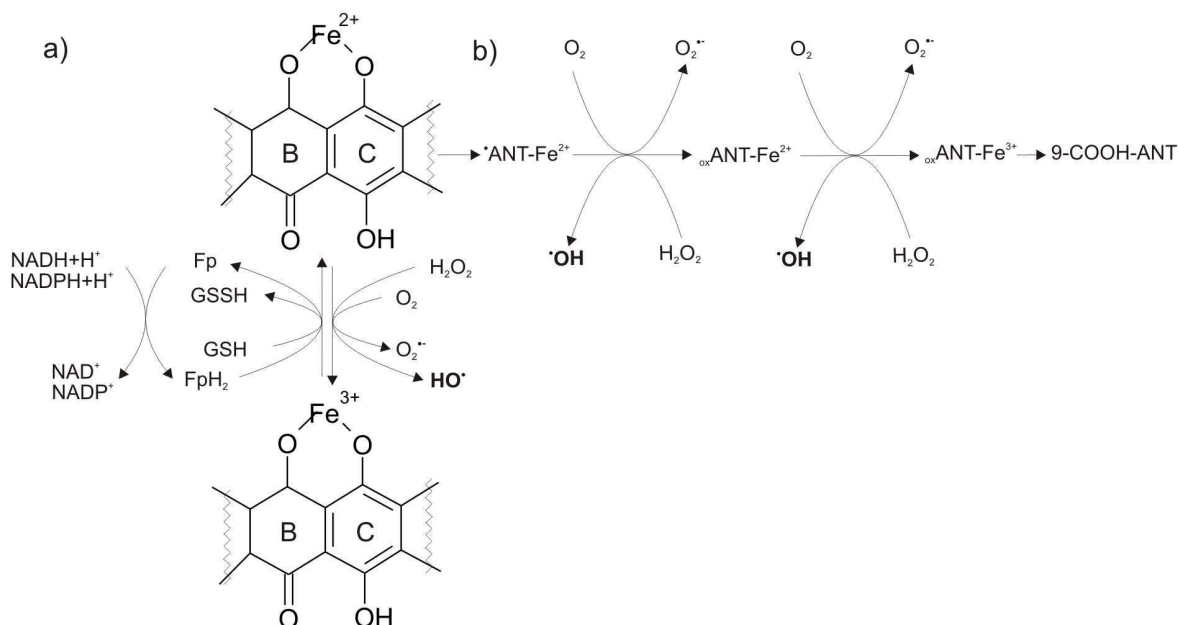


b) Tvorba komplexu antracyklin-Fe³⁺

Antracykliny mohou přímo vázat volné ionty železa a tvořit **komplexy antracyklin-železo (ANT- Fe³⁺)** v poměru 1:1, ve vyšších koncentracích i v poměru 1:2. Tyto komplexy podléhají enzymatické redukci zejména prostřednictvím flavoproteinů, nebo redukovaného glutathionu na komplexy ANT-Fe²⁺. V případě nedostatku zmiňovaných redukujících systémů komplex ANT-Fe³⁺ redukuje jím chelátované volné ionty železa intramolekulární oxidací své molekuly za vzniku radikálu [•]ANT-Fe²⁺. Za přítomnosti molekuly kyslíku, resp. peroxidu vodíku, pak dochází k opětovné tvorbě superoxidových, resp. hydroxylových radikálů (obr. 3) (Hrdina *et al*, 2000; Keizer *et al*, 1990; Olson *et al*, 1981).

Výše popsány mechanismy vznikající **hydroxylové radikály** představují extrémně reaktivní formy kyslíku, které svým působením poškozují téměř všechny buněčné struktury - lipidy, proteiny, nukleové kyseliny. (Emerit *et al*, 2001; Liochev, 1999; Minotti *et al*, 2004). Zřejmě největší riziko spojené se vznikem [•]OH představuje peroxidace lipidů, neboť vede ke vzniku vysoce toxických aldehydů (např. malondialdehydu). Tyto aldehydy jsou vysoce reaktivní, schopné difundovat v buňce nebo i procházet přes plazmatickou membránu a napadat různé makromolekulární cíle i jinde než v místě jejich vzniku (Halliwell & Gutteridge, 2007). Zvýšená citlivost myokardu k toxickému působení antracyklinů oproti ostatním tkáním se vysvětluje

nerovnováhou mezi vznikem a rychlostí odstraňování reaktivních forem kyslíku (buď jejich nadměrnou produkcí nebo nízkou zásobou přirozených antioxidantů v myokardu anebo kombinací obojího). Všechny případy mohou vést k velmi závažnému a ireverzibilnímu poškození srdce s potenciálně fatálními následky pro pacienta (Gianni *et al*, 2008).



Obr. 3. Tvorba reaktivních forem kyslíku prostřednictvím komplexu ANT-Fe a) cyklicky v přítomnosti redukčního systému a b) intramolekulární redoxní reakcí. ANT - antracyklin, Fp - flavoproteinové enzymy, GSH - glutathion, NAD(P) - nikotinamidadenindinukleotid(fosfát).

Kardiomyocyty navíc obsahují velké množství **mitochondrií** (téměř 40 % z celkového buněčného obsahu), které jsou jednak důležitým zdrojem, ale i cílovou organelou pro působení volných radikálů (Jung & Reszka, 2001). Dle dostupných informací je kardiotoxický účinek antracyklinů do značné míry spjat právě s mitochondriemi. Lipofilní antracyklinový aglykon se akumuluje ve vnitřní mitochondriální membráně, kde působí poruchy elektronového transportu v dýchacím řetězci s následným vznikem kyslíkových radikálů, které potom zpětně poškozují mitochondriální respiraci (Berthiaume & Wallace, 2007a; Tokarska-Schlattner *et al*, 2007; Wallace, 2003).

Z uvedeného vyplývá, že významnou roli v patofyziologii buněčného poškození oxidačním stresem hrají **volné ionty železa**. Za normálních okolností je převážná část železa v organismu vázána v hemoglobinu a myoglobinu, zásobní železo je uskladněno ve feritinu a transportováno je pomocí transferinu. Jako substrát Fentonovy reakce je tak

dostupná pouze velmi omezená frakce tzv. oxidoredukčně aktivní železo, uváděné jako nízkomolekulární železo (low molecular weight iron pool) nebo též „volné“ železo (free iron). V případě některých patologických stavů (např. při intracelulární acidóze) však dochází k uvolnění železa z vazby na feritin, a tím i ke vzniku většího množství $\cdot\text{OH}$ prostřednictvím Haber-Weissovy reakce.

2.2.2. Další mechanismy podílející se na rozvoji antracyklinové kardiotoxicity

Předpokládá se, že kardiotoxicita má komplexní charakter a že se do rozvoje antracyklinové kardiotoxicity vedle tvorby reaktivních forem kyslíku mohou zapojovat další mechanismy.

- Antracykliny mohou zřejmě do **buněčné homeostázy železa** zasahovat komplexněji, avšak přesný molekulární mechanismus je stále nejasný (Xu *et al*, 2005). Množství železa v buňce je regulováno prostřednictvím **IRP1 a 2** (iron regulatory proteins), které posttranskripčně ovlivňují mRNA klíčových proteinů v metabolismu železa (regulující syntézu transferinového receptoru a feritinu). Předpokládá se zapojení 13-OH metabolitů antracyklinů a/nebo komplexu antracyklin-Fe do modulace aktivity těchto proteinů. Dalším místem zásahu antracyklinů je **feritin**. Některé studie naznačují, že antracykliny brání uvolňování železa z feritinu prostřednictvím lysosomální degradace tohoto proteinu. V obou případech to má za následek narušení intracelulární homeostázy železa (Kotamraju *et al*, 2002; Kwok & Richardson, 2004; Minotti *et al*, 2004; Xu *et al*, 2005).
- **Porucha homeostázy vápenatých iontů.** Jedním ze zvažovaných patofyziologických mechanismů je porucha homeostázy vápenatých iontů. Někteří autoři poukazují na přímý nebo zprostředkovaný (prostřednictvím ROS nebo 13-OH metabolitů) účinek antracyklinů na rozličné vápníkové kanály a pumpy (např. Ca^{2+} -ATPáza, ryadinový receptor, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výměník) (Arai *et al*, 1998; Boucek *et al*, 1993; Burke *et al*, 2003; Gambliel *et al*, 2002), což může vyústit v tzv. vápníkové přetížení („calcium overload“). Následkem vápníkového přetížení je porucha funkce mitochondrií, vyčerpání zásoby vysokoenergetických fosfátů (Berthiaume & Wallace, 2007b; Holmberg & Williams, 1990; Wallace, 2007) a popř. aktivace řady enzymů, např. Ca^{2+} -dependentní proteázy - kalpainu (Singh *et al*, 2004b). Předchozí práce dokumentují značně zvýšenou aktivitu této proteázy *in vitro* v srdečních buňkách při inkubaci s antracykliny v klinicky relevantních koncentracích (Lim *et al*, 2004). Kalpain se také účastní štěpení cytoskeletálních a myofilamentárních proteinů (troponin T/I, titin,

desmin aj.) (Barta *et al*, 2005), což může vyústit v nestabilitu myofilament, diastolickou dysfunkci a následnou progresi rozvoje kardiomyopatie. Kalpain také vykazuje proteolytickou aktivitu vůči molekule Bid, která je důležitou komponentou mitochondriální apoptotické cesty, a vůči pro-kaspáze 12, která je součástí signální cesty spojené se sarkoplazmatickým retikulem (Jang *et al*, 2004).

- **Antracyklinové metabolity.** Jedná se o hydroxylové deriváty vznikající redukcí ketoskupiny na C-13 tetracyklu aglykonu (doxorubicinol, daunorubicinol). Tato reakce je katalyzována všude se vyskytujícími enzymy - aldo-ketoreduktázy a karbonylreduktázy. Předpokládá se, že pro kardiotoxicitu má zásadní význam především tvorba hydroxylových metabolitů antracyklinů *in situ* v cytoplazmě kardiomyocytů. Soudí se, že doxorubicinol je schopen přímo a v porovnání s parentní látkou ve vyšší míře inhibovat sarkoplazmatickou Ca^{2+} -ATPázu, protonovou pumpu mitochondrií, Na^+/K^+ -ATPázu aj. (Minotti *et al*, 2004; Olson *et al*, 1988). Důsledkem tohoto působení je pak porucha energetického metabolismu myokardu, iontového gradientu a homeostázy vápenatých iontů (Tokarska-Schlattner *et al*, 2006).
- Tradičně je antracyklinová kardiotoxicita spojována s progresivní degenerací a neprogramovanou smrtí kardiomyocytů. Dostupné informace však naznačují, že v tomto procesu může sehrávat určitou roli také **programovaná (apoptotická) buněčná smrt**. V posledních letech byly publikovány desítky studií prezentující zvýšený výskyt různých markerů apoptózy při expozici kardiomyocytů různým antracyklinům (Chen *et al*, 2007; Minotti *et al*, 2004). Byla popsána účast jak vnější (receptorové) (Yamaoka *et al*, 2000), tak vnitřní (mitochondriální) cesty apoptózy (Sawyer *et al*, 1999). Antracykliny např. zvyšují expresi Bax, příp. snižují expresi Bcl-X_L, čímž následně podporují uvolnění cytochromu C a vytvoření apoptosomového komplexu (Chen *et al*, 2007; Sawyer *et al*, 1999). Dále se zvažuje, že antracykliny zasahují do programované buněčné smrti ovlivněním aktivace jaderného faktoru κB , PI3-kinázy a Akt, MAPK (mitogen-activated protein kinases) a transferinového receptoru (Kang *et al*, 2000; Wang, 2002; Wu *et al*, 2004). Interpretace mnohých studií je však komplikována použitím velmi vysokých koncentrací antracyklinů, které mnohonásobně převyšují klinicky relevantní hodnoty. Výsledky většiny *in vitro* studií ukazují na významnou roli apoptózy poměrně jednoznačně. Naproti tomu experimentů v podmínkách *in vivo* bylo provedeno mnohem méně a jejich výsledky jsou značně kontroverzní. Řada autorů použila velmi krátká dávkovací schémata nebo dokonce i pouze jedinou aplikaci vysoké dávky antracyklinu. Studie Aroly *et al*. tak u potkanů

prokázala zvýšení markerů apoptózy pouze 24-48 hodin po i.p. injekci doxorubicinu (Arola *et al.*, 2000). Childs *et al.* pozoroval významné zvýšení počtu apoptotických buněk v myokardu potkanů, kterým byl aplikován jednorázově doxorubicin ve vysoké dávce 20 mg/kg (Childs *et al.*, 2002). Narozdíl od opakovaného podání (které se více blíží klinické situaci) však nebyla zjištěna elevace plazmatického troponinu T. Vzhledem k tomu, že u těchto zvířat nebyla hodnocena srdeční funkce, není možné výskyt apoptózy vztáhnout k rozvoji antracykliny indukovaného srdečního selhání. V jiné studii bylo ukázáno, že indukce apoptózy antracykliny pravděpodobně souvisí i se sarkoplazmatickým stresem, který následně může vést k aktivaci kaspázy 12 (Jang *et al.*, 2004; Szegezdi *et al.*, 2003). Dle dostupných informací se zdá, že apoptóza kardiomyocytů naopak nesouvisí s aktivací tumor supresorového faktoru p53 (Nakamura *et al.*, 2000). Ani ve starší práci Zhang *et al.* nebyli autoři pomocí metody TUNEL schopni detekovat signifikantní zvýšení výskytu apoptotických kardiomyocytů u spontánně hypertenzních potkanů (Zhang *et al.*, 1996). Jedním z možných vysvětlení výše popsaných rozporů je absence systematického studia užívajícího validovaný model chronické antracyklinové kardiomyopatie umožňující korelaci nálezů s mírou srdečního poškození.

- Mezi další děje, které se mohou podílet na vzniku srdečního poškození, patří **uvolnění histaminu** z žírných buněk (Decorti *et al.*, 1997; Klugmann *et al.*, 1986) a interference s **vegetativním nervovým systémem** v srdci. Doxorubicin působí jako kompetitivní antagonist na M receptorech (Temma *et al.*, 1992) a inhibuje uvolňování acetylcholinu z nervových zakončení. Antracykliny také snižují počet β_1 -receptorů a množství noradrenalinu v kardiomyocytech (Hoyano *et al.*, 1996; Nagami *et al.*, 1997). Doxorubicin indukuje i **uvolnění kardiotoxických cytokinů** (např. TNF- α z makrofágů a IL-2 z monocytů) (Pai & Nahata, 2000).

3. Možnosti snížení antracyklinové kardiotoxicity

I přes výskyt závažných nežádoucích účinků zůstávají antracykliny vzhledem k vysokému protinádorovému účinku a širokému spektru indikací základem chemoterapeutických režimů řady nádorových onemocnění. Proto byla v průběhu několika posledních desetiletí pozornost soustředěna na možnost snížení jejich toxického účinku zejména na myokard (viz tab. 2). Poškození srdce antracykliny může být velmi závažné a často ireverzibilního charakteru, proto je hlavní léčebnou strategií kardiotoxicitě předcházet. Jednou z možností, jak předejít nebo výrazně omezit poškození srdce

antracykliny je pozměnit léčbu s ohledem k rizikovým faktorům (tab. 1).

Tab. 1 Přehled rizikových faktorů antracyklinové kardiotoxicity.

Děti	Dospělé
Celková kumulativní dávka (>400-450 mg/m ²)	Celková kumulativní dávka (>400-450 mg/m ²)
Věk <3 roky	Věk >65 let
Iradiace mediastina	Iradiace mediastina
Jiná kardiotoxická chemoterapeutika (cyklofosamid, vinkristin, bleomycin)	Jiná kardiotoxická chemoterapeutika (trastuzumab, cyklofosamid, bleomycin, paklitaxel)
Ženské pohlaví	Ženské pohlaví
Způsob podávání - bolus	Způsob podávání - bolus
Vrozená vada srdeční	Hypertenze, diabetes aj.

- Mezi nejdůležitější rizikové faktory patří kumulativní dávka, proto se nabízí možnost **snížit celkovou kumulativní dávku** (<300-400 mg/m²). Kumulativní dávka doxorubicinu a daunorubicinu 400 mg/m² je dnes považována za nejvyšší relativně bezpečný limit. Při snižování celkové kumulativní dávky antracyklinu se musí přihlídnout k závažnosti nádorového onemocnění a k odpovědi na terapii. U dětských pacientů se musí vzít i v úvahu, že po expozici léčiva pacient nemusí mít symptomy srdečního selhání, nicméně subklinické poškození se může manifestovat až později v dospělém věku. Tento přístup má však svá úskalí, protože striktní omezení celkové kumulativní dávky může vést ke zvýšenému riziku progresu nebo relapsu nádorového onemocnění. Klinické studie navíc naznačují, že z hlediska kardiotoxicity lze za rizikové považovat již nižší kumulativní dávky antracyklinů (400-450 mg/m²) (Ewer & Benjamin, 2006; Wouters *et al*, 2005).
- Dalšími přístupy ve snaze o omezení kardiotoxicity, které přinesly částečný úspěch, byly **změny ve schématu podání**, zejména ve smyslu omezení bolusových aplikací. Dnes se preferuje 12-24 hodinová kontinuální intravenózní infúze, protože vede k nižší maximální plazmatické koncentraci cytostatika (van Dalen *et al*, 2006).
- Jednou z hlavních příčin nežádoucích účinků chemoterapie je nedostatečná selektivita cytotoxického účinku antracyklinů, proto jsou vyvíjeny nové **deriváty s cílenou pasivní a aktivní distribucí** do místa účinku. Pasivní cílená distribuce je založena na vyšší propustnosti cév v nádorových tkáních za současné nižší lymfatické drenáže, čímž se mohou molekuly o vyšší molekulové hmotnosti kumulovat v nádoru. Tohoto jevu lze dosáhnout liposomální enkapsulací antracyklinů (Doxyl[®]) nebo konjugací s biokompatibilními polymery (Batist *et al*, 2006; Hovorka *et al*, 2002; Sapro & Allen, 2003). Druhým způsobem cílené distribuce je reverzibilní připojení léčiva k ligandu,

který se může selektivně vázat na receptory převážně exprimované na povrchu nádorových buněk (Kratz *et al*, 2006; Park *et al*, 2001). Přínos těchto strategií musí však podpořit data z dlouhodobých studií, která by vyhodnotila míru protinádorového účinku a případný výskyt jednotlivých nežádoucích účinků.

- Během posledních 30 let byly syntetizovány stovky **antracyklinových derivátů** s cílem vytvořit nové antineoplasticky účinné látky se sníženou toxicitou oproti 1. generaci cytostatik (Binaschi *et al*, 2001; Sessa *et al*, 2007). Přestože v poslední době bývají v některých schématech nahrazována cytostatika 1. generace novějšími deriváty, nadále zůstávají doxorubicin a daunorubicin široce používanými léčivy. Mezi nové antracyklinové deriváty, které se dostaly i do klinické praxe, patří epirubicin, idarubicin či pirarubicin. Experimentální i klinické studie však prokázaly poškození myokardu u všech antracyklinů, proto jsou i u látek vyšší generace stanoveny kritické kumulativní dávky (např. maximální kumulativní dávka epirubicinu 900-1100 mg/m²).

Tab. 2 Možnosti snížení antracyklinové kardiotoxicity. ANT - antracykliny, LVEF - ejekční frakce levé komory, ? - není zcela potvrzeno (potřeba dlouhodobých klinických studií, které by vyhodnotily profil jednotlivých přístupů snížení antracyklinové kardiotoxicity) (Cvetkovic 2005).

Strategie	Výhoda	Nevýhoda
Chemoterapie bez užití ANT	absence kardiotoxicity	riziko ↓ odpovědi nádoru na léčbu
Snížení kumulativní dávky ANT	↓ riziko kardiotoxicity	oslabený chemoterapeutický účinek
Změny ve schématu podání ANT	↓ kardiotoxicita ?	↑ výskyt nežádoucích účinků (mukozitidy), technicky obtížné, ↑ cena
Monitorování kardiotoxicity ANT	Časnější záchyt kardiotoxicity, možnost ovlivnění další prognózy pacienta	↑ cena, nízká senzitivita a specifita (LVEF), invazivnost (endomyokardiální biopsie)
Nový deriváty ANT a lékové formy (drug targeting)	↓ kardiotoxicita, stejný nebo ↓ účinek	↑ cena, nežádoucí účinky?
Kardioprotektiva	↓ kardiotoxicita	↑ cena, nežádoucí účinky?

3.1. Farmakologická kardioprotekce

Vedle výše uvedených strategií směřovaných ke snížení toxického účinku antracyklinů na myokard je velká pozornost věnovaná farmakologické kardioprotekci. Při vývoji vhodného kardioprotektiva se klade důraz především na co nejefektivnější potlačení kardiotoxického působení při minimálním dopadu na protinádorovou odpověď antracyklinů.

3.1.1. Antioxidanty a zhášecí volných kyslíkových radikálů

Nejčastěji je mechanismus antracyklinové kardiotoxicity spojován s tvorbou reaktivních forem kyslíku, a proto se logicky nabízí užití zhášecí volných kyslíkových

radikálů (tzv. „scavengery“) u tohoto toxického poškození. S celou řadou z nich byly provedeny pokusy na akutním modelu antracyklinové kardiotoxicity, kde byla zvířatům podávána jednorázově celá kumulativní dávka (6-45 mg/kg): *N-acetylcystein* (Doroshov *et al*, 1981; Pritsos *et al*, 1992), *amifostin* (Bolaman *et al*, 2005; Dobric *et al*, 1998; Jahnukainen *et al*, 2001), *ebselen* (Pritsos *et al*, 1992), *flavonoidy* (Mojziso *et al*, 2006; Sadzuka *et al*, 1997), *melatonin* (Agapito *et al*, 2001; Dziegiel *et al*, 2002a; Dziegiel *et al*, 2003a; Kim *et al*, 2005), *probukol* (El-Demerdash *et al*, 2003), *quercetin* (Guzy *et al*, 2003), *selen* (Dobric *et al*, 1998), *vitamin A* (Tesoriere *et al*, 1994), *vitamin C* (Fujita *et al*, 1982), *vitamin E* (Bjelogrić *et al*, 2005) aj. Nicméně vzhledem k použití často málo citlivých a selektivních markerů poškození srdce a oxidačního stresu (např. stanovení lipoperoxidace pomocí kyseliny thiobarbiturové - TBARS, stanovení laktátdehydrogenázy, kreatinkinázy MB) musíme být opatrní při interpretaci těchto výsledků. Navíc přímá souvislost mezi účinky vyvolanými vysokou, jednorázově aplikovanou dávkou (napodobující předávkování léčivem) a účinky vyvolanými opakovaným podáním antracyklinů (napodobující klinickou situaci) dodnes nebyla prokázána. V literatuře lze nalézt i protichůdné výsledky hodnocení kardioprotekce stejné látky na modelu akutním a chronickým. Je tedy možné, že jednorázové podání antracyklinů navozuje kardiotoxicitu odlišným mechanismem než opakované podávání v průběhu týdnů až měsíců. Proto je nutné ověřit tyto výsledky na relevantním chronickém uspořádání pokusu, kde získané výsledky mají bližší vztah ke klinické praxi. V následující části jsou shrnuty výsledky studií, kde byla hodnocena kardioprotekce některých látek (melatonin, vitamin E, N-acetylcystein, amifostin, karvedilol aj.) vůči kardiotoxicitě navozené opakovaným podáváním antracyklinů.

Melatonin (5-methoxy-N-acetyltryptamin) je neurohormon produkovaný primárně buňkami epifyzy, u kterého byly prokázány antioxidační vlastnosti. Při jeho současném podávání s doxorubicinem navodil u potkanů částečnou protekci. Snížil mortalitu zvířat, částečně zamezil změnám kontraktility levé komory, lipoperoxidaci a morfologickým změnám myokardu (Xu *et al*, 2001). Podání daunorubicinu, popř. doxorubicinu (9 mg/kg ve třech jednotlivých dávkách) signifikantně zvýšilo indukci apoptózy v kardiomyocytech. Podání melatoninu částečně zamezilo apoptotické buněčné smrti, ale současně oslabovalo vlastní protinádorový účinek antracyklinů (Dziegiel *et al*, 2003b; Dziegiel *et al*, 2002b).

Tokoferoly patří mezi vitaminy rozpustné v tucích. Z jeho osmi izoform má největší antioxidační aktivitu **α -tokoferol (vitamin E)**. Vedle akutních pokusů s vitaminem E byly provedeny i pokusy na chronickém modelu antracyklinové

kardiotoxicity. U většiny byl zaznamenán jen částečný nebo žádný protektivní účinek na srdce (Unverferth *et al*, 1985; Van Vleet *et al*, 1980). Kardioprotektivní účinek obdobně jako u většiny antioxidantů nebyl prokázán ani v klinických randomizovaných studiích (Dorr, 1996; Legha *et al*, 1982).

Jedním z nejvýznamnějších antioxidantů, který je přítomen v cytoplazmě, jádře a mitochondriích, je tripeptid glutathion (Glu-Cys-Gly). Tato látka ale neproniká přes biologické membrány, nicméně acetylovaný cystein (**N-acetylcystein**) se dobře po p.o. podání vstřebává a proniká do buněk, kde se deacetyluje a může sloužit jako intracelulární zdroj cysteinu pro syntézu glutathionu. V kontrastu s pozitivními výsledky z akutních pokusů (Doroshov *et al*, 1981) podání N-acetylcysteinu nezabránilo rozvoji experimentálně navozené chronické doxorubicinové kardiotoxicity (Herman *et al*, 1985; Unverferth *et al*, 1985). Tyto výsledky potvrdily i dvě randomizované klinické studie. V obou případech podání N-acetylcystein nedokázalo zabránit snížení ejekční frakce u pacientů podstupující léčbu antracykliny (Dresdale *et al*, 1982; Myers *et al*, 1983).

Anorganický **selen** sice nemá přímé antioxidační vlastnosti, ale je nezbytnou komponentou selenoproteinů (např. glutathionperoxidázy). V experimentálním uspořádání suplementace selenu měla pouze nevýrazný či žádný účinek na rozvoj antracyklinové kardiotoxicity (Van Vleet *et al*, 1980).

Amifostin (thiofosfátový derivát cystaminu, WR-2721) je klinicky užívané proléčivo, které podléhá defosforylaci katalyzovanou alkalickou fosfatázou na cytoprotektivní látku WR-1065. Tento metabolit je široce užíván jako tkáňový protektant, který chrání tkáň vůči ionizujícímu záření a toxicitám vyvolaných chemoterapeutiky. Tato látka chránila srdce před toxickým působením doxorubicinu, což bylo dokumentováno signifikantním zlepšením srdeční funkce (Dragojevic-Simic *et al*, 2004; Nazeyrollas *et al*, 1999). Ve studii srovnávající účinek dexrazoxanu a amifostinu (200 mg/kg) vůči chronické doxorubicinové toxicitě (1 mg/kg po dobu 12 týdnů) amifostin vykazoval stejný stupeň protekce vůči doxorubicinové nefrotoxicitě, ale pouze nevýznamný kardioprotektivní účinek (Herman *et al*, 2000). Tyto výsledky potvrdila i další skupina, která podávala amifostin a doxorubicin v obdobném dávkovém schématu (Rigatos *et al*, 2002).

Karvedilol je klinicky užívaný k léčbě hypertenze, ischemické choroby srdeční a levostranného srdečního selhání. Jeho účinek je založen na blokádě α_1 a β adrenergních receptorů. Na rozdíl od ostatních sympatolytik byly u něj zjištěny antioxidační vlastnosti, které v buněčné kultuře vedou k zhášení již vzniklých kyslíkových radikálů (Feuerstein

1995). Byly publikovány práce hodnotící protektivní účinek karvedilolu v *in vivo* podmínkách na chronickém modelu antracyklinové kardiomyopatie, kde perorálně podaný karvedilol zabránil mortalitě zvířat, snížení frakčního zkrácení levé komory a stejně tak i lipoperoxidaci navozené podáním doxorubicinu (2,5 mg/kg, 6 aplikací) (Matsui *et al*, 1999). Pozdější studie ukázala, že karvedilol v kardiomyocytech snižuje stupeň buněčné vakuolizace a brání inhibičnímu působení doxorubicinu na mitochondriální respiraci a integritu (Santos *et al*, 2002). Dlouhou dobu nebylo zřejmé, zda za kardioprotektivní účinky karvedilolu jsou zodpovědné antioxidační vlastnosti nebo antagonistické působení na adrenergní β -receptory, což objasnila až studie Oliviera *et al*. (Oliveira *et al*, 2004). V této práci karvedilol narozdíl od atenololu (betablokátoru bez potvrzených antioxidačních vlastností) ochránil myokard před poškozením navozeným podáním doxorubicinu.

Velká pozornost z hlediska kardioprotekce vůči antracyklinovému poškození srdce je věnována i **probukolu**. Probukol je klinicky užívané hypolipidemikum se známými antioxidačními vlastnostmi. Pro toto léčivo je charakteristická relativně vysoká distribuce do myokardu pravděpodobně díky své vazbě na kardiolipin. Ve studii, kde byl podáván potkanům probukol společně s antracyklinem, byl zaznamenán významný protektivní účinek vůči kardiomyopatii navozené doxorubicinem (Siveski-Iliskovic *et al*, 1995; Siveski-Iliskovic *et al*, 1994). V další studii probukol zabránil též rozvoji poškození myokardu a oxidačnímu poškození (Li *et al*, 2000).

Monohydroxyethylrutosid (**monoHER**) je látka odvozená od flavonoidů, u níž se předpokládají přímé antioxidační účinky a do určité míry i chelatační účinky (ionty železa a mědi). MonoHER navodil úplnou protekci vůči negativnímu inotropnímu účinku doxorubicinu avšak na elektricky stimulovaných myších síních (van Acker *et al*, 1993). Pokud byla kardiotoxicita doxorubicinu hodnocena telemetrickým měřením EKG u myší, podání MonoHER zabránilo prodloužení ST intervalu (Bast *et al*, 2007; van Acker *et al*, 2000; van Acker *et al*, 1995). MonoHER také neovlivňoval negativně antiproliferativní účinky doxorubicinu u řady nádorových linií (A2780, OVCAR-3 MCF-7) (Bast *et al*, 2007). U této látky také již proběhla I. fáze klinického hodnocení na zdravých dobrovolnících se závěrem, že dávka 1500 mg/m² je účinná a bezpečná dávka pro II. fázi studie, kde budou hodnoceny protektivní vlastnosti monoHER vůči doxorubicinové kardiotoxicitě (Willems *et al*, 2006). Vedle těchto pozitivních výsledků existuje studie, která toto tvrzení vyvrací. Opakované podávání monoHER 60 min před aplikací doxorubicinu (4 mg/kg) kardiotoxicitu zhoršovalo (Bruynzeel *et al*, 2007b). Tyto výsledky

byly potvrzeny i v II. fázi klinického hodnocení, kde monoHER nevykazoval kardioprotektivní účinek u pacientů léčených antracykliny a dokonce i snižoval protinádorovou odpověď cytostatika (Bruynzeel *et al*, 2007a).

Další látkou s kardioprotektivním potenciálem je **trimetazidin**. Trimetazidin je látka, která v buňkách stimuluje glykolýzu a tlumí β -oxidaci mastných kyselin a jsou mu přisuzovány také antioxidační vlastnosti. V klinické praxi se indikuje k dlouhodobé profylaktické léčbě anginy pectoris v kombinaci s dalšími léčivy. Ačkoliv trimetazidin významně zlepšuje časné příznaky kardiotoxicity, ve studii zaměřené na pozdní příznaky kardiotoxicity toto léčivo selhalo (Perletti *et al*, 1989). Byla i publikovaná pilotní nekontrolovaná klinická studie, kde perorální podání trimetazidinu bylo provázeno zlepšením funkce levé komory a zabráněním mitrální nedostatečnosti (Pascale *et al*, 2002). Není však uveden počet pacientů ani detailněji rozepsané metody studie, proto tato data nemusí být úplně relevantní. Dále ve studii u 61 pacientek kardioprotekce minimalizovala negativní vliv antracyklinů na diastolickou funkci. Trimetazidin i dexrazoxan, jež byly užity v této studii, navodily srovnatelný protektivní účinek vůči poškození srdce doxorubicinem (Tallarico *et al*, 2003).

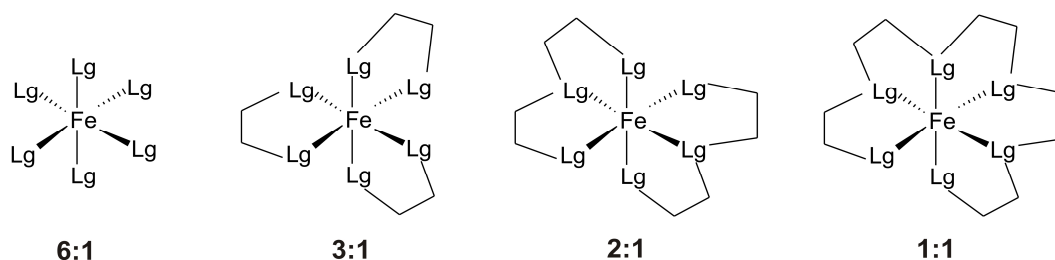
Mnoho dalších testovaných látek vykazalo v provedených preklinických experimentech kardioprotektivní působení, např. inhibitor angiotenzin-konvertujícího enzymu - enalapril (Vaynblat *et al*, 2002), růstový faktor erytropoetin (Hamed *et al*, 2006), inhibitor 5-fosfodieasterázy - sildenafil (Fisher *et al*, 2005) aj. Při interpretaci těchto výsledků musíme být obezřetní, často se jedná o „akcelerovaný model chronické antracyklinové kardiotoxicity“. Dodnes nebylo přesně prokázáno, že tento model nese obdobné rysy jako chronická kardiotoxicita v klinické praxi. Navíc v žádné z těchto studií nebyly výsledky srovnány s dexrazoxanem (modelovým kardioprotektivem). Dalším důvodem k obezřetnosti je fakt, že kardioprotektivní působení těchto látek nebylo mnohdy v dalších experimentálních a zejména klinických studiích potvrzeno (Bruynzeel *et al*, 2007a; Dresdale *et al*, 1982; Herman *et al*, 1985; Legha *et al*, 1982; Myers *et al*, 1983). Zdá se tedy, že účinnější strategií než použití „scavengerů“, které zhášejí již vzniklé volné kyslíkové radikály, bude přímé zabránění vzniku ROS.

3.1.2. Chelátory železa

Jako další způsob farmakologické protekce se nabízí zabránění vzniku vysoce reaktivních hydroxylových radikálů. Nejperspektivnější se v této oblasti zdá být chelatace volného redoxně aktivního železa (labile iron pool), které může katalyzovat reakce vedoucí

ke vzniku ROS. (Kruszewski, 2004). Chelátory železa jsou látky, které mají selektivní afinitu k iontům železa, se kterými pomocí koordinačně-kovalentních vazeb vytvářejí komplexní sloučeniny (obr. 4). Hlavní indikací chelátorů je již více než 40 let léčba stavů spojených s přetížením organismu železem (např. hemosideróza, talasemie, anémii aj.). S poznáním úlohy železa se později chelátory začaly studovat i z hlediska možné prevence a léčby dalších patologických stavů, jejichž rozvoj úzce souvisí s dostupností tohoto iontu, např. při nádorových onemocnění (Kalinowski a Richardson 2005) a zejména pak u různých orgánových poškození oxidačním stresem (včetně poškození srdce antracykliny). Protektivní účinek chelátorů železa u antracyklinové kardiotoxicity je pravděpodobně dán schopností odnímat ionty železa z komplexu s antracykliny a/nebo vázat volné ionty železa, a tak zabraňovat jejich účasti při tvorbě ROS.

Zdaleka ne všechny běžně dostupné chelatační látky mohou v této oblasti najít uplatnění. Jsou hledány takové látky, které snadno pronikají do buňky, které mají vysokou afinitu a selektivitu k iontům železa a které s Fe^{3+} netvoří redoxně aktivní komplexy.



Obr. 4. Struktura jedno-, dvou-, tří a šestivazného chelátoru železa. Lg - koordinační skupina.

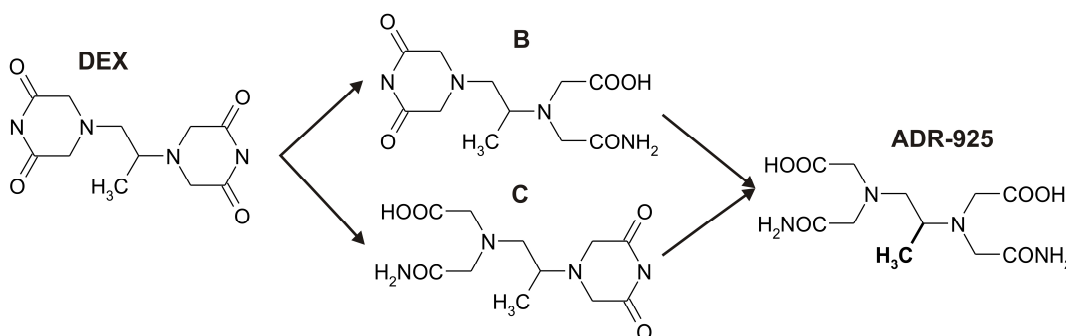
3.1.2.1. Dexrazoxan

Bisdioxopiperazinový derivát **dexrazoxan** (ICRF-187) je pravotočivý enantiomer razoxanu (ICRF-159), látky původně vyvinuté a testované pro protinádorový účinek (Creighton & Birnie, 1969). Jeho protinádorový účinek je připisován schopnosti inhibovat buněčné dělení katalytickou inhibicí topoisomerázy II, aniž by výrazně zasahoval do klidové fáze buňky (Sharpe *et al*, 1970). Protinádorový účinek se v pozdějších klinických studiích ukázal jako nevýrazný, nicméně během preklinických studií byl objeven jeho protektivní účinek vůči antracykliny navozenému poškození srdce (Poster *et al*, 1980). Razoxan je poměrně málo rozpustný ve vodě, proto mohl být podáván jen perorálně. Ve vyšších dávkách byla sledována i nízká biologická dostupnost tohoto léčiva, proto byl izolován jeho pravotočivý optický isomer – dexrazoxan, který umožňoval intravenózní podání díky své 4násobně vyšší rozpustnosti ve vodě. Dexrazoxan díky

optimální lipofilitě může procházet přes biologické membrány pasivní difúzí. Uvnitř srdečních buněk podléhá enzymatické hydrolýze za účasti dihydropyrimidinamidohydrolázy a dihydroorotázy (Schroeder *et al*, 2002) na finální aktivní metabolit **ADR-925** se strukturou připomínající EDTA (obr. 5). Tento metabolit je polární látka s vysokou železo-chelatující aktivitou (stabilitní konstanty 10^{10} a $10^{18,2}$ pro Fe^{2+} a Fe^{3+}). Vzhledem ke své hydrofilní povaze velmi obtížně proniká buněčnou membránou, čímž se prodlužuje jeho intracelulární chelatační účinek.

Podle dostupných poznatků se předpokládá, že hlavní mechanismus kardioprotektivního účinku dexrazoxanu je primárně založen chelatačních vlastnostech jeho metabolitu, díky nimž dokáže odnímat ionty železa z komplexu s antracykliny a/nebo vázat volné, redoxně aktivní ionty železa. Po navázání iontů železa tak zabrání jejich účasti při tvorbě reaktivních forem kyslíku (Hasinoff *et al*, 1998a; Malisza & Hasinoff, 1996).

Teoreticky i komplexy ADR-925 s ionty železa by mohly produkovat volné radikály. Termodynamicky je tento děj málo pravděpodobný, a proto se v praxi uplatňuje velmi málo. V tomto ohledu se redoxní vlastnosti komplexu ADR-925 s ionty železa liší od komplexů např. EDTA-Fe (Barnabe *et al*, 2002; Hasinoff, 1995; Hasinoff *et al*, 2003b).



Obr. 5. Struktura dexrazoxanu a jeho hydrolýzou vzniklého aktivního metabolitu ADR-925. B, C - hydrolytické meziprodukty vzniklé otevřením jednoho cyklu, DEX - dexrazoxan.

Herman a jeho kolektiv jako první odhalili s použitím *in vivo* modelu možnou protekci bisdioxopiperazinových látek vůči antracyklinovému poškození srdce (Herman *et al*, 1979). Následně byl kardioprotektivní účinek dexrazoxanu prokázán a kvantifikován na dalších modelech chronické antracyklinové kardiomyopatie – např. u myší, potkanů, králíků i psů (tab. 3).

Tab. 3 Přehled některých preklinických studií sledující účinek dexrazoxanu vůči antracyklinové kardiotoxicitě. DOX – doxorubicin, DAU – daunorubicin, EPI – epirubicin, ANT – antracyklin.

Lab. zvíře	ANT	Schéma podání	Dexrazoxan	Kardioprotekce	Studie
Myš	EPI/DOX i.p.	1; 1x týdně, 12 apl.	12,5; i.p. 30 min před ANT (1x týdně, 12 apl.)	ANO	(Alderton <i>et al</i> , 1992)
Potkan	DOX i.v.	3; 1x týdně, 5 apl.	25; i.p. (1x týdně, 5 apl.)	ANO	(Villani <i>et al</i> , 1990)
Potkan	DOX i.v.	3; 1x týdně, 5 apl.	60; p.o. 60 min před DOX (1x týdně, 5 apl.)	ANO	(Kvetina <i>et al</i> , 1997)
Potkan	DOX i.v.	1; 1x týdně, 7 apl.	20; i.v. 30 min před DOX (1x týdně, 7 apl.)	ANO	(Della Torre <i>et al</i> , 1999)
Potkan	DOX i.v.	3; 1 apl.	60; i.p. 15 min před DOX (1 apl.)	ANO	(Chakrabarti <i>et al</i> , 2001)
Potkan	DAU i.v.	2,5; 1x týdně, 6 apl.	50; i.p., 30 min před DAU (1x týdně, 6 apl.)	ANO	(Cusack <i>et al</i> , 2006)
SHR	DOX i.v.	1; 1x týdně, 12 apl.	25; i.p., 30 min před DOX (1x týdně, 12 apl.)	ANO + nefroprotekce	(Herman <i>et al</i> , 1988a)
SHR	EPI i.v.	1,5; 1x týdně, 12 apl.	50; i.p., 30 min před DOX (1x týdně, 12 apl.)	ANO + nefroprotekce	(Dardir <i>et al</i> , 1989)
SHR	DOX i.v.	1; 1x týdně, 12 apl.	25; i.p., 30 min před DOX (1x týdně, 12 apl.)	ANO	(Zhang <i>et al</i> , 1996)
SHR	DOX i.v.	1; 1x týdně, 12 apl.	25; i.p., 30 min před DOX (1x týdně, 12 apl.)	ANO	(Herman <i>et al</i> , 2000)
Králík	DAU i.v.	3,2; 3 týdenní interval, 5 apl.	12,5 nebo 25; i.p. 30 min před DAU (3 týdenní interval, 5 apl.)	ANO	(Herman <i>et al</i> , 1981)
Králík	DAU i.v.	3,2; 3 týdenní interval, 6 apl.	25; i.p. 30 min před DAU (3 týdenní interval, 6 apl.)	ANO	(Herman & Ferrans, 1986)
Králík	DAU i.v.	3; 1x týdně, 10 apl.	60; i.p. 30 min před DAU (1x týdně, 10 apl.)	ANO	(Simunek <i>et al</i> , 2004)
Miniprase	DOX i.v.	1,6; 3 týdenní interval, 6 apl.	12,5; i.p. 30 min před DOX (3 týdenní interval, 6 apl.)	ANO	(Herman & Ferrans, 1983)
Pes	DOX i.v.	1; 1x týdně, 15 apl.	12,5; i.p. 30 min před DOX (1x týdně, 15 apl.)	ANO	(Herman & Ferrans, 1981)
Pes	DOX i.v.	1,75; 3 týdenní interval, 7 apl.	25; i.v. 30 min před DOX (3 týdenní interval, 7 apl.)	ANO	(Herman <i>et al</i> , 1985)
Pes	DOX i.v.	1,75; 3 týdenní interval	25; i.v. 15 min před DOX (3 týdenní interval)	ANO (po dobu 90 týdnu)	(Herman <i>et al</i> , 1988b)

V těchto pracích bylo dokumentováno zvýšené přežívání pokusných zvířat a signifikantní snížení srdečního poškození oproti skupinám, kterým bylo podáváno samotné cytostatikum. Dexrazoxan také umožnil aplikaci vyšších než standardních kumulativních dávek antracyklinů, které by jinak byly letální (Hasinoff *et al*, 1998a; Herman *et al*, 1988c). Na zvířecích modelech se mimo jiné ukázalo, že dexrazoxan je účinnější vůči toxickému působení antracyklinů, pokud je podáván bezprostředně před (optimálně 30 minut) nebo současně s antracykliny než po jejich podání. Čím déle byl dexrazoxan aplikován po antracyklinu, tím méně byl protektivní účinek patrný (Herman & Ferrans, 1993). Signifikantní stupeň kardioprotekce byl zaznamenán i u různých antracyklinových derivátů (doxorubicin, daunorubicin, epirubicin a idarubicin), což potvrzuje společný mechanismus vzniku antracyklinové kardiotoxicity.

Farmakokinetika intravenózně podaného dexrazoxanu odpovídá otevřenému dvoukompartimentovému modelu s eliminací probíhající podle kinetiky nultého řádu.

Tkáňová distribuce je rychlá. Nejvyšší koncentrace nezměněné látky i produktů hydrolyzy byla zjištěna v játrech, ledvinách a v srdci. Pokles plazmatických koncentrací dexrazoxanu je bifázický a je charakterizován biologickými poločasy eliminace na cca 15 minut a 150 minut (udávané je i rozmezí 120-240 min). Vazba na plazmatické bílkoviny je nižší než 2 %. Distribuční objem byl vypočten na 1,1 l/kg. Asi 40 % dexrazoxanu se vylučuje ledvinami v nezměněné podobě, ostatní ve formě metabolitů. Metabolizován je pomocí enzymů dihydropyrimidinamidohydrolázy a dihydroorotázy. V experimentálních i klinických studiích byla vyloučena významná farmakokinetická interakce dexrazoxanu s antracykliny (Baldwin *et al*, 1992; Cusack *et al*, 2003; Minotti *et al*, 2004).

Tab. 4 Farmakokinetické parametry dexrazoxanu u dospělých s diagnostikovanou rakovinou. Léčivo bylo podáváno 15-30 min i.v. infuzí. c_{max} - maximální koncentrace léčiva v krvi, AUC - area under curve (plocha pod křivkou plazmatických koncentrací v krvi), $t_{1/2\alpha}$ - biologický poločas distribuce, $t_{1/2\beta}$ - biologický poločas eliminace, CL - clearance (Cvetkovic & Scott, 2005).

Farmakokinetické parametry	Dávka dexrazoxanu (mg/m ²)	
	500	1000
c_{max} (mg/l)	36,5	75,3
AUC (mg.hod/l)	-	125,5-137
Vazba na bílkoviny (%)	< 2	< 2
$t_{1/2\alpha}$ (hod)	0,2-0,3	0,2
$t_{1/2\beta}$ (hod)	2,5	2-2,7
Eliminace ledvinami (%)	42	42-48
CL (l/hod)	13,8	-
Distribuční objem (l/kg)	1,1	1,1

Kardioprotekce s dexrazoxanem je v současnosti celosvětově jediný klinicky ověřený a používaný způsob profylaxe antracyklinové kardiotoxicity u dospělých (Marty *et al*, 2006; Swain *et al*, 1997b) i u dětských pacientů (Lipshultz *et al*, 2004; Wexler *et al*, 1996). Pacientům, kteří byly zařazeni do studií (v mnoha případech randomizovaných kontrolovaných), byly diagnostikovány různé druhy malignit. U žen se nejčastěji jednalo o karcinom prsu, u dětí o sarkomy, lymfomy a leukémie. Projevy kardiotoxicity byly monitorovány pomocí ukazatelů funkce levé komory (např. ejekční frakce) a endomyokardiální biopsie. U všech pacientů, kterým byly podávány antracykliny v kombinaci s dexrazoxanem, byl prokázán signifikantně nižší výskyt kardiovaskulárních nežádoucích účinků i srdečního selhání navozeného antracykliny. Navíc poznatky mnoha studií se shodovaly v tom, že pacientům léčených antracykliny společně s dexrazoxanem se mohlo podat více léčebných cyklů a vyšší kumulativní dávku cytostatika při současném minimálním riziku rozvoje kardiotoxicity.

Speyer (1992) prokázal, že dexrazoxan (1000 mg/m²) působil kardioprotektivně ve studii, jenž byla provedena u 92 žen s pokročilou rakovinou prsu léčených standardním

režimem (5-fluorouracil, cyklofosfamid, doxorubicin). Pro úspěšné potlačení nádorového onemocnění musela být u těchto pacientek podávána vyšší kumulativní dávka doxorubicinu, která vedla k přerušení chemoterapie u 50 % pacientek z placebo skupiny z důvodu výskytu kardiotoxicity. Pokud byl podáván dexrazoxan za stejných podmínek, chemoterapie byla přerušena pouze u 8 % pacientek z dexrazoxanové skupiny. Ve dvou randomizovaných dvojité zaslepených studiích byl též prokázán protektivní účinek dexrazoxanu vůči kardiotoxickému působení antracyklinů (Swain *et al*, 1997a; Swain *et al*, 1997b). V první studii celkový výskyt chronického srdečního selhání dosahoval 1 % u dexrazoxanové skupiny ve srovnání s 8 % v placebo skupině (Swain *et al*, 1997b). Srdeční příhody byly pozorovány u 31 % pacientů léčených doxorubicinem, v dexrazoxanové skupiny jen u 14 %. V druhé multicentrické studii byl podán dexrazoxan v 10násobně vyšší dávce než doxorubicin až po dosažení kumulativní dávky 300 mg/m². Srdeční selhání se vyskytlo jen u 3 % pacientů. V placebo skupině činil výskyt srdečního selhání 22 %. Kardioprotekce umožnila podat až 15 cyklů chemoterapie a významně prodloužila průměrnou dobu přežití (Swain *et al*, 1997a). Výsledky těchto dvou multicentrických studií ukazují, že protektivního působení dexrazoxanu vůči antracyklinové kardiotoxicitě bylo docíleno bez ohledu, zda je podáván protektivum na začátku terapie nebo později až po překročení určité kumulativní dávky. Výsledky dalších klinických studií jsou shrnuty v tab. 5.

Významný stupeň kardioprotekce byl v klinických studiích zaznamenán i u dalších antracyklinových derivátů, což např. potvrzuje studie provedená Venturini *et al*. (Venturini *et al*, 1996). V této studii byly projevy kardiotoxicity navozené epirubicinem (dávky >960 mg/m²) pozorovány u 23 % pacientů z placebo skupiny narozdíl od 7% incidence u pacientek, kterým bylo aplikováno i kardioprotektivum. V další randomizované studii byly pacientům s rakovinou prsu a sarkomem měkkých tkání podávány vysoké dávky epirubicinu (160 mg/m² každé 3 týdny). Obdobně i zde byla incidence kardiotoxicity signifikantně vyšší v placebo skupině (24 %) než v dexrazoxanové (7 %) (Lopez *et al*, 1998).

Tab. 5 Klinické studie hodnotící protektivního účinku vůči kardiotoxicitě antracyklinů. A/CH - dospělí/děti, PS - pilotní studie, R - randomizovaná, (N)K - (ne)kontrolovaná, nb - nezaslepená, db - dvojité zaslepená, I, II, III - fáze klinického hodnocení, CaM - karcinom prsu, CaP - karcinom plic, ALL - akutní lymfoblastická leukémie, DOX - doxorubicin, DAU - daunorubicin, EPI - epirubicin, DEX - dexrazoxan, CDF - cyklofosfamid+doxorubicin+5-fluorouracil, CDV - cyklofosfamid+doxorubicin+vinkristin, CHSS - chronické srdeční selhání, PFS - progression free survival (interval mezi dosažením kompletní remise až po dosažení prvních příznaků relapsu), ORR - objective response rate (procento pacientů, u kterých je dosaženo *kompletní odpověď*, tj. vymizení všech měřitelných známek onemocnění, zjištěné 2 pozorováními během 4 týdnů a *částečná odpověď*, tj. ≥ 50% ústup měřitelných změn během 4 týdnů).

Studie	Typ nádoru	A/CH	Typ a fáze studie	počet pacientů	Schéma léčby (mg/m ²) /poměr DEX:ANT/	Kumulativní dávka ANT (mg/m ²) (počet cyklů)	Srdeční příhody (%)	CHSS (%)	ORR (%)	PFS (%)	celkové přežití (dny)
Porovnání s kontrolou											
(Swain <i>et al</i> , 1997b)	CaM	A	R, K, III, db	168	CDF (50) + DEX (500) /20:1 + 10:1/	- (6)	15	0	47	254	598
				181	CDF (50) + kontrola	- (6)	31	8	61	260	551
(Swain <i>et al</i> , 1997b)	CaP	A	R, K, III, db	81	CDF (50) + DEX (500) /10:1/	- (6)	14	2	54	233	458
				104	CDF (50) + kontrola	- (6)	31	7	49	249	553
(Swain <i>et al</i> , 1997a)	CaM,	A	R, K, III	102	CDF (50) + se 7. cyklem DEX (500) /10:1/	- (15)	25	3	51	-	882
	CaP		db	99	CDF (50) + kontrola	- (5)	60	22	66	-	460
(Feldmann <i>et al</i> , 1998)	CaP	A	R, K, III, db	73	CDV (50) + DEX (500) /10:1/	- (4)	12	4	45	183	280
				82	CDV (50) + kontrola	- (6)	29	10	59	183	312
Porovnání se samotnou chemoterapií											
(Speyer <i>et al</i> , 1992)	CaM	A	R, K, nb, III	76	CDF (50) + DEX (1000) /20:1/	558 (11)	8	3	37	303	549
				74	CDF (50)	407 (9)	50	27	41	282	501
(Venturini <i>et al</i> , 1996)	CaM	A	R, K, nb, III	84	CEF (60) + DEX (600) nebo EPI (120) + DEX (1200) /10:1/	702 (6)	7	2	48	348	1206
				78	CEF (60) nebo EPI (120)	713 (6)	23	4	46	303	1140
(Vici <i>et al</i> , 1998)	CaM	A	R, K, III	43	EPI (160) + DEX (1000) /6,25:1/	960 (6)	0	0	67	240	870
				49	EPI (160)	880 (6)	16	-	69	240	570
(Michelotti <i>et al</i> , 2000)	CaM	A	R	63	EPI (120) + DEX(1200) /10:1/	720 (6)	10	-	47	8,5	20,1
				64	EPI (120)		28	-	46	6,9	16,6
(Marty <i>et al</i> , 2006)	CaM	A	R, K, III, nb	85	DOX (50) + DEX (1000) /20:1/ nebo EPI (90) + DEX (900) /10:1/	669 (1-6)	12 (14)	1 (0)	35	234	405
				79	DOX (50) nebo EPI (90)	608 (1-6)	37 (43)	11 (11)	35	210	480
(Lopez <i>et al</i> , 1998)	sarkom	A	R, K, III, nb	18	EPI (160) + DEX (1000) /6,25:1/	960 (6)	9	7	11	210	450
				16	EPI (160)	880 (6)	29	24	38	270	465
Nekomparativní studie											
(Kolaric <i>et al</i> , 1995)	CaM	A	NK, II	212	CDF (50) + DEX (1000) /20:1/	311	-	3	49,5	-	-
(Jelic <i>et al</i> , 1995)	CaM	A	NK, II	35	CDF (50) + DEX (1000) /20:1/	50-1000	0	0	56	-	-
(Wexler <i>et al</i> , 1996)	sarkom	CH	nb, R	23	CDV (50) + DEX (1000) /20:1/	410 (7)	5	22	80	43	43 měsíců
				18	CDV (50)	310 (5)	21	67	81	39	24 měsíců
(Bu'Lock <i>et al</i> , 1993)	různý	CH	I, PS	10	EPI/DOX + DEX /10:1/	550-1650	1	0	-	-	-
					DEX		11	40	-	-	-
(Lipshultz <i>et al</i> , 2004)	ALL	CH	nb, R	105	DOX (30) + DEX (300) /10:1/	300	0	0	-	83	-
				101	DOX (30)	300	1	0	-	83	-

Doposud nebyla zcela zodpovězena otázka, zda profylaktické podávání dexrazoxanu zabrání také vzniku pozdní formy kardiotoxicity. Důvodem je především fakt, že pozdní forma se může objevit až několik let po skončení chemoterapie a že je potřeba delší období na následné prospektivní monitorování jednotlivých parametrů postižení srdce. Některé studie však naznačují, že dexrazoxan dokáže ochránit myokard i proti této formě kardiotoxicity (Elbl *et al*, 2005; Elbl *et al*, 2006; Lipshultz *et al*, 2008; Scully & Lipshultz, 2007).

Názor na optimální indikaci a dávku pro zahájení profylaxe dexrazoxanem stále není jednoznačný. Obvykle se dexrazoxan podává v podobě hydrochloridu formou pomalé i.v. infúze 30 minut před samotnou aplikací chemoterapeutika. Dodnes není ani úplně stanoven optimální poměr dexrazoxan:antracyklin. Při použití obvyklého dávkového schématu, dle kterého se podává 50 mg/m² doxorubicinu každých 21 dnů, je doporučená denní dávka dexrazoxanu 500 či 1000 mg/m² (poměr 10:1 je častěji užíván v USA, zatímco poměr 20:1 je typičtější pro evropské země). Při užití epirubicinu se dexrazoxan dle dostupných publikací aplikuje v dávce 10krát vyšší než je dávka antracyklinu. V České republice je dexrazoxan (Cardioxane, Novartis Oncology) registrován pro prevenci kardiotoxicity způsobené cytostatickou léčbou chemoterapeutickými režimy obsahujícími antracykliny (AISLP, SPC). Profylaktické podávání dexrazoxanu je doporučeno dětem do 18 let, aby se zamezilo riziku možného pozdního poškození srdce v produktivním věku, a dospělým pacientům, u kterých došlo k překročení doporučených kumulativních dávek nebo ke kumulaci více rizikových faktorů kardiotoxicity (Elbl, 2002). Během podávání dexrazoxanu se doporučuje pravidelné monitorování hematologických parametrů, zejména po dobu prvních dvou cyklů terapie, aby se zjistila možná potenciace hematologické toxicity vyvolané chemoterapií (nejčastěji myelosuprese). U nás (stejně tak i v ostatních evropských zemích) však neexistují žádná doporučení, která by přesněji určila způsob zahájení podání dexrazoxanu, proto se opírají o níže uvedené doporučené postupy. V návaznosti na CCOPGI (The Cancer Care Ontario Practice Guideline Initiative) a ASCO (The American Society of Clinical Oncology, aktualizace 2002) doporučené postupy v USA se indikuje podání dexrazoxanu u pacientek s metastazujícím karcinomem prsu nebo u pacientů s jinými malignitami, kteří obdrželi více než 300 mg/m² doxorubicinu (u epirubicinu 480 mg/m²). V přehledu Swain *et al*. však navrhuje podání dexrazoxanu již při kumulativní dávce doxorubicinu 150-300 mg/m², aby se zabránilo vzniku poškození srdce, které se může objevit již při relativně nízkých dávkách antracyklinů (Gianni *et al*, 2008; Swain & Vici, 2004). Nověji dle „guidelines“ NCCN (The National Comprehensive

Cancer Network) se u pacientů, kterým bylo diagnostikováno symptomatické srdeční selhání či snížená ejekční frakce $>45\%$, se doporučuje vysazení antracyklinů nebo zvažení podání liposomálních antracyklinů či dexrazoxanu (2007). Ačkoliv novější studie potvrzují významný kardioprotektivní účinek dexrazoxanu bez snížení protinádorového účinku i při léčbě dětských malignit (Lipshultz *et al*, 2008), pro tyto indikace zatím nejsou dostupná žádná klinická doporučení.

Přestože dexrazoxan je dosud jediným léčivem, u něhož byl jasně prokázán protektivní účinek vůči chronické kardiotoxicitě navozené antracykliny v preklinických i v klinických studiích (Cvetkovic & Scott, 2005), je v současnosti podáván pouze u malého procenta pacientů podstupujících léčbu s cytostatiky (Swain & Vici, 2004). Jedním z důvodů je existence sporných studií, které se zaměřují na možné interference dexrazoxanu s protinádorovým účinkem antracyklinů. V jedné z multicentrických studií (Swain *et al*, 1997b) pacienti, kterým byl podáván i dexrazoxan, reagovali na cytostatickou léčbu méně než pacienti bez kardioprotektiva (47 vs 61 % hodnoceno podle odpovědi na léčbu, objective response rate, ORR). Později v přehledu Swain *et al*. byly výsledky (ORR) porovnány s ostatními studiemi, což vedlo ke konstatování, že míra protinádorové odpovědi v dexrazoxanové skupině byla velmi podobná obvykle pozorovaným hodnotám, avšak v placebo skupině byla z neznámého důvodu odpověď vyšší (Swain & Vici, 2004). Z toho vyplývá, že dexrazoxan ani v této studii neinterferuje s protinádorovou odpovědí cytostatika. Toto stanovisko potvrzují i ostatní klinické studie, kde dexrazoxan neovlivňoval protinádorový účinek ani další parametry charakterizující odpověď nádoru, a stejně tak 2 metaanalýzy šesti randomizovaných studií (Seymour *et al*, 1999; van Dalen *et al*, 2006) (tab. 6).

Dalším důvodem nízkého užívání dexrazoxanu v profylaxi antracyklinové kardiomyopatie je incidence nežádoucích účinků (především myelosuprese), která se vyskytuje až při relativně vysokých dávkách léčiva. Je vysvětlována inhibicí topoisomerázy II a/nebo inhibicí ribonukleotidreduktázy (enzym důležitý pro syntézu DNA). Podání dexrazoxanu může navíc vést k synergismu, protože myelosuprese je jedním z typických toxických účinků většiny cytostatik. Dalším faktorem, který také významně limituje jeho užití, je jeho vysoká cena. Z dat dvou farmakoekonomických analýz vycházejících z údajů klinických studií se však zdá, že léčba dexrazoxanem je u pacientů podstupujících antracyklinovou chemoterapii cenově efektivní (Cvetkovic & Scott, 2005).

Tab. 6 Výsledky dvou metaanalýz. PFS - Progression Free Survival (interval mezi dosažením kompletní remise až po dosažení prvních příznaků relapsu), ORR - Objective Response Rate (procento pacientů, u kterých je sledována *kompletní odpověď*, tj. vymizení všech měřitelných známek onemocnění, zjištěné 2 pozorováními během 4 týdnů, nebo *částečná odpověď*, tj. $\geq 50\%$ ústup měřitelných změn během 4 týdnů), RR – „relative risk“, HR – “hazard ratio“.

Výsledek studií	Metaanalýza	
	van Dalen (n=1013)	Seymour (n=1070)
Srdeční selhání (sub/klinické) ^a	0,28	0,24
ORR ^b	0,83	0,92
PFS ^c	1,13	-
Celkové přežití ^c	1,07	-

^a RR <1,0 určuje výhodu ve prospěch dexrazoxanu
^b RR <1,0 určuje výhodu ve prospěch antracyklinové skupiny
^c HR <1,0 určuje pravděpodobnější výskyt v antracyklinové skupině

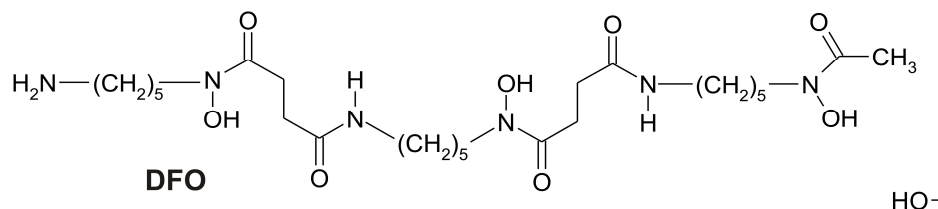
Dexrazoxan byl také zkoumán pro možnou protekci jiných nežádoucích účinků navozených antracykliny. Intravenózní podání dexrazoxanu např. významně snižovalo velikost tkáňového poškození po subkutanním podání doxorubicinu (Jensen *et al*, 2003; Langer, 2007). U hlodavců a králíků, kde antracykliny působí nefrotoxicky, dexrazoxan významně zmírnil nefrotoxicitu (glomerulární vakuolizace, tubulární atrofie, intersticiální lymfocytární infiltrace) navozenou chronickým podáváním doxorubicinu (Dardir *et al*, 1989; Herman *et al*, 1988a). Dexrazoxan (100 mg/kg) také omezil vznik akutního nefrotického syndromu vyvolaného jednorázovou aplikací doxorubicinu (Zima *et al*, 1998). V klinické praxi však nefrotoxicita nebývá závažnější komplikací chemoterapie obsahující antracykliny.

3.1.2.2. Další chelátory železa

Z důvodu omezení spojených s podáváním dexrazoxanu jsou v současnosti intenzivně zkoumány další látky ze skupiny chelátorů železa. Zatím se však nepodařilo nalézt další chelatačně účinnou látku, která by měla vhodnější, nebo alespoň podobné vlastnosti jako dexrazoxan. Důvodem je především nedostatek vhodných biokompatibilních chelátorů železa, které by vykazovaly selektivní účinek vůči iontům železa a nízkou toxicitu. Proto mnoho z běžně dostupných komplexotvorných látek nemůže v humánní farmakoterapii najít uplatnění. Mezi základní požadavky na chelátor použitelný v terapii patří jeho dostatečná lipofilita umožňující vstup látky do buněk, vysoká selektivita k iontům železa a naopak nízká afinita k ostatním biogenním prvkům (zejm. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} aj.) a v neposlední řadě také nízká redoxní aktivita vzniklých komplexů. Vhodným příkladem je např. schopnost chelatačního činidla EDTA vázat také

dvojmocné železo, a tak následně tvořit redoxně aktivní komplexy EDTA-Fe²⁺. Proto jsou hledány takové látky, které váží a udržují železo v trojmocné formě, které nemůže vstoupit do Fentonovy reakce.

Nejdéle známým a nejvíce studovaným chelátorem železa je **deferoxamin** (DFO, obr. 6). Deferoxamin je siderofor odvozený strukturně od kyseliny trihydroxámové, jenž byl v roce 1960 izolovaný ze *Streptomyces pilosus* (Bickel et al, 1960). Řadí se mezi chelátory s vysokou afinitu k trojvaznému železu, se kterými tvoří komplexy 1:1 (pFe³⁺ 26,6). Určitou afinitu vykazuje DFO také pro jiné trojmocné kationty, zejména pro Al³⁺. DFO se ve formě mesylátu využívá v terapii stavů spojených s patologickou kumulací železa v organismu (tzv. přetížením železem), např. při beta-talasemii. Dávkovací rozmezí je obvykle 20-60 mg/kg tělesné hmotnosti.



