

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové

Doktorský studijní program
Lékařská farmakologie

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

**Cardiotoxicity of anthracycline antineoplastic drugs and
possibilities of pharmacological cardioprotection**

Mgr. Eduard Jirkovský

Školitel: Doc. PharmDr. Martin Štěrba, PhD.

Hradec Králové, 2013

Obhajoba dne:.....

Prohlášení

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou dizertační práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

Mgr. Edaurd Jirkovský

V Hradci Králové, 10. 10. 2013.

Poděkování

Děkuji v první řadě svému školiteli **doc. PharmDr. Martinu Štěrbovi, PhD.** za odborné vedení, cenné rady a podněty v průběhu celého doktorského studia a za významnou pomoc při vypracování této práce. Dále bych chtěl poděkovat za výbornou kolektivní spolupráci a podporu členům naší výzkumné skupiny, jmenovitě **PharmDr. Olze Lenčové, PhD., prof. MUDr. Vladimíru Geršlovi, CSc., PhD., doc. MUDr. Michaele Adamcové, CSc., PhD., doc. MUDr. Yvonně Mazurové, CSc., Bc. Kláře Lindrové,** jakož i dalším spolupracovníkům z Lékařské fakulty v Hradci Králové – zejména **Ing. Miloši Hrochovi, PhD., Mgr. Pavle Staňkové, PhD., prof. MUDr. Zuzaně Červinkové, CSc., RNDr. Ivaně Němečkové, PhD. a pracovnícím vivária při Lékařské fakultě v Hradci Králové.** Mé poděkování nejen za odbornou spolupráci patří též kolegům z Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, jmenovitě **doc. PharmDr. Tomáši Šimůnkovi, PhD.** a **Mgr. Anně Jirkovské, PhD.** V neposlední řadě děkuji všem dalším spolupracovníkům a kolegům, zejména kolektivu **Ústavu farmakologie Lékařské fakulty v Hradci Králové** za všestrannou pomoc a vytvoření příjemného pracovního prostředí. Velké poděkování patří i mé rodině, mé milující manželce Anně a přátelům za jejich bezmeznou pomoc a podporu v průběhu celého studia.

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

Obsah	
1	Úvod8
1.1	<i>ANTRACYKLINOVÁ ANTINEOPLASTIKA</i>9
1.1.1	Základní charakteristika antracyklinových antibiotik9
1.1.2	Použití antracyklinových antibiotik v protinádorové léčbě10
1.1.3	Farmakokinetika11
1.1.4	Farmakodynamika13
1.1.5	Nežádoucí účinky antracyklinů14
1.2	<i>ANTRACYKLINOVÁ KARDIOTOXICITA</i>14
1.2.1	Akutní formy antracyklinové kardiotoxicity15
1.2.2	Chronické formy antracyklinové kardiotoxicity16
1.2.3	Rizikové faktory rozvoje chronické antracyklinové kardiotoxicity17
1.2.4	Mechanismy vzniku chronické antracyklinové kardiotoxicity17
1.2.4.1	<i>Poškození srdce volnými radikály</i>18
1.2.4.2	<i>Aktivace Nrf2 kaskády a možný vztah k antracyklinové kardiotoxicitě</i>20
1.2.4.3	<i>Poškození mitochondrií antracykliny</i>21
1.2.4.4	<i>Mitochondriální biogeneze a její možný vztah k antracyklinové kardiotoxicitě</i>22
1.2.4.5	<i>Porucha homeostázy vápníku v kardiomyocytech</i>23
1.2.4.6	<i>Poškození myokardu alkoholovými metabolity antracyklinů</i>25
1.2.4.7	<i>Ovlivnění topoizomerázy II antracykliny</i>25
1.2.4.8	<i>Indukce programované buněčné smrti</i>25
1.2.4.9	<i>Další diskutované mechanismy</i>26
1.3	<i>MOŽNOSTI OCHRANY MYOKARDU PŘED ANTRACYKLINOVOU KARDIOTOXICITOU</i>26
1.3.1	Omezení kumulativní dávky a dalších rizikových faktorů27
1.3.2	Použití antracyklinových derivátů s nižší kardiotoxicitou27
1.3.3	Použití terapeutických systémů s cílenou distribucí léčiva27
1.4	<i>FARMAKOLOGICKÁ KARDIOPROTEKCE ANTRACYKLINOVÉ KARDIOTOXICITY</i>28
1.4.1	Dexrazoxan28
1.4.1.1	<i>Farmakokinetika dexrazoxanu</i>29
1.4.1.2	<i>Mechanismus kardioprotektivního účinku dexrazoxanu</i>29
1.4.1.3	<i>Chelatace iontů železa aktivním metabolitem dexrazoxanu</i>30
1.4.1.4	<i>Reverzibilní inhibice topoizomerázy II</i>30
1.4.1.5	<i>Hodnocení kardioprotektivního účinku dexrazoxanu v experimentálních podmínkách</i>31
1.4.1.6	<i>Hodnocení kardioprotektivního účinku v klinických studiích</i>32
1.4.1.7	<i>Riziko negativního ovlivnění protinádorové léčby při použití dexrazoxanu</i>33
1.4.1.8	<i>Riziko vzniku sekundárních malignit při použití dexrazoxanu</i>34
1.4.1.9	<i>Nežádoucí účinky dexrazoxanu</i>34
1.4.1.10	<i>Užití dexrazoxanu v současné klinické praxi</i>35
1.4.2	<i>Antioxidanty a zhaséče volných kyslíkových radikálů jako kardioprotektiva</i>36
1.4.3	<i>Selektivní chelátory železa</i>38
1.4.4	<i>Beta-blokátory</i>39
1.4.5	<i>Anorganické dusičnany/dusitany</i>40
1.4.6	<i>ACE-inhibitory</i>40
1.4.7	<i>Ostatní látky</i>41
2	CÍLE PRÁCE42
3	PŘEHLED POUŽITÝCH METOD44
4	VÝSLEDKY59
4.1	<i>STUDIUM POŠKOZENÍ SRDCE VYVOLANÉ CHRONICKOU ANTRACYKLINOVOU KARDIOTOXICITOU A JEHO DALŠÍ VÝVOJ PO UKONČENÍ EXPOZICE CYTOSTATIKEM (FOLLOW UP)</i>60
4.1.1	<i>Hodnocení celkové toxicity</i>60
4.1.2	<i>Hodnocení srdeční funkce</i>61
4.1.3	<i>Hodnocení plazmatických koncentrací srdečního troponinu T</i>62

4.1.4	Hodnocení oxidačního stresu a antioxidační ochrany v myokardu levé komory.....	63
4.1.5	Hodnocení mitochondriálního poškození a respirační aktivity.....	67
4.1.6	Hodnocení mitochondriální biogeneze	69
4.2	<i>STUDIUM KARDIOPROTEKTIVNÍHO ÚČINKU DEXRAZOXANU VŮČI CHRONICKÉ ANTRACYKLINOVÉ KARDIOTOXICITĚ PŘI JEHO PODÁNÍ S KAŽDOU DÁVKOU CYTOSTATIKA A PŘI ODLOŽENÉM PODÁNÍ DLE SOUČASNÝCH KLINICKÝCH DOPORUČENÍ</i>	<i>73</i>
4.2.1	Hodnocení celkové toxicity.....	73
4.2.2	Hodnocení funkce levé komory	74
4.2.3	Hodnocení plazmatických koncentrací srdečního troponinu T	75
4.2.4	Histopatologické vyšetření myokardu levé komory.....	77
4.2.5	Hodnocení oxidačního poškození a antioxidační ochrany v myokardu levé komory.....	79
4.2.6	Hodnocení exprese genů spojených s aktivitou hemoxygenázy 1	81
4.2.7	Hodnocení mitochondriálního poškození a procesu mitochondriální biogeneze.....	84
4.2.8	Hodnocení poškození mitochondriální DNA.....	87
5	DISKUZE	89
6	ZÁVĚRY	109
7	SOUHRN	112
8	SUMMARY.....	115
9	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	118
10	PŘÍLOHA I	141
11	PŘÍLOHA II.....	143
12	PŘÍLOHA III	155

Seznam použitých zkratk

ALAS1	γ -aminolevulátsyntáza 1
ARE	<i>Antioxidant Response Elements</i>
ANT	antracyklinová antibiotika
ANT1	adeninnukleotidtranslokáza 1
BVR A	biliverdinreduktáza A
COX	cytochrom-c-oxidáza
COX1	mtDNA kódovaná podjednotka komplexu IV dýchacího řetězce
COX4A1	nDNA kódovaná podjednotka komplexu IV dýchacího řetězce
cTnT	plazmatické koncentrace srdečního troponinu T
CuZnSOD	cytosolická forma superoxiddismutázy
DAU	daunorubicin
DEX	dexrazoxan
DOX	doxorubicin
dP/dt _{max}	index kontraktility levé komory získaný katetrizačním vyšetřením
dP/dt _{min}	index relaxace levé komory získaný katetrizačním vyšetřením
EPI	epirubicin
FTL	lehké řetězce feritinu
FU	<i>follow up</i> – období následného sledování po ukončení expozice cytostatikem
GLCC	katalytická podjednotka γ -glutamylcysteinligázy
GPx	glutathionperoxidáza
GR	glutathionreduktáza
GSH	redukováná forma glutathionu
GSSG	oxidovaná forma glutathionu
GST	glutathion-S-transferáza
HIF1 α	<i>hypoxia inducible factor 1α</i>
HO1	hemoxygenáza 1
IDA	idarubicin
KEAP	<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
LK	levá komora
LVFS	frakční zkrácení levé komory
LVEDD	rozměr levé komory na konci diastoly
LVESD	rozměr levé komory na konci systoly

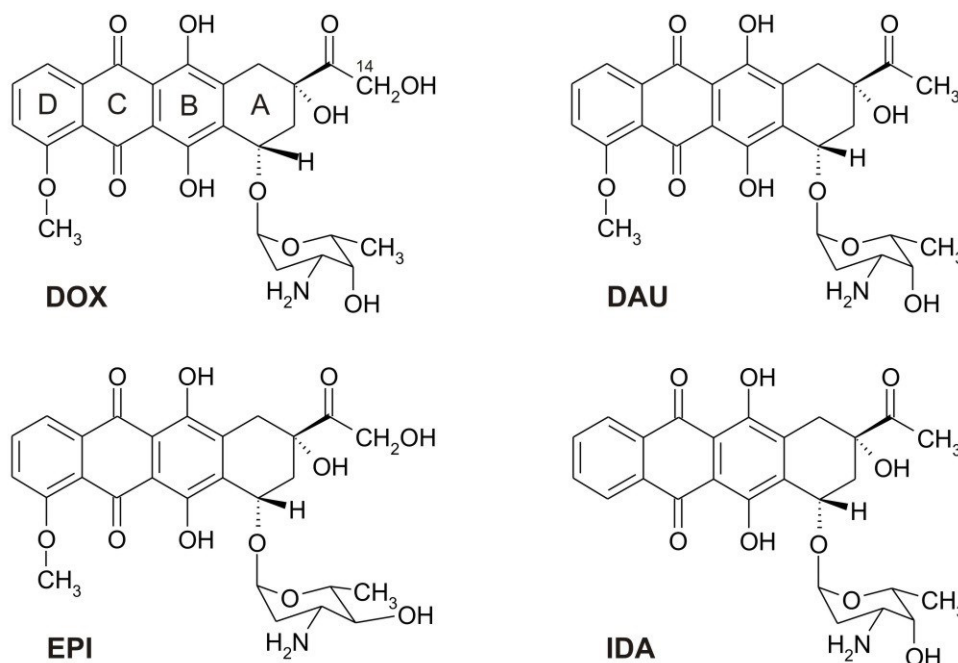
MDA	malondialdehyd
MDR	<i>multiple drug resistance</i> protein
MnSOD	mitochondriální forma superoxiddismutázy
monoHER	7-monohydroxyethyl-rutosidu
mtDNA	mitochondriální deoxyribonukleová kyselina
ND1	mtDNA kódovaná podjednotka komplexu I dýchacího řetězce
ND4	mtDNA kódovaná podjednotka komplexu I dýchacího řetězce
nDNA	nukleární deoxyribonukleová kyselina
NDUFS2	nDNA kódovaná podjednotka komplexu I dýchacího řetězce
NOX	NADPH-oxidáza
NQO1	NAD(P)H:chinonoxidoreduktáza 1
Nrf2	<i>Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i>
NRF1 a 2	nukleární respirační faktor 1 a 2
o-108	pyridoxal 2-chlorbenzyoylhydrazon
OXPHOS	system oxidační fosforylace
PGC1 α	PPAR γ koaktivátor 1 α
PIH	pyridoxal 2-chlorbenzyoylhydrazon
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PRDX3	peroxiredoxin 3
ROS	reaktivní formy kyslíku
RNS	reaktivní formy dusíku
SERCA2a	<i>sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 2a</i>
SHR	spontánně hypertenzní potkan
SIH	salicylaldehydisonikotinoylhydrazonu
SOD	superoxiddismutáza
TFAM	mitochondriální transkripční faktor A
Top2 α a β	topoizomeráza II – izoformy α a β

1 ÚVOD

1.1 Antracyklinová antineoplastika

1.1.1 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA ANTRACYKLINOVÝCH ANTIBIOTIK

Antracyklinová antibiotika (ANT) byla objevena již na počátku 60. let minulého století a stále představují nepostradatelnou součást moderní protinádorové terapie zejména díky své vysoké protinádorové účinnosti a širší indikačního spektra (Klener a Klener 2010; Sawyer 2013). První klinicky používaný zástupce antracyklinových antibiotik, **daunorubicin** (synonyma rubidomycin, daunomycin; Obr. 1 - DAU) byl izolován z hub rodu *Streptomyces peuceticus* a *Streptomyces ceruleoribidus* v roce 1962. Dalším zástupcem je **doxorubicin** (synonymum adriamycin; Obr. 1 - DOX), který byl prvně izolován ze *Streptomyces peuceticus* var. *caesius* v roce 1969 a spolu s DAU se řadí mezi ANT první generace. Ačkoliv bylo v následujících letech izolováno nebo semisyntetickými postupy připraveno několik tisíc dalších antracyklinových derivátů, v klinické praxi se následně uplatnilo pouze několik látek - zejména **epirubicin** (Obr. 1 - EPI) a **idarubicin** (Obr. 1 - IDA), tzv. druhá generace ANT. Mezi ANT třetí generace se řadí **amrubicin**, **pirarubicin** a **valrubicin**, které však mají v klinické praxi pouze omezené uplatnění, stejně jako látka příbuzná ANT- **mitoxantron** (Minotti a kol. 2004; Piekarski a Jelińska 2013).



Obr. 1 Chemická struktura nejvýznamnějších antracyklinových antineoplastik. DOX - doxorubicin, DAU - daunorubicin, EPI - epirubicin, IDA - idarubicin.

Pro všechny molekuly ANT je charakteristická glykosidická struktura tvořená planárním tetracyklickým aglykonem, krátkým postranním řetězcem s karbonylovou skupinou a glykosidicky vázaným aminocukrem, tzv. daunosaminem. Obměnou základní struktury (byť i nepatrnou) lze dosáhnout významných rozdílů ve farmakokinetice a zejména ve spektru protinádorové účinnosti, jak lze dokumentovat u zástupců první a druhé generace ANT. Novější deriváty ANT (třetí generace) mají již strukturu více obměněnou, nejčastěji na molekule daunosaminu nebo na postranním řetězci. Antracykliny jsou poměrně lipofilní látky, ovšem za fyziologického pH mají spíše amfifilní charakter díky kladnému náboji na primárním aminu daunosaminu (Regev a kol. 2005). Mitoxantron nepatří mezi ANT, ale je tradičně s nimi zmiňován vzhledem k podobnosti v chemické struktuře i toxicitě. Mitoxantron je antracendionový derivát, který na rozdíl od ANT postrádá glykosidicky vázaný aminocukr.

1.1.2 POUŽITÍ ANTRACYKLINOVÝCH ANTIBIOTIK V PROTINÁDOROVÉ LÉČBĚ

Přestože ANT byly uvedeny do klinické praxe téměř před půl stoletím, jejich pozice v moderní onkologické léčbě je navzdory možným rizikům stále poměrně pevná (Cortés-Funes a Coronado 2007; Piekarski a Jelińska 2013; Suter a Ewer 2013). Spíše než jejich postupné vytlačování z klinické praxe lze pozorovat trend k jejich kombinování s moderní cílenou onkologickou léčbou pro zvýšení protinádorové odpovědi.

Daunorubicin má protinádorové spektrum relativně úzké, které je zaměřené zejména na hematologické malignity. Klinické užití DAU je omezeno na kombinační terapii akutní myeloblastické a lymfoblastické leukémie (SPC Daunoblastina 2006). Protože dostupnost léčivých přípravků s DAU je nyní v řadě zemí omezená (v současnosti není v ČR registrován), v klinické praxi je postupně nahrazován IDA (Ferrara a Schiffer 2013; Trifilio a kol. 2013). Liposomální formu DAU je možné použít k léčbě Kaposiho sarkomu u pacientů s AIDS (SPC Daunoxome 2013).

Ačkoliv se **doxorubicin** (14-hydroxydaunorubicin) liší od DAU pouze přítomností jedné hydroxylové skupiny na postranním řetězci, tento rozdíl má zásadní vliv na šíři protinádorového spektra. Kromě kombinační terapie hematologických malignit (akutních i chronických leukémií, mnohočetného myelomu, Hodgkinových a non-Hodgkinových lymfomů) je možné DOX použít i v kombinaci při léčbě řady solidních nádorů (např. karcinomu prsu, dělohy, či sarkomy měkkých tkání) (SPC Adriblastina 2009, Vyzula 2013).

Epirubicin (4'-epidoxorubicin) představuje nejvýznamnějšího zástupce derivátů klasických ANT. Jedná se o stereoizomer DOX lišící se pouhým postavením hydroxylové skupiny na molekule daunosaminu v poloze 4'. Protinádorové spektrum účinku EPI je obdobné jako u DOX (SPC Farmorubicin 2009).

Idarubicin (4-demethoxydaunorubicin) se liší od DAU pouze absencí 4-methoxy skupiny na kruhu D, což vedlo ke zvýšení lipofility molekuly umožňující orální podávání léčiva a lepší distribuci v organismu. Spektrum jeho protinádorového účinku odpovídá DAU, který též poslední dobou nahrazuje v léčbě akutních leukémií (SPC Zavedos 2012). Perorální lékové formy byly zkoušeny např. v rámci kombinační terapie mnohočetného myelomu (Auel a kol. 2012), non-Hodgkinových lymfomů (Taylor a kol. 2006) a pokročilého karcinomu prsu (Findlay a kol. 2008), v současnosti ale nejsou v ČR registrovány.

Klinické využití derivátů třetí generace je minoritní, zejména kvůli vyššímu výskytu extrakardiálních nežádoucích účinků a oproti zástupcům 1. a 2. generace mají velmi specifické uplatnění. **Valrubicin** je schválený FDA k léčbě pokročilého karcinomu močového měchýře, kdy je aplikovaný lokálně intravezikálně a vykazuje oproti DOX a EPI rychlejší přestup do nádorových buněk díky lipofilnějším substituentům (Onrust a Lamb 1999, SPC Valstar 2011). **Pirarubicin** je ve fázi klinického hodnocení v indikacích jako jsou karcinom prsu (Li a kol. 2011), mnohočetný myelom nebo enteropatický T-lymfom (EATL) (Clinical Trials Search 2013). **Amrubicin** je registrovaný v Japonsku jako součást chemoterapie při malobuněčném a nemalobuněčném karcinomu plic (Kurata a kol. 2007) a v současné době postupuje v USA druhou fázi klinického zkoušení (Ettinger a kol. 2010).

Mitoxantron je nyní využíván zejména k léčbě roztroušené sklerózy, ale lze ho použít i v kombinační terapii pokročilých stádií rakoviny prostaty, maligních lymfomů, akutních nelymfocytárních forem leukémie u dospělých a metastazujícího prsního karcinomu; tato látka však již není v ČR registrována (SPC Novantrone 2012, Vyzula 2013).

1.1.3 FARMAKOKINETIKA

Antracykliny jsou v klinické praxi podávány téměř výhradně intravenózně, ačkoliv ve specifických případech je možné užít i lokální podání intravezikální (u valrubicinu, DOX a EPI) nebo intraperitoneální v případě DOX (Solass a kol. 2013). Po p.o. podání se

ANT nevstřebávají s výjimkou IDA, který má díky své zvýšené lipofilitě biologickou dostupnost cca 30 % (Danesi a kol. 2002).

Antracykliny se v organismu rychle distribuují do tkání, kde dosahují řádově vyšších koncentrací než v plazmě. Nejvyšších koncentrací je dosaženo v orgánech s vysokou perfuzí, jako jsou játra, ledviny, slezina, plíce a srdce; neprocházejí však hematoencefalickou bariérou (Chabner a kol. 2006). Distribuční objem ANT je obrovský, u DOX přesahuje 500 l/m^2 a u IDA je dokonce až $1\,800 \text{ l/m}^2$ (Danesi a kol. 2002). Mechanismus vstupu ANT do buněk není dosud přesně prozkoumán. Nejčastěji se uvádí mechanismus prosté pasivní difúze, který byl u těchto léčiv popsán již před více než 30 lety (Skovsgaard a Nissen 1982), ale existují i další práce poukazující na možnost zapojení specifických transportních systémů (Nagasawa a kol. 1999, 2001). Novější práce pak poukazují na možný význam tzv. „flip-flop“ mechanismu, který může souviset s amfifilním charakterem molekuly při fyziologickém pH (Regev a kol. 2005). Uvnitř buněk se ANT významně váží na DNA v jádře a kardiolipin v mitochondriích, což může být důležité nejenom z hlediska protinádorové účinnosti, ale i rizika rozvoje jejich kardiotoxicity (Minotti a kol. 2004). Někteří autoři též popisovali významnou úlohu proteazomu při transportu ANT z cytoplazmy do jádra (Kiyomiya a kol. 2001). Z hlediska rozvoje rezistence nádoru na antracyklinovou léčbu je důležitým poznatkem, že ANT jsou významným substrátem P-glykoproteinu a dalších transportérů ze skupiny MDR, které exportují xenobiotika z buněk (Rubin a kol. 2002).

ANT jsou eliminovány z těla buď v nezměněné podobě, nebo po biotransformaci v játrech a jsou vylučovány převážně žlučí, zatímco exkrece močí má pouze minoritní význam. Eliminace ANT z plazmy je třífázová a u DOX představují jednotlivé biologické poločasy $t_{1/2\alpha} = 4,8$ minut, $t_{1/2\beta} = 2,6$ hodin a $t_{1/2\gamma} = 48$ hodin (Danesi a kol. 2002). U pacientů s jaterní dysfunkcí je proto nutné až 50% snížení počáteční dávky ANT (Twelves a kol. 1998). Hlavní biotransformační cestou ANT je tvorba „alkoholových“ metabolitů (dihydroxylové metabolity na C-13 jako např. doxorubicinol a daunorubicinol apod.) působením cytosolických aldo-ketoreduktáz. Oproti parentním látkám mají tyto metabolity sice nižší protinádorovou účinnost, avšak disponují významným cytotoxickým potenciálem, což může hrát významnou roli z hlediska rozvoje kardiotoxicity, protože mohou vznikat i v srdci (Menna a kol. 2012). IDA je primárně metabolizován právě na idarubicinol, který se významně podílí na jeho protinádorovém účinku (Chabner a kol. 2006). Další možností biotransformace ANT je vznik protinádorově neúčinných aglykonů hydrolytickým nebo redukčním štěpením glykosidické vazby. Aglykony mohou být

následně metabolizovány (např. konjugací se sulfáty nebo glukuronovou kyselinou) a následně vyloučeny žlučí do feaces či v případě konjugátů s glukuronovou kyselinou močí. Konjugace ANT s kyselinou glukuronovou je nejvýznamnější u EPI a epirubicinolu díky ekvatoriální pozici 4'-hydroxylové skupiny, naopak u DOX tato biotransformační cesta vůbec neprobíhá. EPI má proto v porovnání s DOX 2x vyšší celkovou clearance, a proto se pro dosažení stejného protinádorového účinku podává v úměrně vyšších dávkách než DOX (Mross a kol. 1988; Robert a Gianni 1993).

1.1.4 FARMAKODYNAMIKA

Přesný mechanismus protinádorového účinku ANT není znám a je stále zdrojem kontroverzí. Mezi nejčastěji zmiňované hypotézy patří interkalace do DNA, inhibice topoizomerázy II nebo tvorba reaktivních kyslíkových radikálů (Šimůnek a kol. 2009).

Antracykliny byly od svého objevení spojovány s interkalačním mechanismem protinádorového účinku. Díky své planární struktuře a slabým nekovalentním interakcím se ANT mohou vmezeřit do molekuly DNA mezi páry bazí G-C, což znemožní transkripci a replikaci DNA (Pigram a kol. 1972). Význam tohoto mechanismu je však v současné době zpochybňován pracemi poukazujícími na skutečnost, že k interkalaci dochází až při velmi vysokých, klinicky nerelevantních koncentracích ANT (Dunkern a kol. 2003; Menna a kol. 2012).

Dalším možným mechanismem protinádorového působení ANT je tvorba volných radikálů, zejména pak vysoce reaktivních forem kyslíku (ROS, viz kapitola 1.2.4.1) (Muindi a kol. 1984). Význam tvorby ROS pro protinádorový účinek ANT byl však značně zpochybněn (Gewirtz 1999; Wu a Hasinoff 2005) a obecně se soudí, že tvorba ROS má mnohem větší význam spíše pro rozvoj kardiotoxicity (Keizer a kol. 1990; Minotti 2010; Wu a Hasinoff 2005).

V současnosti se většina autorů přiklání k názoru, že protinádorový účinek ANT je zprostředkován inhibicí topoizomerázy II (Top2), konkrétně její α izoformy (Top2 α) (Sawyer 2013). Top2 je enzym štěpící obě vlákna molekuly DNA za účelem odstranění vzniklého nežádoucího napětí a zapletení (nad obrátky) molekuly DNA v chromosomu, která vzniká při její replikaci, transkripci, (de)kondenzaci, reparaci, rekombinaci a segregaci. Top2 umožňuje přerušení jedné části dvoušroubovice DNA, kterou kovalentně váže ke své molekule, zatímco vzniklou mezerou provlékne druhou neporušenou část dvoušroubovice. Tento děj je katalyticky závislý na spotřebě ATP (Wang 1998). Látky schopné inhibovat Top2 se dělí podle povahy inhibice na tzv. katalytické inhibitory Top2,

jejichž působení se vyznačuje prostým zpomalením katalytického cyklu Top2 (např. dexrazoxan) a tzv. topoizomerasové jedy (etoposid, ANT), které zvyšují koncentraci tzv. štěpného komplexu, kdy molekula DNA je rozštěpená a její konce jsou kovalentně vázány na tyrozinových zbytcích v aktivním místě Top2. Stabilizace tohoto štěpného komplexu vede následně ke vzniku dvojíých zlomů v DNA. Toto poškození DNA spolu se samotnou inhibicí replikace DNA vede k odstartování procesu programované buněčné smrti, apoptózy (Deweese a Osheroff 2009).

1.1.5 NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY ANTRACYKLINŮ

Podobně jako ostatní klasická protinádorová léčiva, tak i ANT antibiotika vykazují relativně neselektivní cytostatické působení a z toho vyplývající i četné nežádoucí účinky. ANT vyvolávají významnou myelosupresi manifestující se nejčastěji jako febrilní neutropenie, která si může vyžádat i intenzivní podpůrnou léčbu, snížení celkové podávané dávky nebo dokonce i přerušeni léčby. Méně častá bývá trombocytopenie nebo anémie. Obdobně jako klasická cytostatika způsobují i ANT přechodnou nauzeu, zvracení, mukozitidu a alopecii, které však nepředstavují závažnější komplikace v protinádorové léčbě (Chabner a kol. 2006). Tyto nežádoucí účinky jsou v dnešní době obvykle dobře zvládnutelné díky moderní antiemetické terapii a podpůrné léčbě hematopoetickými růstovými faktory.

Závažnou, i když relativně vzácnou, komplikací je náhodná extravazace ANT při jejich *i.v.* podání (vlivem špatné techniky aplikace či poškozením endotelu cév různé etiologie). V důsledku toho dochází k masivním a velmi bolestivým nekrotickým, progredujícím zánětům a ulceracím v zasažené i okolní tkáni, které se následně obtížně hojí a vyžadují zpravidla razantní chirurgický zásah. Tato komplikace též může ohrozit i další pokračování protinádorové léčby (Langer a kol. 2009). V této souvislosti je nutné zmínit, že se při léčbě extravazace ANT ukázalo jako velmi efektivní systémové podání DEX. Pro tuto indikaci je DEX registrován pod názvem Savene. Jeho použití vedlo k výborným dlouhodobým výsledkům a významně eliminovalo potřebu chirurgické léčby poškozené tkáně (Mouridsen a kol. 2007).

1.2 Antracyklinová kardiotoxicita

Specifickým nežádoucím účinkem ANT antibiotik je jejich kardiotoxicita. Ta byla poprvé pozorována až v úvodních klinických studiích s DAU (Tan a kol. 1967), zatímco v průběhu preklinického vývoje nebyla zaznamenána. Brzy se objevila řada dalších zpráv

o kardiotoxickém účinku nejenom DAU, ale i DOX (Lefrak a kol. 1973), čímž začala být zřejmá přímá souvislost mezi rozvojem kardiotoxicity a ANT. Kardiotoxicita byla popsána u všech klinicky používaných zástupců ANT bez výjimky (jedná se o tzv. „skupinový efekt“) a představuje stále významnou limitaci jejich klinického použití (Davies 2012; Minotti 2010; Štěřba a kol. 2007).

S ohledem na rozdílnou klinickou manifestaci, stupeň poškození myokardu a zejména časový odstup od podání je možné ANT kardiotoxicitu rozdělit na několik základních typů: akutní, subakutní, chronickou a pozdní (Elbl 2002; Gharib a Burnett 2002). V současné době je patrná tendence rozdělovat ANT kardiotoxicitu pouze na základě časového odstupu manifestace známek srdeční poškození od podání ANT, a to na formu akutní a chronickou s časným nebo pozdním nástupem (Geisberg a Sawyer 2010).

1.2.1 AKUTNÍ FORMY ANTRACYKLINOVÉ KARDIOTOXICITY

Známky akutní kardiotoxicity se projevují již během podání ANT nebo do 24 hodin po něm. Manifestace je většinou subklinická, bez zjevného organického poškození a spontánně vymizí. Nejčastěji se projevuje změnami srdečního rytmu, které lze na EKG křivce pozorovat jako prodloužení úseku ST, abnormální vlna T, snížení voltáže QRS komplexu či prodloužení trvání celého QT intervalu. Závažnější poruchy rytmu vyžadující léčbu jsou vzácné, avšak škála pozorovaných jevů zahrnuje sinusové tachykardie, předčasné depolarizace síní či komor a síňokomorové bloky, ale i supraventrikulární arytmie a komorové extrasystoly. Ojedinele byly popsány i případy fatální poruchy rytmu či náhlého srdečního infarktu (Carver a Desai 2010). V průběhu několika hodin po podání se též může vyskytnout vazodilatace a hypotenze. V porovnání s ostatními formami nebyla pozorována závislost výskytu poruch rytmu na podané dávce, ani následná progresse do chronických forem ANT kardiotoxicity (Allen 1992; Carver a Desai 2010; Elbl 2002).

Velmi vzácnou formou ANT kardiotoxicity je její subakutní forma, která se může rozvinout v řádu dnů či několika týdnů po podání vysokých dávek ANT. Nejčastěji je charakterizována rozvojem toxické perikarditidy, myokarditidy a tzv. „myokarditis-perikarditis“ syndromu (Elbl 2002; Gharib a Burnett 2002). Z dosavadních zjištění se nepodařilo pro subakutní formu ANT kardiotoxicity definovat rizikové faktory a ani souvislost s další progresí kardiotoxicity (Elbl 2002).

1.2.2 CHRONICKÉ FORMY ANTRACYKLINOVÉ KARDIOTOXICITY

Z klinického hlediska jsou bezesporu nejvýznamnější chronické formy ANT kardiotoxicity. Ačkoli se tato skupina dělí na dvě podjednotky v závislosti na časovém odstupu manifestace klinických známek srdečního selhání od ukončení léčby ANT (časný a pozdní typ), můžeme najít společné jmenovatele jak z hlediska rizikových faktorů, tak i charakteru poškození a dlouhodobé prognózy pacientů. Společným znakem je také skutečnost, že poškození myokardu je určitý čas klinicky němé a příznaky srdečního selhání se objevují až s časovým odstupem. Dle novější klasifikace se řadí oba tyto typy do kategorie „srdeční dysfunkce vyvolané chemoterapeutiky I. typu“ (Ewer a Benjamin 2006; Minotti 2010).

Chronické formy ANT kardiotoxicity jsou charakterizovány rozvojem závažného a ireverzibilního poškození levé komory (LK) vedoucí nejčastěji k dilatační kardiomyopatii (u dětí je někdy popisována i restriční forma (Elbl 2002)). Tento proces je spojen s rozvojem asymptomatické dysfunkce LK, která se může rozvinout do klinicky manifestované formy srdečního selhání a dále progredovat až ke konečnému stádiu vyžadující transplantaci srdce. U formy s časným nástupem se známky klinického srdečního selhání manifestují do jednoho roku po ukončené ANT léčbě. Naproti tomu forma s pozdním nástupem je charakteristická minimálně ročním odstupem od ukončené léčby (jsou popsány případy i 20leté latence) (Ewer a Benjamin 2006; Gharib a Burnett 2002; Jones a kol. 2006; Minotti 2010). Častá frekvence používání ANT v léčbě hematologických malignit v dětském věku a současně dosažená dlouhodobá remise spojená s výrazně delším přežíváním dětských pacientů představuje v dlouhodobém horizontu významné riziko kardiovaskulární morbidity a mortality, které bylo dokumentováno řadou studií s velkým počtem sledovaných subjektů (Aleman a kol. 2007; Armstrong a kol. 2009; Franco a kol. 2011; Lipshultz a kol. 1991; Zerra a kol. 2013). Ve studii Oeffingera a kol. (2006), kde byly zveřejněny výsledky 30letého sledování pacientů přeživších nádorové onemocnění v dětském věku, bylo jasně dokumentováno až 15krát vyšší riziko srdečního selhání a 10krát vyšší riziko ischemické choroby srdeční oproti běžné populaci.

Z morfologického hlediska je popisováno fokální poškození myokardu LK a mezikomorového septa, přičemž pravá komora obvykle nebývá významně poškozena. (Van Vleet a Ferrans 1980a; Van Vleet a kol. 1980). Tento jev bývá spojován s významně vyšší funkční a metabolickou zátěží myokardu LK a septa oproti zbytku srdce, nicméně konkrétní důkazy podporující tuto hypotézu chybí. Patologický obraz chronické ANT

kardiotoxicity je do značné míry charakteristický a zahrnuje soubor změn čítající vakuolární degeneraci kardiomyocytů, desorganizaci a postupnou ztrátu myofibril, morfologické změny mitochondrií, které vedou až k zániku kardiomyocytů a jejich postupnou náhradou vazivovou tkání (Berry a Jorden 2005; Billingham a kol. 1978).

1.2.3 RIZIKOVÉ FAKTORY ROZVOJE CHRONICKÉ ANTRACYKLINOVÉ KARDIOTOXICITY

Nejvýznamnějším rizikovým faktorem rozvoje chronické ANT kardiotoxicity je jednoznačně celková podaná kumulativní dávka ANT (jednotlivé látky se mezi sebou liší, obecně se hovoří o ekvivalentu dávky DOX). Maximální „bezpečná“ kumulativní dávka byla stanovena zpočátku empiricky na hodnotu 550 mg/m² pro DOX (von Hoff a kol. 1979). Avšak retrospektivní analýzy v posledním desetiletí ukázaly, že původně předpokládaná 5% incidence srdečního selhání se pohybuje již mezi 400 - 450 mg/m² DOX. Při kumulativní dávce nad 550 mg/m² se již mění lineární průběh závislosti na exponenciální a při dávce překračující 700 mg/m² dosahuje incidence srdečního selhání až 48 % (Ewer a Benjamin 2006; Swain a Vici 2004). Takto výrazný posun v chápání rizika kardiotoxicity byl dán mohutným rozvojem neinvazivních monitorovacích metod v kardiologii a zvýšením důrazu na podpůrnou i následnou léčbu a dlouhodobé sledování onkologických pacientů (Shankar a kol. 2008; Suter a Ewer 2013; Swain a Vici 2004).

Riziko rozvoje ANT kardiotoxicity také znatelně zvyšuje přítomnost dalších rizikových faktorů. Mezi nejzávažnější patří iradiace mediastina, kombinační terapie s dalšími kardiotoxickými látkami (např. trastuzumab), věk pacienta (děti mladší 3 let a pacienti starší 65 let vykazují mnohem větší citlivost k rozvoji kardiotoxicity), ženské pohlaví, vrozené srdeční vady, celkově zvýšené kardiovaskulární riziko a také vysoké plazmatické hladiny cytostatika, zvláště po bolusovém podání cytostatika či při zkráceném dávkovacím schématu (Ewer a Ewer 2010; Menna a kol. 2012; von Hoff a kol. 1979). V poslední době se objevují nové poznatky o významu genetického polymorfizmu různých genů jako dalšího rizikového faktoru (Blanco a kol. 2012; Visscher a kol. 2012).

1.2.4 MECHANIZMY VZNIKU CHRONICKÉ ANTRACYKLINOVÉ KARDIOTOXICITY

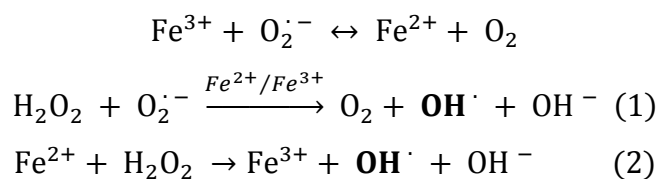
I přes značné úsilí, které bylo posledních 40 let věnováno snaze popsat, vysvětlit a pochopit mechanismy vedoucí k rozvoji chronické ANT kardiotoxicity, můžeme v současnosti pouze konstatovat, že se jedná o značně komplikovaný a patrně multifaktoriální proces. Logická syntéza všech dosavadních poznatků do jednotného

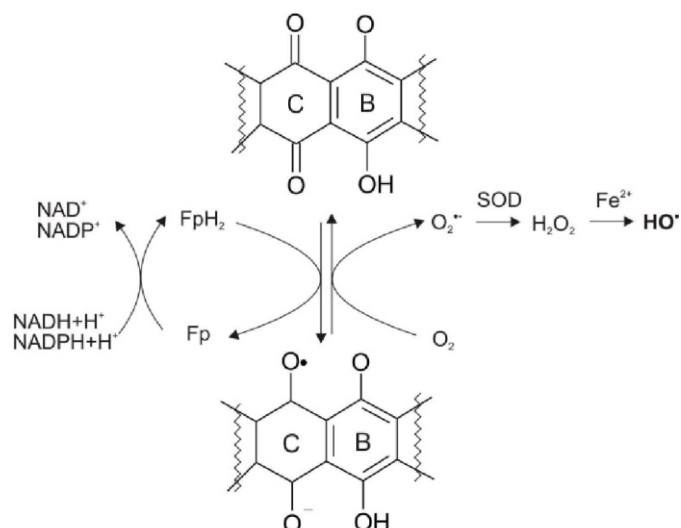
mechanismu toxického účinku je velice obtížná zejména pro heterogenitu užitých modelů (Chen a kol. 2007; Minotti a kol. 2004; Šimůnek a kol. 2009; Štěrbá a kol. 2013).

1.2.4.1 POŠKOZENÍ SRDCE VOLNÝMI RADIKÁLY

Nejčastěji zmiňovaným mechanismem vzniku ANT kardiotoxicity je nadměrná tvorba ROS za katalytické podpory iontů železa, tzv. *ROS and iron hypothesis* (Keizer a kol. 1990; Štěrbá a kol. 2013). Nadměrná tvorba ROS byla opakovaně popsána při experimentech *in vitro* (DeAtley a kol. 1999; Link a kol. 1996) a *in vivo* (Berthiaume a kol. 2005; Luo a kol. 1997). Hypotézu, že ROS jsou zodpovědné za rozvoj kardiotoxicity, podporuje i známá skutečnost, že srdce má oproti ostatním tkáním relativně nízkou schopnost antioxidační obrany danou nízkým obsahem superoxidodismutázy, katalázy a glutathionperoxidázy (Levitt 1999).

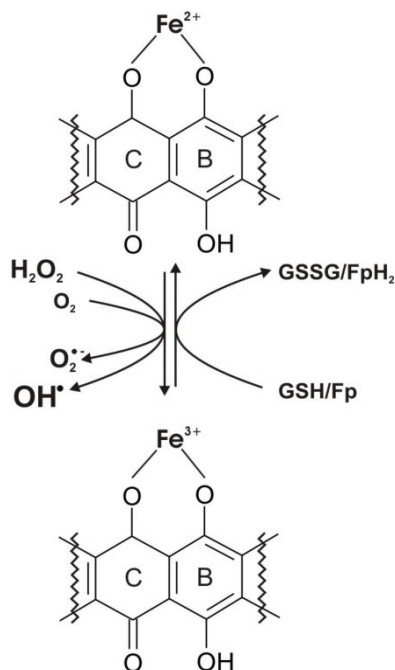
Antracykliny umožňují tvorbu ROS prostřednictvím redoxní cyklizace chinonového fragmentu na kruhu C. Tuto reakci mohou katalyzovat různé buněčné enzymy ze skupiny oxidoreduktáz, zejména NADH:ubichinonreduktáza (komplex I dýchacího řetězce) (Doroshov a Davies 1986), NAD(P)H-dependentní cytochrom P450 reduktáza endoplazmatického retikula (Bachur a kol. 1977), xantinoxidáza (Malisza a Hasinoff 1995a; Pan a Bachur 1980) či různé flavoproteiny. Jejich působením dochází ke vzniku semichinonového radikálu, který následně reaguje s molekulou kyslíku za vzniku superoxidového radikálu (Wallace 2003). Superoxidový radikál je okamžitě přeměněn superoxidodismutázou (nebo pomaleji i spontánní dismutací) na peroxid vodíku, který je za normálních podmínek okamžitě odstraňován působením katalázy. Pokud není peroxid vodíku rychle eliminován nebo je v jeho okolí dostupné zvýšené množství volných iontů železa, může docházet ke vzniku vysoce reaktivních hydroxylových radikálů (OH^\bullet) prostřednictvím Haber-Weissovy (1) a Fentonovy reakce (2) (Obr. 2). Hydroxylové radikály představují jednu z nejtoxičtějších forem ROS vyznačující se enormní reaktivitou, která poškozuje všechny dostupné buněčné struktury - lipidy, proteiny i nukleové kyseliny (Halliwell a Gutteridge 2007).





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

Druhou cestou vzniku vysoce reaktivních OH^\bullet je tvorba komplexu ANT s železitými ionty (ANT-Fe^{3+}), které v *in vivo* podmínkách vznikají nejčastěji v poměru 1:1 (Obr. 3). Železité ionty ve vzniklém komplexu velmi ochotně podstupují redoxní cyklizaci působením flavoproteinů nebo redukováného glutathionu. Následná reakce s molekulami kyslíku nebo peroxidu vodíku vede ke vzniku superoxidových, respektive hydroxylových radikálů (Keizer a kol. 1990; Olson a kol. 1981; Štěrbá a kol. 2013).



Obr. 3 Tvorba hydroxylových radikálů prostřednictvím komplexu ANT-Fe. Fp - flavoprotein, GSH/GSSG - redukováná/oxidovaná forma glutathionu.

Za normálních okolností je v buňkách dostupné pouze omezené množství volných (katalyticky aktivních) iontů železa. Je ovšem známo, že některé patofyziologické děje jako je oxidační stres nebo buněčná acidóza mohou významně zvýšit dostupnost těchto forem železa zejména jeho uvolněním z vnitrobuněčných zásobáren (ferritinu) (Chevion a kol. 1993). K navození těchto podmínek samozřejmě mohou přispět i samotné ANT (Xu a kol. 2005). S ohledem na permanentní fyzickou zátěž a intenzivní energetický metabolismus spoléhající se značnou měrou právě na tvorbu ATP oxidační fosforylací může být myokard poměrně snadným cílem pro tkáňové poškození prostřednictvím ROS (Liochev 1999). Antracykliny navozená tvorba ROS v kardiomyocytech spolu s cyklickým charakterem tohoto děje může snadno překonat omezenou antioxidační kapacitu srdce a způsobit tak jeho významné poškození (Malisza a Hasinoff 1995b; Myers 1998).

Na rozvoji ANT navozeného oxidačního stresu se mohou významně podílet i NADPH-oxidázy (NOX), jejichž vliv byl dobře popsán při řadě patologických stavů v kardiovaskulárním systému. V myokardu hrají nejvýznamnější úlohu izoformy NOX2 a NOX4, které se liší v řadě aspektů včetně lokalizace a své regulace (Nabeebaccus a kol. 2011). V kontextu ANT kardiotoxicity se jeví jako významné práce Wojnowského a kol. (2005) a Zhaa a kol. (2010) popisující významně vyšší odolnost myokardu postrádajícího určitou formu NOX vůči toxicitě opakovaného podávání DOX u myši.

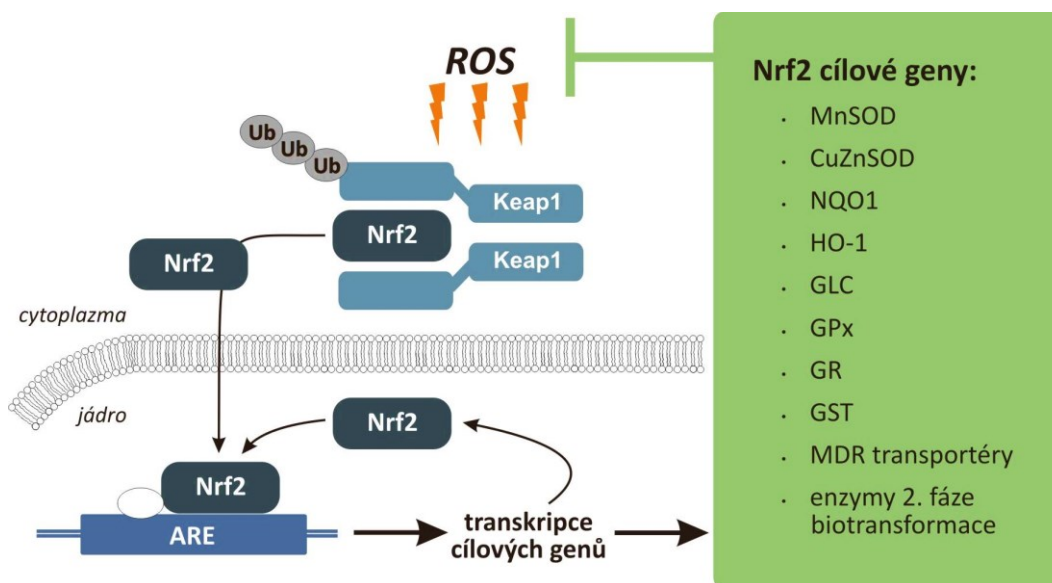
Na poškození kardiomyocytů vyvolané ANT se mohou kromě ROS podílet i reaktivní formy dusíku (RNS). Antracykliny mohou totiž indukovat tvorbu oxidu dusnatého (NO) prostřednictvím zvýšené exprese a aktivity NO syntázy (NOS). Lokálně vysoké koncentrace NO mohou vést k reakci se superoxidovým radikálem uvnitř kardiomyocytů za vzniku vysoce reaktivního peroxonitritu (ONOO^{\cdot}) poškozujícího buněčné struktury (Fogli a kol. 2004; Pacher a kol. 2007).

1.2.4.2 AKTIVACE NRF2 KASKÁDY A MOŽNÝ VZTAH K ANTRACYKLINOVÉ KARDIOTOXICITĚ

Oxidační stres vyvolává v buňce i řadu protektivních dějů, které vedou k obranné odpovědi buňky. Zvyšuje se například exprese řady antioxidačních a cytoprotektivních proteinů a enzymů. Tento děj je koordinován prostřednictvím transkripčního faktoru Nrf2 - *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*. Za fyziologických podmínek je Nrf2 vázán v cytoplasmě na KEAP protein (*Kelch-like ECH-associated protein 1*) a degradován ubikvitin-proteasomovým systémem. V přítomnosti oxidačního inzultu dochází k oxidaci cysteinových skupin KEAP, čímž je Nrf2 uvolněn z vazby na tento protein a translokován do jádra, kde po vazbě na ARE (*Antioxidant Response Elements*) reguluje genovou expresi

řady klíčových antioxidačních a cytoprotektivních molekul. Vedle toho dochází též k indukci exprese transportních molekul z rodiny MDR transportérů a dalších protektivních mechanismů, které umožňují odstranit z buňky potenciálně nebezpečné látky (Obr. 4) (Baird a Dinkova-Kostova 2011).

Aktivace Nrf2 kaskády by mohla být účinnou ochranou myokardu před ANT navozeným oxidačním stresem a poškozením, zatímco nedostatečná regulace této kaskády by mohla významně přispět k orgánovému poškození. Přestože se z dnešního pohledu jedná o klíčový mechanismus, nejsou v současné době k dispozici žádné relevantní informace týkající se možného ovlivnění Nrf2 signální kaskády ANT. Je také známo, že Nrf2 kaskádu lze též indukovat farmakologicky pomocí tzv. nepřímých antioxidantů (diskutovány rozsáhleji v sekci 3.4.). Jejich účinek je vysvětlován produkcí mírného oxidačního inzultu, který pozvolna indukuje Nrf2 signální kaskádu a stimuluje buňku ke zvýšené produkci antioxidačních a cytoprotektivních komponent. Ani v této oblasti není k dispozici dostatek informací a tak je potenciální terapeutické využití této strategie pro kardioprotekci nejasné.



Obr. 4 Schéma regulace antioxidačních a cytoprotektivních mechanismů pomocí Nrf2 signální kaskády. Nrf2 - nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2, ROS - reaktivní formy kyslíku, ARE - antioxidant response element, Keap1 - Kelch-like ECH-associated protein 1, Ub - ubiquitin, SOD - superoxididismutáza, NQO1 - NAD(P)H:chinonoxidoreduktáza 1, HO1 - hemoxygenáza 1, GLCs - rodina γ -glutamylcysteinligázy, GPx - glutationperoxidáza, GR - glutationreduktáza, GST - glutation-S-transferáza, MDR – rodina *multiple drug resistance protein*. Upraveno podle Baird a Dinkova-Kostova (2011).

1.2.4.3 POŠKOZENÍ MITOCHONDRIÍ ANTRACYKLINY

V současné době se předpokládá, že mitochondrie představují jeden z hlavních cílů toxického působení ANT (Šimůnek a kol. 2009; Wallace 2007). Opakovaně byla totiž

popsána významná afinita ANT ke kardiolipinu, který je hlavní součástí vnitřní mitochondriální membrány (Goormaghtigh a kol. 1986, 1990). Mitochondrie ale představují také významný zdroj volných radikálů za normálních i patologických podmínek, přičemž u ANT se mohou významně uplatňovat při katalýze redoxní cyklizace (Pollakis a kol. 1984). Jako hlavní zdroj volných radikálů po expozici ANT je považován komplex I dýchacího řetězce - NADH:ubichinonreduktáza (Doroshov a Davies 1986; Doroshov 1983; Wallace 2003). Následné studie ukázaly, že ANT mohou interagovat i s ostatními komponenty dýchacího řetězce a inhibovat tak oxidační fosforylaci a snižovat celkovou produkci energie dýchacím řetězcem (Goormaghtigh a kol. 1986; Solaini a kol. 1985; Wallace 2007). Poškozeny mohou být i mitochondriální přenašeče pro makroenergetické fosfáty (Cheneval a kol. 1983) či ovlivněna exprese a funkce mitochondriální kreatinkinázy (Miura a kol. 1994; Tokarska-Schlattner a kol. 2006, 2007), jež zaručuje efektivní a konstantní zásobování kardiomyocytů energií. Řada autorů popisuje poruchu mitochondriální homeostázy vápníku působením ANT nebo jejich metabolitů a následnou akumulaci Ca^{2+} v mitochondriální matrix vyvolávající otevření póru regulujícího propustnost vnitřní mitochondriální membrány (MPTP, *mitochondrial permeability transition pore*) (Sokolove a Shinaberry 1988; Solem a Wallace 1993; Solem a kol. 1994; Wallace 2007). Následkem je insuficience dýchacího řetězce a ztráta celkové mitochondriální integrity a funkce (Wallace 2007). V poslední době se objevily také studie popisující poškození mitochondriální DNA účinkem ANT. Mitochondriální DNA je poměrně náchylná k oxidačnímu poškození a k mutacím, které z části též mohou souviset s oxidačním stresem (Lagouge a Larsson 2013). Lebrecht a kol. (2003, 2005) popsali indukci specifických delečních mutací v mitochondriální DNA (tzv. *common deletions*) v myokardu po opakované podání ANT, což bylo spojeno se selektivním porušením exprese mitochondriálně kódovaných podjednotek dýchacího řetězce. Tento děj by mohl vést k porušení tvorby ATP a sekundárně též k dalšímu nárůstu tvorby ROS v důsledku dysfunkce dýchacího řetězce (Lebrecht a Walker 2007; Lebrecht a kol. 2003, 2005; Thompson a kol. 2010; Wallace 2007).

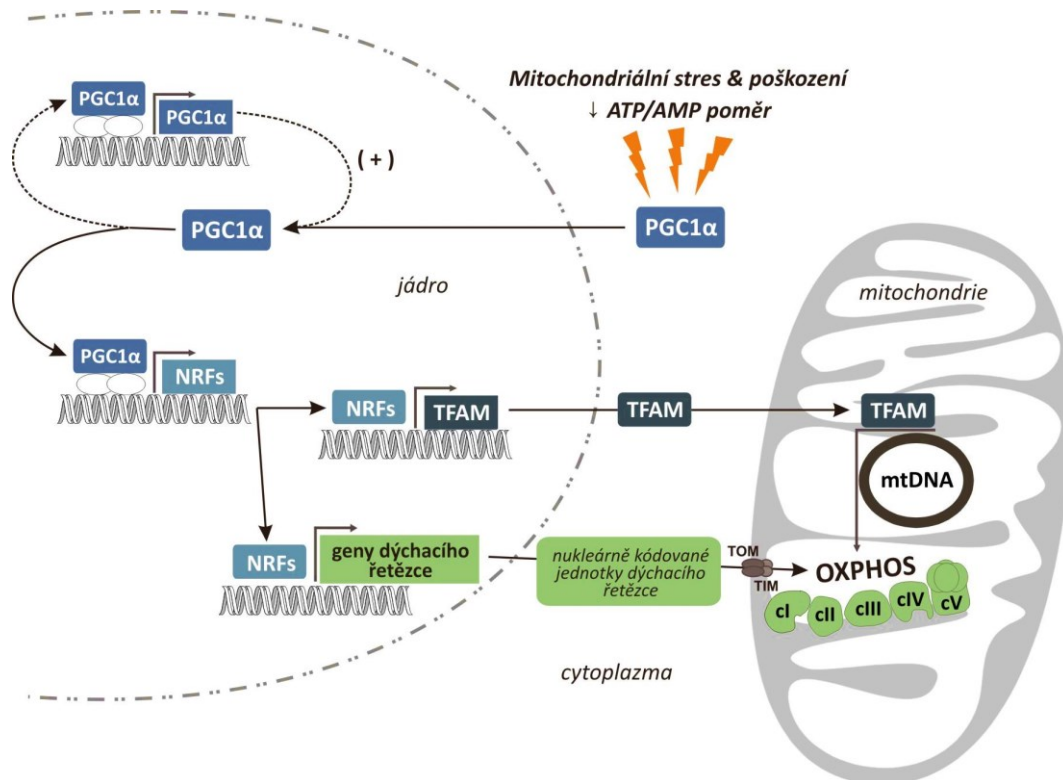
1.2.4.4 MITOCHONDRIÁLNÍ BIOGENEZE A JEJÍ MOŽNÝ VZTAH K ANTRACYKLINOVÉ KARDIOTOXICITĚ

Na rozdíl od předešlých let je současný pohled na strukturu a funkci mitochondrií výrazně méně statický a naopak se u mitochondrií zdůrazňuje jejich plasticita, která umožňuje této organelle adaptaci na fyziologickou i patologickou zátěž (Piquereau a kol.

2013; Ventura-Clapier a kol. 2011). Poškození mitochondrií, nedostatek ATP a mitochondriální stress za normálních okolností vedou k aktivaci endogenní protektivní kaskády mitochondriální biogeneze, která umožňuje buňce reagovat na vzniklou nedostatečnost mitochondriální struktury nebo funkce. Klíčovým koordinátorem tohoto děje je molekula PGC1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α*). PGC1 α funguje jako transkripční (ko)aktivátor, který spolu s ERR (*estrogen-related receptors*) a PPAR α/δ (*peroxisome proliferator-activated receptor- α/δ*) reguluje expresi mitochondriálních proteinů. Z hlediska exprese podjednotek dýchacího řetězce hrají zásadní roli nukleární respirační faktory 1 a 2 (NRF 1 a 2) a mitochondriální transkripční faktor A (TFAM), které koordinují expresi podjednotek kódovaných mitochondriálním a nukleárním genomem, jakož i replikaci mitochondriální DNA (Obr. 5) (Ventura-Clapier a kol. 2008). PGC1 α se také podílí na regulaci mitochondriální dynamiky (proces mitochondriálního dělení a fúze), která má nezanedbatelný význam v dospělém srdci za patologických podmínek jako je ischemicko-reperfúzní poškození nebo srdeční selhání (Piquereau a kol. 2013). S ohledem na výše zdokumentovanou toxicitu ANT vůči mitochondriím je velmi pravděpodobné, že by mitochondriální biogeneze mohla hrát důležitou roli v rozvoji toxicity a případně v obraně před ní. Překvapivě je však o úloze mitochondriální biogeneze a PGC1 α v rozvoji ANT kardiotoxicity známo jen velmi málo informací. Omezené informace jsou dostupné jen u akutní ANT kardiotoxicity vyvolané podáním supratherapeutických dávek, nicméně vztah ke klinicky relevantním formám kardiotoxicity zůstává nejasný (Marechal a kol. 2011; Miyagawa a kol. 2010).

1.2.4.5 PORUCHA HOMEOSTÁZY VÁPŇÍKU V KARDIOMYOCYTECH

Antracykliny a jejich metabolity mají ambivalentní vliv na uvolnění Ca²⁺ ze sarkoplazmatického retikula v závislosti na použité dávce (Boucek a kol. 1999; Maeda a kol. 2000; Olson a kol. 2000; Pessah a kol. 1990). Opakované podávání ANT má za následek snížení exprese řady klíčových molekul pro hospodaření s vápníkem v kardiomyocytech, jako např. ryanodinový receptor (Gambliel a kol. 2002) či SERCA2a (Arai a kol. 1998). Snížená byla též exprese i funkce kalsekvestrin, který řídí uskladnění



Obr. 5 **Kaskáda mitochondriální biogeneze řízená PGC1 α a koordinace podjednotek dýchacího řetězce.** PGC1 α - PPAR- γ koaktivátor 1 α , NRFs - nukleární respirační faktory 1 a 2, Tfam - mitochondriální transkripční faktor A, nDNA - nukleární DNA, mtDNA - mitochondriální DNA, OXPHOS - systém oxidační fosforylace. Upraveno podle Hood a kol.(2003) a Ventura-Clapier a kol. (2008).

a uvolnění iontů Ca^{2+} v lumen sarkoplazmatického retikula (Park a kol. 2005). Těmito a dalšími mechanismy může dojít k přetížení kardiomyocytů vápníkem (tzv. *calcium overload*). I tento stav vede k poruše mitochondriální funkce, integrity a nedostatečné tvorbě ATP. Zvýšené intracelulární koncentrace Ca^{2+} mají také za následek aktivaci kalcium dependentních kináz, fosfolipáz a proteáz (Tokarska-Schlattner a kol. 2006; Wallace 2007). Z kardiotoxického hlediska je nejvýznamnější aktivace proteázy kalpainu (Jang a kol. 2004; Lim a kol. 2004; Singh a kol. 2004), která štěpí cytoskeletární a myofilamentární proteiny (např. desmin, titin nebo troponin T a I) a v důsledku může vést k systolické a diastolické dysfunkci a progresi kardiomyopatie (Barta a kol. 2005; Jang a kol. 2004). Aktivace kalpainu může taktéž hrát roli v indukci apoptózy, protože štěpí jak molekulu Bid, důležitou součást mitochondriální apoptotické cesty, tak i prokaspázu 12 spouštějící apoptotickou cestu řízenou sarkoplazmatickým retikulem (Jang a kol. 2004). Stále ovšem není zřejmé, jestli výše uvedené změny jsou příčinou chronické ANT kardiotoxicity, nebo jen následkem.

1.2.4.6 POŠKOZENÍ MYOKARDU ALKOHOLOVÝMI METABOLITY ANTRACYKLINŮ

Alkoholové metabolity ANT vznikají působením karbonylreduktáz i uvnitř kardiomyocytů, kde jejich koncentrace značně převyšují plazmatické (Menna a kol. 2012). Oproti parentním látkám tyto metabolity mnohem více ovlivňují aktivitu sarkolemálních kalciových transportérů (SERCA2a a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výměník), a tím i výslednou homeostázu Ca^{2+} iontů (Menna a kol. 2012; Olson a kol. 2000). Genetická manipulace exprese karbonylreduktázy měla významný vliv na akutní ANT kardiotoxicitu navozenou supratherapeutickými dávkami ANT (Forrest a kol. 2000; Olson a kol. 2003). Někteří autoři přikládají tvorbě hydroxylovaných metabolitů a jejich retenci v kardiomyocytech zásadní význam, ale jejich úloha v rozvoji chronických forem kardiotoxicity je stále ještě málo prostudovaná (Menna a kol. 2012).

1.2.4.7 OVLIVNĚNÍ TOPOIZOMERÁZY II ANTRACYKLINŮ

ANT patří mezi tzv. topoizomerázové jedy. V buňkách obratlovců se vyskytují dvě izoformy Top2, jejichž koncentrace se v průběhu buněčného cyklu mění. V proliferujících buňkách (tedy i nádorových) je značně zvýšena exprese α izoformy (Top2 α), která je nezbytná pro replikaci DNA a také pro rozdělení sesterských chromatid ve fázi mitózy (Capranico a kol. 1992; Wang 2002; Watanabe a kol. 1994). Protinádorové účinky ANT se vysvětlují působením ANT na Top2 α s následnou inhibicí replikace buněk a také kumulací dvojitých zlomů v DNA a aktivací apoptózy. V kardiomyocytech a dalších terminálně diferencovaných buňkách je však tato izoforma přítomna pouze ve velmi malém množství, protože její exprese se přechodem do G_0 fáze a diferenciací dramaticky snižuje, proto v těchto buňkách je převažující izoformou Top2 β , jejíž exprese se v průběhu buněčného cyklu prakticky nemění (Deweese a Osheroff 2009). O ANT je známo, že mají významný inhibiční vliv na obě formy Top2 (Wang 2002), a proto není vyloučeno, že by inhibice Top2 β mohla mít vliv na rozvoj ANT kardiotoxicity. V poslední době se v literatuře objevily spekulace (Hasinoff a Herman 2007) následně doplněné o experimentální data (Lyu a kol. 2007; Zhang a kol. 2012) o tom, že by právě interakce ANT s Top2 β izoformou a následnou kumulací dvojitých zlomů DNA v kardiomyocytech mohla být příčinou kardiotoxicity ANT.

1.2.4.8 INDUKCE PROGRAMOVANÉ BUNĚČNÉ SMRTI

Vznik chronické ANT kardiotoxicity byl dlouhou dobu spojován s neprogramovanou buněčnou smrtí, ale v poslední době byla publikována řada prací

o významu programované buněčné smrti. Použitím terapeuticky relevantních koncentrací ANT na různých *in vitro* a *in vivo* modelech byla pozorována aktivace apoptózy jak prostřednictvím vnější (Popelová a kol. 2009; Ueno a kol. 2006; Yamaoka a kol. 2000), tak i vnitřní (mitochondriální) cesty (Chen a kol. 2007; Nakamura a kol. 2000; Popelová a kol. 2009; Sawyer a kol. 1999; Wallace 2003, 2007). V některých studiích byla pozorována souvislost mezi ANT indukovanou apoptózou a stresem sarkoplazmatického retikula (Jang a kol. 2004; Popelová a kol. 2009; Szegezdi a kol. 2003). Nicméně skutečný význam apoptózy pro rozvoj chronických forem ANT kardiotoxicity zůstává nejasný a ještě méně informací je dostupných k roli druhého typu programované buněčné smrti – autofagie.

1.2.4.9 DALŠÍ DISKUTOVANÉ MECHANIZMY

Rozvoj ANT kardiotoxicity byl též spojován s uvolněním cytokinů (TNF α , IL-2) z infiltrujících buněk (Pai a Nahata 2000) a histaminu z žírných buněk (Decorti a kol. 1997; Klugmann a kol. 1986). Byly popsány četné interakce ANT s vegetativním nervovým systémem (Geršl a kol. 1996; Hoyano a kol. 1996; Nagami a kol. 1997; Nousiainen a kol. 2001; Sasaki a kol. 2010; Temma a kol. 1992). V poslední době se objevují poznatky, že ANT kardiotoxicita by mohla souviset s dysregulací ubikvitin-proteasomového systému (Ranek a Wang 2009). Jiní autoři předpokládají, že expozice ANT ovlivňuje expresi řady klíčových sarkomerální proteinů, a to prostřednictvím transkripčních faktorů GATA 4 (GATA vázajícího proteinu 4) a CARP (*cardiac ankyrin repeated protein*) (Boucek a kol. 1999; Chen a kol. 2012; Ito a kol. 1990; Jeyaseelan a kol. 1997). Z řady studií vyplývá, že ANT mohou komplexně zasahovat do buněčného metabolismu a homeostázy iontů železa. Na kolik jsou však tyto děje významné pro rozvoj kardiotoxicity však zůstává zatím nejasné (Xu a kol. 2005).

1.3 Možnosti ochrany myokardu před antracyklinovou kardiotoxicitou

Antracyklinová kardiotoxicita podle všech poznatků je ireverzibilním procesem a v případě plného rozvoje je spojována s velmi špatnou dlouhodobou prognózou. Protože moderní onkologická léčba (s přispěním ANT) dosahuje vynikajících výsledků dlouhodobého přežití, do popředí stále více vystupuje zájem o předcházení i subklinického poškození myokardu, které může zvýšit riziko kardiovaskulárních komplikací v budoucnosti. Tato kapitola popisuje možnosti omezení toxicity ANT zaměřené zejména na kontrolu rizikových faktorů pro vznik ANT kardiotoxicity, ale výzkum se zaměřil i na

vývoj nových ANT derivátů s omezenou kardiotoxicitou a na farmakologické možnosti kardioprotekce.

1.3.1 OMEZENÍ KUMULATIVNÍ DÁVKY A DALŠÍCH RIZIKOVÝCH FAKTORŮ

Nejvýznamnějším rizikovým faktorem rozvoje chronických forem ANT kardiotoxicity je celkově dosažená (celoživotní) kumulativní dávka. Její omezení na méně než 300 mg/m^2 DOX může u pacientů bez dalšího kardiovaskulárního rizika vést k snížení rizika rozvoje klinicky manifestovaného srdečního poškození pod akceptovatelnou hranici 2 %. Nicméně současný pohled na tuto problematiku upozorňuje, že neexistuje žádná „bezpečná“ kumulativní dávka ANT a každé podání ANT představuje riziko (Menna a kol. 2012). Omezení celkové kumulativní dávky také může znamenat sníženou odpověď nádoru na terapii (Suter a Ewer 2013).

Dalším rizikovým faktorem jsou vysoké maximální plazmatické koncentrace ANT (c_{\max}), zejména po podání bolusové dávky. Nižší riziko kardiotoxicity bylo prokázáno při podání ANT kontinuální 12 - 24 hodinovou infuzí dospělým pacientům (van Dalen a kol. 2006), nicméně u dětí nebyl přínos dlouhodobých kontinuálních infuzí (6 - 48 hodin) prokázán (Lipshultz a kol. 2010).

1.3.2 POUŽITÍ ANTRACYKLINOVÝCH DERIVÁTŮ S NIŽŠÍ KARDIOTOXICITOU

Do současné doby bylo připraveno více než 2000 nových derivátů ANT antibiotik, na 600 z nich bylo dále studováno s vidinou možného zavedení do praxe se snahou dosáhnout přinejmenším stejné protinádorové účinnosti jako u DOX, při současně nižší kardiotoxicitě. Tato očekávání se bohužel naplnila pouze částečně ve formě EPI a IDA (Piekarski a Jelińska 2013). A ačkoli jsou často označovány jako deriváty s nižší kardiotoxicitou (zvláště EPI), i u nich bylo jak v preklinických, tak i v klinických studiích jasně prokázáno riziko rozvoje kardiotoxicity. Při užití kumulativních dávek zajišťující shodnou odpověď nádorového onemocnění se riziko kardiotoxicity jeví být obdobné jako u DAU, a proto je nelze označit za významně bezpečnější než ANT 1. generace (Carver a Desai 2010; Ewer a Ewer 2010; van Dalen a kol. 2010).

1.3.3 POUŽITÍ TERAPEUTICKÝCH SYSTÉMŮ S CÍLENOU DISTRIBUCÍ LÉČIVA

Jednou z dalších možností omezení ANT kardiotoxicity je snaha o cílenou distribuci ANT do nádorové tkáně. Tak zvaná pasivní cílená distribuce je založena na principu vyšší propustnosti kapilár vyživujících nádor při současně snížené lymfatické drenáži. Uvedená strategie umožňuje dosahovat mnohonásobně vyšších koncentrací částic

s vyšší molekulovou hmotností v nádorové tkáni než v ostatních tkáních. Do klinické praxe se tak dostaly přípravky s obsahem liposomálně enkapsulovaného DOX (Myocet; v pegylované formě Caelyx, Doxil), tak i DAU (DaunoXome). V porovnání s parentní látkou, vykazují liposomální formulace zřejmě nižší výskyt nespecifických (nauzea, zvracení) i specifických nežádoucích účinků, jako je chronická kardiotoxicita, při zachování protinádorové odpovědi (Airoldi a kol. 2011; Batist a kol. 2001; Leonard a kol. 2009; O'Brien a kol. 2004). Naopak použití pegylovaných forem liposomálních ANT je spojeno s výskytem specifických nežádoucích účinků jako je palmo-plantární syndrom (pálení pokožky dlaní a plosek nohou provázené erytémem, otoky a odlupováním pokožky) u téměř poloviny pacientů (Leonard a kol. 2009). Jinou možností pasivní cílené distribuce je konjugace DOX s biopolymerem (Seymour a kol. 2009; Sirova a kol. 2013) či albuminem (Kratz a Elsadek 2012; Unger a kol. 2007). Využití aktivní distribuce léčiva pomocí specifického ligandu nebo protilátky (Elbayoumi a Torchilin 2009) je stále ještě ve stádiu vývoje. Širšímu uplatnění terapeutických systémů s cílenou distribucí v klinické praxi však kromě omezeného množství dostupných informací brání také podstatně vyšší cena.

1.4 Farmakologická kardioprotekce antracyklinové kardiotoxicity

Vedle výše diskutovaných možností, jak omezit rizika rozvoje ANT kardiotoxicity, představuje možnost farmakologické kardioprotekce velmi zajímavou a intenzivně studovanou oblast výzkumu, která již přinesla léčiva schopná účinně ochránit myokard při zachování jejich vynikajících protinádorových účinků.

1.4.1 DEXRAZOXAN

Dexrazoxan (ICRF-187; DEX) představuje doposud jediné léčivo, u kterého byl jasně popsán signifikantní a nezpochybnitelný kardioprotektivní účinek proti ANT kardiotoxicitě jak při použití experimentálních modelů, tak i rozsáhlých kontrolovaných klinických studiích.

Dexrazoxan je S (+)-enantiomer razoxanu (ICRF-159), nejvýznamnějšího zástupce bisdioxopiperazinových derivátů studovaných v 60. letech minulého století jako potenciálního antineoplastika. Původním záměrem bylo vyvinout proléčiva EDTA pronikající do nádorových buněk. Předpokládalo se, že v intracelulárním prostoru se uvolní vlastní chelatačně aktivní látka, která bude inhibovat růst nádorových buněk na základě vyvázání klíčových biogenních iontů (Creighton a Birnie 1969). Později byl mechanismus

protinádorového účinku razoxanu a DEX vysvětlen jejich schopností reverzibilně inhibovat Top2, čímž způsobují zastavení buněčného cyklu nádorových buněk v G₂/M fázi a následně tak indukují apoptotickou smrt buňky, aniž by významně ovlivňovaly buněčný cyklus nenádorových buněk (Hellmann a Rhomberg 2010). Razoxan vykazoval slibné protinádorové účinky a jeho účinek byl hodnocen v mnoha klinických studiích (Poster a kol. 1980). Jeho největší nevýhodou byla jeho velmi špatná rozpustnost ve vodě. Z tohoto důvodu mohl být podáván pouze perorálně, kde však vykazoval jen omezenou biologickou dostupnost. Proto se pozornost přesunula od studia racemické směsi na jeho pravotočivý enantiomer – DEX, u kterého se udává až 5x lepší rozpustnost ve vodě umožňující intravenózní podání. Jeho kardioprotektivní účinek byl pozorován náhodně během preklinického vývoje při studiu jeho protinádorového účinku v kombinaci s ANT a doposud je jediným léčivem schváleným pro prevenci ANT kardiotoxicity (Cvetković a Scott 2005; Hellmann a Rhomberg 2010).

1.4.1.1 FARMAKOKINETIKA DEXRAZOXANU

Po *i.v.* podání DEX vykazuje velmi rychlou tkáňovou distribucí do většiny orgánů kromě mozku a varlat, dobře proniká buněčnými membránami a distribuuje se do celkové tělesné vody ($V_{d_{ss}} = 1,1$ l/kg). Nejvyšších koncentrací je dosaženo v játrech, ledvinách a srdci 2 - 4 hodin po podání. DEX je metabolizován uvnitř buněk pomocí dihydropyrimidin-aminohydrolázy a dihydroorotázy, které dvoufázově hydrolyticky štěpí pyrimidinové kruhy parentní látky za vzniku metabolitu ADR-925 s otevřenou strukturou (viz dále). Štěpení DEX je také možné i prostřednictvím neenzymatické hydrolyzy (Schroeder a kol. 2002). Pokles plazmatických koncentrací DEX probíhá ve dvou fázích s biologickým poločasem $t_{1/2\alpha} = 15$ minut, $t_{1/2\beta} = 140$ minut. Exkrece parentní látky i metabolitů není závislá na věku a probíhá v největší míře pomocí ledvin (48 %), a proto je nutná redukce dávek u pacientů s renálním selháním (Cvetković a Scott 2005; Wiseman a Spencer 1998). V průběhu preklinického i klinického hodnocení nebyla pozorována žádná významná farmakokinetická interakce mezi DEX a ANT (Basser a kol. 1994; Hochster a kol. 1992; Minotti a kol. 2004).

1.4.1.2 MECHANIZMUS KARDIOPROTEKTIVNÍHO ÚČINKU DEXRAZOXANU

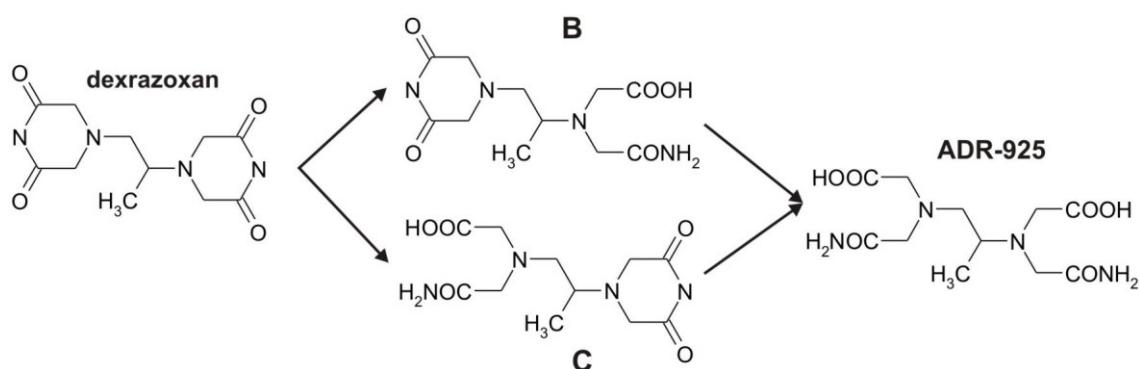
Mechanismus kardioprotektivního účinku dexrazoxanu není doposud přesně vysvětlen. Většina literatury ho spojuje s ochranou před oxidačním stresem, avšak některé

novější teorie prací naznačují možnost uplatnění zcela odlišných mechanismů, jako např. inhibice Top2 (Hasinoff a Herman 2007).

1.4.1.3 CHELATAČE IONTŮ ŽELEZA AKTIVNÍM METABOLITEM DEXRAZOXANU

Doposud nejčastěji uváděná teorie kardioprotektivního účinku je založena na konceptu DEX jako proléčiva. DEX totiž může být uvnitř kardiomyocytů metabolizován přes meziprodukty B a C na aktivní metabolit ADR-925 (Obr. 6), který je chemickou strukturou velmi podobný EDTA. ADR-925 má však oproti EDTA menší schopnost chelátovat Fe^{2+} (asociační konstanta 10^{10} vs. 10^{14} M^{-1}) i Fe^{3+} ionty (asociační konstanta 10^{18} vs. 10^{25} M^{-1}). Nicméně byla popsána schopnost ADR-925 rychle chelátovat volné ionty železa v buňce a hlavně odnímat tyto ionty z komplexu s ANT. Předpokládá se, že tímto mechanismem by měl aktivní metabolit DEX významně omezovat produkci ROS navozenou ANT a chránit tak před ANT kardiotoxicitou (Buss a Hasinoff 1993; Cvetković a Scott 2005; Hasinoff a Herman 2007; Malisza a Hasinoff 1996), včetně poškození mitochondriální DNA a následné mitochondriální dysfunkci (Lebrecht a kol. 2007).

Na druhou stranu podobnost chemické struktury ADR-925 s EDTA s sebou nese nízkou selektivitu chelatačního účinku a významnou redoxní aktivitu komplexu ADR-925 se železem (Thomas a kol. 1993), což může spolu s výsledky ze studií kardioprotektivních účinků selektivních chelátorů železa (Šimůnek a kol. 2009; Štěrbá a kol. 2013) hovořit spíše proti výše diskutované hypotéze.

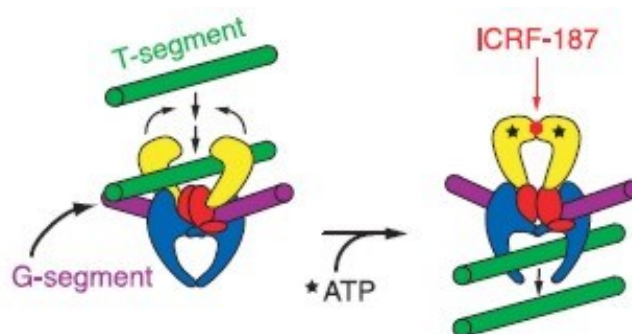


Obr. 6 Chemická struktura dexrazoxanu a jeho hydrolyza na aktivní metabolit ADR-925. B, C - hydrolytické meziprodukty vzniklé otevřením jednoho cyklu.

1.4.1.4 REVERZIBILNÍ INHIBICE TOPOIZOMERÁZY II

Dexrazoxan, stejně tak jako řada zástupců skupiny bisdioxopiperazinů patří mezi tzv. „katalytické“ inhibitory Top2. DEX se reverzibilně váže na enzym v blízkosti vazebného místa pro ATP, blokuje jeho hydrolyzu a zastavuje tak katalytický cyklus Top2. V tomto stavu má molekula Top2 uzavřenou horní „N-bránu“, zatímco spodní „DNA-

brána“ obsahuje ještě nerozštěpená vlákna DNA (Obr. 7). Snížení aktivity Top2 poté vede k zastavení buněčné replikace a následně k potlačení nádorového růstu, avšak na rozdíl od ANT a ostatních topoizomerasových jedů působením DEX nedochází ke kumulaci dvojitých zlomů v DNA (Andoh a Ishida 1998; Classen a kol. 2003; Tanabe a kol. 1991).



Obr. 7 Schématický náčrt inhibičního působení dexrazoxanu (ICRF-187) na molekulu topoizomerasy II β . T-segment - „transportní“ segment DNA vázající se na „N-bránu“, G-segment - štěpená část DNA v „ATP-bráně“. Převzato z Classen a kol. (2003).

1.4.1.5 HODNOCENÍ KARDIOPROTEKTIVNÍHO ÚČINKU DEXRAZOXANU V EXPERIMENTÁLNÍCH PODMÍNKÁCH

Z velkého množství experimentálních *in vitro* prací jsou pro studium kardioprotektivních mechanismů přínosné zejména studie provedené na izolovaných kardiomyocytech s užitím klinicky relevantních koncentrací ANT. Např. Sawyer a kol. (1999) ukázali na dospělých potkaních kardiomyocytech, že preinkubací buněk s DEX je možné předejít oxidačnímu stresu, poškození mitochondrií a programované buněčné smrti navozených klinicky relevantními dávkami DOX (0,1 - 2 $\mu\text{mol/l}$). Naopak při podání supraterapeutické dávky DOX (> 10 $\mu\text{mol/l}$) neměla již preinkubace s DEX žádný efekt na ochranu před nekrotickou buněčnou smrtí. Také Hasinoff a kol. (2003) pozorovali stejný protektivní účinek preinkubace DEX na izolovaných neonatálních kardiomyocytech vystavených působení DOX. Stejná skupina nicméně prokázala, že preinkubace buněk s ADR-925 (aktivním metabolitem DEX) není schopná navodit stejný či podobný účinek jako DEX, což bylo vysvětlováno nízkou lipofilitou metabolitu a tudíž omezenou penetrací do intracelulárního prostoru (Hasinoff a kol. 2003).

Větší význam při hodnocení kardioprotektivního účinku DEX má užití *in vivo* experimentálních modelů, které umožňují opakované podání ANT a komplexní studium rozvoje poškození myokardu za obdobných podmínek jako v klinické praxi. První práce z této oblasti byla publikována již koncem 70. let minulého století (Herman a kol. 1979) týkající se částečného omezení akutní toxicity ANT. Stejná skupina dále publikovala řadu

prací využívající jak zdravá zvířata (myš, potkan, křeček, králík, pes a miniprase), tak i zvířata se zvýšeným kardiovaskulárním rizikem jako jsou spontánně hypertenzní potkani (přehled vybraných studií viz Tab. 1) (Herman a Ferrans 1998). Tyto studie zcela jasně dokumentují kardioprotektivní potenciál DEX, který je zřejmý ze všech hodnocených parametrů - od přežití pokusných zvířat, funkční parametry srdce, histopatologický nálezn až po koncentrace biomarkerů srdečního poškození. Ze všech dostupných informací se zdá, že protektivní účinek je dlouhodobý a že se tedy nejedná pouze o zpomalení či dočasné odsunutí rozvoje srdečního poškození (Herman a kol. 1988c). Bylo též zjištěno, že DEX vykazuje tím větší kardioprotektivní účinky, čím bezprostředněji je podán před ANT (optimálně 30 minut předem nebo současně s aplikací ANT). Pozdější podání dexrazoxanu po aplikaci vede k snížení protektivního účinku (Herman a Ferrans 1993).

Tab. 1 Přehled vybraných studií hodnotících kardioprotektivní účinek dexrazoxanu na úrovni *in vivo*.

Species	ANT	Schéma podání ANT (mg/kg)	Schéma podání DEX (mg/kg)	Studie
Myš	EPI /DOX	1; <i>i.p.</i> , 1x týdný, 12 aplikací	12,5; <i>i.p.</i> , 30 min před ANT	Alderton a kol. 1992
Potkan	DOX	3; <i>i.v.</i> , 1x týdný, 5 aplikací	60; <i>p.o.</i> , 60 min před ANT	Květina a kol. 1997
Potkan	DAU	2,5; <i>i.v.</i> , 1x týdný, 6 aplikací	50; <i>i.p.</i> , 30 min před ANT	Cusack a kol. 2006
SHR	DOX	1; <i>i.v.</i> , 1x týdný, 12 aplikací	25; <i>i.p.</i> , 30 min před ANT	Herman a kol. 1988a
SHR	EPI	1,5; <i>i.v.</i> , 1x týdný, 12 aplikací	50; <i>i.p.</i> , 30 min před ANT	Dardir a kol. 1989
Králík	DAU	3,2; <i>i.v.</i> , 1x za 3 týdny, 5 aplikací	12,5 nebo 25; <i>i.p.</i> , 30 min před ANT	Herman a kol. 1981
Králík	DAU	3,2; <i>i.v.</i> , 1x za 3 týdny, 6 aplikací	25; <i>i.p.</i> , 30 min před ANT	Herman a Ferrans 1993
Králík	DAU	3; <i>i.v.</i> , 1x týdný, 10 aplikací	60; <i>i.p.</i> , 30 min před ANT	Šimůnek a kol. 2004
Miniprase	DOX	1,6; <i>i.v.</i> , 1x za 3 týdny, 6 aplikací	12,5; <i>i.p.</i> , 30 min před ANT	Herman a Ferrans 1983
Pes	DOX	1,75; <i>i.v.</i> , 1x za 3 týdny, 7 aplikací	25; <i>i.v.</i> , 30 min před ANT	Herman a kol. 1985
Pes	DOX	1,75; <i>i.v.</i> , 1x za 3 týdnů, po 90 týdnů	25; <i>i.v.</i> , 15 min před ANT	Herman a kol. 1988c

1.4.1.6 HODNOCENÍ KARDIOPROTEKTIVNÍHO ÚČINKU V KLINICKÝCH STUDIÍCH

Významný kardioprotektivní účinek DEX vůči chronické ANT kardiotoxicitě byl za posledních 20 let dokumentován celkem 18 rozsáhlými klinickými studiemi (Tab. 2), ve kterých nebyl zaznamenán žádný signifikantní rozdíl v kardioprotektivní odpovědi mezi dětmi a dospělými, mezi jednotlivými deriváty ANT nebo schémata podání. Podání DEX spolu s ANT signifikantně zabránilo rozvoji srdeční dysfunkce (echokardiograficky hodnocené frakční zkrácení či ejekční frakce), změnám na EKG záznamu

a kardiovaskulární mortalitě. Zároveň kombinace s DEX umožnila použití vyšších kumulativních dávek ANT bez zvýšení kardiovaskulárních rizik, což se např. u pacientek s pokročilým nádorem prsu projevilo lepší odpovědí na protinádorovou léčbu (Speyer a kol. 1992). Ze studie Elbla a kol. (2006) je patrná schopnost DEX chránit myokard i proti pozdnímu nástupu chronické ANT kardiotoxicity u pacientů, kteří přežili nádorové onemocnění v dětském věku. Stejně závěry je možné učinit i z jiných studií (Armstrong a kol. 2009; Lipshultz a kol. 2010; Oeffinger a kol. 2006; Zerra a kol. 2013). Ze studie Lipshultz a kol. také vyplývá, že 5 let po ukončení chemoterapie je protektivní schopnost DEX vyšší u dívek než chlapců. Z rozsáhlých metaanalýz klinických studií je patrný signifikantní vliv DEX na snížení celkové kardiotoxicity při protinádorové léčbě o 72 - 76 % (Seymour a kol. 1999; van Dalen a kol. 2011).

1.4.1.7 RIZIKO NEGATIVNÍHO OVLIVNĚNÍ PROTINÁDOROVÉ LÉČBY PŘI POUŽITÍ DEXRAZOXANU

Možnost ovlivnění protinádorového účinku ANT představuje od počátku používání DEX velmi diskutované téma. Recentní metaanalýza preklinických studií s DEX nezaznamenala negativní ovlivnění protinádorové aktivity ANT, navíc v řadě studií byl prokázán výrazný synergický vliv DEX na protinádorovou aktivitu ANT (Hellmann a Rhomberg 2010). Stejných výsledků bylo dosaženo i v klinických studiích, s výjimkou části studie publikované Swain a kol. (1997a), která významně zasáhla do osudu užití DEX v klinické praxi.

V této studii byly publikovány výsledky dvou randomizovaných, dvojitě zaslepených a placebem kontrolovaných studií III. fáze klinického hodnocení DEX (studie číslo 088001 a 088006). Výsledky obou studií se významně lišily v jednom z parametrů odpovědi nádoru na léčbu – v tzv. míře objektivní odpovědi (*objective response rate*, ORR). Zatímco v první studii (n = 190) nebyl shledán žádný vliv podávání DEX na ORR (p = 0,63) a průměrné hodnoty byly v DEX skupině spíše vyšší (54 % vs. 49 %), v druhé studii (n = 204) byla ORR signifikantně nižší oproti placebové skupině (47 % vs. 61 %, p = 0,019). Při následné analýze těchto dat ovšem bylo zjištěno, že hodnoty ORR získané u obou skupin v první studii (č. 088001) a u DEX skupiny ve studii č. 088006 lze s ohledem na předchozí data považovat za obvyklá. Naopak hodnotu ORR 61 % ve skupině dostávající placebo lze v dané situaci považovat za nečekaně vysokou (Swain a Vici 2004). Ani jedna z těchto studií navíc neshledala významný vliv DEX na žádný z dalších parametrů úspěšnosti protinádorové léčby jako je celková doba přežití nebo čas

do progresu onemocnění. Tyto skutečnosti významně zpochybňují interpretaci výsledků studie 088006, a to tím spíše, že tyto závěry neodpovídají výsledkům žádné z dosud provedených metaanalýz randomizovaných klinických studií, které jasně konstatují, že neexistuje žádný důkaz, že by DEX významně ovlivňoval protinádorový účinek chemoterapie obsahující ANT (Harake a kol. 2012; van Dalen a kol. 2011; Zerra a kol. 2013). Ani tato nová fakta nicméně nezměnila postoj řady odborníků a odborných společností a výše zmíněné argumenty jsou bohužel často zmiňovány jako argument proti užití DEX jako kardioprotektiva.

1.4.1.8 RIZIKO VZNIKU SEKUNDÁRNÍCH MALIGNIT PŘI POUŽITÍ DEXRAZOXANU

Riziko vyšší četnosti rozvoje sekundárních malignit bylo poprvé zmíněno v práci Tebbi a kol. (2007), která naznačila statisticky významné zvýšení incidence sekundárních malignit u dětských pacientů léčených kombinací DOX a jiných chemoterapeutik s DEX jako kardioprotektivem. Ve zmíněné studii byla zjištěná vyšší standardizovaná míra výskytu (tzv. *standardized incidence rate*) dalších maligních novotvarů za dobu 4 let (42 vs. 10; $p = 0,0231$). Následné diskuze, studie a rozsáhlé metaanalýzy tyto závěry ale nepotvrdily (Barry a kol. 2008; Hellmann 2007; Lipshultz a kol. 2010; van Dalen a kol. 2011) a zpochybnily vypovídající schopnost této studie. Nicméně regulační autority v Evropě a USA (EMA a FDA) vzaly výše uvedené potenciální riziko v potaz při rozhodování o užití DEX u dětí a kontraindikovaly jeho použití u všech dětí do 18 let (SPC Cardioxane 2012).

1.4.1.9 NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY DEXRAZOXANU

Při klinickém užití DEX je nutné počítat s jeho mírným cytostatickým účinkem, který ovšem může představovat významný zdroj nežádoucích účinků, opakovaně popisovaných v klinických studiích. Klinicky významný je především jeho myelosupresivní potenciál. Při podání s dalšími cytostatiky je nutné zvažovat i možný synergismus tohoto účinku (Wiseman a Spencer 1998). Kromě těchto závažných nežádoucích účinků může navodit množství méně závažných nežádoucích účinků, které však nijak významně neovlivňují jeho použití (SPC Cardioxane 2012).

Tab. 2 Přehled klinických studií hodnotících kardioprotektivní účinek dexrazoxanu.

Studie	Pacienti (-/+ DEX)	Nádor	Typ studie	CHT	ANT _{KUM} (-/+DEX)	Poměr ANT:DEX	Vliv na terapii
Speyer a kol. 1992	150 (I) (74/76)	CaM	rnd, nb	FDC	441/500	20:1	ne
Bu'Lock a kol. 1993	10 (I) (5/5)	různé	n-rnd, FI	D	439/925	10:1	ne
Kolaric a kol. 1995	212	CaM	n-rnd, FII	FDC	- /311	20:1	ne
Jelić a kol. 1995	35	CaM	n-rnd	FDC	nespec.	20:1	ne
Wexler a kol. 1996	38 (I) (18/20)	ESF	rnd	DVC	310/410	20:1	ne
Venturini a kol. 1996	160 (78/82)	CaM	rnd	FEC	713/702	10:1	ne
Lemež a Marešová 1996	7	rAML	n-rnd	DAU/MX	- /650	8-13:1 ^{DAU} 40-60:1 ^{MX}	ne
Swain a kol. 1997b	534	CaM	rnd, db, plc, F- III	FDC	nespec.	10:1	ano/ne 204/190
Swain a kol. 1997a	201 (99/102 [#])	CaM	rnd, plc [#] , FIII	FDC	nespec.	10-20:1	ne
Schiavetti a kol. 1997	30 (I) (15/15)	S	n-rnd	D/E/ DAU	309/340 ^{D/DAU} 270/280 ^E	20:1 ^{D/DAU} 10:1 ^E	ne
Lopez a kol. 1998	129 (66/63)	CaM+S TS	rnd, nb	E	880/960	6,25:1	ne
Sparano a kol. 1999	25	CaM	n-rnd, FI	D+P	- /360	10:1	ne
Michelotti a kol. 2000	127 (64/63)	CaM	rnd	E	- /720	10:1	ne
Lipshultz a kol. 2004, 2010	206 (I) (101/105)	ALL	rnd	D	300/300	10:1	ne/ne
Elbl a kol. 2006	108 (40/68)	AxL	n-rnd	C+D/DAU	250/277	20:1	ne
Elbl a kol. 2005	75 (I) (29/53)	AxL, S	n-rnd	D/ DAU	208/234	20:1	ne
Marty a kol. 2006	164 (79/85)	CaM	rnd, FIII, nb	D/E	608/669	10:1	ne
de Matos Neto a kol. 2006	55 (I) (37/18)	OS	n-rnd	D + xPt	345/405	20:1	ne

I – děti; CaM - karcinom prsu, ESF – nádor z rodiny Ewingových sarkomů, rAML – relaps akutní myeloidní leukémie, S – sarkom, OS – osteosarkom, STS – sarkom měkkých tkání, ALL - akutní lymfocytární leukémie, AxL - různé akutní leukémie; (n-)rnd - (ne)randomizovaná studie, F - fáze klinické studie, nb - nezáslepená studie, db - dvojitě záslepená studie, plc - placebo; # - placebo od kumulativní dávky doxorubicinu 300 mg/m² nahrazeno dexrazoxanem; D - doxorubicin, C - cyklofosfamid, FDC – 5-fluoruracil + doxorubicin + cyklofosfamid, DVC - doxorubicin + vinkristin + cyklofosfamid, FEC - 5-fluoruracil + epirubicin + cyklofosfamid, MX – mitoxantron, P - paklitaxel, xPt – cisplatina a karboplatina; ANT_{KUM} - průměrná kumulativní dávka ANT v mg/m².

1.4.1.10 UŽITÍ DEXRAZOCHANU V SOUČASNÉ KLINICKÉ PRAXI

I přes dobře zdokumentované benefity plynoucí z užití DEX a absenci solidních důkazů o významných rizicích spojených s jeho užitím, je názor odborné veřejnosti na širší užití tohoto kardioprotektiva stále nejednotný (Walker a kol. 2013). V posledním doporučení *American Society for Clinical Oncology* je použití DEX doporučeno po individuálním zvážení lékaře u pacientek s metastazujícím karcinomem prsu nebo u pacientů s jinými malignitami pouze pokud kumulativní dávka přesáhne 300 mg/mg² DOX nebo 540 mg/m² EPI (Hensley a kol. 2009). Naproti tomu existuje obecně uznávaný

konsenzus, že každá ANT dávka představuje riziko a že neexistuje žádná „bezpečná“ dávka ANT (Ewer a Yeh 2006; Menna a kol. 2012). Podobně tak všechny provedené klinické studie i jejich následné metaanalýzy (Lipshultz a kol. 2010; Moghrabi a kol. 2007; Swain a Vici 2004; van Dalen a kol. 2011) jednoznačně potvrdily přínos podávání DEX bez snížení ANT protinádorové odpovědi a jeho podání od první dávky ANT jako optimální, což potvrdila i řada experimentálních studií (Herman a Ferrans 1998).

V České republice je DEX používán s výše uvedenými omezeními a je registrován pro prevenci chronické kumulativní ANT kardiotoxicity u pacientů s pokročilým metastazujícím nádorem léčených DOX nebo EPI, kteří prodělali předchozí léčbu ANT. DEX se obvykle podává v 10 - 20násobné dávce k dávce ANT, tedy 500 - 1000 mg/m² půl hodiny před aplikací ANT. Dostupnost DEX pro ochranu myokardu pediatrických pacientů léčených ANT se ještě zhoršila na základě stanoviska FDA a EMEA k potenciálnímu riziku vyššího výskytu sekundárních malignit, který vedl ke kontraindikaci DEX v této populaci (SPC Cardioxane 2012). Síla důkazů pro tato opatření regulátorů je sporná a toto rozhodnutí se jeví jako značně kontroverzní. Na druhou stranu, ve světle existence nových dat, přislíbili zodpovědní zástupci obou agentur přehodnocení tohoto rozhodnutí (Walker 2012).

1.4.2 ANTIOXIDANTY A ZHÁŠEČE VOLNÝCH KYSLÍKOVÝCH RADIKÁLŮ JAKO KARDIOPROTEKTIVA

Výzkum farmakologické kardioprotekce byl vzhledem k převládajícímu názoru o významu ROS orientován již od počátku zejména na zhášeče ROS a antioxidanty. Bohužel dosažené výsledky řady *in vitro* i *in vivo* studií jsou jen obtížně přenositelné do klinické praxe, protože užívaly neadekvátní experimentální modely (akutní modely ANT kardiotoxicity s podáním jediné supratherapeutické nebo dokonce celé kumulativní kardiotoxické dávky v jedné aplikaci). Výsledky dosažené za těchto podmínek jsou pak často protichůdné k těm, které byly získány na relevantnějších chronických modelech (Ammar a kol. 2011; Herman a kol. 1985; Popelová a kol. 2009; Saad a kol. 2001; Yoda a kol. 1986).

Vitamín E (α -tokoferol) patří mezi jednu z nejznámějších látek vyznačující se silnými antioxidačními účinky, relativně nízkou toxicitou a dobrým průnikem do kardiomyocytů. Tato látka opakovaně vykazovala na akutních modelech protektivní účinky proti ANT navozenému poškození srdce a zlepšení celkového přežití (Myers a kol. 1976; Wang a kol. 1980). Při užití vitamínu E na relevantních modelech chronické ANT

kardiotoxicity však byly zjištěny žádné nebo minimální kardioprotektivní účinky (Berthiaume a kol. 2005; Breed a kol. 1980; Milei a kol. 1986; Van Vleet a Ferrans 1980b) a taktéž při kontrolovaných klinických studiích nebyla zaznamenána signifikantní kardioprotekce (Dorr 1996; Legha a kol. 1982a).

Další studovanou látkou byl **N-acetylcystein**, u kterého byly pozorovány *in vivo* jisté kardioprotektivní účinky při podání vysokých dávek (2000 mg/kg) na akutním modelu ANT kardiotoxicity (Doroshov a kol. 1981). Avšak při použití klinicky relevantnějších koncentrací (140 - 200 mg/kg) nebyl schopen zabránit rozvoji chronické ANT kardiotoxicity (Herman a kol. 1985; Unverferth a kol. 1981) a stejně negativně dopadly i randomizované klinické studie, kde též nebyl pozorován žádný kardioprotektivní účinek (Dresdale a kol. 1982; Myers a kol. 1983).

Přírodní látky ze skupiny **flavonoidů** a jejich semi- a syntetické deriváty představovaly další intenzivně studované kandidáty na potenciální kardioprotektiva. Látky flavonoidní struktury vykazují přímé i nepřímé antioxidační účinky. Nejvýznamnější kardioprotektivní účinky byly popsány u semisyntetických flavonoidních derivátů frederinu a 7-monohydroxyethylrutosidu (monoHER). Tyto látky opakovaně prokázaly protektivní účinek nejenom v *in vitro* (Kaiserová a kol. 2007), ale i v relevantních *in vivo* experimentech. Taktéž nebylo pozorováno jejich negativní ovlivnění protinádorového působení DOX (van Acker a kol. 2000, 2001). Nicméně dlouhodobější studie ukázaly na krátkodobý charakter (< 6 měsíců) kardioprotektivního účinku monoHER (Bruynzeel a kol. 2007b) a ani následná klinická studie neprokázala významný kardioprotektivní účinek (Bruynzeel a kol. 2007a).