Obr. 6. Chemická struktura deferoxaminu.

V podmínkách *in vitro* (u buněk přetížených železem) bylo prokázáno protektivní působení deferoxaminu před poškozením kardiomyocytů navozeném doxorubicinem (Hershko *et al*, 1993). Později experimentální *in vitro* studie naznačily jistý kardioprotektivní účinek DFO i u stavů s fyziologickými zásobami železa (Link *et al*, 1996). Skupina Voest *et al*. porovnávala účinky deferoxaminu a dexrazoxanu na akutním modelu, kde byly izolované myši sítě exponovány doxorubicinem. Deferoxamin v koncentraci 200 μmol/l vedl k vyššímu protektivnímu účinku než dexrazoxan, naopak při vyšších koncentracích (500 μmol/l) byl účinnější dexrazoxan (Voest *et al*, 1994). Na možný kardioprotektivní účinek poukazovala také studie provedená na akutním modelu kardiotoxicity navozené jedinou aplikací velmi vysoké dávky doxorubicinu (25 mg/kg) u potkana (Saad *et al*, 2001). Na druhou stranu ve studii, kde byl srovnáván účinek deferoxaminu a dexrazoxanu na chronickém modelu antracyklinové kardiotoxicity u potkana, byl pozorován vyšší stupeň protekce po podání modelového kardioprotektiva dexrazoxanu. Na rozdíl od DFO zde dexrazoxan snížil předčasnou mortalitu a poškození myokardu (Herman *et al*, 1994). Přestože obě látky se řadí mezi velice účinné chelátory železa v *in vitro* podmínkách, tato studie poukazuje na rozdíly v *in vivo* protekci, které

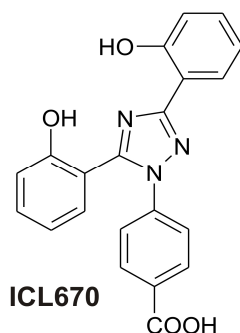
pravděpodobně vyplývají z jejich odlišné biologické dostupnosti.

Zásadní nevýhodou deferoxaminu je jeho hydrofilní charakter, poměrně velká molekulová hmotnost, a tím daný nedostatečný prostup přes buněčné membrány a snížená dostupnost k intracelulárnímu „labile iron pool“ (Cable & Lloyd, 1999). Vedle vysoké hydrofility se deferoxamin vyznačuje krátkým biologickým poločasem eliminace (5-10 min), proto se musí podávat kontinuální infúzí. Dále je jeho dlouhodobé podávání spojeno s vyšším rizikem vzniku závažných nežádoucích účinků (viz tab. 7) a terapie je poměrně finančně náročná.

Deferasirox (ICL670, obr. 7) je novější syntetický perorální chelátor železa ze skupiny N-bis-hydroxyfenyltriazolů (Exjade[®], Novartis Oncology). V současnosti je v klinickém hodnocení pro prevenci a léčbu komplikací vzniklých v důsledku přetížení železem u pacientů s beta-talasemií. Tato látka tvoří s Fe³⁺ stabilní komplexy v poměru 2:1. I u deferasiroxu bylo studováno, zda by se jeho chelatační účinky a vysoká lipofilita nedaly uplatnit i v jiné oblasti než u stavů s přetížením železem (tab. 7) (Tam *et al*, 2003). Jediná dostupná studie provedená na izolovaných neonatálních kardiomyocytech bohužel ukazuje, že deferasirox nezabraňuje toxickému působení, naopak cytotoxicitu doxorubicinu zvyšuje. Toxický účinek na kardiomyocyty je vysvětlován odstraňováním nebo neposkytováním železa důležitým enzymům, které tyto ionty potřebují pro svoji správnou funkci (Hasinoff *et al*, 2003a).

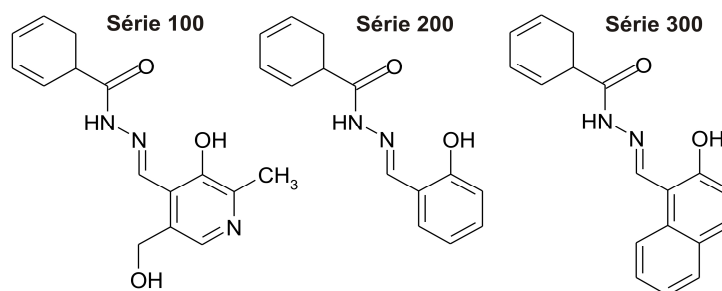
Tab. 7. Srovnání deferoxaminu a deferasiroxu.

	Deferoxamin	Deferasirox
Cesta podání	Parenterální, obvykle i.v, s.c. infuze	Perorální
Biologický poločas eliminace	Krátký (minuty)	Dlouhý (8-16 hod)
Vaznost chelátorů	Šestivazný	Trojvazný
Lipofilita	Hydrofilní (log P=-2,5)	Vysoce lipofilní (log P=3,8)
Významné nežádoucí účinky	Při vysokých dávkách: oto- a retinotoxicita, kostní poruchy a poruchy růstu, plicní syndrom, lokální kožní reakce	GIT obtíže, průjem na začátku léčby, mírně zvýšená hladina kreatininu
Schopnost chelatace intracelulárního železa v srdci a v jiných tkáních	Pravděpodobně nižší než u deferipronu a deferasiroxu	Nedostupná klinická data; slibná data z <i>in vitro</i> studií



Obr. 7. Chemická struktura deferasiroxu.

Velká pozornost byla také v posledních letech soustředěna na další skupinu **chelátorů železa odvozených od aroylhydrazonů**. Tyto látky byly vyvinuty laboratoří prof. Poňky. Jako první byl objeven chelatační účinek pyridoxal isonikotinoyl hydrazonu (PIH) - kondenzačního produktu pyridoxalu (vitamin B6) a hydrazidu kyseliny isonikotinové, který dnes představuje „mateřskou“ látku velké skupiny analogů (Ponka *et al*, 1979). Za účelem zvýšení účinku byly syntetizovány tři základní série jeho analogů, které jsou odvozeny od pyridoxal benzoyl hydrazonu (série 100), salicylaldehyd benzoyl hydrazonu (série 200) a 2-hydroxy-1-naftylaldehyd benzoyl hydrazonu (série 300) (obr. 8).



Obr. 8. Chemická struktura analogů PIH. Série 100 – pyridoxal benzoyl hydrazony, série 200 - salicylaldehyd benzoyl hydrazony, série 300 - 2-hydroxy-1-naftylaldehyd benzoyl hydrazony.

Jedním z vysoce účinných chelátorů železa, který se svými vlastnostmi podobá PIH, je pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazon (o-108) a salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (SIH). Jedná se o lipofilní, při fyziologickém pH neutrální, a proto intracelulárně snadno prostupující látky, které mají vysokou afinitou k trojmocnému železu (pFe^{3+} 23,2) (Buss *et al*, 2002). Za fyziologických podmínek mohou tvořit komplexy také se Zn^{2+} , Pb^{2+} , nikoliv však s fyziologicky významnými kationty, jako jsou Ca^{2+} a Mg^{2+} (Hoy *et al*, 1979).

Z *in vitro* a *in vivo* studií vyplývá, že PIH chelatuje intracelulární železo ve fibroblastech, reticulocytech, hepatocytech, v makrofázích přesycených nehemovým Fe^{3+} aj. (Buss *et al*, 2002). Poňka a jeho kolektiv prokázali, že PIH mobilizuje ionty železa z v mnohem větší míře než DFO a také podstatně účinněji inhibuje intracelulární příjem

železa z transferinu (Ponka *et al*, 1979). V *in vivo* pokusech byla potvrzena schopnost PIH chelátovat železo v parenchymatózních orgánech i v buňkách retikuloendoteliárního systému a zvýšené exkrece železa stolicí (Buss *et al*, 2002).

Byly provedeny studie, které prokázaly schopnost chelátorů z této skupiny blokovat produkci hydroxylových radikálů (Hermes-Lima *et al*, 2000; Hermes-Lima *et al*, 1999). PIH bránil (jako účinný antioxidant) poruše neuroretinální funkce navozené oxidačním stresem, účinně inhiboval peroxidaci lipidů a působil proti elektrofyziologickým poruchám sítnice u novorozených selat (Bhattacharya *et al*, 1997). V porovnání s PIH nebo deferoxaminem se SIH zdá být dokonce ještě účinnějším antioxidantem, což bylo potvrzeno i na izolovaných kardiomyocytech vystavených oxidačnímu stresu indukovaným 100 $\mu\text{mol/l}$ peroxidu vodíku (Horackova *et al*, 2000). Na modelu potkaních embryonálních kardiomyoblastů byla prokázána významná protektivní účinnost chelátoru SIH při inkubaci s 100 $\mu\text{mol/l}$ peroxidem vodíku. SIH v koncentracích 3–10 $\mu\text{mol/l}$ zcela zabránil depolarizaci mitochondrií, změnám v buněčné morfologii a navození apoptózy, tak i nekrózy vyvolaných oxidačním stresem (Simunek *et al*, 2005a).

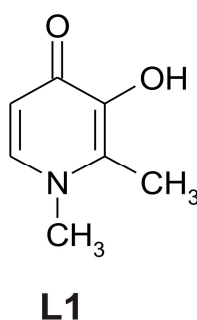
Na nádorových buněčných liniích a tumorech implantovaných pokusným zvířatům byly dále prokázány i antiproliferativní účinky PIH a jeho analogů. Tato analoga relativně selektivně inhibovala proliferaci a indukovala apoptotickou buněčnou smrt nádorových buněk a to inhibicí ribonukleotidreduktázy (enzymu klíčového pro syntézu DNA) (Buss *et al*, 2004; Lovejoy & Richardson, 2003; Yu *et al*, 2006).

Tyto chelátory se také ukázaly být zajímavou skupinou pro užití v oblasti kardioprotekce vůči srdečnímu poškození navozenému antracykliny. Naše skupina se zaměřila na možnou farmakologickou kardioprotekci především pomocí PIH (25 a 50 mg/kg, i.p., podaný 60 minut před daunorubicinem), o-108 (10 a 25 mg/kg, i.p., podaný 30 minut před daunorubicinem) a SIH (0,5, 1 a 2,5 mg/kg, i.v., podaný 10 minut před daunorubicinem) vůči kardiotoxické navozené opakovaným podáváním daunorubicinu (3 mg/kg, i.v.). U všech látek z této skupiny byl zaznamenán významný kardioprotektivní účinek po podání nižších dávek, nicméně po 2,5-násobném zvýšení dávek chelátorů byla překvapivě popsána významná předčasná mortalita a u přeživších zvířat vymizení kardioprotektivního účinku. Tato neobvyklá dávková závislost kardioprotektivního účinku byla pozorována u všech aroylhydrazonů, a to bez ohledu na rozdíly v jejich struktuře, způsob podání a časový odstup od podání cytostatika (Simunek *et al*, 2005b; Sterba *et al*, 2007a; Sterba *et al*, 2006). Možným vysvětlením tohoto nálezu se nabízí, že u těchto látek byly zjištěny velmi krátké biologické poločasy

(Kovarikova *et al*, 2006; Kovarikova *et al*, 2005).

Studie s aroylhydrazony se řadí k nemnoha pracím (vyjma studií s dexrazoxanem) provedených na modelu chronické kardiotoxicity, který nese shodné základní morfologické i funkční rysy s chronickou kardiotoxicitou pozorovanou v klinické praxi (Gersl & Hrdina, 1994; Simunek *et al*, 2004). Proto i zjištěný dílčí, ale stále statisticky významný protektivní účinek těchto selektivních chelátorů železa podporuje teorii rozvoje antracyklinové kardiotoxicity, tedy že významnou roli v této patogenezi hrají volné ionty železa.

Další zajímavou látkou ze skupiny chelátorů železa se nabízí být klinicky užívaný **deferipron** (L1, obr. 6), který byl poprvé podán pacientovi v roce 1987. Jedná se o relativně malou lipofilní molekulu, která tvoří s volnými ionty železa stabilní komplexy 3:1 ($pK_{Fe^{3+}}$ 19,4) (Kontoghiorghes *et al*, 2004; Tam *et al*, 2003). Kromě Fe^{3+} váže i další kovy (Al^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) s výjimkou Ca^{2+} a Mg^{2+} . Komplexy Fe^{3+} -L1 jsou odstraňovány především renální exkrecí, přičemž množství vyloučeného železa závisí na dávce a stupni přetížení organismu železem. Po p.o. podání se deferipron dobře a rychle vstřebává (za 5-10 min je stanoven v krvi) a c_{max} je dosaženo přibližně za 45-60 min. Vazba na plazmatické proteiny je nižší než 10 %. U lidí, kterým bylo p.o. podáno toto léčivo v dávce 25 mg/kg v 8 hodinovém intervalu, byl vypočten distribuční objem na 1,34 l/kg. U lidí se L1 v játrech převážně metabolizuje glukuronidací na neúčinný konjugát (85 % podané dávky). Přibližně z 80 % se vylučuje močí, ve formě výchozí sloučeniny, konjugátu nebo ve vazbě s Fe^{3+} . Biologický poločas eliminace je 1-2,5 hodin. (Kontoghiorghes *et al*, 1990).



Obr. 9. Chemická struktura deferipronu.

V několika zemích je registrovaný (Ferriprox[®], ApoPharma Inc.) k léčbě beta-talasemie (při tzv. iron overload). V této indikaci byl vyvinut jako možná alternativa deferoxaminu z důvodu nižších finančních nákladů a možnosti snadnějšího p.o. podání.

Z klinických studií prováděných většinou na pacientech s beta-talasemií odkázaných na pravidelné krevní transfuze vyplývá, že deferipron (v dávce 75 – 100 mg/kg/den; dělený do třech dávek) snižuje přetížení organismu železem.

Deferipron rychle proniká do srdečních buněk, včetně jednotlivých intracelulárních kompartmentů (např. mitochondrie, lysosomy, jádro), což následně vede k rychlému a významnému snížení koncentrace volného železa v kardiomyocytech (Glickstein *et al*, 2006). Zároveň v mitochondriích kardiomyocytů snižuje produkci reaktivních forem kyslíku navozenou inkubací s peroxidem vodíku. Dále v klinicky relevantních koncentracích zabraňuje poruchám kontraktility vyvolaných přetížením buněk ionty železa (Glickstein *et al*, 2006). Toto tvrzení podporuje i klinická studie, kde u pacientů léčených na beta-talasemii deferipron významně redukoval přetížení myokardu ionty železa a zachoval ejekční frakci levé komory v porovnání s deferoxaminem (Anderson *et al*, 2002). Ve studii Link *et al*. deferipron, stejně jako deferoxamin, eliminoval poškození buněčné kultury kardiomyocytů přetížením železem a vedl ke zmírnění doxorubicinové toxicity (Link *et al*, 1996). Podobně v *in vitro* podmínkách byla zjištěna protekce izolovaných neonatálních potkaních kardiomyocytů deferipronem vůči poškození navozeném doxorubicinem (Barnabe *et al*, 2002). Protekce bylo docíleno preinkubací myocytů deferipronem v koncentracích 2 a 5 $\mu\text{mol/l}$, které jsou snadno dosažitelné v *in vivo* podmínkách p. o. podáním této látky, aniž by se projevil známky toxicity. Ve studii na izolovaných spontánně bijících síních deferipron zabránil významnému snížení kontraktility síní, změnám v morfologii mitochondrií, oxidačnímu poškození navozené inkubací s 0,03 mmol/l doxorubicinem (Xu *et al*, 2006) (tab. 8). Navíc ve studii Yasumoto *et al*. deferipron sám vykazoval antitumorózní aktivitu na nádorových buněčných liniích (např. HSC-2, HL-60) (Yasumoto *et al*, 2004).

Tab. 8. Přehled jednotlivých studií zaměřující se na kardioprotekci pomocí chelátorů železa vůči antracyklinové kardiotoxicitě. LDH – laktátdehydrogenáza, CK-MB – izoforma kreatinkinázy v srdečním svalu, MDA – malondialdehyd, GSH - glutathion, SDH - sukcinátdehydrogenáza, SOD - superoxidodismutáza, DOX – doxorubicin, SHR – spontánně hypertenzní potkan.

Studie	Model	Protektce	Měřené parametry
Deferoxamin (DFO)			
(Hershko <i>et al</i> , 1993)	Potkaní kardiomyocyty	+ buňky přetížené železem - normální buňky	LDH, kontraktilita
(Herman <i>et al</i> , 1994)	Spontánně hypertenzní potkan DOX 1 mg/kg i.v. 12 apl. + DFO 50 mg/kg i.p.	-	histologie srdce, mortalita
(Voest <i>et al</i> , 1994)	Izolované myši síně 300 μM DOX + 200, 500 μM DFO	+ 200 μM - 500 μM	kontraktilita kontraktilita
(Link <i>et al</i> , 1996)	Potkaní kardiomyocyty 1 μM DOX, 0,3 mM DFO	+ normální buňky i přetížené železem	utilizace mitochondriálního palmitátu
(Saad <i>et al</i> , 2001)	Potkaní – akutní DOX 25 mg/kg i.v. + DFO /1:10/	+	CK-MB, LDH, MDA, GSH, histologie srdce
Deferasirox (ICL670)			
(Hasinoff <i>et al</i> , 2003a)	Neonatální potkaní kardiomyocyty 1,5 μM DOX, 1-100 μM ICL670	-	LDH
Aroylhydrazonové chelátory železa			
(Simunek <i>et al</i> , 2005b)	Králíci 3 mg/kg DAU i.v. 10 apl. + PIH 25 a 50 mg/kg i.p.	+ při nižší koncentraci - při vyšší koncentraci	mortalita, kontraktilita, cTnT, histologie srdce
(Sterba <i>et al</i> , 2006)	Králíci 3 mg/kg DAU i.v. 10 apl. + o-108 10 a 25 mg/kg i.p.	+ při nižší koncentraci - při vyšší koncentraci	mortalita, systolická funkce, cTnT, histologie srdce
(Sterba <i>et al</i> , 2007a)	Králíci 3 mg/kg DAU i.v. 10 apl. + SIH 0,5; 1; 2,5 mg/kg i.v.	+ při nižší koncentraci - při vyšší koncentraci	mortalita, systolická funkce, cTnT, histologie srdce
Deferipron (L1)			
(Barnabe <i>et al</i> , 2002)	Neonatální potkaní kardiomyocyty 0,6 μM DOX, 2 a 5 μM L1	+	LDH
(Link <i>et al</i> , 1996)	Neonatální potkaní kardiomyocyty 1 μM DOX, 0,3 mM L1	+ normální buňky i přetížené železem	utilizace mitochondriálního palmitátu
(Xu <i>et al</i> , 2006)	Izolované spontánně bijící síně 30 μM DOX + 0,3 a 1,2 mM L1	+	MDA, SDH, Cu,Zn-SOD, kontraktilita, histologie

4. Shrnutí literárních poznatků s ohledem na zaměření experimentální části dizertační práce

Antracyklinová cytostatika jsou stále základní součástí léčebných režimů používaných v protinádorové chemoterapii a dodnes jsou v mnoha terapeutických schématech nenahraditelná. Jejich vysoký protinádorový účinek je ovšem do značné míry znevýhodněn rizikem výskytu závažné chronické a pozdní kardiotoxicity, kterou jsou často limitujícím faktorem jejich léčby. Přestože antracyklinová kardiotoxicita je intenzivně zkoumána již několik desetiletí, přesný mechanismus jejího vzniku není objasněn. Zřejmě se jedná o multifaktoriální děj, u kterého je hlavní role tradičně přisuzována tvorbě reaktivních forem kyslíku, při jejichž vzniku hrají zásadní katalytickou roli volné ionty železa.

Protože poškození srdce navozené antracykliny může být velmi závažné a často ireverzibilní s potenciálně fatálními následky pro pacienta, je hlavní léčebnou strategií této komplikaci předcházet. Doporučuje se omezení celkové kumulativní dávky cytostatika, změna dávkovacího schématu, použití méně toxických derivátů nebo využití cílené distribuce léčiva. Značné naděje jsou vkládány do farmakologické kardioprotekce především z hlediska možnosti zabránění vzniku vysoce reaktivních hydroxylových radikálů. Nejperspektivnější se v této oblasti zdá právě chelatace volného, redoxně aktivního železa.

Přes uskutečnění řady studií s různými látkami zůstává dexrazoxan dosud jediným léčivem s jasně prokázaným protektivním účinkem vůči chronické antracyklinové kardiotoxicitě v preklinických i v klinických studiích. Protektivní účinky dexrazoxanu jsou spojovány s chelatačními vlastnostmi jeho metabolitu ADR-925, díky nimž dokáže odnímat ionty železa z komplexu s antracykliny a/nebo vázat volné ionty železa, a tak zabraňovat jejich účasti při tvorbě ROS. V současnosti je však dexrazoxan podáván pouze u malého procenta pacientů podstupujících léčbu antracykliny. Důvodem je výskyt nežádoucích účinků, které společně s vysokou cenou významně limitují jeho užití v profylaxi antracyklinové kardiomyopatie. Proto jsou v současnosti zkoumány další potenciálně protektivní látky, které by stejně jako dexrazoxan co nejefektivněji potlačily kardiotoxicitu avšak při minimálním výskytu nežádoucích účinků a současném nesnižování protinádorového účinku antracyklinů.

Na základě teoretických předpokladů a předchozích výsledků *in vitro* a *ex vivo* experimentů se vhodnou alternativou k dexrazoxanu jevil nový perorálně podávaný chelátor železa – deferipron. 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⁺. V *in vitro* podmínkách byla zjištěna protekce izolovaných neonatálních potkaních kardiomyocytů deferipronem vůči poškození navozeném doxorubicinem. Jeho kardioprotektivní potenciál byl dále podpořen studií provedenou na spontánně bijících síních exponovaných doxorubicinu. Přestože se deferipron zdá být slibným kandidátem, dosud nebyly dostupné žádné informace týkající se jeho kardioprotektivního působení na vhodném *in vivo* modelu chronické antracyklinové kardiotoxicity.

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

K lepšímu pochopení multifaktoriální patogeneze chronické antracyklinové 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 antracyklinu. 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, morfologických a dalších změn v myokardu levé komory v průběhu rozvoje chronické antracyklinové kardiotoxicity. Takové schéma pokusu by mohlo významně přispět k pochopení podstaty patogeneze chronické antracyklinové kardiotoxicity a popř. při následném vývoji nových účinných kardioprotektiv.

CÍLE PRÁCE

Cíle dizertační práce:

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

PŘEHLED POUŽITÝCH METOD

Pokusy na úrovni *in vitro*

1. Použitá léčiva

Daunorubicin (Daunoblastina, Pharmacia, Itálie) a deferipron (poskytnut firmou ApoPharma Inc., Kanada).

2. Antiproliferativní studie s buněčnou linií HL-60

Ve spolupráci s Doc. PharmDr. Tomášem Šimůnkem, Ph.D. (Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, UK v Praze) byl studován vliv deferipronu na antiproliferativní účinky daunorubicinu. K tomuto účelu byla použita lidská promyelocytární leukemická buněčná linie HL-60, která byla získána z American Type Culture Collection (ATCC, USA). Buňky byly kultivovány v médiu RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Česká republika) s 10% obsahem fetálního bovinního séra (Sigma-Aldrich, Česká republika) a 1% obsahem antibiotik (penicilin/streptomycin, PAA, Rakousko). Kultivace probíhala v inkubátoru v kontrolované atmosféře 5% CO₂ při teplotě 37°C. Každý 2. až 3. den byla kultura pasážována s konečným ředěním 10⁵ buněk/ml. Ve všech provedených pokusech byl deferipron použit v koncentracích 1-300 μmol/l. Pro společnou inkubaci chelátoru s cytostatikem byla zvolena koncentrace daunorubicinu 12 nmol/l, která v pilotních pokusech navodila 50% inhibici proliferace buněk. Na závěr pokusu byl odebrán vzorek buněčné kultury, který byl použit pro stanovení viability buněk.

3. *In vitro* model antracyklinové kardiotoxicity

Pro tyto účely byla ve spolupráci s Doc. PharmDr. Tomášem Šimůnkem, Ph.D. (Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, UK v Praze) použita buněčná linie H9c2, která je odvozená od potkaních embryonálních srdečních myoblastů a která byla získána z American Type Culture Collection (ATCC, USA). Buňky byly kultivovány v médiu DMEM s 10% obsahem fetálního telecího séra (Sigma-Aldrich, Česká republika) a 1% obsahem antibiotik (penicilin/streptomycin, PAA, Rakousko) v kontrolované atmosféře 5% CO₂ při teplotě 37°C. Buňky byly každý 3. až 5. den trypsinizovány. Pro pokusy byly použity buňky 20. až 40. generace, které byly odebrány do příslušné Petriho misky 48 hodin před pokusem. Následně byl růst buněk zastaven výměnou kultivačního média za bezsérové 24 hodin před začátkem vlastního pokusu. Ve všech provedených pokusech byl daunorubicin použit v koncentracích 0,1-3 μmol/l (n=4). Po 24-hodinové inkubaci byly buňky dvakrát omyty v ledovém PBS a po centrifugaci byla peleta buněk uchována při -80°C.

4. Stanovení viability buněk

Po odstranění média z jamek byly adherované buňky dvakrát opláchnuty pomocí PBS a poté 5 minut inkubovány s 0,25% roztokem trypsinu. K této směsi bylo následně přidáno médium DMEM s 10% obsahem fetálního telecího séra (Sigma-Aldrich, Česká republika). Po důkladném promíchání byl odebrán vzorek buněčné kultury, který byl smíchán s 0,4% roztokem trypanové modře (Sigma-Aldrich, Česká republika) v poměru 1:1. Počet přeživších (neobarvených) buněk byl zjištěn pomocí Bürkerovy komůrky pod světelným mikroskopem Mgr. Annou Vávrovou (Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, UK v Praze).

5. Hodnocení apoptózy v buněčné linii H9c2

K hodnocení apoptotické buněčné smrti v buněčné linii H9c2 byla použita imunochemická detekce mono- a oligonukleotidů pomocí komerčního kitu Cell Death Detection ELISA^{PLUS} (Roche Diagnostics, Německo). Vedle toho byla hodnocena i aktivita exekutivní kaspázy 3 a aktivita dalších kaspáz reprezentujících vnitřní cestu (kaspáza 9), vnější cestu (kaspáza 8) i cestu spojenou se ER/SR stresem (kaspáza 12). Pro pokusy spojené se stanovením aktivit kaspáz 3, 8 a 9 byly použita kultura o konečném počtu buněk $1,9 \times 10^5$, pro stanovení aktivity kaspázy 12 o počtu 3×10^6 buněk, zatímco pro stanovení fragmentace DNA bylo použito 5×10^4 buněk. Postup pro jednotlivá stanovení markerů apoptózy je blíže popsán v následujících bodech (14 b,c).

Pokusy na úrovni *in vivo*

1. Pokusná zvířata

K pokusům byli použiti králíci, Činčila velká, samci o průměrné počáteční tělesné hmotnosti 3,5 kg. Zvířata byla chována ve viváriu Lékařské fakulty v Hradci Králové za standardních laboratorních podmínek (klimatizovaný vzduch, teplota 15-21°C, vlhkost 50-60 % a 12 hodinová délka světelného dne). Zvířata měla volný přístup k pitné vodě a standardní laboratorní dietě. Zacházení se zvířaty probíhalo dle "Guide for the care and use of laboratory animals" (1996). Pokusy s laboratorními zvířaty byly schváleny Odbornou komisí na ochranu zvířat proti týrání Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze.

2. Použitá léčiva

Daunorubicin (Daunoblastina, Pharmacia, Itálie), deferipron (poskytnut firmou ApoPharma Inc., Kanada), dexrazoxan (Cardioxane, Novartis, Švýcarsko), ketamin (Narketan, Vétoquinol AG, Švýcarsko), midazolam (Midazolam Torrex; Torrex Chiesi

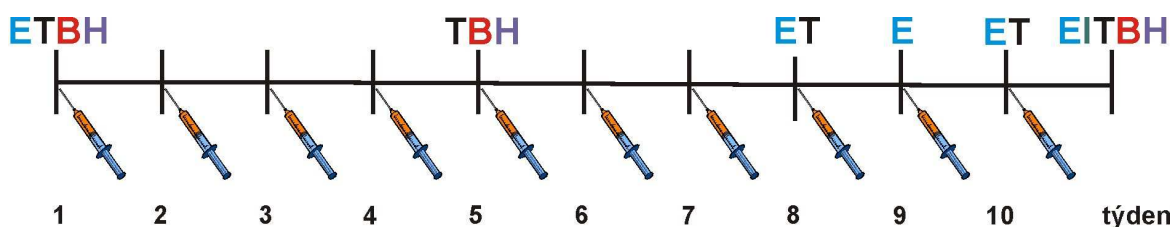
Pharma, Rakousko), pentobarbital (Sigma-Aldrich, USA) a fyziologický roztok (Natrium chloratum, Biotika, Slovenská republika).

3. Anestézie

Kombinovaná anestézie ketamin (50 mg/kg, i.m.) a midazolam (1,25 mg/kg, i.m.) byla zvolena pro aplikaci látek, odběry vzorků krve a neinvazivní hodnocení srdeční funkce. Závěrečná invazivní měření byla provedena v pentobarbitalové anestézii (30 mg/kg, i.v.).

4. Model chronické antracyklinové kardiotoxicity u králíka

Chronická antracyklinová kardiotoxicita byla navozena opakovaným podáním daunorubicinu (3 mg/kg=50 mg/m² i.v., 1x týdně) po dobu 10 týdnů. Echokardiografické měření bylo provedeno na začátku pokusu a dále v 8., 9., 10. týdnu a na konci experimentu. Vzorky krve pro stanovení základních biochemických a hematologických parametrů byly odebírány z centrální ušní artérie před 1., 5. aplikací a na konci pokusu. Koncentrace srdečního troponinu T, popř. I byly stanoveny v plazmě získané 1., 5., 8., 10. týden a na konci pokusu. Závěrečné invazivní hodnocení srdeční funkce bylo provedeno 5. až 7. den po poslední aplikaci. Na závěr pokusu byla zvířata předávkována pentobarbitalem a následně jim byly odebrány jednotlivé orgány pro další analýzy. Detailnější náčrt schématu modelu chronické antracyklinové kardiotoxicity je na obr. 10.



Obr. 10. Schéma modelu chronické antracyklinové kardiotoxicity. E - echokardiografické vyšetření, T - odběr krve ke stanovení plazmatické koncentrace troponinů, B - biochemické vyšetření krve, H - hematologické vyšetření krve, I - invazivní měření srdeční funkce.

5. Dávkovací schémata studovaných látek

Pro studium potenciálních kardioprotektivních účinků deferipronu bylo zvoleno perorální podání látky v 0,5% karboxymethylcelulóze v dávce 10 a 50 mg/kg vždy 45 minut před každou aplikací daunorubicinu. U nejvyšší dávky podané v kardioprotektivní studii (tj. 50 mg/kg) byl hodnocen i vliv samotné látky na jednotlivé kardiovaskulární parametry.

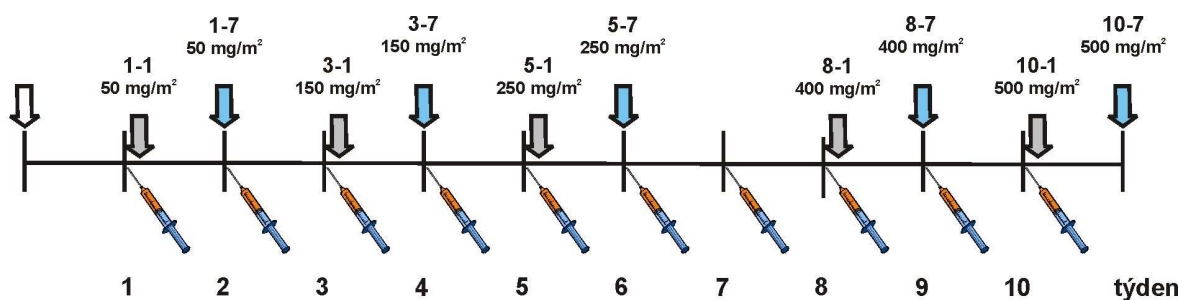
Modelové kardioprotektivum dexrazoxan byl podáván intraperitoneálně v dávce

60 mg/kg 30 minut před daunorubicinem. Všechny uvedené látky byly aplikovány jednou týdně po dobu 10 týdnů. Výsledky byly porovnány s hodnotami naměřenými u kontrolní skupiny (fyziologický roztok 1 ml/kg i.v.).

Tab. 9. Přehled studovaných skupin zvířat.

Skupina	Počet zvířat	Aplikované látky a způsob jejich podání
Kontrolní	8	fyziologický roztok 1 ml/kg, i.v.
Daunorubicinová	11	daunorubicin 3 mg/kg, i.v.
Deferipronová	6	deferipron 50 mg/kg, p.o.
L1 10 mg/kg+DAU	8	deferipron 10 mg/kg, p.o. + daunorubicin 3 mg/kg, i.v.
L1 50 mg/kg+DAU	9	deferipron 50 mg/kg, p.o. + daunorubicin 3 mg/kg, i.v.
Dexrazoxanová	8	dexrazoxan 60 mg/kg, i.p. + daunorubicin 3 mg/kg, i.v.

Pro sledování dynamiky funkčních, morfologických a jiných změn myokardu levé komory v průběhu rozvoje toxického účinku antracyklinů (tzv. „staging“) bylo utvořeno 9 skupin králíků (po n=6), kteří byli exponováni různé kumulativní dávce antracyklinu (jedna dávka představuje 3 mg/kg, tj. 50 mg/m² daunorubicinu). Zvířata byla usmrcena za 24 hodin nebo za 7 dnů po různé, předem definované, kumulativní dávce cytostatika. Výsledky byly porovnány s hodnotami naměřenými u intaktních zvířat (n=6). Detailnější náčrt schématu „stagingu“ je na obr. 11.



Obr. 11. Schéma modelu „stagingu“ chronické antracyklinové kardiotoxicity. Kontrolní skupina (bílá šipka), daunorubicinové skupiny, které reprezentují zvířata ukončená buď 24 hodin (šedivá šipka) nebo 7 dnů (modrá šipka) po dané kumulativní dávce. Kumulativní dávky daunorubicinu jsou vyjádřeny v mg/m².

6. Hodnocení celkové toxicity

V průběhu celého pokusu byly sledovány případné změny v chování zvířat, změny v příjmu pitné vody a potravy, přežívání, resp. předčasný úhyn zvířat. Jednou týdně byly zaznamenány aktuální hmotnosti králíků.

7. Měření funkčních kardiovaskulárních parametrů

a. *Neinvazivní hodnocení srdeční funkce*

Echokardiograficky byla hodnocena systolická srdeční funkce levé komory pomocí přístroje Vivid 4 (GE Medical Systems Ultrasound; GE Healthcare, Velká Británie), který byl vybaven 10 MHz vyšetřovací sondou. Bylo zvoleno parasternální zobrazení levé komory v dlouhé ose, z kterého byl kolmo na mezikomorovou přepážku pod úrovní cípů mitrální chlopně pořízen M-mód záznam. Z průměrných hodnot rozměrů srdce na konci diastoly (LKd) a systoly (LKs) získaných ze čtyř srdečních cyklů v M-mód záznamu bylo dle následujícího vzorce spočteno frakční zkrácení levé komory srdeční (FS):

$$FS(\%) = \frac{LKd - LKs}{LKd} \times 100$$

Ke stanovení jednotlivých hodnot frakčního zkrácení levé komory byly použity tři nezávislé M-mód záznamy.

b. *Invazivní hodnocení srdeční funkce*

Na konci pokusu byla katetrizována levá komora cestou *a. carotis* pomocí Micro-Tip Pressure Catheter (2,3 F, Millar Instruments, USA) připojeného k ADI Powerlab/8SP systému (ADInstruments Pty., Australia). K analýze získaných dat a vypočítání první derivace maximálního vzestupu tlaku v levé komoře v isovolumické fázi systoly (tzv. indexu dP/dt_{max}) byl použit program Chart 5.4.2. (ADInstruments Pty., Australia). Současně byl zaznamenáván průměrný tlak krve v *a. femoralis* měřený krvavou cestou prostřednictvím polyethylenové kanyly naplněné heparinizovaným fyziologickým roztokem a připojené k ADI Powerlab/8SP systému. Kromě uvedených parametrů byla hodnocena i srdeční frekvence.

8. Stanovení srdečních troponinů T a I

Koncentrace troponinu T a I byly stanoveny v heparinizované plazmě pomocí Elecsys Troponin T STAT Immunoassay (Roche Diagnostics, Švýcarsko), popř. pomocí ADV AxSYM troponin I Immunoassay (Abbott Laboratories, USA) na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice v Hradci Králové.

9. Hematologické a biochemické vyšetření krve

V odebrané krvi byly stanoveny na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice v Hradci Králové vybrané biochemické parametry (např. kreatinin, urea, ALT, AST atd.) pomocí automatického analyzátoru (Hitachi 737, Hitachi, Japonsko).

Dále byla provedena i standardní hematologická analýza z odebrané plazmy

na Ústavu klinické hematologie Fakultní nemocnice v Hradci Králové pomocí přístroje Coulter T890 (Beckman Coulter, USA).

10. 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, případně byla sledována přítomnost makroskopicky zřetelných abnormalit. Odebrané srdce bylo omyto a krátce retrográdně perfundováno ledovým fyziologickým roztokem. Byl pořízen transversální řez pravou a levou komorou srdce pod úrovní atrioventrikulárního septa. Blok srdeční tkáně byl společně s dalšími odebranými částmi orgánů (játra, ledvina) použit pro histologické zpracování. Zbývající část levé komory byla šokově zmrazena a následně homogenizována v tekutém dusíku a uchována při -80°C pro následující analýzy.

11. Histologické vyšetření srdce a vybraných orgánů

Odebrané tkáně byly fixovány po dobu 3 dnů ve 4% neutrálním formaldehydu. Po zalití do parafinu byly připraveny série řezů o tloušťce 6 μm . V případě srdce byly první dva řezy obarveny hematoxylin-eosinem a Massonovým modrým trichromem, popř. 3., 6. a 9. řez z odebraného bloku levé komory byl použit pro značení TUNEL metodou (Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP Nick End Labeling, viz níže). Pro hodnocení přítomnosti kolagenu byla vybrána technika Picro-sirius Red s použitím polarizovaného světla. Histologická vyšetření byla provedena Doc. MUDr. Yvonou Mazurovou, CSc. na Ústavu histologie a embryologie Lékařské fakulty v Hradci Králové. Reprezentativní mikrofotografie byly zhotoveny pomocí programu MicroImage 4.51 (Media Cybernetics, Laboratory Imaging, Česká republika).

12. Hodnocení kolagenu pomocí techniky Picro-sirius Red

Značení bylo provedeno na histologických parafinových řezech myokardu. Řezy byly zbaveny parafinu a zavodněny. Následně byla jádra kardiomyocytů obarvena Weigertovým hematoxylinem. Po 8 minutové inkubaci byly řezy omyty vodou a hodinu inkubovány s Picro-sirius Red, což je směs složená ze Sirius Red F3B (Sigma-Aldrich, Česká republika) a nasyceného roztoku kyseliny pikrové. Řezy byly dvakrát omyty vodou s přídavkem kyseliny octové. Dále následovalo odvodnění pomocí koncentrovaného ethanolu, projasnění v xylenu a zamontování do DPX (Sigma-Aldrich, Česká republika). Při použití světelné mikroskopie byl kolagen zobrazen červeně na světle žlutém pozadí. Pokud bylo zvoleno polarizované světlo, silná kolagenní vlákna byla žlutá až oranžová, zatímco tenčí vlákna byla pozorována jako zelená.

13. Stanovení kolagenního profilu levé komory

Stanovení kolagenního profilu bylo provedeno doc. MUDr. Michaelou Adamcovou, Ph.D. na Ústavu fyziologie Lékařské fakulty v Hradci Králové. Nejprve byly izolovány jednotlivé frakce proteinů pomocí pufrů o stoupající iontové síle (Pelouch *et al.*, 1993). V první fázi se ke vzorku myokardu levé komory (přibližně 50 mg tkáně) přidal pufr obsahující 0,1mol/l K_2HPO_4 , 0,1mol/l KH_2PO_4 , 10 mmol/l EDTA a 1% Triton X-100 (pH 7,4). Směs byla 2 hodiny míchána při 4°C a následně centrifugována (8 000 x g, 10 minut, 4°C). Po odstranění supernatantu byl k sedimentu přidán pufr složený z 50mmol/l Tris a 0,9mol/l NaCl o pH 7,5. Směs byla přes noc míchána při 4°C a následně centrifugována (8 000 x g, 10 minut, 4°C). V druhé fázi byla peleta krátce promyta 0,5mol/l kyselinou octovou a následně extrahována směsí tvořenou 0,5mol/l kyselinou octovou a pepsinem. Směs byla opět přes noc míchána při 4°C a následně centrifugována (10 000 x g, 10 minut, 4°C). Takto byl získán supernatant, který představoval rozpustnou frakci kolagenních proteinů. Ke zbývající peletě byl přidán 1,25mol/l hydroxid sodný. Vzorek byl 30 minut míchán a poté dvakrát po dobu 10 minut povařen při 105°C. Takto byla získána frakce nerozpustných kolagenních proteinů. Pro stanovení koncentrace hydroxyprolinu bylo odebráno z každé frakce 50 μ l vzorku, který byl sušen při teplotě do 100°C. Poté bylo přidáno 50 μ l hydroxidu sodného (4 mol/l) a vzorek byl 10 minut temperován do teploty 120°C. Následně byl vzorek neutralizován přídatkem 1,4mol/l kyseliny citrónové. Po přidání 1 ml chloraminu T se reakční směs nechala 20 minut stát při pokojové teplotě. Následně byl přidán roztok složený z p-dimethylaminobenzaldehydu, n-propanolu a 70% $HClO_4$. Směs byla 15 minut inkubována ve vodní lázni při 65°C. Ve vzorcích byla následně změřena absorbance při 550 nm.

14. Hodnocení apoptotické buněčné smrti

a. TUNEL Assay

Komerční kit In situ Cell Death Detection Kit AP (Roche Diagnostics, Švýcarsko) byl použit pro značení TUNEL metodou. Značení bylo provedeno na třech přesně definovaných histologických řezech myokardem (viz bod 11) s předem definovanou vzdáleností od sebe (42 μ m). Řezy byly zbaveny parafinu, zavodněny a promyty destilovanou vodou a roztokem PBS s 0,1% Triton X-100. Řezy byly 15 minut permeabilizovány roztokem proteinázy K (Roche Applied Science, Německo) při teplotě 37°C. Po opakovaném promytí v PBS se řezy inkubovaly ve vlhké komůrce při teplotě

37°C s TUNEL Reaction Mixture. V tomto kroku došlo působením terminální deoxynukleotidyltransferázy k navázání fluoresceinem značených nukleotidů na 3'-OH konce DNA fragmentů. Paralelně byla připravena negativní kontrola, která se odlišovala nepřítomností transferázy v detekčním roztoku. Řezy byly třikrát opláchnuty v PBS a v Tris pufru o výsledném pH 7,4. Fluoresceinem značené nukleotidy byly následně detekovány 30 minutovou inkubací s alkalickou fosfatázou konjugovanou s anti-fluoresceinovou protilátkou při teplotě 37°C. Po omytí Tris pufrům o pH 9,5 byly nukleotidy vizualizovány pomocí chromogenu NBT/BCIP (Boehringer, Německo). Intenzita zbarvení byla kontrolována pod mikroskopem. Na závěr byly řezy omyty destilovanou vodou a slabě dobarveny 1% vodným roztokem eosinu. Dále následovalo standardní histochemické zpracování (odvodnění, projasnění a zamontování). Touto metodou byla jádra apoptotických buněk zbarvena modře. Značení TUNEL metodou bylo provedeno ve spolupráci s Doc. MUDr. Yvonou Mazurovou, CSc. na Ústavu histologie a embryologie Lékařské fakulty v Hradci Králové.

Celková plocha řezu byla rozdělena do jednotlivých polí a obraz získaný mikroskopem Olympus AX7 (celkové zvětšení 200x) byl snímán digitální kamerou Pixelink PL-A642 (Vitana Corp., Kanada). Počet TUNEL pozitivních jader na každém řezu byl spočten manuálně ve 20 polích reprezentujících nejméně 3,7 mm² tkáně levé komory. Jednotlivá pole byla vybrána na základě náhodně vybraných čísel statistickým softwarem SigmaStat 3.5 (SPSS Inc., USA). Kvantifikace byla provedena pomocí programu NIS-Elements (Laboratory Imaging, Česká republika), přičemž výsledný počet TUNEL pozitivních jader byl vztažen na mm² tkáně levé komory.

b. Cell Death Detection assay

Fragmentace DNA byla stanovena v myokardu levé komory (popř. v buněčné kultuře H9c2) za použití komerčního setu Cell Death Detection ELISA^{PLUS} kit (Roche Diagnostics, Německo). Vzorky (přibližně 50 mg tkáně nebo 5 x 10⁴ buněk) byly homogenizovány pomocí ručního minimixéru (Roth, Německo) v přiloženém Lysis Buffer při 15°C. Po 30 minutách byly vzorky centrifugovány (2 000 x g, 10 minut, 15°C). Získaný supernant se naředil příslušným množstvím Lysis Buffer (v případě myokardu 1,2x, u buněk 5x). Pro vlastní analýzu bylo použito 20 µl vzorku, které se napipetovalo do přiložené 96-jamkové destičky. Do každé jamky se přidalo 80 µl směsi složené z biotinem značené myší monoklonální protilátky proti histonu a z myší monoklonální protilátky proti DNA konjugované s peroxidázou. Vzorky byly následně inkubovány

2 hodiny za mírného míchání při pokojové teplotě. Po odstranění roztoku byly jamky opakovaně promyty přiloženým Incubation Buffer. Po pečlivém odstranění promývacího roztoku se do jamek přidalo 100 µl ABTS roztoku. Po 10 minutové inkubaci byla absorbance měřena při vlnové délce 405 nm pomocí Microplate Reader Model 680 (BioRad Laboratories Inc., USA). Výsledná absorbance byla vztažena na koncentraci proteinu stanovenou v každém vzorku. Měření bylo provedeno v duplikátu.

c. Stanovení aktivity jednotlivých kaspáz v myokardu pokusných zvířat

Aktivita jednotlivých kaspáz byly stanoveny v myokardu levé komory (popř. v buněčné kultuře H9c2) za použití příslušných komerčních kitů. Vzorky byly extrahovány na ledu v komerčním pufru (BioVision, USA) za použití ultrazvukového homogenizátoru (Hielscher - Ultrasound Technology, USA) a termomixeru (Eppendorf, USA). Po 20 minutách byly vzorky centrifugovány (14 000 x g, 10 minut, 4°C). Aktivita kaspázy 12 byla stanovena pomocí Caspase-12 Fluorometric Assay Kit (Biovision, USA). Ke každému vzorku byl přidán v poměru 1:8 ledový 2X Reaction Buffer obsahující 10 mM DTT. Vzorky byly následně 120 minut inkubovány s 5 µl substrátu ATAD-AFC při 37°C. Aktivita kaspázy 12 byla měřena fluorometricky s užitím 400 nm excitačního filtru a 505 nm emisního filtru (Tecan InfiniteTM 200, Švýcarsko). Aktivita kaspázy 3/7, 8 a 9 byla stanovena pomocí příslušných Caspase-Glo Assays (Promega, Velká Británie) ve spolupráci s Mgr. Pavlínou Haškovou (Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, UK v Praze). V tomto případě byl ke každému vzorku přidán v poměru 1:1 substrát pro příslušnou kaspázu. Aktivita kaspázy 3/7, 8 a 9 byla měřena po 30 minutové inkubaci s užitím luminiscenční detekce (Tecan InfiniteTM 200, Švýcarsko). Fluorescenční a luminiscenční jednotky (FU a LU) byly vztaženy na koncentraci proteinu stanovenou v každém vzorku. Na závěr výsledné aktivity kaspáz byly dále vztaženy k průměrné hodnotě stanovené u kontrolní skupiny. Všechna měření byla provedena v duplikátu.

15. Hodnocení oxidačního stresu

a. Stanovení celkového malondialdehydu v myokardu pokusných zvířat

Ke každému vzorku z myokardu levé komory (přibližně 70 mg tkáně) bylo přidáno 500 µl RIPA pufru. Vzorky byly homogenizovány pomocí Ultra Turrax (IKA, Německo) a poté 2 hodiny inkubovány na ledu. Během inkubace byly v 15 minutových intervalech vzorky protaženy injekční stříkačkou opatřenou růžovou jehlou. Po centrifugaci (1 000 x g, 10 minut, 4°C) byl odebrán supernatant, který byl použit pro analýzu provedenou dle Pilz et al. (Pilz *et al*, 2000) s malou obměnou v postupu. Vlastní analýza byla

realizována Ing. Milošem Hrochem na Ústavu farmakologie Lékařské fakulty v Hradci Králové. Získaný supernatant (250 µl) byl 30 minut hydrolyzován s 50 µl hydroxidu sodného (6 mol/l) při 60°C. Po ochlazení proběhla deproteinizace vzorku 125 µl kyseliny chloristé 35% (v/v) a vzorky byly centrifugovány (23 000 x g, 10 minut, 4°C). Následně byl ve tmě supernatant derivatizován přidávkem 25 µl 2,4-dinitrofenylhydrazinu (5 mmol/l). Po 10 minutách bylo odebráno 30 µl roztoku k vlastní analýze pomocí HPLC systému (Shimadzu, Japonsko). Během analýzy byla použita stacionární fáze EC Nucleosil C₁₈ 125 x 4,6 mm/5 µm (Macherey-Nagel, Německo) a předkolona CC Nucleosil C₁₈ 8 x 4,0 mm/5 µm (Macherey-Nagel, Německo). Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitrilu, vody a kyselina octové v poměru 380:620:2 (v/v/v) o výsledném pH 3,4. Rychlost průtoku byla 1,0 ml/min a UV detektor byl nastaven na 310 nm. Výsledné množství malondialdehydu bylo vztaženo na koncentraci proteinu stanovenou ve vzorku.

b. Imunohistochemické stanovení 4-hydroxynonenalu v myokardu levé komory

4-hydroxynonenal (4-HNE) byl vybrán jako další marker peroxidace lipidů. Parafinové řezy myokardu byly zbaveny parafinu a zavodněny. Před vlastním barvením byly řezy 20 minut inkubovány v 0,6% peroxidu vodíku pro potlačení vlivu nespecifické reakce endogenních peroxidáz s chromogenem. Následně byly řezy opakovaně inkubovány v mikrovlnné troubě (800 W) s citrátovým pufrům o výsledném pH 6,0. Po ochlazení byly řezy opakovaně omyty v PBS a 20 minut inkubovány s neimunním sérem (Normal Donkey Serum, ředění 1:20, Jackson Immuno Res., USA) při pokojové teplotě. Řezy byly dále značeny myší monoklonální protilátkou proti 4-HNE (Oxis International, USA, ředění 1:40), přičemž inkubace probíhala přes noc při 4°C. Následně byla použita oslí sekundární protilátka proti myším IgG konjugovaná na biotinu (Jackson Immuno Res., USA, ředění 1:500). 4-HNE byl následně detekován inkubací se streptavidinem (ředění 1:300) při pokojové teplotě. Po 45 minutové inkubaci byla imunoreakce vizualizována užitím chromogenu DAB (Sigma-Aldrich, Česká republika), přičemž intenzita zbarvení byla kontrolována pod mikroskopem. Po opláchnutí řezů v destilované vodě byla jádra kardiomyocytů dobarvena Gillovým hematoxylinem. Dále následovalo odvodnění pomocí koncentrovaného ethanolu, projasnění v xylenu a zamontování do DPX (Sigma-Aldrich, Česká republika). Reprezentativní mikrofotografie byly zhotoveny pomocí programu MicroImage 4.51 (Media Cybernetics, Laboratory Imaging, Česká republika) doc. MUDr. Yvonou Mazurovou, CSc. na Ústavu histologie a embryologie Lékařské fakulty v Hradci Králové.

c. Stanovení glutathionu v myokardu levé komory

Ke každému vzorku (přibližně 60 mg tkáně) bylo přidáno 500 μ l Tris pufru (25 mM Tris, 0,1 % Triton X-100, pH 7,6). Vzorky byly 20 minut homogenizovány v termomixeru (Eppendorf, USA) při 4°C. Po centrifugaci (1 000 x g, 10 minut, 4°C) bylo odebráno 100 μ l supernatantu, ke kterému bylo přidáno 200 μ l 10% kyseliny metafosforečné (Sigma-Aldrich, Česká republika). Směs byla opět centrifugována (15 000 x g, 10 minut, 4°C). Vlastní analýza byla realizována Ing. Milošem Hrochem na Ústavu farmakologie Lékařské fakulty v Hradci Králové. V případě redukované formy glutathionu (GSH) se k 50 μ l supernatantu přidal 1 ml roztoku EDTA. Ze směsi se následně odebralo 20 μ l a přidalo ke směsi tvořené 300 μ l roztoku fosfátového pufru (0,1 mol/l, pH 8), EDTA a 20 μ l o-ftaldialdehydu. Směs se nechala ve tmě inkubovat 30 minut při laboratorní teplotě. V případě oxidované formy (GSSG) se ke 100 μ l supernatantu přidalo 200 μ l N-ethylmaleimid a vzorky se nechaly 30 minut inkubovat ve tmě při laboratorní teplotě. Po inkubaci se ke vzorkům přidalo 750 μ l NaOH (0,2 mmol/l). Z této směsi se následně odebralo 20 μ l a přidalo k 300 μ l NaOH (0,2 mmol/l) a 20 μ l o-ftaldialdehydu. Směs se inkubovala 30 minut při 25°C ve tmě. Pro vlastní analýzu pomocí HPLC systému (Shimadzu, Japonsko) bylo použito 20 μ l finálního roztoku. Během analýzy byla použita stacionární fáze Discovery® EC C₁₈ 150 x 4,0 mm/5 μ m (Supelco, Sigma-Aldrich, Česká republika) a předkolona Discovery® C₁₈ Supelguard™ C₁₈ 20 x 4,0 mm/5 μ m (Supelco, Sigma-Aldrich, Česká republika). Jako mobilní fáze byla použita směs methanolu a 25 mM fosfátového pufru v poměru 15:85 (v/v) o výsledném pH 6,0. Rychlost průtoku byla 0,5 ml/min a fluorescenční detektor byl nastaven na excitační vlnovou délku 350 nm a emisní vlnovou délku 420 nm. Výsledné množství glutathionu bylo vztaženo na stanovenou koncentraci proteinu ve vzorku.

16. Stanovení aktivity matrixových metaloproteináz v myokardu pokusných zvířat

Aktivita matrixových metaloproteináz byla stanovena pomocí dvou komerčně dostupných fluorescenční kitů. SensoLyte™ 570 Generic MMP Assay Kit byl použit pro měření celkové aktivity MMP-1, 2, 7, 8, 9, 10, 13, 14. Pro sledování aktivit dalších MMPs byl použit SensoLyte™ 520 MMP Assay Kit (Anaspec, USA) se sérií 6 substrátů, které jsou specifické pro MMP-1, 2, 3, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14. Vzorky z myokardu levé komory (přibližně 60 mg tkáně) byly homogenizovány na ledu v přiloženém Assay Buffer s 0,1% Triton X-100 pomocí ultrazvukového homogenizátoru (Hielscher - Ultrasound Technology, USA) a termomixeru (Eppendorf, USA). Po 20 minutách byly vzorky

centrifugovány (16 000 x g, 10 minut, 4°C). Získaný supernatant byl použit pro následné stanovení aktivit metaloproteináz dle instrukcí výrobce. Po hodinové inkubaci vzorků s fluorescenčním substrátem (TAMRA/QXL^{TM570} FRET peptide) byla aktivita měřena na multifunkčním „readeru“ (Tecan InfiniteTM 200, Švýcarsko) s užitím 540 nm excitačního filtru a 575 nm emisního filtru. V případě druhého kitu byla aktivita MMPs měřena pomocí 6 fluorescenčních substrátů (FAM/QXL^{TM520} generic substrate, SB1, SB2, SB7, SB14, SB16) s užitím 490 nm excitačního filtru a 520 nm emisního filtru. Fluorescenční jednotky (FU) byly vztaženy na koncentraci proteinu stanovenou ve vzorku. Výsledné aktivity metaloproteináz byly na závěr vztaženy k průměrné hodnotě stanovené u kontrolní skupiny. Všechna měření byla provedena v duplikátu.

Aktivita želatináz byla stanovena pomocí komerčního kitu MMP Gelatinase Activity Assay Kit (Chemicon, USA) ve spolupráci s Doc. MUDr. Michaelou Adamcovou, Ph.D. z Ústavu fyziologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové. Vzorky myokardu (přibližně 50 mg tkáně) byly homogenizovány po dobu 24 hodin v 200 µl extrakčního kakodylátového pufru (0,15 mol/l CaCl₂, 0,15 mmol/l ZnCl₂, 2 mmol/l NaCl, pH 5,2) při teplotě 4°C. Poté byly vzorky centrifugovány (10 000 x g, 30 minut, 4°C). Pro vlastní analýzu bylo použito 50 µl supernatantu, ke kterému bylo přidáno 200 µl naředěného Biotinylated Gelatinase Substrate. Vzorky byly inkubovány 3 hodiny při 37 °C. Přiložená 96-jamková destička s navázaným biotinem byla 30 minut rehydratována s 200 µl fosfátového pufru. Po odstranění pufru se do každé jamky přidalo 100 µl předem připravené směsi vzorku a substrátu a opět probíhala 30 minutová inkubace při 37 °C. Po opakovaném opláchnutí destičky se do každé jamky přidalo 100 µl Streptavidin Enzyme Conjugate. Po 30 minutách byly jamky opláchnuty a následně probíhala vizualizace pomocí 100 µl Substrate Solution při pokojové teplotě. Po 20 minutách byla reakce zastavena přidáním 100 µl Stop Solution do každé jamky. Aktivita želatináz byla měřena spektrofotometricky při vlnové délce 450 nm pomocí ELx800 (BioTek Instruments, Inc., USA). Výsledná aktivita byla vztažena na stanovenou koncentraci proteinu v každém vzorku. Všechna měření byla opět provedena v duplikátu.

17. Stanovení koncentrace proteinu ve vzorcích

V připravených vzorcích byla stanovena koncentrace proteinu pomocí spektrofotometrické komerčního kitu Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (Sigma-Aldrich, USA). Spektrofotometrické stanovení bylo založeno na reakci bicinchoninové kyseliny s měďnatými ionty v alkalickém prostředí, což vedlo ke vzniku

barevných komplexů měďných iontů. Některé složky vzorkového pufru mohou však interferovat s činidly kitu, proto byly nejprve proteiny precipitovány 100 μ l kyseliny trichloroctové (72 %) a 100 μ l deoxycholátu sodného (0,15 %). Vysrážené proteiny byly následně rozpuštěny v 5% roztoku dodecylsulfátu sodného rozpuštěném v 0,1 mol/l hydroxidu sodném. Po smíchání takto připraveného vzorku s reakčním činidlem v poměru 1:8 probíhala 30 minutová inkubace. Výsledná absorbance byla měřena při vlnové délce 570 nm pomocí Microplate Reader Model 680 (BioRad Laboratories Inc., USA).

18. Stanovení železa v myokardu pokusných zvířat

Ze vzorků myokardu levé komory byla získána sušina, která byla zvážena po ochlazení. Sušina byla následně inkubována v mikrovlnné troubě s kyselinou dusičnou a peroxidem vodíku. Obsah železa byl stanoven pomocí elektrotermické atomové absorpční spektrometrie (Unicam, Solaar 959, Velká Británie) na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Výsledky byly vyjádřeny v μ mol/g suché tkáně.

19. Statistická analýza

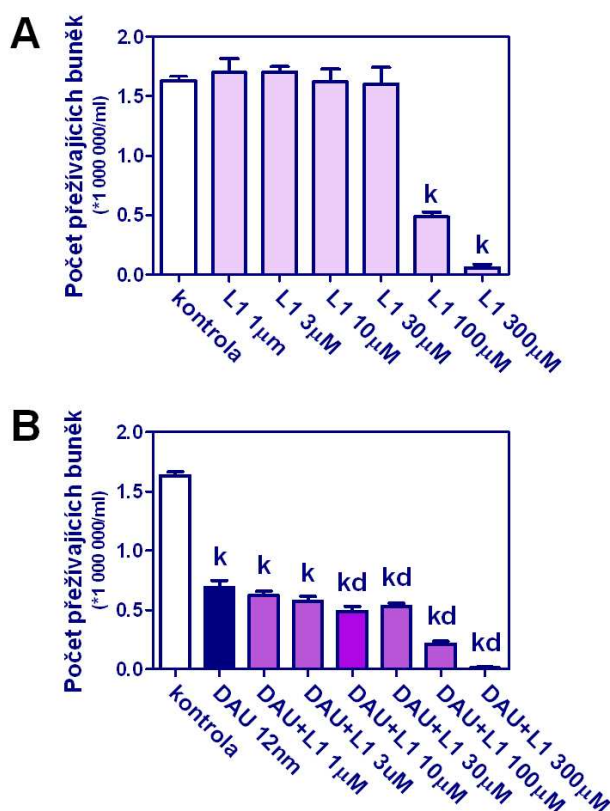
Statistická analýza byla provedena za užití statistických programů SigmaStat 3.5 (SPSS Inc., USA) a STATISTICA Cz (StatSoft, USA). Všechna uvedená data byla vyjádřena jako průměr \pm SEM. Pro určení statistické významnosti byla zvolena hladina $p < 0,05$. Nepárový ANOVA test byl použit pro hodnocení statistické významnosti změn mezi jednotlivými skupinami, zatímco párový t -test byl proveden při hodnocení výsledků v rámci jedné skupiny. Ke stanovení vztahu mezi jednotlivými naměřenými parametry byla zvolena Pearsonova parametrická nebo Spearmanova neparametrické korelační metoda. Explorativní statistické metody, z nichž byla zvolena analýza hlavních komponent (Principal Component Analysis) a hierarchická shlukovací analýza (Hierarchical Tree Clustering), byly využity pro vícerozměrné hodnocení získaných parametrů.

VÝSLEDKY

1. Studium potenciálně kardioprotektivních účinků chelátoru železa deferipronu na modelu chronické antracyklinové kardiotoxicity

1.1. Antiproliferativní studie s buněčnou linií HL-60

Protože perspektivní kardioprotektivum by nemělo mít negativní vliv na protinádorovou účinnost cytostatika, byl nejprve studován účinek deferipronu na daunorubicinem navozenou inhibici proliferace nádorové buněčné linie. K tomuto účelu byla zvolena promyelocytární leukemická buněčná linie HL-60. Při použití nízkých koncentrací (1-30 $\mu\text{mol/l}$) samotného deferipronu jsme zjistili, že chelátor nevykazoval statisticky významný účinek na proliferaci nádorové linie, zatímco vyšší koncentrace (>100 $\mu\text{mol/l}$) byly schopné ji výrazně snižovat (obr. 12A). Následně byly buňky společně inkubovány s deferipronem v rozpětí klinicky relevantních koncentrací (1-300 $\mu\text{mol/l}$) a s daunorubicinem. Při kombinaci obou látek deferipron v nízkých koncentracích statisticky významně neovlivňoval protinádorový účinek cytostatika, zatímco při vyšších koncentracích (>10 $\mu\text{mol/l}$) působil synergicky (obr. 12B).

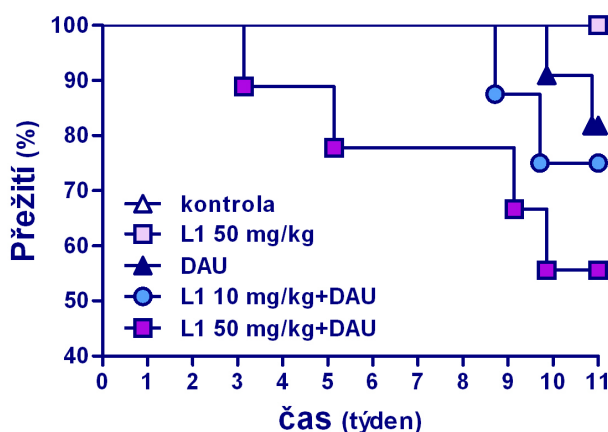


Obr. 12 A) Účinek deferipronu (1-300 $\mu\text{mol/l}$) na proliferaci promyelocytární leukemické buněčné linie HL-60. Počet přežívajících buněk na konci 72 hodinové inkubace. B) Účinek deferipronu (1-300 $\mu\text{mol/l}$) na antiproliferativní působení daunorubicinu (12 nmol/l). Statistická významnost (ANOVA; $p < 0,05$) ve srovnání s kontrolní (k) a daunorubicinovou (d) skupinou.

1.2. Kardioprotektivní studie u králíka

1.2.1. Hodnocení celkové toxicity

U zvířat z kontrolní a deferipronové skupiny nebyly během celého pokusu zaznamenány žádné změny v chování, vnější známky toxicity ani předčasný úhyn. Naproti tomu v daunorubicinové skupině byla pozorována 18% mortalita. Společné podání deferipronu v dávce 10 mg/kg a daunorubicinu překvapivě navodilo 25% mortalitu (2 předčasné úhyny). Další pětinasobné zvýšení dávky chelátoru vedlo k ještě časnějšímu úhynu zvířat. Oproti daunorubicinové skupině a kombinační skupině s nižší dávkou chelátoru, kde byla mortalita zaznamenána mezi 9. a posledním týdnem studie, ve skupině s vyšší dávkou deferipronu (50 mg/kg) byl první úhyn pozorován již mezi 3. a 5. týdnem pokusu. Tato mortalita pravděpodobně souvisela s výskytem extrakardiální toxicity. Výsledky přežití pokusných zvířat jsou shrnuty v Kaplan-Meierově křivce (obr. 13).

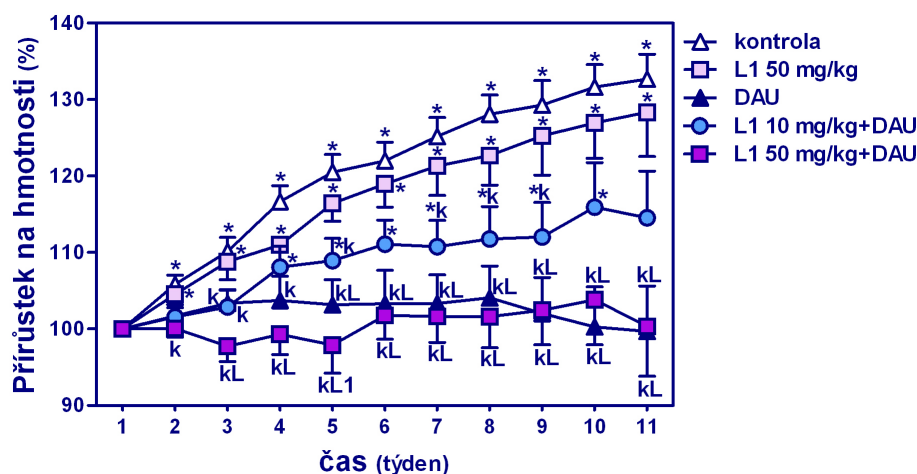


Obr. 13. Kaplan-Meierova křivka přežití zvířat.