Kardioprotektivní účinek byl pozorován i u **probukolu**, dnes již obsolentního hypolipidemika, který vykazuje značné antioxidační schopnosti. V *in vivo* experimentech dokázal probukol ochránit myokard pokusných potkanů před opakovanou expozicí DOX (Li a kol. 2000; Siveski-Iliskovic a kol. 1994), aniž by interferoval s jeho protinádorovou aktivitou (Siveski-Iliskovic a kol. 1995). Probukol ale může signifikantně zvyšovat celkovou clearance DOX, což by mohlo vést jak k snížení kardiotoxicity, tak i jeho protinádorové účinnosti (El-Demerdash a kol. 2003). Ačkoliv bylo následně publikováno několik vědeckých studií o kardioprotektivním účinku probukolu (Ludke a kol. 2009), pro konečné zhodnocení potenciálu této látky bude potřeba další studium, zejména se zaměřením na dlouhodobé modely chronické kardiotoxicity a možné ovlivnění farmakokinetiky ANT.

U **melatoninu** byl sledován určitý kardioprotektivní účinek proti nízkým kumulativním dávkám DOX, vyjádřený zejména potlačením apoptózy. Nicméně pilotní studie naznačily, že potlačení apoptózy by se mohlo uplatnit i v nádorové tkáni a ovlivnit tak výsledný cytostatický účinek (Aydemir a kol. 2010).

S ohledem na možný význam Nrf2 signální kaskády je nutné zmínit, že doposud nebyl systematicky studován kardioprotektivní účinek tzv. **nepřímých antioxidantů**, které aktivují Nrf2 kaskádu. U řady léčiv, kde lze z literárních údajů očekávat aktivaci Nrf2 kaskády (např. flavonoidní látky), nebyl nakonec s použitím relevantního modelu chronické ANT kardiotoxicity zaznamenán přesvědčivý kardioprotektivní účinek (viz výše). Nicméně přímá souvislost mezi účinnou aktivací protektivní Nrf2 kaskády a kardioprotekcí vůči ANT kardiotoxicitě vyžaduje další studium.

1.4.3 SELEKTIVNÍ CHELÁTORY ŽELEZA

Protože intracelulární chelatace iontů železa patří mezi hlavní teorie kardioprotektivního účinku DEX, byla velká pozornost věnována studiu selektivních biokompatibilních chelátorů železa. Pro účinnou kardioprotekci je totiž mnohem výhodnější přímo zabránit vzniku ROS, než je následně relativně obtížně zhaset. Nejčastěji používaný chelátor železa v klinické praxi, **deferoxamin** (DFO), ale nebyl schopen navodit významnou kardioprotekci na osvědčeném experimentálním modelu (Herman a kol. 1994), což bylo vysvětlováno jeho omezeným průnikem do kardiomyocytů a krátkým biologickým poločasem. Další výzkum se tedy zaměřil především na lipofilnější intracelulární chelátory železa, jakými jsou deriváty aroylhydrazonů a deferipron.

Aroylhydrazony (např. **salicylaldehydisonikotinoylhydrazonu** - SIH, **pyridoxal 2-chlorbenzoylhydrazon** – PIH a **pyridoxal 2-chlorbenzoylhydrazon** - o-108) jsou účinnými a selektivními chelátory iontů železa v podmínkách jak *in vitro*, tak i *in vivo*. Na rozdíl od EDTA však vzniknuvší komplexy nevykazují redoxní aktivitu a nevedou k následné tvorbě ROS (Buss a kol. 2002; Horackova a kol. 2000). Aroylhydrazony se navíc vyznačují nízkou toxicitou, malou molekulou s dostatečnou lipofilitou umožňující výborný průnik do buněk (Buss a kol. 2002) a zejména vynikajícími antioxidantními vlastnostmi (Bhattacharya a kol. 1997; Hermes-Lima a kol. 2000; Horackova a kol. 2000; Šimůnek a kol. 2005). Deriváty aroylhydrazonů byly v naší laboratoři studovány na modelu chronické ANT kardiotoxicity u králíka s různým časovým odstupem od podání DAU a v různých dávkách: PIH (25 a 50 mg/kg, *i.p.*, 60 minut), o-108 (10 a 25 mg/kg, *i.p.*, 30 minut) a SIH (0,5, 1 a 2,5 mg/kg, *i.v.*, 10 minut). U všech studovaných látek byl

pozorován určitý signifikantní kardioprotektivní účinek z hlediska srdeční funkce, morfologie a celkového přežití, nicméně pouze při nízkých dávkách chelátorů. Pouhé 2,5násobné zvýšení dávek vedlo ke ztrátě kardioprotektivního účinku u přeživších zvířat, a to bez ohledu na strukturu aroylhydrazonů, způsob aplikace i časový odstup od podání cytostatika (Šimůnek a kol. 2005; Štěrbá a kol. 2006, 2007). Absence dávkové závislosti protektivního účinku byla následně prokázána i v podmínkách *in vitro* (Šimůnek a kol. 2008).

Deferipron je perorálně účinný chelátor železa pronikající do kardiomyocytů, který je v současnosti registrován pro léčbu stavů spojených s přetížením organismu železem (Fisher a kol. 2013). Komplexy deferipronu se železem nepodstupují redoxní cyklizaci a nevytváří tak ROS. Kardioprotektivní účinky deferipronu vůči ANT kardiotoxicitě byly opakovaně popsány v *in vitro* experimentech. V práci Link a kol. (1996) byl významný protektivní účinek pozorován pouze u kardiomyocytů přetížených železem, zatímco toxicita ANT nebyla u intaktních kardiomyocytů deferipronem významně ovlivněna. Slibné protektivní účinky naznačovala i studie provedená na izolovaných síních, nicméně s užitím supratherapeutických koncentrací ANT (Xu a kol. 2006). Taktéž s užitím relevantního *in vivo* modelu chronické ANT kardiotoxicity byla v naší laboratoři jasně demonstrována absence významného kardioprotektivního potenciálu v terapeuticky využitelném dávkovacím rozmezí (Popelová a kol. 2008). Je tedy možné, že samotná chelatace iontů železa nemusí být jediným určujícím faktorem pro úspěšnou kardioprotekci.

1.4.4 BETA-BLOKÁTORY

Beta-blokátory jsou dnes nedílnou součástí léčby srdečního selhání různé etiologie včetně toho navozeného ANT kardiotoxicitou. Některé studie ovšem naznačují, že by tyto látky mohly chránit i před samotným vznikem kardiotoxicity. Experimentálně i v klinické praxi byly bez úspěchu testovány **atenolol** (Oliveira a kol. 2004) nebo **metoprolol** (Georgakopoulos a kol. 2010). Náznak kardioprotektivního účinku byl zaznamenán na izolovaném potkaním srdci za použití **nebivololu** (de Nigris a kol. 2008).

Nejnámější látkou v této souvislosti je **karvedilol**, který se od ostatních beta-blokátorů odlišuje zejména svými antioxidačními účinky. V experimentálních podmínkách dokázal karvedilol signifikantně snížit DOX navozenou mortalitu a srdeční dysfunkci u potkanů (Matsui a kol. 1999) a zabránit rozvoji charakteristických histopatologických známek ANT kardiotoxicity (Oliveira a kol. 2004). Na H9c2 myoblastech karvedilol

signifikantně snížil ANT navozenou toxicitu, oxidační stres a potlačil apoptózu (Spallarossa a kol. 2004). Na stejné buněčné linii byla dokumentována i schopnost karvedilolu parciálně inhibovat mitochondriální komplex I a zvyšovat tak odolnost buňky k oxidačnímu poškození zejména při reperfučním poškození (Sgobbo a kol. 2007). Pilotní randomizovaná klinická studie hodnotila účinek dlouhodobého podávání karvedilolu (12,5 mg/den po 6 měsíců) u pacientů léčených relativně vysokými kumulativními dávkami DOX ($\approx 520 \text{ mg/m}^2$) a EPI ($\approx 780 \text{ mg/m}^2$) (Kalay a kol. 2006). Byla pozorována signifikantní schopnost karvedilolu zabránit jak systolické, tak i diastolické srdeční dysfunkci navozené ANT. Nicméně další výzkum a klinické studie bude ještě nutné doplnit pro konečné zhodnocení těchto slibných kardioprotektivních účinků.

1.4.5 ANORGANICKÉ DUSIČNANY/DUSITANY

V poslední době je značná pozornost věnována kardioprotektivním účinkům anorganických dusitanů (nitritů) a dusičnanů (nitrátů). Tento účinek byl poměrně dobře popsán na modelu ischemicko-reperfučního poškození (Calvert a Lefer 2009). Podstata kardioprotektivního působení stále není zcela vysvětlena, ale předpokládá se reverzibilní S-nitrosylace klíčových myokardiálních proteinů s následnou změnou jejich funkce zprostředkovanou uvolněním NO. Spekuluje se o reverzibilní inhibici komplexu I vedoucího ke zpomalení průchodu elektronů dýchacím řetězcem, omezení tvorby ROS, aktivace guanylátcyklázy či proteinkinázy G (Burwell a kol. 2009; Sgobbo a kol. 2007). Nedávno uveřejněná publikace v jednom z nejprestižnějších kardiologických časopisů popisovala protektivní účinky anorganického dusičnanu podávaného s dietou vůči DOX navozenému akutnímu poškození myokardu u myši (Zhu a kol. 2011). Předpokládá se, že dietou podávané anorganické dusičnany jsou přeměňovány působením mikroflóry v GIT na dusitany, které jsou pak zodpovědné za kardioprotektivní účinky. Ačkoliv tato studie rozpoutala četné debaty o možnosti klinického využití této strategie, její význam pro klinicky relevantnější chronické formy kardiotoxicity či klinickou praxi není dosud znám.

1.4.6 ACE-INHIBITORY

Zprávy o možném protektivním účinku inhibitorů angiotenzin konvertujícího enzymu (ACEi) přinesla studie hodnotící účinek těchto léčiv u pacientů se zvýšenými plazmatickými koncentracemi srdečního troponinu I po vysokodávkované chemoterapii ANT, kde byl enalapril nasazen měsíc po ukončení chemoterapie (Cardinale a kol. 2006).

U těchto pacientů došlo k signifikantnímu snížení výskytu systolické dysfunkce. Naopak pilotní klinická studie ukázala, že profylaktické podávání enalaprilu již od začátku ANT chemoterapie nemělo signifikantní vliv na rozvoj kardiotoxicity (Georgakopoulos a kol. 2010). Z dostupných informací tedy není jisté, zda ACEi pouze nezpomalují progresi ANT navozených změn.

1.4.7 OSTATNÍ LÁTKY

Pilotní klinická studie realizovaná na malém počtu pacientů srovnávající kardioprotektivní účinky trimetazidinu s DEX (Tallarico a kol. 2003) naznačila, že by účinek trimetazidinu na omezení diastolické dysfunkce nemusel být nižší než u DEX. Nicméně interpretace této studie je vzhledem k použité metodice obtížná. Naopak experimentální studie používající chronický model ANT kardiotoxicity nezjistila žádný protektivní účinek (Perletti a kol. 1989).

Potenciálně kardioprotektivní účinek řady dalších látek byl hodnocen *in vivo* s užitím opakovaného podání ANT ve zrychlených schématech (podání celé kumulativní dávky v průběhu několika dnů) nebo ve vysokých dávkách. Tyto výsledky bude nutno ověřit s užitím standardních chronických modelů a klinických studií, které umožní formulovat jednoznačné závěry. To platí například o účinku erythropoetinu (Hamed a kol. 2006; Chen a kol. 2007), trombopoetinu (Li a kol. 2006), sildenafilu (Das a kol. 2010; Fisher 2005), tadalafilu (Koka a kol. 2010) či rimonabantu - antagonistů kanabinoidních CB1-receptorů (Mukhopadhyay a kol. 2010).

V průběhu posledních 40 let bylo publikováno nepřeberné množství experimentálních studií pojednávajících o kardioprotektivním účinku široké palety látek s převážně antioxidačním účinkem na akutním modelu ANT kardiotoxicity: od vitamínu C (Fujita a kol. 1982), vitamínu A (Tesoriere a kol. 1994) a erdosteinu (Fadillioglu a kol. 2003), přes různé zástupce flavonoidů a jejich deriváty (Chlopčíková a kol. 2004a, 2004b; Mojžišová a kol. 2009; Psotová a kol. 2004; Sadzuka a kol. 1997), kurkumin (Venkatesan 1998), až po extrakt ze semen grepu (Bagchi a kol. 2003) či vyzrálého česneku (Alkreaty a kol. 2010). Nicméně klinická relevance těchto výsledků bez podpory dalších studií s užitím relevantních modelů je velmi sporná.

2 CÍLE PRÁCE

Cíle dizertační práce:

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

3 PŘEHLED POUŽITÝCH METOD

3.1 Pokusná zvířata

Jako pokusná zvířata byli použiti samci králíka Činčily velké (dodavatel Velaz, Koleč u Kladna, Česká republika) o počáteční hmotnosti $\approx 3,5$ kg a stáří 3 měsíců. Králíci byli ustájeni ve viváriu Lékařské fakulty v Hradci Králové za standardních podmínek (teplota 15 - 21°C, vlhkost vzduchu 50 – 60 %, 12hodinový světelný cyklus), s volným přístupem k pitné vodě a standardní laboratorní dietě. Veškerá manipulace s pokusnými zvířaty byla prováděna v souladu s platnou legislativou o práci s laboratorními zvířaty a jejich ochraně proti týrání a schválena Odbornou komisí pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat při Lékařské fakultě v Hradci Králové.

3.2 Použitá léčiva a chemikálie

Léčiva používaná v průběhu *in vivo* experimentu byla získána jako hromadně vyráběné léčivé přípravky prostřednictvím lékárenské distribuční sítě: daunorubicin (Daunoblastina, Pfizer, Itálie), dexrazoxan (Cardioxane, Novartis, Švýcarsko), ketamin (Narketan, Vétoquinol AG, Švýcarsko), midazolam (Midazolam Torrex, Torrex Chiesi Pharma, Rakousko) a fyziologický roztok (Natrium chloratum, Biotika, Slovenská republika).

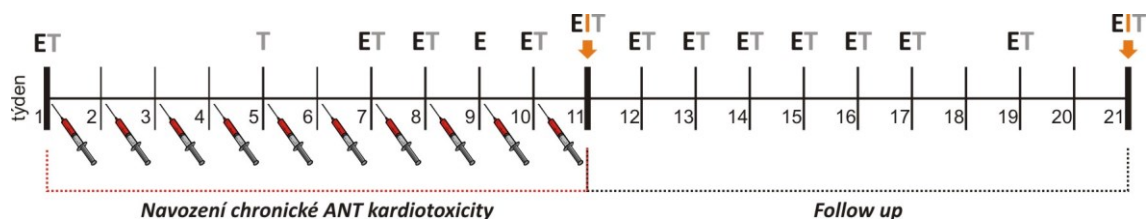
Chemikálie používané pro jednotlivé analýzy byly v odpovídající čistotě a kvalitě vyžadované pro HPLC, Western blot, PCR či ostatní molekulárně biologické stanovení. Pokud není uvedeno jinak, použité chemikálie byly získány od firmy Sigma-Aldrich (MO, USA).

3.3 Anestezie

Anestezie byla používána pro veškeré experimentální procedury včetně aplikace látek a odběrů krve. Pro echokardiografické měření, aplikace látek a odběry vzorků krve byla zvolena lehká kombinovaná anestezie ketamin (30 mg/kg, *i.m.*) a midazolam (5 mg/kg, *i.m.*). Pro závěrečné invazivní hemodynamické vyšetření byla použita chirurgická pentobarbitalová anestezie (30 mg/kg, *i.v.*) titrovaná individuálně při současném monitorování saturace krve kyslíkem pomocí pulsní oxymetrie (Nonin 8500A, Nonin Medical, MI, USA) a podávání kyslíku pro dýchání maskou. Pentobarbital byl též použit pro předávkování zvířat na konci pokusu.

3.4 Navození chronické antracyklinové kardiotoxicity u králíka s následným sledováním zvířat po ukončení podávání cytostatika (*follow up*)

Chronická ANT kardiotoxicita byla navozena u pokusných králíků opakovaným podáváním daunorubicinu (DAU, 3 mg/kg, vždy 1x týdně po 10 týdňů, n = 27) (Geršl a kol. 1996; Šimůnek a kol. 2004). Jednotlivá dávka DAU odpovídala $\approx 50 \text{ mg/m}^2$, tj. kumulativní dávka dosažená v experimentu byla $\approx 500 \text{ mg/m}^2$. Kontrolní skupina dostávala fyziologický roztok ve stejném schématu (K, 1 ml/kg, n = 19). Látky byly aplikovány intravenózně do *v. auricularis marginalis*, v případě DAU pomocí kanyly (BD Neoflon IV Catheter 24 G, Becton Dickenson, Velká Británie). Týden po poslední aplikaci látek (tj. na začátku 11. týdne) byla zvířata v obou skupinách randomizována k provedení hemodynamického vyšetření a usmrcení, nebo k dalšímu 10týdennímu sledování tzv. *follow up* (FU) (DAU FU, n = 11 a K FU, n = 10). Echokardiografické vyšetření bylo provedeno na začátku pokusu, před 7. – 10. aplikací látek a každý týden v období FU s výjimkou 18. a 20. týdne. Ve stejných intervalech byla odebírána i krev pro stanovení plazmatických koncentrací srdečního troponinu T. Přehledné schéma modelu chronické ANT kardiotoxicity je na Obr. 8.

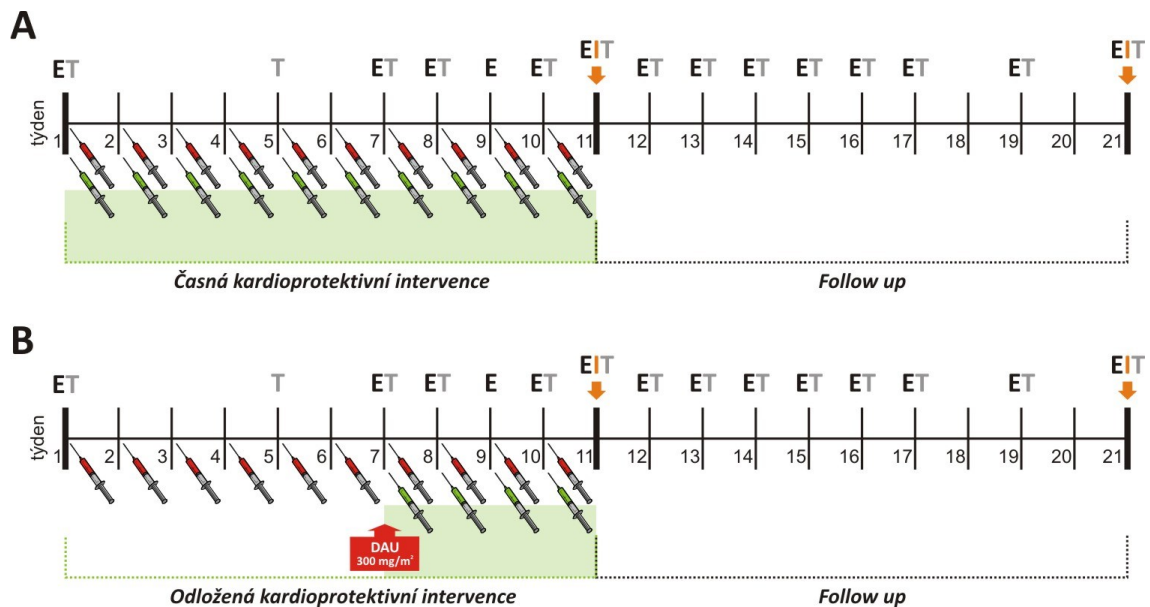


Obr. 8 Schéma navození chronické ANT kardiotoxicity u králíka a následného sledování *follow up*. Červené injekce představují aplikaci DAU, oranžová šipka randomizaci zvířat. E – echokardiografické vyšetření; T – stanovení koncentrace srdečního troponinu T v plazmě; I – invazivní hemodynamické vyšetření srdce.

3.5 Studium časně a odložené kardioprotektivní intervence pomocí dexrazoxanu

Pro studium kardioprotektivních účinků DEX byl použit výše uvedený model chronické ANT kardiotoxicity u králíka s následným sledováním po ukončení expozice látkami. DEX byl pokusným zvířatům (n = 31) podáván v dávce 60 mg/kg, *i.p.*, vždy 30 min před podáním DAU ve dvou schématech, které odpovídají časně a odložené kardioprotektivní intervenci. Ve schématu časně kardioprotekce (viz obr. 2A) bylo podávání dexrazoxanu zahájeno od první dávky DAU (DD₁, n = 16), zatímco v odloženém

schématu (viz obr. 2B) byl DEX podáván až od 7. dávky DAU (DD₇, n = 15), tj. po překročení kumulativní dávky $\approx 300 \text{ mg/m}^2$ DAU. Týden po poslední aplikaci látek byla zvířata z obou skupin opět rozdělena. První část zvířat byla určena k hemodynamickému vyšetření srdce a usmrcení, zatímco druhá část byla sledována dalších 10 týdnů (DD₁ FU, n = 8 a DD₇ FU, n = 8). Přehledné schéma tohoto pokusu je uvedeno na Obr. 9.



Obr. 9 Schéma pokusu studia časně a odložené kardioprotektivní intervence pomocí dexrazoxanu vůči chronické ANT kardiotoxicitě u králíka s následným sledováním zvířat po ukončení expozice látkami (follow up). Červené injekce představují aplikaci DAU, zelené aplikaci DEX, oranžová šipka randomizaci zvířat. E – echokardiografické vyšetření; T – stanovení koncentrace srdečního troponinu T v plazmě; I – invazivní hemodynamické vyšetření srdce.

3.6 Přežití zvířat a hodnocení celkové toxicity

Celková toxicita podávaných látek a jejich kombinace byla hodnocena pomocí parametrů, jako jsou změna tělesné hmotnosti pokusných zvířat v průběhu experimentu (hodnoceno týdně), nápadné změny v příjmu potravy nebo chování (hodnoceno denně). Přežití pokusných zvířat bylo hodnoceno v průběhu podávání látek standardním způsobem, zatímco v průběhu následného sledování zvířat po ukončení expozice (FU) byl pokus ukončen dle předem definovaného kritéria, tj. při poklesu frakčního zkrácení levé komory (LVFS) pod 20 %. Tento přístup byl zvolen z důvodu snížení počtu případných předčasných úhynů zvířat pro dekompenzované srdeční selhání v období FU a případné ztráty vzorku myokardu pro plánované analýzy. Hodnota LVFS byla zvolena na základě dlouhodobých předchozích zkušeností naší laboratoře, které indikovaly vysokou pravděpodobnost předčasného úhynu při poklesu tohoto parametru systolické srdeční funkce pod stanovenou mez.

3.7 Pitva a odběr vzorků

Po předávkování, nebo po předčasném úhynu pokusných zvířat byla provedena pitva. Během pitvy byly sledovány známky městnavého srdečního selhání, jako je přítomnost výpotku v dutině břišní a hrudní a množství perikardiálního výpotku. Srdce bylo neprodleně vyjmuto a krátce retrográdně propláchnuto ledovým fyziologickým roztokem. Po zvážení srdce byly odebrány 2 transverzální řezy levé a pravé komory pro histopatologické vyšetření. Zbytek LK byl šokově zmrazen v tekutém dusíku a uschován při -80°C . Myokard LK byl následně homogenizován pod tekutým dusíkem a jednotlivé vzorky skladovány při -80°C do provedení jednotlivých analýz.

3.8 Neinvazivní hodnocení srdeční funkce

Srdeční funkce byla u pokusných zvířat sledována neinvazivně pomocí echokardiografického vyšetření v předem stanovených intervalech. K vyšetření byl použit echokardiografický systém Vivid 4 vybavený 10 MHz sondou (GE Healthcare, Velká Británie). Levý parasternální přístup byl zvolen pro zobrazení levé komory (LK) v dlouhé a krátké ose a vlastní vyšetření LK probíhalo v tzv. M-módu při současné kontrole vyšetřované roviny pomocí dvourozměrného zobrazení. V průběhu všech měření bylo též orientačně snímáno standardní končetinové EKG pomocí subkutánně umístěných jehel. Na základě vyhodnocení M-mód záznamů byl stanoven rozměr LK na konci systoly (LVESD) a konci diastoly (LVEDD) a tyto parametry byly použity pro výpočet frakčního zkrácení levé komory (LVFS) podle příslušné rovnice (3). Pro vyhodnocení byly vybrány nejméně tři nezávislé záznamy a na každém z nich byly hodnoceny nejméně čtyři srdeční cykly.

$$LVFS (\%) = \frac{LVEDD - LVESD}{LVEDD} \cdot 100 \quad (3)$$

3.9 Invazivní hodnocení srdeční funkce

Na konci pokusu bylo v chirurgické anestézii provedeno invazivní hemodynamické vyšetření srdce. Po preparaci *a. carotis sinistra* byl do LK zaveden Mikro-Tip katetr (2.3F, Milar Instruments, TX, USA) pro přesné a přímé hodnocení změn tlaku v průběhu srdečního cyklu. Katetr byl připojen k sběrné stanici PowerLab/8SP (ADInstruments, Austrálie) vybavené speciálním softwarem Chart 5.4.2 (ADInstruments)

umožňující výpočet maximálních změn tlaku v isovolumické fázi systoly a diastoly a určení indexů systolické (dP/dt_{max}) a diastolické (dP/dt_{min}) funkce LK. Pomocí polyetylenové kanyly napojené na senzor MLT0380/D (ADInstruments) byl současně měřen krevní tlak ve vypreparované *a. femoralis dextra*. Záznam invazivního hemodynamického vyšetření byl proveden po náležité stabilizaci zvířete po preparaci (cca 15 min).

3.10 Stanovení srdečního troponinu T

Vzorky krve pro stanovení koncentrace srdečního troponinu T v plazmě byly v průběhu experimentu odebírány z *a. auricularis centralis* a na konci pokusu z vypreparované *a. femoralis*. Koncentrace srdečního troponinu T byly měřeny v heparinizované plazmě pomocí komerčně dostupného kitu Elecsys Troponin T hs assay kit (Roche Diagnostics, Švýcarsko). Limit pro kvantifikaci byl 0,003 $\mu\text{g/l}$. Stanovení koncentrace srdečního troponinu T bylo provedeno ve spolupráci s Ing. Jaroslavou Vávrovou, PhD. v akreditované laboratoři Ústavu klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice Hradec Králové.

3.11 Histologické vyšetření srdce

Srdeční tkáň odebraná v průběhu pitvy byla fixována v neutrálním 4% formalínu po 3 dny a poté zalita do parafinových bloků, ze kterých byly připraveny série řezů o tloušťce 6 μm . Tyto preparáty byly barveny dle standardních histologických postupů pomocí hematoxylinu a eosinu (H&E) a Massonovým modrým trichromem a hodnoceny s užitím světelného mikroskopu. Reprezentativní snímky byly pořízeny pomocí mikroskopu Olympus BX 51 (Japonsko) vybaveného digitální kamerou DP 70 (Olympus, Japonsko) a softwarem Quick Photo Camera 2.3 (Promicra, ČR). Morfologické vyšetření bylo provedeno ve spolupráci s doc. MUDr. Yvonou Mazurovovou, CSc. (Ústav histologie a embryologie, LFHK UK).

3.12 Úprava vzorku pro stanovení markerů oxidačního stresu

Pro stanovení markerů oxidačního stresu byl použit vzorek myokardu (60 – 70 mg), který byl homogenizován s 500 μl ledového lyzačního pufru (25mM Tris; 0,1 % (V/V) Triton X-100; pH 7,6) s použitím termomixéru po dobu 20 min (Theromixer Comfort, Eppendorf, 1400 ot./min, 4°C). Homogenát byl následně centrifugován (1000x g, 10 min,

4°C) a supernatant uschován při -80°C do vlastního stanovení. V případě stanovení jednotlivých forem glutathionu bylo nutné získaný supernatant před vlastním stanovením zbavit proteinů, proto bylo 100 µl supernatantu smícháno s 200 µl 10% (m/V) metafosforečné kyseliny a po promíchání byl vzorek inkubován 10 min při 4°C. Vzorky byly následně znovu centrifugovány (15000x g, 10 min, 4°C) a výsledný supernatant byl rozdělen pro stanovení jednotlivých forem glutathionu a uschován při -80°C.

3.13 Stanovení malondialdehydu

Jako marker lipoperoxidace v myokardu LK bylo použito stanovení celkového koncentrace malondialdehydu (MDA), která byla stanovena pomocí modifikované metody dle Pilze a kol. (2000). Stanovení je založené na derivatizační reakci MDA s 2,4-dinitrofenylhydrazinem poskytující produkt, který je selektivně detekován pomocí HPLC s UV detekcí. Vlastní analýza jednotlivých markerů pomocí HPLC metody byla realizována Ing. Milošem Hrochem, PhD. na Ústavu farmakologie, LFHK UK.

Před stanovením bylo 250 µl tkáňového supernatantu hydrolyzováno pomocí 50 µl 6M NaOH po dobu 30 min při 60°C. Po ochlazení na ledu byly vzorky deproteinovány pomocí 125 µl 35% (V/V) HClO₄ a centrifugovány (9400x g, 10 min, 4°C). Následovala derivatizace 250 µl takto připraveného supernatantu s 25 µl 5mM 2,4-dinitrofenylhydrazinu po dobu 10 min v temnu. Vzniklý produkt 1-(2,4-dinitrofenyl)pyrazol byl stanovoven na HPLC systému Agilent (CA, USA) vybaveného UV/VIS detekcí. Separace látek probíhala při 30°C na koloně EC Nucleosil C₁₈ (125 x 4,6 mm / 5 µm; Machery-Nagel, Německo) s předkolonou EC Nucleosil C₁₈ (8 x 4 mm / 5 µm; Machery-Nagel, Německo). Mobilní fázi tvořila směs acetonitril/voda/kyselina octová 380/620/2 (v/v/v) o pH 3,4. Rychlost průtoku byla 1,0 ml/min a detekce na UV/VIS detektoru probíhala při vlnové délce $\lambda=310$ nm. Jako standard byl použit tetrabutylamonium malondialdehyd.

3.14 Stanovení jednotlivých forem glutathionu

Množství redukované (GSH) a oxidované (GSSG) formy glutathionu v myokardu bylo stanoveno HPLC metodou podle Kand'ára a kol. (2007). Stanovení je založeno na derivatizační reakci GSH s *o*-ftaldialdehydem (OPA) poskytující produkt, který je selektivně detekován pomocí HPLC vybavené fluorescenčním detektorem. Vlastní analýza

jednotlivých forem glutathionu pomocí HPLC metody byla realizována Ing. Milošem Hrochem, PhD. na Ústavu farmakologie, LFHK UK.

Pro stanovení GSH bylo 50 μ l supernatantu vzorku smícháno s 1 ml 0,2% (m/v) EDTA. Pro derivatizaci bylo použito 20 μ l takto připraveného vzorku, ke kterému bylo přidáno 300 μ l 0,2% (m/v) EDTA a 20 μ l 0,1% (m/v) OPA. Celá směs byla inkubována 30 min ve tmě za laboratorní teploty. V případě stanovení GSSG bylo nejprve nutné odstranit ze vzorku přítomný GSH, proto bylo 200 μ l vzorku smícháno s 200 μ l 40mM N-ethylmaleimidu a inkubováno 30 min ve tmě při laboratorní teplotě. Po ukončení inkubace bylo ke vzorku přidáno 750 μ l 0,2M NaOH. Z této směsi bylo odebráno 20 μ l a použito pro derivatizační reakci s 300 μ l 0,2M NaOH a 20 μ l 0,1% (m/v) OPA. Reakce opět probíhala 30 min ve tmě za laboratorní teploty.

Produkty derivatizačních reakcí byly analyzovány pomocí HPLC systému Shimadzu (Japonsko) vybaveného fluorescenčním detektorem. Separace látek probíhala při 37°C na koloně Supelco Discovery C₁₈ (150 x 4,0 mm / 5 μ m; Supelco, Sigma-Aldrich) a předkolony Supelco Discovery C₁₈ (20 x 4,0 mm / 5 μ m; Supelco). Mobilní fázi tvořila směs methanol/fosfátový pufr: 15/85 (v/v), pH 6,0. Rychlost průtoku byla 0,5 ml/min a fluorescenční detektor byl nastaven na excitaci při vlnové délce λ_{ex} =350 nm a emisi při vlnové délce λ_{em} =420 nm.

3.15 Příprava homogenátu pro stanovení aktivity enzymů

Pro stanovení aktivity enzymů uvedených v kapitole 3.16 – 3.18 byl použit celotkáňový homogenát, který byl připraven homogenizací myokardu LK v ledovém lyzačním pufru (50 mg/ml; 5 mM HEPES, 1 mM EGTA, 1 mM DTT a 0,1 % (v/v) Triton X-100, pH 8,7) po dobu 60 min v termomixéru (Eppendorf, 1400 ot./min a 4°C). Vzorky byly následně centrifugovány (800x g, 5 min, 4°C) a supernatant uschován při -80°C do doby stanovení.

3.16 Stanovení aktivity glutathionperoxidázy a glutathionreduktázy

Aktivity glutathionperoxidázy (GPx) a glutathionreduktázy (GR) byla stanovena pomocí enzymatických reakcí využívajících přeměnu specifického substrátu danými enzymy za redukce NADPH a množství vznikajícího redukovaného NADP⁺ bylo kvantifikováno spektrofotometricky (Esworthy a kol. 2001; Mannervik 2001). Stanovení bylo realizováno ve spolupráci s Mgr. Annou Jirkovskou, PhD. z Katedry biochemických věd, FAF UK.

Pro stanovení aktivity GPx bylo 20 μ l vzorku smícháno se 170 μ l reakční směsí obsahující 1 mM GSH, 0,2 mM NADPH, 11,25 mM NaN₃ a 1 U /ml GR v 0,1M fosfátovém pufru o pH 7,0. Směs byla promíchána a nechána 10 min při laboratorní teplotě a reakce byla nastartována přidávkem 10 μ l 0,25 mM H₂O₂. Změna absorbance při 340 nm po dobu 5 min byla sledována na spektrofotometru TECAN Infinite M200 (Tecan, Rakousko). V případě stanovení GR byla reakce zahájena již přidávkem 20 μ l vzorku do 180 μ l reakční směsí obsahující pouze 1 mM GSSG a 0,1 mM NADPH v 0,1M fosfátovém pufru o pH 7,0. Nárůst absorbance vznikajícího NADP⁺ byl sledován stejným způsobem jako při stanovení GPx. Enzymová aktivita byla vypočítána jako relativní změna absorbance za 1 min, přepočítána na obsah proteinu ve vzorku a vyjádřena jako relativní změna vzhledem ke kontrole.

3.17 Stanovení aktivity glutathion-S-transferázy

Komerčně dostupný kit SensoLyte GST Activity Assay Fluorimetric Kit (Anaspec, CA, USA) byl použit pro stanovení aktivity glutathion-S-transferázy (GST) dle návodu poskytnutého výrobcem. Principem stanovení je konjugace nefluoreskujícího substrátu s GSH dodaných v kitu působením GST ze vzorku za vzniku fluoreskujícího produktu. Fluorescence produktu byla detekována při excitační vlnové délce $\lambda_{\text{ex}}=390$ nm a emisní vlnové délce $\lambda_{\text{em}}=480$ nm pomocí přístroje Tecan M200 Pro (Tecan, Rakousko).

3.18 Stanovení aktivity citrát syntázy

Aktivita citrát syntázy byla stanovena spektrofotometrickou metodou dle De Sousa (1999) založenou na enzymatické reakci citrát syntázy katalyzující tvorbu kyseliny citronové z acetyl-CoA a oxalacetátu. Pro stanovení byl použit celotkáňový homogenát z myokardu LK viz sekce 3.15. Stanovení bylo provedeno ve spolupráci s PharmDr. Olgou Lenčovou, PhD. (Ústav farmakologie, LFHK UK).

Reakční směs tvořilo 8 μ l homogenátu, 2 μ l 30mM acetyl-CoA a 2 μ l 10mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB) v prostředí 178 μ l 1M Tris-HCl pufru o pH 8,0. Reakce byla nastartována přidáním 10 μ l 10mM oxalacetátu a změna absorbance byla měřena v 10sekundovém intervalu po dobu 1,5 min při vlnové délce 412 nm na přístroji Tecan M200 Pro (Tecan, Rakousko). Výsledná aktivita byla vypočítána ze změny absorbance za minutu a vyjádřena jako relativní změna vzhledem ke kontrole.

3.19 Stanovení respirační aktivity mitochondrií myokardu levé komory

Respirační aktivita mitochondrií byla stanovována v celotkáňovém homogenátu čerstvého myokardu LK pomocí vysokoúčinné respirometrie ve spolupráci s Mgr. Pavlou Staňkovou, PhD. a prof. MUDr. Zuzanou Červinkovou, CSc. z Ústavu fyziologie, LFHK UK.

Čerstvá tkáň myokardu LK byla homogenizována pomocí Potter-Elvehjem homogenizátoru s teflonovým pístem a skleněnou zkumavkou (P-LAB, Česká republika) v ledovém pufru obsahujícím 25 mM sacharózu, 75 mM sorbitol, 100 mM KCl, 10 mM H₃PO₄, 5 mM Mg Cl₂, 10 mM Tris, 20 mM EDTA a 1 mg/ml hovězí sérový albumin (BSA). Homogenát byl přefiltrován přes hrubé nylonové síto. Měření probíhalo na přístroji Oroboros 2K (Oroboros, Rakousko) v respiračním pufru MiR05 (Oroboros) při 30°C a spotřeba kyslíku byla vyhodnocena pomocí programu DatLab 4.1 (Oroboros). Respirační aktivita měřená jako spotřeba kyslíku byla nastartována v prostředí 10mM glutamátu, 2,5mM malátu a 1mM ADP. Pro inhibici komplexu I byl použit rotenon (výsledná koncentrace 1μM), pro aktivaci komplexu II byl použit sukcinát (výsledná koncentrace 10mM). Stav vnější mitochondriální membrány po homogenizaci byl hodnocen přidavkem 10μM roztoku cytochromu c, který vyvolal ≈ 69% nárůst spotřeby O₂, což odpovídalo částečnému, ale předpokládanému poškození membrány vyskytující se stejnou měrou ve všech experimentálních skupinách. Aktivita cytochrom-c-oxidázy (COX) byla hodnocena v samostatném pokusu, kdy byl jako substrát pro reakci použit 10 μM cytochrom c, jako umělý donor elektronů 0,5 mM N,N,N,N-tetramethyl-p-fenylendiamin (TMPD) a 2 mM askorbát jako regenerační systém pro redukovaný TMPD. Výsledky byly korigovány na míru autooxidace chemikálií a vyjádřeny relativně vzhledem ke kontrole.

3.20 Stanovení aktivity mitochondriálního komplexu I ve frakci bohaté na mitochondrie

Aktivita mitochondriálního komplexu I (NADH:ubichinon oxidoreduktáza) byla stanovena také ve frakci celotkáňového homogenátu bohatého na mitochondrie připravené z myokardu LK pomocí spektrofotometrické metody podle Janssen a kol. (2007) s menšími modifikacemi pro stanovení v 96jamkovém formátu.

Vzorek myokardu byl homogenizován pomocí Potter-Elvehjem homogenizátoru s teflonovým pístem a skleněnou zkumavkou (P-LAB, Česká republika) v 10násobku ledového pufru obsahujícím 20 mM HEPES, 1 mM EGTA, 70 mM sacharózu a 210 mM mannitol, pH 7,2. Hrubé zbytky tkáně a buněčných membrán byly odstraněny centrifugací

(600x g, 10 min, 4°C) a supernatant byl dále znovu centrifugován (16 000x g, 10 min, 4°C). Získaná peleta byla resuspendována v ledovém 25 mM fosfátovém pufru (pH 7,4) a mitochondriální membrána byla narušena pomocí ultrazvuku (4 x 5 impulzů, 60% výkon, 0,5 cyklu; UP100H, Hielscher Ultrasonic, Německo).

Čerstvě připravený homogenát byl použit pro stanovení aktivity komplexu I. 20 μ l homogenátu bylo smícháno se 159 μ l reakční směsi obsahující 3 mg/ml BSA, 160 μ M 2,6-dichloroindofenol (DCIP), 60 μ M decylubichinon, 2 μ M antimycin a 2 mM KCN v 25mM fosfátovém pufru (pH 7,4). Pro odlišení specifické aktivity komplexu I od nespecifické oxidace NADH byl ke každému vzorku přidán 1 μ l 800 μ M rotenonu nebo stejné množství fosfátového pufru. Reakce byly iniciovány přidáním 20 μ l 160 μ M NADH a absorbance byla sledována v 30s intervalech po dobu 5 min při vlnové délce 570 nm (Microplate Reader Model 680, Bio-Rad, CA, USA). Aktivita byla definována jako pokles absorbance za 1 min a specifická aktivita komplexu I byla stanovena jako část naměřené aktivity citlivá na rotenon. Nespecifická aktivita, která není ovlivněna rotenonem byla nižší než 10 - 15%, což dokumentuje odpovídající přípravu subcelulární frakce a nastavení analýzy. Výsledky byly přepočítány na obsah proteinu a vyjádřeny jako relativní změna vzhledem ke kontrole.

3.21 Příprava nukleární frakce z homogenátu levé komory

Nukleární frakce byla získána z myokardu LK podle Dignamova protokolu (1983). Tkáň byla homogenizována v ledovém pufru A (100 mg/ml; 10 mM HEPES, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,5 mM DTT, 0,005 % NP40 (v/v) a 4% směs inhibitorů proteáz (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, Germany), pH 7,9) po dobu 20 min v termomixéru při 1400 ot./min a 4°C. Po centrifugaci (3 000x g, 10 min, 4°C) byla peleta resuspendována ve čtyřnásobku hmotnosti vzorku ve směsi tvořené z 93,5 % ledovým pufrům B (5 mM HEPES, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 26 % (v/v) glycerol, pH 7,9) a z 6,5 % 4,6M NaCl. Suspenze byla opakovaně homogenizována na ledu ultrazvukem (UP100H, Hielscher Ultrasonic, Německo) a nechána inkubovat 30 min na ledu. Po centrifugaci (16 000x g, 20 min, 4°C) byl supernatant zamrazen při -80°C do vlastního stanovení.

3.22 Stanovení množství transkripčně aktivní formy Nrf2 v nukleární frakci

Množství transkripčně aktivní formy Nrf2 v nukleární frakci bylo stanoveno pomocí komerčně dostupného DNA vázajícího ELISA kitu TransAM Nrf2 (Active Motif, CA, USA) dle doporučení výrobce. Principem tohoto kitu je navázání aktivní formy Nrf2 na specifické dvouřetězcové oligonukleotidy (odpovídající sekvenci ARE) ukotvené na povrch jamek. Nrf2 je pak detekována pomocí specifické protilátky s následnou spektrofotometrickou kvantifikací komplexu při vlnové délce 450 nm. Stanovení bylo provedeno ve spolupráci s PharmDr. Olgou Lenčovou, PhD. (Ústav farmakologie, LFHK UK).

3.23 Izolace nukleových kyselin a RT-qPCR analýza

Celková RNA z myokardu LK byla izolována pomocí fenol-chloroformové extrakce pomocí komerčně dostupného TRI Reagent (Sigma-Aldrich) dle doporučení výrobce. Koncentrace izolované RNA byla stanovena na přístroji NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, DE, USA). Získaná RNA byla přepsána reverzní transkripcí do cDNA s použitím High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, CA, USA) dle doporučení výrobce s užitím přístroje 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems). Relativní kvantifikace exprese cílových genů (Tab. 3) byla stanovena na přístroji 7500HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ve „fast“ režimu pomocí individuálně navržených a komerčně dostupných qPCR reakcí (Generi Biotech, ČR; Applied Biosystems) a TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Reakce probíhala s 30 ng cDNA v 50 cyklech s časově-teplotním profilem: počáteční denaturace 3 min při 95°C, denaturace 5 s při 95°C a annealing/elongace 25 s při 60°C. Expresi cílových genů byla normalizována na expresi referenčního genu HPRT1 za použití Pfafflovy metody (2001). Pro stanovení změny v poměru obsahu mtDNA/nDNA byla izolována celková DNA z myokardu LK pomocí DNeasy Blood&Tissue Kit (Qiagen, CA, USA) na přístroji QIAcube (Qiagen). Koncentrace izolované DNA byla stanovena na přístroji NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, DE, USA). Komerčně dostupné qPCR kity (Generi Biotech) pro geny kódované mtDNA (ND1, ND4, COX1) byly využity ke stanovení relativního množství mtDNA a výsledné množství bylo vztaženo na počet kopií genu pro leptin, který je kódován nDNA, za použití Pfafflovy metody. Výběr hodnocených i referenčních genů pro tuto analýzu probíhal ve spolupráci s Generi

Biotech. Reakce probíhala s 10 ng DNA v 50 cyklech s časově-teplotním profilem: počáteční denaturace 3 min při 95°C, denaturace 10 s při 95°C a annealing/elongace 30 s při 60°C.

Tab. 3 Přehled použitých komerčně dostupných qPCR kitů.

qPCR kity produkované Generi Biotech				
Zkratka	Název genu	Název qPCR kitu	Referenční sekvence	Umístění v genomu
ALAS1	ALAS1	ocALAS1_Q4	XM_002713234.1	exon7 / exon 8
ANT1	ADT1	ocADT1_Q3	ENSOCUG00000002594	exon3 / exon 4
BVR A	BLVRA	ocBLVRA_Q2	XM_002713681.1	exon7 / exon 8
COX1	COX1	ocCOX1_Q2	AJ001588.1	mtDNA
COX4	COX4I1	ocCOX4I1_Q1	NM_001170882.1	exon3 / exon4
FTL	FTL	ocFTL_Q2	NM_001101688.1	exon2 / exon3
GCLC	GCLC	OcGCLC_Q1	XM_002714508.1	exon11 / exon12
HO1	HO1	ocHO1_Q1	XM_002711415	exon2 / exon3
HPRT1	HPRT1 (ref. gene)	ocHPRT1_Q3	NM_001105671	exon6 / exon7
Lep	LEP	ocLEP_Q1	NM_001163069.1	exon2
MnSOD	SOD-2	ocSOD2_Q2	L28808	exon3 / exon4
Myoglobin	MB	ocMB_Q2	ENSOCUT00000028727	exon1 / exon2
ND1	ND1	ocND1_Q1	AJ001580	mtDNA
ND4	ND4	ocND1_Q2	AJ001588.1	mtDNA
NDUFS2	NDUFS2	ocNDUFS2_Q1	XM_002715157.1	exon12 / exon14
NOX2	CYBB	ocCYBB_Q3	NM_001082100.1	exon11 / exon 12
NOX4	NOX4	ocNOX4_Q2	XM_002708641.1	exon16 / exon17
NQO1	NQO1	ocNQO1_Q2	XM_002711667.1	exon5 / exon6
NRF1	NRF1	ocNRF1_Q2	NC_013675	exon7 / exon8
Nrf2	NFE2L2	ocNFE2L2_Q1	XM_002712306.1	exon2 / exon3
PRX3	PRDX3	ocPRDX3_Q2	XM_002718686.1	exon4 / exon5
smtCK	RSMTCK	ocRSMTCK_Q2	NM_001163070	exon7 / exon8
TFAM	TFAM	ocTFAM_Q1	XM_002718363.1	exon2 / exon3 / exon4
qPCR kity produkované Applied Biosystems				
Zkratka	Název genu	Název qPCR kitu	Referenční sekvence	Umístění v genomu
HIF1α	HIF1A	oc03398632	NM_001082782.1	exon6 / exon7

3.24 Analýza delečních mutací mtDNA

Přítomnost delečních mutací a rozsáhlých změn v mtDNA byla stanovena metodou LongRange PCR s individuálně navrženými a optimalizovanými primery (5'-GGACTCTACTCGGGGATGA-3' a 3'-GGGTGTAGTTGTCTGGGTCTC-5') (Generi Biotech, ČR) a komerčně dostupným kitem QIAGEN LongRange PCR kit (Qiagen, CA, USA) podle postupu výrobce. Principem reakce byla amplifikace vybraného úseku mtDNA mezi 5487 – 14946 bp, kde se vyskytují tzv. běžné deleční mutace (*common*

deletions) a většina dalších rozsáhlých změn v DNA. Výsledkem PCR reakce je produkt o délce 9460 bp odpovídající $\approx 55\%$ celkové délky mtDNA. Reakce probíhala v 35 cyklech s časově-teplotním profilem: počáteční denaturace 3 min při 93°C, denaturace 15 s při 93°C, annealing 30 s při 61,5°C, extenze 10,5 min při 68°C a závěrečná extenze 12 min při 68°C. Výsledné produkty PCR reakce byly separovány pomocí elektroforézy (90 V, 40 – 60 min) s užitím 1% agarózového gelu pomocí a vizualizovány pomocí ethidium bromidu. Pro určení velikosti produktu byly použity standardy GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas, Litva). Stanovení bylo provedeno ve spolupráci s firmou Genери Biotech.

3.25 Western blot analýza HIF1 α v nukleární frakci

Hodnocení zastoupení množství HIF1 α v nukleární frakci myokardu LK (viz kapitola 3.21) bylo provedeno jeho imunodetekcí specifickou protilátkou po předešlé separaci jednotlivých proteinů ve vzorku jednorozměrnou elektroforézou. Vzorek byl nejprve smíchan v poměru 1:1 se směsí tvořící v poměru 9:1 Laemmlí Sample Buffer (Bio-Rad, CA, USA) a β -merkaptoetanolem (Bio-Rad) a následně inkubován 5 min při 95°C. Pro separaci proteinů byly použity předpřipravené 15jamkové gely TGX AnykD Mini-PROTEAN (Bio-Rad). Nanáška proteinu byla 15 μ g na jamku a separace probíhala za konstantního napětí 200 V při 240 mA cca 40 min. Jako standard molekulové hmotnosti byl použit Precision Plus Protein Kaleidoscope Standard (Bio-Rad). Po skončení elektroforézy byly proteiny přeneseny na PVDF membránu (Pall Corporation, NY, USA) pomocí přístroje Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) při konstantním proudu 200 mA a napětí 25 V po dobu 1 hod. Po přenesení proteinů byla membrána blokována 24 hod v 5% roztoku odtučněného sušeného mléka (Blotting-Grade Blocker; Bio-Rad) v TBS pufru (2 mM Tris, 1,37 mM NaCl; Bio-Rad) s 0,1 % Tween-20 (Bio-Rad) a následně inkubována s myší primární monoklonální protilátkou anti-HIF1 α (Abcam, UK; ředění 1:150, 24 hod, 4°C) a jako sekundární protilátka byla použita kozi protilátka proti myšimu IgG konjugovaná s křenovou peroxidázou (DakoCytomation, Dánsko, ředění 1:1000, 1 hod při laboratorní teplotě). Chemiluminiscenční detekce byla provedena pomocí BM Chemiluminescence Blotting Substrate kit (Roche Diagnostics, Švýcarsko) a filmů CL-XPosure Film (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) na automatickém vyvolávacím přístroji Optimax X-Ray Film Processor (Protec Medizintechnik, Německo). Nanáška proteinu na gel byla kontrolována Ponceau S

barvením PVDF membrány a denzitometrická kvantifikace relativního množství proteinu byla provedena s užitím programu Quantity One (Bio-Rad).

3.26 Stanovení koncentrace proteinu

Koncentrace proteinu v připravených homogenátech byla stanovena pomocí komerčního kitu Bicinchonic Acid Protein Assay Kit (Sigma-Aldrich) dle návodu výrobce. Metoda je založena na redukci Cu^{2+} na Cu^+ ionty proteiny při 37°C v alkalickém prostředí. Vzniklé Cu^+ ionty jsou chelátovány bicinchoninovu kyselinou za tvorby barevných komplexů, které jsou následně spektrofotometricky stanoveny při 562 nm na přístroji Tecan M200 Pro (Tecan, Rakousko).

Přítomnost látek chelatujících dvojmocné ionty v homogenizačních pufrch může interferovat se stanovením koncentrace proteinů, a proto bylo nutné proteiny v těchto vzorcích nejprve precipitovat podle postupu uvedeného výrobcem. Vzorky byly nejprve inkubovány s 0,15% (m/v) deoxycholátem sodný a poté precipitovány 72% (m/v) trichloroocetovou kyselinou. Vysrážené proteiny byly solubilizovány 5% (m/v) roztokem dodecylsulfátu sodného v 0,1M NaOH.

3.27 Statistická analýza výsledků

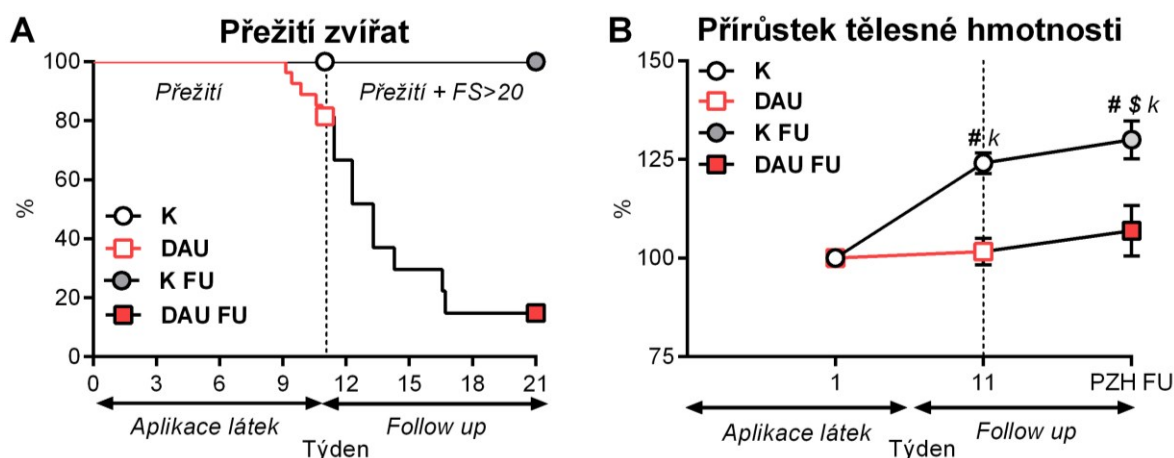
Jestliže není uvedeno jinak, data jsou prezentována jako jednotlivé hodnoty s vyznačeným průměrem či mediánem skupiny, nebo jako krabičkový graf s interkvartilovým rozmezím, mediánem a 5. - 95. percentilem (GraphPad Software, CA, USA). Krabičkový graf, který dobře popisuje distribuci dat ve skupině bez ohledu na charakter dat, byl upřednostněn před znázorněním jednotlivých hodnot při zobrazení většího množství skupin ve studii s dexrazoxanem s ohledem na přehlednost prezentovaných výsledků. Statistická analýza dat byla provedena v statistickém programu SigmaStat 3.5 for Windows (Systat Software, CA, USA). Statistická signifikance byla určena na hladině $p \leq 0,05$. Pro porovnání jednotlivých skupin mezi sebou byla použita jednofaktorová analýza rozptylu (*One Way ANOVA*) nebo její neparametrická modifikace (*Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks*). Pro porovnání párových dat v rámci jedné skupiny byl použit párový *t*-test nebo Wilcoxonův párový test pro data s nenormálním rozložením. Ke stanovení vztahu mezi jednotlivými naměřenými parametry byla použita Pearsonova parametrická nebo Spearmanova neparametrická korelační metoda.

4 VÝSLEDKY

4.1 Studium poškození srdce vyvolané chronickou antracyklinovou kardiotoxicitou a jeho další vývoj po ukončení expozice cytostatikem (*follow up*)

4.1.1 HODNOCENÍ CELKOVÉ TOXICITY

Všechna zvířata v kontrolní skupině se dožila plánovaného konce experimentu (Obr. 10A) a dobře prospívala po celou dobu studie, což je dokumentováno signifikantním přírůstkem tělesné hmotnosti zvířat (Obr. 10B). Naproti tomu bylo v průběhu podávání DAU zaznamenáno 5 předčasných úhynů (5 z 27 zvířat, Obr. 10A) a zvířata jevila známky zhoršeného zdravotního stavu (např. snížená pohybová aktivita a omezený příjem potravy) s minimálním a nesignifikantním přírůstkem tělesné hmotnosti (Obr. 10B). V průběhu období po expozici DAU (tzv. *follow up*) se zdravotní stav těchto zvířat významně nezlepšil – naopak ve většině případů se dále zhoršoval a na základě pravidelného echokardiografického vyšetření muselo být 9 z 11 zvířat (Obr. 10A) předčasně ukončeno podle protokolu studie (pokles LVFS pod 20 %). Tyto hodnoty systolické srdeční funkce obvykle indikují dekompenzované srdeční selhání s možností nečekaného předčasného úhynu zvířat a ztráty vzorku myokardu.



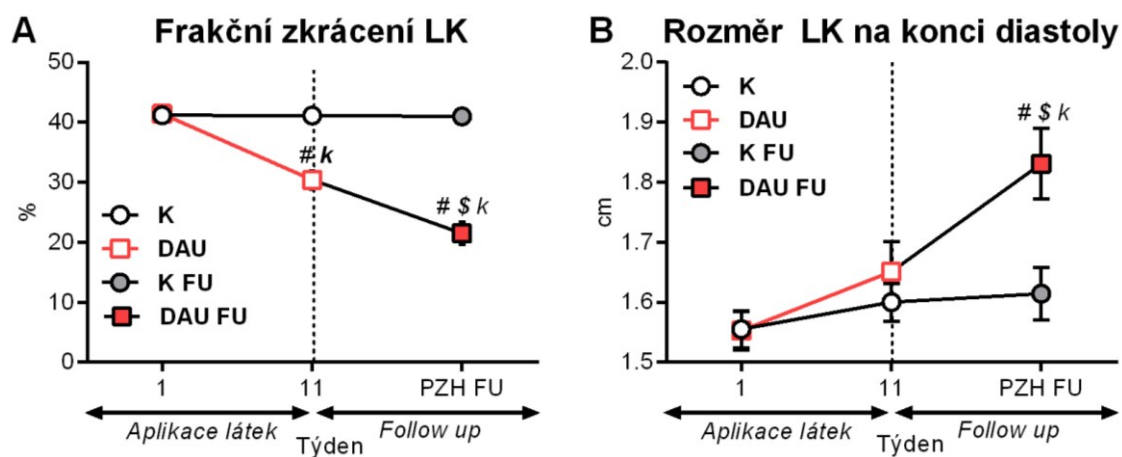
Obr. 10 Přežití zvířat (A) a přírůstek tělesné hmotnosti (B) v průběhu pokusu. Přežití do 11. týdne bylo sledováno standardním způsobem, zatímco v období FU byl pokus u jednotlivých zvířat ukončen při poklesu frakčního zkrácení LK pod 20 %. Výsledky jsou prezentovány jako průměr skupiny \pm SEM. Statistická signifikance v rámci dané skupiny (párový *t*-test, $p \leq 0,01$) v porovnání s počáteční hodnotou (#) nebo hodnotou na konci podávání látek (\$). Statistická signifikance (ANOVA, $p \leq 0,01$) v porovnání s kontrolní skupinou (k). PZH FU – poslední zaznamenaná hodnota v období následného sledování zvířat po expozici (*follow up*). „Přežití + FS > 20“ – přežití zvířat splňující kritérium dané protokolem studie (frakční zkrácení LK větší než 20 %).

Při pitvě zvířat z DAU skupiny byly pozorovány makroskopické známky výrazné kardiovaskulární toxicity, jako je dilatace srdečních oddílů (zejména LK) a oběhového městnání, tj. přítomnost ascitu či hydrothoraxu (přesahujících v některých případech

i 75 ml). Tyto nálezy byly nápadné zejména u zvířat předčasně uhynulých či ukončených podle protokolu studie pro pokles LVFS pod 20 %. Znamky oběhového městnání byly také četnější v období následného sledování po expozici DAU, než v průběhu samotného navození chronické ANT kardiotoxicity. Například významný hrudní výpotek (> 1,0 ml), byl přítomen u 55 % zvířat následně sledovaných po expozici DAU, zatímco v průběhu navození chronické ANT kardiotoxicity to bylo pouze 13 %. V kontrolní skupině pitva neodhalila žádné významné odchylky od normální anatomie srdce.

4.1.2 HODNOCENÍ SRDEČNÍ FUNKCE

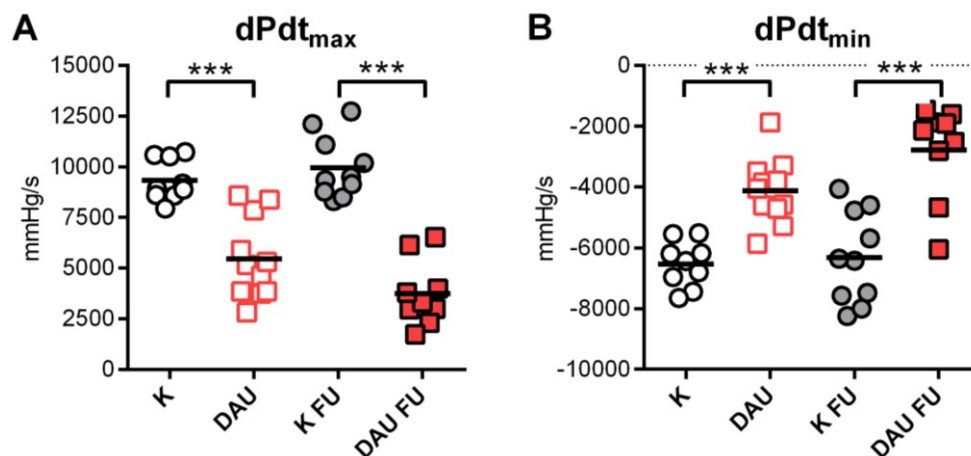
Echokardiografické vyšetření odhalilo signifikantní pokles frakčního zkrácení LK na konci podávání DAU (o 26,5 % oproti výchozím hodnotám, $p \leq 0,001$), který se dále prohluboval v následném období FU (až na ≈ 50 % původních hodnot, $p \leq 0,001$; Obr. 11A). Kontrolní skupina se naproti tomu vyznačovala normálními hodnotami systolické srdeční funkce, které se během pokusu významně neměnily (Obr. 11A). Na konci podávání cytostatika nebyl rozměr LK na konci diastoly významně ovlivněn podáváním DAU, nicméně signifikantní dilatace byla patrná v období FU (Obr. 11B).



Obr. 11 Echokardiograficky stanovené (A) frakční zkrácení LK a (B) rozměr LK na konci diastoly. Data prezentována jako průměr skupiny \pm SEM. Statistická signifikance v rámci dané skupiny (párový t -test/Wilcoxonův párový test, $p \leq 0,01$) v porovnání s počáteční hodnotou (#) nebo hodnotou na konci podávání látek (\$). Statistická signifikance (ANOVA, $p \leq 0,01$) v porovnání s kontrolní skupinou (k). PZH – poslední zaznamenaná hodnota.

Výrazné snížení systolické funkce bylo patrné i při katetrizačním vyšetření LK, kde byl index kontraktility (dP/dt_{max}) na konci podávání DAU o 41,5 % nižší v porovnání s kontrolní skupinou ($p \leq 0,001$) a v následujícím období po expozici DAU byl patrný pokles tohoto parametru o 62,3 % ($p \leq 0,001$; Obr. 12A). Diastolická funkce LK

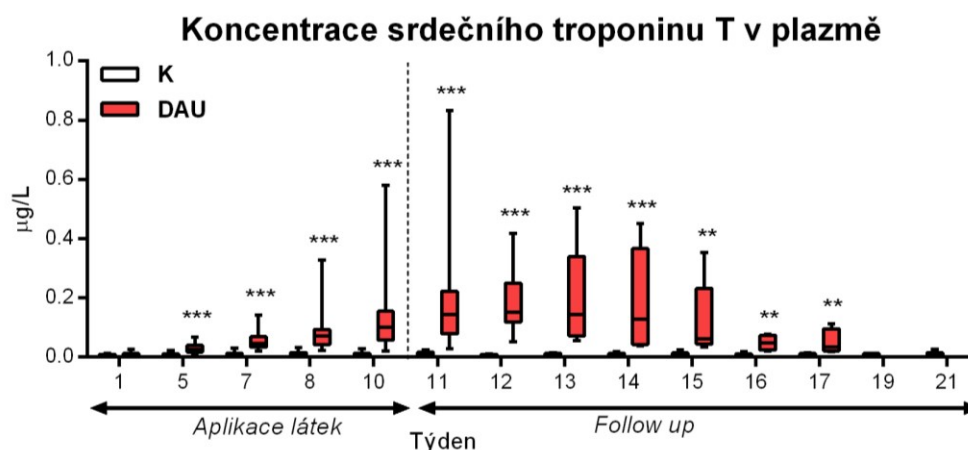
hodnocená dle indexu dP/dt_{\min} byla po podávání DAU ovlivněna obdobně jako systolická funkce (Obr. 12B).



Obr. 12 Katetrizační vyšetření (A) systolické (dP/dt_{\max}) a (B) diastolické funkce LK (dP/dt_{\min}). Statistická signifikance (ANOVA) v porovnání s kontrolní skupinou: *** ($p \leq 0,001$).

4.1.3 HODNOCENÍ PLAZMATICKÝCH KONCENTRACÍ SRDEČNÍHO TROPONINU T

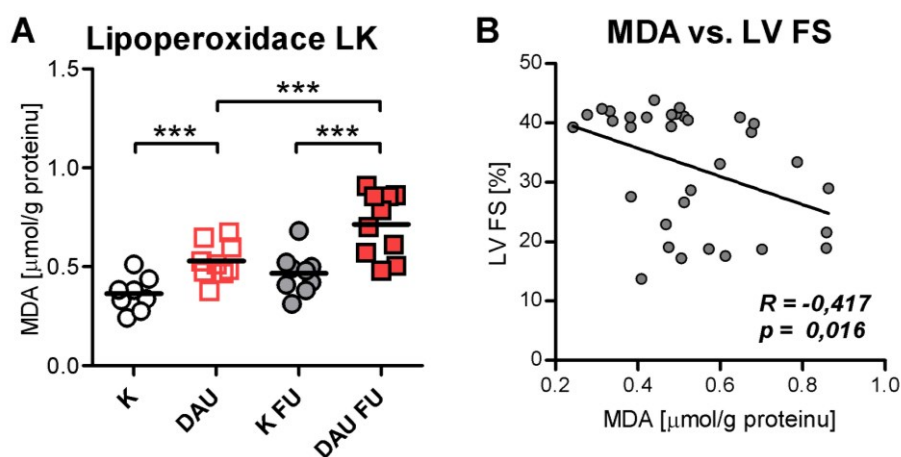
Plazmatické koncentrace srdečního troponinu T byly signifikantně zvýšené již v průběhu podávání DAU (Obr. 13) a se zvyšující se kumulativní dávkou cytostatika vytrvale narůstaly. Nejvyšší koncentrace byly zaznamenány 1-2 týdny po poslední aplikaci DAU a v obdobné míře přetrvávaly až do 13. týdne, kdy začaly postupně klesat. V kontrolní skupině nebyl zaznamenán signifikantní nárůst koncentrace srdečního troponinu T a hodnoty byly po celou dobu experimentu těsně nad detekčním limitem.



Obr. 13 Koncentrace srdečního troponinu T v plazmě. Statistická signifikance (ANOVA) v porovnání s kontrolní skupinou: *** ($p \leq 0,001$), ** ($p \leq 0,01$) a * ($p \leq 0,05$).

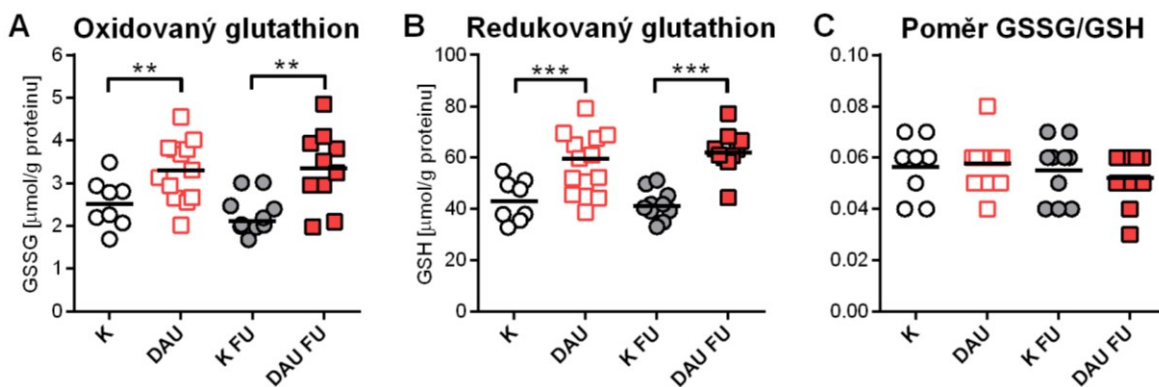
4.1.4 HODNOCENÍ OXIDAČNÍHO STRESU A ANTIOXIDAČNÍ OCHRANY V MYOKARDU LEVÉ KOMORY

Stanovení koncentrace malondialdehydu v myokardu LK (marker lipoperoxidace) odhalilo signifikantní nárůst po podávání DAU (Obr. 14A) s další významnou progresí i v následujícím období FU (34,7% nárůst oproti hodnotám v 11. týdnu, $p \leq 0,001$). Korelační analýza naznačila významný vztah individuálních hodnot tohoto parametru s parametrem systolické srdeční funkce LK, jakož i dalšími markery kardiotoxicity ($p \leq 0,05$), nicméně těsnost tohoto vztahu byla relativně slabá ($R = -0,417$; Obr. 14B).



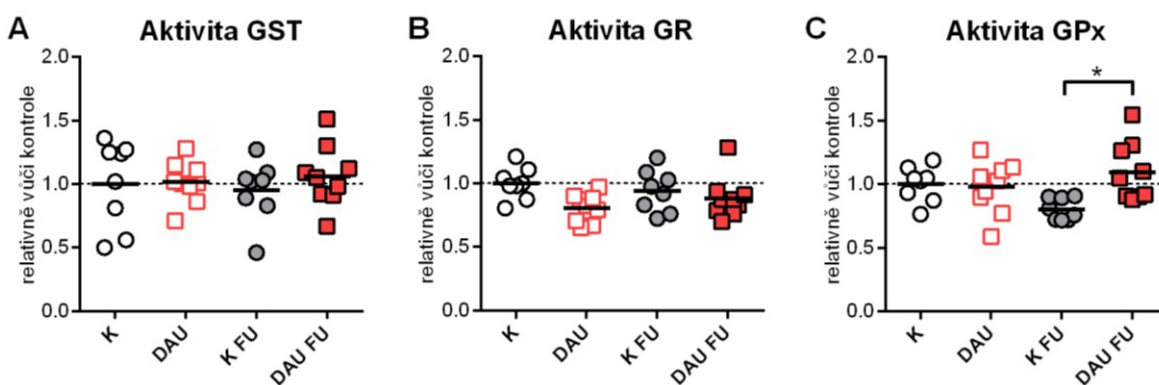
Obr. 14 (A) Hodnocení lipoperoxidace myokardu LK a (B) korelační analýza lipoperoxidace s mírou poškození systolické funkce LK. Statistická signifikance (ANOVA) mezi jednotlivými skupinami: *** ($p \leq 0,001$).

Dalším markerem oxidačního stresu hodnoceným v této studii byla oxidovaná a redukovaná forma glutathionu. Množství oxidovaného glutathionu v myokardu LK bylo po opakovaném podávání DAU zvýšeno (Obr. 15A) a tato změna zůstala signifikantní v porovnání s kontrolní skupinou i v následném období po expozici DAU (FU). Ovšem současně s tím bylo při podávání DAU zvýšeno i množství redukovaného glutathionu v LK (Obr. 15B), takže výsledný poměr GSSG/GSH (Obr. 15C) nebyl jak na konci podávání DAU, tak ani v průběhu následného období FU signifikantně změněn.



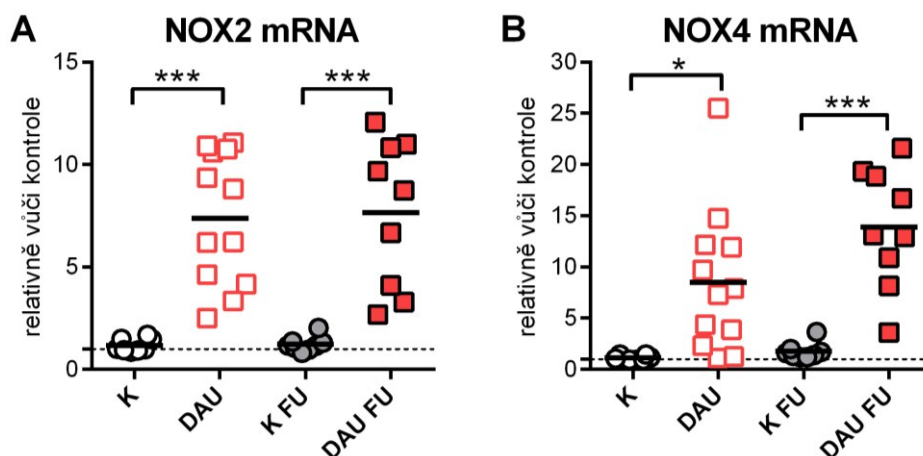
Obr. 15 (A) HPLC stanovení množství glutathionu v myokardu LK a (B) výsledný poměr oxidované a redukované formy glutathionu. Statistická signifikance (ANOVA) v porovnání s kontrolní skupinou: ** ($p \leq 0,01$) a *** ($p \leq 0,001$).

Podávání DAU nemělo významný vliv ani na aktivitu většiny enzymů glutathionového systému. Aktivita glutathion-S-transferázy (GST; Obr. 16A) a glutathionreduktázy (GR; Obr. 16B) nevykazovala žádné změny v důsledku podávání DAU. Aktivita glutathionperoxidázy (GPx) též nebyla významně ovlivněna na konci podávání DAU, zatímco v období po ukončení expozice byla aktivita tohoto enzymu mírně zvýšená (Obr. 16C).



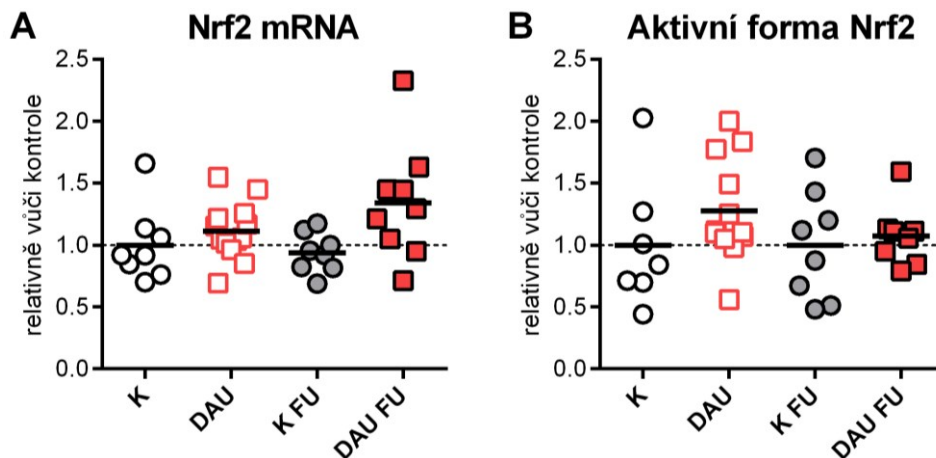
Obr. 16 Stanovení aktivity (A) glutathion-S-transferázy (GST), (B) glutathionreduktázy (GR) a (C) glutathionperoxidázy (GPx). Statistická signifikance (ANOVA) v porovnání s kontrolní skupinou: * ($p \leq 0,05$).

Naopak podávání DAU mělo signifikantní vliv na genovou expresi NADPH oxidázy (NOX), která je známým zdrojem ROS v řadě kardiovaskulárních onemocnění. Exprese klíčových myokardiálních izoforem NOX (NOX2 a NOX4) byla na úrovni mRNA $\approx 7,5x$ vyšší oproti kontrolní skupině a tato změna zůstala významná i v následujícím období FU, přičemž v případě NOX4 byla průměrná exprese až ≈ 13 násobně vyšší než v kontrolní skupině (Obr. 17A,B).



Obr. 17 **Relativní exprese NADPH-oxidáz (NOX) v myokardu LK: (A) NOX2 a (B) NOX4.** Statistická signifikance (ANOVA) v porovnání s kontrolní skupinou: * ($p \leq 0,05$) a *** ($p \leq 0,001$).

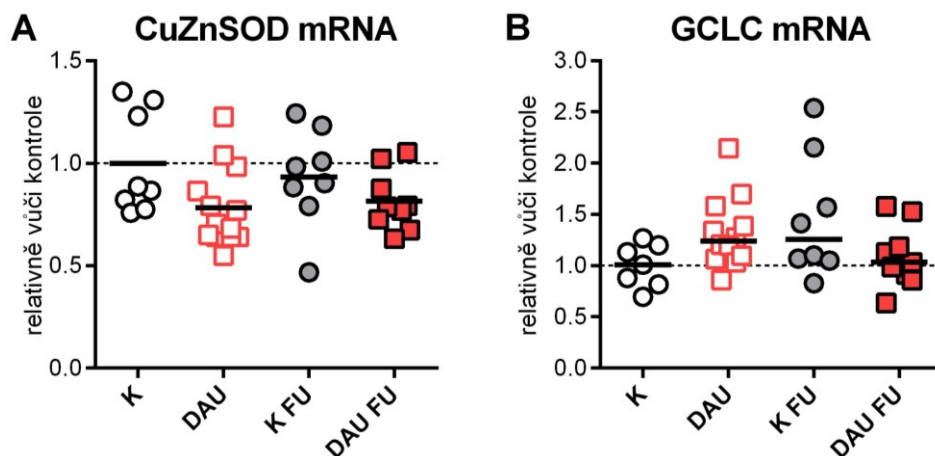
Hodnocení genové exprese Nrf2 jako klíčové molekuly koordinující odpověď buněk na oxidační stres neukázalo žádnou změnu v důsledku podávání DAU (Obr. 18A). Obdobně nebyla zaznamenána významná změna transkripčně aktivní formy Nrf2 v nukleární frakci po podávání DAU v průběhu celého pokusu (Obr. 18B). Tyto výsledky naznačují, že Nrf2 signální dráha není v důsledku navození chronické DAU kardiotoxicity významně aktivována.



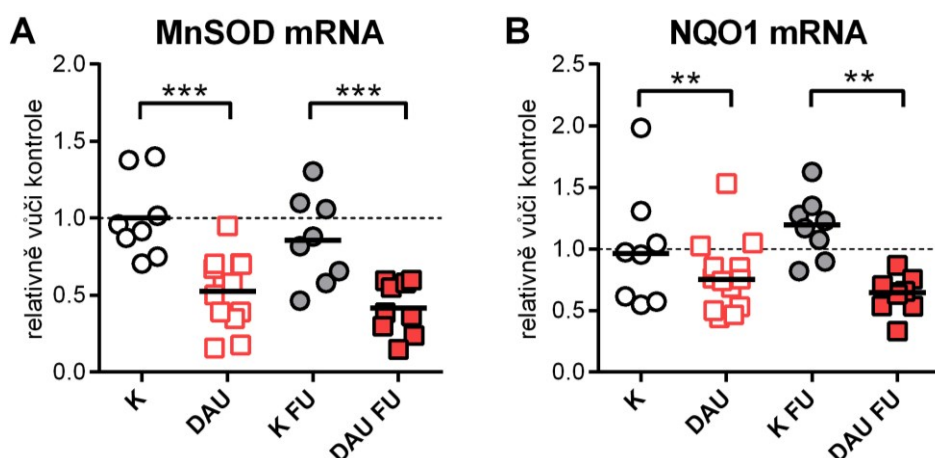
Obr. 18 (A) **Relativní genová exprese Nrf2 a (B) množství jeho transkripčně aktivní formy v nukleární frakci myokardu LK.**

Analýza genové exprese vybraných cílových genů Nrf2 signální kaskády neprokázala žádnou koordinovanou odpověď na opakované podávání DAU v obou hodnocených intervalech pokusu. Například genová exprese cytosolické superoxiddismutázy (CuZnSOD; Obr. 19A) a katalytické podjednotky γ -glutamyl-cysteinilgázy (GCLC; Obr. 19B) nevykazovala žádné změny. V případě mitochondriální formy superoxiddismutázy (MnSOD; Obr. 20A) a NADPH:chinonoxidoreduktáza 1

(NQO1; Obr. 20B) bylo naopak pozorováno signifikantní snížení genové exprese v obou sledovaných obdobích.

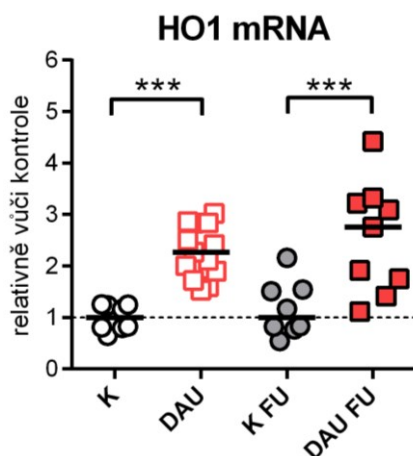


Obr. 19 Relativní genová exprese (A) cytosolické superoxiddismutázy (CuZnSOD) a (B) katalytické podjednotky γ -glutamylcysteinilgázy (GCLC).

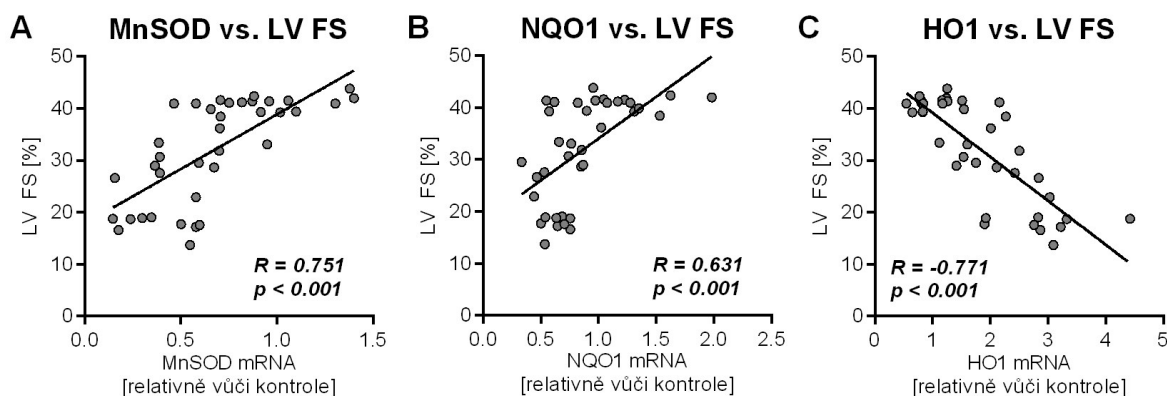


Obr. 20 Relativní genová exprese (A) mitochondriální superoxiddismutázy (MnSOD) a (B) NADPH:chinonoxidoreduktázy 1 (NQO1). Statistická signifikance (ANOVA) v porovnání s kontrolní skupinou: ** ($p \leq 0,01$) a *** ($p \leq 0,001$).

Naproti tomu genová exprese hemoxygenázy 1, která též patří mezi cílové geny Nrf2, byla signifikantně zvýšená v obou sledovaných intervalech (Obr. 21). Výše uvedená data ale naznačují, že exprese tohoto genu je regulována jiným způsobem než prostřednictvím Nrf2. Korelační analýza genové exprese jednotlivých zástupců Nrf2 signální kaskády s parametrem LVFS ukázala signifikantní korelaci ($p \leq 0,001$) pouze u posledních tří zmíněných genů (MnSOD, NQO1 a HO1) s relativně těsnou závislostí (Obr. 22).



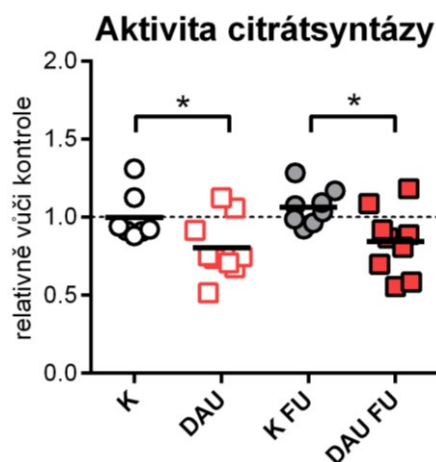
Obr. 21 **Relativní genová exprese hemoxygenázy 1 (HO1)**. Statistická signifikance (ANOVA) v porovnání s kontrolní skupinou: *** ($p \leq 0,001$).



Obr. 22 **Korelační analýza relativní exprese (A) mitochondriální superoxidodismutázy (MnSOD), (B) NADPH:chinonoxidoreduktázy 1 (NQO1) a (C) hemoxygenázy 1 s mírou poškození systolické funkce LK (LVFS)**.

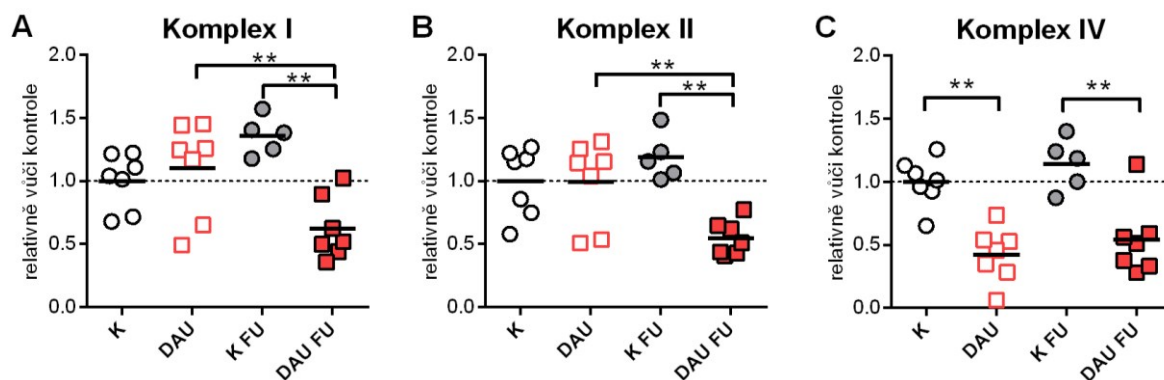
4.1.5 HODNOCENÍ MITOCHONDRIÁLNÍHO POŠKOZENÍ A RESPIRAČNÍ AKTIVITY

Poškození mitochondrií v důsledku podávání DAU bylo patrné již na konci jeho podávání a stejně tak i v období po expozici ANT. Snížená aktivita citrát syntázy o $\approx 20\%$ ($p \leq 0,05$) v obou sledovaných intervalech poukázala na DAU navozený pokles množství mitochondrií v myokardu LK (Obr. 23).



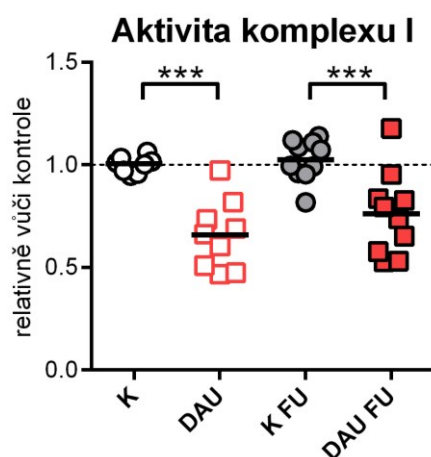
Obr. 23 **Aktivita citrát syntázy odrážející množství mitochondrií v myokardu LK.** Statistická signifikance (ANOVA) v porovnání s kontrolní skupinou: * ($p \leq 0,05$).

S užitím vysokoúčinné respirometrie bylo v myokardu LK zjištěno signifikantní poškození mitochondriální respirační aktivity vlivem opakovaného podávání DAU, a to zejména v období FU (Obr. 24). Zatímco enzymatická aktivita komplexu I a II byla signifikantně snížena pouze v období FU (Obr. 24A, B), aktivita komplexu IV byla snížena již na konci podávání DAU a přetrvávala na stejné úrovni i během následného období FU (Obr. 24C).



Obr. 24 **Respirometrické stanovení aktivity (A) komplexu I, (B) komplexu II a (C) komplexu IV v celotkáňovém homogenátu myokardu LK.** Statistická signifikance (ANOVA) mezi jednotlivými skupinami: ** ($p \leq 0,01$).

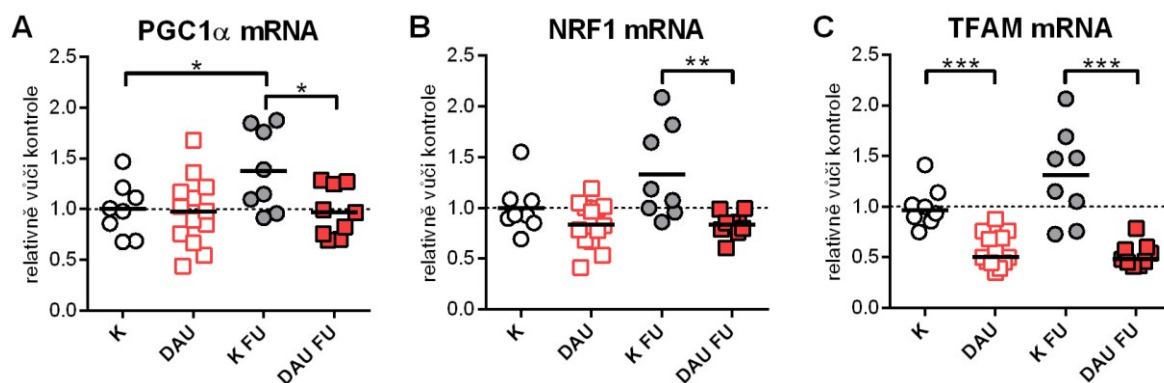
Aktivita komplexu I byla také stanovena ve frakci homogenátu LK obohaceného o mitochondrie, kde se podařilo odhalit signifikantní pokles v enzymatické aktivitě komplexu I již na konci podávání studovaných látek (o 34,1 %, $p \leq 0,001$) a obdobný deficit byl zjištěn i v období FU (Obr. 25).



Obr. 25 Aktivita komplexu I v homogenátu myokardu LK obohaceném o mitochondrie. Statistická signifikance (ANOVA) v porovnání s kontrolní skupinou: *** ($p \leq 0,001$).

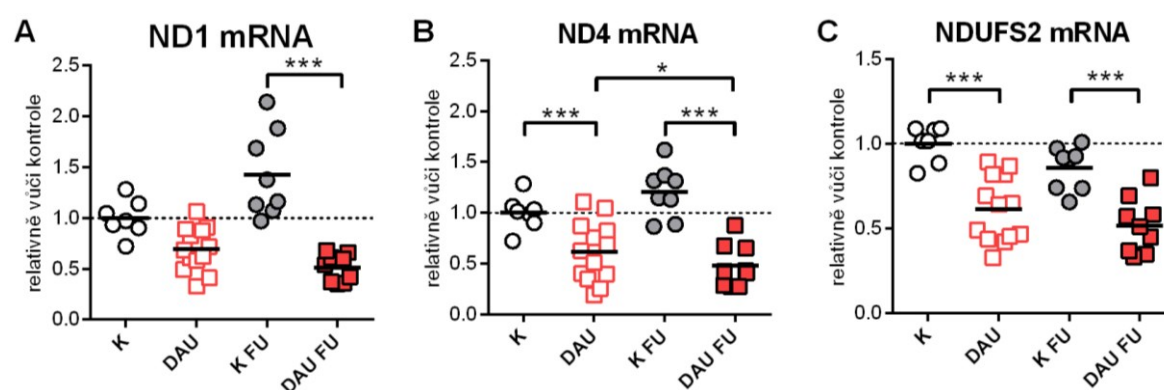
4.1.6 HODNOCENÍ MITOCHONDRIÁLNÍ BIOGENEZE

Ačkoliv výše uvedené výsledky jasně dokumentovaly poškození mitochondriálních funkcí po chronické expozici DAU, nebyla pozorována aktivace endogenní protektivní odpovědi formou zvýšené aktivity mitochondriální biogeneze. Hodnocení genové exprese PGC1 α , klíčového regulátoru mitochondriální biogeneze, nepřineslo žádné důkazy o zvýšené expresi tohoto faktoru vlivem podávání DAU v žádném z hodnocených období (Obr. 26A). Nicméně v období FU byl pozorován mírný, ale signifikantní nárůst genové exprese PGC1 α v kontrolní skupině; tento vzestup nebyl nalezen u zvířat, kterým byl předtím podáván DAU. Z tohoto důvodu byl identifikován významný rozdíl mezi kontrolní a DAU skupinou v období FU ($p \leq 0,05$). Obdobný trend byl také zjištěn u dalšího člena kaskády mitochondriální biogeneze, nukleárního respiračního faktoru 1 (NRF1), kde byl relativní rozdíl oproti kontrole ještě významnější (Obr. 26B). Další zástupce kaskády mitochondriální biogeneze, mitochondriální transkripční faktor A (TFAM), vykazoval výrazné ovlivnění DAU již na konci jeho podávání. Expres tohoto důležitého faktoru byla v obou obdobích výrazně snížena o $\approx 50\%$ ($p \leq 0,001$; Obr. 26C).



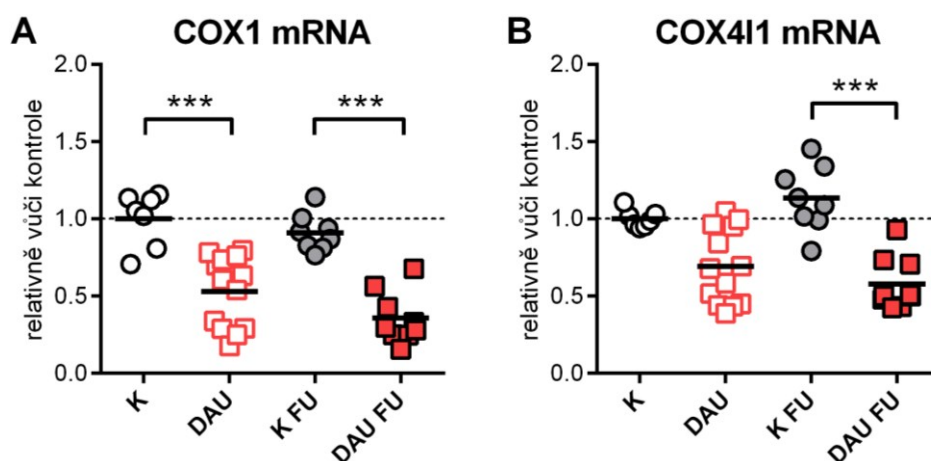
Obr. 26 Relativní genová exprese (A) klíčového regulátoru mitochondriální biogeneze PPAR- γ koaktivátoru 1- α (PGC1 α) a jeho cílových transkripčních faktorů (B) nukleárního respiračního faktoru 1 (NRF1) a (C) mitochondriálního transkripčního faktoru A (TFAM). Statistická signifikance (ANOVA) mezi jednotlivými skupinami: * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$) a *** ($p \leq 0,001$).

Opakované podávání DAU mělo významně negativní vliv na expresi klíčových podjednotek jednotlivých komplexů dýchacího řetězce. Bylo pozorováno významné snížení exprese těchto proteinů bez ohledu na to, zda jsou kódovány nDNA nebo mtDNA. V případě mitochondriálně kódovaných podjednotek komplexu I bylo možné pozorovat jistý trend ke snížení exprese podjednotky ND1 již na konci experimentu, ale statistické signifikance tento účinek dosáhl až v období FU (Obr. 27A). Naproti tomu byla exprese podjednotky ND4 byla výrazně a signifikantně snížena již na konci podávání DAU ($\approx 40\%$) a v následujícím období FU pokles exprese nadále pokračoval (Obr. 27B). Nukleárně kódovaná podjednotka NDUFS2 vykazovala výrazný pokles genové exprese v obou sledovaných intervalech obdobně jako mtDNA kódovaná podjednotka ND4 (Obr. 27C).



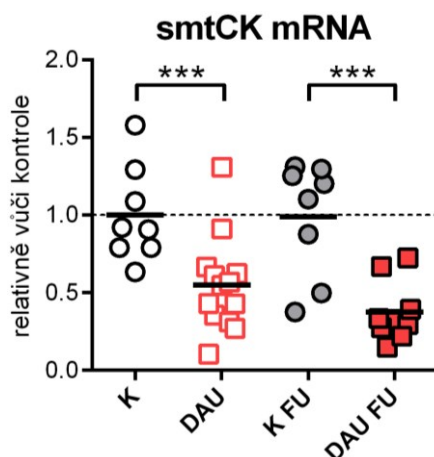
Obr. 27 Hodnocení změn v genové expresi podjednotek komplexu I dýchacího řetězce. Relativní exprese mitochondriálně kódovaných podjednotek (A) ND1, (B) ND4 a (C) nukleárně kódované podjednotky NDUFS2. Statistická signifikance (ANOVA) mezi jednotlivými skupinami: * ($p \leq 0,05$) a *** ($p \leq 0,001$).

Taktéž podjednotky komplexu IV vykazovaly sníženou expresi po podávání DAU. Expresi mitochondriálně kódované podjednotky COX1 byla signifikantně snížena již na konci podávání DAU a tento účinek přetrvával i v období FU (Obr. 28A). Ačkoliv snížení exprese nukleárně kódované COX4I1 vykazovalo statistickou signifikanci až v období FU (Obr. 28B), očividný trend ke snížení exprese této podjednotky byl patrný již na konci podávání cytostatika.



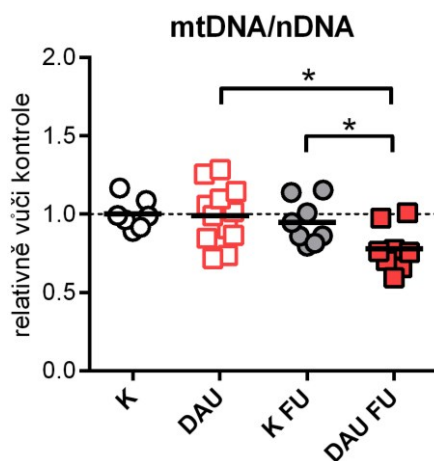
Obr. 28 **Hodnocení změn v genové expresi podjednotek komplexu IV dýchacího řetězce. Relativní exprese (A) mitochondriálně kódované podjednotky COX1 a (B) nukleárně kódované podjednotky COX4I1.** Statistická signifikance (ANOVA) v porovnání s kontrolní skupinou: *** ($p \leq 0,001$).

Kromě podjednotek dýchacího řetězce byla negativně ovlivněna i exprese dalších proteinů důležitých pro energetický metabolismus kardiomyocytů. Například genová exprese mitochondriální formy kreatinkinázy (smtCK) byla výrazně snížena již na konci podávání DAU (o 45 %, $p \leq 0,001$) a další snížení ještě následovalo v období FU, které dosáhlo až na 38 % ($p \leq 0,001$) původních hodnot (Obr. 29).



Obr. 29 **Relativní genová exprese mitochondriální formy kreatinkinázy (smtCK).** Statistická signifikance (ANOVA) v porovnání s kontrolní skupinou: *** ($p \leq 0,001$).

Při stanovení relativního množství mtDNA však nebyl shledán významný pokles tohoto parametru na konci opakovaného podávání DAU. Poměr mtDNA/nDNA vykazoval signifikantní pokles až v období FU (Obr. 30).



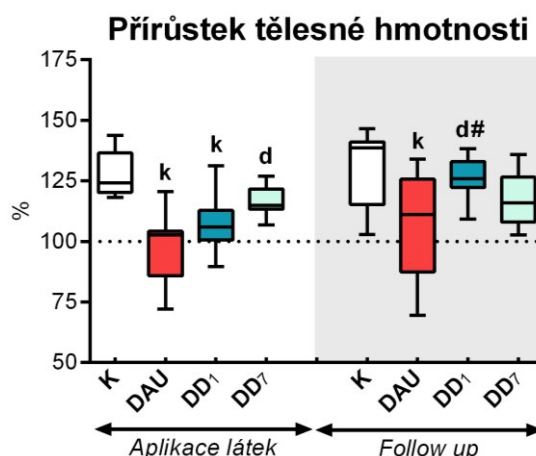
Obr. 30 **Relativní poměr množství mtDNA/nDNA.** Statistická signifikance (ANOVA) v porovnání s kontrolní skupinou: * ($p \leq 0,05$).

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

4.2.1 HODNOCENÍ CELKOVÉ TOXICITY

Podávání DEX v obou použitých schématech dokázalo účinně zabránit předčasným úhynům, které se vyskytly v průběhu opakovaného podáváním DAU (0 vs. 19 %). Stejně tak všechna zvířata, kterým byl podáván DEX, dožila plánovaného konce období FU a nevykazovala nápadné vnější známky zhoršeného zdravotního stavu. Tyto výsledky výrazně kontrastující se skupinou dostávající samotný DAU, kde musela být většina zvířat (82 %) předčasně ukončena podle protokolu studie z důvodu závažného poklesu systolické srdeční funkce pod předem stanovenou mez (LVFS < 20 %) indikující dekompenzované srdečního selhání s vysokou pravděpodobností předčasného úhynu. Při pitvě zvířat dostávajících DEX také nebyly pozorovány žádné známky městnání krve či výrazná remodelace srdce, což bylo opět v protikladu k nálezům zvířat, kterým byl podáván samotný DAU.

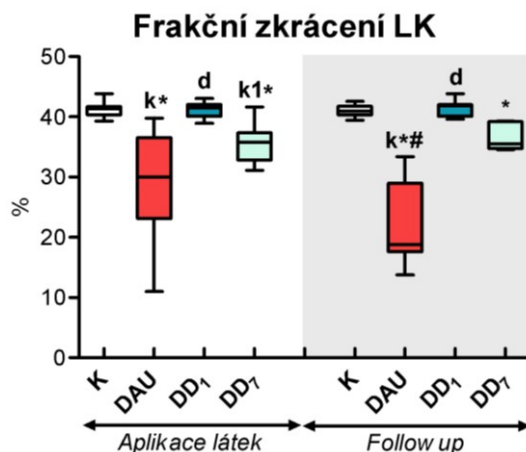
Podávání DEX s každou dávkou DAU vedlo v porovnání s kontrolní skupinou k signifikantně nižšímu přírůstku tělesné hmotnosti na konci první etapy pokusu a získané výsledky byly velmi blízké skupině se samotným DAU (Obr. 31). Použití odložené kardioprotektivní intervence vedlo ve stejné etapě pokusu k mírnému přírůstku hmotnosti, který byl významně vyšší než u samotného DAU. Pokusná zvířata s časnou kardioprotektivní intervencí však zaznamenala významný přírůstek tělesné hmotnosti v nadcházejícím období FU, přičemž tyto hodnoty byly významně vyšší než v DAU skupině. Naopak výsledky zvířat s odloženou kardioprotektivní intervencí nezaznamenaly v tomto intervalu žádné změny v porovnání s předchozím obdobím a rozdíl oproti DAU skupině již nedosahoval statistické signifikance.