Předčasnému úhynu zvířat předcházela snížená příjem potravy a tekutin a známky letargie. Tělesná hmotnost stagnovala, popřípadě docházelo k jejímu poklesu. Změny v tělesné hmotnosti u jednotlivých skupin jsou shrnuty na obr. 14. V průběhu pokusu nebyly nalezeny významné rozdíly v hmotnosti zvířat mezi kontrolní a deferipronovou skupinou, které byl podáván samotný chelátor. V obou skupinách jsme zaznamenali nárůst tělesné hmotnosti oproti počáteční hodnotě. Naproti tomu v daunorubicinové skupině a v kombinační skupině s vyšší dávkou deferipronu (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 deferipronu (10 mg/kg) bylo u zvířat zjištěno signifikantní zvýšení tělesné hmotnosti téměř

v průběhu celého pokusu, nicméně v porovnání s kontrolními hodnotami byly hmotnosti stále významně sníženy.

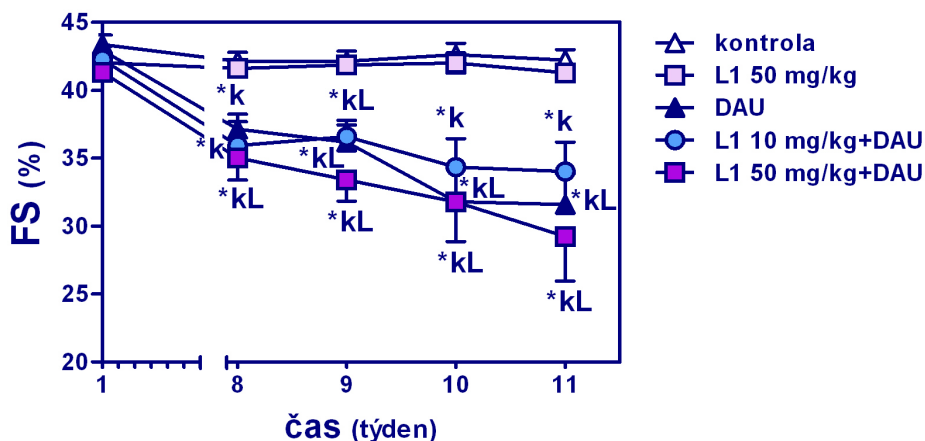
Při posmrtném ohledání zvířat z daunorubicinové skupiny byly nalezeny výpotky v dutině břišní a hrudní a makroskopické změny v kůře ledvin. Pitevní nález v obou kombinačních skupinách L1+DAU neobsahoval žádné odlišné změny, které by nebyly přítomné v samotné daunorubicinové skupině. Poměr hmotnosti srdce a tělesné hmotnosti stanovený na konci pokusu byl významně vyšší u daunorubicinové skupiny ($2,82 \pm 0,1$ g/kg) v porovnání s kontrolní ($2,14 \pm 0,10$ g/kg, $p < 0,05$) a samotnou deferipronovou ($2,06 \pm 0,14$ g/kg, $p < 0,05$) skupinou. U obou kombinačních skupin L1+DAU nebyl nalezen signifikantní rozdíl oproti poměrům v daunorubicinové, tak i kontrolní skupině (L1 10+DAU: $2,51 \pm 0,14$ g/kg a L1 50+DAU: $2,70 \pm 0,19$ g/kg).



Obr. 14. Změny v tělesné hmotnosti u jednotlivých skupin zvířat. Statistická významnost (ANOVA, $p < 0,05$) v porovnání s kontrolní (k), deferipronovou (L) a L1 10mg/kg+DAU (1) skupinou a párový *t*-test ($p < 0,05$) v porovnání s počáteční hodnotou (*).

1.2.2. Echokardiografické hodnocení srdeční funkce

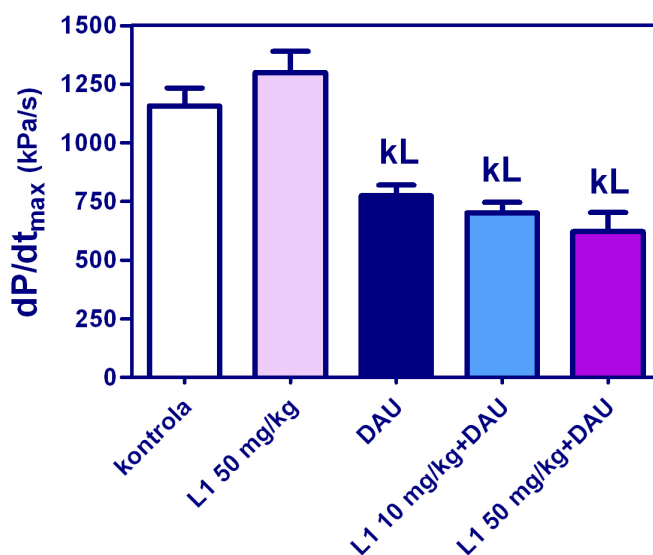
Frakční zkrácení levé komory stanovené echokardiograficky bylo statisticky významně sníženo v daunorubicinové skupině jak ve srovnání s počáteční hodnotou, tak i s kontrolní skupinou (obr. 15). U obou kombinačních skupin L1+DAU se hodnoty frakčního zkrácení levé komory v průběhu celého pokusu signifikantně nelišily od daunorubicinové skupiny. Ačkoliv po podání nižší dávky chelátoru byl pokles systolické funkce méně vyjádřený, žádné signifikantní rozdíly mezi naměřenými hodnotami nebyly zjištěny. Pokles funkčního parametru byl u obou L1+DAU skupin statisticky významný při porovnání s počátečními hodnotami i s kontrolní skupinou.



Obr. 15. Echokardiograficky hodnocená systolická funkce levé komory (frakční zkrácení, FS) v průběhu 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 (*).

1.2.3. Invazivní hemodynamické měření

Katetrizační vyšetření systolické srdeční funkce provedené na konci pokusu odhalilo významný pokles indexu kontraktility levé komory (dP/dt_{max}) v daunorubicinové skupině v porovnání s kontrolní skupinou. Podání deferipronu v obou sledovaných dávkách vedlo k obdobnému snížení systolické funkce levé komory (obr. 16). Mezi těmito skupinami nebyly nalezeny žádné statisticky významné změny. Obdobný trend byl zaznamenán i u dalších hodnocených parametrů (srdeční frekvence a tlaku krve, tab. 2).



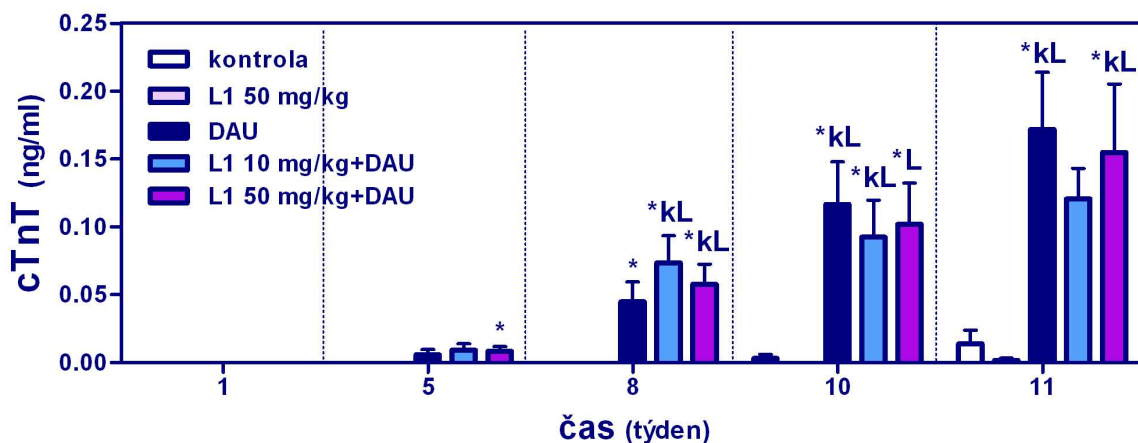
Obr. 16. Index systolické funkce levé komory (dP/dt_{max}) na konci pokusu. Statistická významnost (ANOVA, $p < 0,05$) v porovnání s kontrolní (k) a deferipronovou (L) skupinou.

Tab. 10. Invazivní hemodynamické měření na konci pokusu. Statistická významnost (ANOVA, $p < 0,05$) v porovnání s deferipronovou skupinou (L).

Skupina	Srdeční frekvence (min^{-1})	Tlak krve (mmHg)
Kontrolní	101,0 \pm 3,9	312,3 \pm 9,6
L1 50 mg/kg	107,3 \pm 2,5	335,8 \pm 10,4
DAU	88,9 \pm 3,8 L	284,0 \pm 12,3 L
L1 10 mg/kg+DAU	91,3 \pm 2,4 L	275,3 \pm 12,9 L
L1 50 mg/kg+DAU	86,4 \pm 6,1 L	283,9 \pm 3,2 L

1.2.4. Stanovení srdečního troponinu T

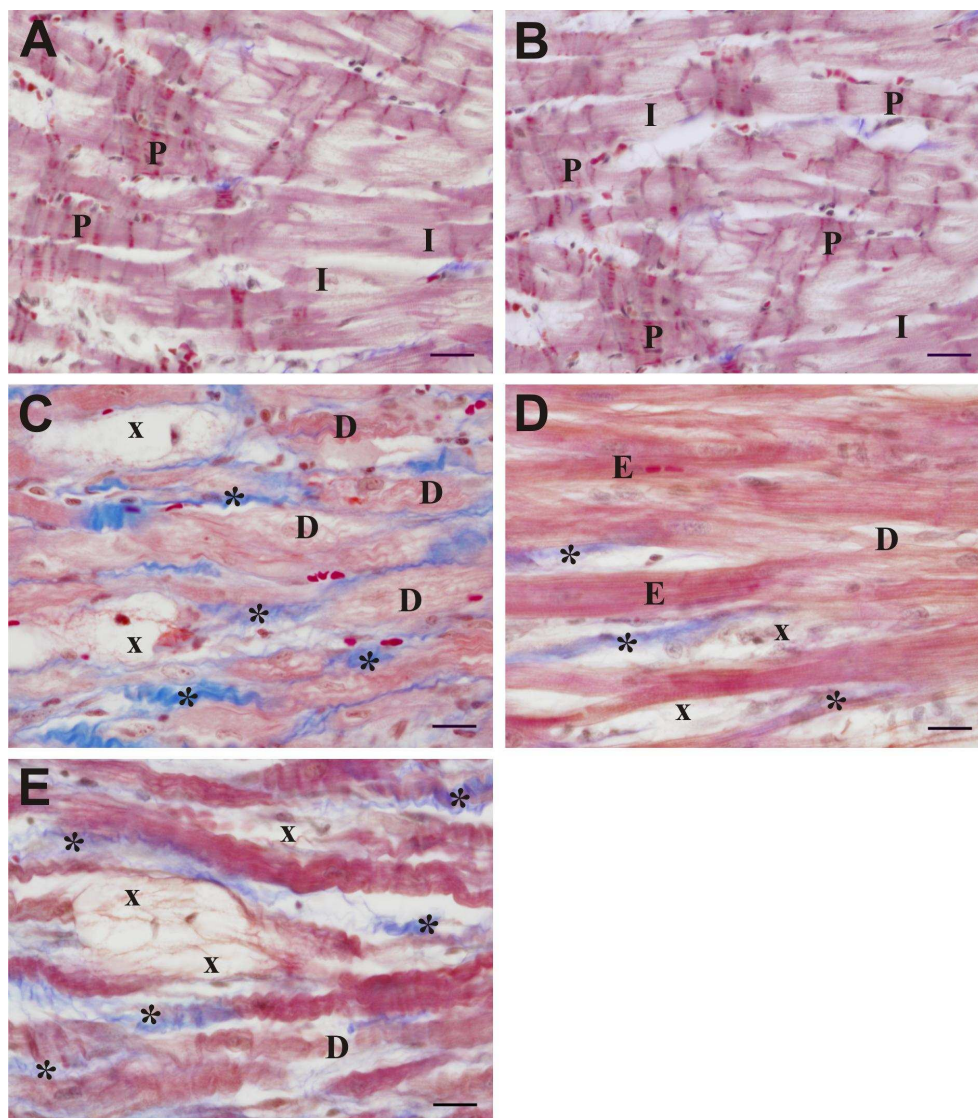
Podání daunorubicinu vedlo k postupnému nárůstu plazmatické koncentrace srdečního troponinu T, který od 8. týdne pokusu byl statisticky významně zvýšen v porovnání s počáteční hodnotou. Podobné změny v plazmatických koncentracích srdečního troponinu T byly nalezeny v obou kombinačních skupinách L1+DAU (obr. 17).



Obr. 17. Plazmatická koncentrace srdečního troponinu T v průběhu experimentu. 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 (*).

1.2.5. Histologické hodnocení myokardu

Histologické hodnocení myokardiálních vzorků získaných z kontrolní a deferipronové skupiny odhalilo téměř srovnatelný morfologický obraz, který dokumentoval intaktní kardiomyocyty normálního vzhledu (obr. 18A,B). Ojedinele byla patrná osamocená místa buněk s mírnějšími morfologickými změnami. Některé skupiny kardiomyocytů měly zvýšenou eosinofilii nebo popřípadě byla přítomná pyknotická jádra, což pravděpodobně souviselo s prodlouženou anestézií na konci experimentu.

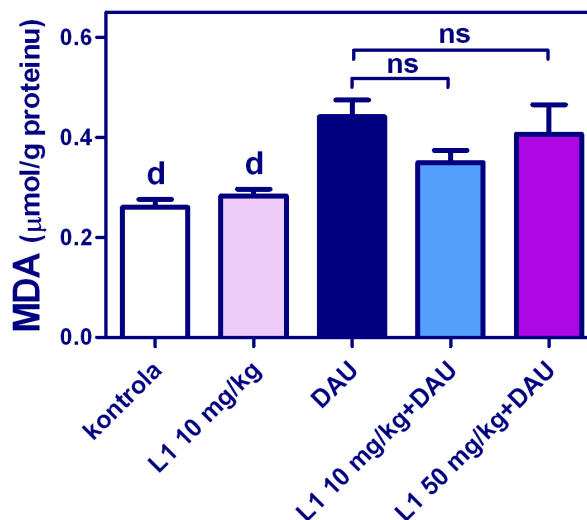


Obr. 18. Myokard levé komory. A) kontrolní skupina, B) deferipronová skupina, C) daunorubicinová skupina, D) L1 10 mg/kg+DAU skupina, E) L1 50 mg/kg+DAU skupina. Intaktní myocyty (I), proužkování cytoplazmy (P), eosinofilie (E), degenerace (D) až smrt kardiomyocytů (X), kolagenní vlákna tvořící fibrotickou jizvu (*). Barvení: Massonův modrý trichrom. Měřítka: 20 µm.

Naopak opakované podání daunorubicinu navodilo typické ložiskové poškození myokardu levé komory. U velkého počtu kardiomyocytů byl nalezen rozdílný rozsah buněčné degenerace vedoucí k buněčné smrti. Rozsáhlejší ložiska odumřelých kardiomyocytů byla pozvolna nahrazována fibrotickou tkání, což následně vyústilo v intersticiální fibrózu (obr. 18C). V obou kombinačních skupinách L1+DAU byl nalezen podobný charakter myokardiálních změn jako u daunorubicinové skupiny. Toxické poškození ve skupině s nižší dávkou chelátoru bylo o něco méně vyjádřené (obr. 18D), zatímco po vyšší dávce chelátoru se změny v myokardu velmi podobaly změnám navozeným aplikacemi samotného cytostatika (obr. 18E).

1.2.6. Stanovení malondialdehydu v myokardu levé komory

Malondialdehyd byl použit jako marker lipoperoxidace. Pomocí validované HPLC metody bylo stanoveno významné zvýšení celkového malondialdehydu v myokardu levé komory po opakovaném podání daunorubicinu. V obou kombinačních skupinách L1+DAU jsme překvapivě zjistili pouze nesignifikantní pokles tohoto markeru v porovnání s daunorubicinovou skupinou (obr. 19).



Obr. 19. Množství malondialdehydu (MDA) v myokardu levé komory vztažené na koncentraci proteinu. Statistická významnost (ANOVA, $p < 0,05$) v porovnání s daunorubicinovou skupinou (d), nesignifikantní změna (ns).

1.2.7. Stanovení železa v myokardu

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

1.2.8. Biochemické a hematologické parametry

V séru králíků, kterým byl podáván daunorubicin, byly zjištěny signifikantní změny v některých biochemických parametrech. Jednalo se především o parametry související s renálním poškozením (např. zvýšení kreatininu) a s poškozením metabolismu lipidů (tab. 11). Podobné výsledky byly popsány i u kombinačních skupin L1+DAU.

Tab. 11. Vybrané biochemické parametry. Statistická významnost (ANOVA, $p < 0,05$) v porovnání s kontrolní (k), deferipronovou (L) a daunorubicinovou (d) skupinou a párový t -test ($p < 0,05$) v porovnání s počáteční hodnotou (*). TAG - triacylglyceridy, ALT - alaninaminotransferáza, AST - aspartátaminotransferáza.

Parametr/skupina	Začátek studie	Před 5. aplikací	Na konci studie
Železo ($\mu\text{mol/l}$)			
Kontrolní	31,8 \pm 3,5	36,2 \pm 2,8	26,3 \pm 1,4
L1 50 mg/kg	36,0 \pm 5,7	33,2 \pm 2,7	29,7 \pm 3,6
DAU	35,7 \pm 2,6	19,5 \pm 2,9 * kL	19,7 \pm 4,1 *
L1 10 mg/kg+DAU	35,3 \pm 2,7	25,5 \pm 2,3 * k	23,4 \pm 4,6
L1 50 mg/kg+DAU	45,0 \pm 2,3	16,7 \pm 3,7 * kL	35,9 \pm 12,0
Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)			
Kontrolní	82,8 \pm 4,2	95,1 \pm 4,2 *	89,0 \pm 4,1
L1 50 mg/kg	83,4 \pm 3,7	89,2 \pm 5,4	77,0 \pm 5,2
DAU	91,1 \pm 8,0	127,1 \pm 11,1 * kL	262,0 \pm 112,9 * kL
L1 10 mg/kg+DAU	88,5 \pm 4,7	102,0 \pm 3,5 *	152,3 \pm 19,3 * kL
L1 50 mg/kg+DAU	85,4 \pm 4,1	108,3 \pm 5,0 *	162,8 \pm 30,1 kL
Močovina (mmol/l)			
Kontrolní	5,83 \pm 0,51	7,58 \pm 0,31 *	6,65 \pm 0,25
L1 50 mg/kg	6,02 \pm 0,80	6,88 \pm 0,48	6,78 \pm 0,42
DAU	7,11 \pm 0,92	7,25 \pm 0,40	12,70 \pm 4,26
L1 10 mg/kg+DAU	6,50 \pm 0,35	7,39 \pm 0,49	8,27 \pm 0,51 *
L1 50 mg/kg+DAU	7,06 \pm 0,39	6,78 \pm 0,38	8,84 \pm 2,29
Protein (g/l)			
Kontrolní	59,8 \pm 0,7	65,7 \pm 1,6 *	60,9 \pm 1,0
L1 50 mg/kg	60,8 \pm 0,3	65,4 \pm 1,0	63,8 \pm 0,9 *
DAU	61,9 \pm 1,4	60,6 \pm 1,3	49,1 \pm 1,6 * kL
L1 10 mg/kg+DAU	64,7 \pm 0,9 k	62,8 \pm 1,4	48,6 \pm 1,4 * kL
L1 50 mg/kg+DAU	65,2 \pm 1,0 k	55,9 \pm 6,5	49,3 \pm 0,8 * kL
Cholesterol ($\mu\text{mol/l}$)			
Kontrolní	1,47 \pm 0,14	1,75 \pm 0,23	1,49 \pm 0,13
L1 50 mg/kg	1,82 \pm 0,52	1,89 \pm 0,51	1,48 \pm 0,28
DAU	1,43 \pm 0,16	2,52 \pm 0,52	3,65 \pm 0,44 * kL
L1 10 mg/kg+DAU	1,36 \pm 0,13	2,76 \pm 0,26 *	5,81 \pm 0,95 * kL
L1 50 mg/kg+DAU	1,27 \pm 0,12	3,23 \pm 0,89 *	4,24 \pm 0,89 * kL
TAG (mmol/l)			
Kontrolní	0,86 \pm 0,06	0,62 \pm 0,09 *	0,82 \pm 0,08
L1 50 mg/kg	1,16 \pm 0,16	1,01 \pm 0,33	1,02 \pm 0,13
DAU	1,19 \pm 0,17	1,10 \pm 0,14	3,73 \pm 0,94 * kL
L1 10 mg/kg+DAU	0,87 \pm 0,07	1,38 \pm 0,21 * k	5,00 \pm 1,71 kL
L1 50 mg/kg+DAU	1,13 \pm 0,16	2,22 \pm 0,77 k	2,54 \pm 0,46 k
ALT ($\mu\text{kat/l}$)			
Kontrolní	0,96 \pm 0,20	0,77 \pm 0,05	0,76 \pm 0,07
L1 50 mg/kg	0,80 \pm 0,16	0,95 \pm 0,14	0,73 \pm 0,09
DAU	1,00 \pm 0,10	0,73 \pm 0,05 *	0,72 \pm 0,15 *
L1 10 mg/kg+DAU	1,07 \pm 0,11	1,14 \pm 0,18 d	0,66 \pm 0,10 *
L1 50 mg/kg+DAU	1,50 \pm 0,28	0,91 \pm 0,12 *	0,65 \pm 0,07

AST ($\mu\text{kat/l}$)			
Kontrolní	0,64 \pm 0,09	0,57 \pm 0,05	0,50 \pm 0,06
L1 50 mg/kg	1,04 \pm 0,23	1,34 \pm 0,52	0,62 \pm 0,09
DAU	0,71 \pm 0,15	0,40 \pm 0,05 *L	0,51 \pm 0,18 *
L1 10 mg/kg+DAU	0,64 \pm 0,06	1,38 \pm 0,67	0,45 \pm 0,07
L1 50 mg/kg+DAU	1,26 \pm 0,31	1,47 \pm 0,93	0,16 \pm 0,02

Z tab. 12 je zřejmé, že podání daunorubicinu vedlo i k signifikantnímu poklesu počtu erytrocytů a trombocytů, ke snížení koncentrace hemoglobinu a hematokritu. Většina hematologických parametrů během studie měla podobný trend i v kombinačních skupinách L1+DAU. Podání samotného chelátoru nemělo významný vliv na jednotlivé hematologické i biochemické parametry.

Tab. 12. Vybrané hematologické parametry. 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 (*).

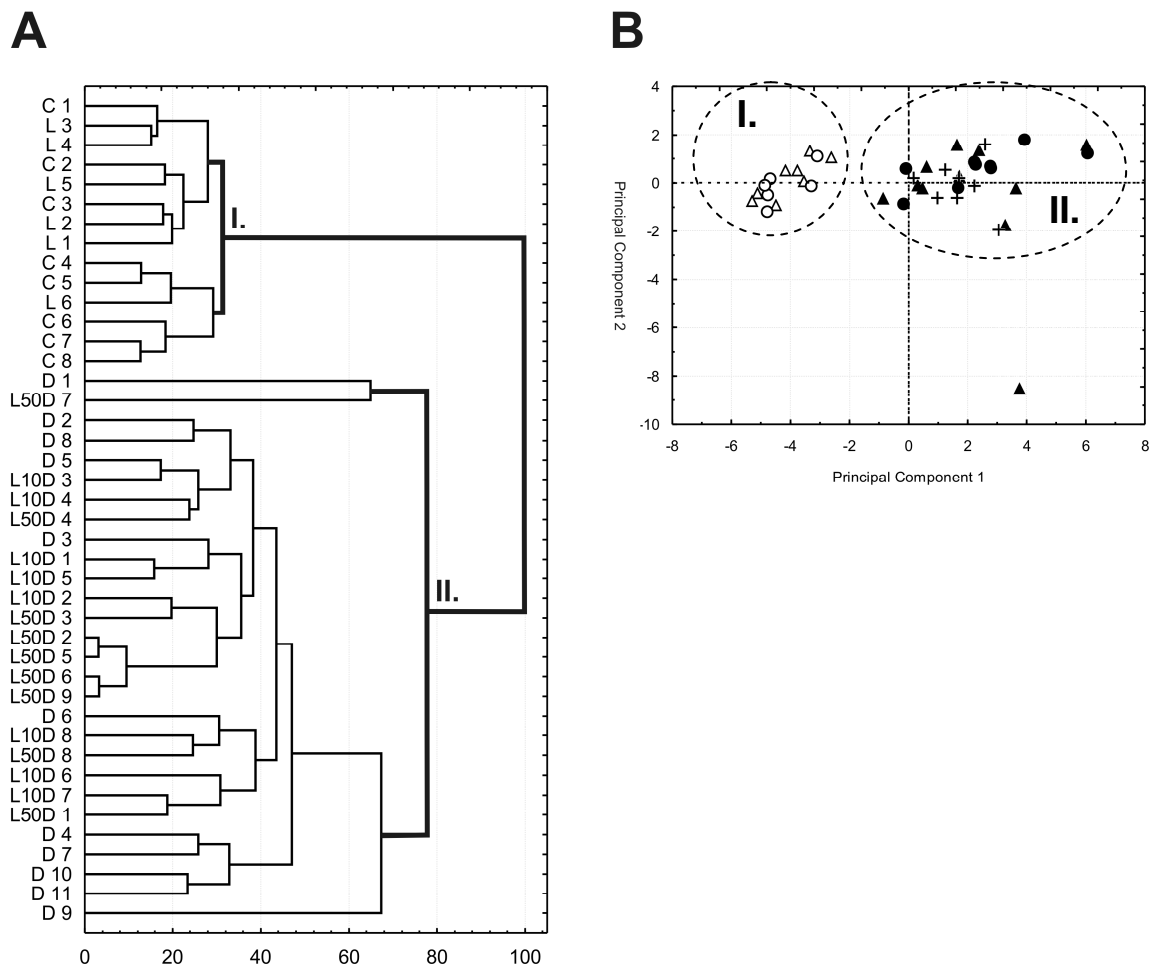
Parametr/skupina	Začátek studie	Před 5. aplikací	Na konci studie
Leukocyty ($\times 10^9/l$)			
Kontrolní	6,17 \pm 0,50	6,92 \pm 0,36	3,80 \pm 0,18*
L1 50 mg/kg	7,22 \pm 0,69	6,70 \pm 0,39	3,72 \pm 0,19*
DAU	6,39 \pm 0,54	4,82 \pm 0,41 *k	2,75 \pm 0,38*
L1 10 mg/kg+DAU	5,31 \pm 0,34	4,58 \pm 0,85 *kL	2,74 \pm 0,49
L1 50 mg/kg+DAU	6,00 \pm 0,48	5,09 \pm 0,78	3,63 \pm 0,95*
Erytrocyty ($\times 10^{12}/l$)			
Kontrolní	6,13 \pm 0,17	6,16 \pm 0,06	6,16 \pm 0,12
L1 50 mg/kg	6,52 \pm 0,11	6,35 \pm 0,12 *	6,04 \pm 0,14 *
DAU	6,04 \pm 0,19	4,26 \pm 0,24 *kL	4,02 \pm 0,30 *kL
L1 10 mg/kg+DAU	6,12 \pm 0,16	4,04 \pm 0,24 *kL	4,33 \pm 0,15 *kL
L1 50 mg/kg+DAU	6,39 \pm 0,24	3,74 \pm 0,48 *kL	4,06 \pm 0,28 *kL
Hemoglobin (g/l)			
Kontrolní	128,9 \pm 3,1	132,3 \pm 2,0	131,6 \pm 2,5
L1 50 mg/kg	138,7 \pm 3,5	137,3 \pm 3,9	131,3 \pm 4,2
DAU	133,4 \pm 3,7	94,2 \pm 4,9 *kL	84,9 \pm 6,7 *kL
L1 10 mg/kg+DAU	129,6 \pm 3,5	86,8 \pm 4,4 *kL	93,6 \pm 4,1 *k
L1 50 mg/kg+DAU	137,3 \pm 3,9	82,3 \pm 10,1 *kL	87,2 \pm 5,8 *kL
Hematokrit			
Kontrolní	0,407 \pm 0,009	0,429 \pm 0,008	0,412 \pm 0,013
L1 50 mg/kg	0,417 \pm 0,010	0,422 \pm 0,008	0,413 \pm 0,012
DAU	0,425 \pm 0,011	0,314 \pm 0,015 *kL	0,287 \pm 0,020 *kL
L1 10 mg/kg+DAU	0,414 \pm 0,010	0,289 \pm 0,013 *kL	0,306 \pm 0,016 *kL
L1 50 mg/kg+DAU	0,425 \pm 0,008	0,261 \pm 0,029 *kL	0,292 \pm 0,015 *kL
Trombocyty ($\times 10^9/l$)			
Kontrolní	290,6 \pm 26,8	287,8 \pm 29,8	306,0 \pm 49,7
L1 50 mg/kg	201,0 \pm 18,1	209,8 \pm 18,3	210,8 \pm 15,4
DAU	249,6 \pm 22,3	176,5 \pm 21,3 *k	124,8 \pm 13,5 *k
L1 10 mg/kg+DAU	244,9 \pm 30,7	114,9 \pm 21,1 *kL	166,0 \pm 19,2 k
L1 50 mg/kg+DAU	234,3 \pm 12,3	121,4 \pm 28,4 *k	175,6 \pm 32,9 k

1.2.9. Histologické hodnocení orgánů

Vzhledem k absenci významnějšího makroskopického nálezu při provedené pitvě jsme se v rámci histologického hodnocení zaměřili jen na nejdůležitější eliminační orgány, tj. na ledviny a játra. U daunorubicinové skupiny bylo v porovnání s kontrolní a deferipronovou skupinou nalezeno závažné poškození parenchymu ledvin. Toxické poškození se převážně vyskytovalo v podobě intersticiální tubulární nefritidy. Změny zahrnovaly postupně se rozvíjející hyalinní degeneraci až nekrózu epitelových buněk proximálních i distálních tubulů. U některých zvířat byla patrná přítomnost jizevnaté tkáně v intersticiu. Popsané změny se vyskytovaly v kůře i v dřeni ledvin. Podobný morfologický nález 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 daunorubicinové skupiny. U některých zvířat byla nalezena tuková degenerace a jen místy centroacinózní nekróza hepatocytů. Při srovnání experimentálních skupin nebyly shledány významné rozdíly mezi daunorubicinovou a oběma kombinačními skupinami L1+DAU.

1.2.10. Explorativní statistická analýza

Na závěr byly výsledky z této části projektu podrobeny dvěma explorativním statistickým analýzám, tj. analýze hlavních komponent (obr. 20A) a hierarchické shlukovací analýze (obr. 20B). V závislosti na 25 proměnných, které zahrnovaly funkční, biochemické, hematologické parametry a parametry obecné toxicity, 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 daunorubicinové skupiny jsme našli v druhém shluku (II) až na výjimku jednoho zvířete z daunorubicinové skupiny, u kterého byl zaznamenán předčasný úhyn a nejvýznamnější změny v jednotlivých hodnocených parametrech.

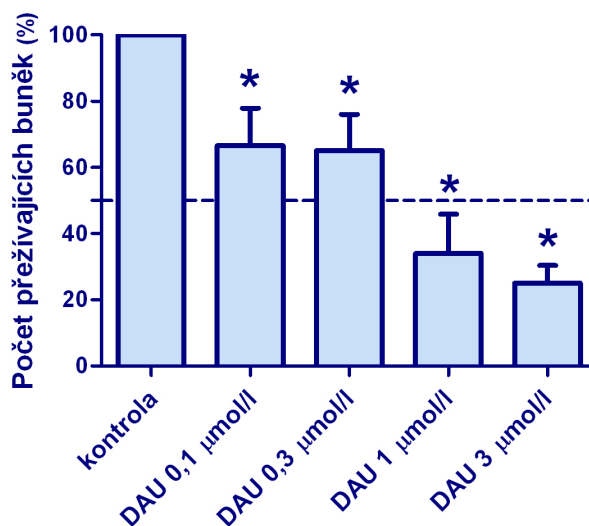


Obr. 20. Explorativní statistická analýza dat. A) Hierarchické shlukování (Hierarchical Tree Clustering). všech hodnocených funkčních, biochemických a hematologických parametrů (25 proměnných) u 5 skupin pokusných zvířat. Analýza rozdělila zkoumané objekty do dvou hlavních shluků. První shluk (I) zahrnuje zvířata z kontrolní (C) a deferipronové (L) skupiny, zatímco druhý shluk (II) obsahuje zvířata z daunorubicinové (D) skupiny a stejně tak z obou kombinačních skupin (L10D, L50D). **B) Analýza hlavních komponent (PCA, Principal Component Analysis).** Tato analýza rozdělila stejné proměnné opět do dvou zřetelně oddělených shluků. V prvním můžeme nalézt zvířata z kontrolní a deferipronové skupiny a v druhém shluku zvířata z ostatních tří skupin. Zkoumané skupiny: kontrolní (Δ), L1 (\circ), DAU (\blacktriangle), L1 10+DAU (\blackplus) a L1 50+DAU (\bullet).

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

2.1. Viabilita buněk

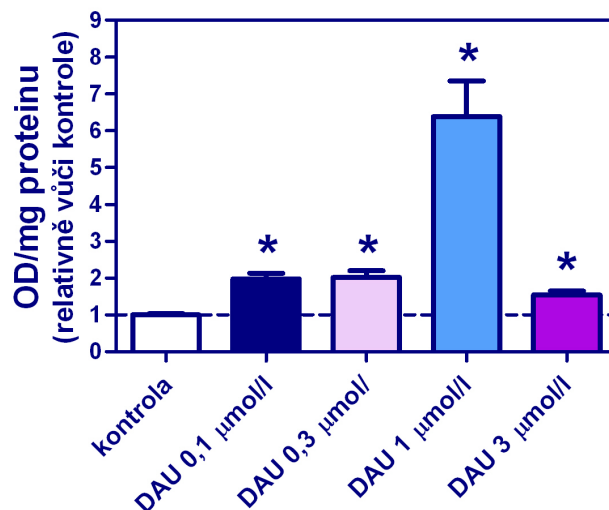
Dávkově závislá cytotoxicita byla zjištěna po 24-hodinové inkubaci buněčné kultury H9c2 s daunorubicinem v klinicky relevantních koncentracích (0,1-3 $\mu\text{mol/l}$). Cytotoxický vliv daunorubicinu se projevil poklesem počtu živých buněk, přičemž nejvýraznější pokles byl pozorován mezi koncentracemi 0,3 a 1 $\mu\text{mol/l}$. U nejvýše zvolené koncentrace daunorubicinu (3 $\mu\text{mol/l}$) dosahovala viabilita buněk $25,0 \pm 2,7$ % hodnoty kontrolní skupiny (obr. 21). Hodnota IC_{50} byla spočtena na 0,48 $\mu\text{mol/l}$.



Obr. 21. Viabilita buněk stanovená po 24-hodinové inkubaci s daunorubicinem v koncentracích 0,1-3 $\mu\text{mol/l}$. Statistická významnost (ANOVA, $p < 0,05$) v porovnání s kontrolní skupinou (*).

2.2. Cell death detection assay

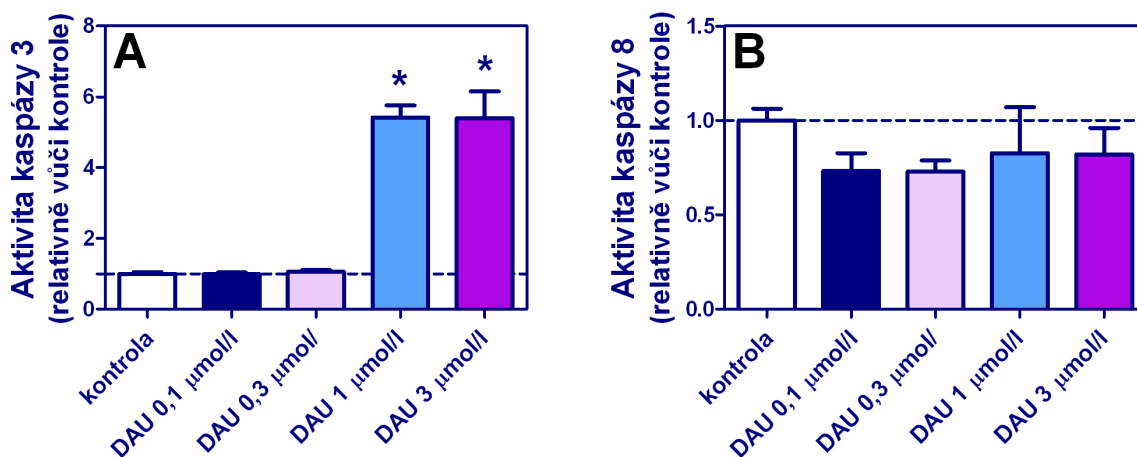
Byl zaznamenán statisticky významný nárůst fragmentace DNA u buněčné linie H9c2 inkubované 24 hodin s různými koncentracemi daunorubicinu, které jsou snadno dosažitelné v klinické praxi (obr. 22). V porovnání s kontrolními hodnotami byl zjištěn nejvyšší počet fragmentů DNA při inkubaci buněk s daunorubicinem o koncentraci 1 $\mu\text{mol/l}$. Při následném zvýšení koncentrace daunorubicinu na 3 $\mu\text{mol/l}$ byl sledovaný prudký pokles imunochemického signálu.

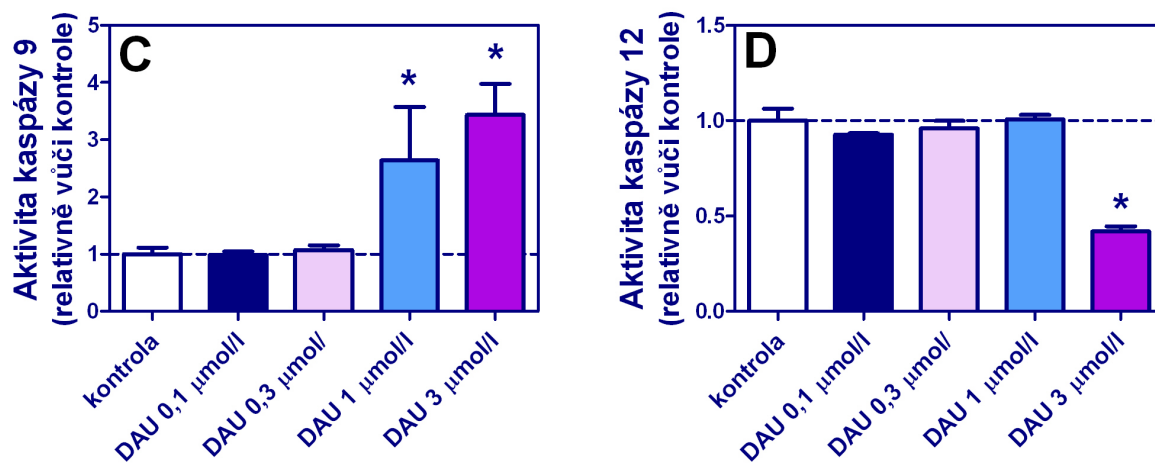


Obr. 22. Stanovení apoptózy pomocí imunochemické detekce fragmentace DNA po 24-hodinové inkubaci H9c2 buněk s daunorubicinem (0,1 – 3 $\mu\text{mol/l}$). Statistická významnost (ANOVA, $p < 0,05$) v porovnání s kontrolní skupinou (*).

2.3. Stanovení aktivity kaspáz

S užitím buněčné linie H9c2 byla provedena i analýza aktivit čtyř kaspáz majících zásadní úlohu při intracelulární signalizaci vedoucí k apoptotické buněčné smrti. 24-hodinová inkubace H9c2 buněk s daunorubicinem (v koncentracích 1 a 3 $\mu\text{mol/l}$) vedla k signifikantnímu zvýšení aktivit kaspáz 3 a 9 (obr. 23A,C), zatímco aktivita kaspáz 8 a 12 nebyla zvýšena (obr. 23B,D).



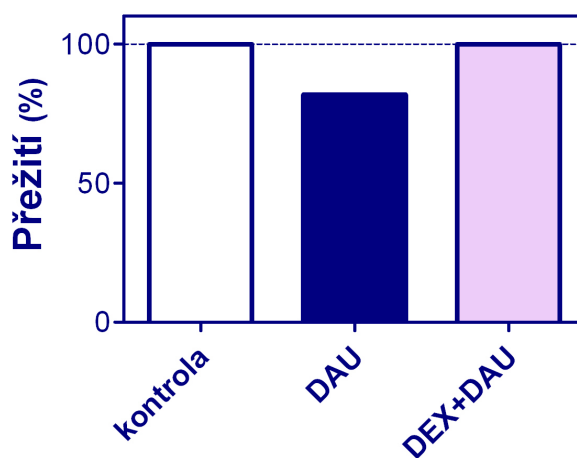


Obr. 23. Aktivita kaspáz po 24-hodinové inkubaci H9c2 buněk s daunorubicinem (0,1 - 3 $\mu\text{mol/l}$): kaspáza 3 (A), kaspáza 8 (B), kaspáza 9 (C) a kaspáza 12 (D). Statistická významnost (ANOVA, $p < 0,05$) v porovnání s kontrolní skupinou (*).

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

3.1. Hodnocení celkové toxicity

V kontrolní skupině nebyl zaznamenán úhyn zvířat a jejich dobré prospívání se projevilo i 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 daunorubicinu vedlo naopak v 11-ti členné skupině ke dvěma předčasným úhynům (obr. 24). Ani významné změny v tělesné hmotnosti nebyly sledovány u této skupiny ($3,45 \pm 0,07$ a $3,47 \pm 0,23$ kg, začátek versus konec pokusu; ns.). Během pitvy byly u předčasně uhynulých zvířat nalezeny známky městnání krve, tj. přítomnost masivního výpotku v dutině hrudní (přibližně 60 ml u obou zvířat) i břišní (25 a 35 ml). V porovnání s kontrolní skupinou byl zjištěn významně vyšší poměr hmotnosti srdce ku celkové tělesné hmotnosti u daunorubicinových zvířat ($2,15 \pm 0,10$ versus $2,82 \pm 0,18$ g/kg; $p < 0,05$).

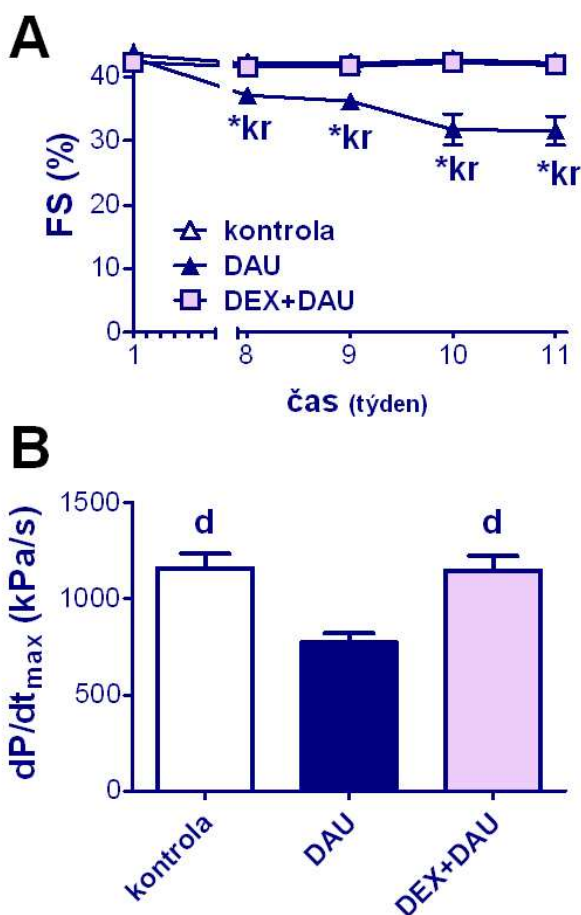


Obr. 24. Přežití zvířat v jednotlivých skupinách.

Na druhou stranu všechna zvířata z dexrazoxanové skupiny přežila až do konce pokusu (obr. 24). 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; $p < 0,01$). Při pitvě nebyl nalezen žádný výpotek v dutině břišní a hrudní a ani poměr hmotnosti srdce vůči celkové tělesné hmotnosti nebyl signifikantně rozdílný od hodnot zjištěných v kontrolní skupině ($2,55 \pm 0,13$ g/kg).

3.2. Hodnocení srdeční funkce

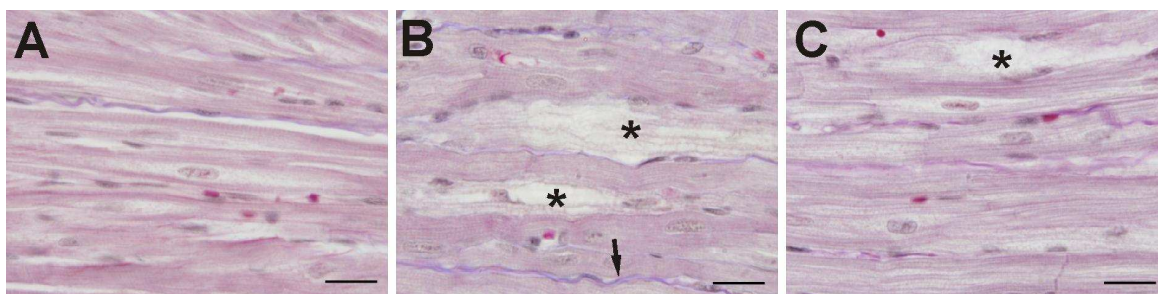
Od 8. týdne pokusu byl echokardiograficky odhalen progresivní a statisticky významný pokles frakčního zkrácení levé komory v daunorubicinové skupině (obr. 25A). V této skupině byl invazivním měřením provedeným na konci pokusu zjištěn i pokles kontraktility levé komory (obr. 25B). Na druhou stranu výsledky obou měření srdeční funkce dokumentovaly u dexrazoxanové skupiny obdobnou systolickou funkci levé komory jako u kontrolních zvířat (obr. 25A,B).



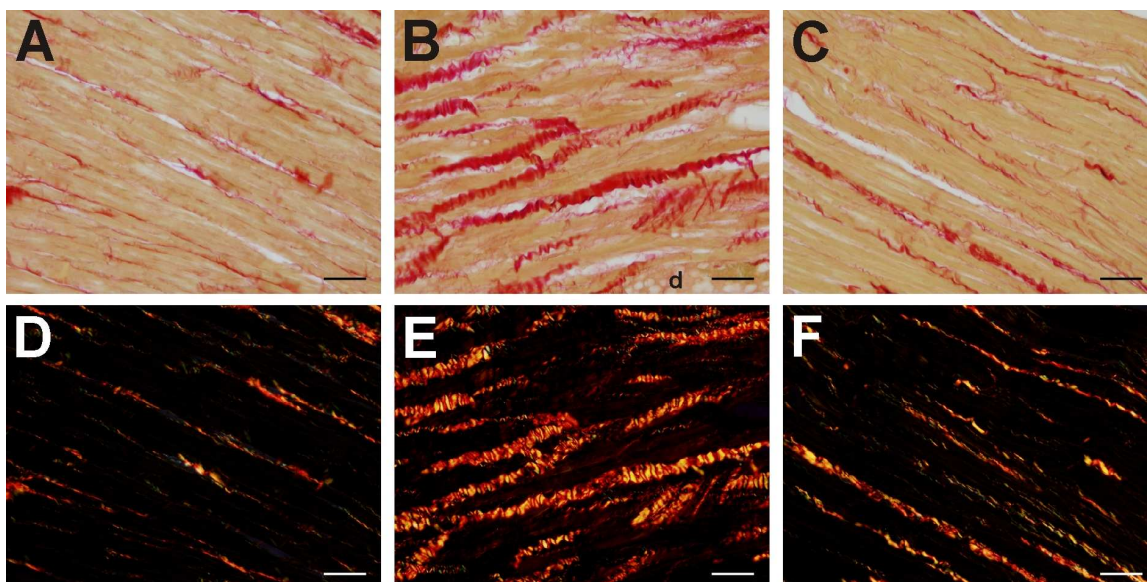
Obr. 25. A) Echokardiograficky hodnocené levokomorové frakční zkrácení (FS) v průběhu pokusu a B) invazivně hodnocený index kontraktility levé komory (index dP/dt_{max}) na konci pokusu. Statistická významnost (ANOVA, $p < 0,05$) v porovnání s kontrolní (k), daunorubicinovou (d) a DEX+DAU (r) skupinou a párový t -test ($p < 0,05$) v porovnání s počáteční hodnotou (*).

3.3. Stanovení plazmatické koncentrace srdečních troponinů

Opakované podání daunorubicinu vedlo k statisticky významnému zvýšení plazmatických koncentrací troponinu T a I stanovených na konci pokusu v porovnání s kontrolní skupinou. Naproti tomu kardioprotekce navozená dexrazoxanem byla spojená i se signifikantním poklesem plazmatických koncentrací obou srdečních markerů



Obr. 27. Histologické hodnocení myokardu levé komory. Barvení: Massonův modrý trichrom; měřítko: 20 μm . V **kontrolní skupině (A)** byla zjištěna normální struktura kardiomyocytů. V **daunorubicinové skupině (B)** byly nalezeny ložiska s výraznými degenerativními změnami (*). Pokročilé morfologické změny zahrnovaly cytoplazmatickou vakuolizaci, buněčný edém a ztrátu myofibril, což vedlo k buněčné smrti s dodatečným rozvojem intersticiální fibrózy (šipka). V myokardu zvířat z **dexrazoxanové skupiny (C)** byla zjištěna významně zachovaná a tedy téměř normální morfologie s ojedinělými mírnými změnami; známky buněčné degenerace (*) byly pozorovány jen vzácně.



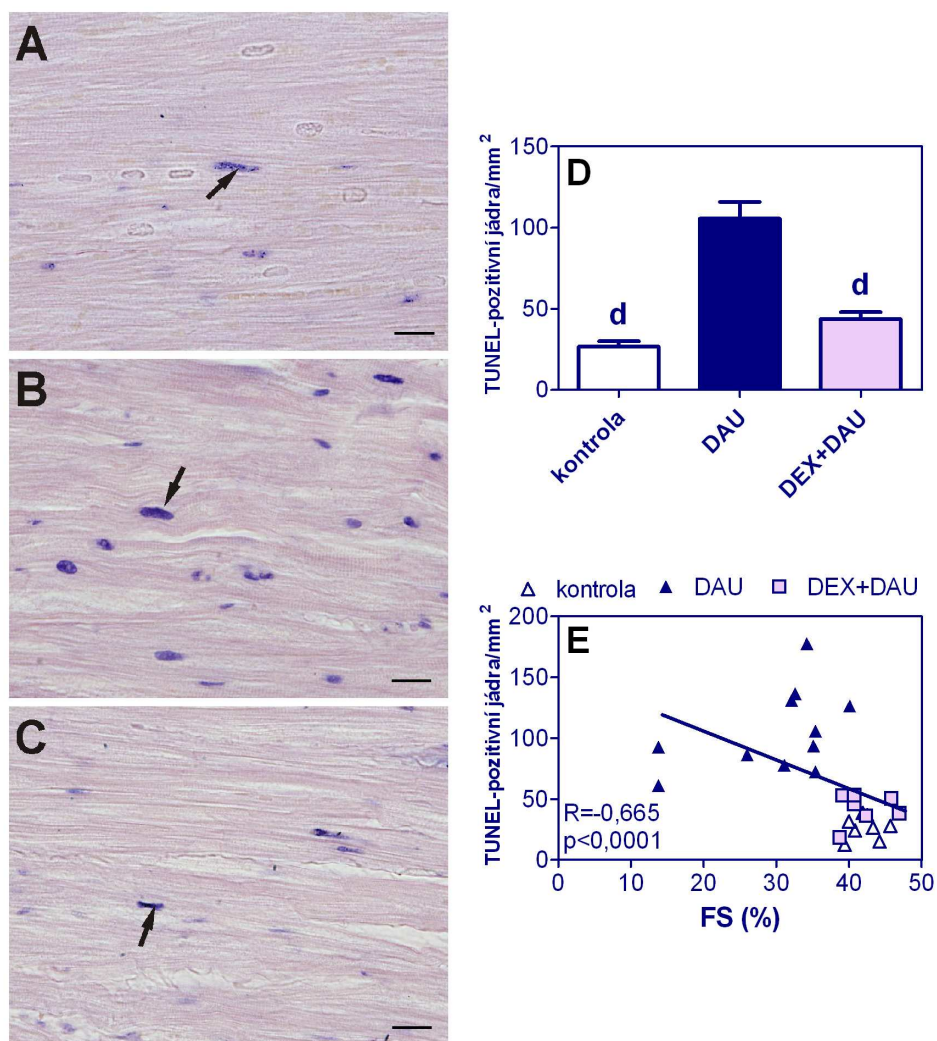
Obr. 28. Histologické hodnocení myokardu levé komory. A,D: kontrolní skupina - pouze malé množství řídkého kolagenního vaziva (A – červená vlákna) podél cév. Je tvořeno vlákny z obou typů kolagenu, tj. typu I (D - žlutočervená vlákna) a typu III (D - zelená vlákna). B,E: **daunorubicinová skupina** - intenzivní proliferace intersticiálního a zejména perivaskulárního vaziva (B - červená vlákna) reprezentovaná zpočátku především retikulárními vlákny (kolagen typu III), v pozdějších stádiích kolagenními vlákny (kolagen typu I - E: žlutočervená vlákna), které postupně nahrazují zničené kardiomyocyty a celý proces ústí v tvorbu fokálních drobných i větších vazivových jizev; (B) d - degenerující myocyt s výrazně vakuolizovanou cytoplazmou. C,F: **dexrazoxanová skupina** – v podstatě není rozdíl v porovnání s kontrolami. A-C: Barvení Picro-sirius Red, světlé pole; D-F: Barvení Picro-sirius Red, polarizované světlo. Měřítko: 50 μm .

3.5. Hodnocení apoptózy v myokardu levé komory

3.5.1. TUNEL assay

U kontrolních zvířat byl zaznamenán pouze velmi malý počet TUNEL-pozitivních jader v hodnocené ploše myokardu (obr. 29A). Na druhou stranu 10-týdenní podávání

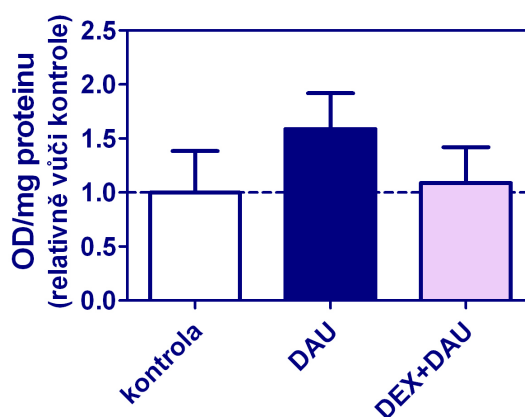
daunorubicinu jednoznačně navodilo nárůst počtu TUNEL-pozitivních jader oproti kontrolní skupině, což bylo potvrzeno kvantitativní a statistickou analýzou výsledků (obr. 29B,D). Většina TUNEL pozitivních jader byla nalezena v kardiomyocytech, u kterých nebyly pozorovány typické degenerativní změny, popř. tyto změny byly přítomné jen v počátečním stádiu. V dexrazoxanové skupině byl pozorován pokles počtu TUNEL-pozitivních jader téměř k hodnotám stanoveným u kontrolních zvířat (obr. 29C,D). Korelační analýza odhalila významný vztah mezi tímto parametrem apoptózy a systolickou funkcí levé komory (obr. 29E).



Obr. 29. A-C) Reprezentativní obrázky myokardu levé komory značeného TUNEL metodou u kontrolní (A), daunorubicinové (B) a dexrazoxanové (C) skupiny. Šipka označuje příklad TUNEL pozitivních jader. Měřítka: 20 μ m. D) Kvantitativní analýza TUNEL assay. Statistická významnost (ANOVA, $p < 0,05$) v porovnání s daunorubicinovou skupinou (d). E) Korelace hodnot frakčního zkrácení (FS) levé komory s počtem TUNEL pozitivních jader/mm² u jednotlivých zvířat s užitím Spearmanovy neparametrické korelační metody.

3.5.2. Cell death Detection Assay

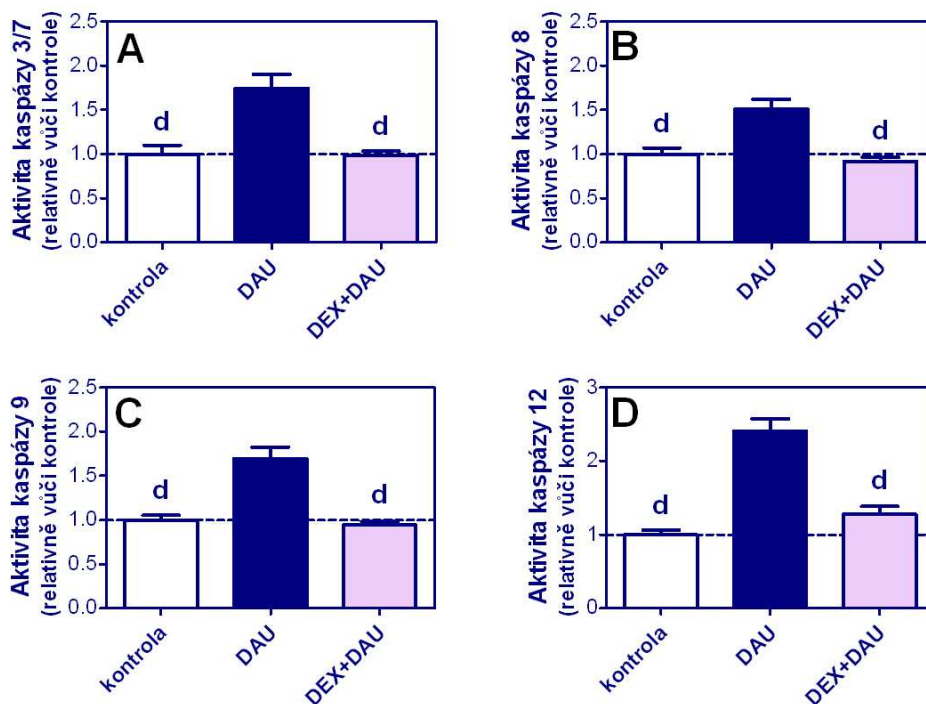
Ke stanovení apoptózy v myokardu levé komory byla dále zvolena imunochemická metoda určená k detekci fragmentace DNA. Tato metoda je primárně určena pro *in vitro* pokusy na buněčných kulturách, přesto jsme ji vyzkoušeli i našem experimentálním *in vivo* modelu za účelem porovnání výsledků s běžně užívanou TUNEL assay. V daunorubicinové skupině byl nalezen určitý trend ve zvýšení počtů fragmentů DNA, zatímco v dexrazoxanové skupině výsledky odpovídaly hodnotám u kontrolní skupiny (obr. 30). V důsledku vyšší variability výsledků žádná ze změn však nedosáhla statistické významnosti.



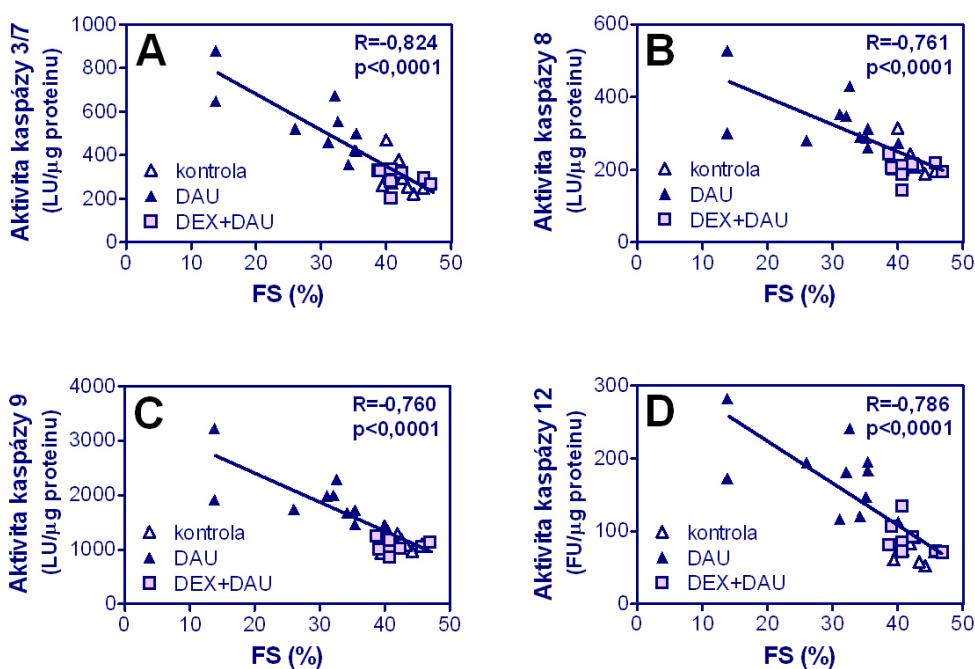
Obr. 30. Stanovení apoptózy pomocí imunochemické detekce fragmentace DNA.

3.5.3. Stanovení aktivity kaspáz

Ve shodě s výsledky TUNEL assay bylo zjištěno, že podání daunorubicinu vedlo k statisticky významnému zvýšení aktivity kaspáz 3/7 v porovnání s kontrolní skupinou, přičemž podání dexrazoxanu před každou dávkou antracyklinu dovedlo kompletně těmto uvedeným změnám zabránit (obr. 31A). Při zaměření na jednotlivé cesty aktivace apoptózy jsme zjistili, že podání samotného daunorubicinu významně ovlivnilo všechny hlavní 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) (obr. 31B-D). Podání dexrazoxanu velmi účinně zabránilo aktivaci všech uvedených apoptotických cest. Nebyly zjištěny žádné rozdíly v proteolytické aktivitě jednotlivých kaspáz mezi kontrolní a dexrazoxanovou skupinou (obr. 31). Obdobně jako u TUNEL metody aktivity kaspáz signifikantně a velmi těsně korelovaly se systolickou srdeční funkcí (obr. 32A-D).



Obr. 31. A-D) Aktivita kaspáz v myokardu levé komory: kaspáza 3/7 (A), kaspáza 8 (B), kaspáza 9 (C) a kaspáza 12 (D). Statistická významnost (ANOVA, $p < 0,05$) v porovnání s daunorubicinovou skupinou (d).

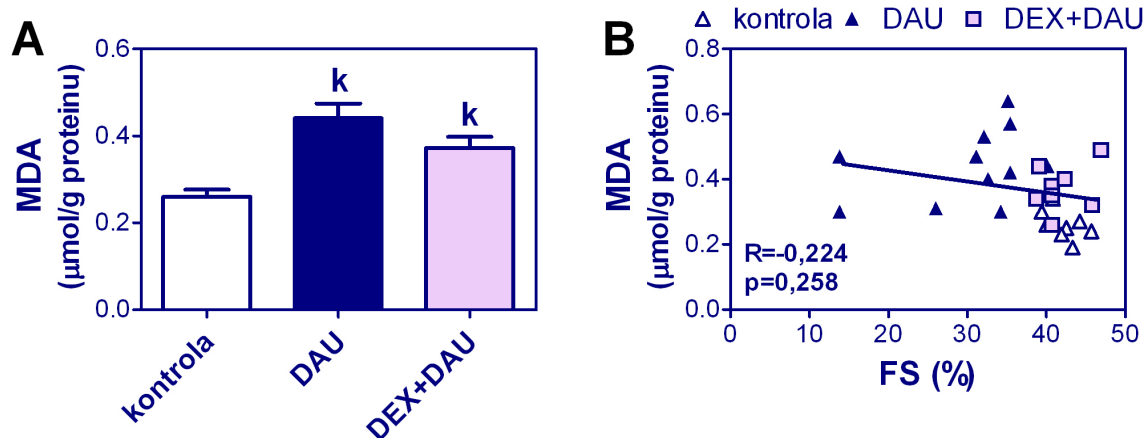


Obr. 32. Korelace systolické funkce levé komory (frakční zkrácení, FS) s aktivitami kaspáz u jednotlivých zvířat s užitím Spearmanovy neparametrické korelační metody: kaspáza 3/7 (A), kaspáza 8 (B), kaspáza 9 (C) a kaspáza 12 (D). LU – luminiscenční jednotka, FU – fluorescenční jednotka.

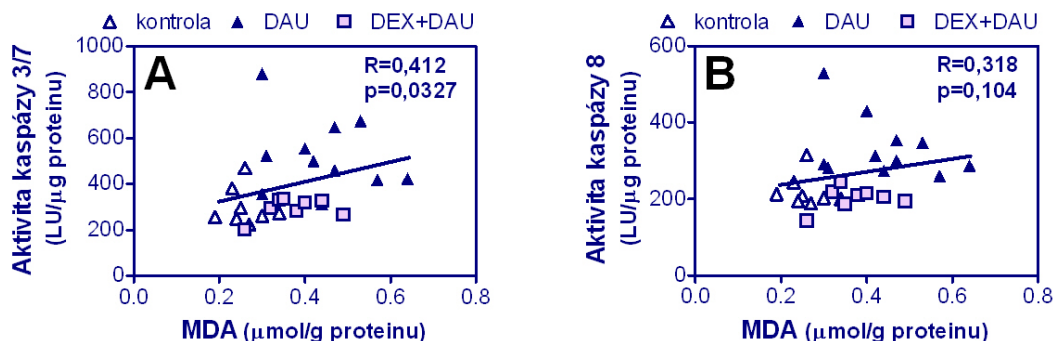
3.6. Hodnocení lipoperoxidace v myokardu levé komory

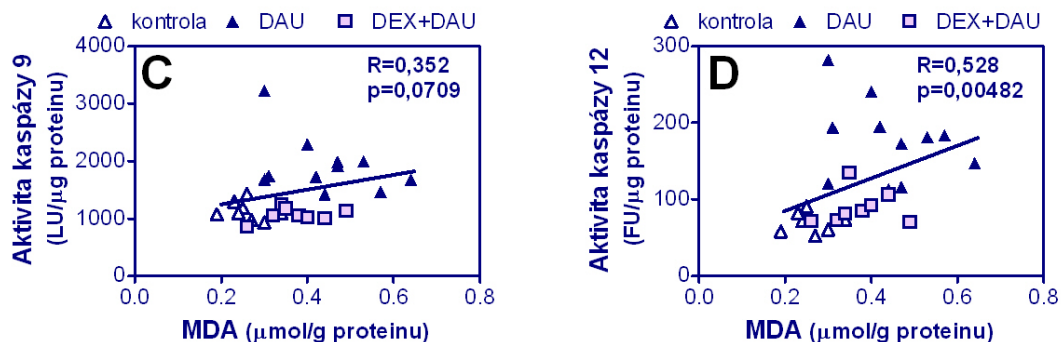
3.6.1. Stanovení celkového malondialdehydu

U daunorubicinových zvířat byla selektivní HPLC metodou stanovena zvýšená koncentrace celkového malondialdehydu v myokardu levé komory. Podání dexrazoxanu nebylo překvapivě spojeno s významným poklesem celkového množství malondialdehydu. U této skupiny byly hodnoty malondialdehydu statisticky téměř srovnatelné s hodnotami naměřenými u samotné daunorubicinové skupiny (obr. 33A). Při korelační analýze byla prokázána velmi slabá korelace s aktivitou kaspázy 3 (obr. 34A) a nesignifikantní vztah s aktivitou kaspázy 8 a 9 (obr. 34B,C). Byl nalezen i nevýznamný vztah mezi myokardiální koncentrací malondialdehydu a levokomorovou systolickou funkcí (obr. 33B).