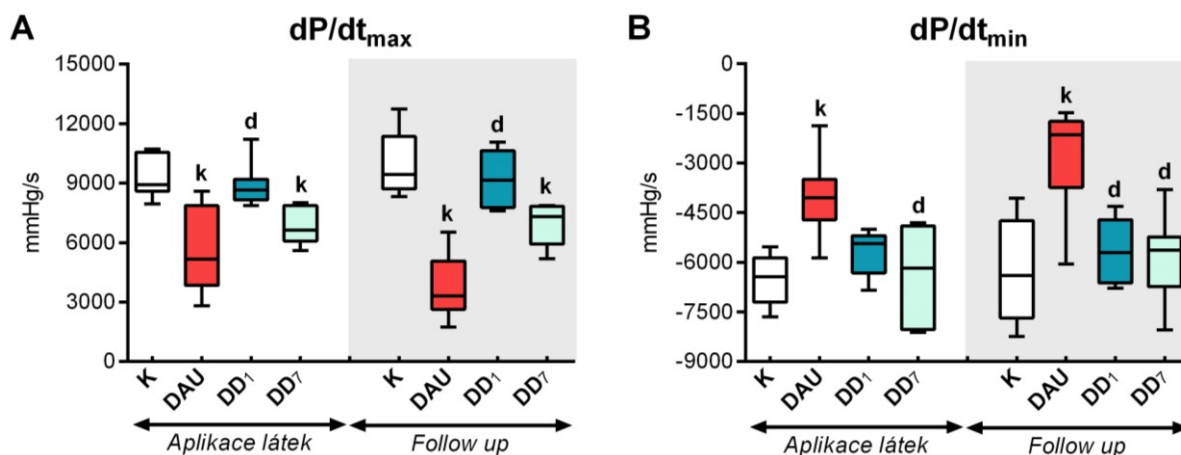
Obr. 31 **Přírůstek tělesné hmotnosti.** Statistická signifikance (ANOVA, $p \leq 0,05$) v porovnání s (k) kontrolní a (d) DAU skupinou. Statistická signifikance v rámci dané skupiny (párový t-test, $p \leq 0,05$) v porovnání s hodnotou na konci podávání látek (#).

4.2.2 HODNOCENÍ FUNKCE LEVÉ KOMORY

V obou schématech podávání DEX bylo dosaženo určitého stupně kardioprotekce proti poškození srdce vyvolaného opakovaným podáváním DAU. Výrazně lepších výsledků bylo ovšem dosaženo při užití časně kardioprotektivní intervence, neboť v tomto schématu DEX zcela zabránil závažnému poškození systolické funkce LK, jak dokumentovalo echokardiografické (Obr. 32) i katetrizačního vyšetření (Obr. 33A). Tento účinek byl jasně patrný i v následném období FU, kdy se parametry systolické funkce nelišily od kontrolních hodnot a byly významně vyšší než v DAU skupině. Naopak při užití odložené kardioprotektivní intervence byly oba hodnocené parametry systolické funkce LK na konci podávání signifikantně nižší než v kontrolní skupině (Obr. 32 a Obr. 33A) a významný rozdíl byl zachován i v následujícím období FU. Z výsledků bylo ovšem patrné, že pokles systolické srdeční funkce není tak závažný jako u zvířat dostávajících samotný DAU. Naproti tomu oba režimy kardioprotektivní intervence vykazovaly stejnou schopnost omezit postižení diastolické funkce LK navozené DAU (Obr. 33B). Reprezentativní záznamy echokardiografického a katetrizačního vyšetření jsou prezentovány v Obr. 34 a Obr. 35.



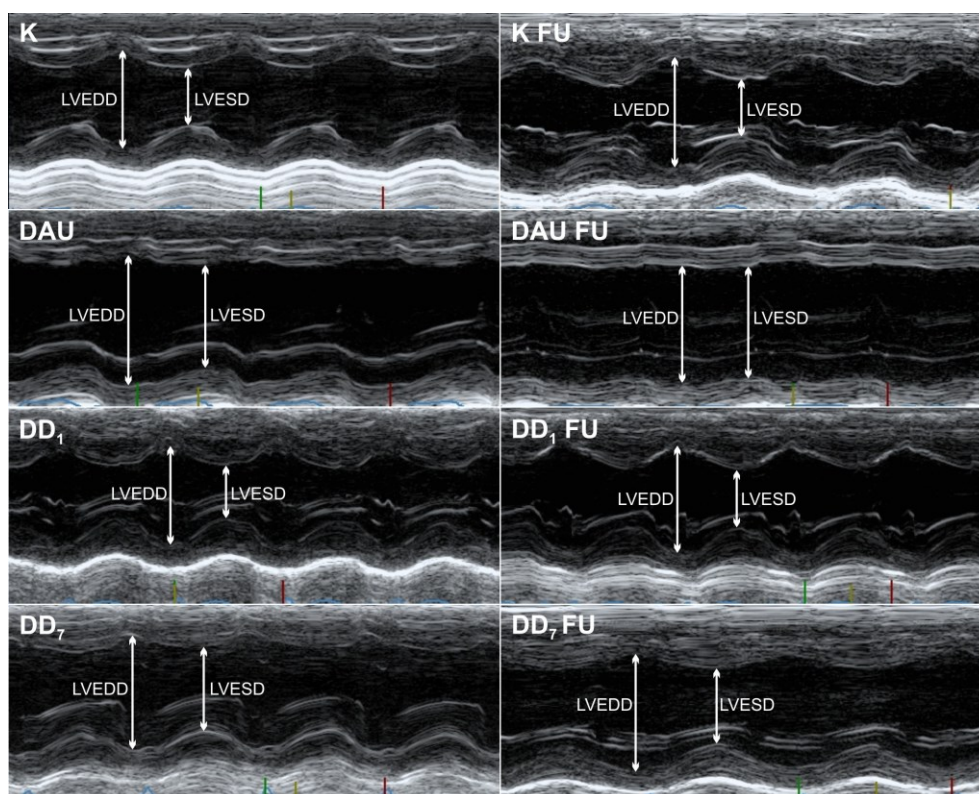
Obr. 32 **Echokardiografické vyšetření systolické funkce LK.** Statistická signifikance v rámci dané skupiny (párový *t*-test, $p \leq 0,05$) v porovnání s počáteční hodnotou (*) nebo hodnotou na konci podávání látek (#) v rámci dané skupiny. Statistická signifikance (ANOVA, $p \leq 0,05$) v porovnání s (k) kontrolní, (d) DAU skupinou a časnou DEX intervencí (1). PZH – poslední zaznamenaná hodnota.



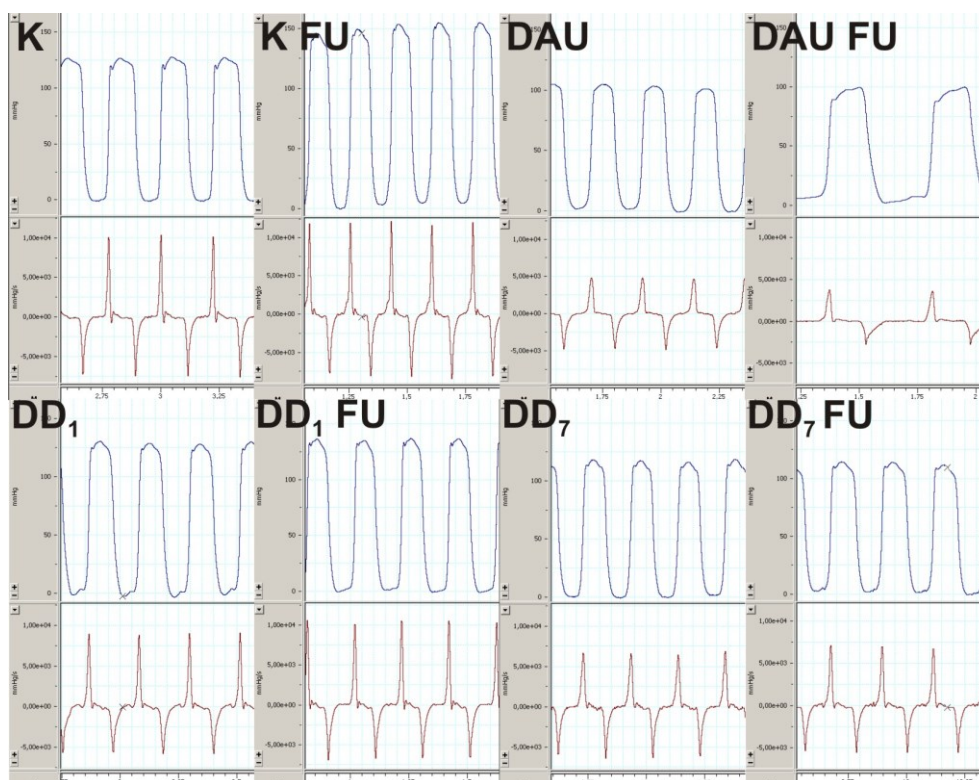
Obr. 33 **Katetrizační vyšetření (A) systolické (dP/dt_{max}) a (B) diastolické funkce LK (dP/dt_{min}).** Statistická signifikance (ANOVA, $p \leq 0,05$) v porovnání s kontrolní skupinou (k) a DAU skupinou (d).

4.2.3 HODNOCENÍ PLAZMATICKÝCH KONCENTRACÍ SRDEČNÍHO TROPONINU T

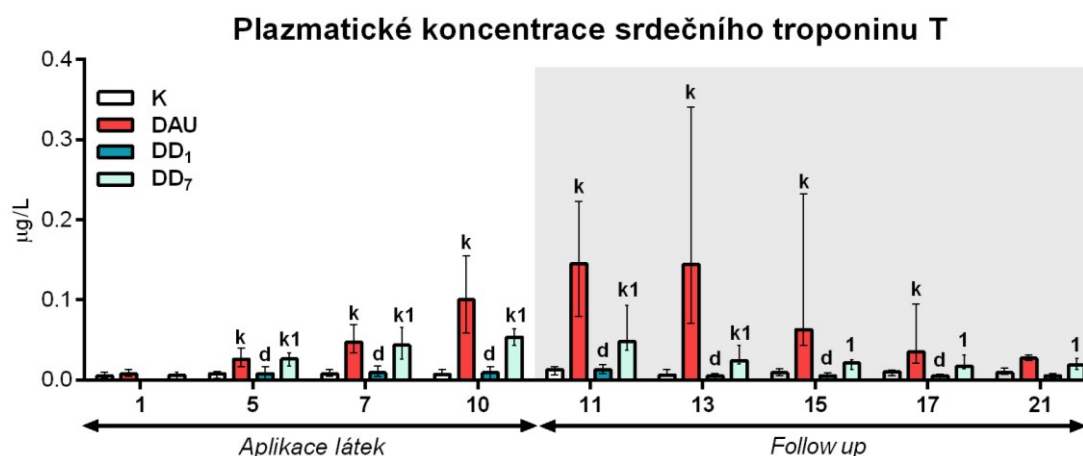
Podání DEX v obou schématech dokázalo významně snížit plazmatické koncentrace srdečního troponinu T (cTnT) vyvolané podáváním DAU a protektivní účinek byl patrný i v průběhu následného období FU. Nicméně podávání DEX od první dávky DAU zcela zabránilo nárůstu plazmatických koncentrací cTnT a v průběhu celých 20 týdnů pokusu byly koncentrace téměř identické s kontrolními hodnotami. Pokud byl ale DEX podáván až od 7. dávky DAU, kdy plazmatické koncentrace cTnT odpovídaly koncentracím v DAU skupině, bylo účinně zabráněno pouze dalšímu masivnímu nárůstu koncentrací cTnT v plazmě a po zbylou část experimentu byly koncentrace signifikantně vyšší než v kontrolní skupině i skupině s časnou kardioprotektivní intervencí (Obr. 36).



Obr. 34 **Reprezentativní záznamy echokardiografického vyšetření LK v M-módu u jednotlivých skupin.** LVEDD – rozměr levé komory na konci diastoly, LVESD – rozměr levé komory na konci systoly.



Obr. 35 **Reprezentativní záznamy katetrizačního vyšetření levé komory.** Horní část záznamu (modrá křivka) zobrazuje tlaky v LK, dolní část (červená křivka) zobrazuje hodnoty indexu dp/dt_{max} a dp/dt_{min} .

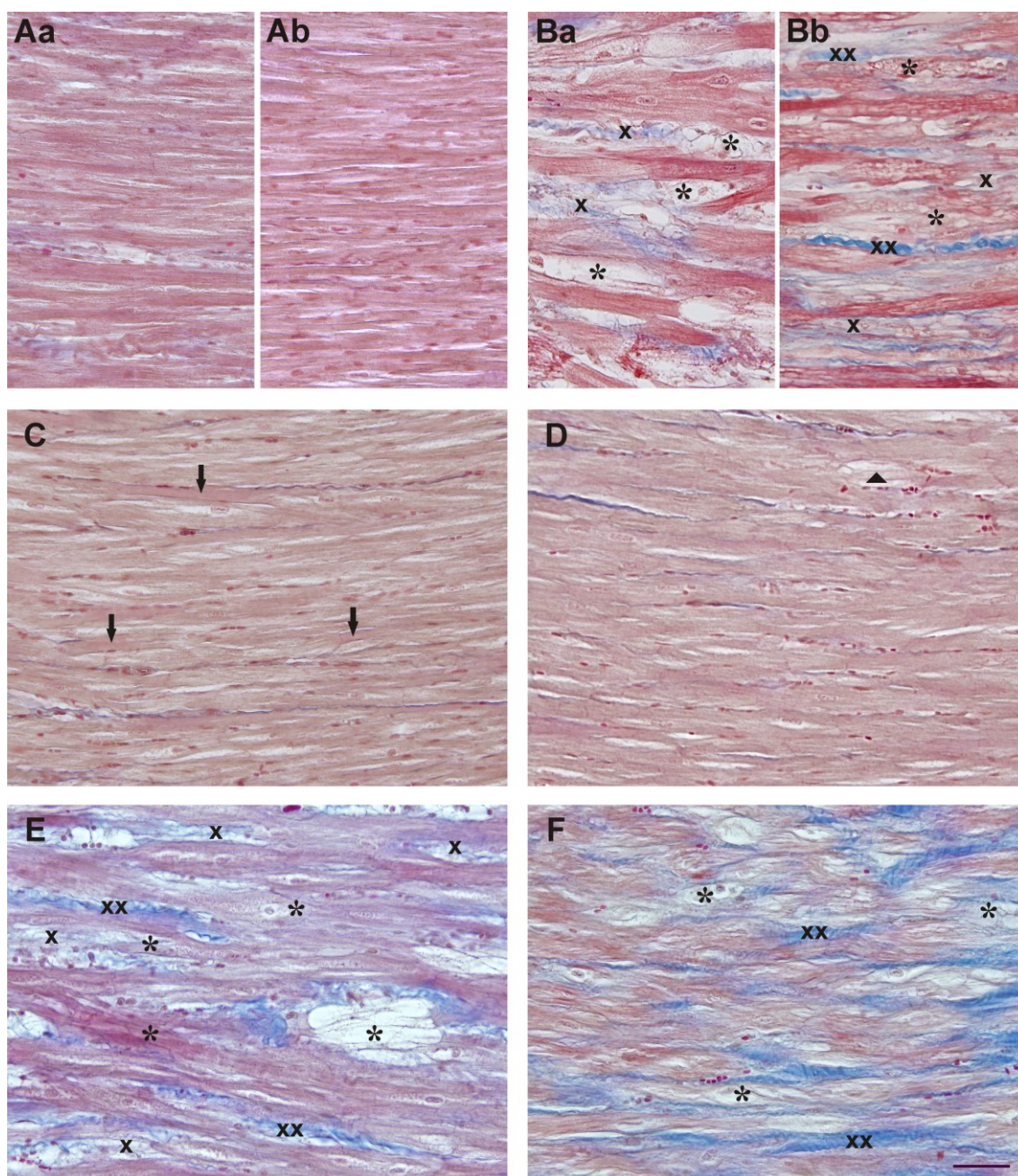


Obr. 36 **Koncentrace srdečního troponinu T v plazmě.** Statistická (ANOVA, $p \leq 0,05$) v porovnání s kontrolní skupinou (k), DAU skupinou (d) a časnou DEX intervencí (1).

4.2.4 HISTOPATOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ MYOKARDU LEVÉ KOMORY

Histologické vyšetření myokardu levé komory na konci podávání DAU odhalilo častá a poměrně rozsáhlá ložiska patologických změn v myokardu LK a mezikomorového septa. Nálezům dominovaly charakteristické degenerativní změny kardiomyocytů vyjádřené jako různé stupně ztráty myofibril (od počátečních až po téměř kompletní) či vakuolizace cytoplazmy (Obr. 37Ba). V oblastech myokardu s pokročilými degenerativními změnami se začínala rozvíjet náhradová fibróza jako součást reparačního procesu. V období FU byly nalezeny obdobné degenerativní změny kardiomyocytů (Obr. 37Bb), ale jejich četnost se jevila být o něco nižší, zatímco náhradová fibróza patřila mezi hlavní změny pozorované v tomto období zvláště u zvířat, která přežila celé období FU.

Podávání DEX spolu s DAU dokázalo zabránit nebo alespoň snížit výskyt výše uvedených charakteristických degenerativních změn v kardiomyocytech (ztráta myofibril, vakuolizace cytoplazmy) navozených expozicí DAU a stejně tak i snížit výskyt fibrózy (Obr. 37C, D). Podstatně významnějšího protektivního účinku bylo ale dosaženo s užitím časně kardioprotektivní intervence, kdy morfologický obraz na konci podávání kombinace léčiv fakticky odpovídal nálezu u kontrolních vzorků (Obr. 37A). Degenerativní změny kardiomyocytů zde buď zcela chyběly, nebo se vyskytovaly pouze velmi zřídka (několik málo izolovaných kardiomyocytů) a vždy byly v porovnání s DAU skupinou jen velmi málo vyjádřené (Obr. 37C). V období FU nebyla v této skupině zaznamenána žádná progresse a morfologický obraz byl opět velmi blízký kontrolní skupině s naprosto minoritním zastoupením kardiomyocytů vykazující degenerativní změny (Obr. 37D).



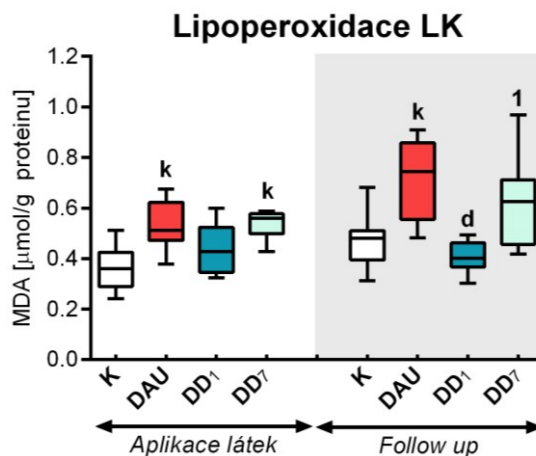
Obr. 37 **Histologické hodnocení změn v myokardu LK.** Kontrolní skupina s normální morfologií myokardu na konci podávání látek (**Aa**) a v následném období FU (**Ab**). (**Ba**) Charakteristické degenerativní změny myokardu vyvolané opakovaným podáváním DAU reprezentované rozsáhlou ztrátou kardiomyocytů, desorganizací myofibril, cytoplazmatickou vakuolizací (*) a počínající náhradovou fibrózou (x) progredující v následném období FU (**Bb**) až do formy jemných jizev (xx). Časná kardioprotekce pomocí DEX (**C**) dokázala zachovat téměř normální strukturu myokardu s pouze ojedinělými známkami počínající degenerace kardiomyocytů (↓). Podobný nálezný byl patrný i v následujícím období FU (**D**) s pouze ojedinělými případy ztráty myofibrilů a cytoplazmatické vakuolizace (▲). (**E**) Odložená kardioprotektivní intervence pomocí DEX měla za následek četné a výrazné degenerativní změny kardiomyocytů (*) s převládající náhradovou fibrózou (x) i v pokročilých stádiích (xx) již na konci podávání látek. Pokročilá náhradová fibróza pak zcela dominovala histologickým nálezům v této skupině během období FU (**F**).

Naopak podávání DEX v režimu odložené kardioprotektivní intervence prokazatelně nedokázalo účinně zabránit rozvoji degenerativních změn navozených DAU (Obr. 37E, F). Již na konci podávání léčiv bylo v myokardu patrné množství kardiomyocytů

s charakteristickými patologickými změnami a významná náhradová fibróza. V následném období byly degenerativní změny v kardiomyocytech poněkud méně patrné, nicméně náhradová fibróza byla výrazně častější než v DAU skupině ve stejném intervalu (FU; Obr. 37F).

4.2.5 HODNOCENÍ OXIDAČNÍHO POŠKOZENÍ A ANTIOXIDAČNÍ OCHRANY V MYOKARDU LEVÉ KOMORY

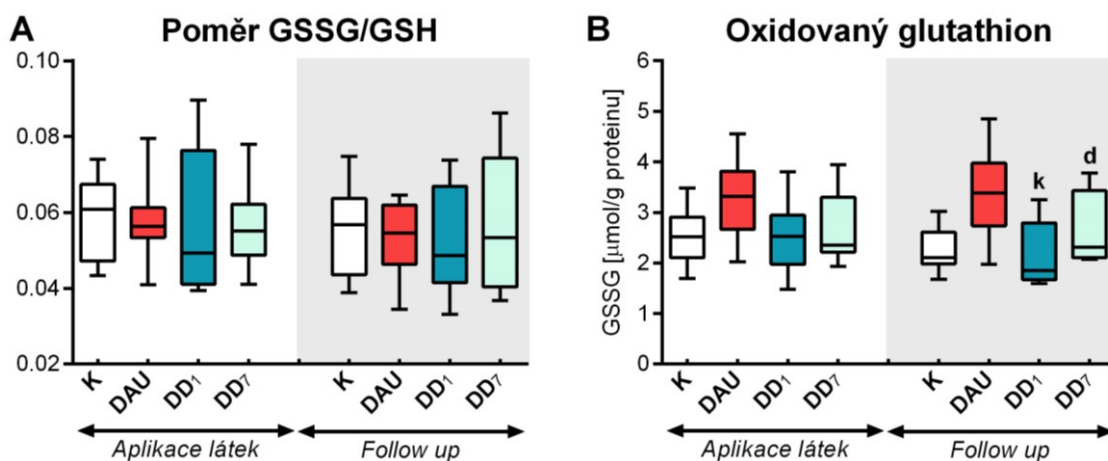
Hodnocení koncentrací MDA v myokardu LK na konci podávání léčiv ukázalo, že žádná z kardioprotektivních intervencí pomocí DEX nebyla schopna účinně zabránit nárůstu lipoperoxidace, kterou navodilo opakované podávání DAU (Obr. 38). Navzdory výše popsanému vynikajícímu stupni ochrany myokardu při užití časně kardioprotektivní intervence byl nárůst lipoperoxidace potlačen pouze částečně a nesignifikantně. Ve skupině s odloženým podáváním DEX pak nebyla v tomto intervalu znatelná žádná známka protekce před navozením lipoperoxidace vlivem podávání DAU. Naopak protektivní účinek DEX byl poměrně dobře patrný v následujícím období FU, kdy bylo navíc možné pozorovat i významný rozdíl mezi účinkem časně a odložené kardioprotektivní intervence.



Obr. 38 **Hodnocení lipoperoxidace myokardu LK.** Statistická signifikance (ANOVA, $p \leq 0,05$) v porovnání s (k) kontrolní, (d) DAU skupinou a časnou DEX intervencí (1).

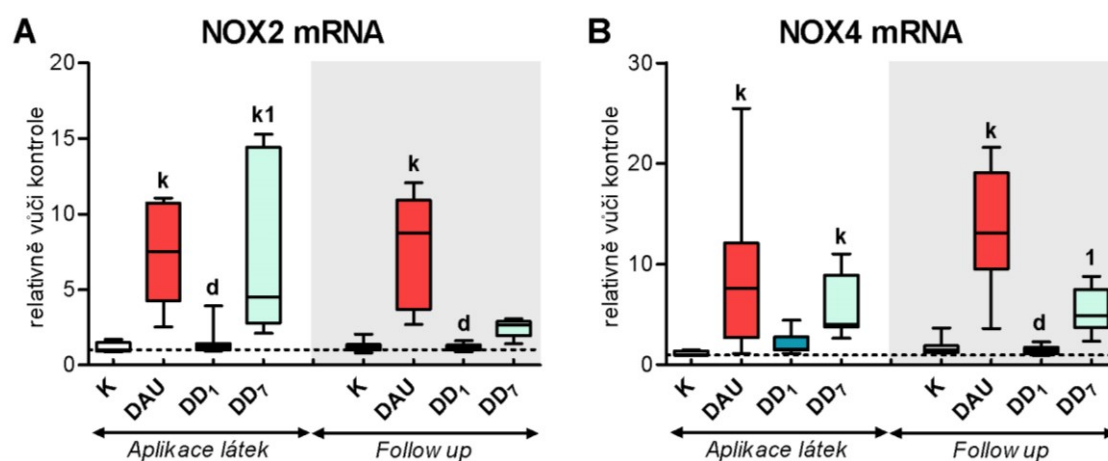
Při hodnocení poměru oxidovaného a redukovaného glutathionu v myokardu LK nebyl zaznamenán žádný vliv kombinace podávaných léčiv (DEX + DAU) na tento parametr v obou sledovaných intervalech a výsledky se podobně jako u DAU skupiny významně nelišily od kontrolní skupiny (Obr. 39A). Nicméně přítomnost určitého oxidačního inzultu po podávání DAU byla potvrzena signifikantně zvýšeným množstvím oxidovaného glutathionu, zejména pak v období FU (Obr. 39B), kterému bylo možné

zabránit podáváním DEX. V tomto ohledu se častá kardioprotektivní intervence pomocí DEX opět jevila jako účinnější, neboť zde byl zaznamenán významný rozdíl oproti DAU skupině, což ale nebyl případ odloženého podání DEX.



Obr. 39 (A) Poměr oxidované a redukované formy glutathionu (GSSG/GSH) v myokardu LK a (B) množství oxidované formy glutathionu (GSSG) v myokardu LK. Statistická signifikance (ANOVA, $p \leq 0,05$) v porovnání s (k) kontrolní a (d) DAU skupinou.

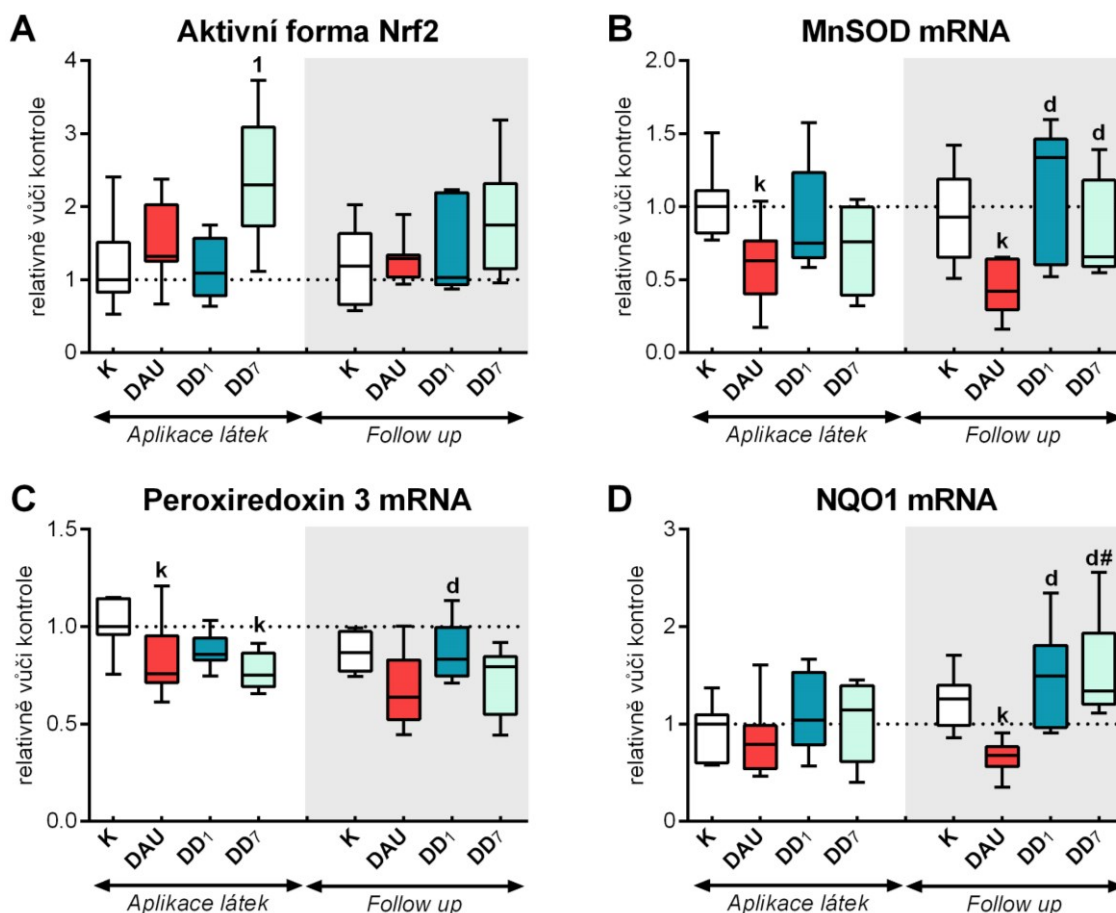
Podávání DEX bylo také schopno zabránit výraznému zvýšení exprese nejvýznamnějších myokardiálních izoform NADPH oxidáz (NOX2 a NOX4) indukovaných opakovaným podáváním DAU. Časná kardioprotektivní intervence byla schopná zcela a dlouhodobě zabránit zvýšení exprese obou genů, zatímco odložený režim podání DEX byl schopen zabránit těmto změnám pouze částečně (Obr. 40A, B).



Obr. 40 Relativní genová exprese NADPH oxidáz v myokardu LK: (A) NOX2 a (B) NOX4. Statistická signifikance (ANOVA, $p \leq 0,05$) v porovnání s (k) kontrolní, (d) DAU skupinou a časnou DEX intervencí (1).

Navzdory výše zmíněným důkazům o přítomnosti oxidačního inzultu, nebylo u studovaných skupin (s výjimkou odložené kardioprotektivní intervence na konci pokusu)

zaznamenána změna v množství transkripčně aktivní formy proteinu Nrf2 (Obr. 41A). Ve shodě s tím nebyla zjištěna ani významná aktivace cílových genů pro Nrf2 u žádné z experimentálních skupin, a to včetně výše zmíněné skupiny s odloženou kardioprotektivní intervencí pomocí DEX. Naopak řada ze studovaných genů jako MnSOD, peroredoxin 3 a NQO1 (NADPH:chinonoxidoreduktáza 1) vykazovala sníženou expresi v důsledku podávání DAU a kardioprotekce pomocí DEX dokázala zamezit těmto změnám, zejména při užití časně kardioprotektivní intervence (Obr. 41C-D).

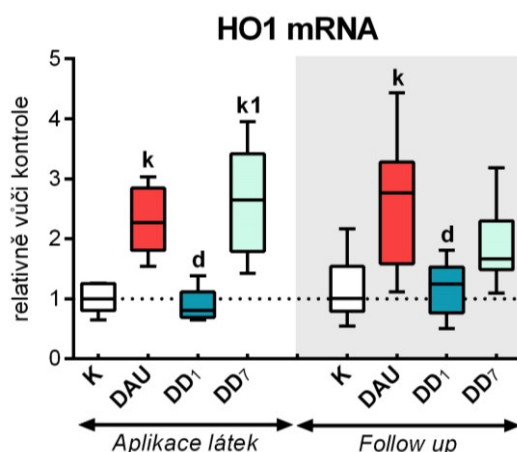


Obr. 41 (A) Množství transkripčně aktivní formy Nrf2 v nukleární frakci. Relativní genová exprese jeho cílových genů: (B) mitochondriální superoxidodismutázy (MnSOD), (C) peroxiredoxinu 3 a (D) NADPH:chinonoxidoreduktázy 1 (NQO1) v myokardu LK. Statistická signifikance (ANOVA, $p \leq 0,05$) v porovnání s (k) kontrolní, (d) DAU skupinou, časnou DEX intervencí (1) a (#) v porovnání s hodnotami na konci podávání látek v dané skupině.

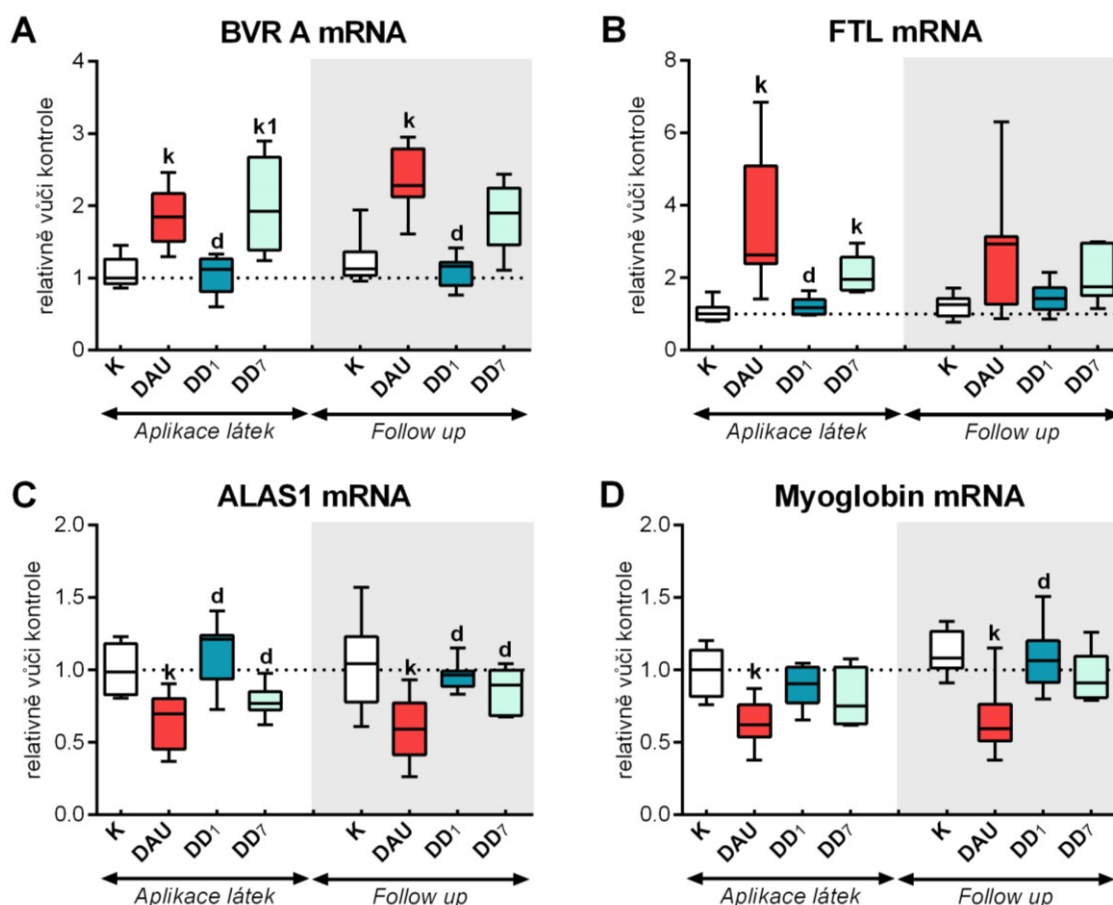
4.2.6 HODNOCENÍ EXPRESE GENŮ SPOJENÝCH S AKTIVITOU HEMOXYGENÁZY 1

Jediným cílovým genem Nrf2 signální kaskády, jehož exprese byla indukována v důsledku podávání DAU, byla hemoxygenáza 1 (HO1) vykazující signifikantně zvýšenou expresi i v průběhu období FU. Časná kardioprotektivní intervence však dokázala tomuto zvýšení exprese zcela zabránit, a to v obou studovaných časových

intervalech. Při použití odloženého schématu podávání DEX byla exprese HO1 ale významně vyšší než v kontrolní skupině a dosahovala obdobných hodnot jako v DAU skupině. V následujícím období pak došlo pouze k mírnému snížení exprese uvedeného genu (Obr. 42). Velmi podobné výsledky byly zjištěny i v případě genové exprese dalších proteinů spojených s degradací hemu, biliverdinreduktázy A (BVR A) a lehkých řetězců ferritinu (FTL, Obr. 43A, B). Změna genové exprese 5-aminolevulátsyntázy 1 (ALAS1), která je klíčovým enzymem pro regulaci syntézy hemu, byla v důsledku podávání DAU regulována opačně. Podání DEX spolu s DAU dokázalo těmto změnám zabránit, ale stejně jako v případě proteinů spojených s degradací hemu bylo lepších výsledků dosaženo při užití časně kardioprotektivní intervence (Obr. 43C). Opakované podání DAU též vedlo k významnému snížení exprese myoglobinu, jako jednoho z nejvýznamnějších hemoproteinů obsažených v myokardu LK, a tyto změny přetrvávaly i v období FU. Obě kardioprotektivní intervence pomocí DEX zabránily významnému poklesu tohoto parametru, nicméně i zde bylo dosaženo lepších výsledků při podávání DEX s každou dávkou cytostatika (Obr. 43D).

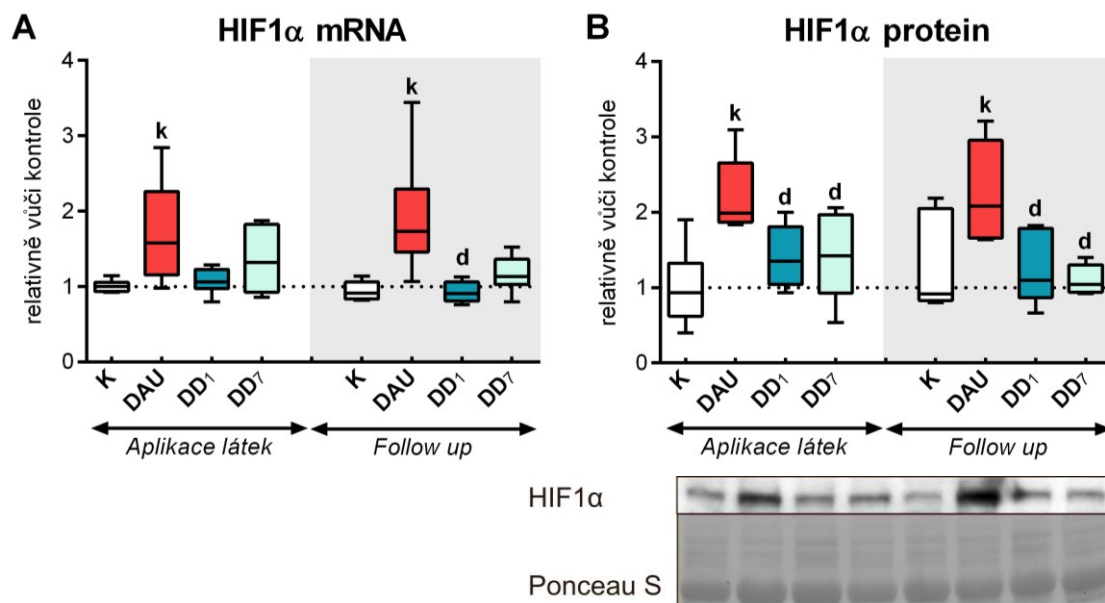


Obr. 42 **Relativní genová exprese hemoxygenázy 1 v myokardu LK.** Statistická signifikance (ANOVA, $p \leq 0,05$) v porovnání s (k) kontrolní, (d) DAU skupinou a časnou DEX intervencí (1).



Obr. 43 **Hodnocení genové exprese enzymů spojených s degradací hemu. Relativní exprese (A) biliverdinreduktázy A (BVR A), (B) lehkých řetězců feritinu (FTL) a (C) γ -aminolevulátsyntázy 1 (ALAS1) a (D) myoglobinu.** Statistická signifikance (ANOVA, $p \leq 0,05$) v porovnání s (k) kontrolní, (d) DAU skupinou a časnou DEX intervencí (1).

Analýza získaných výsledků nenaznačovala, že by regulace exprese HO1 byla zprostředkována prostřednictvím Nrf2 signální kaskády a zároveň nebyly zjištěny žádné známky zánětlivé reakce, které by naznačovaly možnou regulaci prostřednictvím NF- κ B. Pozornost proto byla dále zaměřena na úlohu HIF1 α jako dalšího významného transkripčního regulátoru exprese HO1. Stanovením genové exprese HIF1 α bylo zjištěno jeho výrazné zvýšení v tomto parametru vlivem podávání DAU, které přetrvávalo i v následujícím období FU (Obr. 44A). Stejně tak bylo zvýšeno i množství proteinu HIF1 α v nukleární frakci (Obr. 44B) v obou sledovaných intervalech. Podávání DEX v obou schématech dokázalo shodně těmto změnám zabránit.

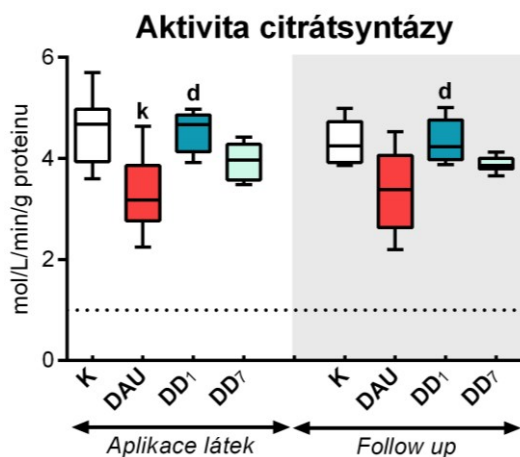


Obr. 44 **Relativní genová exprese (A) HIF1 α v myokardu LK a (B) stanovení relativního množství proteinu HIF1 α v nukleární frakci v homogenátu myokardu LK.** Nanáška proteinu na gely byla kontrolována barvením PVDF membrány pomocí Ponceau S. Statistická signifikance (ANOVA, $p \leq 0,05$) v porovnání s (k) kontrolní a (d) DAU skupinou.

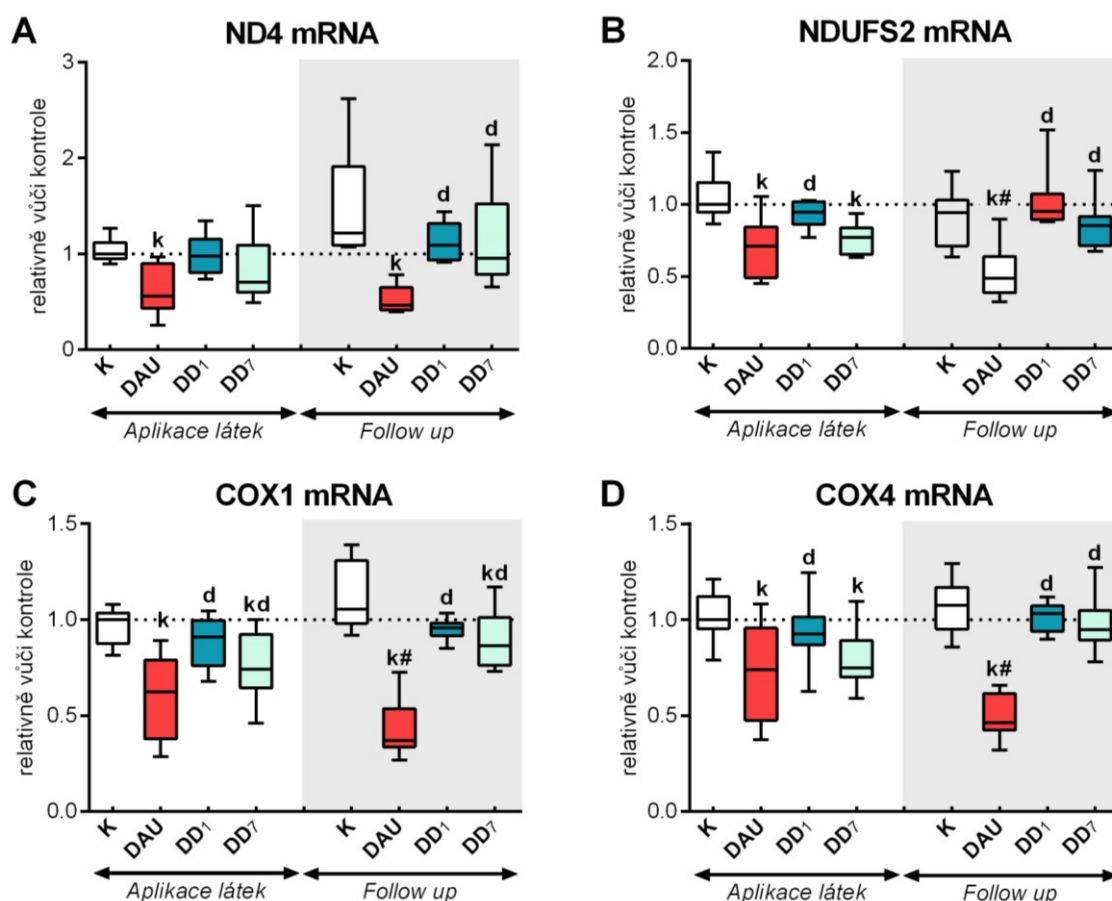
4.2.7 HODNOCENÍ MITOCHONDRIÁLNÍHO POŠKOZENÍ A PROCESU MITOCHONDRIÁLNÍ BIOGENEZE

Hodnocení aktivity citrátsyntázy (Obr. 45) jako markeru množství mitochondrií v tkáni prokázalo, že podávání DEX od první dávky DAU umožnilo zcela předejít poklesu množství mitochondrií v myokardu LK v důsledku podávání cytostatika. Tento účinek byl zachován bez názaku změny i v období FU, což naznačuje dlouhotrvající ochranu těchto organel pomocí DEX před toxickými účinky DAU. Naopak při použití odložené kardioprotektivní intervence byla protektivní účinnost DEX nižší a výsledky již nevykazovaly signifikantní rozdíl v porovnání se skupinou, které byl podáván samotný DAU.

Časná kardioprotektivní intervence byla účinnější i při ochraně před poklesem exprese podjednotek komplexu I a IV dýchacího řetězce navozeným DAU. Tento účinek byl jasně patrný jak u podjednotek kódovaných mitochondriálním (ND4 a COX1), tak i nukleárním (NDUFS2 a COX4A1) genomem (Obr. 46). Časná kardioprotektivní intervence pomocí DEX těmto negativním změnám zabránila účinněji než odložená intervence, neboť u žádné z podjednotek nedošlo k významnému poklesu genové exprese a výsledky byly téměř ve všech případech příznivější než po podávání ve skupině se samotného DAU.



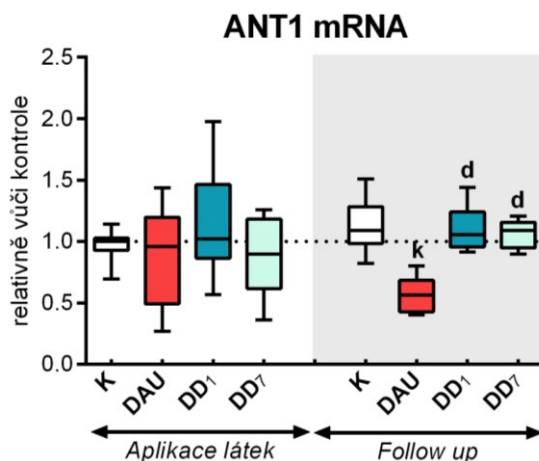
Obr. 45 **Hodnocení aktivity citrát syntázy v myokardu LK.** Statistická signifikance (ANOVA, $p \leq 0,05$) v porovnání s (k) kontrolní, (d) DAU skupinou a časnou DEX intervencí (1).



Obr. 46 **Hodnocení relativní genové exprese mitochondriálně a nukleárně kódovaných podjednotek komplexu I a IV dýchacího řetězce.** Relativní exprese (A) mitochondriálně (ND4) a (B) nukleárně (NDUFS2) kódované podjednotky komplexu I. Relativní exprese (C) mitochondriálně (COX1) a (D) nukleárně (COX4A11) kódované podjednotky komplexu IV. Statistická signifikance (ANOVA, $p \leq 0,05$) v porovnání s (k) kontrolní skupinou, (d) DAU skupinou a (#) v porovnání s hodnotami na konci podávání látek v dané skupině.

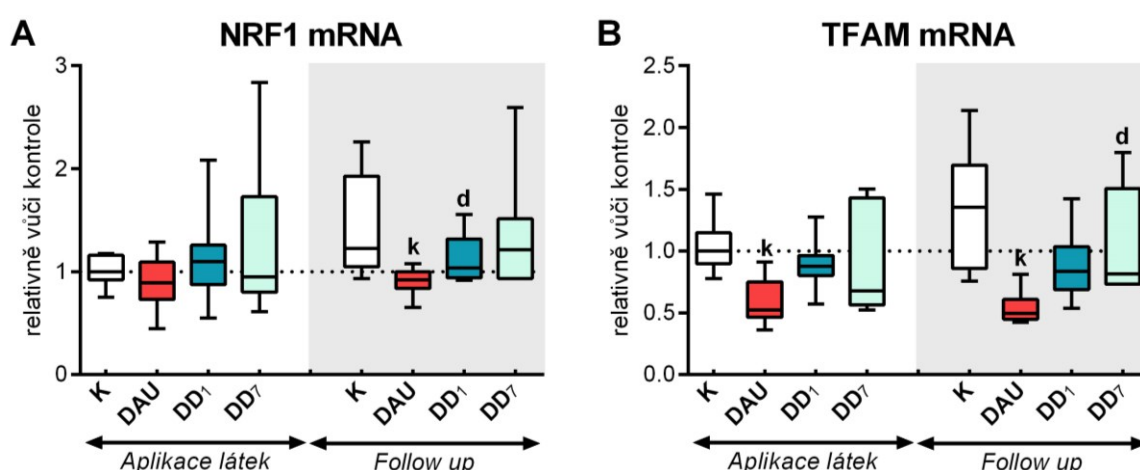
Kardiotoxicity navozená DAU byla též spojena s poklesem genové exprese dalších mitochondriálních proteinů spojených s energetickým metabolismem buňky

(např. adeninnukleotidtranslokázy 1; ANT1), a to zejména v období FU (Obr. 47). Obě kardioprotektivní intervence hodnocené v této studii pak byly schopny účinně zabránit tomuto poklesu v období FU.