Obr. 33. A) Množství celkového malondialdehydu (MDA) v myokardu levé komory vztažené na koncentraci proteinu. Statistická významnost (ANOVA, $p<0,05$) v porovnání s kontrolní skupinou (k). B) Korelace množství celkového malondialdehydu (MDA) myokardu levé komory se systolickou funkcí levé komory u jednotlivých zvířat s užitím Spearmanovy neparametrické korelační metody.

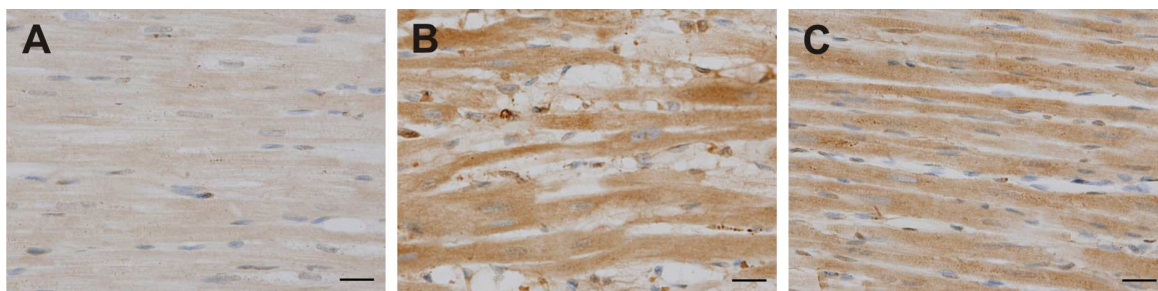




Obr. 34. A-D) Korelace množství malondialdehydu (MDA) v myokardu levé komory s aktivitou kaspáz u jednotlivých zvířat s užitím Spearmanovy neparametrické korelační metody: kaspáza 3/7 (A), kaspáza 8 (B), kaspáza 9 (C) a kaspáza 12 (D). LU – luminiscenční jednotka, FU – fluorescenční jednotka.

3.6.2. Imunohistochemické hodnocení 4-hydroxynonalu

Vedle celkového malondialdehydu byl hodnocen i další marker peroxidace lipidů. Jednalo se o imunohistochemické stanovení 4-hydroxynonalu (4-HNE) v parafinových řezech myokardu levé komory. V daunorubicinové skupině byla nalezena významně zvýšená imunoreaktivita na 4-HNE v porovnání s kontrolní skupinou (obr. 35A,B). Signál 4-HNE byl především lokalizován uvnitř kardiomyocytů, zatímco buňky intersticia vykazovaly velmi nízkou imunoreaktivitu. V dexrazoxanové skupině byla pozorována srovnatelná intenzita signálu jako u daunorubicinové skupiny (obr. 35C). Ačkoliv u této skupiny byla patrná místa, kde intenzita signálu byla částečně potlačena, celková imunoreaktivita zůstala odlišná od kontrolní skupiny. Mezi daunorubicinovou a dexrazoxanovou skupinou nebyly zjištěny žádné významné rozdíly v lokalizaci signálu 4-HNE v myokardu levé komory.

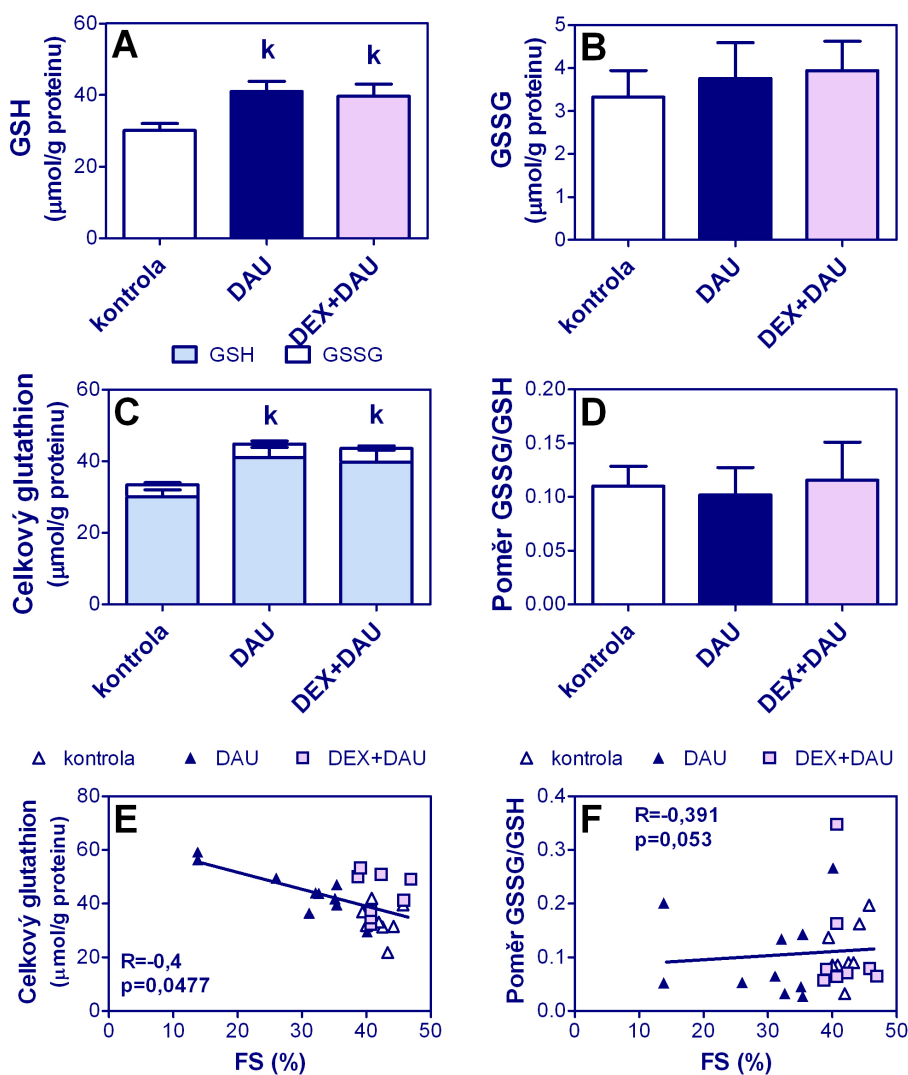


Obr. 35. A-C) Reprezentativní obrázky myokardu levé komory značeného 4-hydroxynonalem u kontrolní (A), daunorubicinové (B) a dexrazoxanové (C) skupiny.

3.6.3. Stanovení glutathionu v myokardu levé komory

V daunorubicinové skupině byla zjištěna signifikantně zvýšená koncentrace redukované formy glutathionu v porovnání s kontrolní skupinou, nicméně množství

oxidované formy zůstalo zachováno na hodnotách srovnatelných s kontrolními zvířaty. V souladu se zvýšeným množstvím redukované formy narůstalo v daunorubicinové skupině i množství celkového glutathionu. Obdobný trend jako u daunorubicinové skupiny byl nalezen i ve skupině, kde byl podáván dexrazoxan společně s daunorubicinem (obr. 36A-C). Při analýze výsledků s glutathionem jsme se zaměřili i na poměr jeho oxidované a redukované formy, který může naznačovat míru tendence ke tvorbě ROS. Mezi experimentálními skupinami nebyl nalezen žádný rozdíl (obr. 36D). Při korelační analýze hodnot poměru oxidované a redukované formy glutathionu s frakčním zkrácením levé komory nebyl nalezen žádný významný vztah (obr. 36F). Naopak byla prokázána velmi slabá korelace na hranici statistické významnosti mezi celkovým množstvím glutathionu a systolickou funkcí levé komory (obr. 36E).



Obr. 36. A-C) Množství redukovaného (GSH), oxidovaného (GSSG) a celkového glutathionu v srdeční tkáni levé komory. D) Poměr redukované a oxidované formy glutathionu u jednotlivých zvířat. Statistická významnost (ANOVA, $p < 0,05$) v porovnání s kontrolní skupinou (k). E-F) Korelace systolické

funkce levé komory (frakční zkrácení, FS) s množstvím celkového glutathionu (E) a s poměrem oxidované a redukované formy glutathionu u jednotlivých zvířat s užitím Spearmanovy neparametrické korelační metody.

3.6.4. Hematologické a biochemické parametry

V krvi zvířat z daunorubicinové skupiny byl stanoven významně snížený počet erytrocytů a leukocytů, snížená koncentrace hemoglobinu a hematokritu. V průběhu pokusu byly nalezeny i zvýšené hodnoty středního objemu erytrocytů a šíře rozptylu červených krvinek. Podání dexrazoxanu nedokázalo zabránit výše uvedeným změnám v jednotlivých hematologických parametrech navozených podáním cytostatika. Tyto hematologické nálezy tak poukazují na možnou přítomnost myelosuprese a anémie u obou skupin pokusných zvířat. Jednotlivé hematologické parametry jsou shrnuty v tab. 13.

Tab. 13. Vybrané hematologické parametry. Statistická významnost (ANOVA, $p < 0,05$) v porovnání s kontrolní skupinou (k) a párový t -test ($p < 0,05$) v porovnání s počáteční hodnotou (*). MCV - střední objem erytrocytů a RDW - šíře rozptylu červených krvinek.

Parametr/skupina	Začátek studie	Před 5. aplikací	Na konci studie
Leukocyty (x 10⁹/l)			
Kontrola	6,17 ± 0,50	6,92 ± 0,36	3,80 ± 0,18 *
DAU	6,39 ± 0,54	4,82 ± 0,41 *k	2,75 ± 0,38 *
DEX+DAU	5,62 ± 0,78	4,69 ± 0,73 *k	2,68 ± 0,73 *
Erytrocyty (x 10¹²/l)			
Kontrola	6,13 ± 0,17	6,16 ± 0,06	6,16 ± 0,12
DAU	6,04 ± 0,19	4,26 ± 0,24 *k	4,02 ± 0,30 *k
DEX+DAU	6,02 ± 0,14	4,27 ± 0,18 *k	4,16 ± 0,10 *k
Hemoglobin (g/l)			
Kontrola	128,9 ± 3,1	132,3 ± 2,0	131,6 ± 2,5
DAU	133,4 ± 3,7	94,2 ± 4,9 *k	84,9 ± 6,7 *k
DEX+DAU	131,9 ± 2,7	95,5 ± 4,8 *k	91,8 ± 1,6 *k
Hematokrit			
Kontrola	0,407 ± 0,009	0,429 ± 0,008	0,412 ± 0,013
DAU	0,425 ± 0,011	0,314 ± 0,015 *k	0,287 ± 0,020 *k
DEX+DAU	0,416 ± 0,009	0,315 ± 0,015 *k	0,307 ± 0,005 *k
MCV (fl)			
Kontrola	66,4 ± 0,7	69,6 ± 1,0 *	66,7 ± 1,0
DAU	70,6 ± 1,2 k	74,0 ± 1,6 *	71,8 ± 1,2 k
DEX+DAU	69,2 ± 0,9	73,9 ± 1,9	73,9 ± 1,1 *k
RDW (%)			
Kontrola	15,5 ± 0,6	14,7 ± 0,3	14,4 ± 0,5
DAU	15,7 ± 0,6	18,5 ± 0,8 *k	19,7 ± 0,9 *k
DEX+DAU	15,3 ± 0,6	19,5 ± 1,3 *k	21,8 ± 1,5 *k
Trombocyty (x 10⁹/l)			
Kontrola	290,6 ± 26,8	287,8 ± 29,8	306,0 ± 49,7
DAU	249,6 ± 22,3	176,5 ± 21,3*	124,8 ± 13,5*k
DEX+DAU	223,5 ± 17,5	242,8 ± 47,5	210,2 ± 30,2

Výsledky z biochemické analýzy jsou shrnuty v tab. 14. Opakované podávání daunorubicinu navodilo statisticky významné změny v parametrech spojených s poškozením ledvin a metabolismem lipidů (např. kreatinin, cholesterol, triacylglyceridy). Společné podání dexrazoxanu s daunorubicinem zabránilo na druhou stranu rozvoji většiny uvedených změn. Snížená plazmatická koncentrace železa byla zjištěna v daunorubicinové i dexrazoxanové skupině.

Tab. 14. Vybrané biochemické parametry. Statistická významnost (ANOVA, $p < 0,05$) v porovnání s kontrolní (k) a daunorubicinovou (d) skupinou a párový t -test ($p < 0,05$) v porovnání s počáteční hodnotou (*). TAG - triacylglyceridy, ALT - alaninaminotransferáza, AST - aspartátaminotransferáza.

Parametr/skupina	Začátek studie	Před 5. aplikací	Na konci studie
Železo ($\mu\text{mol/l}$)			
Kontrola	31,8 \pm 3,5	36,2 \pm 2,8	26,3 \pm 1,4
DAU	35,7 \pm 2,6	19,5 \pm 2,9 * k	19,7 \pm 4,1 *
DEX+DAU	42,7 \pm 3,5	19,9 \pm 3,4 * k	36,9 \pm 5,8 d
Vápník (mmol/l)			
Kontrola	3,14 \pm 0,05	3,34 \pm 0,04 *	3,00 \pm 0,06
DAU	3,20 \pm 0,04	3,33 \pm 0,06	2,87 \pm 0,09 *
DEX+DAU	3,11 \pm 0,05	3,32 \pm 0,06 *	2,95 \pm 0,05 *
Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)			
Control	82,8 \pm 4,2	95,1 \pm 4,2 *	89,0 \pm 4,1
DAU	91,1 \pm 8,0	127,1 \pm 11,1 * k	262,0 \pm 112,9 * k
DEX+DAU	97,5 \pm 6,2	112,5 \pm 5,8	102,4 \pm 6,3
Močovina (mmol/l)			
Kontrola	5,83 \pm 0,51	7,58 \pm 0,31 *	6,65 \pm 0,25
DAU	7,11 \pm 0,92	7,25 \pm 0,40	12,70 \pm 4,26
DEX+DAU	8,08 \pm 0,47	7,08 \pm 0,58	6,18 \pm 0,38 *
Protein (g/l)			
Kontrola	59,8 \pm 0,7	65,7 \pm 1,6 *	60,9 \pm 1,0 d
DAU	61,9 \pm 1,4	60,6 \pm 1,3 k	49,1 \pm 1,6 *
DEX+DAU	65,7 \pm 1,7 k	63,1 \pm 0,8	62,0 \pm 1,2 d
Cholesterol ($\mu\text{mol/l}$)			
Kontrola	1,47 \pm 0,14	1,75 \pm 0,23	1,49 \pm 0,13 d
DAU	1,43 \pm 0,16	2,52 \pm 0,52	3,65 \pm 0,44 *
DEX+DAU	1,60 \pm 0,33	1,40 \pm 0,18	1,33 \pm 0,14 d
TAG (mmol/l)			
Kontrola	0,86 \pm 0,06	0,62 \pm 0,09 * d	0,82 \pm 0,08 d
DAU	1,19 \pm 0,17	1,10 \pm 0,14	3,73 \pm 0,94 *
DEX+DAU	0,80 \pm 0,10	0,62 \pm 0,06 d	0,88 \pm 0,09 d
ALT ($\mu\text{kat/l}$)			
Kontrola	0,96 \pm 0,20	0,77 \pm 0,05	0,76 \pm 0,07
DAU	1,00 \pm 0,10	0,73 \pm 0,05 *	0,72 \pm 0,15 *
DEX+DAU	0,76 \pm 0,10	0,74 \pm 0,10	0,74 \pm 0,11

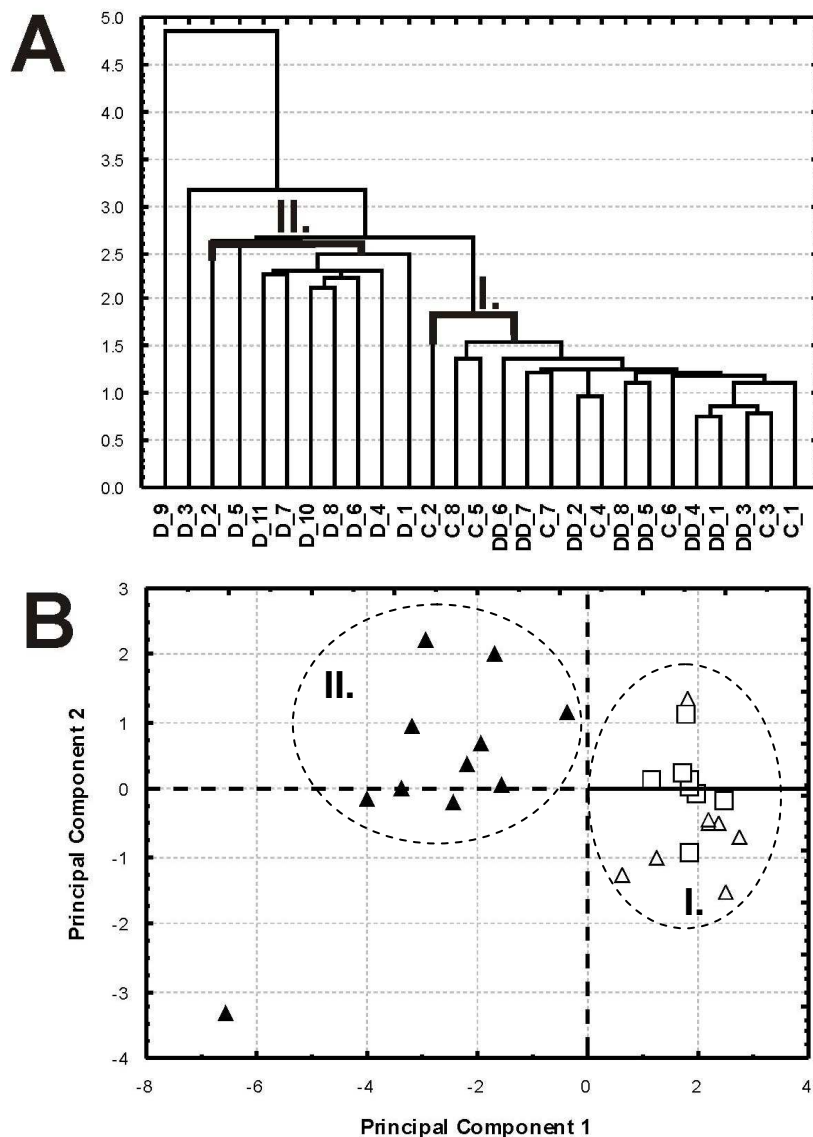
AST ($\mu\text{kat/l}$)			
Kontrola	0,64 \pm 0,09	0,57 \pm 0,05	0,50 \pm 0,06
DAU	0,71 \pm 0,15	0,40 \pm 0,05 *	0,51 \pm 0,18 *
DEX+DAU	0,59 \pm 0,08	0,46 \pm 0,04	0,49 \pm 0,05

3.7. Histologické hodnocení orgánů

V dexrazoxanové skupině byl zaznamenán i protektivní účinek vůči toxickému poškození ledvin navozeném opakovaným podáváním daunorubicinu. U většiny zvířat z této skupiny byly dokumentovány pouze mírnější změny postihující především proximální tubuly. Jen u dvou případů bylo nalezeno významnější poškození ledvin, které se vyznačovalo počátečními znaky intersticiální nefritidy, nicméně tyto změny nedosahovaly takového charakteru a rozsahu jako u daunorubicinové skupiny. Při histologickém hodnocení jater byl shledán převážně normální vzhled parenchymu, ojediněle byly přítomné mírnější změny, které byly však pozorované i u kontrolní skupiny.

3.8. Explorativní statistická analýza

Hierarchické shlukování (obr. 37A) a analýza hlavních komponent (obr. 37B) byly použity ke sledování shlukování 27 zvířat v závislosti na hodnocené systolické funkci levé komory (FS a dP/dt_{\max}), plazmatických koncentrací srdečního troponinu T a I, markerů apoptózy (TUNEL pozitivita a aktivita kaspáz) a markeru lipoperoxidace. Obě nezávislé explorativní statistické analýzy vedly ke shlukování všech hodnocených zvířat do dvou zřetelně oddělených shluků. V prvním shluku (I) byli zahrnuti králíci z kontrolní a dexrazoxanové skupiny, zatímco zvířata z daunorubicinové skupiny jsme mohli nalézt v druhém shluku (II). Téměř všechna zvířata z daunorubicinové 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.

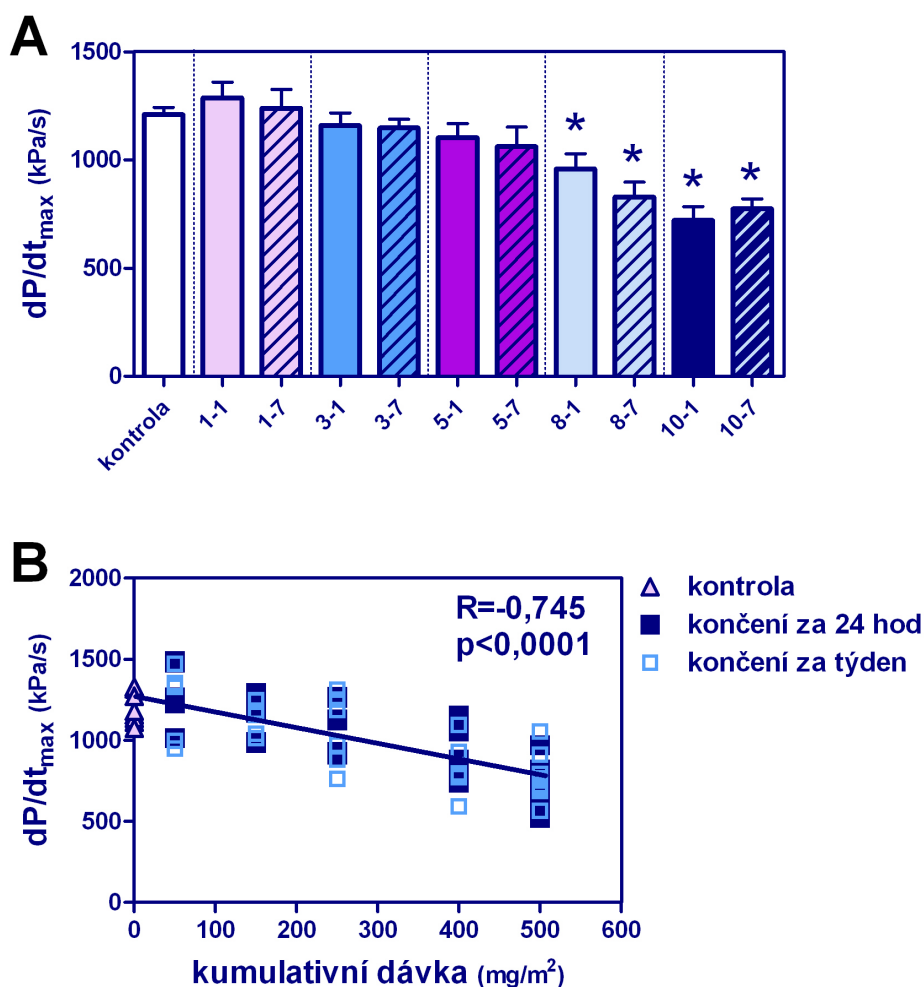


Obr. 37. A) Hierarchické shlukování (Hirerarchical Tree Clustering) všech hodnocených funkčních parametrů, plazmatických koncentracích srdečních troponinu T a I, markerů apoptózy a lipoperoxidace (9 proměnných) u všech pokusných zvířat. Analýza rozdělila zkoumané objekty do dvou hlavních shluků. První shluk (I) zahrnuje zvířata z kontrolní (C) a dexrazoxanové (DD) skupiny, zatímco druhý shluk (II) obsahuje pouze všechna zvířata z daunorubicinové (D) skupiny až na výjimku dvou zvířat, u kterých bylo zaznamenáno nejvýznamnější postižení srdce vedoucí k předčasnému úhynu. **B) Analýza hlavních komponent** (PCA, Principal Component Analysis). Tato analýza rozdělila stejné proměnné opět do dvou zřetelně separovaných shluků. V prvním můžeme nalézt zvířata z kontrolní a dexrazoxanové skupiny a v druhém shluku zvířata jen z daunorubicinové skupiny. Zkoumané skupiny: kontrolní (Δ), daunorubicinová (\blacktriangle) a dexrazoxanová (\square).

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

4.1. Hodnocení srdeční funkce

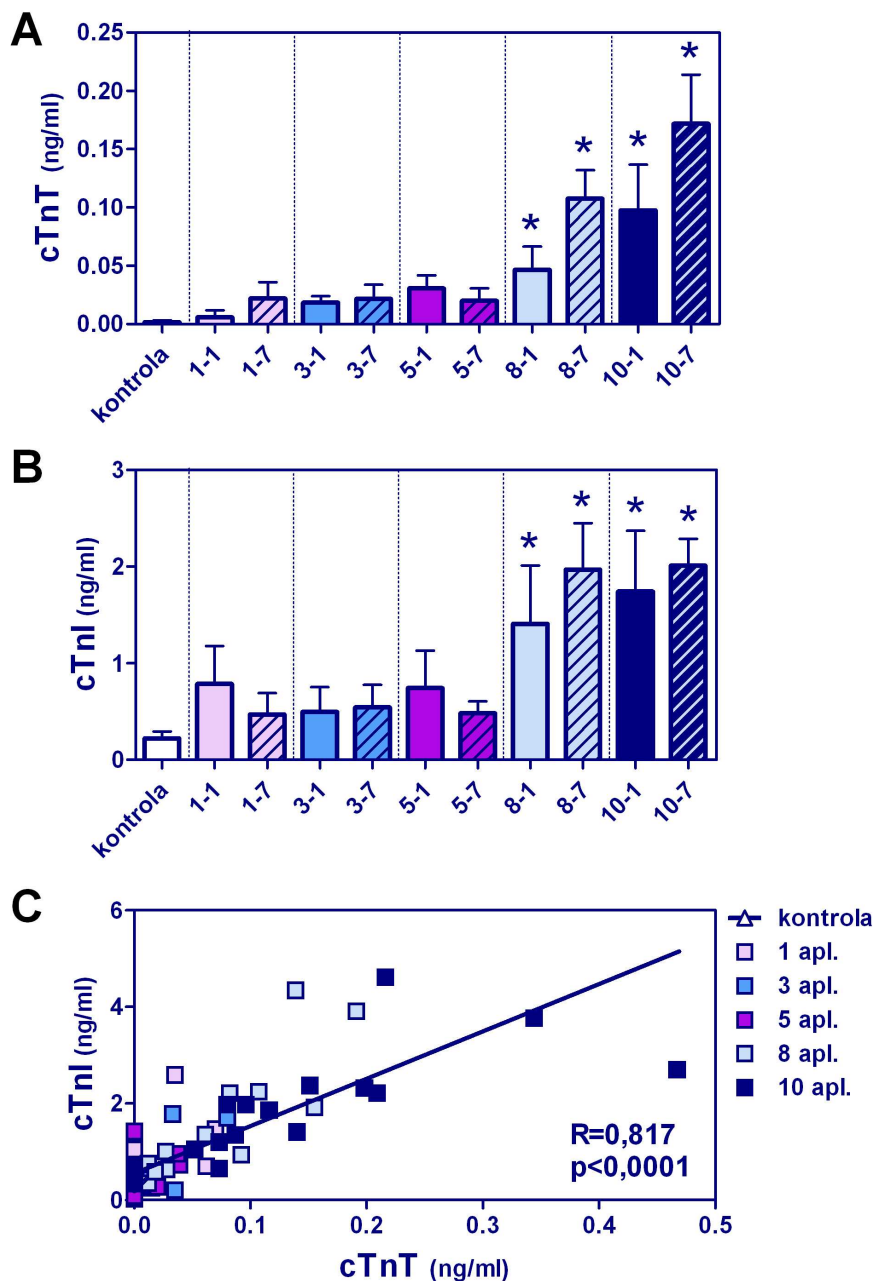
Během studie byl přítomen progresivní pokles parametru kontraktility levé komory (index dP/dt_{max}). U zvířat, která byla usmrcena 24 hodin po 8. aplikaci cytostatika (kumulativní dávka daunorubicinu 400 mg/m^2), byl již pokles indexu dP/dt_{max} statisticky významný v porovnání s kontrolní skupinou (obr. 38A). Byl nalezen i významný vztah mezi systolickou funkcí levé komory a dosaženou kumulativní dávkou daunorubicinu v průběhu rozvoje chronické antracyklinové kardiotoxicity (obr. 38B).



Obr. 38. A) Kontraktilita levé komory (dP/dt_{max}) u jednotlivých skupin v průběhu rozvoje chronické daunorubicinové kardiotoxicity. Statistická významnost (ANOVA, $p < 0,05$) v porovnání s kontrolní skupinou (*). B) Korelace systolické funkce levé komory s dosaženou kumulativní dávkou daunorubicinu u jednotlivých zvířat s užitím Spearmanovy neparametrické korelační metody.

4.2. Stanovení plazmatické koncentrace srdečních troponinů

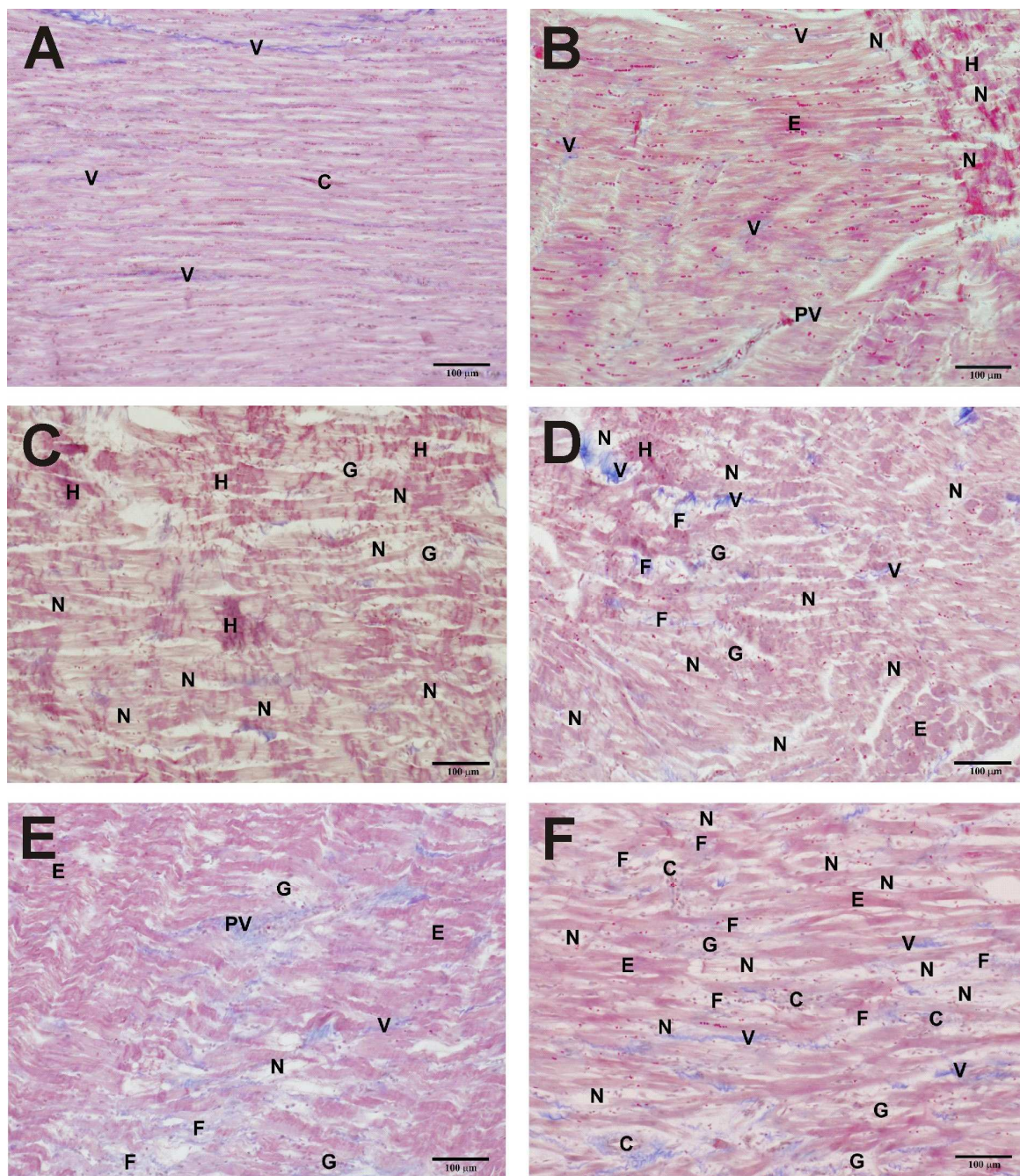
S poklesem funkce levé komory korespondovaly i hodnoty srdečního troponinu T (obr. 39A) a I (obr. 39B), jejichž plazmatické koncentrace se významně zvyšovaly od stejného časového intervalu (8. týden) oproti kontrolním hodnotám. Na závěr provedená korelační analýza odhalila i významný vztah mezi oběma srdečními markery (obr. 39C).



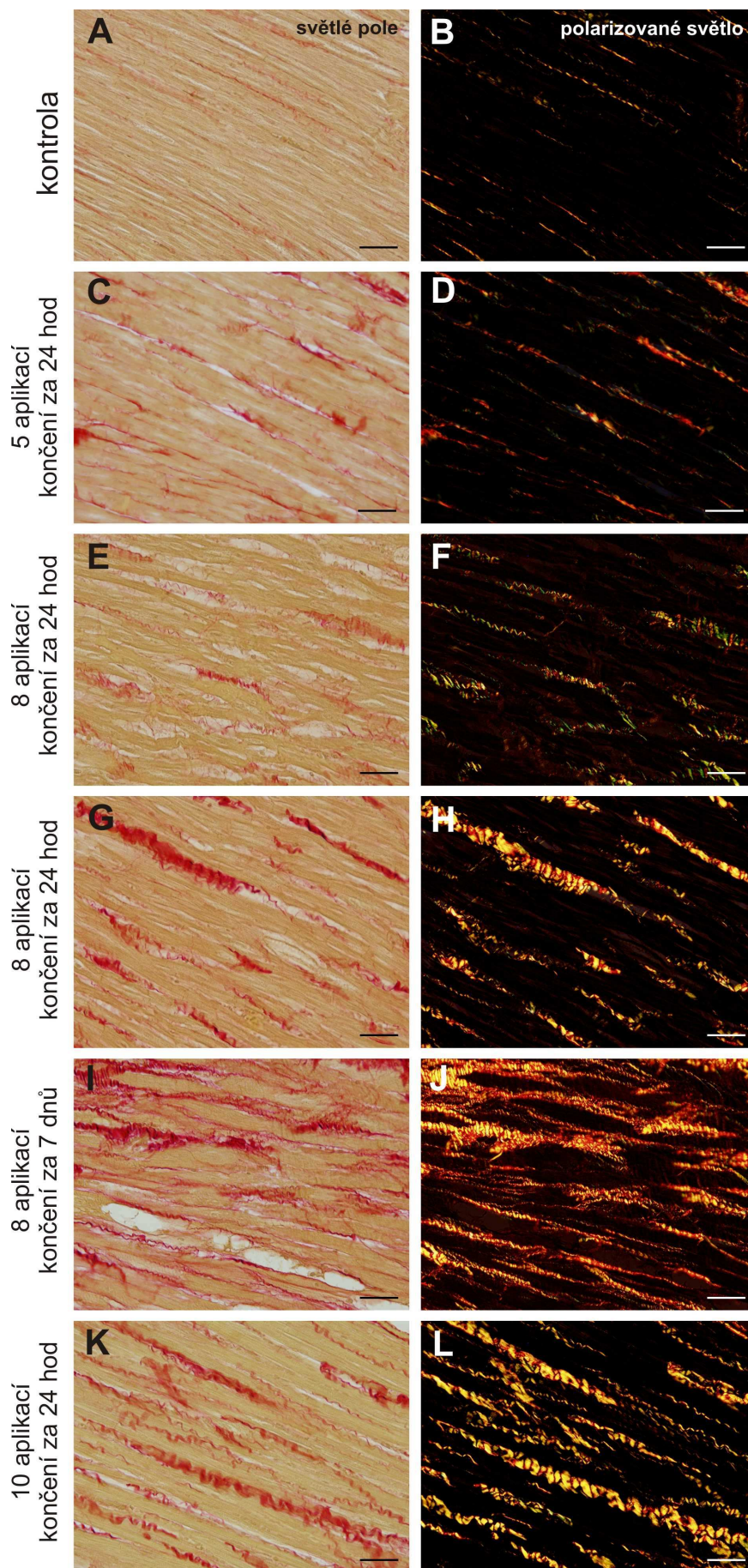
Obr. 39. A) Plazmatické koncentrace troponinu T (cTnT) a B) troponinu I (cTnI) u jednotlivých skupin v průběhu rozvoje chronické daunorubicinové kardiotoxicity. Statistická významnost (ANOVA, $p<0,05$) v porovnání s kontrolní skupinou (*). C) Vzájemná korelace obou srdečních troponinů s užitím Spearmanovy neparametrické korelační metody.

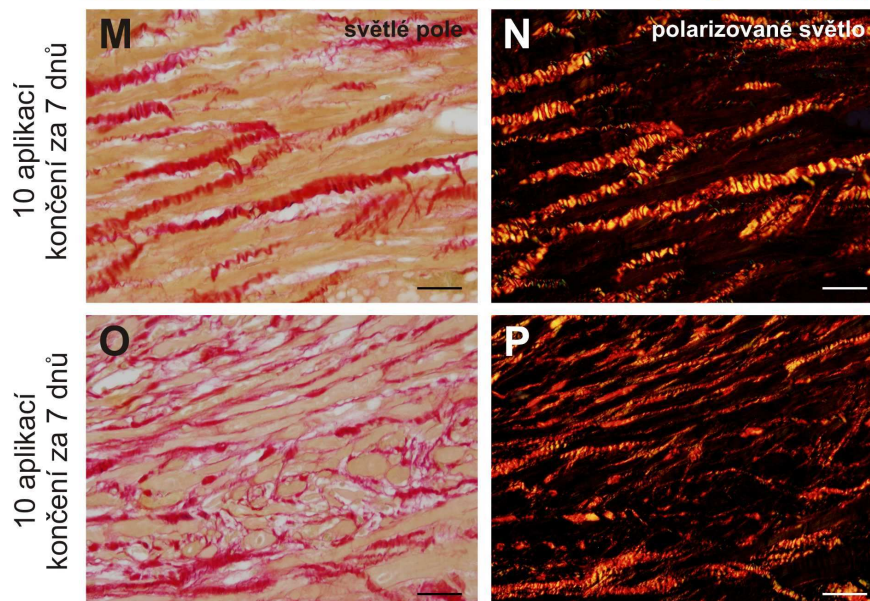
4.3. Histologické hodnocení

Výše zmíněným výsledkům odpovídal i histologický nález. Do 5. týdne (kumulativní dávka daunorubicinu 250 mg/m^2) byly zaznamenány mírné změny v morfologii srdce v porovnání s kontrolní skupinou (obr. 40A,B). Ojedinele se vyskytovalo jemné intersticiální vazivo, které bylo tvořeno oběma typy kolagenu I a III (obr. 41C,D). Husté kolagenní vazivo bylo přítomno pouze okolo cév. V tomto případě červené zbarvení širších svazků kolagenních vláken ukazovalo na přítomnost kolagenu I. K výraznějším morfologickým změnám docházelo až od 8. aplikace cytostatika. V myokardech levé komory, které byly odebrány za 24 hodin po 8. aplikaci cytostatika (kumulativní dávka daunorubicinu 400 mg/m^2), byly zaznamenány různé stupně buněčné degenerace, která se vyznačovaly přítomností cytoplazmatické vakuolizace a postupnou ztrátou myofibril. U kardiomyocytů, které byly v konečném stádiu buněčné degenerace, byl patrný buněčný edém a progresivní buněčná desintegrace (obr. 40C). Vyšší přítomnost zelených retikulárních vláken ukazovala na počátek procesu hojení, které je typické pro typ III kolagenu (obr. 41E,F). V některých místech byla patrná žlutě zbarvená čerstvá kolagenní vlákna odpovídající pokročilému stádiu reparace (obr. 41G,H). Při porovnání myokardů odebraných za 24 hodin a za týden po 8. aplikaci daunorubicinu byl zjištěn nepatrný rozdíl v histologickém nálezu (obr. 40C,D). Zvyšoval se počet buněk podléhající degeneraci a následné neprogramované buněčné smrti. Polarizované světlo odhalilo i postupné vyzrávání kolagenu. Byla častěji patrná silnější žlutá kolagenní vlákna (obr. 41I,J). Další zvýšení kumulativní dávky vedlo k vystupňování změn v morfologii levé komory, přičemž na konci byly změny nejvýraznější (kumulativní dávka daunorubicinu 500 mg/m^2) (obr. 40E,F). V této fázi bylo již zdokumentováno typické ložiskové poškození levé komory charakteristické pro chronické podávání antracyklinů. Rozsáhlejší ložiska odumřelých buněk byly nahrazována fibrotickou tkání, což se v polarizovaném světle projevilo zvýšenou přítomností červených kolagenních vláken (typ I kolagenu) (obr. 41M,N). V této fázi chronické antracyklinové kardiomyopatie byla patrná významná perivaskulární proliferace (obr. 41O,P).



Obr. 40. Myokard levé komory s nejvýznamnějšími morfologickými změnami v dané skupině. A) kontrolní skupina, **B-F)** skupiny ukončené v různé fázi rozvoje chronické daunorubicinové kardiotoxicity, tj. po 5 aplikacích za 24 hodin (**B**), 8 aplikacích za 24 hodin (**C**), 8 aplikacích za týden (**D**), 10 aplikacích za 24 hodin (**E**) a 10 aplikacích za týden (**F**). V - kolagenní vazivo, PV - perivaskulární kolagenní vazivo, F - fibrotická (jizevnatá) tkáň, C - céva, E - eosinofilie cytoplazmy, N - neprogramovaný zánik kardiomyocytu, G - granulační tkáň, H - hypoxické ložiskové změny. Barvení: Massonův modrý trichrom. Měřítko: 100 µm.

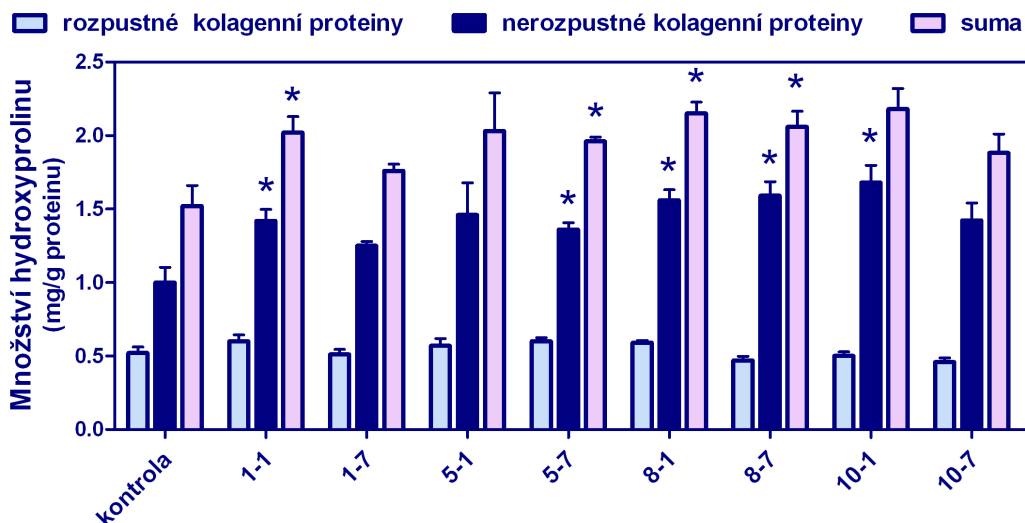




Obr. 41. Histologické hodnocení myokardu levé komory u jednotlivých skupin v průběhu rozvoje chronické antracyklinové kardiotoxicity. Barvení Picro-sirius Red. Měřítko: 50 μm . **A,B)** kontrolní skupina - pouze malé množství řídkého kolagenního vaziva, které je tvořeno vlákny z obou typů kolagenu, tj. typu I (**B** - žlutočervená vlákna) a typu III (**B** - zelená vlákna), **C-P)** skupiny ukončené v různé fázi rozvoje chronické daunorubicinové kardiotoxicity. **C,D)** 5 aplikací za 24 hodin - přítomné pouze jemné intersticiální vazivo tvořené především kolagenem III, které v polarizovaném světle je zeleně zbarvené, **E-H)** 8 aplikací za 24 hodin - dokumentovaný větší počet retikulárních vláken (**F** - zelená), popř. přítomná čerstvá kolagenní vlákna (typ I kolagenu), která v místech s významnějšími morfologickými změnami byla silnější (**F,H** - žlutočervená), **I,J)** 8 aplikací za týden - postupuje proces vyžívání kolagenu, tvorba jemného retikulárního vaziva ustupuje do pozadí navzdory významné proliferaci kolagenních vláken, **K,L)** 10 aplikací za 24 hodin - patrné pokročilé stádium hojení, které se projevuje významným zmnožením intersticiálního vaziva, **M-P)** 10 aplikacích za týden - intenzivní proliferace intersticiálního (**M,N**) a zejména perivaskulárního vaziva (**O,P**) reprezentovaná zejména kolagenními vlákny tvořenými kolagenem typu I (oranžovočervená vlákna).

4.4. Profil kolagenních proteinů levé komory

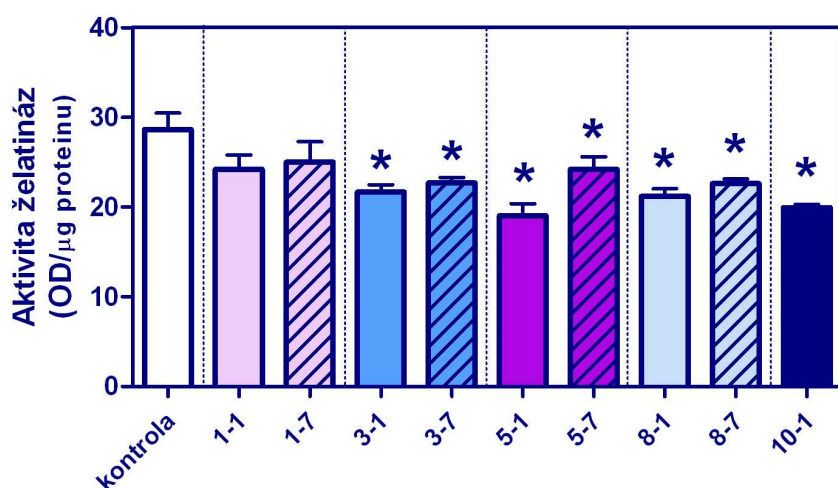
Profil kolagenních proteinů v myokardu levé komory byl vyjádřen na množství hydroxyprolinu v jednotlivých kolagenních frakcích. U celkového množství hydroxyprolinu byl v průběhu rozvoje antracyklinové kardiotoxicity zaznamenán nárůst (obr. 42), který již po první aplikaci daunorubicinu (kumulativní dávka 50 mg/m^2) vykazoval statistickou významnost 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 (obr. 42). Množství hydroxyprolinu v této frakci bylo statisticky významně zvýšeno opět již po první aplikaci daunorubicinu.



Obr. 42. Profil kolagenních proteinů levé komory vyjádřený na množství hydroxyprolinu v jednotlivých kolagenních frakcích. Statistická významnost (ANOVA, $p < 0,05$) v porovnání s kontrolní skupinou (*).

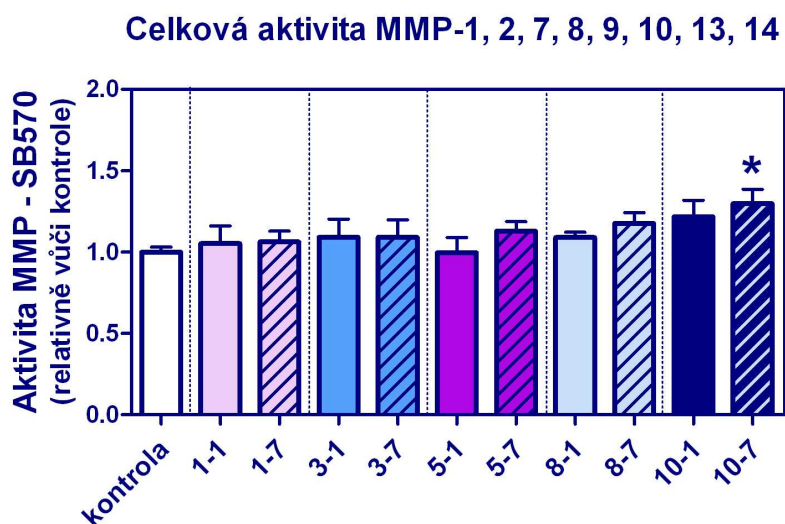
4.5. Stanovení aktivity matrixových metaloproteináz

K hodnocení aktivity želatináz (MMP-2, 9) v myokardiálních vzorcích jsme využili komerční kit MMP Gelatinase Activity Assay Kit. Tato metoda překvapivě odhalila signifikantní pokles celkové aktivity želatináz od 3. týdne podání daunorubicinu. Mezi aktivitami stanovenými ve vzorcích odebraných za 24 hodin a za týden po dané aplikaci cytostatika byl nalezen rozdíl, přičemž u vzorků odebraných v pozdějším intervalu byl patrný určitý rostoucí trend v jejich aktivitě (obr. 43).



Obr. 43. Celková aktivita želatináz hodnocena v průběhu rozvoje chronické antracyklinové kardiotoxicity. Statistická významnost (ANOVA, $p < 0,05$) v porovnání s kontrolní skupinou (*).

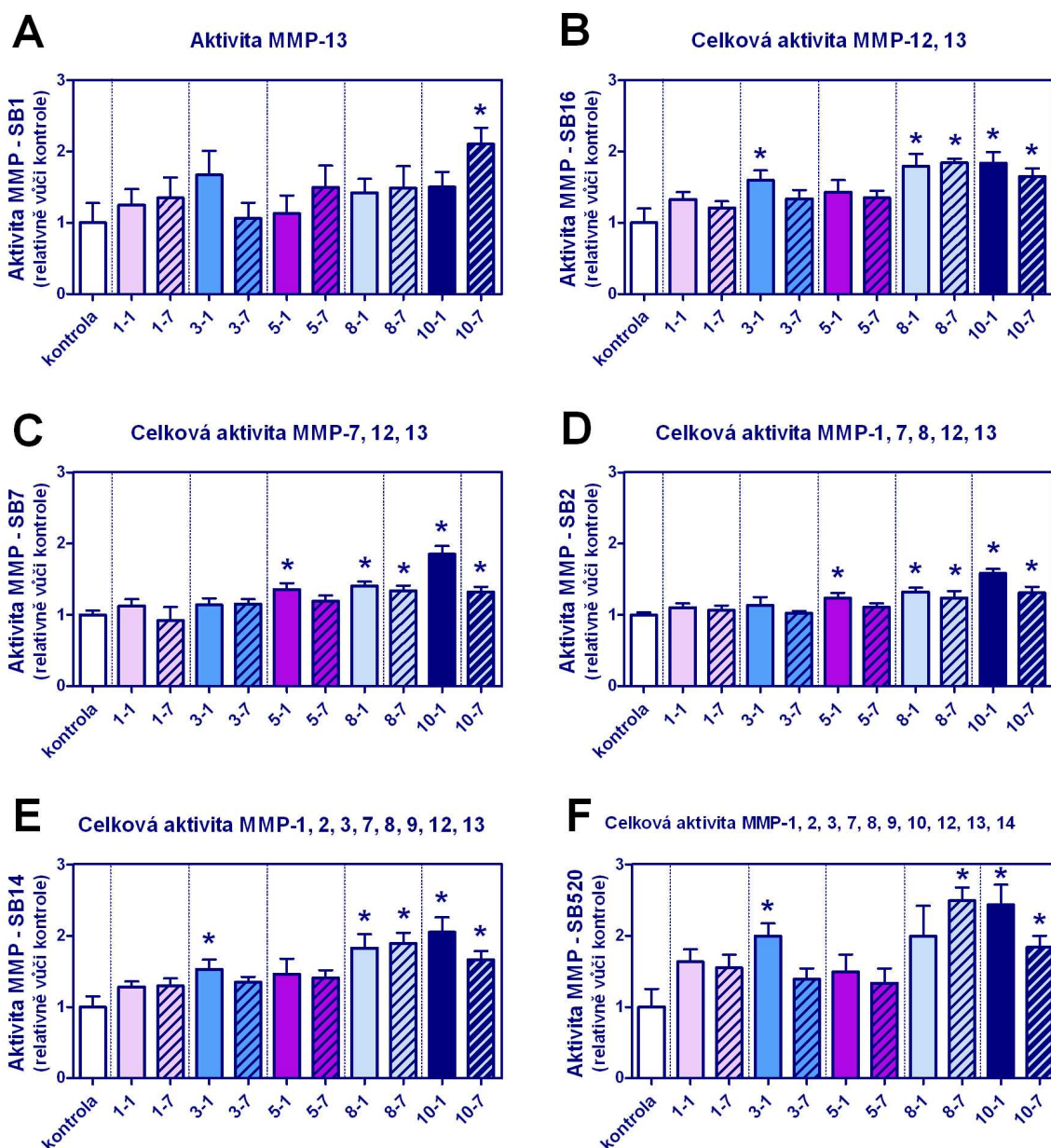
Aktivita dalších MMPs byla stanovena s užitím komerčních kitů SensoLyte™ MMP Assay Kit. Pomocí kitu ze série 570, který zahrnuje specifitu pro MMP-1, 2, 7, 8, 9, 10, 13, 14, jsme nezaznamenali pokles v celkové aktivitě MMPs. Naopak aktivita výše uvedených MMPs v průběhu rozvoje chronické daunorubicinové kardiotoxicity stagnovala a až na konci pokusu došlo k jejímu signifikantnímu zvýšení (obr. 44).



Obr. 44. Celková aktivita matrixových metaloproteináz hodnocena pomocí fluorescenčního kitu SensoLyte™ 570 MMP Assay Kit. Statistická významnost (ANOVA, $p < 0,05$) v porovnání s kontrolní skupinou (*).

Vedle toho jsme použili i kit SensoLyte™ 520 MMP Assay Kit se sérií 6 substrátů (SB520, SB1, SB2, SB7, SB14, SB16). Pro jednotlivou MMP byl z nabídky dostupných substrátů selektivní pouze jeden (substrát SB1), který nám umožnil specificky hodnotit aktivitu MMP-13. V průběhu celého rozvoje antracyklinové kardiotoxicity jsme ovšem zaznamenali signifikantní změnu v aktivitě MMP-13 až na úplném konci pokusu, ačkoliv v první fázi experimentu se takéjevila určitá tendence k jejímu zvýšení (obr. 45A). S použitím substrátu SB16 (se substrátovou specifitou rozšířenou 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 od 8. týdne) (obr. 45B). Substrát (SB7) 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 (obr. 45C). Navíc byl poprvé rozpoznán určitý rozdíl mezi aktivitami naměřenými ve vzorcích odebraných za 24 hodin. Další substrát (SB2) se specifitou rozšířenou o MMP-1 a 8 poskytl téměř identické výsledky s předchozím substrátem (obr. 45D), což nenaznačuje

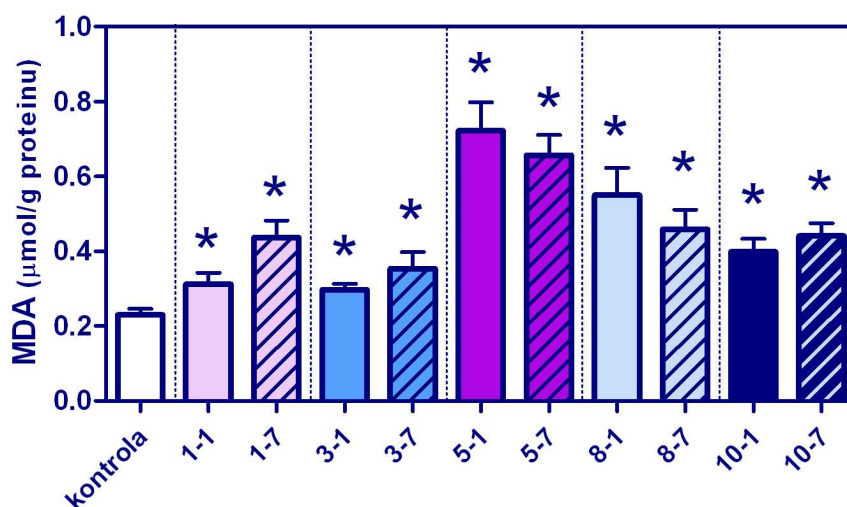
zásadní podíl těchto MMPs. Poslední dva použité substráty (SB14 a SB520) s již poměrně širokou substrátovou specifitou poskytly obdobné výsledky s tendencí ke zvýšení aktivity v první fázi pokusu, následnou stabilizací a signifikantním vzestupem v závěru experimentu (obr. 45E,F). Zásadní souvislost s odstupem po podání jednotlivých dávek cytostatika jsme neidentifikovali. Celkový trend připomínal změny v aktivitě hodnocené pomocí substrátu specifického pro MMP-12 a 13 (SB16, obr. 45B). Relativně nejvýraznější změny byly zjištěny u substrátu s nejmenší specifitou (SB520, obr. 45F).



Obr. 45. A-F) Celková aktivita matrixových metaloproteináz hodnocena pomocí fluorescenčního kitu SensoLyte™ 520 MMP Assay Kit s užitím 6 substrátů (SB), které se od sebe odlišovaly substrátovou specifitou k jednotlivým metaloproteinázám. Statistická významnost (ANOVA, $p < 0,05$) v porovnání s kontrolní skupinou (*).

4.6. Stanovení malondialdehydu v myokardu levé komory

Množství celkového malondialdehydu v srdeční tkáni levé komory bylo změřeno pomocí validované HPLC metody. Již po 1. aplikaci daunorubicinu docházelo k statisticky významnému nárůstu množství malondialdehydu oproti kontrolním hodnotám. Nejvyššímu zvýšení peroxidace lipidů bylo zaznamenáno již po 5. aplikaci cytostatika (kumulativní dávka 250 mg/m²). S dalšími zvyšujícími se kumulativními dávkami daunorubicinu docházelo k poklesu celkového množství tohoto markeru, nicméně jeho hodnoty zůstaly po celou dobu statisticky významně vyšší v porovnání s kontrolní skupinou (obr. 46).

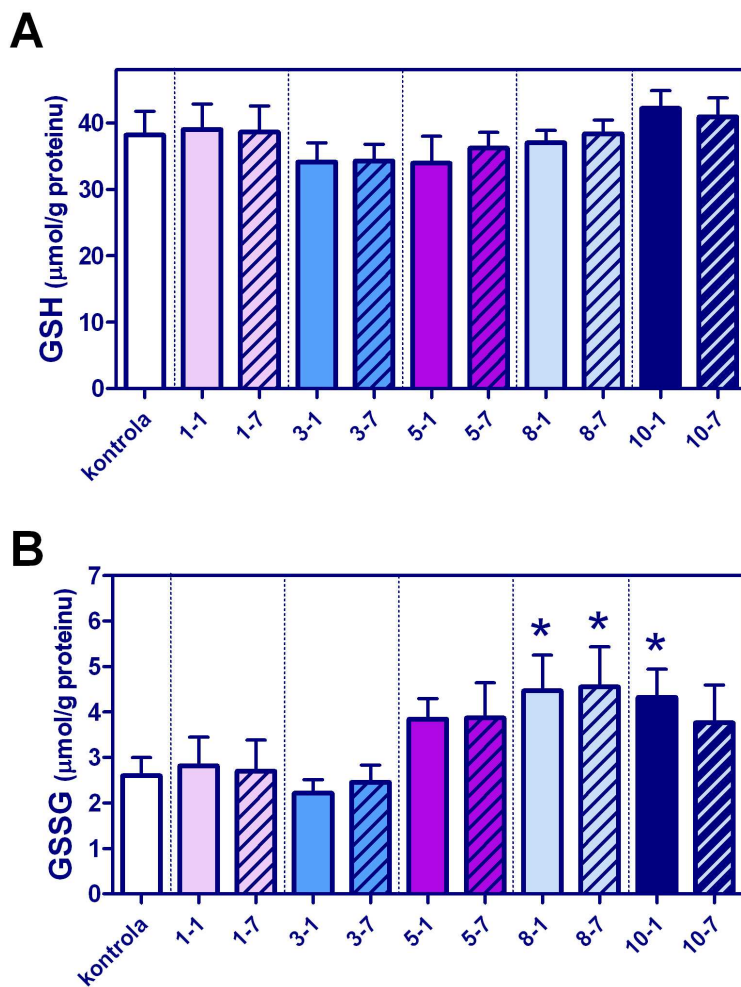


Obr. 46. Množství celkového malondialdehydu v srdeční tkáni levé komory v průběhu rozvoje chronické antracyklinové kardiotoxicity. Statistická významnost (ANOVA, $p < 0,05$) v porovnání s kontrolní skupinou (*).

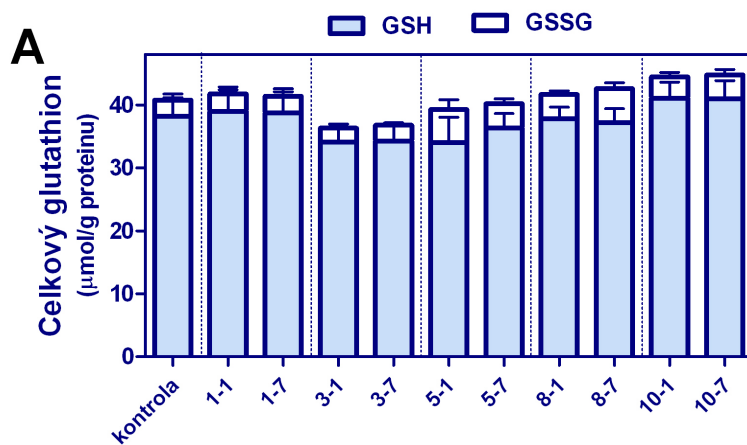
4.7. Stanovení glutathionu v myokardu levé komory

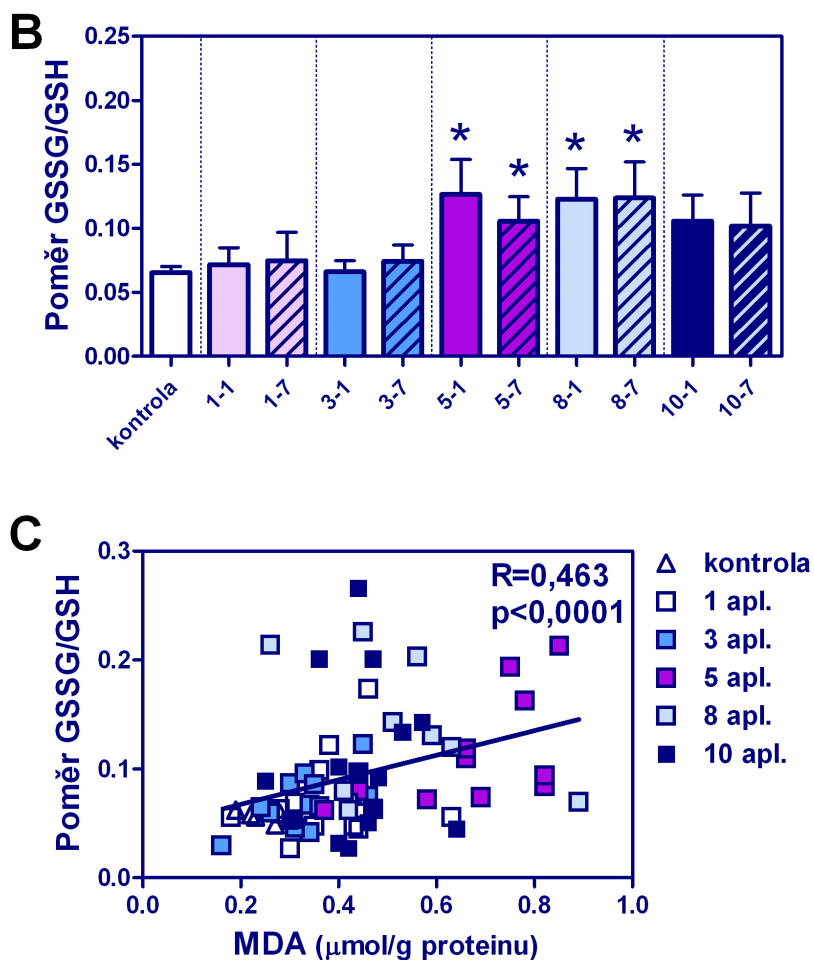
V průběhu rozvoje chronické antracyklinové kardiotoxicity nebyla zjištěna žádná změna v koncentraci redukované formy glutathionu v myokardu levé komory při porovnání s kontrolní skupinou (obr. 47A), naopak rozdíly byly zaznamenány u koncentrace oxidované formy (obr. 47B). Od 5. aplikace daunorubicinu (kumulativní dávka 250 mg/m²) docházelo ke zvýšení tohoto parametru, které do 8. týdne pokusu (kumulativní dávka daunorubicinu 400 mg/m²) bylo statisticky významné. Na konci pokusu byl opět detekován pokles oxidované formy na hodnotu, která již nebyla statisticky významná v porovnání kontrolní skupinou. Obdobný trend byl nalezen i u stanoveného poměru oxidované a redukované formy glutathionu (obr. 48B). Množství celkového glutathionu se u jednotlivých daunorubicinových skupin nelišilo od kontrolních hodnot (obr. 48A). Při korelační analýze byl nalezen významný, nicméně málo těsný vztah mezi

poměrem GSSG/GSH a celkovým malondialdehydem v myokardu jednotlivých zvířat (obr. 48C).



Obr. 47. A) Množství redukovaného formy (GSH) a B) oxidovaného formy glutathionu (GSSG) v srdeční tkáni levé komory v průběhu rozvoje chronické antracyklinové kardiotoxicity. Statistická významnost (ANOVA, $p < 0,05$) v porovnání s kontrolní skupinou (*).





Obr. 48. A) Množství celkového glutathionu v srdeční tkáni levé komory v průběhu rozvoje chronické antracyklinové kardiotoxicity. B) Poměr oxidované a redukované formy glutathionu u jednotlivých zvířat. Statistická významnost (ANOVA, $p<0,05$) v porovnání s kontrolní skupinou (*). C) Korelace celkového malondialdehydu a poměru GSSG/GSH v myokardu levé komory u jednotlivých zvířat s užitím Spearmanovy neparametrické korelační metody.

4.8. Biochemické a hematologické parametry

V průběhu rozvoje chronické antracyklinové kardiotoxicity byly zaznamenány nejvýznamnější změny v koncentraci kreatininu a celkové proteinu v odebrané krvi, přičemž v porovnání s kontrolními hodnotami byla první statistická významnost stanovena u zvířat, kterým byla odebrána krev 24 hodin po 5. aplikaci daunorubicinu (kumulativní dávka 250 mg/m^2). Od 8. aplikace cytostatika se také významně zvyšovala hladina cholesterolu a částečně i triacylglyceridů.

Snížený počet leukocytů a erytrocytů a snížená koncentrace hemoglobinu a hematokritu byla stanovena téměř u všech daunorubicinových skupin až na výjimku první skupiny, která byla končena 24 hodin po 1. aplikaci cytostatika. V této skupině se patrně ještě neprojevil potlačující účinek antracyklinů na tvorbu červené a bílé složky krve.

Tab. 15. Vybrané biochemické parametry. Statistická významnost (ANOVA, $p < 0,05$) v porovnání s kontrolní skupinou (*). TAG - triacylglyceridy, ALT - alaninaminotransferáza, AST - aspartátaminotransferáza.

Skupina/parametr	Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	Močovina (mmol/l)	Protein (g/l)	ALT ($\mu\text{kat/l}$)	AST ($\mu\text{kat/l}$)	Cholesterol ($\mu\text{mol/l}$)	TAG (mmol/l)
Kontrolní	84,1 ± 4,3	7,46 ± 0,41	62,6 ± 0,9	0,714 ± 0,066	0,542 ± 0,078	1,54 ± 0,14	0,93 ± 0,04
1 aplikace za 24 hod	96,7 ± 5,7	7,23 ± 0,52	55,8 ± 1,4	0,953 ± 0,176	0,905 ± 0,172	2,17 ± 0,36	1,10 ± 0,19
1 aplikace za 7 dnů	89,2 ± 8,9	7,37 ± 0,63	60,4 ± 1,1	0,798 ± 0,087	0,427 ± 0,028	1,66 ± 0,25	0,97 ± 0,12
3 aplikace za 24 hod	109,5 ± 15,8	8,38 ± 1,00	60,0 ± 1,2	0,952 ± 0,169	0,558 ± 0,104	3,31 ± 0,67*	1,93 ± 0,65*
3 aplikace za 7 dnů	91,0 ± 5,7	7,33 ± 0,44	64,4 ± 2,0	0,710 ± 0,089	0,525 ± 0,071	1,65 ± 0,20	1,06 ± 0,17
5 aplikací za 24 hod	137,0 ± 29,5*	10,08 ± 1,77	57,0 ± 1,0*	0,900 ± 0,111	0,677 ± 0,214	1,29 ± 0,30	2,15 ± 0,59*
5 aplikací za 7 dnů	130,0 ± 6,1*	6,30 ± 0,40	58,8 ± 1,3*	0,660 ± 0,106	0,493 ± 0,060	2,59 ± 0,73	1,43 ± 0,28
8 aplikací za 24 hod	104,0 ± 12,2	6,22 ± 0,47	57,2 ± 2,0*	0,657 ± 0,081	0,473 ± 0,021	2,52 ± 0,50*	1,32 ± 0,20
8 aplikací za 7 dnů	158,2 ± 39,9*	7,23 ± 1,00	54,0 ± 2,3*	0,610 ± 0,048	0,483 ± 0,073	2,53 ± 0,40*	2,58 ± 0,60
10 aplikací za 24 hod	200,7 ± 47,6*	12,13 ± 2,43*	50,0 ± 2,4*	0,822 ± 0,073	0,442 ± 0,042	4,99 ± 1,12*	2,57 ± 0,73*
10 aplikací za 7 dnů	262,0 ± 112,9*	12,70 ± 4,27	49,1 ± 1,6*	0,715 ± 0,147	0,511 ± 0,181	3,65 ± 0,44*	3,73 ± 0,93*

Tab. 16. Vybrané hematologické parametry. Statistická významnost (ANOVA, $p < 0,05$) v porovnání s kontrolní skupinou (*).

Skupina/parametr	Leukocyty ($\times 10^9/\text{l}$)	Erytrocyty ($\times 10^{12}/\text{l}$)	Hemoglobin (g/l)	Hematokrit	Trombocyty ($\times 10^9/\text{l}$)
Kontrolní	5,12 ± 0,64	6,23 ± 0,12	133,3 ± 2,1	0,401 ± 0,006	276,6 ± 30,9
1 aplikace za 24 hod	4,44 ± 0,80	5,92 ± 0,31	128,3 ± 6,6	0,398 ± 0,022	212,2 ± 28,
1 aplikace za 7 dnů	2,40 ± 0,19 *	5,54 ± 0,21 *	117,8 ± 3,4 *	0,363 ± 0,011 *	105,3 ± 29,5 *
3 aplikace za 24 hod	1,64 ± 0,32 *	4,43 ± 0,25 *	97,0 ± 5,4 *	0,304 ± 0,016 *	185,3 ± 21,1 *
3 aplikace za 7 dnů	2,94 ± 0,33 *	4,94 ± 0,20 *	108,3 ± 3,5 *	0,341 ± 0,010 *	107,8 ± 25,83 *
5 aplikací za 24 hod	2,11 ± 0,27 *	3,90 ± 0,31 *	85,7 ± 7,1 *	0,287 ± 0,019 *	290,7 ± 42,8
5 aplikací za 7 dnů	3,38 ± 0,60	3,79 ± 0,38 *	84,0 ± 6,5 *	0,272 ± 0,017 *	261,0 ± 24,2
8 aplikací za 24 hod	1,87 ± 0,25 *	4,36 ± 0,19 *	93,7 ± 3,5 *	0,306 ± 0,011 *	363,3 ± 34,7
8 aplikací za 7 dnů	3,16 ± 0,42 *	3,96 ± 0,24 *	58,3 ± 5,2 *	0,293 ± 0,015 *	342,7 ± 49,7
10 aplikací za 24 hod	2,35 ± 0,58 *	3,80 ± 0,19 *	52,2 ± 4,7 *	0,278 ± 0,017 *	343,5 ± 31,3
10 aplikací za 7 dnů	2,75 ± 0,38 *	4,02 ± 0,30 *	84,9 ± 6,7 *	0,287 ± 0,020 *	124,8 ± 13,5 *

DISKUZE

Antracyklinová antibiotika jsou považována za jedna z nejúčinnějších 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 leukémií (Jones *et al*, 2006; Klener, 1996). Krátce po zavedení do klinické praxe se bohužel ukázalo, že kardiotoxicita představuje významnou limitaci v jejich užití (Von Hoff *et al*, 1979). 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 (Billingham *et al*, 1978; Ewer & Yeh, 2006). V posledních letech byla popsána i pozdní forma antracyklinové 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 (Aleman *et al*, 2007; Scully & Lipshultz, 2007).

Navzdory mnoha hypotézám (Chen *et al*, 2007; Minotti *et al*, 2004) není přesný mechanismus patogeneze antracyklinové kardiotoxicity dosud znám. Nejčastěji je spojován s nadměrnou produkcí kyslíkových radikálů, které vznikají za katalytického přispění volných, redoxně aktivních iontů železa (tzv. „labile iron pool“). V literatuře jsou popsány dva základní mechanismy tvorby radikálů prostřednictvím molekuly antracyklinu (Keizer *et al*, 1990; Minotti *et al*, 2004; Simunek *et al*, 2009). Jedna hypotéza vychází ze schopnosti antracyklinů vázat volné ionty železa uvnitř kardiomyocytů za tvorby komplexů ANT-Fe³⁺, které podléhají kaskádovité reakci vedoucí k tvorbě extrémně reaktivních hydroxylových radikálů. V druhém případě molekula antracyklinů 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 (Emerit *et al*, 2001; Liochev, 1999; Minotti *et al*, 2004). Cyklický charakter reakcí spolu s poměrně malými zásobami přirozených antioxidantů v myokardu tak mohou

být důvodem ireverzibilního poškození srdce s potenciálně fatálními následky pro pacienta (Gianni *et al*, 2008).

Vzhledem k tomu, že antracykliny 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 látek (Bast *et al*, 2007; Oliveira *et al*, 2004; Saad *et al*, 2001), nicméně jediným léčivem s jednoznačně prokázaným účinkem v preklinických i v klinických studiích je dexrazoxan (Cvetkovic & Scott, 2005; Wouters *et al*, 2005). Dexrazoxan (ICRF-187) je proléčivo, které je uvnitř kardiomyocytů enzymaticky hydrolyzováno na aktivní metabolit ADR-925, který se svojí strukturou podobá chelatačnímu činidlu EDTA. Za protektivní účinky dexrazoxanu jsou považovány právě chelatační vlastnosti jeho metabolitu, díky nimž dokáže odnímat ionty železa z komplexu s antracykliny a/nebo vázat volné, redoxně aktivní ionty železa, čímž zabraňuje jejich účasti při tvorbě kyslíkových radikálů (Hasinoff *et al*, 1998a). V současnosti je dexrazoxan podáván pouze u malého procenta pacientů podstupujících léčbu antracykliny. Důvodem omezeného užívání léčiva je pravděpodobně výskyt nežádoucích účinků (především myelosuprese) a jeho vysoká cena (van Dalen *et al*, 2006). Ze studie publikované kolektivem Swain *et al*. navíc vyvstala otázka, zda dexrazoxan také negativně neovlivňuje protinádorovou účinnost antracyklinů (Swain *et al*, 1997b). Ačkoliv po zpětné analýze výsledků byla tato možnost vyvrácena (Swain & Vici, 2004), což dokládají i nové klinické studie (Marty *et al*, 2006), obava z možné interference s protinádorovým účinkem antracyklinů stále přetrvává. Proto je stále vysoce aktuální snaha o nalezení nového, vysoce účinného a bezpečného kardioprotektiva, které by zároveň negativně neovlivňovalo protinádorovou účinnost cytostatika.

Pro účely studia kardioprotektivních účinků nových látek jsme použili model chronické antracyklinové kardiotoxicity, který je založený na opakovaném podávání daunorubicinu a který sdílí obdobné morfologické, funkční a biochemické znaky s chronickou antracyklinovou kardiotoxicitou pozorovanou v klinické praxi (Gersl & Hrdina, 1994; Simunek *et al*, 2004). Při výběru konkrétního léčiva jsme v první řadě vycházeli z faktu, že kardiotoxicita je společným jmenovatelem všech antracyklinů (tzv. „class effect“), což potvrzuje i univerzálnost kardioprotektivního účinku dexrazoxanu (Cvetkovic & Scott, 2005). Protože doxorubicin podávaný ve stejné nebo nižší dávce než daunorubicin navozuje u králíka mnohem významnější extrakardiální toxicitu (zejména nefrotoxicitu a hematotoxicitu), a tím i vyšší mortalitu a horší reprodukovatelnost

kardiotoxického účinku (Klimtova *et al*, 2003), byl jako modelový antracyklin zvolen daunorubicin i přesto, že se v onkologické praxi používá v menší míře než doxorubicin.

V předešlých letech jsme se s užitím tohoto modelu zaměřili na studium chelátorů železa, které by mohly nahradit dexrazoxan v jeho kardioprotektivní indikaci. Při výběru potenciálního protektiva jsme hledali takové chelatační látky, které snadno pronikají do buňky, které mají stejnou a/nebo vyšší afinitu a selektivitu k iontům železa jako ADR-925 a které s Fe^{3+} netvoří redoxně aktivní komplexy. Především kvůli vysoké lipofilitě, vysoké selektivitě k iontům železa a významnému antioxidačnímu a cytoprotektivnímu účinku byla naše pozornost nejprve soustředěna na aroylhydrazonové chelátory (Buss *et al*, 2002). V první fázi mého studia jsem se zapojila do výzkumu potenciálních kardioprotektivních účinků dvou nejnadějnějších analogů odvozených od pyridoxal isonikotinoyl hydrazonu (PIH). Jednalo se o pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazon (o-108) a salicylaldehyd isonikotinyol hydrazon (SIH), které byly poskytnuty prof. Poňkou (McGill University, Kanada). Při hodnocení protektivních účinků o-108 (10 a 25 mg/kg i.p., podaný 30 minut před daunorubicinem) a SIH (0,5, 1 a 2,5 mg/kg i.v., podaný 10 minut před daunorubicinem) jsme zjistili, že oba analogy v nižší dávce zabraňují předčasnému úhynu pokusných zvířat a rozvoji systolické srdeční dysfunkce navozené opakovaným podáváním daunorubicinu (3 mg/kg, i.v.) (Sterba *et al*, 2007a; Sterba *et al*, 2006). Uvedený nálezh byl dále podpořen histologickým vyšetřením myokardu levé komory a stanovením plazmatických koncentrací srdečního troponinu T. Naproti tomu ve skupinách, kterým byla podávána 2,5-násobně vyšší dávka chelátorů, došlo k předčasné mortalitě a u přeživších zvířat k vymizení kardioprotektivního účinku. Obdobný jev byl zaznamenán i v předešlých pokusech s mateřskou látkou PIH (Simunek *et al*, 2005b). Tato paradoxní dávková závislost kardioprotektivního účinku je tedy společná pro všechny aroylhydrazony, a to bez ohledu na rozdíly v jejich struktuře, způsobu podání a časovém odstupu od podání cytostatika (Simunek *et al*, 2005b; Sterba *et al*, 2007a; Sterba *et al*, 2006). Velmi důležitou okolností, která mohla mít dopad na vymizení kardioprotektivního účinku aroylhydrazonů, jsou jejich farmakokinetické parametry. U látek o-108 a SIH byly zjištěny velmi krátké biologické poločasy (v řádech několika desítek minut), které patrně souvisí s chemickou nestabilitou aroylhydrazonové vazby v plazmě (Kovarikova *et al*, 2006; Kovarikova *et al*, 2005). Proto jsme se v následující studii, tvořící významnou část předložené dizertační práce, zaměřili na látky, které jsou prosty výše uvedených limitací.

Pro další studium byl na základě teoretických předpokladů a předchozích výsledků *in vitro* a *ex vivo* experimentů (Barnabe *et al*, 2002; Xu *et al*, 2006) zvolen nový perorálně

podávaný chelátor železa - deferipron. Jedná se s o klinicky užívané léčivo s biologickým poločasem eliminace cca 2 hodiny, které je v několika zemích registrováno k léčbě beta-talasemie, resp. stavů spojených s přetížením organismu ionty železa (Kontoghiorghes *et al*, 2004). Na jeho eventuální kardioprotektivní užití u antracyklinové kardiotoxicity poukazovaly výsledky z *in vitro* modelu využívajícím izolované neonatální kardiomyocyty, kde byl prokázán ochranný účinek deferipronu před cytotoxickým působením doxorubicinu (Barnabe *et al*, 2002). Autoři tento účinek přičítali právě jeho chelatačním vlastnostem. Kardioprotektivní potenciál deferipronu byl dále podpořen studií provedenou na spontánně bijících síních exponovaných doxorubicinu (Xu *et al*, 2006).

Protože potenciální kardioprotektivum by nemělo negativně ovlivňovat protinádorový účinek antracyklinového cytostatika, byla nejprve provedena antiproliferativní studie. Pro tento účel byla použita linie HL-60 odvozená od buněk humánní promyelocytární leukémie. Výběr nádorové linie vycházel z hlavní indikace daunorubicinu, kterou jsou akutní formy leukémií. Podání samotného deferipronu vedlo ke statisticky významnému snížení proliferace leukemické buněčné linie v koncentracích, které jsou snadno dosažitelné v *in vivo* podmínkách (Glickstein *et al*, 2006). Při inkubaci buněk s daunorubicinem ($c \approx IC_{50}$) a různými koncentracemi deferipronu chelátor nesnižoval protinádorový účinek cytostatika. Při vyšších koncentracích deferipronu byla naopak pozorována sumace antiproliferativních účinků obou látek. Tyto výsledky byly v souladu s předchozími studii zaměřenými na protinádorové účinky deferipronu (Yasumoto *et al*, 2004), jakož i dalších látek chelatujících ionty železa (Yu *et al*, 2006). Některé práce naznačují, že důležitou roli v tomto procesu může sehrávat deplece železa společně s inhibicí ribonukleotidreduktázy, enzymu důležitého pro syntézu deoxyribonukleotidů (Green *et al*, 2001), ačkoliv další mechanismy nejsou vyloučeny. U řady chelátorů železa byla zaznamenána schopnost zasahovat do procesů spojených s kontrolou buněčného cyklu, apoptózou, tvorbou metastáz a angiogeneze (Kontoghiorghes *et al*, 2008; Richardson, 2005). Na leukemické buněčné linii HL-60 bylo ukázáno, že podání deferipronu navozuje i apoptózu prostřednictvím vnější i vnitřní mitochondriální cesty (Yasumoto *et al*, 2004). Další autoři poukazují na možnost, že protinádorový účinek deferipronu může souviset s porušenou regulací polyaminového metabolismu. Protinádorový účinek deferipronu byl v tomto případě spojen se spermidin/spermin N_1 -acetyltransferázovou cestou, která má za následek zastavení buněčného cyklu v G_2 -M fázi prostřednictvím zvýšené hladiny putrescinu (Lescoat *et al*, 2007).

Na podkladě výše uvedených výsledků byla následně provedena vlastní

kardioprotektivní studie. Jejím hlavním cílem bylo zjistit, zda je deferipron schopný zabránit nebo alespoň signifikantně omezit rozvoj chronické antracyklinové kardiotoxicity. Ve studii byl deferipron podáván perorálně ve dvou dávkách 10 a 50 mg/kg 45 minut před každou aplikací daunorubicinu. Opakované podávání daunorubicinu navodilo v našich experimentálních podmínkách 18% mortalitu pozorovanou během posledních dvou týdnů pokusu. Vzhledem ke kumulativní dávce cytostatika dosažené v tomto období, přítomnosti výpotků v dutině břišní a hrudní a významným morfologickým změnám v myokardu levé komory lze předpokládat, že zaznamenaný úhyn nastal v důsledku chronické kardiotoxicity. Podávání ani jedné ze studovaných dávek deferipronu překvapivě nezabránilo mortalitě navozené antracyklinem. Následné 5-násobné zvýšení dávky chelátoru (50 mg/kg) vedlo ještě k časnějšímu úhynu zvířat (mezi 3. a 5. týdnem pokusu), 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 daunorubicinovou skupinou a objektivní histologické vyšetření orgánů uhynulých zvířat bylo v mnoha případech znemožněno výraznými posmrtnými změnami. Na druhou stranu nízké koncentrace srdečního troponinu T, které předcházely jednotlivým úhynům, poukazují na extrakardiální toxicitu, která se rozvíjela pozvolna vzhledem k pozorovanému progresivnímu poklesu tělesné hmotnosti.

Vedle předčasné mortality jsme navíc zaznamenali, že deferipron neochránil myokard ani před antracyklinem navozeným oxidačním stresem, levokomorovým poškozením a srdečním selháním. K hodnocení lipoperoxidace jsme použili validovanou HPLC metodu založenou na stanovení celkového množství malondialdehydu po předchozí derivatizaci 2,4-dinitrofenylhydrazinem. Záměrně byl zvolen tento přístup, abychom se vyhnuli známým nedostatkům spojených s dříve užívanou metodou založenou na stanovení látek reagujících při vysoké teplotě s kyselinou thiobarbiturovou (Esterbauer *et al*, 1991; Janero, 1990; Pilz *et al*, 2000). Pomocí HPLC stanovení byl nalezen statisticky významný nárůst malondialdehydu po opakovaném podávání daunorubicinu. Získané výsledky byly v souladu s dostupnou literaturou a tradičním konceptem antracyklinové kardiotoxicity (Doroshov *et al*, 1980; Sarvazyan, 1996; Zhou *et al*, 2001). Deferipron 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 (Barnabe *et al*, 2002; Xu *et al*, 2006). Obě citované studie mohou mít však významné limitace s ohledem na přenositelnost získaných dat do klinicky relevantní situace. V první studii

bylo s použitím elektronové paramagnetické rezonanční spektroskopie ukázáno, že deferipron snížil tvorbu ROS navozenou antracykliny v roztoku založeném na hypoxantin/xantinoxidázovém systému určeném ke tvorbě superoxidového radikálu. 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 antracyklinů, protože kardiotoxicita těchto cytostatik postihuje zejména levou komoru srdeční.

Neschopnost deferipronu efektivně snížit daunorubicinem navozený oxidační stres a následně vyvolanou kardiotoxicitu byla potvrzena dalšími výsledky funkčního vyšetření levé komory, které bylo provedeno pomocí echokardiografického měření a katetrizačního přístupu. Společné podání deferipronu s cytostatikem vedlo, obdobně jako u daunorubicinové skupiny, i k progresivnímu a signifikantnímu zvyšování plazmatických koncentrací troponinu T, který je považován za citlivý a selektivní marker srdečního poškození (Adamcova *et al*, 2007; Bryant *et al*, 2007; Sterba *et al*, 2007b). Shoda těchto výsledků byla dále podpořena histopatologickým vyšetřením myokardu levé komory. Opakované podávání samotného deferipronu 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 druhů (Porter *et al*, 1990). Výše uvedená tvrzení byla ověřena i pomocí dvou explorativních statistických analýz, které prokázaly, že samotný deferipron neovlivňuje kardiovaskulární, hematologické a biochemické parametry a obdobně i parametry obecné toxicity. Jediná výjimka byla nalezena v souvislosti se zvýšeným obsahem myokardiálního železa u zvířat, kterým byl podáván chelátor ve vyšší dávce (50 mg/kg) buď samostatně nebo v kombinaci s daunorubicinem. Tento nálezn byl překvapivě v rozporu s prokázanou schopností deferipronu mobilizovat myokardiální železo u zvířat přetížených železem nebo u pacientů s beta-talasemií (Anderson *et al*, 2002; Wood *et al*, 2006). Protože biologický poločas deferipronu (přibližně 2 hodiny) vylučuje přímý účinek chelátoru na tento parametr týden po poslední aplikaci, lze uvažovat o možné adaptivní reakci na opakovanou, nicméně přerušovanou chelataci železa v srdečních buňkách. Tyto změny u samostatně podaného deferipronu nebyly navíc doprovázeny zvýšeným oxidačním stresem nebo dalšími korelujícími změnami v myokardu, což poukazuje na to, že pravděpodobná kompenzační reakce probíhala ve fyziologických mezích.

Výsledky této studie tedy naznačují, že deferipron nechrání před chronickou antracyklinovou kardiotoxicitou. V souvislosti s tímto zjištěním tu vyvstává několik otázek. Lze namítat, že selhání deferipronu může souviset s malou nebo kolísavou biologickou dostupností látky. U deferipronu byla však prokázána velmi dobrá biologická dostupnost po perorálním podání. Deferipron se dobře vstřebává z gastrointestinálního traktu u lidí stejně tak i u králíků (Fredenburg *et al*, 1993; Kontoghiorghes *et al*, 1990). Dávka a časový odstup mezi aplikacemi obou látek byly zvoleny v souladu s farmakokinetickou studií provedenou u králíků (Fredenburg *et al*, 1993). Z této studie jsme odvodili, že koncentrace deferipronu navozující signifikantní protekci vůči antracyklinové kardiotoxicitě na *in vitro* úrovni (Barnabe *et al*, 2002) jsou v králičí plazmě detekovány po více než 12 hodinách po jeho perorálním 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 (Danesi *et al*, 2002; Yokel *et al*, 1995). Ani jedna z podávaných látek se velkou měrou neváže na plazmatické proteiny. U obou léčiv je známá zcela odlišná cesta eliminace. Zatímco deferipron se vylučuje především ledvinami do moče, daunorubicin se eliminuje přes játra do stolice. Dále není u nich popsáno ovlivnění hlavních metabolických cest a ani nejsou důležitými substráty pro cytochrom P450 (Danesi *et al*, 2002; Kontoghiorghes *et al*, 1990). Přímé farmakokinetické interakce na úrovni kardiomyocytů jsou pravděpodobně také vyloučeny, protože by se projevil v předešlých *in vitro* a *ex vivo* experimentech.

V předešlých pokusech bylo prokázáno, že „klasický“ chelátor železa, deferoxamin (DFO) nechrání vůči chronické antracyklinové toxicitě u spontánně hypertenzních potkanů (Herman *et al*, 1994). Toto selhání lze připsat jeho hydrofilní povaze, která omezuje jeho vstup do kardiomyocytů. Na druhou stranu s použitím našeho experimentálního *in vivo* modelu jsme prokázali, že lipofilní aroylhydrazonové chelátory železa, odvozené od mateřské látky pyridoxal isonikotinoyl hydrazonu, byly schopny zabránit rozvoji antracyklinové kardiotoxicity, i když pouze ve velmi úzkém dávkovém rozmezí (Simunek *et al*, 2005b; Sterba *et al*, 2007a; Sterba *et al*, 2006). Obdobně jako u dexrazoxanu a aroylhydrazonových látek byl po podání deferipronu prokázán rychlý vstup do kardiomyocytů (Glickstein *et al*, 2006; Hasinoff *et al*, 1998a) a zde efektivní odstraňování iontů železa z komplexů ANT-Fe³⁺ (Barnabe *et al*, 2002), nicméně narozdíl od nich nechránil před poškozením vyvolaným cytostatikem. Nesoulad našich výsledků s výše uvedenými údaji nás přivedl ke srovnání deferipronu s dalším chelátory

studovanými na podobném schématu. Například lipofilní selektivní chelátor železa deferasirox (ICL670), navzdory své schopnosti rychlého prostupu do buňky a účinnému odnímání iontů železa z komplexu ANT-Fe³⁺, nenašel protektivní účinek na stejném *in vitro* modelu, který byl použit i při kardioprotektivní studii s deferipronem (Hasinoff *et al*, 2003a). Toto zjištění může vést k myšlence, že schopnost látky chelatovat ionty železa nemusí být jediným rozhodujícím činitelem pro protektivní účinek. Rozdíly v kardioprotektivních vlastnostech mohou být přičítány i odlišnému poměru, ve kterém chelátory vážou volné ionty železa. Deferipron 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 deferipronu v kardioprotektivní oblasti. Dále nelze vyloučit, že deferipron přes svoji dobrou prostupnost do srdečních buněk nemusí dosáhnout žádoucího intracelulárního kompartmentu a/nebo zde nemusí setrvávat po celou dobu potřebnou k navození účinné kardioprotekce. Pozorovaný nedostatečný kardioprotektivní účinek deferipronu může též znamenat, že železem katalyzovaná tvorba ROS nemusí být klíčovým a konečným exekutorem zodpovědným za chronickou antracyklinovou kardiotoxicitu. Reaktivní formy kyslíku mohou vznikat i bez přítomnosti iontů železa (Keizer *et al*, 1990). Proto tyto výsledky společně s předešlými nálezy podporují možnost, že role železa a jeho chelatace při antracyklinové 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 antracyklinovou kardiotoxicitu pozorovanou v klinické praxi. Vhodným příkladem látek, které se zdály být nadějnými v *in vitro* pokusech anebo na akutních modelech (Dobric *et al*, 1998; Doroshov *et al*, 1981; Wang *et al*, 1980), jsou zhášecí volných kyslíkových radikálů (tzv. „scavengery“; např. vitamin E, N-acetylcystein). U těchto látek nebylo ve většině chronických experimentálních (Herman *et al*, 1985) a zejména klinických randomizovaných studií (Bruynzeel *et al*, 2007a; Dresdale *et al*, 1982; Legha *et al*, 1982; Myers *et al*, 1983) prokázáno jejich protektivní působení vůči srdečnímu poškození navozenému antracykliny.

Naše výsledky naznačují, že patogeneze antracyklinové kardiotoxicity může být mnohem složitější než se doposud myslelo. V naprosté většině přehledových prací a učebnic je antracyklinová kardiotoxicita tradičně spojována s navozením oxidačního stresu a z toho plynoucí progresivní degenerací a neprogramovanou smrtí kardiomyocytů (Billingham *et al*, 1978; Godfraind, 1984; Lewis & Silver, 2001). S hlubším pochopením

role programované buněčné smrti u onemocnění srdce se však tento pohled v posledních letech zásadně změnil (Dorn, 2009; Lee & Gustafsson, 2009). V odborné literatuře se objevuje stále více prací poukazujících na možnou úlohu apoptózy v rozvoji kardiotoxicity antracyklinových cytostatik (Arola *et al*, 2000; Konorev *et al*, 2008; Kotamraju *et al*, 2004; Nakamura *et al*, 2000; Sawyer *et al*, 1999; Yamaoka *et al*, 2000), i když historicky první studie zaměřená na tuto oblast dospěla k opačnému výsledku (Zhang *et al*, 1996).

Úvahy o podílu apoptózy u antracyklinové kardiotoxicity jsme chtěli nejprve potvrdit na našem *in vitro* modelu, který je založen na použití buněčné linie H9c2 odvozené od potkaních embryonálních srdečních myoblastů. Daunorubicin v klinicky relevantních koncentracích (0,1 až 3 $\mu\text{mol/l}$) (Danesi *et al*, 2002; Minotti *et al*, 2004) 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 antracyklinů, které jsou snadno dosažitelné v klinické praxi, spolehlivě navozovaly apoptotickou buněčnou smrt. Největší nárůst fragmentace DNA byl zjištěn při inkubaci buněk s daunorubicinem o koncentraci 1 $\mu\text{mol/l}$, zatímco následné zvýšení koncentrace cytostatika do oblasti hraničních a supratherapeutických koncentrací vedlo k poklesu fragmentace DNA. Tento nálezný může být vysvětlen tím, že při takto vysoké koncentraci antracyklinu již převažuje nekrotická buněčná smrt nad apoptotickou, což by bylo v souladu i s výsledky předchozích prací (Newman *et al*, 1981; Sawyer *et al*, 1999). S užitím buněčné linie H9c2 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 daunorubicinem 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 antracyklinové kardiotoxicity *in vivo* a na jejich možné ovlivnění podáním modelového kardioprotektiva dexrazoxanu. V této studii bylo zjištěno, že opakované podávání daunorubicinu navodilo zvýšenou mortalitu zvířat, která byla doprovázená známkami městnání krve a srdečním

selháním. Echokardiograficky měřené frakční zkrácení levé komory odhalilo progresivní pokles systolické funkce, což bylo dále potvrzeno katetrizací levé komory provedené na konci pokusu. Dexrazoxan podávaný před každou aplikací daunorubicinu zcela ochránil zvířata před předčasným úhynem a levokomorovou dysfunkcí. Získaná data tak potvrzují významný kardioprotektivní potenciál dexrazoxanu, který je v souladu s výsledky z předchozích preklinických a klinických studií (Cvetkovic & Scott, 2005).

Histologické hodnocení v daunorubicinové 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. V této části je třeba zdůraznit, že koncentrace troponinů v našich pokusech standardně dosahují nižších hodnot než např. u ischemicko/reperfuzního poškození či isoprenalinové kardiotoxicity (Bertinchant *et al*, 2000), což může být dáno pozvolným rozvojem chronické antracyklinové kardiotoxicity (v řádech několika týdnů) a jejím typickým ložiskovým charakterem. 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 reparační. Dexrazoxan dokázal těmto morfologickým změnám zřetelně zabránit, a to ve srovnatelném rozsahu jako v dříve publikovaných pracích (Herman *et al*, 1981; Herman *et al*, 1985; Herman *et al*, 1994). Dexrazoxan dále zamezil 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 narušena (Arbustini *et al*, 2008; Horenstein *et al*, 2000; Wallace *et al*, 2004). Na základě nízkých koncentrací troponinů a zmírnění degenerativních změn lze tedy odvodit, že dexrazoxan zabránil i výskytu neprogramované smrti kardiomyocytů navozené daunorubicinem. Tyto výsledky tak velmi dobře korespondují s široce akceptovaným konceptem kardioprotekce navozené dexrazoxanem (Herman *et al*, 1981; Van Vleet *et al*, 1980).

Vedle tradiční cesty opírající se o antracykliny 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 daunorubicinu spjata se signifikantním zvýšením počtu TUNEL-pozitivních buněk myokardu levé komory a nárůstem aktivit exekutivních kaspáz 3 a 7. Oba hodnocené apoptotické parametry dobře korelovaly s levokomorovou systolickou funkcí u jednotlivých zvířat. Pro potvrzení těchto výsledků jsme použili i novější metodu určenou k detekci fragmentace DNA (Cell Death Detection ELISA^{PLUS}). Tato metoda je založena na imunochemické detekci mono- a oligonukleotidů v cytosolické frakci připraveného vzorku. Přestože je set primárně určen pro *in vitro* pokusy na buněčných kulturách, vyzkoušeli jsme ho i na myokardiálních vzorcích z *in vivo* studie. V daunorubicinové skupině jsme obdobně zaznamenali zvýšení počtů fragmentů DNA, nicméně v důsledku vyšší variability výsledků pozorovaná změna nedosáhla statistické významnosti. Tento fakt nás přivedl k závěru, že uvedená metoda je mnohem vhodnější pro hodnocení apoptotické smrti v buněčných kulturách.

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) (Childs *et al*, 2002) a popřípadě jinými autory zmiňovaná vnější receptorová cesta (kaspáza 8) (Nakamura *et al*, 2000). Naše hodnocení ukázalo na současnou aktivaci obou signálních cest při chronické antracyklinové 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 antracyklinové kardiotoxicity, nicméně i v tomto případě byla navozená podáním jedné supratherapeutické dávky doxorubicinu (Jang *et al*, 2004). Naše výsledky byl v souladu i s dostupnými daty, která poukazují na závažný ultrastrukturální a funkční účinek opakovaného podání antracyklinů na ER/SR (Minotti *et al*, 2004).

V naší studii bylo zjištěno, že znaky významné buněčné degenerace a zvýšená TUNEL pozitivita byly velmi výjimečně lokalizovány ve stejných kardiomyocytech. Ačkoliv oba děje vedoucí k buněčné smrti kardiomyocytů se očividně vyskytují současně v celém myokardu levé komory, typicky postihují rozdílné kardiomyocyty. Obecně se ukazuje, že apoptóza sehrává méně významnou úlohu uvnitř ložisek kardiomyocytů 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 antracykliny nelze na základě dostupných dat

objektivně posoudit. Je třeba podotknout, že zatímco apoptóza je kompletně ukončena během několika hodin, degenerativní změny probíhají zřetelně pozvolněji (v rádech několika týdnů až měsíců). Perspektivně zvažovaná možnost užití geneticky modifikovaného organismu, u kterého by byla záměrně pozměněna exprese některé z klíčových molekul apoptotické kaskády, by zajisté přispěla k posouzení skutečného zapojení obou procesů do rozvoje antracyklinové kardiotoxicity.

Na podkladě výše diskutovaných výsledků i dostupných literárních údajů lze tudíž konstatovat, že k dispozici jsou poměrně jednoznačné důkazy o apoptóze navozené antracykliny. Nicméně stále zůstává nezodpovězená důležitá otázka, zda-li kardioprotektivní účinek dexrazoxanu zahrnuje také ochranu před apoptotickou smrtí kardiomyocytů. Dexrazoxan je tradičně považován za proléčivo, které je uvnitř kardiomyocytů enzymaticky aktivováno na chelatačně účinný metabolit ADR-925. Doposud byl protektivní účinek dexrazoxanu spojován s ochranou kardiomyocytů před tvorbou ROS a následnými degenerativními změnami kardiomyocytů, které mohou vyústit v jejich spontánní zánik (Herman *et al*, 1981; Van Vleet *et al*, 1980). Jediná *in vitro* studie provedená na izolovaných potkaních kardiomyocytech naznačuje, že při klinicky relevantních koncentracích antracyklinů může být hlavní část protektivního účinku dexrazoxanu spojena i s ochranou srdečních buněk před apoptózou (Sawyer *et al*, 1999). 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 dexrazoxan 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 sehraávají „exekutivní“ úlohu v apoptotické kaskádě. Shoda obou výsledků získaných metodicky rozdílnými přístupy tedy naznačila, že dexrazoxan je schopen účinně zabránit apoptotické buněčné smrti navozené antracykliny. V následující fázi nás také zajímalo, jakým způsobem dexrazoxan ovlivnil apoptotickou signalizaci spuštěnou daunorubicinem. Naše výsledky překvapivě ukázaly, že dexrazoxan zabránil aktivaci všech výše zmiňovaných cest (zprostředkované kaspázou 8, 9 a 12). Tato schopnost dexrazoxanu zabránit spuštění hned několika signálních cest pravděpodobně vysvětluje jeho celkovou antiapoptotickou 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 dexrazoxan měl jasnou tendenci k omezení apoptotické i neapoptotické buněčné smrti. Aktivita kaspáz byla navíc určena jako významný činitel v přirozeném shlukování jednotlivých zvířat, což tak vyzdvihlo apoptózu na velmi důležitý cíl pro kardioprotektivní zásah dexrazoxanem.

Ačkoliv tyto výsledky přesvědčivě prokazují, že dexrazoxan chrání kardiomyocyty před neprogramovanou a programovanou buněčnou smrtí, mechanismy zodpovědné za tyto účinky zůstávají neznámé. Tradičně se hlavní úloha v rozvoji antracyklinové kardiotoxicity připisovala tvorbě ROS za katalytického přispění volných iontů železa (Keizer *et al*, 1990; Simunek *et al*, 2009). Tuto teorii podporovalo i zjištění, že aktivní metabolit dexrazoxanu (ADR-925) odnímá ionty železa z ANT-Fe³⁺ komplexu a účinně tak brání tvorbě toxických hydroxylových radikálů (Hasinoff *et al*, 1998a). Naše předchozí experimenty však ukázaly, že strukturně odlišné látky, které snadno pronikají 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 (Popelova *et al*, 2008; Simunek *et al*, 2005b; Sterba *et al*, 2007a; Sterba *et al*, 2006). 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 kardioprotektivní účinek dexrazoxanu před antracykliny navozenou programovanou i neprogramovanou smrtí kardiomyocytů zahrnuje i ochranu před poškozením vyvolaným ROS. V souvislosti s antracykliny je historicky věnována největší pozornost peroxidaci lipidů vedoucí ke vzniku velkého množství vysoce cytotoxických aldehydů, jako např. malondialdehydu. Pro stanovení tohoto markeru lipoperoxidace byla použita validovaná HPLC metoda, kterou jsme hodnotili jeho celkové množství v myokardu levé komory po předchozí derivatizaci 2,4-dinitrofenylhydrazinem (Pilz *et al*, 2000). Zvýšené hladiny malondialdehydu byly stanoveny v myokardu zvířat, kterým byl opakovaně podáván daunorubicin ve standardním schématu. Tento výsledek byl v souladu s mnoha literárními údaji a poměrně jasně ukazoval na přítomnost oxidačního stresu po podání cytostatika a následné lipoperoxidační poškození. Novým a zároveň značně překvapivým nálezem však bylo, že dexrazoxan tomuto ději významně nezabránil. Obdobné výsledky byly získány i s imunohistochemickou detekcí dalšího markeru lipoperoxidace, kterým byl 4-hydroxynonenal (4-HNE). Pomocí tohoto přístupu jsme pozorovali zřetelně vyšší signál

4-HNE v myokardu daunorubicinových zvířat. Obdobné výsledky byly získány i u skupiny zvířat, kterým byl spolu s daunorubicinem podáván dexrazoxan. Obě metody, které umožnily nezávisle hodnotit peroxidaci lipidů v našich experimentálních podmínkách, tedy shodně poukazují na zjevný nesoulad mezi téměř úplným protektivním účinkem dexrazoxanu na většinu kardiovaskulárních parametrů a absencí jeho významného vlivu na antracyklinem navozenou peroxidaci lipidů. Tento nepoměr částečně potvrdila i korelační analýza, která nenalezla významný vztah mezi celkovým množstvím malondialdehydu 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 (kaspáza 8 a 9).

V naší studii jsme stanovili MDA v celotkáňovém homogenátu myokardu levé komory. Na základě našich výsledků tedy nemůžeme vyloučit možnost, že ochrana dexrazoxanu před poškozením navozeným volnými kyslíkovými radikály není primárně spojená jen s některým z buněčných kompartmentů. Na druhou stranu výsledky imunohistochemické detekce 4-HNE nenaznačovaly, že by tomu tak mělo být. Při zvažování eventuálního významu kompartmentalizace u antracykliny navozené tvorby ROS a místně specifické ochrany myokardu před tímto jevem se jako nejpravděpodobnější varianta nabízí zejména mitochondriální kompartment (Berthiaume & Wallace, 2007a; Tokarska-Schlattner *et al*, 2006). V tomto kontextu je důležité dodat, že mitochondrie představují důležitý zdroj, ale i cíl volných radikálů. Navíc myokard se svými obrovskými energetickými nároky je znám značnou respirační aktivitou, přičemž mitochondrie zde tvoří až 33 % objemu tkáně. Dle dostupných informací je kardiotoxický účinek antracyklinů do značné míry spjat právě s mitochondriemi. Lipofilní antracyklinový aglykon se může totiž kumulovat ve vnitřní mitochondriální membráně, což souvisí s jeho významnou afinitou ke kardiolipinu, který je zde lokalizován (Tokarska-Schlattner *et al*, 2007). Redoxní cyklizace aglykonu antracyklinu a jejich komplexů se železem může být katalyzována enzymatickou aktivitou komplexu I dýchacího řetězce. Porucha elektronového transportu v dýchacím řetězci pak může mít na svědomí tvorbu volných kyslíkových radikálů. S ohledem na význam tohoto kompartmentu při vzniku volných kyslíkových radikálů a na celkové objemové zastoupení mitochondrií v srdeční tkáni lze tedy předpokládat, že účinná ochrana dexrazoxanu před lipoperoxidací v tomto kompartmentu by se měla promítnout v celkovém množství MDA. Žádný takový trend jsme však v naší studii nezaznamenali. Proto se přikláníme k možnosti, že účinná kardioprotekce navozená dexrazoxanem primárně nemusí záviset na ochraně

před lipoperoxidací navozenou antracykliny. Na druhou stranu nelze 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 daunorubicinem. Je zajímavé, že tento protektivní účinek nebyl doprovázen významným snížením peroxidace lipidů (Simunek *et al.*, 2008). Toto pozorování bylo též v kontrastu s výsledky získanými se stejnou látkou při navození oxidačního stresu inkubací buněk s peroxidem vodíku (Simunek *et al.*, 2005a; Simunek *et al.*, 2007). Za těchto podmínek bylo dosaženo nejen vyššího protektivního účinku, ale i téměř kompletní ochrany před lipoperoxidací. V další studii bylo ukázáno, že dexrazoxan nezmírnil ani oxidační poškození vyvolané doxorubicinem u buněčné linie A549 (Kaiserova *et al.* 2006). I tato data ukazují, že ochrana srdečních buněk před antracyklinovou kardiotoxicitou nemusí být jednoznačně závislá na ochraně před lipoperoxidací.

V návaznosti na výše uvedená fakta jsme se v další části zaměřili na stanovení množství glutathionu v myokardu levé komory jako jedné z hlavních endogenních látek, které slouží k udržení redoxní homeostázy buňky. V daunorubicinové skupině byla zjištěna signifikantně zvýšená koncentrace GSH, což naznačuje zvýšenou syntézu glutathionu, nicméně množství GSSG zůstalo zachované na hodnotách srovnatelných s kontrolní skupinou. Podání dexrazoxanu přitom navenodilo významné změny v obou parametrech a hodnoty se velmi blížily daunorubicinové skupině. Zaměřili jsme se i na poměr GSSG/GSH, který může být důležitým ukazatelem tvorby ROS v buňce (Stipek, 2000). Mezi experimentálními skupinami nebyl 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 jádře (Schafer & Buettner, 2001). 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 antracyklinové kardiotoxicitě jistě zaslouží další pozornost. Nicméně shrnutí všech dosavadních výsledků nás zatím vede k závěru, že ochrana před tvorbou ROS a následnou

lipoperoxidací nemusí hrát zásadní úlohu v kardioprotekci navozené dexrazoxanem. Toto zjištění může vysvětlit selhání dřívějších pokusů s celou řadou antioxidantů (např. vitamin E, acetylcystein, flavonoidy) zaměřených na kardioprotektivní intervenci před antracyklinovou kardiotoxicitou na chronických experimentálních modelech (Bruynzeel *et al*, 2007b; Herman *et al*, 1985; Van Vleet *et al*, 1980) a v randomizovaných klinických studiích (Bruynzeel *et al*, 2007a; Dresdale *et al*, 1982; Legha *et al*, 1982; Myers *et al*, 1983). Naše data tímto také podporují současnou výzvu k přehodnocení „klasické“ a možná až příliš zjednodušené verze “ROS and iron hypothesis” patogeneze antracyklinové kardiotoxicity a mechanismu kardioprotekce navozené dexrazoxanem (Gianni *et al*, 2008).

Za těchto okolností zde vyvstává řada otázek ohledně konkrétních mechanismů zodpovědných za protektivní účinek dexrazoxanu vůči antracyklinové kardiotoxicitě. Antracykliny a jejich metabolity mohou vyvolat řadu dalších buněčných dějů, které nejsou přímo zprostředkovány ROS (Menna *et al*, 2007). Antracykliny například významně interferují s buněčnou homeostázou vápníku ovlivněním funkce kalciových transportů a iontových kanálů (Minotti *et al*, 2004; Simunek *et al*, 2005c; Solem *et al*, 1994; Wallace, 2007), což může ve svém důsledku vyústit v přetížení buňky vápníkem. Narozdíl od dříve studovaných látek (Popelova *et al*, 2008; Sterba *et al*, 2007a; Sterba *et al*, 2006) aktivní metabolit dexrazoxanu (ADR-925) díky své strukturní podobnosti s EDTA může chelátovat i vápenaté ionty. Schopnost dexrazoxanu zabránit poruše homeostázy vápníku byla v minulosti prokázána i na našem modelu (Simunek *et al*, 2005c), 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 daunorubicinu, přičemž dexrazoxan ji dokázal významně potlačit. Vápenaté ionty zvyšují aktivitu řady enzymů, např. Ca^{2+} -dependentní proteázy, kalpainu (Singh *et al*, 2004a), který se např. účastní štěpení řady cytoskeletárních a myofilamentárních proteinů, což by mohlo vést k progresi rozvoje kardiomyopatie (Barta *et al*, 2005; Papp *et al*, 2000). Kalpain je také spojován s apoptotickou buněčnou smrtí prostřednictvím štěpení pro-kaspázy 12 a pro-apoptické molekuly Bid, která je součástí mitochondriální signální cesty. Na jeho případnou úlohu v antracyklinové kardiotoxicitě poukazuje i jeho značně zvýšená aktivita po inkubaci izolovaných kardiomyocytů s klinicky relevantními koncentracemi antracyklinu (Lim *et al*, 2004). Naše pilotní výsledky též naznačují zvýšenou aktivitu této proteázy v myokardu zvířat, kterým byl podáván opakovaně daunorubicin (data nejsou prezentována), proto si význam této cesty pro ochranu myokardu vyžádá další studium.

Vedle výše diskutovaných hypotéz, které výhradně vycházely z předpokladu, že dexrazoxan je proléčivo chelatačně aktivní látky ADR-925, můžeme v recentní literatuře nalézt indicie poukazující na možnost přímého kardioprotektivního působení dexrazoxanu (Hasinoff & Herman, 2007; Lyu *et al.*, 2007). Dexrazoxan patří mezi kompetitivní katalytické inhibitory topoisomerázy II, které uzamykají enzym v jeho stabilní a uzavřenou konformaci obklopující DNA (Roca *et al.*, 1994). Tento účinek je tradičně spojován s protinádorovým působením dexrazoxanu. Na druhou stranu antracykliny se řadí mezi ireverzibilní inhibitory topoisomerázy II („topoisomerase II poisons“), které se kovalentně vážou na DNA řetězce a molekulu topoisomerázy za vzniku stabilního komplexu. Tato interakce následně vede k vyvolání zlomů v DNA (Minotti *et al.*, 2004). Nově se proto objevily informace, že dexrazoxan jako katalytický inhibitor by mohl působit kardioprotektivně vůči účinkům látek řadících se k „topoisomerase II poisons“ (Lyu *et al.*, 2007). Tyto výsledky byly částečně podpořeny experimenty s novým dexrazoxanovým derivátem (ICRF-161), který má obdobně jako dexrazoxan 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 účinku (Martin *et al.*, 2009).

V naší studii jsme tedy poprvé popsali, že dexrazoxanem navozená kardioprotekce vůči chronické antracyklinové kardiotoxicitě *in vivo* je založena nejen na ochraně kardiomyocytů před degenerativními změnami a neprogramovanou buněčnou smrtí, ale také před programovanou (apoptotickou) smrtí. Daunorubicin v našich podmínkách navodil komplexní apoptotickou signalizaci, přičemž dexrazoxan dokázal blokovat všechny tyto významné apoptotické cesty. Zůstává tu však spousta neobjasněných otázek týkajících se právě mechanismů zodpovědných za tento protektivní účinek dexrazoxanu a za samotný rozvoj chronické antracyklinové kardiotoxicity. Ze získaných výsledků zejména vyplývá, že vztah mezi antracyklinovou kardiotoxicitou a oxidačním stresem nemusí být tak jednoduchý, jak se původně předpokládalo.

Proto jsme se v následující části zaměřili na lepší pochopení patogeneze chronické antracyklinové kardiotoxicity. Jednou z klíčových otázek, které stále nebyly vyřešeny, je 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 antracyklinu. Bioptický odběr materiálu je zatížen řadou komplikací, a proto se dnes provádí jen ve výjimečných případech. Při jeho odběrech se obvykle získá velmi omezené

množství a nemusí se nutně obdržet reprezentativní vzorek myokardu vzhledem k ložiskovému charakteru postižení. Navíc pacienti jsou často léčeni i řadou jiných chemoterapeutik a v mnoha případech v různých schématech, což může též značně komplikovat interpretaci získaných dat. Postmortální odběr humánních vzorků je obdobně limitován dostupností myokardiálních vzorků a vlivem možných postmortálních změn. 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, morfologických a dalších změn v myokardu levé komory v průběhu rozvoje chronické antracyklinové kardiotoxicity.

Současná úvaha předpokládá, že každá dávka antracyklinů může vyvolat určité poškození myokardu. Toto poškození zpočátku probíhá skrytě až do doby, kdy nakumulované poškození myokardu překročí jeho funkční rezervu (Ewer & Benjamin, 2006). Se zvyšující se kumulativní dávkou antracyklinů se stupňují změny v ultrastruktuře myokardu, které mohou vyústit v ireverzibilní ztrátu myofibril, v degeneraci kardiomyocytů a až v jejich smrt (Billingham *et al*, 1978; Von Hoff *et al*, 1979). Takto vzniklá antracyklinová kardiomyopatie se dále manifestuje jako levostranné srdeční selhání s velmi špatnou prognózou pro pacienta (Gianni *et al*, 2008; Jones *et al*, 2006). Dle nových informací je hranice 5% výskytu kardiotoxicity překročena již při kumulativní dávce doxorubicinu 400-500 mg/m² (Ewer & Benjamin, 2006). 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/m² (Von Hoff *et al*, 1979). Z těchto údajů vychází i současná doporučení pro podávání kardioprotektiva dexrazoxanu, která navrhují jeho podání až při překročení určité kumulativní dávky antracyklinu (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 utvořeno několik skupin zvířat, která byla exponovaná různě kumulativní dávkou antracyklinu a končena za 24 hodin 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 daunorubicinu 400 mg/m² (přesněji s 24 hodinovým odstupem od 8. aplikace daunorubicinu). 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 hodin nebo týden po dané aplikaci daunorubicinu, 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 antracyklinové kardiotoxicity. Korelační analýza odhalila i významný vzájemný vztah mezi oběma srdečními markery. Tento fakt nám tedy dále potvrzuje, že stanovení koncentrací troponinu T a I je vhodným markerem hodnocení chronické antracyklinové kardiotoxicity (Bryant *et al*, 2007).

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

Stanovení změn v oxidované a redukované formě glutathionu v průběhu rozvoje antracyklinové kardiotoxicity přineslo další zajímavé informace. I když se hodnoty celkového a redukovaného glutathionu měnily pouze nevýznamně, poměr GSSH/GSH byl signifikantně zvýšen 5. a 8. týdnů pokusu, přičemž hodnoty v závěru experimentu opět klesaly a již se nelišily od kontrol. Z hlediska časového a obecného trendu vývoje tohoto parametru lze shledat určitou podobnost se stanovením MDA, na což poukázala i korelační analýza. O pravděpodobné kauzální souvislosti obou parametrů napovídají i teoretické argumenty, neboť právě glutathion je známým substrátem pro enzymatické reakce katalyzované glutathionperoxidázou směřující k odbourávání toxických produktů lipoperoxidace (Stipek, 2000). Oba tyto parametry naznačují, že průběh oxidačního stresu v průběhu antracyklinové kardiotoxicity je dynamický, ale překvapivě nemá kumulativní charakter. Vzhledem k tomu, že oxidační stres předcházela systolická dysfunkce levé komory o několik týdnů a vzhledem k celkovému trendu vývoje obou jeho markerů, by

tento fakt mohl znamenat, že oxidační stres je spíše určitým spouštěcím než exekutivním činitelem v rozvoji chronické antracyklinové kardiotoxicity.

Výše uvedeným výsledkům odpovídal i histologický nález myokardu levé komory. Do kumulativní dávky daunorubicinu 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 hodin či týden po poslední aplikaci daunorubicinu v daném intervalu sledování. K výraznějším morfologickým změnám docházelo až od 8. aplikace cytostatika (kumulativní dávka daunorubicinu 400 mg/m²). V myokardech levé komory, které byly odebrány za 24 hodin 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 hodin a za týden po 8. aplikaci daunorubicinu byl zjištěn nepatrný rozdíl v histologickém nálezu. Zvyšoval se počet buněk podléhající degeneraci a následné neprogramované buněčné smrti. S použitím polarizovaného světla bylo odhaleno i postupné vyžrávání 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 daunorubicinu 500 mg/m²). V této fázi bylo již zdokumentováno typické ložiskové poškození levé komory charakteristické pro chronické podávání antracyklinů (Billingham *et al*, 1978; Lewis & Silver, 2001).

V průběhu rozvoje chronické antracyklinové 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 vyžrávání 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 fibrózy (Pelouch *et al*, 1993).

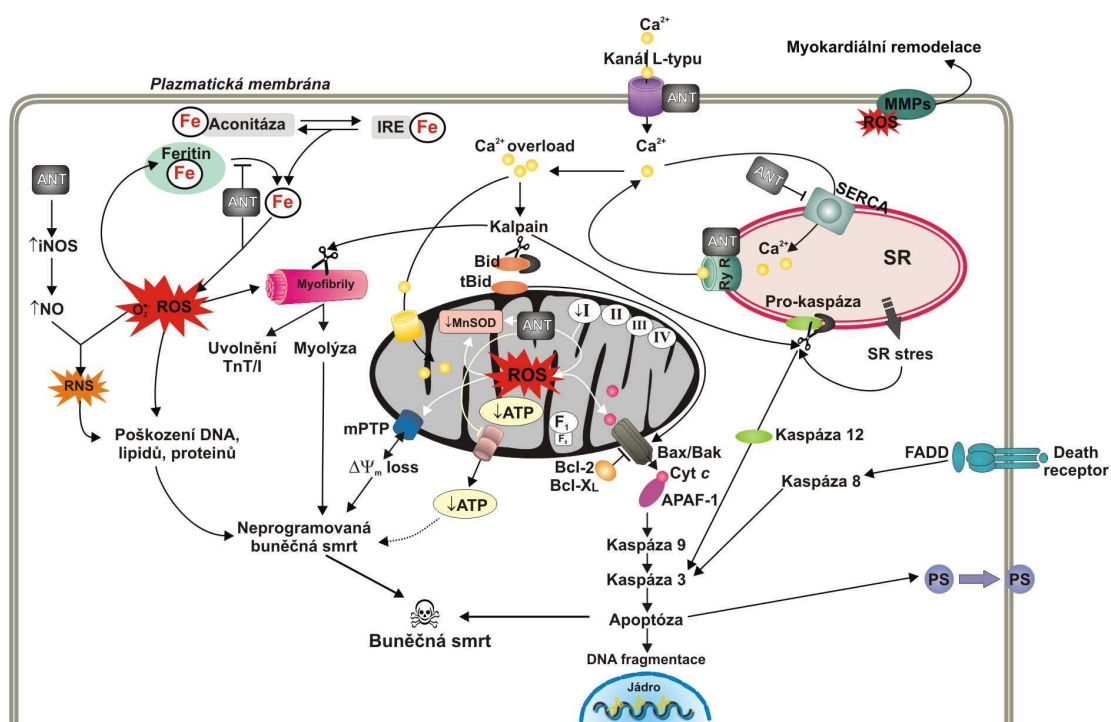
Remodelace myokardu není děj samovolný, ale ze všech informací je zřejmé, že se na něm podílí řada signálních a exekutivních molekul. Proto jsme se v další části zaměřili na hodnocení úlohy matrixových metaloproteináz (MMPs), které jsou obecně považovány za klíčové regulátory a vykonavatele remodelace extracelulární matrix. Soudí se, že právě MMPs by měly mít zásadní vliv na změny v geometrii a integritě myokardu v průběhu remodelace. Změny v aktivaci MMPs byly popsány u řady patologických stavů jako je ateroskleróza, infarkt myokardu, či u progresu srdečního selhání (Graham *et al*, 2008; Lala *et al*, 2005). Údaje o možném podílu MMPs na remodelaci myokardu u antracyklinové kardiomyopatie jsou však omezené. Dosud byly pouze publikované práce, kde byla úloha MMPs hodnocena jen po jednorázové aplikaci vysoké dávky antracyklinu (Bai *et al*, 2004; Pacher *et al*, 2002). 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 III (Spinale, 2007). Významné zapojení těchto MMP bylo popsáno např. u ischemicko/reperfuze poškození a následné myokardiální remodelace (Lala *et al*, 2005). Obdobně zvýšená jejich aktivita byla prokázána i po jednorázové vysoké dávce antracyklinů (Bai *et al*, 2004; Pacher *et al*, 2002). Při použití našeho modelu jsme překvapivě pozorovali významný pokles celkové aktivity obou želatináz od 3. aplikace daunorubicinu (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 (Spanikova *et al*, 2008; Van Linthout *et al*, 2008). Tyto výsledky tedy naznačují, že hlavní želatinázy (MMP-2 a 9) se zřejmě významně nepodílejí na remodelaci myokardu v důsledku antracyklinové 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 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 (substrát SB1), který nám umožnil specificky hodnotit aktivitu MMP-13. Tato metaloproteináza je syntetizována zejména aktivovanými myokardiálními fibroblasty (často v odpovědi na oxidační stres) (Spinale, 2007). V průběhu celého rozvoje antracyklinové 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 SB16 (se substrátovou specifitou rozšířenou 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 od 8. týdne pokusu neboli kumulativní dávka daunorubicinu 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 oxidovaného glutathionu a jeho poměr k redukovanému 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, fibronectin a kolagen IV (Spinale, 2007). Těmto výsledkům odpovídal i histologický nálezu, který ukazoval na nástup pokročilejších degenerativních změn právě od 8. týdne pokusu, s postupným výskytem „úklidové reakce“ (byť relativně omezené) v podobě infiltrace makrofágů. Substrát (SB7) se specifitou dále rozšířenou o MMP-7 poněkud pozměnil charakter pozorovaných změn. Trend ve zvýšení aktivity v první fázi pokusu vymizel a došlo k významnému zvýšení celkové aktivity MMPs až v druhé polovině pokusu. Poprvé byl nalezen rozdíl mezi aktivitou ve vzorcích odebraných za 24 hodin a za týden po aplikaci cytostatika, což naznačuje možnou akutní indukci aktivity MMP s podáním vyšších kumulativních dávek cytostatika. MMP-7 štěpí především fibrilární kolageny a komponenty bazální membrány kardiomyocytů (zejména kolagen IV, fibronectin a lamin) a někdy bývá spojena s akutnější odpovědí na patologický inzult (např. infarkt myokardu) (Spinale, 2007). Další substrát (SB2) 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 (SB14 a SB520) s již poměrně širokou substrátovou specifitou poskytly obdobné výsledky s tendencí ke zvýšení aktivity v první fázi pokusu, následnou stabilizací a signifikantním vzestupem v závěru experimentu. Celkový trend

připomínal změny v aktivitě hodnocené pomocí substrátu specifického pro MMP-12 a 13 (SB16). Relativně nejvýraznější změny byly zjištěny u substrátu s nejmenší specifikou (SB520).

Výše diskutované výsledky dokazují, že patogeneze chronické antracyklinové kardiotoxicity je velmi komplikovaný děj, který může být výsledkem několika po sobě, ale i paralelně jdoucích procesů. Protože úspěch při vývoji nových účinných kardioprotektiv bude do značné míry záviset na schopnosti pochopit podstatu komplexní patogeneze chronické antracyklinové kardiotoxicity, rozhodli jsme se shrnout dosavadní literární údaje a výsledky plynoucí z této dizertační práce v grafickém schématu (obr. 48).



Obr. 49. Schématický přehled intracelulárních cest pravděpodobně zapojených do chronické antracyklinové kardiotoxicity. ANT – antracyklin, Cyt C – cytochrom C, IRE – „iron responsive elements“, FADD – intracelulární doména receptoru pro Fas, mPTP - permeační pór na mitochondriální membráně, PS - fosfatidylserin, MMP – matrixová metaloproteináza, NOS – NO syntáza, RNS – reaktivní formy dusíku, ROS – reaktivní formy kyslíku, RyR – ryadinový receptor, SERCA – sarkoplazmatická ATPáza, SOD – superoxidodismutáza, SR – sarkoplazmatické retikulum, Tn - troponin.

Z tohoto přehledu je zřejmé, že je zde stále mnoho nejasností především s ohledem na reálný význam jednotlivých mechanismů, jejich vzájemné kauzální a časové souslednosti a propojení. Proto je potřebné upřít další pozornost k analýze molekulárních dějů ovlivňující spouštěcí i exekutivní mechanismy antracyklinové kardiotoxicity. K identifikaci klíčových molekul a signálních cest by mohla přispět probíhající proteomická analýza myokardu chronicky exponovaného antracyklinům (ve spolupráci s Ústavem molekulární patologie FVZ UO). Na tyto výsledky bude zajímavé dále navázat

analýzou takto vybraných molekul ve vzorcích myokardu úspěšně ochráněných dexrazoxanem, čímž by bylo možné potvrdit jejich kauzální vztah k účinné kardioprotekci. Dále bude možné pomocí imunodetekčních metod (Western blot a imunohistochemie) sledovat časový průběh těchto změn ve vzorcích z pokusů realizovaných v rámci této dizertační práce, což bude klíčové pro určení příčinných a následných vztahů.

Další oblastí, která podle našeho názoru zasluhuje pozornost vědecké komunity, je role programované buněčné smrti v průběhu chronické antracyklinové 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 antracyklinu 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 antracyklinovou kardiotoxicitou je v literatuře vedle ROS zmiňována úloha nitračního stresu (Fogli *et al*, 2004). Antracykliny mohou indukovat tvorbu NO v kardiomyocytech v důsledku zvýšené exprese a aktivity inducibilní NO syntázy (iNOS) (Liu *et al*, 2006). Vzniklý NO může společně se superoxidovým radikálem vést ke tvorbě reaktivních forem dusíku (převážně peroxynitritu) (Stipek, 2000). Tyto extrémně reaktivní látky následně poškozují různé biomolekuly a/nebo spouštějí rozličné buněčné signalizační cesty. V mnoha studiích s užitím akutního modelu byly zaznamenány vysoké koncentrace nitrotyrosinu (markeru nitračního stresu) v myokardu zvířat exponovaných antracykliny (Andreadou *et al*, 2007; Pacher *et al*, 2003; Weinstein *et al*, 2000). 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 dexrazoxanem.

Stále aktuální oblastí výzkumu je tudíž pochopení mechanismů a dalších souvislostí kardioprotekce navozené dexrazoxanem. Na tomto místě je opět třeba zdůraznit, že dexrazoxan je jediné kardioprotektivum, které je prokazatelně schopné ochránit myokard pacientů léčených antracykliny. Je s podivem, jak malá pozornost byla dosud věnována vztahu mezi strukturou tohoto léčiva a jeho účinkem. Tento fakt je patrně zapříčiněn tím, že dexrazoxan byl dlouhou dobu vyvíjen jako cytostatikum, přičemž jeho kardioprotektivní účinek byl objeven později a vlastně náhodou (Hellmann, 1998). Cílená obměna struktury dexrazoxanu by s velkou pravděpodobností mohla přispět k optimalizaci

kardioprotektivního účinku a zároveň k snížení jeho toxicity, která je patrně dána inhibicí topoisomerázy II. Dále lze důvodně očekávat, že farmakologické hodnocení těchto nových derivátů dexrazoxanu by též mohlo identifikovat klíčové molekuly a následně i molekulární mechanismy nezbytné pro výsledný protektivní efekt.

Současná doporučení navrhují podání dexrazoxanu až při překročení určité kumulativní dávky antracyklinu (např. 300 mg/m² u doxorubicinu) (Ewer & Yeh, 2006), 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 dexrazoxan v odloženém schématu dokáže zabránit předčasnému úhynu zvířat navozenému daunorubicinem. Z výsledků také vyplývá, že dexrazoxan je schopen do značné míry ochránit myokard před toxicitou antracyklinů 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 dexrazoxan dokáže některým následkům podávání antracyklinů zcela zabránit, nebo zda budou jeho protektivní vlastnosti omezeny pouze na oddálení některých aspektů antracyklinové kardiotoxicity. V tomto kontextu je třeba vnímat i závěry recentních klinických studií a jejich metaanalýz (van Dalen *et al*, 2006), že i subklinické poškození myokardu antracykliny přináší zvýšené kardiovaskulární riziko v budoucnosti.