Obr. 47 **Relativní genová exprese adeninnukleotidtranslokázy (ANT1) v myokardu LK.** Statistická signifikance (ANOVA, $p \leq 0,05$) v porovnání s (k) kontrolní a (d) DAU skupinou.

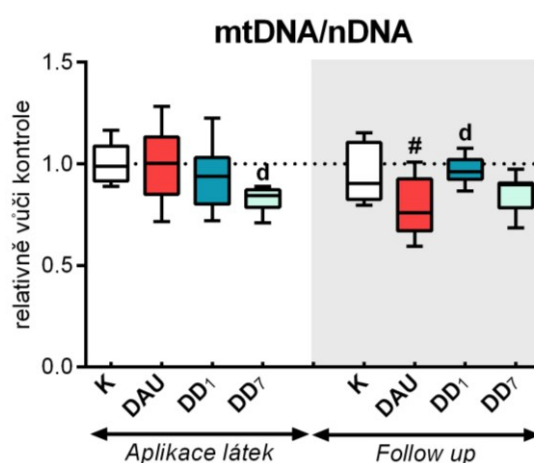
Protože genová exprese studovaných mitochondriálních proteinů je kontrolována prostřednictvím kaskády mitochondriální biogeneze a konkrétně pomocí transkripčních faktorů jako NRF1 a TFAM, byla v této studii hodnocena i genovou expresi těchto klíčových regulátorů. Zatímco v období FU byla exprese obou studovaných transkripčních faktorů výrazně snížena v důsledku podávání DAU (Obr. 48), signifikantní změna na konci podávání cytostatika byla zjištěna pouze v případě TFAM. Obě kardioprotektivní intervence pomocí DEX pak těmto změnám dokázaly zabránit.



Obr. 48 **Hodnocení mitochondriální biogeneze v myokardu LK – relativní genová exprese (A) nukleární respiračního faktoru 1 (NRF1) a (B) mitochondriálního transkripčního faktoru A (TFAM).** Statistická signifikance (ANOVA, $p \leq 0,05$) v porovnání s (k) kontrolní a (d) DAU skupinou.

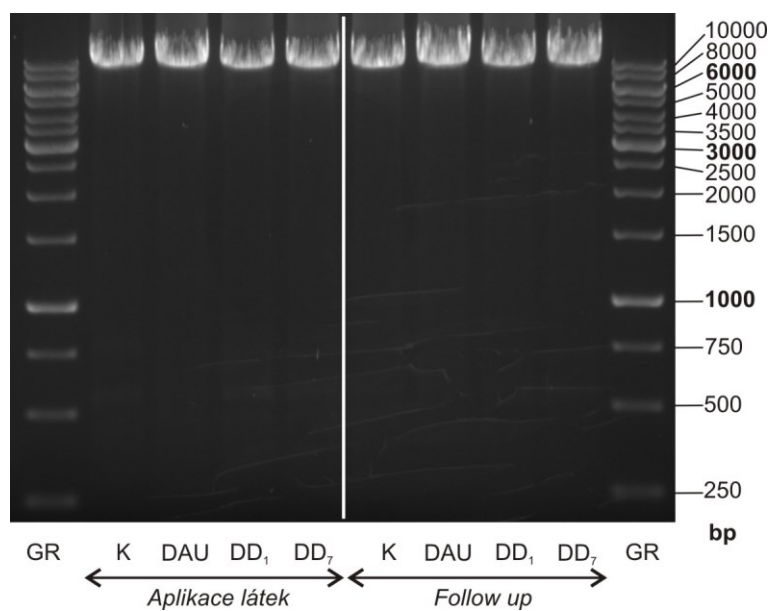
4.2.8 HODNOCENÍ POŠKOZENÍ MITOCHONDRIÁLNÍ DNA

Analýza relativního poměru kopií mitochondriální a nukleární DNA (Obr. 49) neshledala významnou změnu tohoto parametru na konci podávání DAU a stejné výsledky byly získány analýzou vzorků myokardu od zvířat s časnou kardioprotektivní intervencí. Nicméně při užití odloženého podání DEX byl překvapivě zjištěn pokles relativního množství mtDNA. Podávání samotného cytostatika se na poklesu relativního množství mtDNA významněji projevilo až v následném období FU, kterému byl DEX podaný s každou dávkou DAU schopen účinně zabránit. Odložená kardioprotektivní intervence již nebyla tak účinná.



Obr. 49 Relativní poměr množství mitochondriální a nukleární DNA v myokardu LK. Statistická signifikance (ANOVA, $p \leq 0,05$) v porovnání s (d) DAU skupinou a (#) v porovnání s hodnotami na konci podávání látek v dané skupině.

Protože předešlé práce spojovaly toxicitu DAU s indukcí tzv. běžných delečních mutací v mtDNA, pozornost byla také zaměřena na možnost, že mechanismus kardioprotektivního účinku je založen na ochraně před těmito mutacemi. Pomocí tzv. *long-range PCR* a separace produktu na agarózovém gelu nebyly však po podání DAU detekovány žádné deleční změny v mtDNA izolované z myokardu LK a podávání DEX v obou schématech nemělo na tyto výsledky žádný vliv (Obr. 50).



Obr. 50 **Analýza delečních mutací v mitochondriálním genomu v myokardu LK.** Porovnání produktů tzv. *long-range PCR* reakce amplifikující 9460 bp dlouhý úsek mtDNA na agarózovém gelu a následná vizualizace pomocí ethidium bromidu. Pro určení velikosti produktu byl použit standard GeneRuler 1 kb DNA Ladder (GR). V případě výskytu tzv. běžných delečních mutací (*common deletions*), nebo jiných delečních změn v analyzovaném úseku mtDNA by byl kromě základního PCR produktu detekován i PCR produkt o významně nižším množství páru bází (bp).

5 DISKUZE

Kardiotoxicita způsobená antracyklinovými (ANT) antibiotiky představuje již bezmála půl století závažný klinický problém, který je od svého počátku předmětem intenzivního interdisciplinárního výzkumu. Ačkoliv její následky jsou velmi vážné, ANT stále zaujímají významné postavení v moderní onkologické léčbě, a to zejména díky své vysoké terapeutické účinnosti a širí protinádorového spektra. Spíše než jejich postupné vytlačování z klinické praxe lze v posledním desetiletí sledovat tendenci k jejich užití v kombinaci s novějšími protinádorovými látkami, jako jsou např. biologicky cílená léčiva. I v těchto kombinacích je však nutné mít na paměti riziko kardiotoxicity, protože některá biologicky cílená protinádorová léčiva vykazují také určitý kardiotoxický potenciál (např. trastuzumab, sunitinib, sorafenib, bortezomib, cafilzomib). V monoterapii je riziko kardiotoxicity těchto nových léčiv relativně nízké a jimi způsobená srdeční dysfunkce má dle dostupných informací spíše přechodnou povahu (Force a kol. 2007). Nicméně při vzájemné kombinaci těchto léčiv může i při relativně nízkých kumulativních dávkách ANT docházet k těžkému poškození myokardu LK s následným rozvojem vážného srdečního selhání. Nejznámější případ potenciace ANT kardiotoxicity je kombinace ANT s trastuzumabem při léčbě HER2 pozitivního metastazujícího karcinomu prsu. Tato léčba sice významně zvyšuje šanci pacientek na přežití nádorového onemocnění, ale zároveň může významně zvýšit riziko ireverzibilní kardiotoxicity a srdečního selhání (Gianni a kol. 2007).

Z těchto důvodů je zřejmé, proč se odborný zájem o ANT kardiotoxicitu nezmenšuje, ale naopak se přesouvá i k subklinickým známkám poškození myokardu, které dle dostupných dat (Oeffinger a kol. 2006) může zásadním způsobem ovlivnit dlouhodobou kardiovaskulární morbiditu a mortalitu této populace pacientů. Se zvyšujícím se množstvím pacientů, kteří jsou i díky léčbě ANT schopni dosáhnout dlouhodobé kompletní remise, je kladen na tyto závažné pozdní následky protinádorové léčby stále větší důraz (Ewer a Ewer 2010). Specifickou skupinou takovýchto pacientů jsou děti léčené ANT, neboť poškození myokardu způsobené protinádorovou léčbou v dětském věku může významným způsobem determinovat riziko srdečního selhání a dalších kardiovaskulárních onemocnění v dospělosti (Chen a kol. 2011; Lipshultz a kol. 2008; Scully a Lipshultz 2007).

Navzdory několika dekadám klinického a experimentálního výzkumu ANT kardiotoxicity se doposud nepodařilo na molekulární úrovni přesně popsat mechanismy, které za rozvoj kardiotoxicity zodpovídají. Jednou z možných příčin je patrně i významná heterogenita používaných experimentálních modelů a zejména časté upřednostňování

akutních modelů s podáním vysokých supratherapeutických dávek na úkor dlouhodobých a celkově náročnějších chronických modelů využívající klinicky relevantní dávky ANT. Ačkoliv i v podmínkách akutního modelu lze nalézt významné poškození myokardu, není jisté, zda hlavní mechanismus zodpovědný za tuto toxicitu odpovídá mechanismu pozorovanému u chronických modelů ANT kardiotoxicity a u pacientů v klinické praxi (Gianni a kol. 2008; Štěřba a kol. 2013). Protichůdné výsledky experimentů hodnotících kardioprotektivní účinky řady antioxidantně účinných látek (Berthiaume a kol. 2005; Breed a kol. 1980; Dorr 1996; Herman a kol. 1994; Legha a kol. 1982b; Popelová a kol. 2008) v závislosti na použitém akutním či chronickém modelu spíše napovídají, že tomu tak není. Klinická relevance dat získaných na akutních modelech je proto sporná, neboť k těžkému akutnímu předávkování ANT v klinické praxi nedochází a přenositelnost výsledků do oblasti chronické ANT kardiotoxicity je očividně velmi nejistá.

Pro studium chronické ANT kardiotoxicity a získání klinicky relevantních výsledků je tedy zásadní užití vhodného experimentálního modelu. Volba ANT podle dostupných údajů nemá vliv na charakter dosaženého poškození, neboť chronická ANT kardiotoxicita je považována za tzv. „skupinový účinek“ společný všem ANT zavedeným do klinické praxe (Minotti 2010). Tato hypotéza je též podpořena totožným kardioprotektivním účinkem DEX u všech ANT studovaných v klinických i experimentálních podmínkách (Gianni a kol. 2007). Z hlediska významu volby použitého experimentálního modelu je také důležité, že chronická ANT kardiotoxicita vykazuje shodné funkční, morfologické a biochemické znaky u různých species experimentálních zvířat a že tyto nálezy odpovídají pozorováním z klinické praxe (Herman a Ferrans 1998).

V této dizertační práci byl použit osvědčený model chronické ANT kardiotoxicity navozené daunorubicinem u králíka, který je dlouhodobě zaveden na našem pracovišti (Geršl a Hrdina 1994; Šimůnek a kol. 2004). Uvedené ANT cytostatikum je podáváno v 10 jednotlivých, klinicky relevantních dávkách (3 mg/kg; $\approx 50 \text{ mg/m}^2$) s týdenními rozestupy mezi dávkami tak, aby mohlo být léčivo vyloučeno z organismu a nedocházelo k jeho nežádoucí kumulaci v organismu. Zároveň dané dávkovací schéma poskytuje časový prostor pro reakci myokardu i celého organismu a určitou stabilizaci před další expozicí cytostatikem. Uvedený model byl v této dizertační práci rozšířen o sledování pokusných zvířat o dalších 10 týdnů po ukončení expozice, tzv. *follow up* (FU). Ačkoliv chronická ANT kardiotoxicita se může v klinické praxi dále rozvíjet i měsíce po ukončení chemoterapie, v literatuře existuje jen velmi málo experimentálních prací, které se studiem tohoto období zabývají (Herman a kol. 1988b; Lebrecht a kol. 2003). Dle

dostupných informací nebylo studium tohoto období u DAU kardiotoxicity u králíka dosud realizováno. Výhodou tohoto prodloužení je možnost hodnotit následný vývoj cytostatikem navozených změn a možnost zapojení kompenzačních mechanismů. Toto experimentální uspořádání navíc umožňuje i dobře určit charakter kardioprotektivního účinku studované látky a odlišit skutečnou dlouhodobou ochranu myokardu od pouhého zpomalení či odsunutí rozvoje kardiotoxicity v čase.

V souladu s očekáváním a předchozími výsledky naší výzkumné skupiny (Geršl a Hrdina 1994; Popelová a kol. 2009; Šimůnek a kol. 2004) bylo zjištěno, že podávání DAU v uvedeném schématu vede k signifikantnímu rozvoji systolické dysfunkce již v průběhu období aplikace látek. Nicméně výsledky z období následného sledování ukazují, že u většiny pokusných zvířat dochází k další progresi směrem k městnavému srdečnímu selhání. V období podávání látek byla proto také pozorována relativně nízká mortalita a známky dilatace LK a oběhového městnání byly významně méně časté, což je patrné z provedených echokardiografických vyšetření i pitevnických nálezů. Naopak v období následného sledování zvířat po ukončení expozice DAU byla jasně zjištěna signifikantní dilatace a těžká dysfunkce LK s četnými známkami městnavého srdečního selhání. U většiny zvířat byl proto pokus ukončen dle protokolu studie v různé fázi tohoto období pro těžký stupeň srdečního selhání ($FS < 20\%$), který dle zkušeností naší laboratoře bývá spojen s vysokou pravděpodobností předčasného úhynu, a tudíž i ztrátou vzorku myokardu. Tyto výsledky také dokumentují, že s užitím signifikantní kumulativní dávky cytostatika dochází u králíka k poškození myokardu, které je evidentně ireverzibilní a u většiny vyšetřovaných zvířat výrazně překročilo kontraktilní rezervu myokardu i jeho kompenzační mechanismy (Jirkovský a kol. 2012).

Použití vysoce citlivého stanovení srdečního troponinu T v plazmě pomocí nové generace ELISA kitu pak umožnilo sledovat dynamiku rozvoje poškození myokardu. K významnému vzestupu koncentrací tohoto biomarkeru v plazmě docházelo již od 5. týdne pokusu, který dále pokračoval v průběhu podávání ANT, což koresponduje s kumulativním charakterem chronické ANT kardiotoxicity. Je též zajímavé, že zvýšené koncentrace tohoto biomarkeru v plazmě přetrvávaly i mnoho týdnů po ukončení expozice DAU, což naznačuje, že degenerativní proces v kardiomyocytech pokračoval dále i po poslední dávce cytostatika a že tento děj pravděpodobně souvisí s progresí dysfunkce LK během následného období FU.

Vznik ANT kardiotoxicity je nejčastěji spojován s indukci oxidačního stresu a přímým oxidačním poškozením jednotlivých biomolekul kardiomyocytů, které vede

k následnému rozvoji charakteristických degenerativních změn a spuštění signalizace vedoucí k apoptotické buněčné smrti (Menna a kol. 2012). V této dizertační práci byl zjištěn výrazný vzestup markeru lipoperoxidace (MDA) v myokardu LK na konci podávání ANT, který se dále zvyšoval v období po ukončení expozice cytostatikem. Toto pozorování naznačuje, že nezanedbatelná část peroxidačního poškození lipidů probíhá až po vyloučení ANT z organismu, tj. dle všeho až sekundárně bez přímého působení ANT. Zdroj volných radikálů, který za tuto skutečnost zodpovídá, nelze ze získaných dat spolehlivě dovodit, nicméně lze spekulovat o pravděpodobné účasti poškozených mitochondrií (zejména unik elektronů z komplexu I a III dýchacího řetězce). Dále by se na tomto jevu mohla podílet indukce exprese enzymů produkujících ROS (NOX2 a NOX4) či naopak snížená exprese antioxidantních enzymů (např. MnSOD, NQO1 a peroxiredoxin 3).

Ačkoliv byla zjištěna významná asociace mezi markerem myokardiální lipoperoxidace a mírou systolické dysfunkce, nízký korelační koeficient svědčí pouze o velmi slabé závislosti, která nenaznačuje přímou exekutivní roli peroxidačního poškození lipidů myokardu LK v rozvoji ANT kardiotoxicity, jak je předpokládáno ve většině dostupné literatury (Keizer a kol. 1990; Minotti a kol. 2004; Štěrba a kol. 2013). Z metodického hlediska je třeba zdůraznit, že v našem případě bylo použito selektivního a analyticky přesného a správného stanovení MDA jako typického markeru lipoperoxidace. Tato metoda netrpí známými nedostatky staršího ale stále užívaného stanovení tzv. látek reagujících s kyselinou thiobarbiturovou (TBARS) (Pilz a kol. 2000). Přítomnost oxidačního inzultu vyvolaného podáváním DAU naznačuje také pozorované zvýšené množství oxidovaného glutathionu přetrvávající i v období po ukončení aplikace cytostatika. Avšak absence jakékoliv změny v poměru oxidované a redukované formy glutathionu (GSSG/GSH) svědčí o tom, že funkční antioxidantní kapacita glutathionového systému patrně není podáváním DAU negativně ovlivněna a je v podstatě kompetentní. Proti přímé účasti dysfunkčního glutathionového systému v rozvoji funkčního poškození LK svědčí i závěry provedených korelačních analýz, které nenašly žádnou souvislost mezi daným poškozením a poměrem GSSG/GSH. Toto pozorování patrně do značné míry zpochybňuje i patogenetický význam oxidačního stresu na rozvoji chronické ANT kardiotoxicity, neboť za těchto podmínek by ke změně v inkriminovaném poměru GSSG/GSH mělo dojít. Tyto výsledky ovšem odpovídají závěrům naší nedávné práce hodnotící účinek DAU kardiotoxicity na homeostázu glutathionu v podmínkách *in vitro* a *in vivo* (Vávrová a kol. 2011). Také v této studii nebyl nalezen žádný vliv ANT na

klíčový poměr GSSG/GSH, ačkoliv byla pro analýzu použita zcela odlišná metoda (enzymatická metoda vs. HPLC stanovení použité v této dizertační práci). V práci Vávrová *a kol.* (2011) jsme také prokázali, že deplece glutathionu *in vitro* neměla žádný vliv na toxicitu ANT vůči H9c2 kardiomyoblastům, zatímco stejná látka značně zvýšila toxicitu navozenou peroxidem vodíku. Výsledky obou těchto prací tak mohou vysvětlit absenci kardioprotektivního účinku acetylcysteinu na modelech chronické ANT kardiotoxicity (Herman *a kol.* 1985), jakož i v klinických studiích (Dresdale *a kol.* 1982).

V případě významného oxidačního stresu lze předpokládat aktivaci antioxidační a cytoprotektivní kaskády řízené pomocí Nrf2. Významný oxidační inzult totiž modifikuje SH skupiny cysteinových zbytků v proteinu KEAP, který za normálních okolností váže Nrf2 v cytoplazmě a slouží tak jako represor jeho transkripční aktivity. Po uvolnění Nrf2 z vazby na KEAP a translokaci Nrf2 do jádra dochází k indukci exprese cílových genů kódujících významné antioxidační a cytoprotektivní proteiny (Baird *a Dinkova-Kostova* 2011). V našich experimentech jsme však po opakovaném podávání ANT nezjistili žádnou aktivaci Nrf2 a stejně tak ani zvýšenou expresi jeho cílových genů. Naopak u řady z nich (např. MnSOD, NQO1 a peroxiredoxin 3) jsme pozorovali významné snížení exprese, což naznačuje, že Nrf2 signální kaskáda nehraje významnou úlohu v rozvoji chronické ANT kardiotoxicity. Lze samozřejmě uvažovat i o časnější aktivaci této kaskády v rozmezí hodin či několika prvních dnů po podání ANT, což v této práci nebylo s ohledem na použité schéma experimentu studováno. Nicméně naše pilotní data (dosud nepublikované výsledky) nenaznačují ani tuto variantu. Je tedy možné, že buď oxidační inzult navozený ANT nedosahuje takové intenzity, aby spustil protektivní kaskádu řízenou Nrf2, nebo oxidační stres primárně probíhá v některém z buněčných kompartmentů (např. v mitochondriích) s minimálním přesahem na úroveň celé buňky, což s ohledem na dostupné informace nelze vyloučit. Další studium by se též mohlo zaměřit na možnou roli proteinu BACH-1, který inhibuje transkripční aktivitu Nrf2 a jeho zvýšená exprese by případně mohla antagonizovat účinky cytotatikem aktivovaného Nrf2.

Mitochondrie jsou známým zdrojem i cílem pro volné kyslíkové radikály za normálních i patologických podmínek (Sardão *a kol.* 2008; Wallace 2003). ANT mají významnou afinitu k této organelle díky své vazbě na kardiolipin – negativně nabitý fosfolipid lokalizovaný na vnitřní mitochondriální membráně. Navíc komplex I dýchacího řetězce představuje patrně nejvýznamnější katalyzátor redoxní cyklizace ANT v myokardu (Doroshov *a Davies* 1986). V neposlední řadě komplex I a některé další součásti dýchacího řetězce obsahují Fe-S proteiny s redoxně aktivními ionty železa (Halliwell

a Gutteridge 2007). Také v naší nedávné proteomické studii jsme s užitím našeho modelu chronické ANT kardiotoxicity navozené u králíka našli nejvíce změn právě v mitochondriálních proteinech (Štěrba a kol. 2011). Zvláště nápadné bylo snížené množství několika podjednotek komplexu I, což by mohlo potvrzovat domněnku, že právě tento komplex může být nejen zdrojem ROS, ale i cílem pro jejich toxické působení. S ohledem na výše zmíněné poznatky nelze tedy vyloučit relativní kompartmentalizaci oxidačního stresu do mitochondrií, což může vysvětlovat, proč nebyla pozorována koordinovaná odpověď Nrf2/KEAP komplexu, který je lokalizován v cytoplazmě. Ve zmíněné proteomické studii byl zjištěn i významný pokles v zastoupení klíčových transportních proteinů pro makroergní fosfáty, které zajišťují jejich transport z mitochondriálního matrix do cytoplazmy, což spolu s dalšími pracemi (Cheneval a kol. 1983; Tokarska-Schlattner a kol. 2006, 2007) naznačuje zásadní postižení mitochondriální bioenergetiky.

V našich pozorováních jsme také odhalili významnou poruchu mitochondriální respirace na úrovni komplexu I, III a IV. V případě prvních dvou komplexů bylo ovšem při respirometrickém stanovení zjištěno signifikantní snížení jejich aktivity až v průběhu následného sledování po ukončení expozice DAU. Na druhou stranu byla snížená aktivita komplexu I zjištěna již na konci expozice při enzymatickém stanovení jeho aktivity v tkáňové frakci bohaté na mitochondrie. Tento výsledek více odpovídá literárním údajům (Ohkura a kol. 2003) a výše zmíněným výsledkům, které jsme na našem modelu získali v předchozí proteomické studii (Štěrba a kol. 2011). Důvodem pro rozdílné výsledky obou těchto stanovení aktivity komplexu I by mohla být určitá limitace plynoucí z provedení respirometrické analýzy v celotkáňovém homogenátu. Užití izolovaných mitochondrií by pro tuto analýzu mohlo být vhodnější, nicméně i tento přístup skýtá řadu problémů spojených s procesem izolace mitochondrií (např. neproporcionální zastoupení subsarkolemální populace mitochondrií po izolaci či ztráta mitochondrií poškozených toxicitou v průběhu izolace). Optimální by patrně bylo stanovení respirace v permeabilizovaných vláknech myokardu, což by mohlo být zvaženo při dalších experimentech. Lze tedy shrnout, že dysfunkce respiračního řetězce a potažmo celé buněčné energetiky nebyla v období po ukončení expozice ANT nijak kompenzována a naopak se v průběhu následného sledování spíše zhoršovala.

Pozorované poškození oxidační fosforylace provázející rozvoj ANT kardiotoxicity je v souladu s předchozími studiemi, které popisovaly snížení množství podjednotek dýchacího řetězce v myokardu LK (Lebrecht a kol. 2003, 2007; Štěrba a kol. 2011).

Příčina tohoto jevu ovšem zůstává nejasná. Mohlo by se jednat o přímé poškození těchto proteinů oxidačním stresem indukovaným v bezprostřední blízkosti podjednotek dýchacího řetězce s následným odstraněním poškozených proteinů pomocí ubikvitin-proteasomového systému, nebo by k tomuto jevu mohla přispívat změna transkripční regulace exprese podjednotek jednotlivých komplexů. Například Lebrecht a kol. (2003) opakovaně spojoval tento děj s poškozením mtDNA delečními mutacemi a následným negativním ovlivněním exprese podjednotek komplexu I kódovaných mitochondriálním genomem. Výsledky uvedené v této dizertační práci ovšem naznačují, že tento mechanismus patrně nehraje v rozvoji časných forem chronické ANT kardiotoxicity zásadní roli. V našich podmínkách totiž došlo nejenom ke snížení exprese mitochondriálně kódovaných podjednotek, ale i těch kódovaných nukleárním genomem. Tyto výsledky jsou v souladu s výsledky naší předchozí proteomické studie (Štěrbá a kol. 2011), kde jsme též identifikovali snížené zastoupení podjednotek dýchacího řetězce kódovaných nDNA.

Protože předchozí práce zdůrazňovaly významnou úlohu poškození mtDNA prostřednictvím tzv. běžných delečních mutací (*common deletions*) (Lebrecht a kol. 2003, 2007, 2010), které mohou být navozeny oxidačním stresem nebo stárnutím, zaměřili jsme se v našich experimentech i na možnou účast tohoto mechanismu. Ve studii s DEX jsme se proto pokusili výskyt delečních mutací v mtDNA hodnotit přímo pomocí PCR amplifikace dlouhého úseku mtDNA, ve kterém se tento druh delečních mutací typicky vyskytuje. Získané výsledky pak ukázaly, že chronická ANT kardiotoxicita nemusí být spojena se vznikem běžných delecí v mtDNA ani jiných rozsáhlých mutačních změn v analyzovaném úseku. Použitá gelová analýza však může trpět nižší citlivostí při detekci minoritně se vyskytujících úseků mtDNA postižených mutací. Pro dosažení biologického významu by ovšem taková mutace musela být v mitochondriálním genomu poměrně hojně zastoupená (min. 50 %) (Greaves a kol. 2012; Chinnery a Hudson 2013), a proto je poměrně málo pravděpodobné, že by zůstala neodhalena z důvodu nízké citlivosti použité metody. Na základě našich výsledků nemůžeme nicméně vyloučit indukci jiných mutací mtDNA, které nelze zvolenou metodou postihnout. Použitá metoda by mohla mít nejistou vypovídající hodnotu pro detekci delecí zasahující oblast, kde se vážou primery pro PCR reakci. Ačkoliv se většina popsanych delečních mutací vyskytuje v úseku mtDNA studovaném v této práci, nelze vyloučit možnost výskytu ANT navozených mutací mimo tuto oblast. Použitá metoda též neumožňuje odhalení bodových mutací a oxidačního poškození v mtDNA a tyto jevy tedy vyžadují další studium.

V našich pokusech jsme také zjistili pokles relativního zastoupení mtDNA v myokardu LK, nicméně tento jev byl významný až v následném období po ukončení expozice DAU, tedy v době, kdy již byla ANT kardiotoxicity značně rozvinuta a snížena exprese mtDNA i nDNA kódovaných podjednotek dýchacího řetězce. Naše výsledky proto naznačují, že poškození mtDNA patrně nehraje ústřední úlohu v časně fázi rozvoje ANT kardiotoxicity. Protože Lebrecht a kol. (2003) použili podstatně nižší kumulativní dávku (7 mg/kg DOX) a podstatně delší dobu následného sledování (7 měsíců), je možné, že uvedené děje mohou spíše souviset s rozvojem pozdních forem ANT kardiotoxicity, která se rozvíjí až po delší době.

Protože bylo zjištěno relativně koordinované snížení exprese mitochondriálních proteinů, zajímali nás faktory zodpovědné za tyto změny. Jednou z nejdůležitějších možností, jak může být exprese těchto proteinů regulována, je proces mitochondriální biogeneze. S ohledem na zjevné poškození struktury a funkce mitochondrií by bylo možné po ukončení expozice ANT očekávat aktivaci této dráhy, která by kompenzovala deficit navozený ANT toxicitou. Žádný náznak koordinované aktivace mitochondriální biogeneze ale nebyl v našich experimentech pozorován. Naopak u několika základních členů této kaskády byla zjištěna tendence k poklesu exprese členů regulujících tuto kaskádu v důsledku podávání DAU, zejména v období po ukončení expozice ANT. Nejdůležitější snížení exprese, které se jako jediné významně projevilo již na konci podávání DAU, bylo pozorováno v případě transkripčního faktoru TFAM. Tento transkripční faktor je zodpovědný za koordinaci exprese podjednotek dýchacího řetězce kódovaných nukleárním a mitochondriálním genomem. Vedle toho se TFAM podílí na udržování počtu kopií mtDNA v kardiomyocytech a je možné, že významný relativní pokles mtDNA v období po ukončení expozice cytostatikem může se sníženou expresí TFAM souviset. Klíčové regulátory celé kaskády, PGC1 α a nukleární respirační faktor 1 (NRF1) vykazovaly menší změnu, která se projevila při porovnání s kontrolní skupinou v období FU. Je třeba poznamenat, že při vzájemném porovnání obou sledovaných intervalů byl v kontrolní skupině v období FU zaznamenán mírný vzestup exprese u řady členů kaskády mitochondriální biogeneze, jakož i u některých genů řízených touto cestou. Nelze vyloučit, pozorovaná změna u těchto kontrolních zvířat může souviset s další zátěží zvířat spojenou s významným prodloužením pokusu a stářím pokusných zvířat. Je tedy možné, že se jedná o určitou mírnou adaptaci myokardu na tyto podmínky. Skupina zvířat, které byl podáván DAU, však v období FU reagovala zcela odlišně, což determinovalo signifikantní rozdíl oproti odpovídající kontrolní skupině. Vzhledem k tomu, že mitochondriální funkce byla

předchozím podáváním DAU již významně poškozena, je možné, že by se tento relativní deficit mitochondriální biogeneze v období FU mohl podílet na progresi kardiotoxicity a srdečního selhání právě díky nemožnosti adekvátní kompenzace tohoto poškození. Více informací o úloze mitochondriální biogeneze a hlavně její regulaci v ANT kardiotoxicitě by též mohlo přinést studium exprese dalších základních členů této kaskády jako PGC1 β či NRF2, i když o jejich konkrétní úloze při regulaci mitochondriální biogeneze je zatím jen omezené množství informací. Pro podrobnější studium regulace této kaskády by bylo též vhodné studovat uvedené změny i na úrovni proteinu, včetně možných post-translačních modifikací, neboť zde je možné očekávat ještě těsnější vztah k funkci celé kaskády. Faktickou překážkou pro realizaci tohoto plánu byl ovšem objektivní nedostatek vhodných protilátek použitelných k imunodetekci u králíka. Nicméně lze předpokládat, že cílené studium genové exprese několika členů kaskády, u kterých dochází na transkripční úrovni k významné sekvenční regulaci, jakož i cílových mitochondriálních proteinů může poskytnout důležitou informaci o funkci celé kaskády. Tento přístup je také v kardiovaskulárním výzkumu mitochondriální biogeneze často užíván (Garnier a kol. 2009; Rimbaud a kol. 2009; Zhang a kol. 2012).

Dosud publikované studie se věnovaly významu mitochondriální biogeneze ve vztahu k ANT kardiotoxicitě spíše okrajově, v řadě případů bez kvantitativní analýzy a se zaměřením na akutní expozici myokardu vysokým supratherapeutickým dávkám. Navíc tyto studie vedly k nejednotným a často spíše protichůdným závěrům (Marechal a kol. 2011; Miyagawa a kol. 2010). Naopak poměrně zásadní práce vrhající nové světlo na význam této kaskády pro rozvoj chronické ANT kardiotoxicity byla zveřejněna až po publikaci našich výsledků (Jirkovský a kol. 2012). Skupina prof. Yeha (MD Anderson Cancer Center, Texas, USA) ve své studii publikované v prestižním odborném časopise *Nature Medicine* (Zhang a kol. 2012) prezentovala data, která spojují ANT navozené poškození nukleárního genomu kardiomyocytů s poruchou mitochondriální biogeneze a rozvojem mitochondriálního poškození. Přestože je tato práce průlomová a byla velmi dobře přijata odbornou veřejností (Sawyer 2013), detaily tohoto procesu nejsou známy a jistě si zasluhují další studium. V případě platnosti této hypotézy by bylo možné uvažovat o farmakologické aktivaci mitochondriální biogeneze jako perspektivní kardioprotektivní strategii. Mezi léčiva, která jsou tímto účinkem známá, patří například osvědčené a relativně bezpečné antidiabetikum metformin, které tuto dráhu aktivuje prostřednictvím AMP-kinázy (Ventura-Clapier a kol. 2008). Zda-li metformin nebo jiné experimentálně

užívané induktory mitochondriální biogeneze mají významný potenciál v ochraně myokardu před ANT kardiotoxicitou, bude třeba zjistit v dalších experimentech.

Naše studie tedy potvrdila, že rozvinutá chronická ANT kardiotoxicita představuje ireverzibilní poškození myokardu, které progresivně směřuje k dilataci LK a těžkému srdečnímu selhání, což je v souladu s údaji z klinické praxe. Možnosti léčby tohoto stavu jsou velmi omezené a prognóza pacientů je i přes intenzivní léčbu srdečního selhání nepříznivá (Menna a kol. 2012; Minotti 2010). Nejvýhodnější strategií je tedy vzniku této komplikace předcházet. Běžně uplatňovanou strategií je omezení kumulativní dávky cytostatika na 300-450 mg/m². Toto opatření významně snížilo incidenci těžkých forem srdečního selhání, nicméně dnes se soudí, že v praxi neexistuje žádná zcela bezpečná kumulativní dávka ANT (Ewer a Yeh 2006; Menna a kol. 2012). Navíc ANT kardiotoxicita vykazuje významný stupeň inter-individuální variability, která znemožňuje paušalizaci kardiiovaskulárních rizik a znesnadňuje účinnou ochranu myokardu před vážnou toxicitou. Stejně tak není absolutní shoda na tom, zda podání ANT infuzí významně snižuje riziko kardiotoxicity (Minotti 2010). Dle současných klinických doporučení je individuální riziko kardiotoxicity u jednotlivých pacientů kontrolováno pomocí monitorování systolické srdeční funkce a v případě potřeby je možné upravit chemoterapeutický plán. K tomuto účelu se užívá vyšetření srdeční funkce pomocí echokardiografie nebo radionuklidové ventrikulografie. Oba tyto přístupy jsou poměrně dobře dostupné a spolehlivé, ovšem dle převládajícího názoru jsou poměrně málo citlivé, a proto odhalí až pokročilejší stádia toxicity. Vyšší citlivost by mohlo poskytnout hodnocení diastolické funkce levé komory (také pomocí echokardiografie) či stanovení biomarkerů kardiotoxicity (plazmatické koncentrace srdečního troponinu T/I či NT-proBNP), nicméně klinická doporučení pro vyšetření těchto parametrů v každodenní praxi a interpretace získaných výsledků z hlediska predikce rizika kardiotoxicity a ovlivnění léčebného plánu se v současnosti v Evropě i USA teprve připravují.

Mezi nejperspektivnější strategie ochrany myokardu před ANT kardiotoxicitou v klinické praxi patří farmakologické kardioprotekce. Podstatným problémem, který omezuje racionální vývoj účinných kardioprotektivních léčiv, je neznalost přesného spouštěcího mechanismu ANT kardiotoxicity. Tradiční názor na mechanismus kardiotoxicity zdůrazňoval roli ANT navozeného oxidačního stresu a přímého oxidačního poškození biomolekul kardiomyocytů. Je proto logické, že již z počátku začaly být studovány klasické antioxidační látky jako potenciální kardioprotektiva (Štěrba a kol. 2013). S použitím *in vitro* experimentů a akutních modelů byl zjištěn kardioprotektivní

účinek u řady těchto látek - např. acetylcystein (Doroshov a kol. 1981), vitamín E (Myers a kol. 1976; Wang a kol. 1980) nebo různé deriváty flavonoidů (Bast a kol. 2007). Studium těchto látek na klinicky relevantnějších modelech chronické ANT kardiotoxicity však vedlo k negativním nálezům a k obdobným výsledkům také dospěly pilotní klinické studie (Dorr 1996; Dresdale a kol. 1982; Herman a kol. 1985; Legha a kol. 1982a). Tento poměrně zásadní rozpor ve výsledcích kardioprotektivních účinků známých antioxidantů a zhášeců ROS v závislosti na užitém experimentálním modelu naznačuje, že mechanismus akutní toxicity navozený vysokými dávkami ANT se může podstatně lišit od chronické toxicity vyvolané opakovaným podáním klinicky relevantních dávek ANT v průběhu týdnů a měsíců. Z významného protektivního účinku antioxidantů vůči akutně podaným vysokým dávkám ANT se dá usuzovat, že by zde mohla být role oxidačního stresu podstatně významnější, než při opakovaném podání klinicky relevantních dávek cytostatika.

Protože výzkum kardioprotektivních účinků antioxidantů a zhášeců ROS nepřinesl očekávaný úspěch, další směr výzkumu se zaměřil na chelátory železa. Tyto látky by mohly při ochraně myokardu před ANT navozeným oxidačním stresem uplatnit jinou a možná perspektivnější strategii. Chelátotvorné látky by totiž mohly vyvázáním volných (tj. katalyticky aktivních) iontů železa předejít produkci hydroxylových radikálů, které patří mezi nejreaktivnější a nejtoxičtější formy ROS (Keizer a kol. 1990; Šimůnek a kol. 2009; Štěrba a kol. 2013). Tato strategie se zdála být efektivnější než relativně obtížné zhášení vysoce reaktivních forem ROS již vzniklých v myokardu. Studované chelátory železa jako deferoxamin (al-Harbi a kol. 1992; Saad a kol. 2001) nebo deferipron (Xu a kol. 2006) vykazovaly protektivní působení proti ANT v *in vitro* experimentech, ale při použití relevantního modelu chronické ANT kardiotoxicity nebyl zjištěn žádný kardioprotektivní účinek (Herman a kol. 1994; Popelová a kol. 2008). Naše laboratoř také v minulosti zkoumala kardioprotektivní účinek aroylhydrazonových chelátorů železa (PIH, SIH a o-108). Ačkoliv tyto látky vykazovaly významný protektivní účinek proti modelovému oxidačnímu stresu navozenému u izolovaných kardiomyocytů inkubací s peroxidem vodíku, měly pouze omezený kardioprotektivní účinek vůči ANT kardiotoxicitě *in vitro* (Šimůnek a kol. 2008) a *in vivo* (Štěrba a kol. 2006, 2007) bez zjevné dávkové závislosti.

Jedinou látkou s jasně prokázaným kardioprotektivním účinkem vůči chronické ANT kardiotoxicity v experimentálních i klinických podmínkách tak zůstává dexrazoxan (DEX, ICRF-187). Léčivo, které bylo paradoxně vyvíjeno jako protinádorově účinná látka,

na jejíž kardioprotektivní účinek se přišlo později a pouhou náhodou při kombinaci s ANT (Creighton a Birnie 1969). V průběhu následného výzkumu bylo zjištěno, že DEX je v organizmu (patrně i uvnitř kardiomyocytů) metabolizován na metabolit ADR-925, který je chemickou strukturou velmi blízký známé chelatační látce EDTA. V tomto období též získala na popularitě hypotéza vysvětlující vznik chronické ANT kardiotoxicity prostřednictvím oxidačního stresu, na jehož vzniku mají významný podíl redoxaktivní ionty železa (Keizer a kol. 1990). Protože další práce potvrdily, že ADR-925 chelatuje volné ionty železa a je schopen tyto ionty odnímat z komplexu s ANT (Buss a Hasinoff 1993), stal se brzy tento mechanismus nejcitovanějším vysvětlením kardioprotektivního účinku DEX (Chabner a kol. 2006). Při podrobnější rešerši najdeme v literatuře jen málo přímých důkazů podporujících tuto teorii. Například Rajagopalan a kol. (1988) s užitím izolovaného perfundovaného srdce dle Langendorffa ukázali, že DEX (25 μM) inhiboval produkci hydroxylových radikálů navozenou DOX (1 μM). Nicméně míra produkce hydroxylových radikálů v této studii nezávisela na koncentraci cytostatika (v rozmezí 0,1 - 25 μM DOX) a výsledky byly signifikantní pouze 10. - 15. minutu po reperfuzi, což může snižovat význam tohoto pozorování pro chronickou ANT kardiotoxicitu. Lebrecht a kol. (2007) pak popsal, že podávání DEX (8 mg/kg/týden) zabránilo vzestupu TBARS v myokardu potkanů, kterým byl aplikován DOX (0,8 mg/kg/týden po 7 týdnů) a následně pozorování 37 týdnů. Tímto způsobem pak autoři vysvětlovali výše diskutovanou ochranu mtDNA před delečními mutacemi. V tomto pokusu byl ovšem oxidační stres hodnocen pouze pomocí TBARS, což je metoda dobře známá svými limitacemi, a pouze za dlouhou dobu po ukončené expozici. Uvedené schéma (nízká kumulativní dávka) a velmi dlouhá doba sledování navíc spíše odpovídá pozdnímu typu chronické ANT kardiotoxicity. Přesná úloha oxidačního stresu v DEX navozené protekci proti časně formě chronické ANT kardiotoxicity proto zůstala poměrně nejasná.

Ačkoliv kardioprotektivní účinek DEX byl bezpečně prokázán v celé řadě kontrolovaných klinických studií, ve kterých byl podáván od první dávky ANT, současná klinická doporučení omezují jeho užití pouze na pacienty, u kterých byla překročena riziková kumulativní dávku ANT 300 mg/m² (Hensley a kol. 2009). Toto doporučení bylo přijato odbornými společnostmi v návaznosti na publikaci výsledků třetí fáze klinického hodnocení DEX (Swain a kol. 1997a), kde byl u jedné z provedených studií nalezen negativní vliv DEX na protinádorovou účinnost použitých ANT. Tyto výsledky byly velmi překvapivé, neboť žádný další parametr úspěšnosti protinádorové léčby nebyl významně ovlivněn a tyto nálezy též nebyly v souladu s paralelně probíhající studií s téměř

identickým uspořádáním. Pozdější analýza těchto dat naznačila, že k tomuto výsledku došlo díky neobvykle vysoké odpovědi u skupiny s placebem, která neodpovídala předchozím nálezům (Swain a Vici 2004; van Dalen a kol. 2011). Také poslední metanalýza všech provedených kontrolovaných studií jasně konstatovala, že zde nejsou důkazy o statisticky významném vlivu DEX na odpověď nádoru na chemoterapii obsahující ANT (van Dalen a kol. 2011; Zerra a kol. 2013). Klinická doporučení ovšem zůstávají beze změny, navzdory tomu, že je čím dál více akceptován názor, že určitému ultrastrukturálnímu poškození dochází s každou dávkou ANT (Ewer a Yeh 2006; Menna a kol. 2012).

V další části této dizertační práce jsme se proto zabývali hodnocením kardioprotektivního účinku DEX při jeho podání s každou dávkou ANT (časná kardioprotektivní intervence) v porovnání s podáním DEX dle současných doporučení, tj. po překročení kumulativní dávky DAU 300 mg/m^2 (odložená kardioprotektivní intervence). Stejně jako v první části této dizertační práce, i zde byla pokusná zvířata randomizována pro ukončení pokusu týden po poslední aplikaci látek, zatímco zbytek zvířat byl pozorován dalších 10 týdnů a výsledky byly porovnány s kontrolní a DAU skupinou. Získané výsledky potvrdily, že obě schémata podání DEX jsou schopná zabránit rozvoji těžkého srdečního selhání. Tento závěr byl potvrzen zejména kompletním přežitím zvířat do konce pokusu (včetně následného sledování) a absencí výrazných změn v pitevních nalezích. Tyto nálezy samozřejmě ostře kontrastovaly s výsledky dosaženými u zvířat, která dostávala samotný DAU. Neinvazivní i invazivní vyšetření systolické srdeční funkce ovšem identifikovalo významný rozdíl mezi užitými schématy. Časná kardioprotektivní intervence byla schopna kompletně zabránit rozvoji systolické dysfunkce, zatímco odložené schéma podání vykazovalo významně nižší účinnost. Hodnocení těchto parametrů v období po ukončení expozice myokardu ANT pak jasně potvrdilo, že kardioprotekce navozená DEX je dlouhodobá, neboť v případě časné intervence nedochází k žádné změně systolické funkce a hodnoty se vůbec neliší od kontrolní skupiny. Na druhou stranu nálezy u odložené kardioprotektivní intervence poukazují na přetrvávající charakter poškození systolické funkce, což potvrzuje, že změny navozené DAU jsou ireverzibilní. Překvapivě však obě schémata podání DEX poskytovala obdobně signifikantní protektivní účinek na diastolickou funkci levé komory hodnocenou katetrizačně, což poněkud odporuje publikovanému předpokladu, že při rozvoji ANT kardiotoxicity diastolická dysfunkce předchází systolické dysfunkci (Bu'Lock a kol. 1993; Menna a kol. 2012). Při sledování změn v přírůstku tělesné hmotnosti byly zaznamenány

významné rozdíly mezi použitými schémata. V průběhu aplikace látek měla zvířata dostávající DEX s každou dávkou DAU významně nižší přírůstek tělesné hmotnosti odpovídající samotné DAU skupině, zatímco při odložené kardioprotektivní intervenci byl váhový přírůstek významně vyšší než v DAU skupině. V následném období FU se však situace obrátila a zvířata po časně DEX intervenci vykazovala významný přírůstek tělesné hmotnosti, zatímco zvířata dostávající DEX v odloženém schématu stagnovala. Popsané negativní ovlivnění tělesné hmotnosti ve skupině zvířat s časnou kardioprotektivní intervencí by mohlo souviset s některými nežádoucími účinky DEX (SPC Cardioxane 2012), které by mohly v kombinaci s DAU představovat další zátěž pro organizmus. Nicméně tyto účinky jsou však reverzibilní, jak dokládá i v této práci pozorovaný významný nárůst tělesné hmotnosti v období po ukončení expozice. Absence pozitivního vývoje tělesné hmotnosti v období FU ve skupině s odloženou kardioprotektivní intervencí by mohla souviset s nedostatečnou kardioprotektivní účinností toho přístupu.

Hodnocení plazmatických koncentrací srdečního troponinu T, sloužícího jako velmi citlivý marker srdečního poškození, nesporně potvrzuje enormní kardioprotektivní potenciál DEX při podání s každou dávkou ANT. Při použití časného schématu nedošlo v průběhu podávání látek k žádnému významnému vzestupu tohoto markeru ani po ukončení expozice DAU. Výsledky odložené kardioprotektivní intervence pak zřetelně dokládají, že expozice myokardu dávkám do 300 mg/m² DAU je u králíka spojena s významným poškozením myokardu. Nicméně nasazením DEX od zmíněné kumulativní dávky bylo možné zamezit progresi tohoto poškození, a to i v průběhu následného dlouhodobého sledování po ukončení expozice oběma látkám. Kardioprotektivní potenciál DEX byl dále podpořen a doplněn výsledky histologického nálezu myokardu LK. Časná kardioprotektivní intervence dovedla téměř kompletně zabránit typickým histopatologickým změnám navozeným DAU. Podstatně horší výsledky ovšem byly nalezeny u zvířat s odloženou kardioprotektivní intervencí, i když celková míra poškození nebyla tak závažná jako při podání samotného ANT. Pozorované degenerativní změny v kardiomyocytech tak byly méně časté než na konci podávání samotného DAU, zatímco proces hojení reprezentovaný náhradovou fibrózou byl mnohem výraznější. Z daného lze usuzovat na to, že odložené podání DEX zabránilo nástupu dalších degenerativních změn a umožnilo částečné odhojení nejvýznamnějších degenerativních změn navozených v přechodném období a tento děj byl završen v období FU.

Tyto poznatky pak dokreslují výše diskutované funkční změny a potvrzují předpoklad, že chronická ANT kardiotoxicita vzniká postupnou kumulací převážně

ireverzibilních ultrastrukturálních změn v kardiomyocytech, které se klinicky projeví až po překročení kontraktilní rezervy a schopnosti kompenzačních a reparačních mechanismů jim čelit. Přestože DEX vykazuje neobyčejný kardioprotektivní účinek vůči toxicitě ANT, je evidentně při svém odloženém nasazení pouze schopen zabránit další progresi poškození směrem k srdečnímu selhání. Králíci se zdají být ke kardiotoxicitě ANT poměrně vnímaví (Herman a kol. 1981), a proto lze očekávat, že stupeň poškození myokardu by byl v klinické praxi při nasazení DEX od uvedené kumulativní dávky ANT spíše méně výrazný. Tyto výsledky ale jasně ukazují, že s užitím doporučeného odloženého kardioprotektivního schématu může docházet přinejmenším k subklinickým známkám poškození myokardu, které se mohou významně projevit na budoucí kardiovaskulární morbiditě a mortalitě pacientů přeživších nádorové onemocnění (Oeffinger a kol. 2006). Vzhledem k tomu, že v současnosti neexistuje žádný solidní důkaz o významném ovlivnění účinnosti ANT chemoterapie působením DEX, lze konstatovat, že současná doporučení pro užití DEX v klinické praxi by zasluhovala další diskuzi a eventuální přehodnocení. Naše výsledky dokumentují, že doporučovaná odložená kardioprotektivní intervence pomocí DEX není z kardiovaskulárního hlediska optimální a neumožňuje plně využít kardioprotektivní potenciál tohoto léčiva. Odborná diskuze na toto téma v současnosti dále probíhá a tento problém byl pro svou závažnost vybrán mezi hlavní témata letošní konference (*Prevention of Chemotherapy-induced Cardiotoxicity*) pořádané Oddělením kardiologie, MD Anderson Cancer Center v Houstonu.

Dexrazoxan lze považovat za klíč k pochopení podstaty chronické ANT kardiotoxicity a analýza vzorků myokardu s téměř úplnou a částečnou protekcí by mohla pomoci identifikovat mechanismy, na kterých je ochrana myokardu pomocí DEX založena. Hodnocení lipoperoxidace ukázalo, že vynikající ochrana myokardu DEX jen málo souvisí s mírou lipoperoxidace na konci podávání látek, což příliš nesvědčí o přímém a kauzálním vztahu tohoto jevu ke kardiotoxicitě, která je ve stejném období v DAU skupině již evidentní. V naší předchozí studii jsme dokonce za obdobných podmínek nenalezli žádnou asociaci mezi těmito parametry (Popelová a kol. 2009). Tento významný, i když velmi málo těsný výsledek analýzy vztahu lipoperoxidace a systolické dysfunkce LK získaný v této dizertační práci mohl být způsoben přítomností dat z období FU, která předchozí práce neobsahovala. V období následujícím po ukončení expozice hodnoceným látkám byl totiž pozorován významný účinek DEX na lipoperoxidaci myokardu, obdobně jako u nárůstu oxidovaného glutathionu. Tento nálezný by mohl naznačovat, že prooxidační změny mají spíše pozdní a možná též sekundární charakter, než aby byly přímými

a primárními determinanty rozvoje poškození myokardu v časnějších fázích rozvoje kardiotoxicity. Na tomto protektivním účinku by se mohla uplatnit schopnost DEX přecházet řadě patologických jevů (např. zvýšené exprese NOX, snížené exprese antioxidantních enzymů či poškození mitochondrií), které by tento následný oxidační stres mohly vysvětlit. Odložená kardioprotektivní intervence byla v prevenci výše zmíněných patologických jevů méně účinná, což by mohlo vysvětlovat i vyšší hodnoty markerů oxidačního stresu.