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

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 reparační.
- 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.

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/m²) 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 poskytly 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.

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 and 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/m²). 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.

LITERATURA

- Adamcova M, Simunek T, Kaiserova H, Popelova O, Sterba M, Potacova A, Vavrova J, Malakova J, Gersl V (2007) In vitro and in vivo examination of cardiac troponins as biochemical markers of drug-induced cardiotoxicity. *Toxicology* **237**: 218-28
- Agapito MT, Antolin Y, del Brio MT, Lopez-Burillo S, Pablos MI, Recio JM (2001) Protective effect of melatonin against adriamycin toxicity in the rat. *J Pineal Res* **31**: 23-30
- Alderton PM, Gross J, Green MD (1992) Comparative study of doxorubicin, mitoxantrone, and epirubicin in combination with ICRF-187 (ADR-529) in a chronic cardiotoxicity animal model. *Cancer Res* **52**: 194-201
- Aleman BM, van den Belt-Dusebout AW, De Bruin ML, van 't Veer MB, Baaijens MH, de Boer JP, Hart AA, Klokman WJ, Kuenen MA, Ouwens GM, Bartelink H, van Leeuwen FE (2007) Late cardiotoxicity after treatment for Hodgkin lymphoma. *Blood* **109**: 1878-86
- Allen A (1992) The cardiotoxicity of chemotherapeutic drugs. *Semin Oncol* **19**: 529-42
- Anderson LJ, Wonke B, Prescott E, Holden S, Walker JM, Pennell DJ (2002) Comparison of effects of oral deferiprone and subcutaneous desferrioxamine on myocardial iron concentrations and ventricular function in beta-thalassaemia. *Lancet* **360**: 516-20
- Andreadou I, Sigala F, Iliodromitis EK, Papaefthimiou M, Sigalas C, Aligiannis N, Savvari P, Gorgoulis V, Papalabros E, Kremastinos DT (2007) Acute doxorubicin cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress. *J Mol Cell Cardiol* **42**: 549-58
- Arai M, Tomaru K, Takizawa T, Sekiguchi K, Yokoyama T, Suzuki T, Nagai R (1998) Sarcoplasmic reticulum genes are selectively down-regulated in cardiomyopathy produced by doxorubicin in rabbits. *J Mol Cell Cardiol* **30**: 243-54
- Arbustini E, Brega A, Narula J (2008) Ultrastructural definition of apoptosis in heart failure. *Heart Fail Rev* **13**: 121-35
- Arola OJ, Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM (2000) Acute doxorubicin cardiotoxicity involves cardiomyocyte apoptosis. *Cancer Res* **60**: 1789-92
- Bai P, Mabley JG, Liaudet L, Virag L, Szabo C, Pacher P (2004) Matrix metalloproteinase activation is an early event in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Oncol Rep* **11**: 505-8
- Baldwin JR, Phillips BA, Overmyer SK, Hatfield NZ, Narang PK (1992) Influence of the cardioprotective agent dexrazoxane on doxorubicin pharmacokinetics in the dog. *Cancer Chemother Pharmacol* **30**: 433-8
- Barnabe N, Zastre JA, Venkataram S, Hasinoff BB (2002) Deferiprone protects against doxorubicin-induced myocyte cytotoxicity. *Free Radic Biol Med* **33**: 266-75
- Barta J, Toth A, Edes I, Vaszily M, Papp JG, Varro A, Papp Z (2005) Calpain-1-sensitive myofibrillar proteins of the human myocardium. *Mol Cell Biochem* **278**: 1-8
- Bast A, Haenen GR, Bruynzeel AM, Van der Vijgh WJ (2007) Protection by flavonoids against anthracycline cardiotoxicity: from chemistry to clinical trials. *Cardiovasc Toxicol* **7**: 154-9
- Batist G, Harris L, Azarnia N, Lee LW, Daza-Ramirez P (2006) Improved anti-tumor response rate with decreased cardiotoxicity of non-pegylated liposomal doxorubicin compared with conventional doxorubicin in first-line treatment of metastatic breast cancer in patients who had received prior

- adjuvant doxorubicin: results of a retrospective analysis. *Anticancer Drugs* **17**: 587-95
- Berthiaume JM, Oliveira PJ, Fariss MW, Wallace KB (2005) Dietary vitamin E decreases doxorubicin-induced oxidative stress without preventing mitochondrial dysfunction. *Cardiovasc Toxicol* **5**: 257-67
- Berthiaume JM, Wallace KB (2007a) Adriamycin-induced oxidative mitochondrial cardiotoxicity. *Cell Biol Toxicol* **23**: 15-25
- Berthiaume JM, Wallace KB (2007b) Persistent alterations to the gene expression profile of the heart subsequent to chronic Doxorubicin treatment. *Cardiovasc Toxicol* **7**: 178-91
- Bertinchant JP, Robert E, Polge A, Marty-Double C, Fabbro-Peray P, Poirey S, Aya G, Juan JM, Ledermann B, de la Coussaye JE, Dauzat M (2000) Comparison of the diagnostic value of cardiac troponin I and T determinations for detecting early myocardial damage and the relationship with histological findings after isoprenaline-induced cardiac injury in rats. *Clin Chim Acta* **298**: 13-28
- Bhattacharya M, Ponka P, Hardy P, Hanna N, Varma DR, Lachapelle P, Chemtob S (1997) Prevention of postasphyxia electroretinal dysfunction with a pyridoxal hydrazone. *Free Radic Biol Med* **22**: 11-6
- Bickel H, Gaeumann E, Keller-Schierlein W, Prelog V, Vischer E, Wettstein A, Zaehner H (1960) [On iron-containing growth factors, sideramines, and their antagonists, the iron-containing antibiotics, sideromycins.]. *Experientia* **16**: 129-33
- Billingham ME, Mason JW, Bristow MR, Daniels JR (1978) Anthracycline cardiomyopathy monitored by morphologic changes. *Cancer Treat Rep* **62**: 865-72
- Binaschi M, Bigioni M, Cipollone A, Rossi C, Goso C, Maggi CA, Capranico G, Animati F (2001) Anthracyclines: selected new developments. *Curr Med Chem Anticancer Agents* **1**: 113-30
- Bjelogrlic SK, Radic J, Jovic V, Radulovic S (2005) Activity of d,l-alpha-tocopherol (vitamin E) against cardiotoxicity induced by doxorubicin and doxorubicin with cyclophosphamide in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **97**: 311-9
- Bolaman Z, Cicek C, Kadikoylu G, Barutca S, Serter M, Yenisey C, Alper G (2005) The protective effects of amifostine on adriamycin-induced acute cardiotoxicity in rats. *Tohoku J Exp Med* **207**: 249-53
- Boucek RJ, Jr., Buck SH, Scott F, Oquist NL, Fleischer S, Olson RD (1993) Anthracycline-induced tension in permeabilized cardiac fibers: evidence for the activation of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum. *J Mol Cell Cardiol* **25**: 249-59
- Bruynzeel AM, Niessen HW, Bronzwaer JG, van der Hoeven JJ, Berkhof J, Bast A, van der Vijgh WJ, van Groeningen CJ (2007a) The effect of monohydroxyethylrutoside on doxorubicin-induced cardiotoxicity in patients treated for metastatic cancer in a phase II study. *Br J Cancer* **97**: 1084-9
- Bruynzeel AM, Vormer-Bonne S, Bast A, Niessen HW, van der Vijgh WJ (2007b) Long-term effects of 7-monohydroxyethylrutoside (monoHER) on DOX-induced cardiotoxicity in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* **60**: 509-14
- Bryant J, Picot J, Levitt G, Sullivan I, Baxter L, Clegg A (2007) Cardioprotection against the toxic effects of anthracyclines given to children with cancer: a systematic review. *Health Technol Assess* **11**: iii, ix-x, 1-84

- Bu'Lock FA, Gabriel HM, Oakhill A, Mott MG, Martin RP (1993) Cardioprotection by ICRF187 against high dose anthracycline toxicity in children with malignant disease. *Br Heart J* **70**: 185-8
- Burke BE, Olson RD, Cusack BJ, Gambliel HA, Dillmann WH (2003) Anthracycline cardiotoxicity in transgenic mice overexpressing SR Ca²⁺-ATPase. *Biochem Biophys Res Commun* **303**: 504-7
- Buss JL, Hermes-Lima M, Ponka P (2002) Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and its analogues. *Adv Exp Med Biol* **509**: 205-29
- Buss JL, Neuzil J, Ponka P (2004) Oxidative stress mediates toxicity of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone analogs. *Arch Biochem Biophys* **421**: 1-9
- Cable H, Lloyd JB (1999) Cellular uptake and release of two contrasting iron chelators. *J Pharm Pharmacol* **51**: 131-4
- Creighton AM, Birnie GD (1969) The effect of bisdioxopiperazines on the synthesis of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and protein in growing mouse-embryo fibroblasts. *Biochem J* **114**: 58P
- Cusack BJ, Gambliel H, Musser B, Hadjokas N, Shadle SE, Charlier H, Olson RD (2006) Prevention of chronic anthracycline cardiotoxicity in the adult Fischer 344 rat by dexrazoxane and effects on iron metabolism. *Cancer Chemother Pharmacol* **58**: 517-26
- Cusack BJ, Musser B, Gambliel H, Hadjokas NE, Olson RD (2003) Effect of dexrazoxane on doxorubicin pharmacokinetics in young and old rats. *Cancer Chemother Pharmacol* **51**: 139-46
- Cvetkovic RS, Scott LJ (2005) Dexrazoxane : a review of its use for cardioprotection during anthracycline chemotherapy. *Drugs* **65**: 1005-24
- Danesi R, Fogli S, Gennari A, Conte P, Del Tacca M (2002) Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of the anthracycline anticancer drugs. *Clin Pharmacokinet* **41**: 431-44
- Dardir M, Herman EH, Ferrans VJ (1989) Effects of ICRF-187 on the cardiac and renal toxicity of epirubicin in spontaneously hypertensive rats. *Cancer Chemother Pharmacol* **23**: 269-75
- DeAtley SM, Aksenov MY, Aksenova MV, Harris B, Hadley R, Cole Harper P, Carney JM, Butterfield DA (1999) Antioxidants protect against reactive oxygen species associated with adriamycin-treated cardiomyocytes. *Cancer Lett* **136**: 41-6
- Decorti G, Candussio L, Klugmann FB, Strohmayer A, Mucci MP, Mosco A, Baldini L (1997) Adriamycin-induced histamine release from heart tissue in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol* **40**: 363-6
- Della Torre P, Imondi AR, Bernardi C, Podesta A, Moneta D, Riflettuto M, Mazue G (1999) Cardioprotection by dexrazoxane in rats treated with doxorubicin and paclitaxel. *Cancer Chemother Pharmacol* **44**: 138-42
- Dobric S, Dragojevic-Simic V, Bokonjic D, Milovanovic S, Marincic D, Jovic P (1998) The efficacy of selenium, WR-2721, and their combination in the prevention of adriamycin-induced cardiotoxicity in rats. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* **17**: 291-9
- Dorn GW, 2nd (2009) Apoptotic and non-apoptotic programmed cardiomyocyte death in ventricular remodelling. *Cardiovasc Res* **81**: 465-73

- Doroshov JH, Locker GY, Ifrim I, Myers CE (1981) Prevention of doxorubicin cardiac toxicity in the mouse by N-acetylcysteine. *J Clin Invest* **68**: 1053-64
- Doroshov JH, Locker GY, Myers CE (1980) Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites: alterations produced by doxorubicin. *J Clin Invest* **65**: 128-35
- Dorr RT (1996) Cytoprotective agents for anthracyclines. *Semin Oncol* **23**: 23-34
- Dragojevic-Simic VM, Dobric SL, Bokonjic DR, Vucinic ZM, Sinovec SM, Jacevic VM, Dogovic NP (2004) Amifostine protection against doxorubicin cardiotoxicity in rats. *Anticancer Drugs* **15**: 169-78
- Dresdale AR, Barr LH, Bonow RO, Mathisen DJ, Myers CE, Schwartz DE, d'Angelo T, Rosenberg SA (1982) Prospective randomized study of the role of N-acetyl cysteine in reversing doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Am J Clin Oncol* **5**: 657-63
- Dziegiel P, Jethon Z, Suder E, Sopel M, Rabczynski J, Surowiak P, Zabel M (2002a) Role of exogenous melatonin in reducing the cardiotoxic effect of daunorubicin and doxorubicin in the rat. *Exp Toxicol Pathol* **53**: 433-9
- Dziegiel P, Murawska-Cialowicz E, Jethon Z, Januszewska L, Podhorska-Okolow M, Surowiak P, Zawadzki M, Rabczynski J, Zabel M (2003a) Melatonin stimulates the activity of protective antioxidative enzymes in myocardial cells of rats in the course of doxorubicin intoxication. *J Pineal Res* **35**: 183-7
- Dziegiel P, Podhorska-Okolow M, Surowiak P, Ciesielska U, Rabczynski J, Zabel M (2003b) Influence of exogenous melatonin on doxorubicin-evoked effects in myocardium and in transplantable Morris hepatoma in rats. *In Vivo* **17**: 325-8
- Dziegiel P, Surowiak P, Rabczynski J, Zabel M (2002b) Effect of melatonin on cytotoxic effects of daunorubicin on myocardium and on transplantable Morris hepatoma in rats. *Pol J Pathol* **53**: 201-4
- El-Demerdash E, Ali AA, Sayed-Ahmed MM, Osman AM (2003) New aspects in probucol cardioprotection against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol* **52**: 411-6
- Elbl L (2002) *Poškození srdce protinádorovou léčbou*, 1. edition edn. Praha: Grada Publishing
- Elbl L, Hrstkova H, Tomaskova I, Blazek B, Michalek J (2005) Long-term serial echocardiographic examination of late anthracycline cardiotoxicity and its prevention by dexrazoxane in paediatric patients. *Eur J Pediatr* **164**: 678-84
- Elbl L, Hrstkova H, Tomaskova I, Michalek J (2006) Late anthracycline cardiotoxicity protection by dexrazoxane (ICRF-187) in pediatric patients: echocardiographic follow-up. *Support Care Cancer* **14**: 128-36
- Emerit J, Beaumont C, Trivin F (2001) Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomed Pharmacother* **55**: 333-9
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* **11**: 81-128
- Ewer MS, Benjamin RS (2006) Doxorubicin Cardiotoxicity: Clinical Aspect, Recognition, Monitoring, Treatment, and Prevention. In *Cancer and the Heart*, Ewer MS, Yeh E (eds), pp 9-32.

Hamilton: BC Decker

Ewer MS, Vooletich MT, Durand JB, Woods ML, Davis JR, Valero V, Lenihan DJ (2005) Reversibility of trastuzumab-related cardiotoxicity: new insights based on clinical course and response to medical treatment. *J Clin Oncol* **23**: 7820-6

Ewer MS, Yeh E (2006) *Cancer and the heart*. Hamilton, Ont: BC Decker Inc

Fisher PW, Salloum F, Das A, Hyder H, Kukreja RC (2005) Phosphodiesterase-5 inhibition with sildenafil attenuates cardiomyocyte apoptosis and left ventricular dysfunction in a chronic model of doxorubicin cardiotoxicity. *Circulation* **111**: 1601-10

Fogli S, Nieri P, Breschi MC (2004) The role of nitric oxide in anthracycline toxicity and prospects for pharmacologic prevention of cardiac damage. *FASEB J* **18**: 664-75

Fredenburg AM, Wedlund PJ, Skinner TL, Damani LA, Hider RC, Yokel RA (1993) Pharmacokinetics of representative 3-hydroxypyridin-4-ones in rabbits: CP20 and CP94. *Drug Metab Dispos* **21**: 255-8

Fujita K, Shinpo K, Yamada K, Sato T, Niimi H, Shamoto M, Nagatsu T, Takeuchi T, Umezawa H (1982) Reduction of adriamycin toxicity by ascorbate in mice and guinea pigs. *Cancer Res* **42**: 309-16

Gambliel HA, Burke BE, Cusack BJ, Walsh GM, Zhang YL, Mushlin PS, Olson RD (2002) Doxorubicin and C-13 deoxydoxorubicin effects on ryanodine receptor gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* **291**: 433-8

Gersl V, Hrdina R (1994) Noninvasive polygraphic cardiac changes in daunorubicin-induced cardiomyopathy in rabbits. *Sb Ved Pr Lek Fak Karlovy Univerzity Hradci Kralove* **37**: 49-55

Gharib MI, Burnett AK (2002) Chemotherapy-induced cardiotoxicity: current practice and prospects of prophylaxis. *Eur J Heart Fail* **4**: 235-42

Gianni L, Herman EH, Lipshultz SE, Minotti G, Sarvazyan N, Sawyer DB (2008) Anthracycline cardiotoxicity: from bench to bedside. *J Clin Oncol* **26**: 3777-84

Gianni L, Salvatorelli E, Minotti G (2007) Anthracycline cardiotoxicity in breast cancer patients: synergism with trastuzumab and taxanes. *Cardiovasc Toxicol* **7**: 67-71

Glickstein H, El RB, Link G, Breuer W, Konijn AM, Hershko C, Nick H, Cabantchik ZI (2006) Action of chelators in iron-loaded cardiac cells: Accessibility to intracellular labile iron and functional consequences. *Blood* **108**: 3195-203

Godfraind T (1984) Drug-induced cardioneclerosis. *Arch Toxicol Suppl* **7**: 1-15

Graham HK, Horn M, Trafford AW (2008) Extracellular matrix profiles in the progression to heart failure. European Young Physiologists Symposium Keynote Lecture-Bratislava 2007. *Acta Physiol (Oxf)* **194**: 3-21

Green DA, Antholine WE, Wong SJ, Richardson DR, Chitambar CR (2001) Inhibition of malignant cell growth by 311, a novel iron chelator of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class: effect on the R2 subunit of ribonucleotide reductase. *Clin Cancer Res* **7**: 3574-9

Guzy J, Kusnir J, Marekova M, Chavkova Z, Dubayova K, Mojzisoava G, Mirossay L, Mojzic J (2003) Effect of quercetin on daunorubicin-induced heart mitochondria changes in rats. *Physiol Res*

52: 773-80

Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) *Free radicals in biology and medicine*, 4th edn. Oxford ; New York: Oxford University Press

Hamed S, Barshack I, Luboshits G, Wexler D, Deutsch V, Keren G, George J (2006) Erythropoietin improves myocardial performance in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Eur Heart J* **27**: 1876-83

Hasinoff BB (1995) NADPH-cytochrome-P450 reductase promotes hydroxyl radical production by the iron complex of ADR-925, the hydrolysis product of ICRF-187 (dexrazoxane). *Free Radic Res* **22**: 319-25

Hasinoff BB, Hellmann K, Herman EH, Ferrans VJ (1998a) Chemical, biological and clinical aspects of dexrazoxane and other bisdioxopiperazines. *Curr Med Chem* **5**: 1-28

Hasinoff BB, Herman EH (2007) Dexrazoxane: how it works in cardiac and tumor cells. Is it a prodrug or is it a drug? *Cardiovasc Toxicol* **7**: 140-4

Hasinoff BB, Kuschak TI, Fattman CL, Yalowich JC (1998b) The one-ring open hydrolysis intermediates of the cardioprotective agent dexrazoxane (ICRF-187) do not inhibit the growth of Chinese hamster ovary cells or the catalytic activity of DNA topoisomerase II. *Anticancer Drugs* **9**: 465-71

Hasinoff BB, Patel D, Wu X (2003a) The oral iron chelator ICL670A (deferasirox) does not protect myocytes against doxorubicin. *Free Radic Biol Med* **35**: 1469-79

Hasinoff BB, Schnabl KL, Marusak RA, Patel D, Huebner E (2003b) Dexrazoxane (ICRF-187) protects cardiac myocytes against doxorubicin by preventing damage to mitochondria. *Cardiovasc Toxicol* **3**: 89-99

Hellmann K (1998) Overview and historical development of dexrazoxane. *Semin Oncol* **25**: 48-54

Herman E, Ardalan B, Bier C, Waravdekar V, Krop S (1979) Reduction of daunorubicin lethality and myocardial cellular alterations by pretreatment with ICRF-187 in Syrian golden hamsters. *Cancer Treat Rep* **63**: 89-92

Herman EH, el-Hage A, Ferrans VJ (1988a) Protective effect of ICRF-187 on doxorubicin-induced cardiac and renal toxicity in spontaneously hypertensive (SHR) and normotensive (WKY) rats. *Toxicol Appl Pharmacol* **92**: 42-53

Herman EH, Ferrans VJ (1981) Reduction of chronic doxorubicin cardiotoxicity in dogs by pretreatment with (+/-)-1,2-bis(3,5-dioxopiperazinyl-1-yl)propane (ICRF-187). *Cancer Res* **41**: 3436-40

Herman EH, Ferrans VJ (1983) Influence of vitamin E and ICRF-187 on chronic doxorubicin cardiotoxicity in miniature swine. *Lab Invest* **49**: 69-77

Herman EH, Ferrans VJ (1986) Pretreatment with ICRF-187 provides long-lasting protection against chronic daunorubicin cardiotoxicity in rabbits. *Cancer Chemother Pharmacol* **16**: 102-6

Herman EH, Ferrans VJ (1993) Timing of treatment with ICRF-187 and its effect on chronic doxorubicin cardiotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol* **32**: 445-9

Herman EH, Ferrans VJ, Jordan W, Ardalan B (1981) Reduction of chronic daunorubicin

- cardiotoxicity by ICRF-187 in rabbits. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **31**: 85-97
- Herman EH, Ferrans VJ, Myers CE, Van Vleet JF (1985) Comparison of the effectiveness of (+/-)-1,2-bis(3,5-dioxopiperazinyl-1-yl)propane (ICRF-187) and N-acetylcysteine in preventing chronic doxorubicin cardiotoxicity in beagles. *Cancer Res* **45**: 276-81
- Herman EH, Ferrans VJ, Young RS, Hamlin RL (1988b) Effect of pretreatment with ICRF-187 on the total cumulative dose of doxorubicin tolerated by beagle dogs. *Cancer Res* **48**: 6918-25
- Herman EH, Ferrans VJ, Young RS, Hamlin RL (1988c) Pretreatment with ICRF-187 allows a marked increase in the total cumulative dose of doxorubicin tolerated by beagle dogs. *Drugs Exp Clin Res* **14**: 563-70
- Herman EH, Zhang J, Ferrans VJ (1994) Comparison of the protective effects of desferrioxamine and ICRF-187 against doxorubicin-induced toxicity in spontaneously hypertensive rats. *Cancer Chemother Pharmacol* **35**: 93-100
- Herman EH, Zhang J, Chadwick DP, Ferrans VJ (2000) Comparison of the protective effects of amifostine and dexrazoxane against the toxicity of doxorubicin in spontaneously hypertensive rats. *Cancer Chemother Pharmacol* **45**: 329-34
- Hermes-Lima M, Ponka P, Schulman HM (2000) The iron chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) and its analogues prevent damage to 2-deoxyribose mediated by ferric iron plus ascorbate. *Biochim Biophys Acta* **1523**: 154-60
- Hermes-Lima M, Santos NC, Yan J, Andrews M, Schulman HM, Ponka P (1999) EPR spin trapping and 2-deoxyribose degradation studies of the effect of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) on $\cdot\text{OH}$ formation by the Fenton reaction. *Biochim Biophys Acta* **1426**: 475-82
- Hershko C, Link G, Tzahor M, Kaltwasser JP, Athias P, Grynberg A, Pinson A (1993) Anthracycline toxicity is potentiated by iron and inhibited by deferoxamine: studies in rat heart cells in culture. *J Lab Clin Med* **122**: 245-51
- Holmberg SR, Williams AJ (1990) Patterns of interaction between anthraquinone drugs and the calcium-release channel from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Circ Res* **67**: 272-83
- Horackova M, Ponka P, Byczko Z (2000) The antioxidant effects of a novel iron chelator salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone in the prevention of H_2O_2 injury in adult cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* **47**: 529-36
- Horenstein MS, Vander Heide RS, L'Ecuyer TJ (2000) Molecular basis of anthracycline-induced cardiotoxicity and its prevention. *Mol Genet Metab* **71**: 436-44
- Hovorka O, St'astny M, Etrych T, Subr V, Strohalm J, Ulbrich K, Rihova B (2002) Differences in the intracellular fate of free and polymer-bound doxorubicin. *J Control Release* **80**: 101-17
- Hoy T, Humphrys J, Jacobs A, Williams A, Ponka P (1979) Effective iron chelation following oral administration of an isoniazid-pyridoxal hydrazone. *Br J Haematol* **43**: 443-9
- Hoyano Y, Furukawa Y, Oguchi T, Kasama M, Imamura H, Chiba S (1996) Acute presynaptic inhibition by doxorubicin of negative chrono- and inotropic responses to parasympathetic nerve stimulation in isolated, blood-perfused dog atrium. *J Cardiovasc Pharmacol* **27**: 37-41
- Hrdina R, Gersl V, Klímtová I, Šimunek T, Machacková J, Adamcová M (2000) Anthracycline-induced cardiotoxicity. *Acta Medica (Hradec Kralove)* **43**: 75-82

- Chakrabarti KB, Hopewell JW, Wilding D, Plowman PN (2001) Modification of doxorubicin-induced cardiotoxicity: effect of essential fatty acids and ICRF-187 (dexrazoxane). *Eur J Cancer* **37**: 1435-42
- Chen B, Peng X, Pentassuglia L, Lim CC, Sawyer DB (2007) Molecular and cellular mechanisms of anthracycline cardiotoxicity. *Cardiovasc Toxicol* **7**: 114-21
- Childs AC, Phaneuf SL, Dirks AJ, Phillips T, Leeuwenburgh C (2002) Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome C release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2:Bax ratio. *Cancer Res* **62**: 4592-8
- Chu TF, Rupnick MA, Kerkela R, Dallabrida SM, Zurakowski D, Nguyen L, Woulfe K, Pravda E, Cassiola F, Desai J, George S, Morgan JA, Harris DM, Ismail NS, Chen JH, Schoen FJ, Van den Abbeele AD, Demetri GD, Force T, Chen MH (2007) Cardiotoxicity associated with tyrosine kinase inhibitor sunitinib. *Lancet* **370**: 2011-9
- Iarussi D, Indolfi P, Casale F, Martino V, Di Tullio MT, Calabro R (2005) Anthracycline-induced cardiotoxicity in children with cancer: strategies for prevention and management. *Paediatr Drugs* **7**: 67-76
- Jahnukainen K, Jahnukainen T, Salmi TT, Svechnikov K, Eksborg S, Soder O (2001) Amifostine protects against early but not late toxic effects of doxorubicin in infant rats. *Cancer Res* **61**: 6423-7
- Janero DR (1990) Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* **9**: 515-40
- Jang YM, Kendaiah S, Drew B, Phillips T, Selman C, Julian D, Leeuwenburgh C (2004) Doxorubicin treatment in vivo activates caspase-12 mediated cardiac apoptosis in both male and female rats. *FEBS Lett* **577**: 483-90
- Jelic S, Radulovic S, Neskovic-Konstantinovic Z, Kreacic M, Ristic Z, Bosnjak S, Milanovic N, Vuletic L (1995) Cardioprotection with ICRF-187 (Cardioxane) in patients with advanced breast cancer having cardiac risk factors for doxorubicin cardiotoxicity, treated with the FDC regimen. *Support Care Cancer* **3**: 176-82
- Jensen JN, Lock-Andersen J, Langer SW, Mejer J (2003) Dexrazoxane-a promising antidote in the treatment of accidental extravasation of anthracyclines. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* **37**: 174-5
- Jones RL, Smith IE (2004) Efficacy and safety of trastuzumab. *Expert Opin Drug Saf* **3**: 317-27
- Jones RL, Swanton C, Ewer MS (2006) Anthracycline cardiotoxicity. *Expert Opin Drug Saf* **5**: 791-809
- Jung K, Reszka R (2001) Mitochondria as subcellular targets for clinically useful anthracyclines. *Adv Drug Deliv Rev* **49**: 87-105
- Kaiserova H, den Hartog GJ, Simunek T, Schroterova L, Kvasnickova E, Bast A (2006) Iron is not involved in oxidative stress-mediated cytotoxicity of doxorubicin and bleomycin. *Br J Pharmacol* **149**: 920-30
- Kang YJ, Zhou ZX, Wang GW, Buridi A, Klein JB (2000) Suppression by metallothionein of doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* **275**: 13690-8

Keizer HG, Pinedo HM, Schuurhuis GJ, Joenje H (1990) Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmacol Ther* **47**: 219-31

Kerkela R, Grazette L, Yacobi R, Iliescu C, Patten R, Beahm C, Walters B, Shevtsov S, Pesant S, Clubb FJ, Rosenzweig A, Salomon RN, Van Etten RA, Alroy J, Durand JB, Force T (2006) Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate. *Nat Med* **12**: 908-16

Kim C, Kim N, Joo H, Youm JB, Park WS, Cuong DV, Park YS, Kim E, Min CK, Han J (2005) Modulation by melatonin of the cardiotoxic and antitumor activities of adriamycin. *J Cardiovasc Pharmacol* **46**: 200-10

Kim SJ, Park KM, Kim N, Yeom YI (2006) Doxorubicin prevents endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **339**: 463-8

Klener P (1996) *Protinádorová chemoterapie*. Praha: Galén

Klimtova I, Simunek T, Mazurova Y, Kaplanova J, Sterba M, Hrdina R, Gersl V, Adamcova M, Ponka P (2003) A study of potential toxic effects after repeated 10-week administration of a new iron chelator--salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH) to rabbits. *Acta Medica (Hradec Kralove)* **46**: 163-70

Klugmann FB, Decorti G, Candussio L, Grill V, Mallardi F, Baldini L (1986) Inhibitors of adriamycin-induced histamine release in vitro limit adriamycin cardiotoxicity in vivo. *Br J Cancer* **54**: 743-8

Kolaric K, Bradamante V, Cervek J, Cieslinska A, Cisarz-Filipcak E, Denisov LE, Donat D, Drosik K, Gershanovic M, Hudziec P, et al. (1995) A phase II trial of cardioprotection with Cardioxane (ICRF-187) in patients with advanced breast cancer receiving 5-fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide. *Oncology* **52**: 251-5

Konorev EA, Vanamala S, Kalyanaraman B (2008) Differences in doxorubicin-induced apoptotic signaling in adult and immature cardiomyocytes. *Free Radic Biol Med* **45**: 1723-8

Kontoghiorghes GJ, Efstathiou A, Ioannou-Loucaides S, Kolnagou A (2008) Chelators controlling metal metabolism and toxicity pathways: applications in cancer prevention, diagnosis and treatment. *Hemoglobin* **32**: 217-27

Kontoghiorghes GJ, Goddard JG, Bartlett AN, Sheppard L (1990) Pharmacokinetic studies in humans with the oral iron chelator 1,2-dimethyl-3-hydroxypyrid-4-one. *Clin Pharmacol Ther* **48**: 255-61

Kontoghiorghes GJ, Pattichis K, Neocleous K, Kolnagou A (2004) The design and development of deferiprone (L1) and other iron chelators for clinical use: targeting methods and application prospects. *Curr Med Chem* **11**: 2161-83

Kotamraju S, Chitambar CR, Kalivendi SV, Joseph J, Kalyanaraman B (2002) Transferrin receptor-dependent iron uptake is responsible for doxorubicin-mediated apoptosis in endothelial cells: role of oxidant-induced iron signaling in apoptosis. *J Biol Chem* **277**: 17179-87

Kotamraju S, Kalivendi SV, Konorev E, Chitambar CR, Joseph J, Kalyanaraman B (2004) Oxidant-induced iron signaling in Doxorubicin-mediated apoptosis. *Methods Enzymol* **378**: 362-82

Kovarikova P, Klimes J, Sterba M, Popelova O, Gersl V, Ponka P (2006) 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* **838**: 107-12

Kovarikova P, Klimes J, Sterba M, Popelova O, Mokry M, Gersl V, Ponka P (2005) 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* **28**: 1300-6

Kratz F, Warnecke A, Schmid B, Chung DE, Gitzel M (2006) Prodrugs of anthracyclines in cancer chemotherapy. *Curr Med Chem* **13**: 477-523

Kruszewski M (2004) The role of labile iron pool in cardiovascular diseases. *Acta Biochim Pol* **51**: 471-80

Kvetina J, Grossmann V, Svoboda Z, Safarova M (1997) Preclinical comparison of bis-diketopiperazine-propane (dexrazoxane) and bis-diketopiperazine-ethane (antimet) on the adriamycin-cardiotoxic effect. *Neoplasma* **44**: 97-9

Kwok JC, Richardson DR (2000) The cardioprotective effect of the iron chelator dexrazoxane (ICRF-187) on anthracycline-mediated cardiotoxicity. *Redox Rep* **5**: 317-24

Kwok JC, Richardson DR (2004) Examination of the mechanism(s) involved in doxorubicin-mediated iron accumulation in ferritin: studies using metabolic inhibitors, protein synthesis inhibitors, and lysosomotropic agents. *Mol Pharmacol* **65**: 181-95

Lalu MM, Pasini E, Schulze CJ, Ferrari-Vivaldi M, Ferrari-Vivaldi G, Bachetti T, Schulz R (2005) Ischaemia-reperfusion injury activates matrix metalloproteinases in the human heart. *Eur Heart J* **26**: 27-35

Langer SW (2007) Dexrazoxane for anthracycline extravasation. *Expert Rev Anticancer Ther* **7**: 1081-8

Lee Y, Gustafsson AB (2009) Role of apoptosis in cardiovascular disease. *Apoptosis* **14**: 536-48

Legha SS, Wang YM, Mackay B, Ewer M, Hortobagyi GN, Benjamin RS, Ali MK (1982) Clinical and pharmacologic investigation of the effects of alpha-tocopherol on adriamycin cardiotoxicity. *Ann N Y Acad Sci* **393**: 411-8

Lescoat G, Chantrel-Groussard K, Padeloup N, Nick H, Brissot P, Gaboriau F (2007) Antiproliferative and apoptotic effects in rat and human hepatoma cell cultures of the orally active iron chelator ICL670 compared to CP20: a possible relationship with polyamine metabolism. *Cell Prolif* **40**: 755-67

Lewis W, Silver MD (2001) Adverse effects of drugs on the cardiovascular system. In *Cardiovascular Pathology*, Silver MD, Gotlieb AI, Schoen FJ (eds), pp 546-550. Philadelphia: Churchill Livingstone

Li T, Danelisen I, Bello-Klein A, Singal PK (2000) Effects of probucol on changes of antioxidant enzymes in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Cardiovasc Res* **46**: 523-30

Lim CC, Zuppinger C, Guo X, Kuster GM, Helmes M, Eppenberger HM, Suter TM, Liao R, Sawyer DB (2004) Anthracyclines induce calpain-dependent titin proteolysis and necrosis in cardiomyocytes. *J Biol Chem* **279**: 8290-9

Link G, Tirosh R, Pinson A, Hershko C (1996) Role of iron in the potentiation of anthracycline cardiotoxicity: identification of heart cell mitochondria as a major site of iron-anthracycline interaction. *J Lab Clin Med* **127**: 272-8

- Liochev SI (1999) The mechanism of "Fenton-like" reactions and their importance for biological systems. A biologist's view. *Met Ions Biol Syst* **36**: 1-39
- Lipshultz SE, Alvarez JA, Scully RE (2008) Anthracycline associated cardiotoxicity in survivors of childhood cancer. *Heart* **94**: 525-33
- Lipshultz SE, Rifai N, Dalton VM, Levy DE, Silverman LB, Lipsitz SR, Colan SD, Asselin BL, Barr RD, Clavell LA, Hurwitz CA, Moghrabi A, Samson Y, Schorin MA, Gelber RD, Sallan SE (2004) The effect of dexrazoxane on myocardial injury in doxorubicin-treated children with acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* **351**: 145-53
- Liu B, Li H, Qu H, Sun B (2006) Nitric oxide synthase expressions in ADR-induced cardiomyopathy in rats. *J Biochem Mol Biol* **39**: 759-65
- Lopez M, Vici P, Di Lauro K, Conti F, Paoletti G, Ferraironi A, Sciuto R, Giannarelli D, Maini CL (1998) Randomized prospective clinical trial of high-dose epirubicin and dexrazoxane in patients with advanced breast cancer and soft tissue sarcomas. *J Clin Oncol* **16**: 86-92
- Lovejoy DB, Richardson DR (2003) Iron chelators as anti-neoplastic agents: current developments and promise of the PIH class of chelators. *Curr Med Chem* **10**: 1035-49
- Luo X, Pitkanen S, Kassovska-Bratinova S, Robinson BH, Lehotay DC (1997) Excessive formation of hydroxyl radicals and aldehydic lipid peroxidation products in cultured skin fibroblasts from patients with complex I deficiency. *J Clin Invest* **99**: 2877-82
- Lyu YL, Kerrigan JE, Lin CP, Azarova AM, Tsai YC, Ban Y, Liu LF (2007) Topoisomerase IIbeta mediated DNA double-strand breaks: implications in doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dexrazoxane. *Cancer Res* **67**: 8839-46
- Malisza KL, Hasinoff BB (1996) Inhibition of anthracycline semiquinone formation by ICRF-187 (dexrazoxane) in cells. *Free Radic Biol Med* **20**: 905-14
- Martin E, Thougard AV, Grauslund M, Jensen PB, Bjorkling F, Hasinoff BB, Tjornelund J, Sehested M, Jensen LH (2008) Evaluation of the topoisomerase II-inactive bisdioxopiperazine ICRF-161 as a protectant against doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Toxicology*
- Martin E, Thougard AV, Grauslund M, Jensen PB, Bjorkling F, Hasinoff BB, Tjornelund J, Sehested M, Jensen LH (2009) Evaluation of the topoisomerase II-inactive bisdioxopiperazine ICRF-161 as a protectant against doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Toxicology* **255**: 72-9
- Marty M, Espie M, Llombart A, Monnier A, Rapoport BL, Stahalova V (2006) Multicenter randomized phase III study of the cardioprotective effect of dexrazoxane (Cardioxane) in advanced/metastatic breast cancer patients treated with anthracycline-based chemotherapy. *Ann Oncol* **17**: 614-22
- Matsui H, Morishima I, Numaguchi Y, Toki Y, Okumura K, Hayakawa T (1999) Protective effects of carvedilol against doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *Life Sci* **65**: 1265-74
- Menna P, Recalcati S, Cairo G, Minotti G (2007) An introduction to the metabolic determinants of anthracycline cardiotoxicity. *Cardiovasc Toxicol* **7**: 80-5
- Michelotti A, Venturini M, Tibaldi C, Bengala C, Gallo L, Carnino F, Del Mastro L, Lionetto R, Montanaro E, Rosso R, Conte P (2000) Single agent epirubicin as first line chemotherapy for metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* **59**: 133-9

- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L (2004) Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* **56**: 185-229
- Mojzisova G, Mirossay L, Kucerova D, Kyselovic J, Mirossay A, Mojzis J (2006) Protective effect of selected flavonoids on in vitro daunorubicin-induced cardiotoxicity. *Phytother Res* **20**: 110-4
- Myers C, Bonow R, Palmeri S, Jenkins J, Corden B, Locker G, Doroshow J, Epstein S (1983) A randomized controlled trial assessing the prevention of doxorubicin cardiomyopathy by N-acetylcysteine. *Semin Oncol* **10**: 53-5
- Nagami K, Yoshikawa T, Suzuki M, Wainai Y, Anzai T, Handa S (1997) Abnormal beta-adrenergic transmembrane signaling in rabbits with adriamycin-induced cardiomyopathy. *Jpn Circ J* **61**: 249-55
- Nagy AC, Tolnay E, Nagykalnai T, Forster T (2006) Cardiotoxicity of anthracycline in young breast cancer female patients: the possibility of detection of early cardiotoxicity by TDI. *Neoplasma* **53**: 511-7
- Nakamura T, Ueda Y, Juan Y, Katsuda S, Takahashi H, Koh E (2000) Fas-mediated apoptosis in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats: In vivo study. *Circulation* **102**: 572-8
- Nazeyrollas P, Prevost A, Baccard N, Manot L, Devillier P, Millart H (1999) Effects of amifostine on perfused isolated rat heart and on acute doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol* **43**: 227-32
- Newman RA, Hacker MP, Krakoff IH (1981) Amelioration of adriamycin and daunorubicin myocardial toxicity by adenosine. *Cancer Res* **41**: 3483-8
- Oliveira PJ, Bjork JA, Santos MS, Leino RL, Froberg MK, Moreno AJ, Wallace KB (2004) Carvedilol-mediated antioxidant protection against doxorubicin-induced cardiac mitochondrial toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* **200**: 159-68
- Olson RD, Boerth RC, Gerber JG, Nies AS (1981) Mechanism of adriamycin cardiotoxicity: evidence for oxidative stress. *Life Sci* **29**: 1393-401
- Olson RD, Mushlin PS, Brenner DE, Fleischer S, Cusack BJ, Chang BK, Boucek RJ, Jr. (1988) Doxorubicin cardiotoxicity may be caused by its metabolite, doxorubicinol. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 3585-9
- Pacher P, Liaudet L, Bai P, Mabley JG, Kaminski PM, Virag L, Deb A, Szabo E, Ungvari Z, Wolin MS, Groves JT, Szabo C (2003) Potent metalloporphyrin peroxynitrite decomposition catalyst protects against the development of doxorubicin-induced cardiac dysfunction. *Circulation* **107**: 896-904
- Pacher P, Liaudet L, Bai P, Virag L, Mabley JG, Hasko G, Szabo C (2002) Activation of poly(ADP-ribose) polymerase contributes to development of doxorubicin-induced heart failure. *J Pharmacol Exp Ther* **300**: 862-7
- Pai VB, Nahata MC (2000) Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents: incidence, treatment and prevention. *Drug Saf* **22**: 263-302
- Papp Z, van der Velden J, Stienen GJ (2000) Calpain-I induced alterations in the cytoskeletal structure and impaired mechanical properties of single myocytes of rat heart. *Cardiovasc Res* **45**:

981-93

Park JW, Kirpotin DB, Hong K, Shalaby R, Shao Y, Nielsen UB, Marks JD, Papahadjopoulos D, Benz CC (2001) Tumor targeting using anti-her2 immunoliposomes. *J Control Release* **74**: 95-113

Pascale C, Fornengo P, Epifani G, Bosio A, Giacometto F (2002) Cardioprotection of trimetazidine and anthracycline-induced acute cardiotoxic effects. *Lancet* **359**: 1153-4

Pelouch V, Milerova M, Ostadal B, Samanek M, Hucin B (1993) Protein profiling of human atrial and ventricular musculature: the effect of normoxaemia and hypoxaemia in congenital heart diseases. *Physiol Res* **42**: 235-42

Perletti G, Monti E, Paracchini L, Piccinini F (1989) Effect of trimetazidine on early and delayed doxorubicin myocardial toxicity. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **302**: 280-9

Pigram WJ, Fuller W, Hamilton LD (1972) Stereochemistry of intercalation: interaction of daunomycin with DNA. *Nat New Biol* **235**: 17-9

Pilz J, Meineke I, Gleiter CH (2000) Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **742**: 315-25

Ponka P, Borova J, Neuwirt J, Fuchs O, Necas E (1979) A study of intracellular iron metabolism using pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and other synthetic chelating agents. *Biochim Biophys Acta* **586**: 278-97

Popelova O, Sterba M, Simunek T, Mazurova Y, Guncova I, Hroch M, Adamcova M, Gersl V (2008) Deferiprone does not protect against chronic anthracycline cardiotoxicity in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* **326**: 259-69

Porter JB, Morgan J, Hoyes KP, Burke LC, Huehns ER, Hider RC (1990) Relative oral efficacy and acute toxicity of hydroxypyridin-4-one iron chelators in mice. *Blood* **76**: 2389-96

Poster DS, Penta J, Marsoni S, Bruno S, Macdonald JS (1980) Bis-diketopiperazine derivatives in clinical oncology: ICRF-159. *Cancer Clin Trials* **3**: 315-20

Pritsos CA, Sokoloff M, Gustafson DL (1992) PZ-51 (Ebselen) in vivo protection against adriamycin-induced mouse cardiac and hepatic lipid peroxidation and toxicity. *Biochem Pharmacol* **44**: 839-41

Rigatos SK, Stathopoulos GP, Dontas I, Perrea-Kotsarelis D, Couris E, Karayannacos PE, Delicostantinos G (2002) Investigation of doxorubicin tissue toxicity: does amifostine provide chemoprotection? An experimental study. *Anticancer Res* **22**: 129-34

Richardson DR (2005) Molecular mechanisms of iron uptake by cells and the use of iron chelators for the treatment of cancer. *Curr Med Chem* **12**: 2711-29

Roca J, Ishida R, Berger JM, Andoh T, Wang JC (1994) Antitumor bisdioxopiperazines inhibit yeast DNA topoisomerase II by trapping the enzyme in the form of a closed protein clamp. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 1781-5

Routledge HC, Rea DW, Steeds RP (2006) Monitoring the introduction of new drugs--Herceptin to cardiotoxicity. *Clin Med* **6**: 478-81

Saad SY, Najjar TA, Al-Rikabi AC (2001) The preventive role of deferoxamine against acute

- doxorubicin-induced cardiac, renal and hepatic toxicity in rats. *Pharmacol Res* **43**: 211-8
- Sadzuka Y, Sugiyama T, Shimoi K, Kinane N, Hirota S (1997) Protective effect of flavonoids on doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicol Lett* **92**: 1-7
- Santos DL, Moreno AJ, Leino RL, Froberg MK, Wallace KB (2002) Carvedilol protects against doxorubicin-induced mitochondrial cardiomyopathy. *Toxicol Appl Pharmacol* **185**: 218-27
- Sapra P, Allen TM (2003) Ligand-targeted liposomal anticancer drugs. *Prog Lipid Res* **42**: 439-62
- Sarvazyan N (1996) Visualization of doxorubicin-induced oxidative stress in isolated cardiac myocytes. *Am J Physiol* **271**: H2079-85
- Sawyer DB, Fukazawa R, Arstall MA, Kelly RA (1999) Daunorubicin-induced apoptosis in rat cardiac myocytes is inhibited by dexrazoxane. *Circ Res* **84**: 257-65
- Scully RE, Lipshultz SE (2007) Anthracycline cardiotoxicity in long-term survivors of childhood cancer. *Cardiovasc Toxicol* **7**: 122-8
- Sessa C, Valota O, Geroni C (2007) Ongoing phase I and II studies of novel anthracyclines. *Cardiovasc Toxicol* **7**: 75-9
- Seymour L, Bramwell V, Moran LA (1999) Use of dexrazoxane as a cardioprotectant in patients receiving doxorubicin or epirubicin chemotherapy for the treatment of cancer. The Provincial Systemic Treatment Disease Site Group. *Cancer Prev Control* **3**: 145-59
- Shan K, Lincoff AM, Young JB (1996) Anthracycline-induced cardiotoxicity. *Ann Intern Med* **125**: 47-58
- Sharpe HB, Field EO, Hellmann K (1970) Mode of action of the cytostatic agent "ICRF 159". *Nature* **226**: 524-6
- Schafer FQ, Buettner GR (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* **30**: 1191-212
- Schroeder PE, Davidson JN, Hasinoff BB (2002) Dihydroorotase catalyzes the ring opening of the hydrolysis intermediates of the cardioprotective drug dexrazoxane (ICRF-187). *Drug Metab Dispos* **30**: 1431-5
- Simunek T, Boer C, Bouwman RA, Vlasblom R, Versteilen AM, Sterba M, Gersl V, Hrdina R, Ponka P, de Lange JJ, Paulus WJ, Musters RJ (2005a) SIH--a novel lipophilic iron chelator--protects H9c2 cardiomyoblasts from oxidative stress-induced mitochondrial injury and cell death. *J Mol Cell Cardiol* **39**: 345-54
- Simunek T, Kaiserova H, Sterba M, Popelova O, Adamcova M, Ponka P, Gersl V (2007) Study of protection by salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone against hydrogen peroxide- and anthracycline-induced toxicity to cardiac cells. *Circulation Research* **101**: E72-E72
- Simunek T, Klimtova I, Kaplanova J, Mazurova Y, Adamcova M, Sterba M, Hrdina R, Gersl V (2004) Rabbit model for in vivo study of anthracycline-induced heart failure and for the evaluation of protective agents. *Eur J Heart Fail* **6**: 377-87
- Simunek T, Klimtova I, Kaplanova J, Sterba M, Mazurova Y, Adamcova M, Hrdina R, Gersl V, Ponka P (2005b) Study of daunorubicin cardiotoxicity prevention with pyridoxal isonicotinoyl hydrazone in rabbits. *Pharmacol Res* **51**: 223-31

Simunek T, Sterba M, Holeckova M, Kaplanova J, Klimtova I, Adamcova M, Gersl V, Hrdina R (2005c) Myocardial content of selected elements in experimental anthracycline-induced cardiomyopathy in rabbits. *Biometals* **18**: 163-9

Simunek T, Sterba M, Popelova O, Adamcova M, Hrdina R, Gersl V (2009) Anthracycline-induced cardiotoxicity: Overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Rep* **61**: 154-71

Simunek T, Sterba M, Popelova O, Kaiserova H, Adamcova M, Hroch M, Haskova P, Ponka P, Gersl V (2008) Anthracycline toxicity to cardiomyocytes or cancer cells is differently affected by iron chelation with salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone. *Br J Pharmacol* **155**: 138-48

Singh RB, Dandekar SP, Elimban V, Gupta SK, Dhalla NS (2004a) Role of proteases in the pathophysiology of cardiac disease. *Mol Cell Biochem* **263**: 241-56

Singh RB, Chohan PK, Dhalla NS, Netticadan T (2004b) The sarcoplasmic reticulum proteins are targets for calpain action in the ischemic-reperfused heart. *J Mol Cell Cardiol* **37**: 101-10

Siveski-Iliskovic N, Hill M, Chow DA, Singal PK (1995) Probucol protects against adriamycin cardiomyopathy without interfering with its antitumor effect. *Circulation* **91**: 10-5

Siveski-Iliskovic N, Kaul N, Singal PK (1994) Probucol promotes endogenous antioxidants and provides protection against adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Circulation* **89**: 2829-35

Solem LE, Henry TR, Wallace KB (1994) Disruption of mitochondrial calcium homeostasis following chronic doxorubicin administration. *Toxicol Appl Pharmacol* **129**: 214-22

Spanikova A, Simoncikova P, Ravingerova T, Pechanova O, Barancik M (2008) The effect of chronic nitric oxide synthases inhibition on regulatory proteins in rat hearts. *Mol Cell Biochem* **312**: 113-20

Speyer JL, Green MD, Zeleniuch-Jacquotte A, Wernz JC, Rey M, Sanger J, Kramer E, Ferrans V, Hochster H, Meyers M, et al. (1992) ICRF-187 permits longer treatment with doxorubicin in women with breast cancer. *J Clin Oncol* **10**: 117-27

Spinale FG (2007) Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev* **87**: 1285-342

Sterba M, Popelova O, Simunek T, Mazurova Y, Potacova A, Adamcova M, Guncova I, Kaiserova H, Palicka V, Ponka P, Gersl V (2007a) Iron chelation-afforded cardioprotection against chronic anthracycline cardiotoxicity: a study of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH). *Toxicology* **235**: 150-66

Sterba M, Popelova O, Simunek T, Mazurova Y, Potacova A, Adamcova M, Kaiserova H, Ponka P, Gersl V (2006) Cardioprotective effects of a novel iron chelator, pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone, in the rabbit model of daunorubicin-induced cardiotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* **319**: 1336-47

Sterba M, Simunek T, Popelova O, Potacova A, Adamcova M, Mazurova Y, Holeckova M, Gersl V (2007b) Early detection of anthracycline cardiotoxicity in a rabbit model: left ventricle filling pattern versus troponin T determination. *Physiol Res* **56**: 535-45

Stipek S (2000) Volné radikály - dobří sluhové a zlí páni. In *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*, Stipek S (ed), pp 41-108. Praha: Grada Publishing

- Swain SM, Vici P (2004) The current and future role of dexrazoxane as a cardioprotectant in anthracycline treatment: expert panel review. *J Cancer Res Clin Oncol* **130**: 1-7
- Swain SM, Whaley FS, Gerber MC, Ewer MS, Bianchine JR, Gams RA (1997a) Delayed administration of dexrazoxane provides cardioprotection for patients with advanced breast cancer treated with doxorubicin-containing therapy. *J Clin Oncol* **15**: 1333-40
- Swain SM, Whaley FS, Gerber MC, Weisberg S, York M, Spicer D, Jones SE, Wadler S, Desai A, Vogel C, Speyer J, Mittelman A, Reddy S, Pendergrass K, Velez-Garcia E, Ewer MS, Bianchine JR, Gams RA (1997b) Cardioprotection with dexrazoxane for doxorubicin-containing therapy in advanced breast cancer. *J Clin Oncol* **15**: 1318-32
- Szegezdi E, Fitzgerald U, Samali A (2003) Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Ann N Y Acad Sci* **1010**: 186-94
- Tallarico D, Rizzo V, Di Maio F, Petretto F, Bianco G, Placanica G, Marziali M, Paravati V, Gueli N, Meloni F, Campbell SV (2003) Myocardial cytoprotection by trimetazidine against anthracycline-induced cardiotoxicity in anticancer chemotherapy. *Angiology* **54**: 219-27
- Tam TF, Leung-Toung R, Li W, Wang Y, Karimian K, Spino M (2003) Iron chelator research: past, present, and future. *Curr Med Chem* **10**: 983-95
- Tan C, Tasaka H, Yu KP, Murphy ML, Karnofsky DA (1967) Daunomycin, an antitumor antibiotic, in the treatment of neoplastic disease. Clinical evaluation with special reference to childhood leukemia. *Cancer* **20**: 333-53
- Temma K, Akera T, Chugun A, Ohashi M, Yabuki M, Kondo H (1992) Doxorubicin: an antagonist of muscarinic receptors in guinea pig heart. *Eur J Pharmacol* **220**: 63-9
- Tesoriere L, Ciaccio M, Valenza M, Bongiorno A, Maresi E, Albiero R, Livrea MA (1994) Effect of vitamin A administration on resistance of rat heart against doxorubicin-induced cardiotoxicity and lethality. *J Pharmacol Exp Ther* **269**: 430-6
- Tokarska-Schlattner M, Dolder M, Gerber I, Speer O, Wallimann T, Schlattner U (2007) Reduced creatine-stimulated respiration in doxorubicin challenged mitochondria: particular sensitivity of the heart. *Biochim Biophys Acta* **1767**: 1276-84
- Tokarska-Schlattner M, Zaugg M, Zuppinger C, Wallimann T, Schlattner U (2006) New insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: the critical role of cellular energetics. *J Mol Cell Cardiol* **41**: 389-405
- Unverferth DV, Leier CV, Balcerzak SP, Hamlin RL (1985) Usefulness of a free radical scavenger in preventing doxorubicin-induced heart failure in dogs. *Am J Cardiol* **56**: 157-61
- van Acker FA, van Acker SA, Kramer K, Haenen GR, Bast A, van der Vijgh WJ (2000) 7-mono-hydroxyethylrutoside protects against chronic doxorubicin-induced cardiotoxicity when administered only once per week. *Clin Cancer Res* **6**: 1337-41
- van Acker SA, Kramer K, Grimbergen JA, van den Berg DJ, van der Vijgh WJ, Bast A (1995) Monohydroxyethylrutoside as protector against chronic doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Br J Pharmacol* **115**: 1260-4
- van Acker SA, Voest EE, Beems DB, Madhuizen HT, de Jong J, Bast A, van der Vijgh WJ (1993) Cardioprotective properties of O-(beta-hydroxyethyl)-rutosides in doxorubicin-pretreated BALB/c

mice. *Cancer Res* **53**: 4603-7

van Dalen EC, van der Pal HJ, Caron HN, Kremer LC (2006) Different dosage schedules for reducing cardiotoxicity in cancer patients receiving anthracycline chemotherapy. *Cochrane Database Syst Rev*: CD005008

Van Linthout S, Seeland U, Riad A, Eckhardt O, Hohl M, Dhayat N, Richter U, Fischer JW, Bohm M, Pauschinger M, Schultheiss HP, Tschope C (2008) Reduced MMP-2 activity contributes to cardiac fibrosis in experimental diabetic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol* **103**: 319-27

Van Vleet JF, Ferrans VJ, Weirich WE (1980) Cardiac disease induced by chronic adriamycin administration in dogs and an evaluation of vitamin E and selenium as cardioprotectants. *Am J Pathol* **99**: 13-42

Vaynblat M, Shah HR, Bhaskaran D, Ramdev G, Davis WJ, 3rd, Cunningham JN, Jr., Chiavarelli M (2002) Simultaneous angiotensin converting enzyme inhibition moderates ventricular dysfunction caused by doxorubicin. *Eur J Heart Fail* **4**: 583-6

Venturini M, Michelotti A, Del Mastro L, Gallo L, Carnino F, Garrone O, Tibaldi C, Molea N, Bellina RC, Pronzato P, Cyrus P, Vinke J, Testore F, Guelfi M, Lionetto R, Bruzzi P, Conte PF, Rosso R (1996) Multicenter randomized controlled clinical trial to evaluate cardioprotection of dexrazoxane versus no cardioprotection in women receiving epirubicin chemotherapy for advanced breast cancer. *J Clin Oncol* **14**: 3112-20

Vici P, Ferraironi A, Di Lauro L, Carpano S, Conti F, Belli F, Paoletti G, Maini CL, Lopez M (1998) Dexrazoxane cardioprotection in advanced breast cancer patients undergoing high-dose epirubicin treatment. *Clin Ter* **149**: 15-20

Villani F, Galimberti M, Monti E, Cova D, Lanza E, Rozza-Dionigi A, Favalli L, Poggi P (1990) Effect of ICRF-187 pretreatment against doxorubicin-induced delayed cardiotoxicity in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* **102**: 292-9

Voest EE, van Acker SA, van der Vijgh WJ, van Asbeck BS, Bast A (1994) Comparison of different iron chelators as protective agents against acute doxorubicin-induced cardiotoxicity. *J Mol Cell Cardiol* **26**: 1179-85

Von Hoff DD, Layard MW, Basa P, Davis HL, Jr., Von Hoff AL, Rozenzweig M, Muggia FM (1979) Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. *Ann Intern Med* **91**: 710-7

Wallace KB (2003) Doxorubicin-induced cardiac mitochondrionopathy. *Pharmacol Toxicol* **93**: 105-15

Wallace KB (2007) Adriamycin-induced interference with cardiac mitochondrial calcium homeostasis. *Cardiovasc Toxicol* **7**: 101-7

Wallace KB, Hausner E, Herman E, Holt GD, MacGregor JT, Metz AL, Murphy E, Rosenblum IY, Sistare FD, York MJ (2004) Serum troponins as biomarkers of drug-induced cardiac toxicity. *Toxicol Pathol* **32**: 106-21

Wang JC (2002) Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 430-40

Wang YM, Madanat FF, Kimball JC, Gleiser CA, Ali MK, Kaufman MW, van Eys J (1980) Effect of vitamin E against adriamycin-induced toxicity in rabbits. *Cancer Res* **40**: 1022-7

- Weinstein DM, Mihm MJ, Bauer JA (2000) Cardiac peroxynitrite formation and left ventricular dysfunction following doxorubicin treatment in mice. *J Pharmacol Exp Ther* **294**: 396-401
- Wexler LH, Andrich MP, Venzon D, Berg SL, Weaver-McClure L, Chen CC, Dilsizian V, Avila N, Jarosinski P, Balis FM, Poplack DG, Horowitz ME (1996) Randomized trial of the cardioprotective agent ICRF-187 in pediatric sarcoma patients treated with doxorubicin. *J Clin Oncol* **14**: 362-72
- Willems AM, Bruynzeel AM, Kedde MA, van Groenigen CJ, Bast A, van der Vijgh WJ (2006) A phase I study of monohydroxyethylrutoside in healthy volunteers. *Cancer Chemother Pharmacol* **57**: 678-84
- Wood JC, Otto-Duessel M, Gonzalez I, Aguilar MI, Shimada H, Nick H, Nelson M, Moats R (2006) Deferasirox and deferiprone remove cardiac iron in the iron-overloaded gerbil. *Transl Res* **148**: 272-80
- Wouters KA, Kremer LC, Miller TL, Herman EH, Lipshultz SE (2005) Protecting against anthracycline-induced myocardial damage: a review of the most promising strategies. *Br J Haematol* **131**: 561-78
- Wu J, Harris NL, Inge TH (2004) Nuclear factor-kappa B and apoptosis inducing factor activation by doxorubicin analog WP744 in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Surg Res* **122**: 231-9
- Wu X, Hasinoff BB (2005) The antitumor anthracyclines doxorubicin and daunorubicin do not inhibit cell growth through the formation of iron-mediated reactive oxygen species. *Anticancer Drugs* **16**: 93-9
- Xu LJ, Jin L, Pan H, Zhang AZ, Wei G, Li PP, Lu WY (2006) Deferiprone protects the isolated atria from cardiotoxicity induced by doxorubicin. *Acta Pharmacol Sin* **27**: 1333-9
- Xu MF, Ho S, Qian ZM, Tang PL (2001) Melatonin protects against cardiac toxicity of doxorubicin in rat. *J Pineal Res* **31**: 301-7
- Xu X, Persson HL, Richardson DR (2005) Molecular pharmacology of the interaction of anthracyclines with iron. *Mol Pharmacol* **68**: 261-71
- Yamaoka M, Yamaguchi S, Suzuki T, Okuyama M, Nitobe J, Nakamura N, Mitsui Y, Tomoike H (2000) Apoptosis in rat cardiac myocytes induced by Fas ligand: priming for Fas-mediated apoptosis with doxorubicin. *J Mol Cell Cardiol* **32**: 881-9
- Yasumoto E, Nakano K, Nakayachi T, Morshed SR, Hashimoto K, Kikuchi H, Nishikawa H, Kawase M, Sakagami H (2004) Cytotoxic activity of deferiprone, maltol and related hydroxyketones against human tumor cell lines. *Anticancer Res* **24**: 755-62
- Yokel RA, Fredenburg AM, Meurer KA, Skinner TL (1995) Influence of lipophilicity on the bioavailability and disposition of orally active 3-hydroxypyridin-4-one metal chelators. *Drug Metab Dispos* **23**: 1178-80
- Yu Y, Wong J, Lovejoy DB, Kalinowski DS, Richardson DR (2006) Chelators at the cancer coalface: desferrioxamine to Triapine and beyond. *Clin Cancer Res* **12**: 6876-83
- Zhang J, Clark JR, Jr., Herman EH, Ferrans VJ (1996) Doxorubicin-induced apoptosis in spontaneously hypertensive rats: differential effects in heart, kidney and intestine, and inhibition by ICRF-187. *J Mol Cell Cardiol* **28**: 1931-43

Zhou S, Palmeira CM, Wallace KB (2001) Doxorubicin-induced persistent oxidative stress to cardiac myocytes. *Toxicol Lett* **121**: 151-7

Zima T, Tesar V, Crkowska J, Stejskalova A, Platenik J, Teminova J, Nemecek K, Janebova M, Stipek S (1998) ICRF-187 (dexrazoxan) protects from adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats. *Nephrol Dial Transplant* **13**: 1975-9

PŘÍLOHA I

Popelová O, Štěrbá 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.

Deferiprone Does Not Protect against Chronic Anthracycline Cardiotoxicity in Vivo

Olga Popelová, Martin Štěrba, Tomáš Šimůnek, Yvona Mazurová, Ivana Gunčová, Miloš Hroch, Michaela Adamcová, and Vladimír Geršl

Department of Pharmacology (O.P., M.Š., M.H., V.G.), Department of Histology and Embryology (Y.M., I.G.), Department of Physiology (M.A.), Faculty of Medicine in Hradec Králové, and Department of Biochemical Sciences, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové (T.Š.), Charles University in Prague, Hradec Králové, Czech Republic

Received February 5, 2008; accepted April 22, 2008

ABSTRACT

Anthracycline cardiotoxicity ranks among the most severe complications of cancer chemotherapy. Although its pathogenesis is only incompletely understood, “reactive oxygen species (ROS) and iron” hypothesis has gained the widest acceptance. Besides dexrazoxane, novel oral iron chelator deferiprone has been recently reported to afford significant cardioprotection in both in vitro and ex vivo conditions. Therefore, the aim of this study was to assess whether deferiprone 1) has any effect on the anticancer action of daunorubicin and 2) whether it can overcome or significantly reduce the chronic anthracycline cardiotoxicity in the in vivo rabbit model (daunorubicin, 3 mg/kg i.v., weekly for 10 weeks). First, using the leukemic cell line, deferiprone (1–300 μ M) was shown not to blunt the antiproliferative effect of daunorubicin.

Instead, in clinically relevant concentrations (>10 μ M), deferiprone augmented the antiproliferative action of daunorubicin. However, deferiprone (10 or 50 mg/kg administered p.o. before each daunorubicin dose) failed to afford significant protection against daunorubicin-induced mortality, left ventricular lipoperoxidation, cardiac dysfunction, and morphological cardiac deteriorations, as well as an increase in plasma cardiac troponin T. Hence, this first in vivo 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 are involved.

Anthracyclines [e.g., doxorubicin, daunorubicin (DAU), and epirubicin] rank among the most effective antineoplastic agents ever developed. In clinical practice today, they are widely indicated in the treatment of a number of hematological and solid malignancies (Jones et al., 2006). However, their clinical potential is considerably hampered by the risk of severe dose-dependent cumulative cardiotoxicity, which manifests months or years after the completion of chemotherapy (Minotti et al., 2004). These chronic and delayed types of cardiotoxicity are characterized by continuous and irreversible myofibrillar loss, cytoplasmic vacuolization, and degeneration of cardiomyocytes that can ultimately result into dilated cardiomyopathy and congestive heart failure (Herman et al., 1997).

Despite a number of theories proposed (Minotti et al., 2004;

Chen et al., 2007), the precise molecular basis of this phenomenon still remains elusive. The prevailing hypothesis emphasizes the iron-catalyzed formation of reactive oxygen species (ROS) (Keizer et al., 1990). It is known that anthracyclines chelate free or loosely bound iron within the cardiomyocytes to form anthracycline-Fe³⁺ complexes, which can undergo cascade of reactions resulting in a production of extremely reactive and toxic hydroxyl radicals. In addition, anthracycline molecule can induce the production of superoxide radicals via redox cycling of the quinone/semiquinone ring of its aglycone. The superoxide produced through this route can dismutate to hydrogen peroxide, which may in turn enter the iron-catalyzed Haber-Weiss reaction, resulting again in an overproduction of hydroxyl radicals (Keizer et al., 1990). These can attack and damage all biomolecules (lipids, proteins, and nucleic acids) within their vicinity and thus promote the death of cardiac cells either by apoptosis or necrosis.

A number of interventions have been proposed to prevent the anthracycline-induced ROS formation (Saad et al., 2001;

This study was supported by the Charles University in Prague (Grant 89/2006/C) and the Czech Ministry of Education, Youth and Sports (Research Project MSM0021620820).

Article, publication date, and citation information can be found at <http://jpet.aspetjournals.org>.
doi:10.1124/jpet.108.137604.

ABBREVIATIONS: DAU, daunorubicin; L1, deferiprone; ROS, reactive oxygen species; ICRF-187, dexrazoxane; cTnT, concentration of troponin T; ICL670, deferasirox; MDA, malondialdehyde; LV, left ventricular; FS, fractional shortening; ANOVA, analysis of variance; ADR-925, *N,N'*-[1(S)-1-methyl-1,2-ethanediy]bis[*N*-(2-amino-2-oxoethyl)glycine].

Oliveira et al., 2004; Bast et al., 2007). Nevertheless, so far, dexrazoxane (ICRF-187) is the only agent, which is clearly able to protect the myocardium from anthracycline-induced toxicity both in experimental and clinical settings (Wouters et al., 2005). Dexrazoxane is a prodrug, which is enzymatically hydrolyzed (inside the cardiomyocytes) to its active metal-chelating metabolite, ADR-925. This metabolite is believed to be responsible for the cardioprotective effects by displacing iron from its complex with anthracyclines and/or via chelation of intracellular labile iron pool (Hasinoff et al., 1998). However, dexrazoxane may potentiate the myelotoxicity of anthracyclines, which together with its high cost limit its wider use in clinical practice (van Dalen et al., 2006).

Deferiprone (Fig. 1, L1) is the first orally active iron chelator introduced into the clinical practice for the treatment of iron-overloaded patients (Kontoghiorghes et al., 2004). It is a synthetic bidentate chelator with a small molecular weight, binding specifically ferric iron in a 3:1 ratio. Under physiological conditions, it has a favorable lipophilicity and thus can readily enter the cardiomyocytes to reach therapeutic levels (Glickstein et al., 2006). It has been also shown to efficiently bind labile cellular iron, both free as well as accumulated, within mitochondria and lysosomes (Glickstein et al., 2006). Using an in vitro model of iron overload, L1 has been reported to significantly attenuate ROS formation within mitochondria and restore contractility impaired by iron loading (Link et al., 1996). L1 given orally on a daily basis has been also shown to effectively reduce myocardial iron burden and improve ventricular function in iron-overloaded patients with β -thalassemia (Anderson et al., 2002).

With respect to anthracycline cardiotoxicity prevention, L1 has been recently shown as capable to protect isolated ventricular cardiomyocytes from doxorubicin-induced cellular toxicity (Barnabé et al., 2002). This effect has been attributed to its iron-chelating properties, which allow displacing the iron from its complexes with anthracyclines and/or reduce the availability of free iron for catalysis of the Haber-Weiss reaction. Moreover, a recent study performed on the isolated spontaneously beating atria further confirmed the cardioprotective potential of L1 against acute anthracycline cardiotoxicity (Xu et al., 2006).

To summarize, several lines of evidence indicated that L1, already a clinically approved drug, might be a promising and readily available option to increase the cardiac safety of cancer patients undergoing treatment with anthracyclines. The present investigation was undertaken to further the

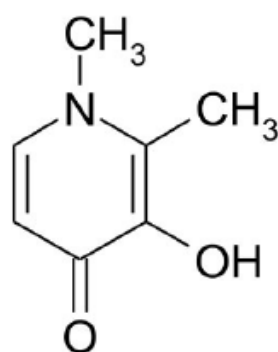


Fig. 1. Chemical structure of deferiprone (L1).

development of this drug as a potential cardioprotectant. Two main aims of this study were 1) to preliminarily assess whether deferiprone has any potential to blunt the anticancer efficacy of anthracyclines (as this could preclude practical utility of this approach) and 2) to examine the cardioprotective potential of this drug using a clinically relevant model of chronic anthracycline cardiotoxicity, which was previously validated with dexrazoxane.

Materials and Methods

Proliferation Studies with HL-60 Cells

HL-60 human acute promyelocytic leukemia cell line was obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA). Cells were maintained in RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Sigma-Aldrich) and 1% penicillin/streptomycin (PAA Laboratories, Pasching, Austria) and grown in humidified atmosphere at 37°C in 5% CO₂. Medium was renewed every 2 to 3 days. For proliferation studies, the cells were seeded at a density of 10⁵ cells/ml. Tested substances (L1 and/or DAU) had been added, and cells were allowed to proliferate under standard conditions. The tested concentrations of L1 ranged from 1 to 300 μ M. For combination assays, 12 nM DAU was used, which was previously shown to induce 50% growth inhibition. To quantify the number of viable cells after each treatment, suspension samples were taken and mixed 1:1 with 0.4% trypan blue solution (Sigma-Aldrich), and the living (unstained) cells were counted using a Bürker's hemocytometer under a light microscope.

Cardioprotection Studies in Rabbits

Animals. Forty-two adult Chinchilla male rabbits of an average body weight of 3.44 \pm 0.03 kg at the beginning of the experiment were housed under a 12-h light cycle and constant temperature and humidity. The animals had free access to tap water and a standard laboratory pellet diet. Before experimental procedures, the animals were fasted overnight. Administration of drugs, blood sampling, and noninvasive measurements during the study were carried out under ketamine (50 mg/kg, i.m.; Narketan inj., Vétroquinol AG, Switzerland) and midazolam (1.25 mg/kg, i.m.; Midazolam Torrex; Torrex Chiesi Pharma GmbH, Vienna, Austria) anesthesia. Pentobarbital (30 mg/kg i.v.; Sigma-Aldrich) was used for anesthesia during final invasive hemodynamic measurements and for an overdose of animals at the end of the experiment. All experiments were approved and supervised by the Ethical Committee of Charles University (Prague, Czech Republic) and the Faculty of Medicine (Hradec Králové, Czech Republic) and were in accordance Institute of Laboratory Animal Resources (1996).

Experimental Design. All substances were administered once a week for 10 weeks. The study was carried out with five groups of animals: 1) control group—animals were receiving saline (1 ml/kg i.v., $n = 8$; Natrium Chloratum, Biotika, Slovakia); 2) DAU group—animals were injected with DAU (3 mg/kg i.v., $n = 11$; Daunoblastina; Pharmacia Italia S.p.A., Nerviano, Italy) in a validated schedule for induction of chronic anthracycline cardiomyopathy (Simunek et al., 2004); 3) L1 group—animals received L1 (50 mg/kg p.o., in 0.5% carboxymethylcellulose, $n = 6$; kindly provided by ApoPharma Inc.); 4) L1 10 + DAU group ($n = 8$)—this group received L1 (10 mg/kg p.o., in 0.5% carboxymethylcellulose) 45 min before each DAU administration (3 mg/kg i.v.); and 5) L1 50 + DAU group ($n = 9$)—L1 (50 mg/kg p.o.) was administered before DAU in the same schematic as in the previous combination group.

Body weight was recorded weekly, whereas mortality, general appearance, and behavior were observed daily. Noninvasive echocardiographic measurements were performed at the beginning of the study and later in weeks 8, 9, and 10 and, finally, at the end of the

experiment (5–7 days after the last administration of drugs). Plasma for cardiac troponin T (cTnT) determination was sampled before the first, fifth, eighth, and tenth administration and at the end of the study. Standard biochemical and hematological parameters were determined from blood sampled from the ear artery before the first and fifth administrations and at the end of the study. The experiment was terminated 5 to 7 days after the last administration when final invasive hemodynamic measurements were performed. Thereafter, the animals had been overdosed with pentobarbital, and an autopsy had followed. The heart of each animal was rapidly excised, washed in ice-cold saline, and briefly retrogradely perfused with cold saline through the aorta. Tissue blocks of the transversely sectioned left and right cardiac ventricles underwent histological examination. The rest of the left ventricle was snap-frozen in liquid nitrogen and kept frozen at -80°C until further analyzed.

Noninvasive Cardiac Function Measurements. Echocardiographic examination of the LV systolic function was carried out using a Vivid 4 echocardiograph (GE Medical Systems Ultrasound; GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) equipped with a 10-MHz probe. The LV long axis view was obtained through the left parasternal approach, and a guided M-mode measurement at the tips of the mitral valve was performed. The LV fraction shortening (LVFS) was calculated from the LV end-diastolic (LVED) and end-systolic diameters (LVES) determined from at least four heart cycles in each M-mode examination as follows:

$$\text{LVFS (\%)} = \frac{\text{LVED} - \text{LVES}}{\text{LVED}} \times 100$$

At least three independent examinations were used to determine the individual LVFS values.

Invasive Hemodynamic Measurements. In pentobarbital anesthesia, the left carotid artery was prepared, and a Micro-Tip Pressure Catheter (2.3F Nylon; ADInstruments, Australia) was introduced into the left heart ventricle. After a 10-min equilibration period, the measurement of the following parameters was performed; the maximum of the first derivative of the LV pressure rise in the isovolumic phase of the systole ($\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$) and the minimum of the first derivative of the LV pressure decline in the isovolumic phase of diastole ($\text{dP}/\text{dt}_{\text{min}}$) as well as the heart rate. For the arterial blood pressure measurement, a polyethylene cannula, filled in with heparinized (10 IU/ml) saline, was inserted into the right femoral artery. The ADI PowerLab/8SP (ADInstruments Pty Ltd., Castle Hill, Australia) with appropriate transducers and the Chart software 5.4.2 were used for pressure measurements, obtaining from derivatives and recordings.

Cardiac Troponin T Determination. cTnT, as a selective and sensitive marker of heart injury, was determined in heparinized plasma using an Elecsys Troponin T STAT Immunoassay (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) and an Elecsys 2010 (Roche Diagnostics) immunoassay analyzer with the detection limit of 0.010 ng/ml. The values below this detection limit were considered to be zero.

Determination of Total Malondialdehyde in Myocardial Samples. The samples of the LV myocardium were pulverized under liquid nitrogen. Radioimmunoprecipitation assay buffer (500 μl) was added to the myocardial samples (~ 70 mg), and the mixture was homogenized and vortexed. After centrifugation (3000 rpm, 10 min, 4°C), the supernatant was removed, and 250 μl of supernatant was taken and analyzed according to the Pilz et al. (2000) with minor modifications. In brief, 50 μl of NaOH (6 M) were added to the taken amount of supernatant, and after vortexing, the solution was kept at 60°C for 30 min. The samples were then cooled on ice, and 125 μl of perchloric acid [35% (v/v)] was added. After centrifugation (13,000 rpm, 10 min, 4°C), 250 μl of supernatant was taken, and derivatization was performed using 25 μl of 5 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine. After 10 min in the dark, the solution (30 μl) was analyzed using a high-performance liquid chromatography system (Shimadzu, Kyoto, Japan) with UV detection: col-

umn—EC Nucleosil 100–5 C18, 4.6×125 mm heated on 30°C ; mobile phase—acetonitrile/water/acetic acid: 380/620/2 (v/v/v), pH 3.4; flow rate—1.0 ml/min, UV detector set on 310 nm.

Histological Examination. Tissue blocks of the transversely sectioned left and right cardiac ventricles were fixed for 3 days by immersion in 4% neutral formaldehyde. Paraffin sections (6 μm thick) were stained with hematoxylin-eosin and Masson's blue trichrome. Photomicrographs were made with a Cybernetics software version 4.51 (Laboratory Imaging, Prague, Czech Republic).

Biochemical and Hematological Analyses. Standard biochemical parameters were determined in plasma/serum using an automatic analyzer (Hitachi 737; Hitachi, Tokyo, Japan) at the Institute of Clinical Biochemistry and Diagnostics, University Teaching Hospital (Hradec Králové, Czech Republic); hematological parameters were measured using an automatic analyzer Coulter T890 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) at the Institute of Clinical Hematology, University Teaching Hospital. Content of iron in the left ventricular myocardium samples was determined at the Institute of Clinical Biochemistry and Diagnostics using graphite furnace atomic absorption spectrometry (Solaar 959; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) as described previously (Simůnek et al., 2005b). The results are expressed as micromole per gram of dry tissue.

Data Analysis. Statistical software SigmaStat 3.5 (SPSS Inc., Chicago, IL) and STATISTICA Cz (StatSoft, Tulsa, OK) were used in this study. All data are expressed as mean \pm S.E.M. Significances of the differences were determined using one-way ANOVA unpaired test (comparison between groups) or paired *t* test (comparison with the initial value within each group). For exploratory data analysis (Principal Component Analysis, Hierarchical Tree Clustering), data from all parameters (general toxicity, cardiovascular, biochemical, and hematological parameters) were employed.

Results

Proliferation Studies with HL-60 Cells

As seen in Fig. 2A, whereas the lower concentrations (1–30 μM) of L1 had no significant effect on the proliferation of HL-60 cells, its higher concentrations (>100 μM) were able to significantly decrease the tumor cell growth. The experiments examining a 72-h coinubation of L1 with DAU revealed that, within the broad and clinically relevant concentration range (1–300 μM), the chelator did not have any negative effect on the antitumor efficacy of DAU. Moreover, at the higher L1 concentrations (>10 μM), the augmentation of DAU-antiproliferative effects was observed (Fig. 2B).

Cardioprotection Studies in Rabbits

General Observations. No premature deaths and no changes in appearance or behavior were observed throughout the experiment in the control and L1 groups. In contrast, chronic DAU treatment resulted in 18% mortality. Coadministration of L1 (10 mg/kg) together with DAU was lethal for two of eight animals (25% mortality). A further (5-fold) rise of the L1 dose led to an even more pronounced and also earlier mortality. In both the DAU and L1 10+DAU groups, the mortality occurred only between the 9th and last weeks of the study, whereas in the group cotreated with the higher L1 dose, the first premature deaths occurred much earlier, between weeks 3 and 5 (Fig. 3). Before the deaths, the animals lost appetite; their body weight tended to stagnate or decrease and/or exhibited signs of lethargy. The body weight changes in all groups are shown in Fig. 4. There were no significant differences between the control and L1 groups. The body weights of animals in the DAU and L1 50+DAU groups were lower than in the control and L1 groups. "Heart

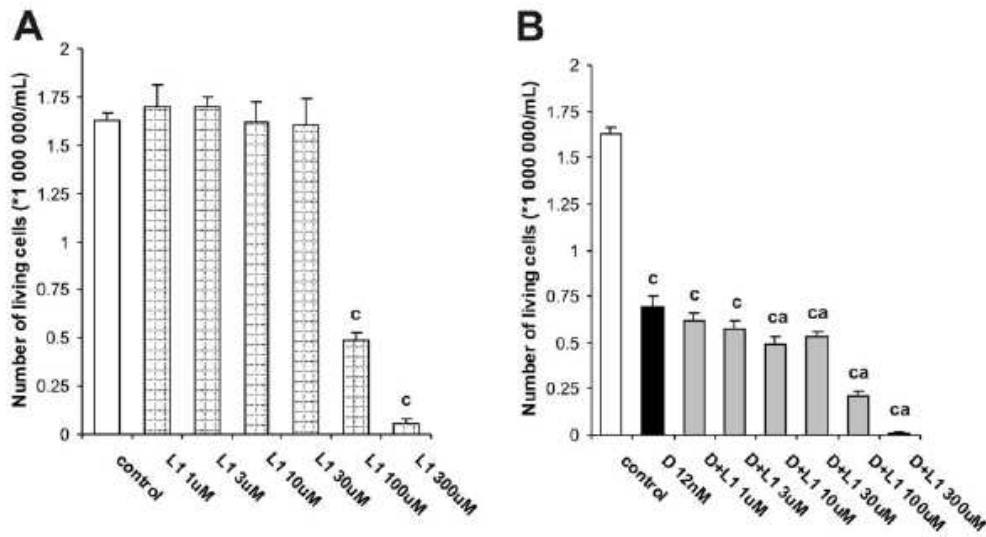


Fig. 2. Proliferation studies with HL-60 promyelocytic leukemia cell line. A, effect of deferiprone (1–300 μ M) on proliferation of HL-60 cells. Number of cells at the end of the 72-h incubation period. B, effect of deferiprone on antiproliferative action of daunorubicin (12 nM). Statistical significances (ANOVA, $P < 0.05$) in comparison with control (c) group and daunorubicin (a) group are given. D, daunorubicin; L1, deferiprone.

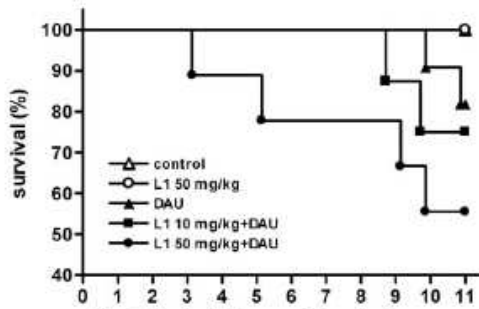


Fig. 3. Kaplan-Meier survival analysis.

weight/body weight^{0.75} ratio, determined at the end of experiment, was significantly higher in the DAU group (2.82 ± 0.10 g/kg) compared with both the control (2.14 ± 0.10 g/kg) and L1 (2.06 ± 0.14 g/kg) groups. In the L1+DAU combination groups, no significant difference was found in comparison with either the DAU or control groups (L1 10+DAU: 2.51 ± 0.14 g/kg; and L1 50+DAU: 2.70 ± 0.19 g/kg).

Determination of Malondialdehyde in Myocardial Samples. Malondialdehyde (MDA) was used as a marker of lipid peroxidation in the LV myocardium. As shown in Fig. 5, the MDA content was significantly increased in the DAU group. Although the MDA concentration was somewhat lower when L1 (10 mg/kg) was coadministered with DAU, the change did not reach the statistical significance. The escalation of the chelator dose did not improve the results, and MDA levels remained significantly higher than in controls and close to the DAU group.

Echocardiography. Left ventricular fractional shortening (FS) was gradually decreasing in the DAU group from $42.9 \pm 0.6\%$ at the beginning to $31.6 \pm 2.3\%$ at the end of the experiment; the decline was significant in comparison with

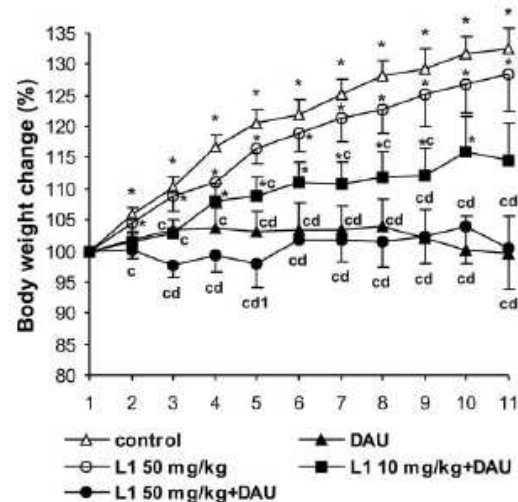


Fig. 4. Changes in body weights following daunorubicin and/or deferiprone treatment. Data are presented as mean \pm S.E.M. *, statistical significances in comparison with the initial values within each group (paired t -test, $P < 0.05$). ANOVA, $P < 0.05$ in comparison with control (c) group, deferiprone (d) group, and L1 10 mg/kg+DAU (1) group.

the initial values as well as with the control group (Fig. 6). In both doses of L1 coadministered with DAU, the LV fractional shortening values did not differ significantly from the DAU group. Although the combination with the lower L1 dose tended to have somewhat better results than the combination with the higher dose, no significant difference between these values was detected. In addition, in both groups, the decline in the fractional shortening was significant compared with the initial and the control values.

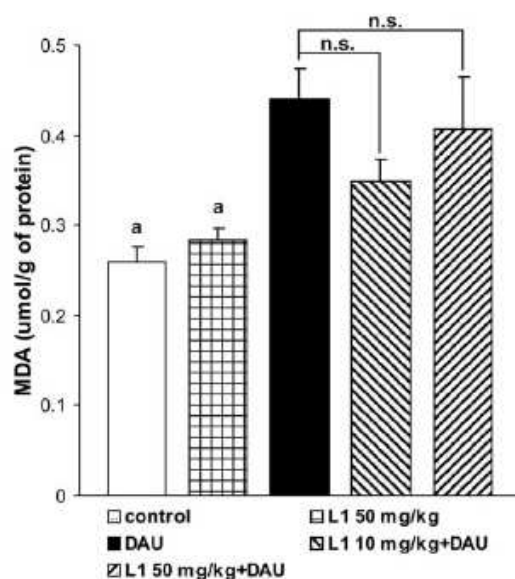


Fig. 5. MDA content in the myocardium of the left ventricles. MDA level normalized for the protein concentration. Statistical significances (ANOVA, $P < 0.05$) in comparison with daunorubicin (a) group. n.s., not significant.

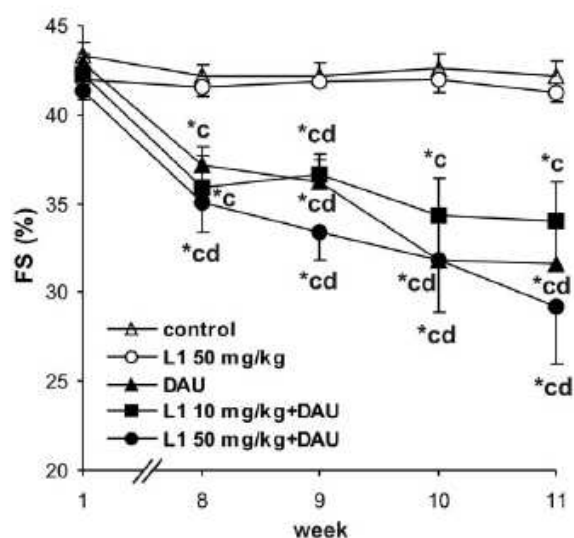


Fig. 6. Echocardiographically assessed systolic function (fraction shortening of the left ventricle) during the experiment. *, statistical significances in comparison with the initial values within each group (paired t -test, $P < 0.05$). ANOVA, $P < 0.05$ in comparison with control (c) and deferiprone (d) group.

Invasive Hemodynamic Measurements. Invasively determined indexes of both the LV contractility (dp/dt_{max}) and relaxation (dp/dt_{min}) were significantly lower in the DAU than in the control group (Fig. 7). Concurrent administration of L1 in both doses resulted in similar outcomes with regard to both LV contractility and relaxation; no statistical differences were observed between these groups. A similar trend

was determined in arterial blood pressure and heart rate values (Table 1).

Cardiac Troponin T Determination. Ten weeks of repeated administration of DAU led to progressive and significant elevation of cardiac troponin T levels, starting with the 8th week (Fig. 8). Correspondingly, cotreatment with either dose of L1 induced very similar changes in plasma concentrations of cTnT as in the DAU group.

Histological Examination. Histological examination (Fig. 9) of myocardial samples obtained from both the control and the L1 group revealed a comparable morphological picture, which comprised mainly less intensive, acute, and scattered changes (some groups of cardiac cells exhibited increased eosinophilia of the cytoplasm, or pyknotic nuclei, which is likely to be associated with protracted anesthesia performed at the end of experiment). On the other hand, DAU treatment induced a typical massive toxic focal damage predominantly in the LV myocardium. A large number of cardiomyocytes revealed a different level of degeneration resulting in necrosis, whereas most of others have at least intensely eosinophilic cytoplasm due to the myofibrillar damage. Necrotic cardiomyocytes were gradually replaced by the granulation tissue, and the interstitial myofibrosis subsequently developed. In both groups cotreated with L1, a similar pattern of myocardial changes as in the DAU group was observed. The toxic damage tended to be somewhat less pronounced in the group cotreated with the lower chelator dose, whereas the changes in the myocardium of animals cotreated with the higher chelator dose closely resembled those induced by DAU alone.

Biochemical and Hematological Analyses. Repeated DAU administration caused significant changes in the plasma biochemical parameters, mainly related to the renal damage (e.g., increase in creatinine, decrease in total plasma protein) and impairment in lipid metabolism (Table 2). Similar results were also observed in the groups cotreated with L1. As seen in Table 3, the DAU administration caused also a significant decrease in erythrocyte and thrombocyte counts, a concentration of hemoglobin and in hematocrit. Most of the hematological parameters under study tend to change similarly in the groups cotreated with either dose of deferiprone. L1 alone did not induce any abnormalities in biochemical as well as hematological parameters.

With regard to myocardial iron content, no significant changes between the daunorubicin and control group were detected (2.2 ± 0.2 and 2.5 ± 0.4 $\mu\text{mol/g}$, respectively). However, significantly higher values were found in the L1-treated (50 mg/kg) and in the L1- (50 mg/kg) and DAU-cotreated animals (4.2 ± 0.7 and 4.9 ± 0.5 $\mu\text{mol/g}$, respectively, $p \leq 0.05$), whereas only insignificant difference was determined in the group cotreated with the lower dose of the chelator (3.4 ± 0.3 $\mu\text{mol/g}$).

Exploratory Data Analysis. Hierarchical tree clustering (Fig. 10A) and principal component analysis (Fig. 10B) are two independent exploratory multivariate statistical methods, which were used to identify the natural grouping of 42 individual animals in this study with respect to all evaluated parameters [general toxicity, cardiovascular, biochemical, and hematological parameters (25 variables)]. Both exploratory data analyses grouped all examined objects into two well separated clusters. In the first cluster (I), all animals from the control and L1 groups were found, whereas the

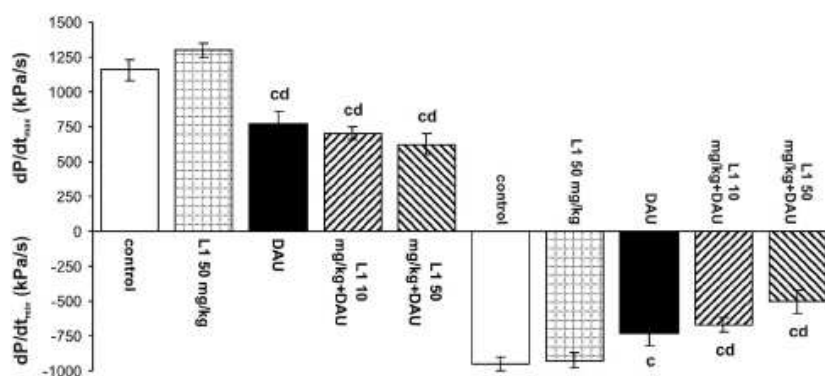


Fig. 7. Index of systolic (dP/dt_{max}) and diastolic (dP/dt_{min}) function of the left ventricle at the end of the experiment. Data presented as mean \pm S.E.M. Statistical significances (ANOVA, $P < 0.05$) in comparison with control (c) group and deferoxamine (d) group are given.

TABLE 1

Invasive hemodynamic measurements at the end of the experiment
Statistical significances (ANOVA, $P < 0.05$) in comparison with deferoxamine group (d) is given.

Group	BP	HR
	mm Hg	min^{-1}
Control	101.0 \pm 3.9	312.3 \pm 9.6
L1 (50 mg/kg)	107.3 \pm 2.5	335.8 \pm 10.4
DAU	88.9 \pm 3.8d	284.0 \pm 12.3d
L1 (10 mg/kg) + DAU	91.3 \pm 2.4d	275.3 \pm 12.9d
L1 (50 mg/kg) + DAU	86.4 \pm 6.1d	283.9 \pm 3.2d

BP, blood pressure; HR, heart rate.

individuals from the other groups (DAU, L1 10+DAU, and L1 50+DAU) were arranged into the second cluster (II).

Discussion

Theoretical assumptions as well as recent *in vitro/ex vivo* results (Barnabé et al., 2002; Xu et al., 2006) have strongly suggested that L1, a novel oral iron chelator, could be a rational and promising alternative to dexrazoxane in cardioprotective indications. To further explore therapeutic potential of L1, there was a need to eliminate a possibility that it can attenuate the antiproliferative efficacy of anthracyclines. Hence, using a leukemic cell line, we have demonstrated that this does not take place. In contrast, L1 alone was capable of significantly reducing proliferation of leukemic cells in the concentrations, which might be achieved *in vivo*. Furthermore, when HL-60 cells were treated with DAU ($\approx IC_{50}$) together with different concentrations of L1, it was obvious that the chelator did not possess any potential to blunt the antiproliferative effect. Instead, in higher doses of L1, the summation of antiproliferative effects of both compounds was observed. These outcomes are in good agreement with other reports describing antiproliferative effects of L1 (Yasumoto et al., 2004) and other iron-chelating compounds (Yu et al., 2006). Several lines of evidences suggest that inhibition of ribonucleotide reductase can be involved in this matter (Green et al., 2001), although other mechanisms have been also proposed. Different iron chelators have been shown to cause cell cycle arrest and apoptosis and antimetastatic and antiangiogenic effects (Richardson, 2005). Using L1 and HL-60 leukemic cell line, it has been shown that chelator treatment induces apoptosis via both intrinsic (mitochon-

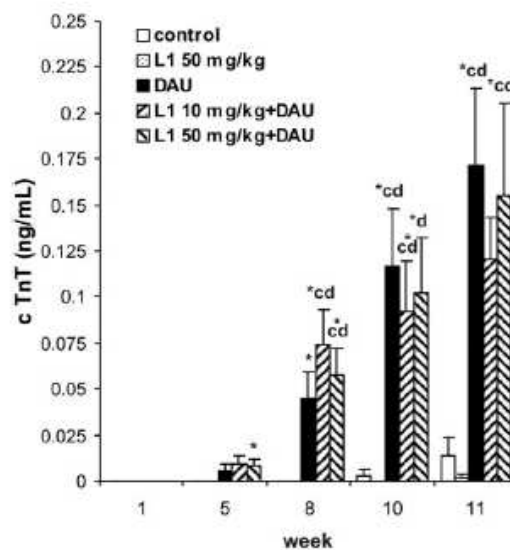


Fig. 8. cTnT plasma concentrations during the experiment. Statistical significances (ANOVA, $P < 0.05$) in comparison with control (c) and deferoxamine (d) group are given.

dria-mediated) and extrinsic pathways (Yasumoto et al., 2004). Furthermore, recently, it has been reported that L1 anticancer effects can be related to the deregulation of the polyamine metabolism. It has been suggested L1 anticancer effects are associated with induction of spermidine/spermine N_1 -acetyltransferase pathway leading to higher putrescine levels, resulting in the cell cycle arrest in G_2 -M phase (Lescoat et al., 2007).

In the major part of the study, we aimed to assess whether L1 cotreatment can overcome or significantly diminish chronic anthracycline cardiotoxicity. For this purpose, a clinically relevant dexrazoxane-validated rabbit model of chronic anthracycline cardiotoxicity was used (Simůnek et al., 2004).

L1 was administered orally in two doses of 10 and 50 mg/kg, 45 min before each DAU injection. It is surprising that, in both doses, L1 was unable to reduce anthracycline-induced mortality. Moreover, the higher L1 dose (50 mg/kg) actually led to earlier deaths, which can probably be explained by the occur-

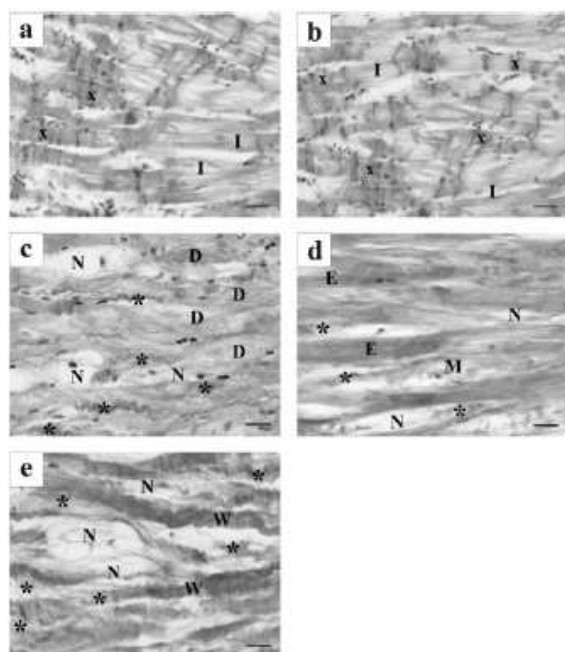


Fig. 9. The myocardium of the left ventricular wall. **a.** control group. Intact cardiomyocytes (D) of normal appearance markedly prevailed, only here and there, foci of cells with degenerated myofibrils (stripped cytoplasm, X) were present (particularly in the right ventricular wall and subendocardially, less in the middle part of the wall of the left ventricle). **b.** L1 group. A completely similar picture as in the control animals; only the number and especially the size of the foci of cells with degenerated myofibrils (stripped cytoplasm, X) appeared to be somewhat larger in some animals. **c.** DAU group. Large number of cardiomyocytes on a different level of the degeneration (D) up to the necrosis (N) and the other with intensely eosinophilic cytoplasm (based on a damage of the myofibrils) gave a typical picture of chronic focal toxic damage of the myocardium. Bundles of collagen fibers (asterisks) formed fine but also dense fibrotic scars. **d.** L1 10+DAU group. Myocardium of most of animals in this group revealed intensive focal damage comparable with the DAU group. Slight difference between both groups was noted partly in relation to the extent of inflammatory reaction (representing "early" changes during the healing process; M, macrophages), which was a bit more intensive here and partly in the amount of collagen scar tissue (representing "advanced" stages of healing), which was less abundant in this case. This may suggest a later onset of severe toxic damage in this group, although the character of changes (i.e., the development of focal necroses healed by collagen scars) was the same. **e.** L1 50+DAU group. Intensely eosinophilic cytoplasm represents the first sign of myocyte's damage; N, necrotic myocyte; *, fibrotic (scar) tissue subsequently replaced remnants of necrotic cells. **e.** L1 50+DAU group, a similar character of focal myocardial damage as in the previous group but more developed; in particular, the extent of scar tissue is larger. Essentially, in comparison with the DAU group, no distinct differences were found. N, necrotic myocyte; W, wavy myocytes, reduced in thickness, with intensely eosinophilic cytoplasm signalize irreversible damage. *, fibrotic scar tissue. Masson's blue trichrome, scale bar 20 μ m.

rence of extracardiac toxicity, the nature of which could not be reliably identified in this study. Most importantly, we have also clearly demonstrated that L1 is not able to protect the myocardium against either anthracycline-induced oxidative stress or LV cardiac damage and heart failure. Using a validated high-performance liquid chromatography method, we have found marked elevation of MDA (a standard marker of lipoperoxidation) following DAU administration, which is in line with numerous reports published so far (Lebrecht et al., 2007). How-

ever, we have surprisingly failed to detect a significant impact of L1 on this parameter in either dose. This evidently contradicts the results provided in previous reports (Barnabé et al., 2002; Xu et al., 2006). Nevertheless, both the latter studies could have certain limitations with respect to translatability of their results to the clinically relevant situation. In the first study, although L1 has been shown to reduce the anthracycline-induced ROS production using electron paramagnetic resonance spectroscopy, this was not followed within the biological system and particularly not in the chronic setting. In second case, myocardial injury was induced with an acute exposure of the isolated atria (which are not the main target for anthracyclines) to relative high and clinically unachievable doxorubicin concentration (30 μ M).

The inability of L1 to overcome DAU-induced oxidative stress was further supported by the outcomes of functional LV examination, performed using both echocardiography and LV catheterization. Furthermore, L1 exerted no effect on DAU-induced plasma concentrations cTnT, which is a very sensitive and selective biochemical marker of cardiac injury (Sterba et al., 2007b). The good agreement of these results was further supported by similar findings from the histopathological examination of the myocardium. On the other hand, repeated administration of L1 alone (in the higher dose of 50 mg/kg) was well tolerated, and no abnormalities were found in the most of the parameters evaluated, which corresponds with a preclinical investigation of L1 performed on a number of species (Porter et al., 1990). The empiric assumptions given above were further supported by two independent exploratory data analyses. These have clearly revealed that L1 had shown no clear tendency to affect the general toxicity, cardiovascular, hematological, and plasma biochemistry parameters. The only exception was found in the case of the higher myocardial iron content in the animals treated or cotreated with the higher dose of the chelator. This finding was rather surprising in the light of the proved efficacy of this compound to mobilize iron from the myocardium of iron-overloaded animals and patients upon regular daily treatment (Anderson et al., 2002; Wood et al., 2006). Furthermore, the biological half-life (approximately 2 h) of L1 excludes any potential direct effect of the compound on this parameter a week after its last dose. Hence, one can only reasonably explain these findings like a certain adaptive reaction of myocardium on the repeated intermittent iron chelation. Most importantly, these changes have not been associated with increased oxidative stress or other correlating myocardial disturbances, which indicates that this compensatory reaction was instead within a physiological range.

The results of this study strongly suggest that oral treatment with L1 has no beneficial effect on chronic anthracycline cardiotoxicity, which certainly raises several questions. One may speculate that the failure of L1 could have been associated with its poor or erratic bioavailability. However, it should be noted that L1 is characterized with very good oral bioavailability; it is fairly well absorbed from the gastrointestinal tract in humans as well as in rabbits (Fredenburg et al., 1993). Furthermore, the doses and timing of administration were designed according to the pharmacokinetic study performed in rabbits. It is noteworthy that L1 concentrations affording significant protection against anthracycline cardiotoxicity in vitro are detectable in rabbit plasma, even more than 12 h after its oral administration (Fredenburg et al.,

TABLE 2

Selected biochemical parameters

Statistical significance ($P < 0.05$, ANOVA) in comparison with control (c), deferiprone (d), and daunorubicin (a) group is given.

Parameter/Group	Beginning of the Study	Before the Fifth Administration	End of the Study
Serum iron (μM)			
Control	31.8 \pm 3.5	36.2 \pm 2.8	26.3 \pm 1.4
L1 (50 mg/kg)	36.0 \pm 5.7	33.2 \pm 2.7	29.7 \pm 3.6
DAU	35.7 \pm 2.6	19.5 \pm 2.9 ^{cd}	19.7 \pm 4.1*
L1 (10 mg/kg) + DAU	35.3 \pm 2.7	25.5 \pm 2.3 ^c	23.4 \pm 4.6
L1 (50 mg/kg) + DAU	45.0 \pm 2.3	16.7 \pm 3.7 ^{cd}	35.9 \pm 12.0
Creatinine (μM)			
Control	82.8 \pm 4.2	95.1 \pm 4.2*	89.0 \pm 4.1
L1 (50 mg/kg)	83.4 \pm 3.7	89.2 \pm 5.4	77.0 \pm 5.2
DAU	91.1 \pm 8.0	127.1 \pm 11.1 ^{ed}	262.0 \pm 112.9 ^{ed}
L1 (10 mg/kg) + DAU	88.5 \pm 4.7	102.0 \pm 3.5*	152.3 \pm 19.3 ^{cd}
L1 (50 mg/kg) + DAU	85.4 \pm 4.1	108.3 \pm 5.0*	162.8 \pm 30.1 ^{cd}
Urea (ml)			
Control	5.83 \pm 0.51	7.58 \pm 0.31*	6.65 \pm 0.25
L1 (50 mg/kg)	6.02 \pm 0.80	6.88 \pm 0.48	6.78 \pm 0.42
DAU	7.11 \pm 0.92	7.25 \pm 0.40	12.70 \pm 4.26
L1 (10 mg/kg) + DAU	6.50 \pm 0.35	7.39 \pm 0.49	8.27 \pm 0.51*
L1 (50 mg/kg) + DAU	7.06 \pm 0.39	6.78 \pm 0.38	8.84 \pm 2.29
Protein (g/l)			
Control	59.8 \pm 0.7	65.7 \pm 1.6*	60.9 \pm 1.0
L1 (50 mg/kg)	60.8 \pm 0.3	65.4 \pm 1.0	63.8 \pm 0.9*
DAU	61.9 \pm 1.4	60.6 \pm 1.3	49.1 \pm 1.6 ^{cd}
L1 (10 mg/kg) + DAU	64.7 \pm 0.9c	62.8 \pm 1.4	48.6 \pm 1.4 ^{cd}
L1 (50 mg/kg) + DAU	65.2 \pm 1.0c	55.9 \pm 6.5	49.3 \pm 0.8 ^{cd}
Cholesterol (μM)			
Control	1.47 \pm 0.14	1.75 \pm 0.23	1.49 \pm 0.13
L1 (50 mg/kg)	1.82 \pm 0.52	1.89 \pm 0.51	1.48 \pm 0.28
DAU	1.43 \pm 0.16	2.52 \pm 0.52	3.65 \pm 0.44 ^{ed}
L1 (10 mg/kg) + DAU	1.36 \pm 0.13	2.76 \pm 0.26*	5.81 \pm 0.95 ^{ed}
L1 (50 mg/kg) + DAU	1.27 \pm 0.12	3.23 \pm 0.89*	4.24 \pm 0.89 ^{ed}
TAG (ml)			
Control	0.86 \pm 0.06	0.62 \pm 0.09*	0.82 \pm 0.08
L1 (50 mg/kg)	1.16 \pm 0.16	1.01 \pm 0.33	1.02 \pm 0.13
DAU	1.19 \pm 0.17	1.10 \pm 0.14	3.73 \pm 0.94 ^{ed}
L1 (10 mg/kg) + DAU	0.87 \pm 0.07	1.38 \pm 0.21 ^{cd}	5.00 \pm 1.71 ^{cd}
L1 (50 mg/kg) + DAU	1.13 \pm 0.16	2.22 \pm 0.77 ^c	2.54 \pm 0.46 ^c
ALT ($\mu\text{kat/l}$)			
Control	0.96 \pm 0.20	0.77 \pm 0.05	0.76 \pm 0.07
L1 (50 mg/kg)	0.80 \pm 0.16	0.95 \pm 0.14	0.73 \pm 0.09
DAU	1.00 \pm 0.10	0.73 \pm 0.05*	0.72 \pm 0.15
L1 (10 mg/kg) + DAU	1.07 \pm 0.11	1.14 \pm 0.18 ^a	0.66 \pm 0.10*
L1 (50 mg/kg) + DAU	1.50 \pm 0.28	0.91 \pm 0.12*	0.65 \pm 0.07
AST ($\mu\text{kat/l}$)			
Control	0.64 \pm 0.09	0.57 \pm 0.05	0.50 \pm 0.06
L1 (50 mg/kg)	1.04 \pm 0.23	1.34 \pm 0.52	0.62 \pm 0.09
DAU	0.71 \pm 0.15	0.40 \pm 0.05 ^d	0.51 \pm 0.18
L1 (10 mg/kg) + DAU	0.64 \pm 0.06	1.38 \pm 0.67	0.45 \pm 0.07
L1 (50 mg/kg) + DAU	1.26 \pm 0.31	1.47 \pm 0.93	0.16 \pm 0.02

TAG, triacylglycerides.

* Statistical significance ($P < 0.05$, paired *t*-test) paired comparison with the initial values.

1993). Furthermore, potential pharmacokinetic interactions also deserve consideration in such experiments. However, in this particular case, the experimental design and especially the pharmacokinetic characteristics of both studied compounds (Yokel et al., 1995; Danesi et al., 2002) make this possibility unlikely. It should be noted that neither of these drugs is extensively bound to plasma proteins. Moreover, both drugs are known to have different routes of elimination. Whereas L1 is mainly excreted by kidney to the urine, daunorubicin is predominantly excreted by liver to the stool. In addition, both drugs also do not share the major metabolic pathways, and neither of these agents is known as an important substrate for cytochrome P450. Furthermore, direct pharmacokinetic interaction at the cardiomyocyte level is also unlikely, as this would be recognizable in the previous *in vitro* and *ex vivo* results.

Similar to dexrazoxane, L1 is able to quickly enter cardio-

myocytes (Glickstein et al., 2006) and efficiently remove iron from its complex with doxorubicin (Barnabé et al., 2002). Thus, it should be able to protect myocytes against anthracycline-induced injury. The discrepancy between this assumption and the outcomes of the present study prompts us to compare L1 with other iron chelators studied in a similar setting so far [e.g., lipophilic, cell permeable, and specific chelator of iron, deferasirox (ICL670), studied on the same model as L1 lacked any protective effects]. It is interesting that this occurred in spite of the fact that ICL670 quickly and efficiently removed Fe^{3+} from its complex with doxorubicin, rapidly entered myocytes, and displaced iron from an intracellular iron-calcein complex (Hasinoff et al., 2003). This suggests that the mere ability of an agent to chelate iron need not be a sole determinant of its protective action. Difference in cardioprotective properties could be accounted for different ratios in which chelators are capable to bind ferric ions. L1 is

TABLE 3
Selected hematological parameters
Statistical significance ($P < 0.05$, ANOVA) in comparison with control (c) and deferiprone (d) group is given.

Parameter/Group	Beginning of the Study	Before the Fifth Administration	End of the Study
Leukocytes ($\times 10^9/l$)			
Control	6.17 \pm 0.50	6.92 \pm 0.36	3.80 \pm 0.18*
L1 (50 mg/kg)	7.22 \pm 0.69	6.70 \pm 0.39	3.72 \pm 0.19*
DAU	6.39 \pm 0.54	4.82 \pm 0.41*c	2.75 \pm 0.38*
L1 10 (mg/kg) + DAU	5.31 \pm 0.34	4.58 \pm 0.85*cd	2.74 \pm 0.49
L1 50 (mg/kg) + DAU	6.00 \pm 0.48	5.09 \pm 0.78	3.63 \pm 0.95*
Erythrocytes ($\times 10^{12}/l$)			
Control	6.13 \pm 0.17	6.16 \pm 0.06	6.16 \pm 0.12
L1 (50 mg/kg)	6.52 \pm 0.11	6.35 \pm 0.12*	6.04 \pm 0.14*
DAU	6.04 \pm 0.19	4.26 \pm 0.24*cd	4.02 \pm 0.30*cd
L1 (10 mg/kg) + DAU	6.12 \pm 0.16	4.04 \pm 0.24*cd	4.33 \pm 0.15*cd
L1 (50 mg/kg) + DAU	6.39 \pm 0.24	3.74 \pm 0.48*cd	4.06 \pm 0.28*cd
Hemoglobin (g/l)			
Control	128.9 \pm 3.1	132.3 \pm 2.0	131.6 \pm 2.5
L1 (50 mg/kg)	138.7 \pm 3.5	137.3 \pm 3.9	131.3 \pm 4.2
DAU	133.4 \pm 3.7	94.2 \pm 4.9*cd	84.9 \pm 6.7*cd
L1 (10 mg/kg) + DAU	129.6 \pm 3.5	86.8 \pm 4.4*cd	93.6 \pm 4.1*c
L1 (50 mg/kg) + DAU	137.3 \pm 3.9	82.3 \pm 10.1*cd	87.2 \pm 5.8*cd
Hematocrit			
Control	0.407 \pm 0.009	0.429 \pm 0.008	0.412 \pm 0.013
L1 (50 mg/kg)	0.417 \pm 0.010	0.422 \pm 0.008	0.413 \pm 0.012
DAU	0.425 \pm 0.011	0.314 \pm 0.015*cd	0.287 \pm 0.020*cd
L1 (10 mg/kg) + DAU	0.414 \pm 0.010	0.289 \pm 0.013*cd	0.306 \pm 0.016*cd
L1 (50 mg/kg) + DAU	0.425 \pm 0.008	0.261 \pm 0.029*cd	0.292 \pm 0.015*cd
Trombocytes ($\times 10^9/l$)			
Control	290.6 \pm 26.8	287.8 \pm 29.8	306.0 \pm 49.7
L1 (50 mg/kg)	201.0 \pm 18.1	209.8 \pm 18.3	210.8 \pm 15.4
DAU	249.6 \pm 22.3	176.5 \pm 21.3*c	124.8 \pm 13.5*c
L1 (10 mg/kg) + DAU	244.9 \pm 30.7	114.9 \pm 21.1*cd	166.0 \pm 19.2c
L1 (50 mg/kg) + DAU	234.3 \pm 12.3	121.4 \pm 28.4*c	175.6 \pm 32.9c

* Statistical significance ($P < 0.05$, paired t-test) in comparison with the initial values.

a bidentate iron chelator, which forms a complex with iron in a ratio of 3:1. This might be a limitation from the viewpoint of protection, because the probability of insufficient occupation of all sites of ferric ions is higher. Furthermore, we cannot rule out that, although L1 entered the cardiac cells, it did not reach the desirable intracellular compartment and remained there for a sufficient time to induce effective cardioprotection.

Previously, the well known iron chelator deferoxamine had been shown to be ineffective against chronic anthracycline toxicity in spontaneously hypertensive rats (Herman et al., 1994). Nevertheless, this was well attributable to the hydrophilic nature of this drug, which hinders its penetration into the cardiomyocytes. On the other hand, using our in vivo rabbit model, we have recently shown that lipophilic aryolhydrazone iron chelators are able to protect against anthracycline cardiotoxicity in terms of overall mortality, functional parameters, and histopathology (Simunek et al., 2005a; Sterba et al., 2006, 2007a). However, at the same time, it was revealed that dexrazoxane is superior to aryolhydrazones, as the cardioprotection of the latter compounds—albeit significant—was always only partial. Moreover, dose escalations of all aryolhydrazones surprisingly resulted in the disappearance of protection, which was puzzling and unexpected. These results together with the findings from the present study indicate that the role of iron in anthracycline cardiotoxicity is not as trivial as originally supposed. For instance, a number of studies provided evidence for anthracycline-induced dysregulation of iron homeostasis with potentially serious consequences (Xu et al., 2005). Anthracyclines can perturb iron metabolism by interacting with various molecular targets, including iron regulatory proteins, ferritin, or

transferrin receptor (Kwok and Richardson, 2003; Xu et al., 2008).

The observed lack of cardioprotective effect of L1 can also mean that iron-catalyzed formation of ROS is not the pivotal and ultimate executor responsible for chronic anthracycline cardiotoxicity. ROS can also be produced without presence of iron, and they might be rather important as the triggering factor for a number of successive molecular and cellular events. In addition, anthracyclines and their metabolites have been reported to induce a number of distinct cellular effects, which do not appear to be ROS-mediated (Menna et al., 2007). For example, anthracyclines have been demonstrated to induce a number of perturbations in cellular calcium homeostasis (Simunek et al., 2005b; Wallace, 2007). Unlike in the case of selective iron chelator L1, it can not be excluded that dexrazoxane may also chelate calcium, which can potentially account for the difference in cardioprotective effects of both chelators.

This study also points out on difficulties with the translation of in vitro and ex vivo cardioprotection results into the chronic in vivo settings, reflecting more closely the anthracycline cardiotoxicity seen in clinics. It is interesting that a similar scenario took place with a number of antioxidants (e.g., vitamins A and E and acetylcysteine) (Dresdale et al., 1982; Legha et al., 1982; Myers et al., 1983).

In conclusion, this study revealed that, despite the promising results obtained previously in vitro/ex vivo, iron chelation with L1 was unable to protect the myocardium against lipoperoxidation, cardiomyopathy, and heart failure induced by repeated administration of DAU to rabbits. Together with our previous findings, this study strongly suggests that the role of iron and its chelation in anthracycline cardiotoxicity is

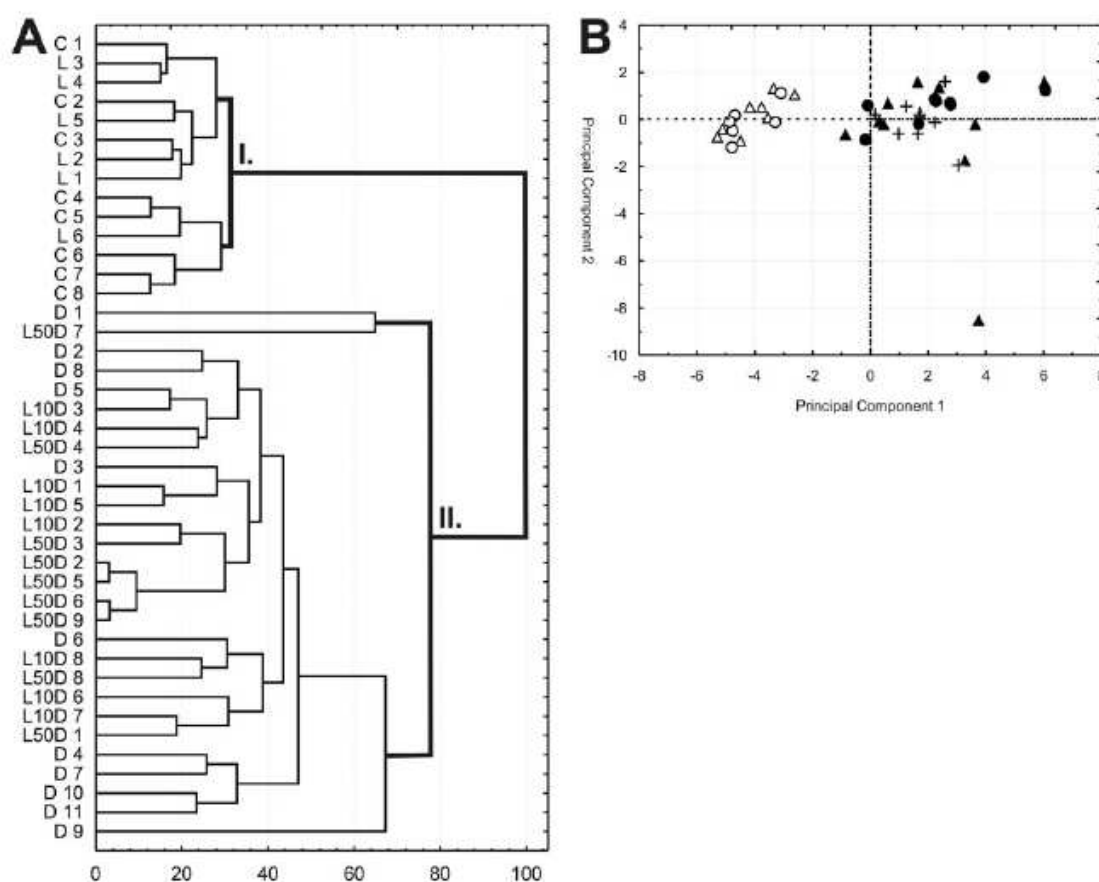


Fig. 10. Exploratory data analysis. A, horizontal hierarchical tree plot of all determined functional, biochemical, and hematological parameters (25 variables) in five experimental groups. The analysis resulted into two main clusters. The first cluster (I) covers exclusively the individuals from the control (C) and deferiprone (L) group, whereas the second cluster contains the animals from the daunorubicin group (D) as well as from both groups cotreated with L1 (L10D, L50D). It is noteworthy that, in both clusters, the particular treatments did not form distinct subclusters; instead, the individuals were rather randomly spread in there. B, principal component analysis scatter-plots. This analysis of the same variables also points on two distinctly separated clusters comprising the L1 and control groups in the first case, with all other groups in the second cluster. Treatment groups: control (Δ), L1 (\circ), DAU (\blacktriangle), L1 10+DAU (+), and L1 50+DAU (\bullet).

probably not as trivial as originally believed and/or other mechanisms unrelated to iron-catalyzed ROS production are involved in this pathology.

Acknowledgments

We thank Dr. Magdaléna Holečková for myocardial iron content determination, Ludmila Latýnová for skillful technical assistance, and Dr. John Connelly (ApoPharma Inc.) for kindly providing a drug substance of deferiprone.

References

- Anderson LJ, Wonke B, Prescott E, Holden S, Walker JM, and Pennell DJ (2002) Comparison of effects of oral deferiprone and subcutaneous desferrioxamine on myocardial iron concentrations and ventricular function in beta-thalassemia. *Lancet* 360:516–520.
- Barnabé N, Zastra JA, Venkataram S, and Hasinoff BB (2002) Deferiprone protects against doxorubicin-induced myocyte cytotoxicity. *Free Radic Biol Med* 33:266–275.
- Bast A, Haenen GR, Bruynzeel AM, and Van der Vijgh WJ (2007) Protection by flavonoids against anthracycline cardiotoxicity: from chemistry to clinical trials. *Cardiovasc Toxicol* 7:154–159.
- Chen B, Peng X, Pentassuglia L, Lim CC, and Sawyer DB (2007) Molecular and cellular mechanisms of anthracycline cardiotoxicity. *Cardiovasc Toxicol* 7:114–121.
- Danesi R, Fogli S, Gennari A, Conte P, and Del Tacca M (2002) Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of the anthracycline anticancer drugs. *Clin Pharmacokinet* 41:431–444.
- Dresdale AR, Barr LH, Bonow RO, Mathisen DJ, Myers CE, Schwartz DE, d'Angelo T, and Rosenberg SA (1982) Prospective randomized study of the role of *N*-acetyl cysteine in reversing doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Am J Clin Oncol* 5:657–663.
- Fredenburg AM, Wedlund PJ, Skinner TL, Damani LA, Hider RC, and Yokel RA (1993) Pharmacokinetics of representative 3-hydroxypyridin-4-ones in rabbits: CP20 and CP94. *Drug Metab Dispos* 21:255–258.
- Glickstein H, El RB, Link G, Breuer W, Konijn AM, Hershko C, Nick H, and Cabantchik ZI (2006) Action of chelators in iron-loaded cardiac cells: accessibility to intracellular labile iron and functional consequences. *Blood* 108:3195–3203.
- Green DA, Antholine WE, Wong SJ, Richardson DR, and Chitambar CR (2001) Inhibition of malignant cell growth by 311, a novel iron chelator of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class: effect on the R2 subunit of ribonucleotide reductase. *Clin Cancer Res* 7:3574–3579.
- Hasinoff BB, Hellmann K, Herman EH, and Ferrans VJ (1998) Chemical, biological and clinical aspects of dexrazoxane and other bisdioxopiperazines. *Curr Med Chem* 5:1–28.
- Hasinoff BB, Patel D, and Wu X (2005) The oral iron chelator ICL670A (deferazirox) does not protect myocytes against doxorubicin. *Free Radic Biol Med* 35:1469–1479.
- Herman EH, Zhang J, and Ferrans VJ (1994) Comparison of the protective effects of desferrioxamine and ICRF-187 against doxorubicin-induced toxicity in spontaneously hypertensive rats. *Cancer Chemother Pharmacol* 35:93–100.
- Herman EH, Zhang J, Hasinoff BB, Chadwick DP, Clark JR Jr., and Ferrans VJ (1997) Comparison of the protective effects against chronic doxorubicin cardiotox-

- icity and the rates of iron (III) displacement reactions of ICRF-187 and other bisdiketopiperazines. *Cancer Chemother Pharmacol* 40:400–408.
- Institute of Laboratory Animal Resources (1996) *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* 7th ed. Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council, Washington DC.
- Jones RL, Swanton C, and Ewer MS (2006) Anthracycline cardiotoxicity. *Expert Opin Drug Saf* 5:791–809.
- Keizer HG, Pinedo HM, Schuurhuis GJ, and Joenje H (1990) Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmacol Ther* 47:219–231.
- Kontoghiorghes GJ, Pattichis K, Neocleous K, and Kolnagou A (2004) The design and development of deferiprone (LI) and other iron chelators for clinical use: targeting methods and application prospects. *Curr Med Chem* 11:2161–2183.
- Kwok JC and Richardson DR (2003) Anthracyclines induce accumulation of iron in ferritin in myocardial and neoplastic cells: inhibition of the ferritin iron mobilization pathway. *Mol Pharmacol* 63:849–861.
- Lebrecht D, Geist A, Ketelsen UP, Haberstroh J, Setzer B, and Walker UA (2007) Desferazoxane prevents doxorubicin-induced long-term cardiotoxicity and protects myocardial mitochondria from genetic and functional lesions in rats. *Br J Pharmacol* 151:771–778.
- Legha SS, Wang YM, Mackay B, Ewer M, Hortobagyi GN, Benjamin RS, and Ali MK (1992) Clinical and pharmacologic investigation of the effects of alpha-tocopherol on adriamycin cardiotoxicity. *Ann NY Acad Sci* 393:411–418.
- Lescoat G, Chantrel-Groussard K, Pasdeloup N, Nick H, Brisot P, and Gaboriau F (2007) Antiproliferative and apoptotic effects in rat and human hepatoma cell cultures of the orally active iron chelator ICL670 compared to CP20: a possible relationship with polyamine metabolism. *Cell Prolif* 40:755–767.
- Link G, Tirosh R, Pinson A, and Hershko C (1996) Role of iron in the potentiation of anthracycline cardiotoxicity: identification of heart cell mitochondria as a major site of iron-anthracycline interaction. *J Lab Clin Med* 127:272–278.
- Menna P, Recalcati S, Cairo G, and Minotti G (2007) An introduction to the metabolic determinants of anthracycline cardiotoxicity. *Cardiovasc Toxicol* 7:80–85.
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, and Gianni L (2004) Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 56:185–229.
- Myers C, Bonow R, Palmeri S, Jenkins J, Corden E, Locker G, Doroshov J, and Epstein S (1988) A randomized controlled trial assessing the prevention of doxorubicin cardiomyopathy by *N*-acetylcysteine. *Semin Oncol* 10:53–55.
- Oliveira PJ, Bjork JA, Santos MS, Leino RL, Froberg MK, Moreno AJ, and Wallace KB (2004) Carvedilol-mediated antioxidant protection against doxorubicin-induced cardiac mitochondrial toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 200:159–168.
- Pilz J, Meineke I, and Gleiter CH (2000) Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 742:315–325.
- Porter JB, Morgan J, Hoyes KP, Burke LC, Huehns ER, and Hider RC (1990) Relative oral efficacy and acute toxicity of hydroxypyridin-4-one iron chelators in mice. *Blood* 76:2389–2396.
- Richardson DR (2005) Molecular mechanisms of iron uptake by cells and the use of iron chelators for the treatment of cancer. *Curr Med Chem* 12:2711–2729.
- Saad SY, Najjar TA, and Al-Rikabi AC (2001) The preventive role of deferoxamine against acute doxorubicin-induced cardiac, renal and hepatic toxicity in rats. *Pharmacol Res* 43:211–218.
- Simunek T, Klimtova I, Kaplanova J, Mazurova Y, Adamcova M, Sterba M, Hrdina R, and Gersl V (2004) Rabbit model for in vivo study of anthracycline-induced heart failure and for the evaluation of protective agents. *Eur J Heart Fail* 6:377–387.
- Simunek T, Klimtova I, Kaplanova J, Sterba M, Mazurova Y, Adamcova M, Hrdina R, Gersl V, and Ponka P (2005a) Study of daunorubicin cardiotoxicity prevention with pyridoxal isonicotinoyl hydrazone in rabbits. *Pharmacol Res* 51:223–231.
- Simunek T, Sterba M, Holeckova M, Kaplanova J, Klimtova I, Adamcova M, Gersl V, and Hrdina R (2005b) Myocardial content of selected elements in experimental anthracycline-induced cardiomyopathy in rabbits. *Biometals* 18:163–169.
- Sterba M, Popelova O, Simunek T, Mazurova Y, Potacova A, Adamcova M, Guncova I, Kaiserova H, Palicka V, Ponka P, et al. (2007a) Iron chelation-afforded cardioprotection against chronic anthracycline cardiotoxicity: a study of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH). *Toxicology* 235:150–166.
- Sterba M, Popelova O, Simunek T, Mazurova Y, Potacova A, Adamcova M, Kaiserova H, Ponka P, and Gersl V (2006) Cardioprotective effects of a novel iron chelator, pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone, in the rabbit model of daunorubicin-induced cardiotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 319:1336–1347.
- Sterba M, Simunek T, Popelova O, Potacova A, Adamcova M, Mazurova Y, Holeckova M, and Gersl V (2007b) Early detection of anthracycline cardiotoxicity in a rabbit model: left ventricle filling pattern versus troponin T determination. *Physiol Res* 56:535–545.
- van Dalen EC, van der Pal HJ, Caron HN, and Kremer LC (2006) Different dosage schedules for reducing cardiotoxicity in cancer patients receiving anthracycline chemotherapy. *Cochrane Database Syst Rev*:CD005008.
- Wallace KB (2007) Adriamycin-induced interference with cardiac mitochondrial calcium homeostasis. *Cardiovasc Toxicol* 7:101–107.
- Wood JC, Otto-Duessel M, Gonzalez I, Aguilar MI, Shimada H, Nick H, Nelson M, and Moots R (2006) Deferasirox and deferiprone remove cardiac iron in the iron-overloaded gerbil. *Transl Res* 148:272–280.
- Wouters KA, Kremer LC, Miller TL, Herman EH, and Lipschutz SE (2005) Protecting against anthracycline-induced myocardial damage: a review of the most promising strategies. *Br J Haematol* 131:561–578.
- Xu LJ, Jin L, Pan H, Zhang AZ, Wei G, Li PP, and Lu WY (2006) Deferiprone protects the isolated atria from cardiotoxicity induced by doxorubicin. *Acta Pharmacol Sin* 27:1333–1339.
- Xu X, Persson HL, and Richardson DR (2005) Molecular pharmacology of the interaction of anthracyclines with iron. *Mol Pharmacol* 68:261–271.
- Xu X, Sutak R, and Richardson DR (2006) Iron chelation by clinically relevant anthracyclines: alteration in expression of iron-regulated genes and atypical changes in intracellular iron distribution and trafficking. *Mol Pharmacol* 73:833–844.
- Yasumoto E, Nakano K, Nakayachi T, Morshed SR, Hashimoto K, Kikuchi H, Nishikawa H, Kawase M, and Sakagami H (2004) Cytotoxic activity of deferiprone, maltol and related hydroxyketones against human tumor cell lines. *Anticancer Res* 24:755–762.
- Yokel RA, Fredenburg AM, Meurer KA, and Skinner TL (1995) Influence of lipophilicity on the bioavailability and disposition of orally active 3-hydroxypyridin-4-one metal chelators. *Drug Metab Dispos* 23:1178–1190.
- Yu Y, Wong J, Lovejoy DE, Kalkowski DS, and Richardson DR (2006) Chelators at the cancer coalface: desferrioxamine to triapine and beyond. *Clin Cancer Res* 12:6876–6883.

Address correspondence to: Dr. Olga Popelová, Department of Pharmacology, Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Hradec Králové, Simkova 870, 500 38 Hradec Králové, Czech Republic. E-mail: popelova@lfhk.cuni.cz

PŘÍLOHA II

Popelová O, Štěrba M, Hašková P, Šimůnek T, Hroch M, Gunčová I, Nachtigal P, Adamcová M, Geršl V, Mazurová Y. *Dexrazoxane-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)

TITLE PAGE

Full Title:

Dexrazoxane-afforded protection against chronic anthracycline cardiotoxicity *in vivo*: effective rescue of cardiomyocytes from apoptotic cell death

Running title: Dexrazoxane and apoptosis

O Popelová¹, M Štěrba¹, P Hašková², T Šimůnek², M Hroch¹, I Gunčová³, P Nachtigal⁴, M Adamcová⁵, V Geršl¹, Y Mazurová³

Departments of ¹Pharmacology, ³Histology and Embryology, and ⁵Physiology, Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové, Czech Republic, and ²Departments of Biochemical Sciences, and ⁴Biological and Medical Sciences, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic.