Dále jsme zjistili, že v závislosti na užitém schématu podávání byl DEX v myokardu LK schopen zabránit ANT navozené aktivaci genové exprese HO1 a dalších enzymů a proteinů spojených s degradací hemu, přičemž zároveň inhiboval i negativní vliv cytostatika na mitochondriální syntézu hemu. Z těchto důvodů patrně nebyla významně ovlivněna exprese hemoproteinu myoglobinu v myokardu LK v DEX skupinách. Exprese HO1 může být aktivována oxidačním stresem prostřednictvím Nrf2 kaskády (Baird a Dinkova-Kostova 2011), avšak naše výsledky na tento mechanismu regulace neukazují. Proto jsme se zaměřili na HIF1 α jako dalšího z důležitých transkripčních faktorů, který může indukovat expresi HO1 v myokardu. Naše výsledky ukazují, že exprese HIF1 α je při opakovaném podávání ANT zvýšená a protekce pomocí DEX tomuto jevu předchází. O úloze tohoto transkripčního faktoru jakož i HO1 v ANT kardiotoxicitě se ví poměrně málo, nicméně obecně se v kardiomyocytech předpokládá jejich adaptační či protektivní účinek (Peers a Steele 2011). Experimentálně navozené snížení či zvýšení aktivity těchto proteinů prostřednictvím cílené genetické či farmakologické intervence by mohlo přinést cenné informace o funkčním významu těchto proteinů pro molekulární patogenezi chronické ANT kardiotoxicity a ochrany myokardu před ní.

Výsledky této dizertační práce též prokázaly, že podání DEX může ochránit mitochondrie před jejich poškozením navozeným ANT, přičemž míra tohoto účinku opět významně závisí na schématu podání. Časná kardioprotektivní intervence zabránila poklesu množství mitochondrií i relativně pozdějšímu poklesu zastoupení mtDNA v myokardu LK, zatímco účinek odložené intervence byl méně významný. Časné podání DEX také zabránilo poruše exprese podjednotek komplexů dýchacího řetězce kódovaných nukleárním i mitochondriálním genomem, ale výsledek odložené intervence byl opět méně přesvědčivý. Na rozdíl od studie Lebrechta a kol. (2007) jsme ovšem nepotvrdili, že by kardioprotektivní účinek DEX souvisel s protekcí mitochondriální DNA před navozením tzv. běžných delečních mutací. Protože DEX předešel i změnám v expresi transkripčního faktoru TFAM a v období FU i NRF1, nelze vyloučit, že kardioprotektivní účinek je spojen

s prevencí poruchy v mitochondriální biogenezi. Podrobnější pochopení tohoto možného účinku DEX ovšem vyžaduje další experimenty.

Získané výsledky souhrnně poukazují na fakt, že kardioprotekce pomocí DEX nemusí být přímo závislá na celkovém oxidačním stresu v myokardu a delečních mutacích v mtDNA, jak je uváděno v literatuře. Proti tomuto mechanismu účinku také svědčí několik teoretických argumentů. Především je známo, že komplex metabolitu DEX s ionty železa je obdobně jako komplex tohoto kovu s EDTA redoxně aktivní, takže není jisté, zda by chelatace iontů železa účinně inhibovala produkci ROS (Diop a kol. 2000). Také bylo demonstrováno, že semichinonový ANT radikál může katalyzovat redoxní cyklizaci komplexu racemického ADR-925 (ICRF-198) s ionty železa, což také podstatně zpochybňuje přímý antioxidační účinek DEX u ANT kardiotoxicity (Thomas a Aust 1986). Nedávná studie pak poukázala na to, že DEX by mohl chránit kardiomyocyty před ANT prostřednictvím indukce HIF1 α (Spagnuolo a kol. 2011), což si i vzhledem k našim pozorováním zaslouhuje další pozornost. Tento účinek by mohl souviset s chelatací iontů železa metabolitem DEX, neboť je známo, že chelatační látky jsou schopny i v normoxických podmínkách indukovat HIF1 α na základě inhibice Fe-dependetních prolylhydroxyláz (Triantafyllou a kol. 2006). Některé další práce pak zpochybnily i celý koncept DEX jako proléčiva chelatačně účinné látky coby hlavního nositele kardioprotektivního účinku (Hasinoff a Herman 2007). Například skupina prof. Hasinoffa publikovala výsledky, které ukazují, že předpokládaný aktivní metabolit na rozdíl od parentní látky nechrání izolované kardiomyocyty před toxicitou ANT (Hasinoff a kol. 2003). Absence tohoto účinku byla vysvětlována nízkou schopností ADR-925 penetrovat do buněk s ohledem na svoji vysokou hydrofilitu. Stejní autoři však později nepřímo prokázali průnik ADR-925 do kardiomyocytů a jeho protektivní účinek vůči hypoxicko-reoxygenačnímu poškození (Hasinoff a Herman 2007). Doposud však nebyla provedena žádná studie hodnotící kardioprotektivní účinky metabolitu ADR-925 na relevantním modelu chronické ANT kardiotoxicity. V naší laboratoři v současnosti probíhají pilotní pokusy zaměřené na tuto problematiku, jež by mohly v budoucnu pomoci odhalit skutečný význam metabolitu a parentní látky v protekci před ANT kardiotoxicitou.

Ačkoliv je zřejmé, že řada recentních výsledků neodpovídá tradičně přijímaným hypotézám, do nedávné doby bylo dostupno pouze velmi málo alternativních teorií, které by zpochybňovaný původní koncept mohly nahradit či významně doplnit. Klíčové informace přinesla studie Zhang a kol. (2012), která pomocí unikátního modelu geneticky modifikované myši jasně ukázala na důležitost topoizomerázy II β v ANT

kardiotoxicitě. Podmíněná delece tohoto genu v kardiomyocytech totiž účinně zabránila rozvoji chronické ANT kardiotoxicity. Tento účinek byl spjat s prevencí ANT navozeného genotoxického stresu v jádře kardiomyocytů, poruchou mitochondriální biogeneze v kardiomyocytech a inhibicí apoptózy kardiomyocytů. Je tedy možné, že ANT kardiotoxicita by mohla být zapříčiněna nežádoucí inhibicí enzymu Top2 β , který je dominantně zastoupen v kardiomyocytech a dalších terminálně diferencovaných buňkách. Tento účinek by mohl být nezávislý na protinádorovém účinku ANT, neboť zde je hlavním cílem odlišná izoforma tohoto enzymu (Top2 α), která je hojně exprimována nádorovými buňkami, jakož i normálními rychle proliferujícími buňkami organismu.

Uvedené poznatky mohou mít bezprostřední vztah k porozumění nejen mechanismům vzniku chronické ANT kardiotoxicity, ale i kardioprotektivního účinku DEX. Jak bylo uvedeno výše, DEX vykazuje určité antiproliferační účinky, které byly vysvětleny inhibičním účinkem léčiva na Top2 (Tanabe a kol. 1991). DEX stejně jako další látky ze skupiny „katalytických“ inhibitorů Top2 β dokáže snižovat její aktivitu v buňkách reverzibilním zastavením jejího katalytického cyklu, čímž se odlišuje od působení topoizomerázových jedů, jakými jsou např. ANT (Andoh a Ishida 1998). Předchozí práce také prokázaly, že expozice potkaních myoblastů H9c2 DEX vede k depleci Top2 β na úrovni proteinu prostřednictvím proteazomového systému (Lyu a kol. 2007). Relativní deplecí proteinu Top2 β by se pak mohlo v kardiomyocytech předejít poškození DNA vzniklé vzájemným působením ANT s Top2 β . Ačkoliv uvedené pokusy byly zatím provedeny pouze na proliferujících H9c2 buňkách, které se od terminálně diferencovaných kardiomyocytů v řadě aspektů podstatně liší (např. exprimují obě izoformy Top2), uvedená data naznačují, že by se daný mechanismus mohl významnou měrou podílet na kardioprotektivním účinku DEX. Farmakologický účinek DEX by se totiž ve výsledku mohl podobat recentně publikované delecí tohoto genu, což bylo jasně spojeno s odolností myokardu vůči ANT kardiotoxicitě (Zhang a kol. 2012). Předpokládaný vztah DEX kardioprotekce a inhibice Top2 podporují i závěry studie Martin a kol. (2009), kde byl na modelu chronické ANT kardiotoxicity studován velmi blízký derivát DEX (ICRF-161), který má spojovací řetězec mezi dioxopiperazinovými cykly prodloužený o jeden uhlík. Tato látka je také metabolizována na chelatační metabolit, který odnímá ionty železa z komplexu s ANT obdobně jako ADR-925, nicméně na rozdíl od DEX nevykazuje parentní látka ICRF-161 inhibiční vliv na topoisomerázu. V chronickém experimentu bylo zjištěno, že ICRF-161 nebyl schopen navodit významný stupeň kardioprotekce, což kontrastovalo s přesvědčivým účinkem DEX.

Z diskuze výsledků získaných v rámci této dizertační práce a v kontextu současných literárních poznatků také vyplývá řada neujasněných otázek, které by mohly být předmětem dalšího studia. Do této oblasti patří nedostatek informací o metabolizaci DEX uvnitř kardiomyocytů a dosud necharakterizovaný časový profil koncentrací ADR-925 v myokardu po podání DEX. Není vyloučeno, že právě tento aspekt může být pro kardioprotektivní účinek zásadní, neboť ANT jsou v myokardu přítomny řadu hodin až dnů po aplikaci ANT. Tyto poznatky by též umožnily analýzu vztahu farmakokinetiky a farmakodynamiky parentní látky a metabolitu. Dostupnost těchto dat dlouhou dobu omezoval nedostatek vhodných analytických metod, které by umožnily realizaci uvedených experimentů. Díky mezioborové spolupráci máme nyní k dispozici validovanou metodu pro stanovení parentní látky i metabolitu v plazmě, tkáni, izolovaných buňkách a buněčném mediu (Kovaříková a kol. 2013); odpovídající *in vivo* a *in vitro* studie v současné době probíhají. Pilotní výsledky z *in vitro* studií potvrzují, že inkubace primárních kardiomyocytů s ADR-925 umožňuje dosáhnout jeho významných intracelulárních koncentrací, které jsou srovnatelné nebo vyšší než po inkubaci buněk s DEX. Data z *in vivo* experimentu pak ukazují, že parenterálním podáním ADR-925 lze dosáhnout u králíka po dobu 6-12 h výrazně vyšších či srovnatelných koncentrací ADR-925 než po podání DEX. Další fází, která by mohla výrazně pomoci objasnit úlohu metabolitu DEX, bude studium kardioprotektivních účinků této látky na úrovni *in vitro* a *in vivo* (pilotní fáze těchto experimentů již byla zahájena). Dalším úkolem bude zjistit, zda podání DEX snižuje množství Top2 β v izolovaných kardiomyocytech a v myokardu zvířat za podmínek, při kterých toto léčivo navozuje kardioprotektivní účinek. První data naznačují, že by tomu tak mohlo být, ale vzhledem k zásadnímu významu těchto výsledků bude nutné počkat na dokončení všech experimentů. Studium kardioprotektivních účinků různých derivátů DEX a ADR-925 by pak bylo možné definovat i vztah sktruktury a účinku, který zatím u DEX nebyl popsán.

Výsledky dosažené v rámci této dizertační práce poskytují nové důležité poznatky o molekulárních dějích, které souvisejí s rozvojem chronické ANT kardiotoxicity. Kardioprotektivní účinek DEX si zaslouhuje další studium, neboť může být klíčem k pochopení mechanismů zodpovědných za rozvoj ANT kardiotoxicity a mohl by přispět k vývoji nových účinných strategií pro ochranu myokardu před tímto poškozením.

6 ZÁVĚRY

- Opakované podávání daunorubicinu vedlo k rozvoji systolické dysfunkce, která v období následného sledování po ukončení expozice cytostatikem (*follow up*) progredovala do městnavého srdečního selhání spojeného s významnou dilatací levé komory. Tato data tedy potvrzují, že poškození myokardu antracykliny je do značné míry ireverzibilní.
- Vzestup plazmatických koncentrací srdečního troponinu T pozorovaný v průběhu podávání daunorubicinu dokládá postupné poškození kardiomyocytů v závislosti na kumulativní dávce cytostatika, zatímco přetrvávající zvýšené koncentrace v následném období nasvědčují tomu, že toxické poškození myokardu pokračuje i několik týdnů po ukončení expozice daunorubicinem.
- Podávání daunorubicinu bylo spojeno s prooxidačním působením v myokardu, zvláště pak v období po ukončení expozice daunorubicinem, nicméně málo těsná či chybějící asociace markerů oxidačního stresu s parametry toxicity nenasvědčuje přímé exekutivní úloze globálního oxidačního stresu v rozvoji chronické antracyklinové kardiotoxicity.
- Chronická daunorubicinová kardiotoxicita nebyla spojena s koordinovanou aktivací antioxidační a cytoprotektivní dráhy řízené Nrf2; tento transkripční faktor patrně nesehrává významnou roli v rozvoji toxického poškození myokardu antracykliny.
- Daunorubicinem navozené poškození mitochondrií, oxidační fosforylace a snížení exprese podjednotek komplexů dýchacího řetězce, jakož i dalších mitochondriálních proteinů nebylo provázeno aktivací protektivní kaskády mitochondriální biogeneze. Naopak byly patrné známky útlumu této dráhy, zvláště v průběhu následného sledování, což by mohlo souviset s progresí toxického poškození a rozvojem srdečního selhání v tomto období.
- Obě schémata podávání dexrazoxanu dokázala zabránit rozvoji těžkých forem městnavého srdečního selhání a předčasným úhynům pokusných zvířat, nicméně účinnost obou kardioprotektivních intervencí byla významně odlišná.
- Časná kardioprotektivní intervence pomocí dexrazoxanu byla schopna zcela zabránit vzniku degenerativních změn v myokardu, vzestupu srdečních troponinů T v plazmě a rozvoji systolické i diastolické dysfunkce levé komory.
- Odložená kardioprotektivní intervence pomocí dexrazoxanu (od kumulativní dávky 300 mg/m² daunorubicinu) byla proti tomu významně méně účinná z hlediska většiny studovaných parametrů. Získané výsledky dokumentují, že tento přístup

pouze brání další progresi uvedených změn směrem k městnavého srdečního selhání, nicméně myokard již může trpět významným subklinickým poškozením.

- Kardioprotektivní účinek dexrazoxanu nebyl asociován s významnou změnou markeru oxidačního stresu na konci expozice daunorubicinem, nicméně signifikantní účinek dexrazoxanu na lipoperoxidaci myokardu byl pozorován až v období po ukončení expozice cytostatikem. Tato data napovídají tomu, že mechanismus kardioprotektivního účinku dexrazoxanu nemusí přímo souviset s ochranou před oxidačním stresem navozeným daunorubicinem a že tento děj může mít spíše sekundární význam v rozvoji chronické antracyklinové kardiotoxicity.
- V závislosti na použitém schématu podávání dexrazoxanu bylo možné předejít daunorubicinem navozenému zvýšení exprese hemoxygenázy 1 v myokardu levé komory, přičemž tento jev by mohl souviset s aktivací transkripčního faktoru HIF1 α . Úloha HIF1 α a hemoxygenázy 1 proto zasluhuje další studium.
- Dexrazoxan byl schopen zabránit daunorubicinem navozenému poškození mitochondrií a poruchám v expresi podjednotek dýchacího řetězce kódovaných nukleárním i mitochondriálním genomem. Výsledky této práce nepodporují hypotézu, že by mechanismus kardioprotektivního účinku dexrazoxanu byl založen na prevenci poškození mitochondriální DNA před tzv. běžnými delecemi navozenými opakovaným podáváním antracyklinů.
- Odložená kardioprotektivní intervence dle současných klinických doporučení může být proto z hlediska kardiovaskulárního rizika suboptimální a evidentně nedovoluje plně využít kardioprotektivní potenciál dexrazoxanu. Vzhledem k tomu, že dostupné informace nepotvrzují negativní vliv dexrazoxanu na protinádorový účinek antracyklinů v klinické praxi, data obsažená v této dizertační práci by mohla přispět k odborné diskuzi o optimalizaci schématu podání dexrazoxanu.
- Kardioprotektivní účinek dexrazoxanu si zasluhuje další studium, neboť může být klíčem k pochopení mechanismů zodpovědných za rozvoj antracyklinové kardiotoxicity a mohl by přispět k vývoji nových účinných strategií pro ochranu myokardu před tímto poškozením.

7 SOUHRN

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

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

Dalším cílem pak bylo s užitím výše uvedeného modelu porovnat kardioprotektivní účinek DEX při jeho podání s každou dávkou ANT (časná kardioprotektivní intervence) nebo při podání dle doporučeného schématu (odložená kardioprotektivní intervence). DEX (60 mg/kg) byl podáván před každou dávkou DAU, či až od 7. dávky DAU (kumulativní dávka cca 300 mg/m²). Obě schémata podávání DEX dokázala zabránit rozvoji těžkých forem městnavého srdečního selhání a předčasným úhynům pokusných

zvířat, nicméně účinnost obou kardioprotektivních intervencí byla významně odlišná. Z většiny hodnocených parametrů bylo zjevné, že časná kardioprotektivní intervence dosahovala podstatně lepších výsledků. V této skupině nebyly zaznamenány v průběhu podávání ani po ukončení expozice DAU žádné změny systolické či diastolické funkce, nedošlo k významnému zvýšení plazmatických koncentrací srdečního troponinu T a morfologie myokardu většiny zvířat se prakticky nelišila od kontrolní skupiny. Naproti tomu odložená kardioprotektivní intervence byla schopna pouze zabránit další progresi subklinického myokardiálního poškození směrem k městnavému srdečnímu selhání. Získaná data také nenaznačovala, že by kardioprotektivní účinek DEX byl přímo závislý na ochraně myokardu před oxidačním stresem vyvolaným opakovanou expozicí DAU. Časně podání DEX také předešlo poškození mitochondrií a poruše exprese podjednotek dýchacího řetězce kódovaných mitochondriálním i nukleárním genomem; tato protekce nesouvisela s ochranou myokardu před tzv. běžnými delecemi v mitochondriální DNA.

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

8 SUMMARY

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

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

Another aim of this thesis was to use the above described experimental model to compare the cardioprotective effects of DEX when administered from the very first ANT dose (early cardioprotective intervention) compared to the administration following current guidelines (delayed cardioprotective intervention). DEX (60 mg/kg) was administered before each DAU dose or commencing the 7th DAU administration (cumulative DAU dose

of 300 mg/m²). Both schedules prevented occurrence of premature deaths and severe congestive heart failure, but they were substantially different each other in the efficacy. Most of evaluated parameters clearly indicated that the early cardioprotective intervention achieved markedly better outcomes. In this group no changes were found in the systolic and diastolic function in both treatment and follow up period, cardiac morphology was comparable as in the controls group and no changes were observed in plasma concentrations of cardiac troponin T. This contrasted with delayed cardioprotective intervention where DEX administration only prevented further progression of the subclinical cardiac damage towards heart failure. Obtained data also did not indicate that the cardioprotective effects are directly dependent and proportional to changes in oxidative stress parameters. Early DEX administration also effectively prevented the onset of mitochondrial damage and impairment of the expression of respiratory chain subunits encoded by both mitochondrial and nuclear genome; however, this protection was not based on the common mtDNA deletions prevention.

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

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Airoldi M., Amadori D., Barni S., Cinieri S., De Placido S., Di Leo A., Gennari A., Iacobelli S., Ionta M.T., Lorusso V., Lotrionte M., Marchetti P., Mattioli R., Minotti G., Pronzato P., Rosti G., Tondini C.A., Veronesi A. 2011. Clinical activity and cardiac tolerability of non-pegylated liposomal doxorubicin in breast cancer: a synthetic review. *Tumori* 97(6):690–692.
- al-Harbi M.M., al-Gharably N.M., al-Shabanah O.A., al-Bekairi A.M., Osman A.M., Tawfik H.N. 1992. Prevention of doxorubicin-induced myocardial and haematological toxicities in rats by the iron chelator desferrioxamine. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 31(3):200–204.
- Alderton P.M., Gross J., Green M.D. 1992. Comparative Study of Doxorubicin, Mitoxantrone, and Epirubicin in Combination with ICRF-187 (ADR-529) in a Chronic Cardiotoxicity Animal Model. *Cancer Res.* 52(1):194–201.
- Aleman B.M.P., van den Belt-Dusebout A.W., De Bruin M.L., van 't Veer M.B., Baaijens M.H.A., de Boer J.P., Hart A.A.M., Klokman W.J., Kuenen M.A., Ouwens G.M., Bartelink H., van Leeuwen F.E. 2007. Late cardiotoxicity after treatment for Hodgkin lymphoma. *Blood* 109(5):1878–1886.
- Alkreathy H., Damanhoury Z.A., Ahmed N., Slevin M., Ali S.S., Osman A.-M.M. 2010. Aged garlic extract protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology* 48(3):951–956.
- Allen A. 1992. The cardiotoxicity of chemotherapeutic drugs. *Semin. Oncol.* 19(5):529–542.
- Ammar E.-S.M., Said S.A., Suddek G.M., El-Damarawy S.L. 2011. Amelioration of doxorubicin-induced cardiotoxicity by deferiprone in rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 89:269–276.
- Andoh T., Ishida R. 1998. Catalytic inhibitors of DNA topoisomerase II. *Biochim. Biophys. Acta* 1400(1-3):155–171.
- 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(2):243–254.
- Armstrong G.T., Liu Q., Yasui Y., Neglia J.P., Leisenring W., Robison L.L., Mertens A.C. 2009. Late mortality among 5-year survivors of childhood cancer: a summary from the Childhood Cancer Survivor Study. *J. Clin. Oncol* 27(14):2328–2338.
- Auel B., Goldschmidt H., Geer T., Moehler T.M., Platzbecker U., Naumann R., Blau I., Hänel M., Knauf W., Nüchel H., Salwender H.-J., Scheid C., Weisel K., Gorschlüter M., Glasmacher A., Schmidt-Wolf I.G.H., German Refractory Myeloma Study Group 2012. Treatment with Thalidomide and Cyclophosphamide (TCID) is Superior to Vincristine (VID) and to Vinorelbine (VRID) Regimens in Patients with Refractory or Recurrent Multiple Myeloma. *Indian J Hematol Blood Transfus* 28(2):67–76.
- Aydemir S., Ozdemir I., Kart A. 2010. Role of exogenous melatonin on adriamycin-induced changes in the rat heart. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 14(5):435–441.
- Bagchi D., Sen C.K., Ray S.D., Das D.K., Bagchi M., Preuss H.G., Vinson J.A. 2003. Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 523-524(0):87–97.
- Bachur N.R., Gordon S.L., Gee M.V. 1977. Anthracycline antibiotic augmentation of microsomal electron transport and free radical formation. *Mol. Pharmacol.* 13(5):901–910.
- Baird L., Dinkova-Kostova A.T. 2011. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch. Toxicol.* 85(4):241–272.

- Barry E.V., Vrooman L.M., Dahlberg S.E., Neuberger D.S., Asselin B.L., Athale U.H., Clavell L.A., Larsen E.C., Moghrabi A., Samson Y., Schorin M.A., Cohen H.J., Lipshultz S.E., Sallan S.E., Silverman L.B. 2008. Absence of secondary malignant neoplasms in children with high-risk acute lymphoblastic leukemia treated with dexrazoxane. *J. Clin. Oncol* 26(7):1106–1111.
- Barta J., Tóth A., Edes I., Vaszily M., Papp J.G., Varró A., Papp Z. 2005. Calpain-1-sensitive myofibrillar proteins of the human myocardium. *Mol. Cell. Biochem.* 278(1-2):1–8.
- Basser R.L., Sobol M.M., Duggan G., Cebon J., Rosenthal M.A., Mihaly G., Green M.D. 1994. Comparative study of the pharmacokinetics and toxicity of high-dose epirubicin with or without dexrazoxane in patients with advanced malignancy. *J. Clin. Oncol.* 12(8):1659–1666.
- Bast A., Haenen G.R.M.M., Bruynzeel A.M.E., Vijgh W.J.F. 2007. Protection by flavonoids against anthracycline cardiotoxicity: from chemistry to clinical trials. *Cardiovasc Toxicol* 7(2):154–159.
- Batist G., Ramakrishnan G., Rao C.S., Chandrasekharan A., Gutheil J., Guthrie T., Shah P., Khojasteh A., Nair M.K., Hoelzer K., Tkaczuk K., Park Y.C., Lee L.W. 2001. Reduced cardiotoxicity and preserved antitumor efficacy of liposome-encapsulated doxorubicin and cyclophosphamide compared with conventional doxorubicin and cyclophosphamide in a randomized, multicenter trial of metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 19(5):1444–1454.
- Berry G.J., Jorden M. 2005. Pathology of radiation and anthracycline cardiotoxicity. *Pediatr Blood Cancer* 44(7):630–637.
- Berthiaume J.M., Oliveira P.J., Fariss M.W., Wallace K.B. 2005. Dietary vitamin E decreases doxorubicin-induced oxidative stress without preventing mitochondrial dysfunction. *Cardiovasc. Toxicol.* 5(3):257–267.
- Bhattacharya M., Ponka P., Hardy P., Hanna N., Varma D.R., Lachapelle P., Chemtob S. 1997. Prevention of Postasphyxia Electroretinal Dysfunction with a Pyridoxal Hydrazone. *Free Radical Biology and Medicine* 22(1-2):11–16.
- Billingham M.E., Mason J.W., Bristow M.R., Daniels J.R. 1978. Anthracycline cardiomyopathy monitored by morphologic changes. *Cancer Treat Rep* 62(6):865–872.
- Blanco J.G., Sun C.-L., Landier W., Chen L., Esparza-Duran D., Leisenring W., Mays A., Friedman D.L., Ginsberg J.P., Hudson M.M., Neglia J.P., Oeffinger K.C., Ritchey A.K., Villaluna D., Relling M.V., Bhatia S. 2012. Anthracycline-related cardiomyopathy after childhood cancer: role of polymorphisms in carbonyl reductase genes--a report from the Children's Oncology Group. *J. Clin. Oncol.* 30(13):1415–1421.
- Boucek R.J., Miracle A., Anderson M., Engelman R., Atkinson J., Dodd D.A. 1999. Persistent effects of doxorubicin on cardiac gene expression. *J. Mol. Cell. Cardiol* 31(8):1435–1446.
- Breed J.G.S., Zimmerman A.N.E., Dormans J.A.M.A., Pinedo H.M. 1980. Failure of the Antioxidant Vitamin E to Protect against Adriamycin-induced Cardiotoxicity in the Rabbit. *Cancer Res.* 40(6):2033–2038.
- Bruynzeel A.M.E., Niessen H.W.M., Bronzwaer J.G.F., van der Hoeven J.J.M., Berkhof J., Bast A., van der Vijgh W.J.F., van Groeningen C.J. 2007a. The effect of monohydroxyethylrutoside on doxorubicin-induced cardiotoxicity in patients treated for metastatic cancer in a phase II study. *Br. J. Cancer* 97(8):1084–1089.

- Bruynzeel A.M.E., Vormer-Bonne S., Bast A., Niessen H.W.M., Vijgh W.J.F. 2007b. Long-term effects of 7-mono-hydroxyethylrutoside (monoHER) on DOX-induced cardiotoxicity in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 60(4):509–514.
- Bu'Lock F.A., Gabriel H.M., Oakhill A., Mott M.G., Martin R.P. 1993. Cardioprotection by ICRF187 against high dose anthracycline toxicity in children with malignant disease. *Br Heart J* 70(2):185–188.
- Burwell L.S., Nadtochiy S.M., Brookes P.S. 2009. Cardioprotection by metabolic shut-down and gradual wake-up. *J. Mol. Cell. Cardiol* 46(6):804–810.
- Buss J.L., Hasinoff B.B. 1993. The one-ring open hydrolysis product intermediates of the cardioprotective agent ICRF-187 (dexrazoxane) displace iron from iron-anthracycline complexes. *Agents Actions* 40(1-2):86–95.
- Buss J.L., Hermes-Lima M., Ponka P. 2002. Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and its analogues. *Adv. Exp. Med. Biol.* 509:205–229.
- Calvert J.W., Lefer D.J. 2009. Myocardial protection by nitrite. *Cardiovasc. Res.* 83(2):195–203.
- Capranico G., Tinelli S., Austin C.A., Fisher M.L., Zunino F. 1992. Different patterns of gene expression of topoisomerase II isoforms in differentiated tissues during murine development. *Biochim. Biophys. Acta* 1132(1):43–48.
- Cardinale D., Colombo A., Sandri M.T., Lamantia G., Colombo N., Civelli M., Martinelli G., Veglia F., Fiorentini C., Cipolla C.M. 2006. Prevention of High-Dose Chemotherapy-Induced Cardiotoxicity in High-Risk Patients by Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition. *Circulation* 114(23):2474–2481.
- Carver J., Desai C. 2010. Chapter 5. Cardiovascular Toxicity of Antitumor Drugs: Dimension of the Problem in Adult Settings., In: Minotti G. (Ed.) *Cardiotoxicity of Non-Cardiovascular Drugs*. 1st ed. Padstow: John Wiley & Sons, 2010. ISBN: 9780470772744
- Classen S., Olland S., Berger J.M. 2003. Structure of the topoisomerase II ATPase region and its mechanism of inhibition by the chemotherapeutic agent ICRF-187. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100(19):10629–10634.
- Clinical Trials Search. National Cancer Institute at the U. S. National Institute of Health [databáze online]. Poslední rev.: 12. 6. 2013. [cit.: 9. 10. 2013] Dostupné z: <http://www.cancer.gov/clinicaltrials/search/results?protocolsearchid=12068699>
- Cortés-Funes H., Coronado C. 2007. Role of anthracyclines in the era of targeted therapy. *Cardiovasc. Toxicol.* 7(2):56–60.
- Creighton A.M., Birnie G.D. 1969. The effect of bisdioxopiperazines on the synthesis of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and protein in growing mouse-embryo fibroblasts. *Biochem. J.* 114(4):58P.
- Cusack B.J., Gambliel H., Musser B., Hadjokas N., Shadle S.E., Charlier H., Olson R.D. 2006. Prevention of chronic anthracycline cardiotoxicity in the adult Fischer 344 rat by dexrazoxane and effects on iron metabolism. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 58:517–526.
- Cvetković R.S., Scott L.J. 2005. Dexrazoxane: a review of its use for cardioprotection during anthracycline chemotherapy. *Drugs* 65(7):1005–1024.
- Danesi R., Fogli S., Gennari A., Conte P., Del Tacca M. 2002. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of the anthracycline anticancer drugs. *Clin. Pharmacokinet.* 41(6):431–444.
- Dardir M., Herman E.H., Ferrans V.J. 1989. Effects of ICRF-187 on the cardiac and renal toxicity of epirubicin in spontaneously hypertensive rats. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 23(5):269–275.

- Das A., Durrant D., Mitchell C., Mayton E., Hoke N.N., Salloum F.N., Park M.A., Qureshi I., Lee R., Dent P., Kukreja R.C. 2010. Sildenafil increases chemotherapeutic efficacy of doxorubicin in prostate cancer and ameliorates cardiac dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107(42):18202–18207.
- Davies S.M. 2012. Getting to the Heart of the Matter. *J. Clin. Oncol.* 30(13):1399–1400.
- De Matos Neto R.P., Petrilli A.S., Silva C.M.C., Campos Filho O., Oporto V.M., Gomes L. de F.G., Paiva M.G., Carvalho A.C.C., Moisés V.A. 2006. Left ventricular systolic function assessed by echocardiography in children and adolescents with osteosarcoma treated with doxorubicin alone or in combination with dexrazoxane. *Arq. Bras. Cardiol.* 87(6):763–771.
- De Nigris F., Rienzo M., Schiano C., Fiorito C., Casamassimi A., Napoli C. 2008. Prominent cardioprotective effects of third generation beta blocker nebivolol against anthracycline-induced cardiotoxicity using the model of isolated perfused rat heart. *European Journal of Cancer* 44(3):334–340.
- De Sousa E., Veksler V., Minajeva A., Kaasik A., Mateo P., Mayoux E., Hoerter J., Bigard X., Serrurier B., Ventura-Clapier R. 1999. Subcellular creatine kinase alterations. Implications in heart failure. *Circ. Res.* 85(1):68–76.
- DeAtley S.M., Aksenov M.Y., Aksenova M.V., Jordan B., Carney J.M., Butterfield D.A. 1999. Adriamycin-induced changes of creatine kinase activity in vivo and in cardiomyocyte culture. *Toxicology* 134(1):51–62.
- Decorti G., Candussio L., Klugmann F.B., Strohmayer A., Mucci M.P., Mosco A., Baldini L. 1997. Adriamycin-induced histamine release from heart tissue in vitro. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 40(4):363–366.
- Deweese J.E., Osheroff N. 2009. The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: wolf in sheep's clothing. *Nucleic Acids Res.* 37(3):738–748.
- Dignam J.D., Martin P.L., Shastry B.S., Roeder R.G. 1983. Eukaryotic gene transcription with purified components. *Meth. Enzymol.* 101:582–598.
- Diop N.K., Vitellaro L.K., Arnold P., Shang M., Marusak R.A. 2000. Iron complexes of the cardioprotective agent dexrazoxane (ICRF-187) and its desmethyl derivative, ICRF-154: solid state structure, solution thermodynamics, and DNA cleavage activity. *J. Inorg. Biochem.* 78(3):209–216.
- Doroshov J.H. 1983. Anthracycline antibiotic-stimulated superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical production by NADH dehydrogenase. *Cancer Res.* 43(10):4543.
- Doroshov J.H., Davies K.J. 1986. Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. II. Formation of superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical. *Journal of Biological Chemistry* 261(7):3068.
- Doroshov J.H., Locker G.Y., Ifrim I., Myers C.E. 1981. Prevention of doxorubicin cardiac toxicity in the mouse by N-acetylcysteine. *Journal of Clinical Investigation* 68(4):1053.
- Dorr R.T. 1996. Cytoprotective agents for anthracyclines. *Semin. Oncol.* 23(4 Suppl 8):23–34.
- Dresdale A.R., Barr L.H., Bonow R.O., Mathisen D.J., Myers C.E., Schwartz D.E., d'Angelo T., Rosenberg S.A. 1982. Prospective randomized study of the role of N-acetyl cysteine in reversing doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Am. J. Clin. Oncol.* 5(6):657–663.
- Dunkern T.R., Wedemeyer I., Baumgärtner M., Fritz G., Kaina B. 2003. Resistance of p53 knockout cells to doxorubicin is related to reduced formation of DNA strand breaks rather than impaired apoptotic signaling. *DNA Repair (Amst.)* 2(1):49–60.

- Elbayoumi T.A., Torchilin V.P. 2009. Tumor-specific anti-nucleosome antibody improves therapeutic efficacy of doxorubicin-loaded long-circulating liposomes against primary and metastatic tumor in mice. *Mol. Pharm.* 6(1):246–254.
- Elbl L. 2002. Poškození srdce protinádorovou léčbou. 1st ed.. Praha: Grada Publishing, 2002. ISBN: 8024702401.
- 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(11):678–684.
- 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(2):128–136.
- El-Demerdash E., Ali A.A., Sayed-Ahmed M.M., Osman A.-M.M. 2003. New aspects in probucol cardioprotection against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 52(5):411–416.
- Esworthy R.S., Chu F.-F., Doroshov J.H. 2001. Analysis of Glutathione-Related Enzymes, in: Bus, J.S., Costa, L.G., Hodgson, E., Lawrence, D.A., Reed, D.J. (Eds.), *Curr. Protoc. Toxicol.* doi: 10.1002/0471140856.tx0701s00
- Ettinger D.S., Jotte R., Lorigan P., Gupta V., Garbo L., Alemany C., Conkling P., Spigel D.R., Dudek A.Z., Shah C., Salgia R., McNally R., Renschler M.F., Oliver J.W. 2010. Phase II study of amrubicin as second-line therapy in patients with platinum-refractory small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 28(15):2598–2603.
- Ewer M.S., Benjamin R.S. 2006. Chapter 2. Doxorubicin cardiotoxicity: Clinical Aspects, Recognition, Monitoring, Treatment and prevention. In: Ewer, M.S., Yeh, E. (Eds.), *Cancer and the Heart*. 1st ed.. Hamilton: BC Decker, 2006. ISBN: 9781550092684.
- Ewer M.S., Ewer S.M. 2010. Cardiotoxicity of anticancer treatments: what the cardiologist needs to know. *Nat. Rev. Cardiol.* 7(10):564–575.
- Ewer M.S., Yeh E. 2006. *Cancer and the heart*. 1st ed.. Hamilton: BC Decker, 2006. ISBN: 9781550092684.
- Fadillioglu E., Yilmaz H.R., Erdogan H., Sogut S. 2003. The activities of tissue xanthine oxidase and adenosine deaminase and the levels of hydroxyproline and nitric oxide in rat hearts subjected to doxorubicin: protective effect of erdosteine. *Toxicology* 191(2-3):153–158.
- Ferrara F., Schiffer C.A. 2013. Acute myeloid leukaemia in adults. *The Lancet* 381(9865):484–495.
- Findlay M., Minckwitz G. von, Wardley A. 2008. Effective oral chemotherapy for breast cancer: pillars of strength. *Ann. Oncol.* 19(2):212–222.
- Fisher P.W. 2005. Phosphodiesterase-5 Inhibition With Sildenafil Attenuates Cardiomyocyte Apoptosis and Left Ventricular Dysfunction in a Chronic Model of Doxorubicin Cardiotoxicity. *Circulation* 111(13):1601–1610.
- Fisher S.A., Brunskill S.J., Doree C., Chowdhury O., Gooding S., Roberts D.J. 2013. Oral deferiprone for iron chelation in people with thalassaemia. *Cochrane Database Syst. Rev.* 8CD004839.
- Fogli S., Nieri P., Breschi M.C. 2004. The role of nitric oxide in anthracycline toxicity and prospects for pharmacologic prevention of cardiac damage. *The FASEB Journal* 18(6):664.
- Force T., Krause D.S., Van Etten R.A. 2007. Molecular mechanisms of cardiotoxicity of tyrosine kinase inhibition. *Nat. Rev. Cancer* 7(5):332–344.

- Forrest G.L., Gonzalez B., Tseng W., Li X., Mann J. 2000. Human carbonyl reductase overexpression in the heart advances the development of doxorubicin-induced cardiotoxicity in transgenic mice. *Cancer Res.* 60(18):5158–5164.
- Franco V.I., Henkel J.M., Miller T.L., Lipshultz S.E. 2011. Cardiovascular effects in childhood cancer survivors treated with anthracyclines. *Cardiol. Res. Pract.* 2011:134679, p.13. doi: 10.4061/2011/134679.
- 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(1):309–316.
- Gambliel H.A., Burke B.E., Cusack B.J., Walsh G.M., Zhang Y.L., Mushlin P.S., Olson R.D. 2002. Doxorubicin and C-13 deoxydoxorubicin effects on ryanodine receptor gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291(3):433–438.
- Garnier A., Zoll J., Fortin D., N'Guessan B., Lefebvre F., Geny B., Mettauer B., Veksler V., Ventura-Clapier R. 2009. Control by Circulating Factors of Mitochondrial Function and Transcription Cascade in Heart Failure / CLINICAL PERSPECTIVE. *Circ. Heart Fail.* 2(4):342–350.
- Geisberg C.A., Sawyer D.B. 2010. Mechanisms of anthracycline cardiotoxicity and strategies to decrease cardiac damage. *Curr. Hypertens. Rep* 12(6):404–410.
- Georgakopoulos P., Roussou P., Matsakas E., Karavidas A., Anagnostopoulos N., Marinakis T., Galanopoulos A., Georgiakodis F., Zimeras S., Kyriakidis M., Ahimastos A. 2010. Cardioprotective effect of metoprolol and enalapril in doxorubicin-treated lymphoma patients: a prospective, parallel-group, randomized, controlled study with 36-month follow-up. *Am. J. Hematol* 85(11):894–896.
- Geršl V., Bajgar J., Krs O., Hrdina R., Palička V., Mazurová Y. 1996. Changes in cholinesterase activities after daunorubicin administration to rabbits. *Hum Exp Toxicol* 15(10):834–838.
- Geršl V., Hrdina R. 1994. Noninvasive polygraphic cardiac changes in daunorubicin-induced cardiomyopathy in rabbits. *Sb Ved Pr Lek Fak Karlovy Univerzity Hradci Kralove* 37(2):49–55.
- Gewirtz D.A. 1999. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem. Pharmacol.* 57(7):727–741.
- Gharib M.I., Burnett A.K. 2002. Chemotherapy-induced cardiotoxicity: current practice and prospects of prophylaxis. *Eur. J. Heart Fail.* 4(3):235–242.
- Gianni L., Herman E.H., Lipshultz S.E., Minotti G., Sarvazyan N., Sawyer D.B. 2008. Anthracycline Cardiotoxicity: From Bench to Bedside. *J. Clin. Oncol.* 26(22):3777–3784.
- Gianni L., Salvatorelli E., Minotti G. 2007. Anthracycline cardiotoxicity in breast cancer patients: synergism with trastuzumab and taxanes. *Cardiovasc. Toxicol.* 7(2):67–71.
- Goormaghtigh E., Huart P., Brasseur R., Ruyschaert J.M. 1986. Mechanism of inhibition of mitochondrial enzymatic complex I-III by adriamycin derivatives. *Biochim. Biophys. Acta* 861(1):83–94.
- Goormaghtigh E., Huart P., Praet M., Brasseur R., Ruyschaert J.M. 1990. Structure of the adriamycin-cardiolipin complex. Role in mitochondrial toxicity. *Biophys. Chem.* 35(2-3):247–257.
- Greaves L.C., Reeve A.K., Taylor R.W., Turnbull D.M. 2012. Mitochondrial DNA and disease. *J. Pathol.* 226(2):274–286.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 2007. Chapter 2: The chemistry of free radicals and related “reactive species”, in: Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (Eds.) *Free Radicals in*

- Biology and Medicine*. 4th ed.. Oxford: Oxford University Press, 2007. ISBN: 9780198568698
- 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(15):1876–1883.
- Harake D., Franco V.I., Henkel J.M., Miller T.L., Lipshultz S.E. 2012. Cardiotoxicity in childhood cancer survivors: strategies for prevention and management. *Future Cardiol.* 8(4):647–670.
- Hasinoff B.B., Herman E.H. 2007. Dexrazoxane: how it works in cardiac and tumor cells. Is it a prodrug or is it a drug? *Cardiovasc. Toxicol.* 7(2):140–144.
- Hasinoff B.B., Schroeder P.E., Patel D. 2003. The metabolites of the cardioprotective drug dexrazoxane do not protect myocytes from doxorubicin-induced cytotoxicity. *Mol. Pharmacol.* 64(3):670–678.
- Hellmann K. 2007. Dexrazoxane-Associated Risk for Secondary Malignancies in Pediatric Hodgkin's Disease: A Claim Without Evidence. *J. Clin. Oncol.* 25(29):4689–4690.
- Hellmann K., Rhomberg W. 2010. Razoxane and Dexrazoxane - Two Multifunctional Agents, 1st ed.. Dordrecht: Springer Netherlands, 2010, p. 167–213. ISBN: 9789048191673
- Hensley M.L., Hagerty K.L., Kewalramani T., Green D.M., Meropol N.J., Wasserman T.H., Cohen G.I., Emami B., Gradishar W.J., Mitchell R.B., Thigpen J.T., Trotti A., von Hoff D., Schuchter L.M. 2009. American Society of Clinical Oncology 2008 Clinical Practice Guideline Update: Use of Chemotherapy and Radiation Therapy Protectants. *J. Clin. Oncol.* 27(1):127–145.
- Herman E., Ferrans V. 1998. Preclinical animal models of cardiac protection from anthracycline-induced cardiotoxicity. *Semin. Oncol.* 25(4):15–21.
- Herman E.H., 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(1):89–92.
- Herman E.H., el-Hage A., Ferrans V.J. 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(1):42–53.
- Herman E.H., Ferrans V.J. 1983. Influence of vitamin E and ICRF-187 on chronic doxorubicin cardiotoxicity in miniature swine. *Lab. Invest.* 49(1):69–77.
- Herman E.H., Ferrans V.J. 1993. Timing of treatment with ICRF-187 and its effect on chronic doxorubicin cardiotoxicity. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 32(6):445–449.
- Herman E.H., Ferrans V.J., Jordan W., Ardalan B. 1981. Reduction of chronic daunorubicin cardiotoxicity by ICRF-187 in rabbits. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 31(1):85–97.
- Herman E.H., Ferrans V.J., Myers C.E., Van Vleet J.F. 1985. Comparison of the Effectiveness of (+)-1, 2-Bis (3, 5-dioxopiperazinyl-1-yl) propane (ICRF-187) and N-Acetylcysteine in Preventing Chronic Doxorubicin Cardiotoxicity in Beagles. *Cancer Res.* 45(1):276.
- Herman E.H., Ferrans V.J., Young R.S., Hamlin R.L. 1988b. Pretreatment with ICRF-187 allows a marked increase in the total cumulative dose of doxorubicin tolerated by beagle dogs. *Drugs Exp Clin Res* 14(9):563–570.
- Herman E.H., Ferrans V.J., Young R.S.K., Hamlin R.L. 1988c. Effect of Pretreatment with ICRF-187 on the Total Cumulative Dose of Doxorubicin Tolerated by Beagle Dogs. *Cancer Res.* 48(23):6918–6925.

- Herman E.H., Zhang J., Ferrans V.J. 1994. Comparison of the protective effects of desferrioxamine and ICRF-187 against doxorubicin-induced toxicity in spontaneously hypertensive rats. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 35(2):93–100.
- Hermes-Lima M., Ponka P., Schulman H.M. 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(2-3):154–160.
- Hochster H., Liebes L., Wadler S., Oratz R., Wernz J.C., Meyers M., Green M., Blum R.H., Speyer J.L. 1992. Pharmacokinetics of the cardioprotector ADR-529 (ICRF-187) in escalating doses combined with fixed-dose doxorubicin. *J. Natl. Cancer Inst.* 84(22):1725–1730.
- Hood D.A., Adhietty P.J., Colavecchia M., Gordon J.W., Irrcher I., Joseph A.-M., Lowe S.T., Rungi A.A. 2003. Mitochondrial biogenesis and the role of the protein import pathway. *Med. Sci. Sports Exerc.* 35(1):86–94.
- Horackova M., Ponka P., Byczko Z. 2000. The antioxidant effects of a novel iron chelator salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone in the prevention of H₂O₂ injury in adult cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* 47(3):529.
- 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(1):37–41.
- Chabner B.A., Amrein P.C., Druker B., Michaelson M.D., Mitsiades C.S., Goss P.E., Ryan D.P., Ramachandra S., Richarson P.G., Supko J.G., Wilson W.H. 2006. Chapter 51: Antineoplastic Agents. In: Brunton LL (Ed.), *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 11th ed.. New York: McGraw-Hill, 2006. ISBN: 9780071422802
- Chen B., Peng X., Pentassuglia L., Lim C.C., Sawyer D.B. 2007. Molecular and cellular mechanisms of anthracycline cardiotoxicity. *Cardiovasc. Toxicol* 7(2):114–121.
- Chen B., Zhong L., Roush S.F., Pentassuglia L., Peng X., Samaras S., Davidson J.M., Sawyer D.B., Lim C.C. 2012. Disruption of a GATA4/Ankrd1 signaling axis in cardiomyocytes leads to sarcomere disarray: implications for anthracycline cardiomyopathy. *PLoS ONE* 7(4):e35743.
- Chen M.H., Colan S.D., Diller L. 2011. Cardiovascular disease: cause of morbidity and mortality in adult survivors of childhood cancers. *Circ. Res* 108(5):619–628.
- Cheneval D., Müller M., Carafoli E. 1983. The mitochondrial phosphate carrier reconstituted in liposomes is inhibited by doxorubicin. *FEBS Lett.* 159(1-2):123–126.
- Chevion H., Jiang Y., Har-El R., Berenshtein E., Uretzky G., Kitrossky N. 1993. Copper and iron are mobilized following myocardial ischemia: possible predictive criteria for tissue injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90(3):1102–6.
- Chinnery P.F., Hudson G. 2013. Mitochondrial genetics. *Br. Med. Bull.* 106:135–159.
- Chlopčíková Š., Psotová J., Miketová P., Soušek J., Lichnovský V., Šimánek V. 2004a. Chemoprotective effect of plant phenolics against anthracycline-induced toxicity on rat cardiomyocytes. Part II. caffeic, chlorogenic and rosmarinic acids. *Phytother Res* 18(5):408–413.
- Chlopčíková Š., Psotová J., Miketová P., Šimánek V. 2004b. Chemoprotective effect of plant phenolics against anthracycline-induced toxicity on rat cardiomyocytes. Part I. Silymarin and its flavonolignans. *Phytother. Res.* 18(2):107–110.
- Ito H., Miller S.C., Billingham M.E., Akimoto H., Torti S.V., Wade R., Gahlmann R., Lyons G., Kedes L., Torti F.M. 1990. Doxorubicin selectively inhibits muscle gene

- expression in cardiac muscle cells in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87(11):4275–4279.
- Jang Y.M., 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(3):483–490.
- Janssen A.J.M., Trijbels F.J.M., Sengers R.C.A., Smeitink J.A.M., van den Heuvel L.P., Wintjes L.T.M., Stoltenborg-Hogenkamp B.J.M., Rodenburg R.J.T. 2007. Spectrophotometric Assay for Complex I of the Respiratory Chain in Tissue Samples and Cultured Fibroblasts. *Clinical Chemistry* 53(4):729–734.
- Jelić S., Radulović S., Nesković-Konstantinović Z., Kreacić M., Ristović Z., Bosnjak S., Milanović N., Vuletić 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(3):176–182.
- Jeyaseelan R., Poizat C., Baker R.K., Abdishoo S., Isterabadi L.B., Lyons G.E., Kedes L. 1997. A novel cardiac-restricted target for doxorubicin. *J. Biol. Chem.* 272(36):22800.
- Jirkovský E., Popelová O., Křiváková-Staňková P., Vávrová A., Hroch M., Hašková P., Brčáková-Doleželová E., Mičuda S., Adamcová M., Šimůnek T., Červinková Z., Geršl V., Štěřba M. 2012. Chronic anthracycline cardiotoxicity: molecular and functional analysis with focus on nuclear factor erythroid 2-related factor 2 and mitochondrial biogenesis pathways. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 343(2):468–478.
- Jones R.L., Swanton C., Ewer M.S. 2006. Anthracycline cardiotoxicity. *Expert. Opin. Drug. Saf.* 5(6):791–809.
- Kaiserová H., Šimůnek T., van der Vijgh W.J.F., Bast A., Kvasničková E. 2007. Flavonoids as protectors against doxorubicin cardiotoxicity: Role of iron chelation, antioxidant activity and inhibition of carbonyl reductase *Biochim. Biophys. Acta* 1772(9):1065–1074.
- Kalay N., Basar E., Ozdogru I., Er O., Cetinkaya Y., Dogan A., Inanc T., Oguzhan A., Eryol N.K., Topsakal R., Ergin A. 2006. Protective effects of carvedilol against anthracycline-induced cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 48(11):2258–2262.
- Kand'ár R., Záková P., Lotková H., Kucera O., Cervinková Z. 2007. Determination of reduced and oxidized glutathione in biological samples using liquid chromatography with fluorimetric detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43(4):1382–1387.
- Keizer H.G., Pinedo H.M., Schuurhuis G.J., Joenje H. 1990. Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmacol. Ther.* 47(2):219–231.
- Kiyomiya K., Matsuo S., Kurebe M. 2001. Mechanism of specific nuclear transport of adriamycin: the mode of nuclear translocation of adriamycin-proteasome complex. *Cancer Res.* 61(6):2467–2471.
- Klener P., Klener P. jr. 2010. *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*, 1st ed.. Praha: Grada Publishing, 2010. ISBN: 9788024769882
- Klugmann F.B., 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(5):743–748.
- Koka S., Das A., Zhu S.-G., Durrant D., Xi L., Kukreja R.C. 2010. Long-Acting Phosphodiesterase-5 Inhibitor Tadalafil Attenuates Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy without Interfering with Chemotherapeutic Effect. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 334(3):1023–1030.