Correspondence:

Dr. Martin Štěrba

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine in Hradec Králové, Charles University in Prague, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové, Czech Republic.

E-mail: sterbam@lfhk.cuni.cz

ABSTRACT

Background: Dexrazoxane (ICRF-187) is the only clinically approved cardioprotectant against anthracycline cardiotoxicity. It has been traditionally postulated to undergo hydrolysis to iron-chelating agent ADR-925 and prevent the anthracycline-induced oxidative stress, progressive cardiomyocyte degeneration and subsequent non-programmed cell death. However, the additional capability of dexrazoxane to protect cardiomyocytes from apoptosis has remained unsubstantiated under clinically relevant *in vivo* conditions.

Methods: Chronic anthracycline cardiotoxicity was induced in rabbits by repeated daunorubicin administrations (3 mg/kg weekly for 10 weeks). Cardiomyocyte apoptosis was evaluated using TUNEL assay and activities of caspases 3/7, 8, 9 and 12. Lipoperoxidation was assayed using HPLC determination of myocardial malondialdehyde and 4-hydroxynonenal immunodetection.

Results: Dexrazoxane (60 mg/kg) co-treatment was capable of overcoming the daunorubicin-induced mortality, left ventricular dysfunction, profound structural damage of the myocardium and release of cardiac troponin T and I to the circulation. Moreover, for the first time it has been demonstrated that dexrazoxane is able to afford significant and nearly complete cardioprotection against anthracycline-induced apoptosis *in vivo* and to effectively suppress the complex apoptotic signalling triggered by daunorubicin. In individual animals, severity of apoptotic parameters significantly correlated with the cardiac function. However, this effective cardioprotection occurred without a significant decrease in anthracycline-induced lipoperoxidation.

Conclusion:

This study identifies inhibition of apoptosis as an important target for effective cardioprotection against chronic anthracycline cardiotoxicity and suggests that lipoperoxidation-independent mechanisms are involved in the cardioprotective action of dexrazoxane.

Keywords: anthracyclines, cardiotoxicity, cardioprotection, dexrazoxane, apoptosis

INTRODUCTION

Anthracycline antibiotics (ANT, e.g. doxorubicin, daunorubicin or epirubicin) rank among the most potent and clinically important anticancer drugs ever developed. However, their clinical utility is markedly hampered by a significant risk of cardiotoxicity, especially that of a chronic and delayed type (Jones *et al*, 2006). The current conceptual model proposes that each anthracycline dose (cycle) induces an amount of damage to the myocardium. This injury, however, may stay clinically silent as long as the cumulative damage to the cardiomyocytes does not exceed a certain functional reserve of the myocardium (Ewer & Benjamin, 2006). With increasing cumulative dose, alterations to myocyte ultrastructure may progress further towards end-stage degeneration and cell death (Billingham *et al*, 1978; Von Hoff *et al*, 1979). The ANT cardiomyopathy which develops in this manner manifests itself in severe heart failure with poor overall prognosis (Gianni *et al*, 2008; Jones *et al*, 2006).

ANT cardiotoxicity has been traditionally associated with oxidative stress-induced injury with catalytic involvement of free cellular iron (Keizer *et al*, 1990). For many years, it has been believed that reactive oxygen species (ROS)-induced degenerative changes and subsequent non-programmed cell death of the cardiomyocytes are the primary (or even exclusive) hallmarks of ANT cardiomyopathy (Billingham *et al*, 1978; Godfraind, 1984; Lewis & Silver, 2001). However, with the wider appreciation of the role of programmed cell death in cardiac diseases, this view is undergoing considerable change. More recently, several experimental *in vitro* as well as *in vivo* reports have suggested that exposure of the cardiomyocytes to ANTs also triggers a well-orchestrated apoptotic mode of cell death (Arola *et al*, 2000; Konorev *et al*, 2008; Kotamraju *et al*, 2004; Nakamura *et al*, 2000; Sawyer *et al*, 1999; Yamaoka *et al*, 2000).

Dexrazoxane (DEX, ICRF-187) is the only well-established and clinically approved cardioprotectant against ANT cardiotoxicity (Wouters *et al*, 2005). DEX is traditionally characterised as a prodrug which is activated inside cardiomyocytes to the metal-chelating metabolite ADR-925. The latter active form of the drug is proposed to prevent ANT-induced and ROS-mediated cellular degeneration and non-programmed death of the cardiomyocytes (Herman *et al*, 1981; Van Vleet *et al*, 1980). However, an *in vitro* study using the isolated cardiomyocytes suggested that in clinically relevant concentrations of ANTs, DEX may instead work through prevention of programmed (apoptotic) cell death (Sawyer *et al*, 1999).

Hence, the main aim of this study was to examine whether the DEX-afforded

cardioprotection against chronic ANT cardiotoxicity *in vivo* involves a rescue of the cardiomyocytes from apoptosis. In addition, the effects of DEX on the main apoptotic pathways and relations to lipoperoxidation were investigated.

MATERIAL AND METHOS

Animals and study design

The present study was performed using the previously well-established and accepted model of chronic ANT cardiotoxicity in rabbits (Gersl & Hrdina, 1994; Simunek *et al*, 2004; Sterba *et al*, 2006). Chinchilla male rabbits (3.48 ± 0.03 kg) were randomized into 3 groups receiving: (1) saline (1 ml/kg, *i.v.*, n=8; Natrium Chloratum, Biotika, Slovakia); (2) daunorubicin (DAU, 3 mg/kg, *i.v.*, n=11; Daunoblastina; Pharmacia Italia, Italy); (3) DEX (60 mg/kg, *i.p.*, n=8; Cardioxane, Novartis, Switzerland) 30 min prior to each DAU administration (DEX+DAU group). All substances were administered once weekly for 10 weeks. Administration of drugs, blood sampling, and non-invasive measurements during the study were carried out under combined anaesthesia – ketamine (50 mg/kg, *i.m.*; Narketan, Vétoquinol AG, Switzerland) and midazolam (1.25 mg/kg, *i.m.*; Midazolam Torrex; Torrex Chiesi Pharma, Austria). Pentobarbital (30 mg/kg, *i.v.*; Sigma-Aldrich, Czech Republic) was used for anaesthesia during the final invasive haemodynamic measurements and for an overdose of animals at the end of the experiment.

The study was terminated 5-7 days after the last drug administration. During subsequent autopsy, the hearts were rapidly excised, washed and briefly perfused with ice-cold saline. The heart ventricles were transversely cut under the atrio-ventricular septum and a block of LV tissue was used for histological examination. The rest of the left ventricular (LV) free wall was snap-frozen and homogenized under liquid nitrogen and kept frozen at -80°C for further analysis.

All experiments were approved and supervised by the Ethical Committee of Charles University in Prague, the Faculty of Medicine in Hradec Králové, and were in accordance with the Institute of Laboratory Animal Resources (1996).

Cardiac function measurements

During the time course of the experiment, the LV systolic function was followed by echocardiography (Vivid 4, with a 10 MHz probe; GE Medical Systems Ultrasound; GE Healthcare, UK). The LV fractional shortening (FS) was obtained from LV end-systolic and end-diastolic diameters determined by guided M-mode scanning from the left

parasternal long axis view.

At the end of the study, an invasive examination of the LV contractility was performed using a Micro-Tip pressure catheter (2.3F, Millar Instruments, TX, U.S.A.) connected to a data acquisition system (Powerlab, ADInstruments Pty., Australia). The Chart 5.4.2 software (ADInstruments Pty., Australia) was used for data analysis and calculation of the first derivative of the LV pressure rise in the isovolumic phase of systole (index dP/dt_{max}).

Cardiac troponin determination

Plasma concentrations of cardiac troponins T and I were determined using an Elecsys Troponin T STAT Immunoassay (Roche Diagnostics, Switzerland) and an ADV AxSYM troponin I Immunoassay (Abbott Laboratories, IL, U.S.A.), respectively.

Histology and TUNEL labelling

Tissue blocks (~ 3 mm thick) of the transversely sectioned LVs were fixed by immersion in 4% neutral formaldehyde for 3 days. Thereafter, they were embedded in paraffin and numbered serial sections (6 μm thick) were cut. First two sections in each set were stained with H&E and Masson's blue trichrome for morphological evaluation, while the 3rd, 6th and 9th sections were used for a terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling (TUNEL) assay using an In situ Cell Death Detection Kit AP (Roche Diagnostics, Switzerland) according to the manufacturer's recommendation. The representative photomicrographs were obtained with a MicroImage software version 4.51 (Media Cybernetics, Laboratory Imaging, Czech Republic).

Quantification of TUNEL-positive nuclei

Three serial LV sections were taken from each heart (representing a distance of 42 μm) and labelled with the TUNEL assay. Photomicrographs of the tissue (x 200 magnification) were made in numbered series using an Olympus AX 70 microscope equipped with a digital camera Pixelink PL-A642 (Vitana Corp., Canada). The quantitative analysis was performed by NIS image-analysis software (Laboratory Imaging, Czech Republic) using 20 randomly chosen fields which represented approximately 3.7 mm^2 of the LV area on a given section. The selection of fields was based on generation of random numbers by SigmaStat software (SPSS Inc., IL, U.S.A.). Only the appropriately stained nuclei of the cardiomyocytes at the section level were carefully counted. The average

number of TUNEL positive nuclei per square millimetre of the LV tissue was determined.

Caspases activity determination

The activities of individual caspases were determined in the LV myocardium using commercially available kits. The myocardial samples were homogenized in a Lysis Buffer (BioVision, CA, U.S.A.) on ice. After centrifugation, the supernatants were collected for further analysis of caspase activity. Caspase 12 activity was determined using a Caspase-12 Fluorometric Assay Kit (BioVision, CA, U.S.A.), while the activities of caspase 3/7, 8, and 9 were determined using luminescence Caspase-Glo Assays (Promega, U.K.) according to the manufacturer's instruction. The fluorescence and luminescence units (FU and LU) were normalized on the protein content in each sample. The fold-increase in caspase activity was determined by comparison of these results with the levels determined in the samples obtained from control animals.

Myocardial lipoperoxidation analyses

For reliable analytical determination of malondialdehyde (MDA) in myocardial samples a thiobarbituric acid-independent HPLC method was employed. This method has been appropriately validated with respect to selectivity, precision, accuracy and linearity following standards of FDA Guidelines for Bioanalytical Method Validation (FDA Guidance Document 2001). Radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA, 500 μ l) was added to the LV samples (approx. 70 mg of tissue) and the mixture was homogenized and vortexed. After centrifugation, the supernatant was withdrawn and analyzed according to Pilz *et al.* (Pilz *et al.*, 2000). Briefly, 50 μ l of NaOH (6 mol/l) was added and after vortexing, the solution was kept at 60°C for 30 min. The samples were then cooled on ice and 125 μ l of perchloric acid [35% (v/v)] was added. After centrifugation, 250 μ l of supernatant was taken and derivatisation was performed using 25 μ l of 5 mmol/l 2,4-dinitrophenylhydrazine. After 10 min in the dark, the solution was analysed using an HPLC system (Shimadzu, Japan).

In addition, the immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal (4-HNE) was employed as a complementary approach to myocardial lipoperoxidation assessment on transversal sections of the LV myocardium (two per each animal). Incubation with monoclonal 4-HNE antibody (Oxis International Inc., CA, U.S.A.; dilution 1:40) was performed overnight at 4°C. Secondary biotinylated donkey anti-mouse antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., PA, U.S.A.; dilution 1:500) was applied for 40 min at

room temperature. For visualization 3,3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride (DAB, Sigma-Aldrich, Czech Republic) was used. Sections were counterstained with Gill's haematoxylin.

Protein concentration determination

Protein concentrations in the analysed samples were determined using a BCA Assay Kit according to the manufacturer's protocol (Sigma-Aldrich, Czech Republic).

Data analysis

The statistical softwares SigmaStat 3.5 (SPSS Inc., IL, U.S.A.) and STATISTICA Cz (StatSoft, OK, U.S.A.) were used in this study. All data is expressed as mean \pm S.E.M. Statistical significance was determined using one-way ANOVA unpaired test or paired *t*-test. Correlation analyses were performed using Spearman's method and regression analysis. Two independent exploratory multivariate statistical methods (Hierarchical Tree Clustering and Principal Component Analysis) were employed to identify the natural groupings of individual animals in this study with respect to the following evaluated parameters – LV cardiac function parameters, cardiac troponins and markers of apoptosis and lipoperoxidation (comprising a total of 10 variables).

RESULTS

General toxicity

The general appearance and mortality of animals were recorded during the time course of the study. In the control group, no premature mortality was observed and body weights were significantly increased during the experiment as compared with the initial values (3.50 ± 0.03 versus 4.64 ± 0.13 kg; $P < 0.01$). On the other hand, DAU treatment resulted in premature death in two out of eleven animals (18%) and no change in body weights was observed in this group (3.45 ± 0.07 and 3.47 ± 0.23 kg, beginning versus end; n.s.). Furthermore, in prematurely dead animals, necropsy examination revealed marked signs of blood congestion – involving massive hydrothorax (approx. 60 ml) in both animals in addition to ascites (25 and 35 ml). In addition, in comparison with the control group, the heart to body weight ratio was found to be significantly increased in this group (2.82 ± 0.18 versus 2.15 ± 0.10 g/kg, respectively, $P < 0.05$).

In contrast to the DAU group, all DEX co-treated animals survived until the end of the study and their well-being was evidenced by a significant body weight increase during

the experiment (3.50 ± 0.07 and 3.99 ± 0.07 kg, beginning versus end; $P<0.01$). No hydrothorax or ascites were found in this group and also the heart to body weight ratio (2.55 ± 0.13 g/kg) showed no significant difference compared to the control group.

Left ventricular systolic function

Echocardiographically-determined fractional shortening revealed a progressive and significant decline in the LV systolic function in DAU-treated animals, starting by the 8th week (Figure 1A). In addition, impaired LV systolic performance was also found in this group by invasive contractility examination performed at the end of the study (Figure 1B). In contrast, animals receiving DEX before each DAU injection showed nearly the same systolic function as the controls, which was evident from the outcomes of both types of the LV systolic examination (Figure 1A and 1B).

Plasma concentrations of cardiac troponins

Repeated administration of DAU led to significant elevations of plasma levels of troponins T and I. Correspondingly, DEX-afforded cardioprotection was associated with significantly lower plasma levels of both cardiac biomarkers (Figure 2A and 2B).

Histological examination

Light microscopy examination of the LV myocardium of rabbits receiving DAU revealed profound focal toxic damage (Figure 3B). These changes comprised cellular degeneration with a mild to prominent loss of myofibrils and cytoplasmic vacuolisation. The advanced degenerative changes resulted in cell death of the non-programmed type. The affected cardiomyocytes were observed to undergo cellular swelling and gradual disintegration. Furthermore, whenever the dead cells formed larger foci their remnants were replaced by subsequent proliferation of fibrotic tissue that resulted in interstitial fibrosis. In sharp contrast, examination of samples obtained from both the control and the DEX+DAU groups revealed a comparable morphological picture, with only subtle differences observed (Figure 3A and 3C). Importantly, the degenerative changes resulting in cell death, conspicuous in the DAU group, were rarely seen in the DEX+DAU group.

TUNEL labelling and quantification of TUNEL-positive nuclei

Examination of the TUNEL-labelled LV tissue sections showed only few positive cells in the investigated areas within the control group (Figure 4A). However, the nuclear

TUNEL-positivity was significantly increased in the myocardium of DAU-treated animals (Figure 4B and 4D). The majority of TUNEL-positive nuclei were found in the cardiomyocytes which lacked any signs of typical degenerative changes, or these changes were present in their initial stages only. Unlike degenerative changes, the TUNEL-positivity did not show any regular pattern of appearance in the LV myocardium.

In the DEX+DAU group, the number of TUNEL-positive nuclei significantly declined to nearly the same values determined in the control animals (Figure 4C). The TUNEL-positive nuclei were found only in scattered isolated cells without any specific pattern. In addition, in individual animals, this parameter showed a significant correlation with LV systolic function (Figure 4E).

Caspase activity

Determination of the activity of all major caspases associated with apoptotic signalling showed triggering of multiple apoptotic pathways in the LV myocardium of the DAU-treated animals. As seen in Figure 5A, chronic ANT treatment resulted in a significant increase in the activity of the executive downstream caspases 3 and 7 in comparison with the control group. In addition, the activities of caspases 8, 9 and 12 were also found to be increased in the DAU group (Figures 5B-D). In the DEX co-treated animals, the activity of the executive caspases 3/7 was significantly lower than in the DAU alone group (Figure 5A). Furthermore, activation of all major upstream pathways (i.e. caspases 8, 9 and 12) was effectively prevented by DEX co-treatment. There were no significant differences in the activities of individual caspases between the control and the DEX+DAU group (Figures 5B-D). Interestingly, the activities of these caspases showed a significant and strong correlation with the LV systolic function (Figures 6A-D).

Myocardial lipoperoxidation analyses

Using a selective HPLC method, significantly increased levels of total malondialdehyde (MDA, a widely used marker of lipoperoxidation) were determined in the LV myocardium of the DAU-treated animals (Figure 7A). Surprisingly, DEX co-administration was not associated with a significant decrease of the MDA levels. The MDA levels in the DEX+DAU group remained significantly higher than in the controls and were close to the levels determined in the DAU alone group. Furthermore, the MDA levels showed only a poor correlation with caspase 3 activity (Figure 7B) and no significant correlation with the activities of caspases 8 and 9 (Figure 7C and 7D).

Interestingly, no association was also found between the myocardial MDA levels and the LV systolic function (Figure 7F).

Immunohistochemical detection of 4-HNE (another independent marker of lipoperoxidation) in the LV myocardium revealed markedly higher response in the samples obtained from daunorubicin-treated animals than in corresponding controls (Figure 8A and 8B). The 4-HNE signal was predominantly detected within the cardiomyocytes while interstitial cells showed poor immunoreactivity. The myocardium of dexrazoxane co-treated animals (Figure 8C) showed largely comparable 4-HNE signal intensity as in the DAU alone group. Although in some cases a moderate degree of reduction of 4-HNE signal could be found in the DEX+DAU group, it was clearly always very far from being complete. No distinct changes in the 4-HNE signal localisation could be found between the DAU and DEX+DAU groups.

Exploratory Data Analysis

Hierarchical Tree Clustering (Figure 9A) and Principal Component Analysis (Figure 9B) were used to identify natural groupings within the 27 individual animals in this study with respect to the index of their LV functions (FS and dP/dt_{max}), the plasma levels of cardiac troponins T and I, markers of apoptosis (TUNEL positivity and activities of caspases), and lipoperoxidation. Both exploratory data analysis approaches independently resulted in grouping of all examined animals into two well-separated clusters. In the first cluster (I), all animals from the control and the DEX+DAU groups were found, whereas the individuals from the DAU group were arranged into a second cluster (II). Almost all animals from the DAU group appeared in one cluster, with the exception of two animals (prematurely dead) associated with the most profound changes. In addition, this exploratory data analysis identified caspase activities as the parameters with the highest impact on the natural grouping of animals.

DISCUSSION

In this study, repeated chronic DAU administration resulted in increased mortality, which was accompanied by severe blood congestion and heart failure. Echocardiographically-determined fractional shortening revealed a progressive decline in the LV systolic function and this was further supported by an independent LV catheterization examination performed at the end of the experiment. Dexrazoxane (ICRF-187), administered before each DAU injection, was capable of fully protecting the animals

from both premature death and LV dysfunction. These findings illustrate the excellent cardioprotective potential of DEX and the overall result is well in line with the outcomes of preclinical studies and clinical trials (Cvetkovic & Scott, 2005).

Histological examination of the LV myocardium in the DAU-treated animals revealed profound focal damage. These advanced degenerative changes (mainly cytoplasmic vacuolisation and loss of myofibrils) evidently resulted in non-programmed cell death. Such cardiomyocytes showed cellular swelling and gradual disintegration. Importantly, DEX afforded very effective cardioprotection against these degenerative changes in a degree evidently comparable with previously published reports employing morphometric quantitation (Herman *et al*, 1981; Herman *et al*, 1985; Herman *et al*, 1994). At the same time, the plasma levels of both cardiac troponins T and I were found to be markedly increased. The troponin concentrations found in this study were indeed lower than those associated with acute ischemia-reperfusion injury or isoproterenol cardiotoxicity (Bertinchant *et al*, 2000). However, it should be taken into account that chronic anthracycline cardiotoxicity progresses very slowly (several weeks) and is typically of focal nature. Although the precise mechanism of troponin release into the blood stream has not yet been revealed, traditionally it is linked to necrotic death of the cardiomyocytes, when the integrity of the cytoplasmic membrane is compromised (Arbustini *et al*, 2008; Horenstein *et al*, 2000; Wallace *et al*, 2004). Hence, DEX administration provided nearly full protection of the myocytes from above-described advanced degenerative changes as well as from the rise of cardiac troponin plasma levels. Specifically, the above-stated processes suggest a rescue of the cardiomyocytes from non-programmed cell death which likely triggers the process of cardiac remodelling. These findings correspond well with the widely accepted concept of DEX-afforded cardioprotection (Herman *et al*, 1981; Van Vleet *et al*, 1980).

In addition to the "traditional" pathway of ANT-induced and ROS-mediated cardiomyocyte degeneration possibly resulting in non-programmed cell death, several lines of evidence have shown that apoptotic cell death may also be involved in anthracycline cardiotoxicity (Arola *et al*, 2000; Nakamura *et al*, 2000; Sawyer *et al*, 1999; Yamaoka *et al*, 2000). This is in contrast to very early reports, (Zhang *et al*, 1996). In good agreement with numerous recent reports, we have demonstrated that chronic ANT treatment leads to a significant increase in the number of TUNEL-positive nuclei in the LV myocardium along with an increased activity of the executive downstream caspases 3 and 7. Interestingly, both these parameters corresponded well with the LV systolic function in individual

animals. Previous studies have suggested in the main that either the intrinsic (i.e. mitochondrial, caspase 9-dependent) (Childs *et al*, 2002) or extrinsic (receptor-mediated, caspase 8-dependent) (Nakamura *et al*, 2000) pathways are pivotal in ANT-induced triggering of cardiomyocyte apoptosis. Our investigation demonstrated activation of both caspases 8 and 9, thereby suggesting a concomitant involvement of both previously reported pathways and/or crosstalk between them. In addition, we have shown for the first time that the recently described endoplasmic/sarcoplasmic reticulum (ER/SR) pathway (caspase 12-mediated) might also contribute to chronic ANT cardiotoxicity. So far, this pathway has been reported only at the *in vitro* level (Kim *et al*, 2006), or as a result of administration of a single high (supratherapeutic) dose of doxorubicin *in vivo* (Jang *et al*, 2004). Our present findings agree well with available data, as profound ultrastructural and functional effects on ER/SR have been reported after repeated administration of ANTs *in vivo* (Minotti *et al*, 2004).

Of note, in the present study we have observed that the signs of significant cell degeneration and nuclear TUNEL-positivity were only very rarely present in a single cardiomyocyte. Instead, although both these processes evidently co-existed in the LV myocardium as a whole, they typically affected different cardiomyocytes. We failed to find any regular pattern of distribution of the cells with TUNEL-positive nuclei within the LV myocardium. Generally, apoptosis appeared to play a less significant role within the foci of the cardiomyocytes exhibiting advanced degenerative changes. Though the advanced degenerative changes appeared to be more prominent in the animals with most profound cardiotoxicity, we cannot yet apportion the contribution of each of these processes to heart failure induced by anthracyclines. At this point, it should be stressed that whereas apoptosis is completely finished within several hours, the degenerative changes evidently progress relatively slowly, which hinders appropriate head to head comparison of real contribution of both processes to the clinical manifestation of the ANT cardiotoxicity.

Although there is evidently solid evidence for induction of apoptosis after exposure of the cardiac myocytes to ANTs, one of the important questions has remained hitherto unanswered: is modulation of apoptotic cell death involved in the remarkably effective cardioprotection afforded by DEX? Scanty data from the literature have suggested that this might be true, at least at the level of the isolated cardiomyocytes exposed acutely to ANTs (Sawyer *et al*, 1999). Nevertheless, in the present study we have demonstrated for the first time that DEX is able to significantly and nearly completely rescue the cardiomyocytes from ANT-induced apoptosis under clinically relevant chronic *in vivo* conditions.

Furthermore, the current investigation reveals that DEX prevents the ANT-induced activation of all major upstream (i.e. caspases 8, 9 and 12-dependent) pathways. Importantly, all the examined parameters of apoptosis showed a significant and strong correlation with the LV systolic function in individual animals. Indeed, the ability of DEX to prevent triggering of multiple apoptotic pathways may account for its high efficacy in the prevention of ANT-induced apoptotic cell death in the LV myocardium. Further information regarding the relationships between the apoptotic and other studied parameters was obtained from two independent exploratory data analyses. These revealed that DEX showed a clear tendency toward reduction of both apoptotic and non-apoptotic cell death. Of note, the activities of apoptotic caspases were determined to have the strongest impact on the natural grouping of individual animals which highlight apoptosis as an extremely important target for cardioprotective intervention with DEX. However, it should be stated that we can not draw any definitive conclusion regarding the relative importance of these cardioprotective pathways at this stage.

Although the present results convincingly demonstrate that DEX rescues the cardiac myocytes from the programmed and non-programmed cell death, the mechanisms responsible for these effects remain elusive. So far, the cardioprotective effects of DEX have been mostly attributed to its ring-opening hydrolysis product ADR-925 (Cvetkovic & Scott, 2005; Kwok & Richardson, 2000). This compound has been shown to displace iron from ANT-iron complexes and hence it has been assumed to prevent redox-cycling and production of extremely toxic hydroxyl radicals (Hasinoff *et al*, 1998b). Nevertheless, using the same experimental model, the degree of cardioprotection afforded by DEX in the present study was apparently much higher than that obtained previously with much stronger and selective aroylhydrazone iron chelators (Simunek *et al*, 2005b; Sterba *et al*, 2007a; Sterba *et al*, 2006). Furthermore, deferiprone, a novel clinically used cell permeable iron chelator, failed to afford any meaningful cardioprotection under identical conditions (Popelova *et al*, 2008). Hence, these data imply that the iron chelating properties of a compound are not the main determinants of its cardioprotective action.

ANT-induced formation of ROS is believed to induce a profound myocardial oxidative injury to most of the biomolecules in the LV myocardium and to phospholipids in particular (Keizer *et al*, 1990). Hence, we sought to determine whether DEX-afforded cardioprotection involves prevention of ROS-induced damage as a common denominator by means of total MDA measurement by HLPC in whole tissue extract prepared from LV myocardium. This analytical approach is free of the known drawbacks associated with the

older thiobarbituric acid-based methods (Esterbauer *et al*, 1991; Janero, 1990; Pilz *et al*, 2000). Using this method, we have found significantly increased levels of MDA in the LV myocardium of DAU-treated animals suggesting that oxidative damage was associated with the treatment. While this data is well in line with literature and traditional concepts (Doroshov *et al*, 1980; Sarvazyan, 1996; Zhou *et al*, 2001), the finding that DEX failed to overcome ANT-induced lipoperoxidation was highly novel and rather surprising. Of note, the analytical method employed herein has been previously shown to be capable to document reduction of lipoperoxidation provided by pharmacological cardioprotection using iron chelating agents (Simunek *et al*, 2007). Moreover, the similar results were also obtained using complementary immunohistochemical detection of 4-HNE as another marker of lipoperoxidation. These observations strikingly contrasted with the powerful cardioprotection afforded by DEX in these animals. In addition, the MDA levels showed only poor agreement with caspase 3/7 activity, and no correlation with the activities of main caspases of both extrinsic and intrinsic pathways (caspases 8 and 9) were found. Moreover, this marker of lipoperoxidation showed no relationship with the LV systolic function. We cannot exclude however, the fact that dexrazoxane-afforded protection against free radical injury may be primarily compartmentalized in origin, although the immunohistochemical analysis of 4-HNE did not suggest so. One also could expect that the protection afforded in any particular compartment should still be reflected in the total MDA levels, if in fact it is so crucial to the fate of the whole cell. Nevertheless, we did not observe any such trend in the present study. These findings strongly suggest that the excellent cardioprotection obtained with DEX is not primarily dependent on the protection from ANT-induced lipoperoxidation. On the other hand, we can not exclude that there is a compartment within the cell which might play a key role in ROS-dependent cardiotoxicity and dexrazoxane-afforded cardioprotection, although it has not a striking impact on overall lipoperoxidation.

Using isolated rat cardiomyocytes, we have previously shown that the chelator salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH) is able to afford significant, albeit only partial, protection from daunorubicin-induced cell death. However, this protective effect was not accompanied by any reduction of lipoperoxidation (Simunek *et al*, 2008). This finding contrasted with the results obtained with the same compound on the model of hydrogen peroxide induced oxidative stress (Simunek *et al*, 2005a; Simunek *et al*, 2007; Simunek *et al*, 2008). In this latter case the SIH-afforded protection of cardiomyocytes was markedly better and clearly oxidative stress-dependent. Furthermore, in another study,

DEX failed to mitigate doxorubicin-induced peroxidative damage to A549 human lung adenocarcinoma cells (Kaiserova *et al*, 2006).

Although further studies primarily designed to clarify this point deserve to be performed, at this stage we come to the inevitable conclusion that the role of DEX has less to do with its ROS-reduction capability. This might provide us an explanation for the failure of previous attempts to provide effective cardioprotection against ANT cardiotoxicity using a whole range of antioxidants (e.g. vitamin E, acetylcysteine, or flavonoids) in chronic experimental models (Bruynzeel *et al*, 2007b; Herman *et al*, 1985; Van Vleet *et al*, 1980) and randomized clinical trials (Bruynzeel *et al*, 2007a; Dresdale *et al*, 1982; Legha *et al*, 1982; Myers *et al*, 1983). From this point of view, our results further support the recent call for revisiting the classical “ROS and iron hypothesis” of ANT cardiotoxicity and DEX cardioprotection (Gianni *et al*, 2008).

Indeed, the data from the current study raises new questions about the actual mechanisms underlying the protective action of DEX against ANT cardiotoxicity. Firstly, it should be noted that unlike iron-chelating compounds studied previously (Popelova *et al*, 2008; Sterba *et al*, 2007a; Sterba *et al*, 2006), the putative active metabolite of DEX (ADR-925) is far from being a selective iron chelator. Due to this non-selectivity, it is plausible that intracellular chelation of other biologically important multivalent metal cations could participate in cardioprotective effects of DEX. Importantly, ANTs have been repeatedly shown to impair tightly regulated calcium homeostasis in the cardiac cells (Minotti *et al*, 2004; Wallace, 2007). We have previously shown that ANT-induced calcium overload can be prevented by DEX co-treatment (Simunek *et al*, 2005c). Furthermore, determination of caspase 12 activity in the present study suggested involvement of ER/SR stress which was preventable by DEX administration. In addition, others have reported that mitochondrial calcium overload and/or activation of calcium-dependent proteases are part of the key molecular mechanism of ANT cardiotoxicity development (Lim *et al*, 2004; Solem *et al*, 1994).

Besides the above-discussed hypotheses which consider DEX solely as a prodrug of the metal chelating agent ADR-925, some novel suggestions point at the importance of direct cardioprotective involvement of DEX (Hasinoff & Herman, 2007; Lyu *et al*, 2007). DEX is a known catalytic inhibitor of topoisomerase II and this action has also been considered as responsible for its anticancer effects. DEX binds directly to topoisomerase II and thereby locks the enzyme in a stable and closed clamp conformation around DNA (Roca *et al*, 1994). On the other hand, ANTs are also known to be topoisomerase II

poisons which act through stabilization of topoisomerase II-DNA covalent complexes resulting in DNA strand breaks (Minotti *et al*, 2004). It has been hypothesized that DEX, as a catalytic inhibitor, might have protective effects against topoisomerase II poisoning agents (Lyu *et al*, 2007).

In addition, there are reports indicating that the beta isoform of topoisomerase II is abundant in the post-mitotic myocardium (Wang, 2002) including mitochondria which are prominently targeted by ANT cardiotoxicity (Wallace, 2003; Wallace, 2007). A recent *in vitro* study performed on a H9c2 rat cardiomyoblast cell line has suggested that DEX-promoted inhibition of topoisomerase II beta may play a significant role in the cardioprotective action of the drug (Lyu *et al*, 2007). Another recent report dealing with a new DEX derivative (ICRF-161) has demonstrated that, unlike iron chelating properties, topoisomerase II inhibition might be of primary importance for effective cardioprotection under chronic *in vivo* conditions (Martin *et al*, 2008).

In conclusion, the present study shows for the first time that DEX-afforded cardioprotection against chronic ANT cardiotoxicity *in vivo* is based not only on the rescue of the cardiomyocytes from degenerative changes and non-programmed cell death, but also on rescue from programmed cell suicide – apoptosis of the ventricular myocytes. The ANT-induced apoptotic signalling appears to be very complex, but DEX was shown to block all the major apoptotic pathways. Clarification of the mechanisms responsible for the potent protective action of DEX against the apoptotic death of cardiac myocytes merits further study. Nevertheless, protection of cardiac myocytes does not appear to be primarily lipoperoxidation-dependent. These findings point out on apoptosis as a part of cardioprotective action of DEX and further underline the need for revisiting the traditional but potentially oversimplified “ROS and iron hypothesis” of ANT cardiotoxicity.

Acknowledgments

The authors thank Mrs. Ludmila Latýnová, Milada Hetešová, and Jana Kudrnáčová for their technical assistance and Professor Bohuslav Mánek for the kind review of English grammar. We also thank Catherine McGrath for reading the manuscript and helpful suggestions. This study was supported by Research Project No. MSM0021620820, the Grant of the Czech Science Foundation No. 305/09/0416 and the Grant from the Czech Society of Cardiology.

References

- Arbustini E, Brega A, Narula J (2008) Ultrastructural definition of apoptosis in heart failure. *Heart Fail Rev* 13: 121-35
- Arola OJ, Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM (2000) Acute doxorubicin cardiotoxicity involves cardiomyocyte apoptosis. *Cancer Res* 60: 1789-92
- Bertinchant JP, Robert E, Polge A, Marty-Double C, Fabbro-Peray P, Poirey S, Aya G, Juan JM, Ledermann B, de la Coussaye JE, Dauzat M (2000) Comparison of the diagnostic value of cardiac troponin I and T determinations for detecting early myocardial damage and the relationship with histological findings after isoprenaline-induced cardiac injury in rats. *Clin Chim Acta* 298: 13-28
- Billingham ME, Mason JW, Bristow MR, Daniels JR (1978) Anthracycline cardiomyopathy monitored by morphologic changes. *Cancer Treat Rep* 62: 865-72
- Bruynzeel AM, Niessen HW, Bronzwaer JG, van der Hoeven JJ, Berkhof J, Bast A, van der Vijgh WJ, van Groeningen CJ (2007a) The effect of monohydroxyethylrutoside on doxorubicin-induced cardiotoxicity in patients treated for metastatic cancer in a phase II study. *Br J Cancer* 97: 1084-9
- Bruynzeel AM, Vormer-Bonne S, Bast A, Niessen HW, van der Vijgh WJ (2007b) Long-term effects of 7-monohydroxyethylrutoside (monoHER) on DOX-induced cardiotoxicity in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 60: 509-14
- Childs AC, Phaneuf SL, Dirks AJ, Phillips T, Leeuwenburgh C (2002) Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome C release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2:Bax ratio. *Cancer Res* 62: 4592-8
- Cvetkovic RS, Scott LJ (2005) Dexrazoxane : a review of its use for cardioprotection during anthracycline chemotherapy. *Drugs* 65: 1005-24
- Doroshov JH, Locker GY, Myers CE (1980) Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites: alterations produced by doxorubicin. *J Clin Invest* 65: 128-35
- Dresdale AR, Barr LH, Bonow RO, Mathisen DJ, Myers CE, Schwartz DE, d'Angelo T, Rosenberg SA (1982) Prospective randomized study of the role of N-acetyl cysteine in reversing doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Am J Clin Oncol* 5: 657-63
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11: 81-128
- Ewer MS, Benjamin RS (2006) Doxorubicin Cardiotoxicity: Clinical Apect, Recognition, Monitoring, Treatment, and Prevention. In *Cancer and the Heart*, Ewer MS, Yeh E (eds), pp 9-32. Hamilton: BC Decker
- Gersl V, Hrdina R (1994) Noninvasive polygraphic cardiac changes in daunorubicin-induced cardiomyopathy in rabbits. *Sb Ved Pr Lek Fak Karlovy Univerzity Hradci Kralove* 37: 49-55
- Gianni L, Herman EH, Lipshultz SE, Minotti G, Sarvazyan N, Sawyer DB (2008) Anthracycline cardiotoxicity: from bench to bedside. *J Clin Oncol* 26: 3777-84
- Godfraind T (1984) Drug-induced cardioneclerosis. *Arch Toxicol Suppl* 7: 1-15
- Hasinoff BB, Herman EH (2007) Dexrazoxane: how it works in cardiac and tumor cells. Is it a prodrug or is it a drug? *Cardiovasc Toxicol* 7: 140-4
- Hasinoff BB, Kuschak TI, Fattman CL, Yalowich JC (1998) The one-ring open hydrolysis intermediates of the cardioprotective agent dexrazoxane (ICRF-187) do not inhibit the growth of Chinese hamster ovary cells or the catalytic activity of DNA topoisomerase II. *Anticancer Drugs* 9: 465-71

- Herman EH, Ferrans VJ, Jordan W, Ardalan B (1981) Reduction of chronic daunorubicin cardiotoxicity by ICRF-187 in rabbits. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 31: 85-97
- Herman EH, Ferrans VJ, Myers CE, Van Vleet JF (1985) Comparison of the effectiveness of (+/-)-1,2-bis(3,5-dioxopiperazinyl-1-yl)propane (ICRF-187) and N-acetylcysteine in preventing chronic doxorubicin cardiotoxicity in beagles. *Cancer Res* 45: 276-81
- Herman EH, Zhang J, Ferrans VJ (1994) Comparison of the protective effects of desferrioxamine and ICRF-187 against doxorubicin-induced toxicity in spontaneously hypertensive rats. *Cancer Chemother Pharmacol* 35: 93-100
- Horenstein MS, Vander Heide RS, L'Ecuyer TJ (2000) Molecular basis of anthracycline-induced cardiotoxicity and its prevention. *Mol Genet Metab* 71: 436-44
- Janero DR (1990) Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 9: 515-40
- Jang YM, Kendaiah S, Drew B, Phillips T, Selman C, Julian D, Leeuwenburgh C (2004) Doxorubicin treatment in vivo activates caspase-12 mediated cardiac apoptosis in both male and female rats. *FEBS Lett* 577: 483-90
- Jones RL, Swanton C, Ewer MS (2006) Anthracycline cardiotoxicity. *Expert Opin Drug Saf* 5: 791-809
- Kaiserova H, den Hartog GJ, Simunek T, Schroterova L, Kvasnickova E, Bast A (2006) Iron is not involved in oxidative stress-mediated cytotoxicity of doxorubicin and bleomycin. *Br J Pharmacol* 149: 920-30
- Keizer HG, Pinedo HM, Schuurhuis GJ, Joenje H (1990) Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmacol Ther* 47: 219-31
- Kim SJ, Park KM, Kim N, Yeom YI (2006) Doxorubicin prevents endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 339: 463-8
- Konorev EA, Vanamala S, Kalyanaraman B (2008) Differences in doxorubicin-induced apoptotic signaling in adult and immature cardiomyocytes. *Free Radic Biol Med* 45: 1723-8
- Kotamraju S, Kalivendi SV, Konorev E, Chitambar CR, Joseph J, Kalyanaraman B (2004) Oxidant-induced iron signaling in Doxorubicin-mediated apoptosis. *Methods Enzymol* 378: 362-82
- Kwok JC, Richardson DR (2000) The cardioprotective effect of the iron chelator dexrazoxane (ICRF-187) on anthracycline-mediated cardiotoxicity. *Redox Rep* 5: 317-24
- Legha SS, Wang YM, Mackay B, Ewer M, Hortobagyi GN, Benjamin RS, Ali MK (1982) Clinical and pharmacologic investigation of the effects of alpha-tocopherol on adriamycin cardiotoxicity. *Ann N Y Acad Sci* 393: 411-8
- Lewis W, Silver MD (2001) Adverse effects of drugs on the cardiovascular system. In *Cardiovascular Pathology*, Silver MD, Gotlieb AI, Schoen FJ (eds), pp 546-550. Philadelphia: Churchill Livingstone
- Lim CC, Zuppinger C, Guo X, Kuster GM, Helmes M, Eppenberger HM, Suter TM, Liao R, Sawyer DB (2004) Anthracyclines induce calpain-dependent titin proteolysis and necrosis in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 279: 8290-9
- Lyu YL, Kerrigan JE, Lin CP, Azarova AM, Tsai YC, Ban Y, Liu LF (2007) Topoisomerase IIbeta mediated DNA double-strand breaks: implications in doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dexrazoxane. *Cancer Res* 67: 8839-46
- Martin E, Thougard AV, Grauslund M, Jensen PB, Bjorkling F, Hasinoff BB, Tjornelund J, Sehested M, Jensen LH (2008) Evaluation of the topoisomerase II-inactive bisdioxopiperazine ICRF-161 as a protectant against doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Toxicology*

- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L (2004) Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 56: 185-229
- Myers C, Bonow R, Palmeri S, Jenkins J, Corden B, Locker G, Doroshow J, Epstein S (1983) A randomized controlled trial assessing the prevention of doxorubicin cardiomyopathy by N-acetylcysteine. *Semin Oncol* 10: 53-5
- Nakamura T, Ueda Y, Juan Y, Katsuda S, Takahashi H, Koh E (2000) Fas-mediated apoptosis in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats: In vivo study. *Circulation* 102: 572-8
- Pilz J, Meineke I, Gleiter CH (2000) Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 742: 315-25
- Popelova O, Sterba M, Simunek T, Mazurova Y, Guncova I, Hroch M, Adamcova M, Gersl V (2008) Deferiprone does not protect against chronic anthracycline cardiotoxicity in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 326: 259-69
- Roca J, Ishida R, Berger JM, Andoh T, Wang JC (1994) Antitumor bisdioxopiperazines inhibit yeast DNA topoisomerase II by trapping the enzyme in the form of a closed protein clamp. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 1781-5
- Sarvazyan N (1996) Visualization of doxorubicin-induced oxidative stress in isolated cardiac myocytes. *Am J Physiol* 271: H2079-85
- Sawyer DB, Fukazawa R, Arstall MA, Kelly RA (1999) Daunorubicin-induced apoptosis in rat cardiac myocytes is inhibited by dexrazoxane. *Circ Res* 84: 257-65
- Simunek T, Boer C, Bouwman RA, Vlasblom R, Versteilen AM, Sterba M, Gersl V, Hrdina R, Ponka P, de Lange JJ, Paulus WJ, Musters RJ (2005a) SIH--a novel lipophilic iron chelator--protects H9c2 cardiomyoblasts from oxidative stress-induced mitochondrial injury and cell death. *J Mol Cell Cardiol* 39: 345-54
- Simunek T, Kaiserova H, Sterba M, Popelova O, Adamcova M, Ponka P, Gersl V (2007) Study of protection by salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone against hydrogen peroxide- and anthracycline-induced toxicity to cardiac cells. *Circulation Research* 101: E72-E72
- Simunek T, Klimtova I, Kaplanova J, Mazurova Y, Adamcova M, Sterba M, Hrdina R, Gersl V (2004) Rabbit model for in vivo study of anthracycline-induced heart failure and for the evaluation of protective agents. *Eur J Heart Fail* 6: 377-87
- Simunek T, Klimtova I, Kaplanova J, Sterba M, Mazurova Y, Adamcova M, Hrdina R, Gersl V, Ponka P (2005b) Study of daunorubicin cardiotoxicity prevention with pyridoxal isonicotinoyl hydrazone in rabbits. *Pharmacol Res* 51: 223-31
- Simunek T, Sterba M, Holeckova M, Kaplanova J, Klimtova I, Adamcova M, Gersl V, Hrdina R (2005c) Myocardial content of selected elements in experimental anthracycline-induced cardiomyopathy in rabbits. *Biometals* 18: 163-9
- Simunek T, Sterba M, Popelova O, Kaiserova H, Adamcova M, Hroch M, Haskova P, Ponka P, Gersl V (2008) Anthracycline toxicity to cardiomyocytes or cancer cells is differently affected by iron chelation with salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone. *Br J Pharmacol* 155: 138-48
- Solem LE, Henry TR, Wallace KB (1994) Disruption of mitochondrial calcium homeostasis following chronic doxorubicin administration. *Toxicol Appl Pharmacol* 129: 214-22
- Sterba M, Popelova O, Simunek T, Mazurova Y, Potacova A, Adamcova M, Guncova I, Kaiserova H, Palicka V, Ponka P, Gersl V (2007) Iron chelation-afforded cardioprotection against chronic anthracycline cardiotoxicity: a study of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH). *Toxicology* 235: 150-66
- Sterba M, Popelova O, Simunek T, Mazurova Y, Potacova A, Adamcova M, Kaiserova H, Ponka

-
- P, Gersl V (2006) Cardioprotective effects of a novel iron chelator, pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone, in the rabbit model of daunorubicin-induced cardiotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 319: 1336-47
- Van Vleet JF, Ferrans VJ, Weirich WE (1980) Cardiac disease induced by chronic adriamycin administration in dogs and an evaluation of vitamin E and selenium as cardioprotectants. *Am J Pathol* 99: 13-42
- Von Hoff DD, Layard MW, Basa P, Davis HL, Jr., Von Hoff AL, Rozenzweig M, Muggia FM (1979) Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. *Ann Intern Med* 91: 710-7
- Wallace KB (2003) Doxorubicin-induced cardiac mitochondrionopathy. *Pharmacol Toxicol* 93: 105-15
- Wallace KB (2007) Adriamycin-induced interference with cardiac mitochondrial calcium homeostasis. *Cardiovasc Toxicol* 7: 101-7
- Wallace KB, Hausner E, Herman E, Holt GD, MacGregor JT, Metz AL, Murphy E, Rosenblum IY, Sistare FD, York MJ (2004) Serum troponins as biomarkers of drug-induced cardiac toxicity. *Toxicol Pathol* 32: 106-21
- Wang JC (2002) Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 430-40
- Wouters KA, Kremer LC, Miller TL, Herman EH, Lipshultz SE (2005) Protecting against anthracycline-induced myocardial damage: a review of the most promising strategies. *Br J Haematol* 131: 561-78
- Yamaoka M, Yamaguchi S, Suzuki T, Okuyama M, Nitobe J, Nakamura N, Mitsui Y, Tomoike H (2000) Apoptosis in rat cardiac myocytes induced by Fas ligand: priming for Fas-mediated apoptosis with doxorubicin. *J Mol Cell Cardiol* 32: 881-9
- Zhang J, Clark JR, Jr., Herman EH, Ferrans VJ (1996) Doxorubicin-induced apoptosis in spontaneously hypertensive rats: differential effects in heart, kidney and intestine, and inhibition by ICRF-187. *J Mol Cell Cardiol* 28: 1931-43
- Zhou S, Palmeira CM, Wallace KB (2001) Doxorubicin-induced persistent oxidative stress to cardiac myocytes. *Toxicol Lett* 121: 151-7

FIGURE LEGENDS

Figure 1 (A) Echocardiographically determined left ventricular (LV) fractional shortening (FS) during the time course of experiment. (B) Invasively determined index of LV contractility (index dP/dt_{max}) at the end of the experiment. Statistical significance in comparison with: "*" the initial values within each group (paired t-test, $P < 0.05$), "c" control, "d" daunorubicin and "x" DEX+DAU groups (ANOVA, $P < 0.05$).

Figure 2 (A) Plasma concentrations of cardiac troponin T (cTnT) and (B) troponin I (cTnI) at the end of the experiment.

Figure 3 (A-C) Histological examination of the left ventricular (LV) myocardium. Masson's blue trichrome; bar=20 μ m. In the control group (A), normal structure of the myocardium was observed. In the DAU group (B), foci of cardiomyocytes showing profound degeneration (asterisks) were found. Marked morphological changes comprise cytoplasmic vacuolisation, cell swelling and loss of myofibrils resulting in cell death with subsequent development of interstitial fibrosis (arrow). The LV myocardium of DEX co-treated animals (C) showed largely preserved normal morphology with only subtle changes; signs of cardiomyocyte degeneration were scarce (asterisk).

Figure 4 TUNEL assay. (A-C) Representative samples of left ventricular (LV) myocardium labelled with TUNEL in the control (A), DAU (B), and DEX+DAU (C) groups. The arrows indicate examples of TUNEL-positive nuclei. Bar=20 μ m. (D) Quantitative analysis of TUNEL assay. Statistical significance (ANOVA, $P < 0.05$) in comparison with "d" daunorubicin group. (E) Scatterplot of the LV fractional shortening versus number of TUNEL-positive nuclei per square mm and results of the Spearman correlation analyses.

Figure 5 (A-D) Caspase activities in the left ventricular (LV) myocardium: caspase 3/7 (A), caspase 8 (B), caspase 9 (C), and caspase 12 (D). Statistical significances (ANOVA, $P < 0.05$) in comparison with "d" daunorubicin group.

Figure 6 (A-D) Scatterplots of the cardiac function (LV fractional shortening - FS) versus activity of individual caspases as determined by Spearman correlation analyses: caspases 3/7 (A), caspase 8 (B), caspase 9 (C), and caspase 12 (D). LU - luminescence units, FU -

fluorescence units.

Figure 7 (A) Total malondialdehyde (MDA - marker of lipoperoxidation) levels in LV myocardium. Statistical significances (ANOVA, $P < 0.05$) in comparison with “c” control group. (B-E) Scatterplots of MDA levels in the left ventricular myocardium versus activity of individual caspases and results of the Spearman correlation analyses: caspases 3/7 (B), caspase 8 (C), caspase 9 (D), and caspase 12 (E). (F) Scatterplot of myocardial MDA levels versus LV fractional shortening (FS) and results of the Spearman correlation analyses. LU - luminescence units, FU - fluorescence units.

Figure 8 Representative samples of left ventricular (LV) myocardium showing 4-hydroxynonenal staining in the control (A), DAU (B), and DEX+DAU (C) groups.

Figure 9 (A) Horizontal Hierarchical Tree Plot. The analysis comprised LV functional parameters (FS and dP/dt_{max}), the plasma levels of cardiac troponins T and I, markers of apoptosis (TUNEL positivity and activities of caspases), and lipoperoxidation (9 variables) in all experimental groups. The analysis resulted in two main clusters. The first cluster covers exclusively the individuals from the control (C) and DEX co-treated group (DD), whereas the second cluster contains only the animals from the daunorubicin group (D), where almost all animals appeared in one cluster. (B) Principal Component Analysis (PCA) scatterplots. This analysis of the same variables also revealed two distinctly separated clusters comprising the DEX+DAU and control groups in the first, with all animals from the DAU group in the second cluster. Treatment groups: control (Δ), DAU (\blacktriangle), and DEX+DAU (\square).

Figure 1

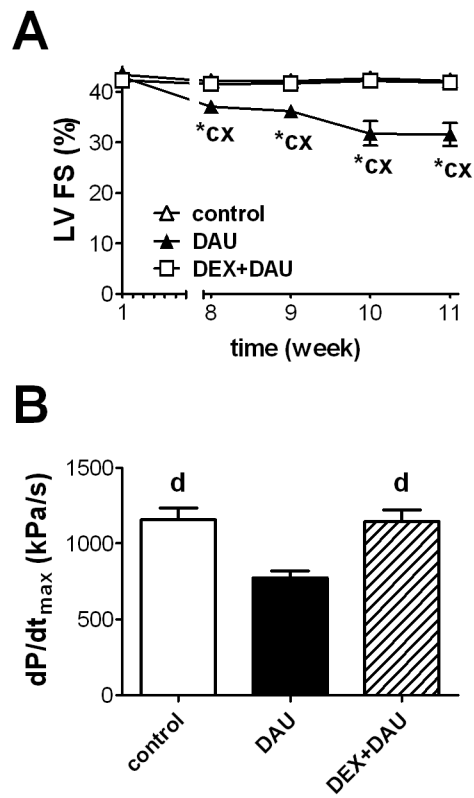


Figure 2

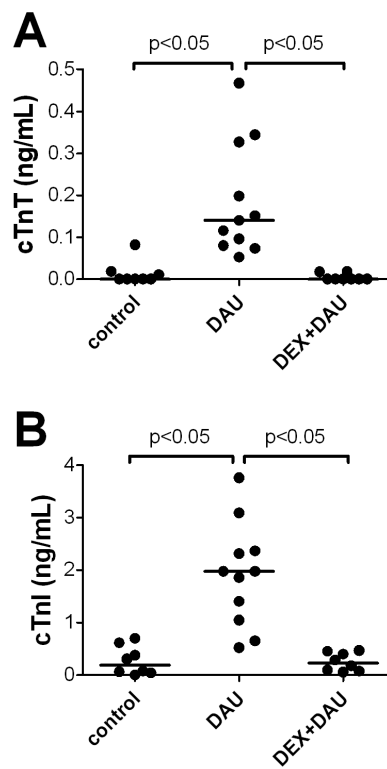


Figure 3

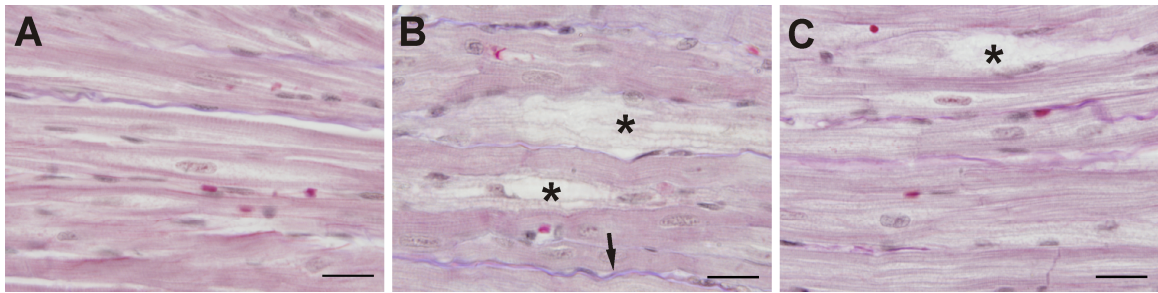


Figure 4

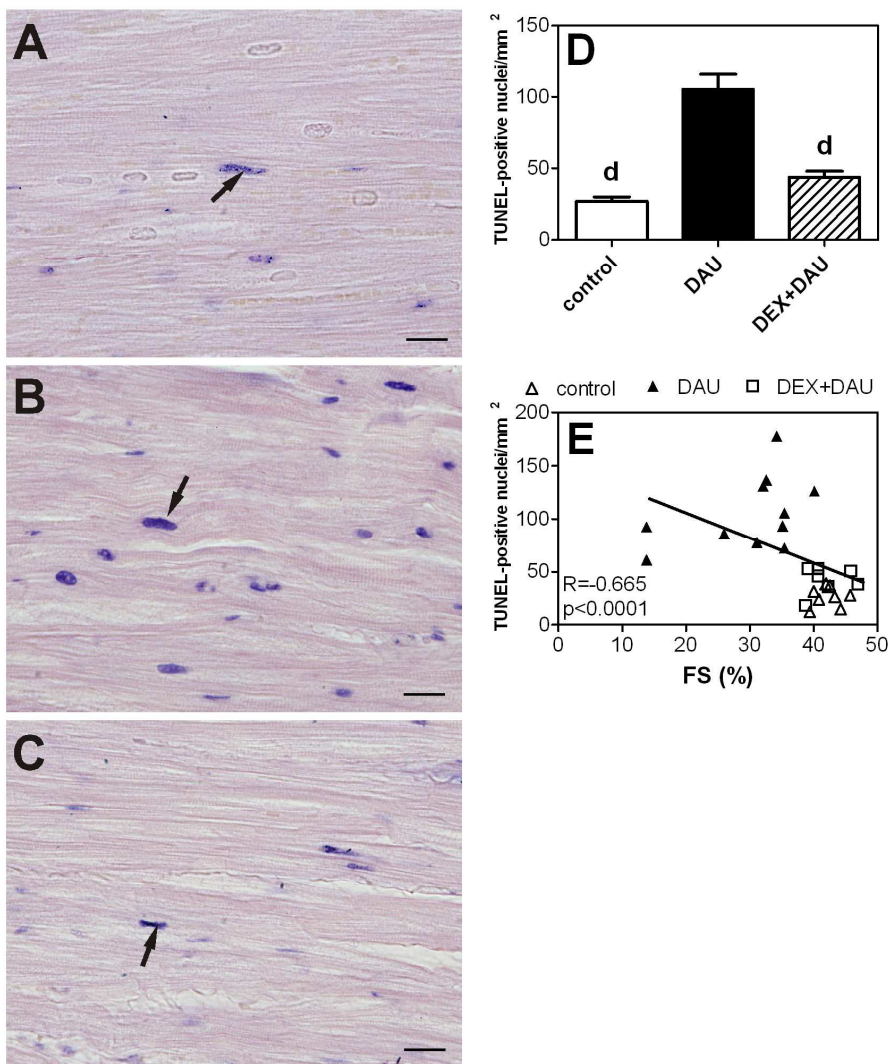


Figure 5

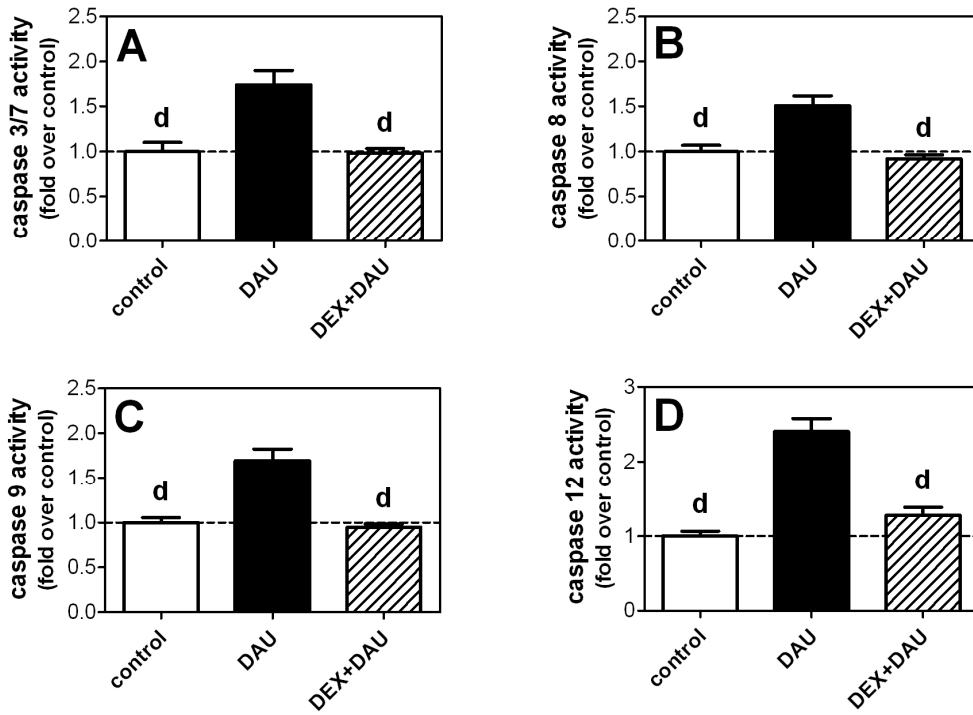


Figure 6

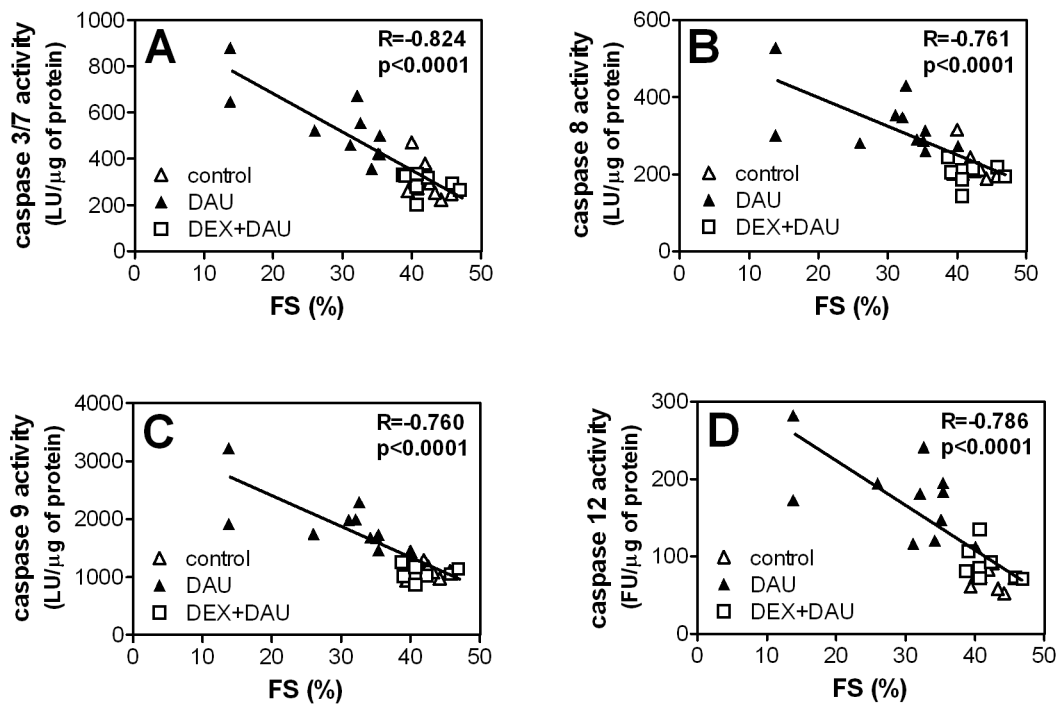


Figure 7

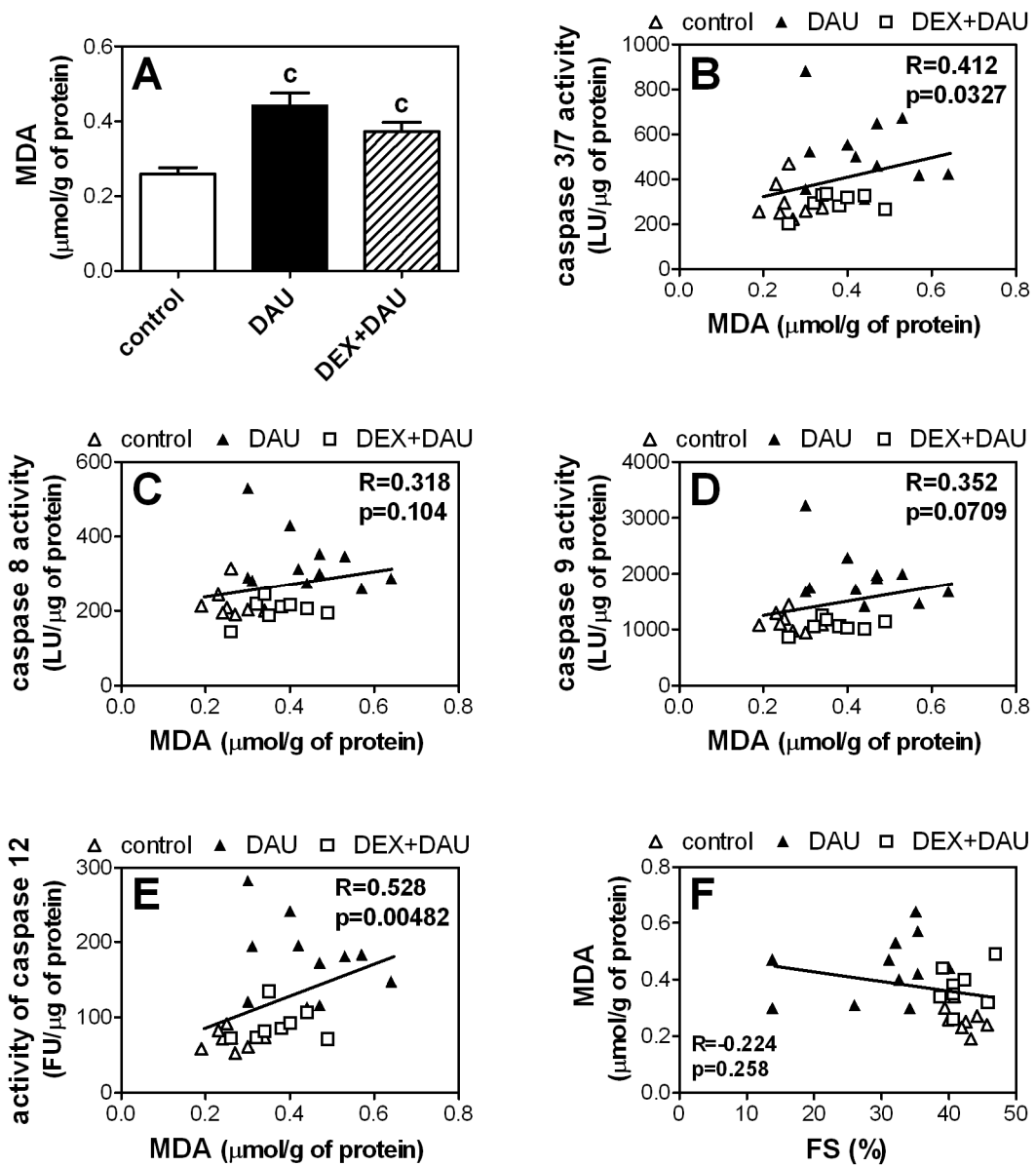


Figure 8

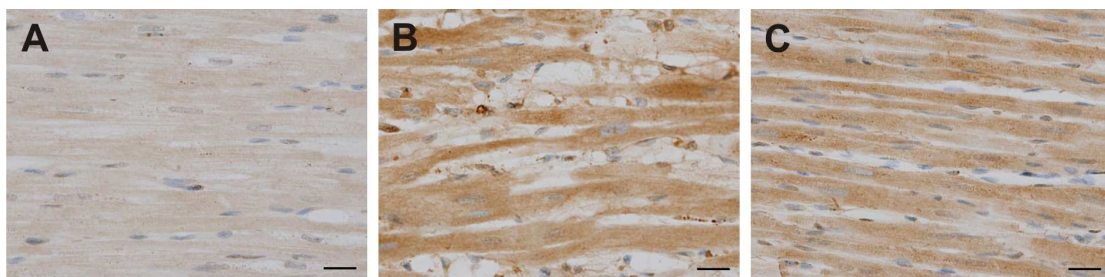


Figure 9