- Kolaric K., Bradamante V., Cervek J., Cieslinska A., Cisarz-Filipcak E., Denisov L.E., Donat D., Drosik K., Gershanovic M., Hudziec P. 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(3):251–255.
- Kovaříková P., Pasaková-Vrbatová I., Vavrová A., Stariat J., Klimeš J., Šimůnek T. 2013. Development of LC-MS/MS method for the simultaneous analysis of the cardioprotective drug dexrazoxane and its metabolite ADR-925 in isolated cardiomyocytes and cell culture medium. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 76243–251.
- Kratz F., Elsadek B. 2012. Clinical impact of serum proteins on drug delivery. *J. Control. Release* 161(2):429–445.
- Kurata T., Okamoto I., Tamura K., Fukuoka M. 2007. Amrubicin for non-small-cell lung cancer and small-cell lung cancer. *Invest. New Drugs* 25(5):499–504.
- Květina J., Grossmann V., Svoboda Z., Safárová M. 1997. Preclinical comparison of bis-diketopiperazine-propane (dexrazoxane) and bis-diketopiperazine-ethane (antimet) on the adriamycin-cardiotoxic effect. *Neoplasma* 44(2):97–99.
- Lagouge M., Larsson N.-G. 2013. The role of mitochondrial DNA mutations and free radicals in disease and ageing. *J. Intern. Med.* 273(6):529–543.
- Langer S.W., Sehested M., Jensen P.B. 2009. Anthracycline extravasation: a comprehensive review of experimental and clinical treatments. *Tumori* 95(3):273–282.
- Lebrecht D., Geist A., Ketelsen U.-P., Haberstroh J., Setzer B., Walker U.A. 2007. Dexrazoxane prevents doxorubicin-induced long-term cardiotoxicity and protects myocardial mitochondria from genetic and functional lesions in rats. *Br. J. Pharmacol.* 151(6):771–778.
- Lebrecht D., Kirschner J., Geist A., Haberstroh J., Walker U.A. 2010. Respiratory chain deficiency precedes the disrupted calcium homeostasis in chronic doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiovasc. Pathol.* 19(5):e167–e174.
- Lebrecht D., Kokkori A., Ketelsen U.-P., Setzer B., Walker U.A. 2005. Tissue-specific mtDNA lesions and radical-associated mitochondrial dysfunction in human hearts exposed to doxorubicin. *J. Pathol.* 207(4):436–444.
- Lebrecht D., Setzer B., Ketelsen U.-P., Haberstroh J., Walker U.A. 2003. Time-Dependent and Tissue-Specific Accumulation of mtDNA and Respiratory Chain Defects in Chronic Doxorubicin Cardiomyopathy. *Circulation* 108(19):2423–2429.
- Lebrecht D., Walker U.A. 2007. Role of mtDNA lesions in anthracycline cardiotoxicity. *Cardiovasc. Toxicol.* 7(2):108–113.
- Lefrak E.A., Pitha J., Rosenheim S., Gottlieb J.A. 1973. A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. *Cancer* 32(2):302–314.
- Legha S.S., Benjamin R.S., Mackay B., Yap H.Y., Wallace S., Ewer M., Blumenschein G.R., Freireich E.J. 1982a. Adriamycin therapy by continuous intravenous infusion in patients with metastatic breast cancer. *Cancer* 49(9):1762–1766.
- Legha S.S., Wang Y.M., Mackay B., Ewer M., Hortobagyi G.N., Benjamin R.S., Ali M.K. 1982b. Clinical and pharmacologic investigation of the effects of alpha-tocopherol on adriamycin cardiotoxicity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 393:411–418.
- Lemež P., Marešová J. 1996. Protective effects of cardioxane against anthracycline-induced cardiotoxicity in relapsed acute myeloid leukemias. *Neoplasma* 43(6):417–419.
- Leonard R.C.F., Williams S., Tulpule A., Levine A.M., Oliveros S. 2009. Improving the therapeutic index of anthracycline chemotherapy: Focus on liposomal doxorubicin (MyocetTM). *The Breast* 18(4):218–224.

- Levitt G. 1999. Cardioprotection. *Br. J. Haematol.* 106(4):860–869.
- Li J.-J., Di G.-H., Tang L.-C., Yu K.-D., Hu Z., Liu G.-Y., Lu J.-S., Wu J., Han Q.-X., Shen Z.-Z., Shao Z.-M. 2011. Adjuvant therapy of breast cancer with pirarubicin versus epirubicin in combination with cyclophosphamide and 5-fluorouracil. *Breast J* 17(6):657–660.
- Li K., Sung R.Y.T., Huang W.Z., Yang M., Pong N.H., Lee S.M., Chan W.Y., Zhao H., To M.Y., Fok T.F., Li C.K., Wong Y.O., Ng P.C. 2006. Thrombopoietin Protects Against In Vitro and In Vivo Cardiotoxicity Induced by Doxorubicin. *Circulation* 113(18):2211–2220.
- Li T., Danelisen I., Bello-Klein A., Singal P.K. 2000. Effects of probucol on changes of antioxidant enzymes in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Cardiovasc. Res.* 46(3):523.
- Lim C.C., Zuppinger C., Guo X., Kuster G.M., Helmes M., Eppenberger H.M., Suter T.M., Liao R., Sawyer D.B. 2004. Anthracyclines induce calpain-dependent titin proteolysis and necrosis in cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 279(9):8290–8299.
- Link G., Tirosch 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(3):272–278.
- Liochev S.I. 1999. The mechanism of “Fenton-like” reactions and their importance for biological systems. A biologist’s view. *Met. Ions. Biol. Syst.* 361–36.
- Lipshultz S.E., Alvarez J.A., Scully R.E. 2008. Anthracycline associated cardiotoxicity in survivors of childhood cancer. *Heart* 94(4):525–533.
- Lipshultz S.E., Colan S.D., Gelber R.D., Perez-Atayde A.R., Sallan S.E., Sanders S.P. 1991. Late cardiac effects of doxorubicin therapy for acute lymphoblastic leukemia in childhood. *N. Engl. J. Med* 324(12):808–815.
- Lipshultz S.E., Rifai N., Dalton V.M., Levy D.E., Silverman L.B., Lipsitz S.R., Colan S.D., Asselin B.L., Barr R.D., Clavell L.A., others 2004. The effect of dexrazoxane on myocardial injury in doxorubicin-treated children with acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 351(2):145–153.
- Lipshultz S.E., Scully R.E., Lipsitz S.R., Sallan S.E., Silverman L.B., Miller T.L., Barry E.V., Asselin B.L., Athale U., Clavell L.A., Larsen E., Moghrabi A., Samson Y., Michon B., Schorin M.A., Cohen H.J., Neuberg D.S., Orav E.J., Colan S.D. 2010. Assessment of dexrazoxane as a cardioprotectant in doxorubicin-treated children with high-risk acute lymphoblastic leukaemia: long-term follow-up of a prospective, randomised, multicentre trial. *Lancet Oncol.* 11(10):950–961.
- Lopez M., Vici P., Di Lauro K., Conti F., Paoletti G., Ferraironi A., Sciuto R., Giannarelli D., Maini C.L. 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(1):86–92.
- Ludke A.R.L., Al-Shudiefat A.A.-R.S., Dhingra S., Jassal D.S., Singal P.K. 2009. A concise description of cardioprotective strategies in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 87(10):756–763.
- Luo X., Evrovsky Y., Cole D., Trines J., Benson L.N., Lehotay D.C. 1997. Doxorubicin-induced acute changes in cytotoxic aldehydes, antioxidant status and cardiac function in the rat. *Biochim. Biophys. Acta* 1360(1):45–52.
- Lyu Y.L., Kerrigan J.E., Lin C.-P., Azarova A.M., Tsai Y.-C., Ban Y., Liu L.F. 2007. Topoisomerase II β -Mediated DNA Double-Strand Breaks: Implications in Doxorubicin Cardiotoxicity and Prevention by Dexrazoxane. *Cancer Res.* 67(18):8839–8846.

- Maeda H., Wu J., Sawa T., Matsumura Y., Hori K. 2000. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J. Control. Release* 65(1-2):271–284.
- Malisza K.L., Hasinoff B.B. 1995a. Production of Hydroxyl Radical by Iron(III)-Anthraquinone Complexes through Self-Reduction and through Reductive Activation by the Xanthine Oxidase/Hypoxanthine System. *Arch. Biochem. Biophys.* 321(1):51–60.
- Malisza K.L., Hasinoff B.B. 1995b. Doxorubicin Reduces the Iron(III) Complexes of the Hydrolysis Products of the Antioxidant Cardioprotective Agent Dexrazoxane (ICRF-187) and Produces Hydroxyl Radicals. *Arch. Biochem. Biophys.* 316(2):680–688.
- Malisza K.L., Hasinoff B.B. 1996. Inhibition of anthracycline semiquinone formation by ICRF-187 (dexrazoxane) in cells. *Free Radic. Biol. Med.* 20(7):905–914.
- Mannervik B. 2001. Measurement of Glutathione Reductase Activity, in: Bus, J.S., Costa, L.G., Hodgson, E., Lawrence, D.A., Reed, D.J. (Eds.), *Curr. Protoc. Toxicol.* doi: 10.1002/0471140856.tx0702s00.
- Marechal X., Moutaigne D., Marciniak C., Marchetti P., Hassoun S.M., Beauvillain J.C., Lancel S., Neviere R. 2011. Doxorubicin-induced cardiac dysfunction is attenuated by ciclosporin treatment in mice through improvements in mitochondrial bioenergetics. *Clin. Sci.* 121(9):405–413.
- Martin E., Thougard A.V., Grauslund M., Jensen P.B., Bjorkling F., Hasinoff B.B., Tjørnelund J., Sehested M., Jensen L.H. 2009. Evaluation of the topoisomerase II-inactive bisdioxopiperazine ICRF-161 as a protectant against doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Toxicology* 255(1–2):72–79.
- Marty M., Espie M., Llombart A., Monnier A., Rapoport B.L., 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(4):614.
- Matsui H., Morishima I., Numaguchi Y., Toki Y., Okumura K., Hayakawa T. 1999. Protective effects of carvedilol against doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *Life Sciences* 65(12):1265–1274.
- Menna P., Paz O.G., Chello M., Covino E., Salvatorelli E., Minotti G. 2012. Anthracycline cardiotoxicity. *Expert Opinion on Drug Safety* 11 Suppl 1S21–36.
- Michelotti A., Venturini M., Tibaldi C., Bengala C., Gallo L., Carnino F., Mastro L.D., 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.* 59:133–139.
- Milei J., Boveris A., Llesuy S., Molina H.A., Storino R., Ortega D., Milei S.E. 1986. Amelioration of adriamycin-induced cardiotoxicity in rabbits by prenylamine and vitamins A and E. *Am. Heart J.* 111(1):95–102.
- Minotti G. 2010. *Cardiotoxicity of Non-Cardiovascular Drugs*, 1st ed. Padstow: John Wiley & Sons, 2010. ISBN: 9780470772744. doi: 10.1002/9780470660379
- Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., Gianni L. 2004. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev* 56(2):185–229.
- Miura T., Muraoka S., Ogiso T. 1994. Adriamycin-Fe(3+)-induced inactivation of rat heart mitochondrial creatine kinase: sensitivity to lipid peroxidation. *Biol. Pharm. Bull.* 17(9):1220–1223.
- Miyagawa K., Emoto N., Widyantoro B., Nakayama K., Yagi K., Rikitake Y., Suzuki T., Hirata K. 2010. Attenuation of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy by

- Endothelin-Converting Enzyme-1 Ablation Through Prevention of Mitochondrial Biogenesis Impairment. *Hypertension* 55(3):738–746.
- Moghrabi A., Levy D.E., Asselin B., Barr R., Clavell L., Hurwitz C., Samson Y., Schorin M., Dalton V.K., Lipshultz S.E., Neuberg D.S., Gelber R.D., Cohen H.J., Sallan S.E., Silverman L.B. 2007. Results of the Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium Protocol 95-01 for children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 109(3):896–904.
- Mojžišová G., Šarišský M., Mirossay L., Martinka P., Mojžiš J. 2009. Effect of Flavonoids on Daunorubicin-induced Toxicity in H9c2 Cardiomyoblasts. *Phytother. Res.* 23(1):136–139.
- Mouridsen H.T., Langer S.W., Buter J., Eidtmann H., Rosti G., De Wit M., Knoblauch P., Rasmussen A., Dahlström K., Jensen P.B., others 2007. Treatment of anthracycline extravasation with Savene (dexrazoxane): results from two prospective clinical multicentre studies. *Ann. Oncol.* 18(3):546.
- Mross K., Maessen P., van der Vijgh W.J., Gall H., Boven E., Pinedo H.M. 1988. Pharmacokinetics and metabolism of epidoxorubicin and doxorubicin in humans. *J. Clin. Oncol.* 6(3):517–526.
- Muindi J.R., Sinha B.K., Gianni L., Myers C.E. 1984. Hydroxyl radical production and DNA damage induced by anthracycline-iron complex. *FEBS letters* 172(2):226–230.
- Mukhopadhyay P., Rajesh M., Bátkai S., Patel V., Kashiwaya Y., Liaudet L., Evgenov O.V., Mackie K., Haskó G., Pacher P. 2010. CB1 cannabinoid receptors promote oxidative stress and cell death in murine models of doxorubicin-induced cardiomyopathy and in human cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* 85(4):773–784.
- Myers C. 1998. The role of iron in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Semin. Oncol.* 25(4 Suppl 10):10–14.
- 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(1 Suppl 1):53–55.
- Myers C.E., McGuire W., Young R. 1976. Adriamycin: amelioration of toxicity by alpha-tocopherol. *Cancer Treat. Rep.* 60(7):961–962.
- Nabeebaccus A., Zhang M., Shah A.M. 2011. NADPH oxidases and cardiac remodelling. *Heart. Fail. Rev.* 16(1):5–12.
- 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(3):249–255.
- Nagasawa K., Fumihara T., Ohnishi N., Yokoyama T. 1999. Contribution of the nucleoside transport system to doxorubicin transport in HL60 cells but not in mononuclear cells. *Jpn. J. Cancer Res.* 90(7):781–787.
- Nagasawa K., Nagai K., Ohnishi N., Yokoyama T., Fujimoto S. 2001. Contribution of specific transport systems to anthracycline transport in tumor and normal cells. *Curr. Drug Metab.* 2(4):355–366.
- 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(5):572–578.
- Nousiainen T., Vanninen E., Jantunen E., Remes J., Ritanen E., Vuolteenaho O., Hartikainen J. 2001. Neuroendocrine changes during the evolution of doxorubicin-induced left ventricular dysfunction in adult lymphoma patients. *Clin. Sci.* 101(6):601–607.

- O'Brien M.E.R., Wigler N., Inbar M., Rosso R., Grischke E., Santoro A., Catane R., Kieback D.G., Tomczak P., Ackland S.P., Orlandi F., Mellars L., Alland L., Tendler C. 2004. Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX/Doxil) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. *Ann. Oncol.* 15(3):440–449.
- Oeffinger K.C., Mertens A.C., Sklar C.A., Kawashima T., Hudson M.M., Meadows A.T., Friedman D.L., Marina N., Hobbie W., Kadan-Lottick N.S., others 2006. Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer. *N. Engl. J. Med.* 355(15):1572-1582.
- Ohkura K., Lee J.D., Shimizu H., Nakano A., Uzui H., Horikoshi M., Fujibayashi Y., Yonekura Y., Ueda T. 2003. Mitochondrial complex I activity is reduced in latent adriamycin-induced cardiomyopathy of rat. *Mol. Cell. Biochem.* 248(1):203–208.
- Oliveira P.J., Bjork J.A., Santos M.S., Leino R.L., Froberg M.K., Moreno A.J., Wallace K.B. 2004. Carvedilol-mediated antioxidant protection against doxorubicin-induced cardiac mitochondrial toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 200(2):159–168.
- Olson L.E., Bedja D., Alvey S.J., Cardounel A.J., Gabrielson K.L., Reeves R.H. 2003. Protection from doxorubicin-induced cardiac toxicity in mice with a null allele of carbonyl reductase 1. *Cancer Res.* 63(20):6602–6606.
- Olson R.D., Boerth R.C., Gerber J.G., Nies A.S. 1981. Mechanism of adriamycin cardiotoxicity: evidence for oxidative stress. *Life Sci.* 29(14):1393–1401.
- Olson R.D., Li X., Palade P., Shadle S.E., Mushlin P.S., Gambliel H.A., Fill M., Boucek R.J. Jr, Cusack B.J. 2000. Sarcoplasmic reticulum calcium release is stimulated and inhibited by daunorubicin and daunorubicinol. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 169(2):168–176.
- Onrust S.V., Lamb H.M. 1999. Valrubicin. *Drugs Aging* 15(1):69–75; discussion 76.
- Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L. 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* 87(1):315-424.
- Pai V.B., Nahata M.C. 2000. Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents: incidence, treatment and prevention. *Drug Saf.* 22(4):263–302.
- Pan S.S., Bachur N.R. 1980. Xanthine oxidase catalyzed reductive cleavage of anthracycline antibiotics and free radical formation. *Mol. Pharmacol.* 17(1):95–99.
- Park I.Y., Kim E.J., Park H., Fields K., Dunker A.K., Kang C. 2005. Interaction between cardiac calsequestrin and drugs with known cardiotoxicity. *Mol. Pharmacol.* 67(1):97–104.
- Peers C., Steele D.S. 2011. Carbon monoxide: A vital signalling molecule and potent toxin in the myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 52(2):359-65.
- Perletti G., Monti E., Paracchini L., Piccinini F. 1989. Effect of trimetazidine on early and delayed doxorubicin myocardial toxicity. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 302:280–289.
- Pessah I.N., Durie E.L., Schiedt M.J., Zimanyi I. 1990. Anthraquinone-sensitized Ca²⁺ release channel from rat cardiac sarcoplasmic reticulum: possible receptor-mediated mechanism of doxorubicin cardiomyopathy. *Mol. Pharmacol.* 37(4):503–514.
- Pfaffl M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29(9):e45.
- Piekarski M., Jelińska A. 2013. Anthracyclines still prove effective in anticancer therapy. *Mini Rev. Med. Chem.* 13(5):627–634.
- Pigram W.J., Fuller W., Hamilton L.D. 1972. Stereochemistry of intercalation: interaction of daunomycin with DNA. *Nat. New Biol.* 235(53):17–19.

- Pilz J., Meineke I., Gleiter C.H. 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(2):315–325.
- Piquereau J., Caffin F., Novotova M., Lemaire C., Veksler V., Garnier A., Ventura-Clapier R., Joubert F. 2013. Mitochondrial dynamics in the adult cardiomyocytes: which roles for a highly specialized cell? *Front. Physiol.* 4:102. doi: 10.3389/fphys.2013.00102
- Pollakis G., Goormaghtigh E., Delmelle M., Lion Y., Ruyschaert J.M. 1984. Adriamycin and derivatives interaction with the mitochondrial membrane: O₂ consumption and free radicals formation. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 44(3):445–459.
- Popelová O., Štěrbá M., Hašková P., Šimůnek T., Hroch M., Gunčová I., Nachtigal P., Adamcová M., Geršl V., Mazurová Y. 2009. Dexrazoxane-afforded protection against chronic anthracycline cardiotoxicity in vivo: effective rescue of cardiomyocytes from apoptotic cell death. *Br. J. Cancer* 101(5):792–802.
- Popelová O., Štěrbá M., Šimůnek T., Mazurová Y., Gunčová I., Hroch M., Adamcová M., Geršl V. 2008. Deferiprone Does Not Protect against Chronic Anthracycline Cardiotoxicity in Vivo. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 326(1):259–269.
- Poster D.S., Penta J., Marsoni S., Bruno S., Macdonald J.S. 1980. Bis-diketopiperazine derivatives in clinical oncology: ICRF-159. *Cancer Clin Trials* 3(4):315–320.
- Psotová J., Chlopcíková S., Miketová P., Hrbáč J., Simánek V. 2004. Chemoprotective effect of plant phenolics against anthracycline-induced toxicity on rat cardiomyocytes. Part III. Apigenin, baicalein, kaempferol, luteolin and quercetin. *Phytother Res* 18(7):516–521.
- Rajagopalan S., Politi P.M., Sinha B.K., Myers C.E. 1988. Adriamycin-induced free radical formation in the perfused rat heart: implications for cardiotoxicity. *Cancer Res.* 48(17):4766–4769.
- Ranek M.J., Wang X. 2009. Activation of the ubiquitin-proteasome system in doxorubicin cardiomyopathy. *Curr. Hypertens. Rep.* 11(6):389–395.
- Regev R., Yeheskely-Hayon D., Katzir H., Eytan G.D. 2005. Transport of anthracyclines and mitoxantrone across membranes by a flip-flop mechanism. *Biochem. Pharmacol.* 70(1):161–169.
- Rimbaud S., Sanchez H., Garnier A., Fortin D., Bigard X., Veksler V., Ventura-Clapier R. 2009. Stimulus specific changes of energy metabolism in hypertrophied heart. *J. Mol. Cell. Cardiol* 46(6):952–959.
- Robert J., Gianni L. 1993. Pharmacokinetics and metabolism of anthracyclines. *Cancer Surv.* 17:219–252.
- Rubin E.H., de Alwis D.P., Pouliquen I., Green L., Marder P., Lin Y., Musanti R., Grospe S.L., Smith S.L., Toppmeyer D.L., Much J., Kane M., Chaudhary A., Jordan C., Burgess M., Slapak C.A. 2002. A phase I trial of a potent P-glycoprotein inhibitor, Zosuquidar.3HCl trihydrochloride (LY335979), administered orally in combination with doxorubicin in patients with advanced malignancies. *Clin. Cancer Res.* 8(12):3710–3717.
- Saad S.Y., Najjar T.A., Al-Rikabi A.C. 2001. The preventive role of deferoxamine against acute doxorubicin-induced cardiac, renal and hepatic toxicity in rats. *Pharmacological Research* 43(3):211–218.
- Sadzuka Y., Sugiyama T., Shimoi K., Kinae N., Hirota S. 1997. Protective effect of flavonoids on doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicology Letters* 92(1):1–7.

- Sardão V.A., Oliveira P.J., Holy J., Oliveira C.R., Wallace K.B. 2008. Morphological alterations induced by doxorubicin on H9c2 myoblasts: nuclear, mitochondrial, and cytoskeletal targets. *Cell Biology and Toxicology* 25(3):227–243.
- Sasaki T., Ueno S., Hara Y., Uchida T., Temma K. 2010. Antimuscarinic action of doxorubicin does not involve free-radical formation in isolated guinea pig hearts. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 88(1):77–81.
- Sawyer D.B. 2013. Anthracyclines and heart failure. *N. Engl. J. Med.* 368(12):1154–1156.
- Sawyer D.B., Fukazawa R., Arstall M.A., Kelly R.A. 1999. Daunorubicin-induced apoptosis in rat cardiac myocytes is inhibited by dexrazoxane. *Circulation research* 84(3):257.
- Scully R.E., Lipshultz S.E. 2007. Anthracycline cardiotoxicity in long-term survivors of childhood cancer. *Cardiovasc. Toxicol* 7(2):122–128.
- Seymour L., Bramwell V., Moran L.A. 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(2):145–159.
- Seymour L.W., Ferry D.R., Kerr D.J., Rea D., Whitlock M., Poyner R., Boivin C., Hesslewood S., Twelves C., Blackie R., Schatzlein A., Jodrell D., Bissett D., Calvert H., Lind M., Robbins A., Burtles S., Duncan R., Cassidy J. 2009. Phase II studies of polymer-doxorubicin (PK1, FCE28068) in the treatment of breast, lung and colorectal cancer. *Int. J. Oncol.* 34(6):1629–1636.
- Sgobbo P., Pacelli C., Grattagliano I., Villani G., Cocco T. 2007. Carvedilol inhibits mitochondrial complex I and induces resistance to H₂O₂ -mediated oxidative insult in H9C2 myocardial cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1767(3):222–232.
- Shankar S.M., Marina N., Hudson M.M., Hodgson D.C., Adams M.J., Landier W., Bhatia S., Meeske K., Chen M.H., Kinahan K.E., Steinberger J., Rosenthal D. 2008. Monitoring for cardiovascular disease in survivors of childhood cancer: report from the Cardiovascular Disease Task Force of the Children's Oncology Group. *Pediatrics* 121(2):e387–396.
- Schiavetti A., Castello M.A., Versacci P., Varrasso G., Padula A., Ventriglia F., Werner B., Colloridi V. 1997. Use of ICRF-187 for prevention of anthracycline cardiotoxicity in children: preliminary results. *Pediatr Hematol Oncol* 14(3):213–222.
- Schroeder P.E., Davidson J.N., Hasinoff B.B. 2002. Dihydroorotase catalyzes the ring opening of the hydrolysis intermediates of the cardioprotective drug dexrazoxane (ICRF-187). *Drug Metab. Dispos.* 30(12):1431–1435.
- Singh R.B., Chohan P.K., Dhalla N.S., Netticadan T. 2004. The sarcoplasmic reticulum proteins are targets for calpain action in the ischemic-reperfused heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 37(1):101–110.
- Sirova M., Kabesova M., Kovar L., Etrych T., Strohalm J., Ulbrich K., Rihova B. 2013. HEMA Copolymer-Bound Doxorubicin Induces Immunogenic Tumor Cell Death. *Curr. Med. Chem.* .
- Siveski-Iliskovic N., Hill M., Chow D.A., Singal P.K. 1995. Probucol protects against adriamycin cardiomyopathy without interfering with its antitumor effect. *Circulation* 91(1):10.
- Siveski-Iliskovic N., Kaul N., Singal P.K. 1994. Probucol promotes endogenous antioxidants and provides protection against adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Circulation* 89(6):2829–2835.
- Skovsgaard T., Nissen N.I. 1982. Membrane transport of anthracyclines. *Pharmacol. Ther.* 18(3):293–311.

- Sokolove P.M., Shinaberry R.G. 1988. Na⁺-independent release of Ca²⁺ from rat heart mitochondria. Induction by adriamycin aglycone. *Biochem. Pharmacol.* 37(5):803–812.
- Solaini G., Ronca G., Bertelli A. 1985. Studies on the effects of anthracyclines on mitochondrial respiration in vitro. *Drugs Exp Clin Res* 11(2):115–121.
- Solass W., Kerb R., Mürdter T., Giger-Pabst U., Strumberg D., Tempfer C., Zieren J., Schwab M., Reymond M.A. 2013. Intraperitoneal Chemotherapy of Peritoneal Carcinomatosis Using Pressurized Aerosol as an Alternative to Liquid Solution: First Evidence for Efficacy. *Ann. Surg. Oncol.* .
- Solem L.E., Henry T.R., Wallace K.B. 1994. Disruption of Mitochondrial Calcium Homeostasis Following Chronic Doxorubicin Administration. *Toxicology and Applied Pharmacology* 129(2):214–222.
- Solem L.E., Wallace K.B. 1993. Selective Activation of the Sodium-Independent, Cyclosporine A-Sensitive Calcium Pore of Cardiac Mitochondria by Doxorubicin. *Toxicology and Applied Pharmacology* 121(1):50–57.
- Spagnuolo R.D., Recalcati S., Tacchini L., Cairo G. 2011. Role of hypoxia-inducible factors in the dexrazoxane-mediated protection of cardiomyocytes from doxorubicin-induced toxicity. *Br. J. Pharmacol.* 163(2):299–312.
- Spallarossa P., Garibaldi S., Altieri P., Fabbi P., Manca V., Nasti S., Rossettin P., Ghigliotti G., Ballestrero A., Patrone F., Barsotti A., Brunelli C. 2004. Carvedilol prevents doxorubicin-induced free radical release and apoptosis in cardiomyocytes in vitro. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 37(4):837–846.
- Sparano J.A., Speyer J., Gradishar W.J., Liebes L., Sridhara R., Mendoza S., Fry D., Egorin M.J. 1999. Phase I trial of escalating doses of paclitaxel plus doxorubicin and dexrazoxane in patients with advanced breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 17(3):880–886.
- SPC Adriblastina. Státní ústav pro kontrolu léčiv [databáze online]. Poslední rev.: 4. 11. 2009. [cit.: 9. 10. 2013] Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0042271&tab=texts>
- SPC Cardioxane. Státní ústav pro kontrolu léčiv [databáze online]. Poslední rev.: 18. 4. 2012. [cit.: 9. 10. 2013] Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0021908&tab=texts>
- SPC Daunoblastina. ADC číselník [databáze online]. Poslední rev.: listopad 2006. [cit.: 9. 10. 2013] Dostupné z: <http://www.adcc.sk/web/humane-lieky/spc/daunoblastina-spc-5105.html>
- SPC Daunoxome. DataPharm [databáze online]. Poslední rev.: 14. 3. 2013. [cit.: 9. 10. 2013] Dostupné z: <http://www.medicines.org.uk/emc/medicine/27507/SPC/DaunoXome+Injection+2mg+ml+Concentrate+for+Solution+for+Infusion/>
- SPC Farmorubicin. Státní ústav pro kontrolu léčiv [databáze online]. Poslední rev.: 9. 12. 2009. [cit.: 9. 10. 2013] Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0040124>
- SPC Novantrone. U. S. Food and Drug Administration [databáze online]. Poslední rev.: březen 2012. [cit.: 9. 10. 2013] Dostupné z: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/019297s035lbl.pdf
- SPC Valstar. U. S. Food and Drug Administration [databáze online]. Poslední rev.: srpen 2011. [cit.: 9. 10. 2013] Dostupné z: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/020892s013lbl.pdf
- SPC Zavedos. Státní ústav pro kontrolu léčiv [databáze online]. Poslední rev.: 8. 8. 2012. [cit.: 9. 10. 2013] Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0001181&tab=texts>

- Speyer J.L., Green M.D., Zeleniuch-Jacquotte A., Wernz J.C., Rey M., Sanger J., Kramer E., Ferrans V., Hochster H., Meyers M. 1992. ICRF-187 permits longer treatment with doxorubicin in women with breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 10(1):117–127.
- Suter T.M., Ewer M.S. 2013. Cancer drugs and the heart: importance and management. *Eur. Heart J.* 34(15):1102–1111.
- Swain S.M., Vici P. 2004. The current and future role of dexrazoxane as a cardioprotectant in anthracycline treatment: expert panel review. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 130(1):1–7.
- Swain S.M., Whaley F.S., Gerber M.C., Ewer M.S., Bianchine J.R., Gams R.A. 1997a. Delayed administration of dexrazoxane provides cardioprotection for patients with advanced breast cancer treated with doxorubicin-containing therapy. *J. Clin. Oncol.* 15(4):1333–1340.
- Swain S.M., Whaley F.S., Gerber M.C., Weisberg S., York M., Spicer D., Jones S.E., Wadler S., Desai A., Vogel C., Speyer J., Mittelman A., Reddy S., Pendergrass K., Velez-Garcia E., Ewer M.S., Bianchine J.R., Gams R.A. 1997b. Cardioprotection with dexrazoxane for doxorubicin-containing therapy in advanced breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 15(4):1318–1332.
- Szegezdi E., Fitzgerald U., Samali A. 2003. Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1010:186–194.
- Šimůnek T., Klimtová I., Kaplanová J., Mazurová Y., Adamcová M., Štěrba M., Hrdina R., Geršl 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(4):377–387.
- Šimůnek T., Klimtová I., Kaplanová J., Štěrba M., Mazurová Y., Adamcová M., Hrdina R., Geršl V., Poňka P. 2005. Study of daunorubicin cardiotoxicity prevention with pyridoxal isonicotinoyl hydrazone in rabbits. *Pharmacological research* 51(3):223–231.
- Šimůnek T., Štěrba M., Popelová O., Adamcová M., Hrdina R., Geršl V. 2009. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Rep* 61(1):154–171.
- Šimůnek T., Štěrba M., Popelová O., Kaiserová H., Adamcová M., Hroch M., Hašková P., Poňka P., Geršl V. 2008. Anthracycline toxicity to cardiomyocytes or cancer cells is differently affected by iron chelation with salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone. *British Journal of Pharmacology* 155(1):138–148.
- Štěrba M., Popelová O., Lenčo J., Fučíková A., Brčáková E., Mazurová Y., Jirkovský E., Šimůnek T., Adamcová M., Mičuda S., Stulík J., Geršl V. 2011. Proteomic insights into chronic anthracycline cardiotoxicity. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 50(5):849–862.
- Štěrba M., Popelová O., Šimůnek T., Mazurová Y., Potáčová A., Adamcová M., Gunčová I., Kaiserová H., Palička V., Poňka P. 2007. Iron chelation-afforded cardioprotection against chronic anthracycline cardiotoxicity: a study of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH). *Toxicology* 235(3):150–166.
- Štěrba M., Popelová O., Šimůnek T., Mazurová Y., Potáčová A., Adamcová M., Kaiserová H., Poňka P., Geršl V. 2006. Cardioprotective Effects of a Novel Iron Chelator, Pyridoxal 2-Chlorobenzoyl Hydrazone, in the Rabbit Model of Daunorubicin-Induced Cardiotoxicity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 319(3):1336–1347.
- Štěrba M., Popelová O., Vávrová A., Jirkovský E., Kovaříková P., Geršl V., Šimůnek T. 2013. Oxidative stress, redox signaling, and metal chelation in anthracycline cardiotoxicity and pharmacological cardioprotection. *Antioxid. Redox Signal.* 18(8):899–929.

- Tallarico D., Rizzo V., di Maio F., Petretto F., Bianco G., Placanica G., Marziali M., Paravati V., Gueli N., Meloni F., Campbell S.V. 2003. Myocardial Cytoprotection by Trimetazidine Against Anthracycline-Induced Cardiotoxicity in Anticancer Chemotherapy. *Angiology* 54(2):219–227.
- Tan C., Tasaka H., Yu K.P., Murphy M.L., Karnofsky D.A. 1967. Daunomycin, an antitumor antibiotic, in the treatment of neoplastic disease. Clinical evaluation with special reference to childhood leukemia. *Cancer* 20(3):333–353.
- Tanabe K., Ikegami Y., Ishida R., Andoh T. 1991. Inhibition of topoisomerase II by antitumor agents bis(2,6-dioxopiperazine) derivatives. *Cancer Res.* 51(18):4903–4908.
- Taylor P.R.A., White J.M., Prescott R.J., Angus B., Galloway M.J., Jackson G.H., Lessells A.M., Lucraft H.H., Summerfield G.P., Proctor S.J., Scotland And Newcastle Lymphoma Group 2006. The addition of oral idarubicin to a chlorambucil/dexamethasone combination has a significant impact on time to treatment failure but none on overall survival in patients with low grade non-Hodgkin's lymphoma: Results of the Scotland and Newcastle Lymphoma Group randomized NHL VIII trial. *Leuk. Lymphoma* 47(11):2321–2330.
- Tebbi C.K., London W.B., Friedman D., Villaluna D., De Alarcon P.A., Constone L.S., Mendenhall N.P., Sposto R., Chauvenet A., Schwartz C.L. 2007. Dexrazoxane-associated risk for acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome and other secondary malignancies in pediatric Hodgkin's disease. *J. Clin. Oncol.* 25(5):493–500.
- 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(1):63–69.
- Tesoriere L., Ciaccio M., Valenza M., Bongiorno A., Maresi E., Albiero R., Livrea M.A. 1994. Effect of vitamin A administration on resistance of rat heart against doxorubicin-induced cardiotoxicity and lethality. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 269(1):430–436.
- Thomas C., Vile G.F., Winterbourn C.C. 1993. The hydrolysis product of ICRF-187 promotes iron-catalysed hydroxyl radical production via the Fenton reaction. *Biochem. Pharmacol.* 45(10):1967–1972.
- Thomas C.E., Aust S.D. 1986. Release of iron from ferritin by cardiotoxic anthracycline antibiotics. *Arch. Biochem. Biophys.* 248(2):684–689.
- Thompson K.L., Rosenzweig B.A., Zhang J., Knapton A.D., Honchel R., Lipshultz S.E., Retief J., Sistare F.D., Herman E.H. 2010. Early alterations in heart gene expression profiles associated with doxorubicin cardiotoxicity in rats. *Cancer Chemother. Pharmacol* 66(2):303–314.
- 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(11):1276–1284.
- Tokarska-Schlattner M., Zaugg M., Zuppinger C., Wallimann T., Schlattner U. 2006. New insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: the critical role of cellular energetics. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 41(3):389–405.
- Triantafyllou A., Liakos P., Tsakalof A., Georgatsou E., Simos G., Bonanou S. 2006. Cobalt induces hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) in HeLa cells by an iron-independent, but ROS-, PI-3K- and MAPK-dependent mechanism. *Free Radic. Res.* 40(8):847–856.
- Trifilio S., Zhou Z., Mehta J., Czerniak C., Pi J., Greenberg D., Koslosky M., Pantiru M., Altman J. 2013. Idarubicin appears equivalent to dose-intense daunorubicin for

- remission induction in patients with acute myeloid leukemia. *Leuk. Res.* 37(8):868–871.
- Twelves C.J., Dobbs N.A., Gillies H.C., James C.A., Rubens R.D., Harper P.G. 1998. Doxorubicin pharmacokinetics: the effect of abnormal liver biochemistry tests. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 42(3):229–234.
- Ueno M., Kakinuma Y., Yuhki K., Murakoshi N., Iemitsu M., Miyauchi T., Yamaguchi I. 2006. Doxorubicin induces apoptosis by activation of caspase-3 in cultured cardiomyocytes in vitro and rat cardiac ventricles in vivo. *J. Pharmacol. Sci.* 101(2):151–158.
- Unger C., Häring B., Medinger M., Drevs J., Steinbild S., Kratz F., Mross K. 2007. Phase I and pharmacokinetic study of the (6-maleimidocaproyl)hydrazone derivative of doxorubicin. *Clin. Cancer Res.* 13(16):4858–4866.
- Unverferth D.V., Magorien R.D., Unverferth B.P., Talley R.L., Balcerzak S.P., Baba N. 1981. Human myocardial morphologic and functional changes in the first 24 hours after doxorubicin administration. *Cancer Treat Rep* 65(11-12):1093–1097.
- Van Acker F.A., van Acker S.A., Haenen G.R., Bast A., van der Vijgh W.J. 2000. In vitro screening of antitumour agents for cardiotoxicity by means of isolated mouse left atria. *Anticancer Res.* 20(6B):4483–4487.
- Van Acker F.A., Hulshof J.W., Haenen G.R.M., Menge W.M.P., van der Vijgh W.J., Bast A. 2001. New synthetic flavonoids as potent protectors against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Free Radical Biology and Medicine* 31(1):31–37.
- Van Dalen E.C., Caron H.N., Dickinson H.O., Kremer L.C. 2011. Cardioprotective interventions for cancer patients receiving anthracyclines. *Cochrane Database Syst Rev* (6):CD003917.
- Van Dalen E.C., Michiels E.M., Caron H.N., Kremer L.C. 2010. Different anthracycline derivatives for reducing cardiotoxicity in cancer patients. *Cochrane Database Syst Rev* (5):CD005006.
- Van Dalen E.C., van den Brug M., Caron H.N., Kremer L.C.M. 2006. Anthracycline-induced cardiotoxicity: Comparison of recommendations for monitoring cardiac function during therapy in paediatric oncology trials. *European Journal of Cancer* 42(18):3199–3205.
- Van Vleet J.F., Ferrans V.J. 1980a. Clinical and pathologic features of chronic adriamycin toxicosis in rabbits. *Am. J. Vet. Res.* 41(9):1462–1469.
- Van Vleet J.F., Ferrans V.J. 1980b. Clinical observations, cutaneous lesions, and hematologic alterations in chronic adriamycin intoxication in dogs with and without vitamin E and selenium supplementation. *Am. J. Vet. Res.* 41(5):691–699.
- Van Vleet J.F., Ferrans V.J., Weirich W.E. 1980. Cardiac disease induced by chronic adriamycin administration in dogs and an evaluation of vitamin E and selenium as cardioprotectants. *Am J Pathol* 99(1):13–42.
- Vávrová A., Popelová O., Štěrbá M., Jirkovský E., Hašková P., Mertlíková-Kaiserová H., Geršl V., Šimůnek T. 2011. In vivo and in vitro assessment of the role of glutathione antioxidant system in anthracycline-induced cardiotoxicity. *Arch. Toxicol* 85(5):525–535.
- Venkatesan N. 1998. Curcumin attenuation of acute adriamycin myocardial toxicity in rats. *Br J Pharmacol* 124(3):425–427.
- Ventura-Clapier R., Garnier A., Veksler V. 2008. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1 α . *Cardiovascular Research* 79(2):208–217.
- Ventura-Clapier R., Garnier A., Veksler V., Joubert F. 2011. Bioenergetics of the failing heart. *Biochim. Biophys. Acta* 1813(7):1360–1372.

- Venturini M., Michelotti A., Del Mastro L., Gallo L., Carnino F., Garrone O., Tibaldi C., Molea N., Bellina R.C., Pronzato P., Cyrus P., Vinke J., Testore F., Guelfi M., Lionetto R., Bruzzi P., Conte P.F., 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(12):3112–3120.
- Visscher H., Ross C.J.D., Rassekh S.R., Barhdadi A., Dubé M.-P., Al-Saloos H., Sandor G.S., Caron H.N., Dalen E.C. van, Kremer L.C., Pal H.J. van der, Brown A.M.K., Rogers P.C., Phillips M.S., Rieder M.J., Carleton B.C., Hayden M.R. 2012. Pharmacogenomic Prediction of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity in Children. *JCO* 30(13):1422–1428.
- Von Hoff D.D., Layard M.W., Basa P., Davis H.L. Jr, Von Hoff A.L., Rozenzweig M., Muggia F.M. 1979. Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. *Ann. Intern. Med* 91(5):710–717.
- Vyzula R. 2013. *Modrá kniha České onkologické společnosti*. 17th ed.. Brno: Masarykův onkologický ústav, 2013. ISBN: 9788086793269
- Walker D.M.. Dexrazoxane exposure and risk of secondary acute myeloid leukemia in pediatric cancer patients. [konference online] In *2012 ASCO Annual Meeting. Virtual Meeting: Oral Abstract Session: Cancer Prevention/Epidemiology Track*. [cit. 9. 10. 2013] Abstract no.: 1504. Dostupné z: <http://meetinglibrary.asco.org/content/71330>
- Walker D.M., Fisher B.T., Seif A.E., Huang Y.-S.V., Torp K., Li Y., Aplenc R. 2013. Dexrazoxane use in pediatric patients with acute lymphoblastic or myeloid leukemia from 1999 and 2009: analysis of a national cohort of patients in the Pediatric Health Information Systems database. *Pediatr Blood Cancer* 60(4):616–620.
- Wallace K.B. 2003. Doxorubicin-induced cardiac mitochondrionopathy. *Pharmacology & toxicology* 93(3):105–115.
- Wallace K.B. 2007. Adriamycin-induced interference with cardiac mitochondrial calcium homeostasis. *Cardiovasc Toxicol* 7(2):101–107.
- Wang J.C. 1998. Moving one DNA double helix through another by a type II DNA topoisomerase: the story of a simple molecular machine. *Q. Rev. Biophys.* 31(2):107–144.
- Wang J.C. 2002. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3(6):430–440.
- Wang Y.M., Madanat F.F., Kimball J.C., Gleiser C.A., Ali M.K., Kaufman M.W., van Eys J. 1980. Effect of vitamin E against adriamycin-induced toxicity in rabbits. *Cancer Res.* 40(4):1022–1027.
- Watanabe M., Tsutsui K., Tsutsui K., Inoue Y. 1994. Differential expressions of the topoisomerase II alpha and II beta mRNAs in developing rat brain. *Neurosci. Res.* 19(1):51–57.
- Wexler L.H., Andrich M.P., Venzon D., Berg S.L., Weaver-McClure L., Chen C.C., Dilsizian V., Avila N., Jarosinski P., Balis F.M., Poplack D.G., Horowitz M.E. 1996. Randomized trial of the cardioprotective agent ICRF-187 in pediatric sarcoma patients treated with doxorubicin. *J. Clin. Oncol.* 14(2):362–372.
- Wiseman L.R., Spencer C.M. 1998. Dexrazoxane. A review of its use as a cardioprotective agent in patients receiving anthracycline-based chemotherapy. *Drugs* 56(3):385–403.
- Wojnowski L., Kulle B., Schirmer M., Schlüter G., Schmidt A., Rosenberger A., Vonhof S., Bickeböller H., Toliat M.R., Suk E.-K., Tzvetkov M., Kruger A., Seifert S.,

- Kloess M., Hahn H., Loeffler M., Nürnberg P., Pfreundschuh M., Trümper L., Brockmöller J., Hasenfuss G. 2005. NAD(P)H oxidase and multidrug resistance protein genetic polymorphisms are associated with doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Circulation* 112(24):3754–3762.
- Wu X., Hasinoff B.B. 2005. The antitumor anthracyclines doxorubicin and daunorubicin do not inhibit cell growth through the formation of iron-mediated reactive oxygen species. *Anticancer Drugs* 16(1):93–99.
- Xu L., Jin L., Pan H., Zhang A., Wei G., Li P., Lu W. 2006. Deferiprone protects the isolated atria from cardiotoxicity induced by doxorubicin. *Acta Pharmacol Sin* 27(10):1333–1339.
- Xu X., Persson H.L., Richardson D.R. 2005. Molecular pharmacology of the interaction of anthracyclines with iron. *Molecular pharmacology* 68(2):261.
- 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(6):881–889.
- Yoda Y., Nakazawa M., Abe T., Kawakami Z. 1986. Prevention of doxorubicin myocardial toxicity in mice by reduced glutathione. *Cancer Res.* 46(5):2551.
- Zerra P., Cochran T.R., Franco V.I., Lipshultz S.E. 2013. An expert opinion on pharmacologic approaches to reducing the cardiotoxicity of childhood acute lymphoblastic leukemia therapies. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 14(11):1497–1513.
- Zhang S., Liu X., Bawa-Khalfe T., Lu L.-S., Lyu Y.L., Liu L.F., Yeh E.T.H. 2012. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat. Med.* 18(11):1639–1642.
- Zhao Y., McLaughlin D., Robinson E., Harvey A.P., Hookham M.B., Shah A.M., McDermott B.J., Grieve D.J. 2010. Nox2 NADPH Oxidase Promotes Pathologic Cardiac Remodeling Associated with Doxorubicin Chemotherapy. *Cancer Res* 70(22):9287–9297.
- Zhu S.-G., Kukreja R.C., Das A., Chen Q., Lesnefsky E.J., Xi L. 2011. Dietary nitrate supplementation protects against Doxorubicin-induced cardiomyopathy by improving mitochondrial function. *J. Am. Coll. Cardiol* 57(21):2181–2189.

10 PŘÍLOHA I
SEZNAM ODBORNÝCH PUBLIKACÍ

Seznam odborných publikací

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

- **Jirkovský E**, Popelová O, Křiváková-Staňková P, Vávrová A, Hroch M, Hašková P, Brčáková-Doleželová E, Mičuda S, Adamcová M, Šimůnek T, Červinková Z, Geršl V, Štěrba M. Chronic anthracycline cardiotoxicity: molecular and functional analysis with focus on nuclear factor erythroid 2-related factor 2 and mitochondrial biogenesis pathways. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012 Nov;343(2):468-78. **IF = 3,891**
- **Jirkovský E**, Lenčová-Popelová O, Hroch M, Adamcová M, Mazurová Y, Vávrová J, Mičuda S, Šimůnek T, Geršl V and Štěrba M. Early and delayed cardioprotective intervention with dexrazoxane show different potential for prevention of chronic anthracycline cardiotoxicity and reveal molecular events involved. *Toxicology*. 2013 Sep 15;311(3):191-204. **IF = 4,017**
- Bendová P, Macková E, Hašková P, Vávrová A, **Jirkovský E**, Štěrba M, Popelová O, Kalinowski DS, Kovaříková P, Vávrová K, Richardson DR, Šimůnek T. Comparison of Clinically Used and Experimental Iron Chelators for Protection against Oxidative Stress-Induced Cellular Injury. *Chem Res Toxicol*. 2010 Jun 21;23(6):1105-14. **IF = 4,140**
- Nachtigal P, Štěrba M, Popelová O, Večeřová L, Kudláčková Z, **Jirkovský E**, Geršl V. Daunorubicin does not induce immunohistochemically detectable endothelial dysfunction in rabbit aorta and femoral artery. *Histol Histopathol*. 2011 May;26(5):551-62. **IF = 2,502**
- Vávrová A, Popelová O, Štěrba M, **Jirkovský E**, Hašková P, Kaiserová H, Geršl V, Šimůnek T. In vivo and in vitro assessment of the role of glutathione antioxidant system in anthracycline-induced cardiotoxicity. *Arch Toxicol*. 2011 May;85(5):525-35. **IF = 4,041**
- Štěrba M, Popelová O, Lenčo J, Fučíková A, Brčáková E, Mazurová Y, **Jirkovský E**, Šimůnek T, Adamcová M, Mičuda S, Stulík J, Geršl V. Proteomic insights into chronic anthracycline cardiotoxicity. *J Mol Cell Cardiol*. 2011 Jan 31. 50(5):849-62. **IF = 5,166**

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

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

11 PŘÍLOHA II

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

12 PŘÍLOHA III

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