
Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové
Ústav farmakologie

**ANTRACYKLINOVÁ KARDIOTOXICITA A
POTENCIÁLNĚ KARDIOPROTEKTIVNÍ ÚČINKY
LÁTEK CHELATUJÍCÍCH ŽELEZO**

Dizertační práce

Mgr. Martin Štěrba

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

Hradec Králové
2007

Poděkování

- **Prof. MUDr. Vladimíru Geršlovi, CSc.**, za odborné vedení v průběhu celého doktorského studia, za možnost pracovat ve výborném kolektivu sdružující odborníky z různých oborů a v neposlední řadě za cenné rady a připomínky při přípravě této práce.
- **PharmDr. Tomáši Šimůnkovi, PhD., Mgr. Olze Popelové, Ludmile Latýnové, Doc. MUDr. Yvoně Mazurové CSc., Doc. MUDr. Michaele Adamcové, PhD., PharmDr. Petře Kovařikové, PhD., PharmDr. Kateřině Vávrové, PhD., Mgr. Anně Potáčové, Prof. MUDr. Přemyslu Poňkovi, CSc., Mgr. Magdaléně Holečkové, Ing. Jaroslavu Chládkovi, PhD., prof. MUDr. Jiřině Martínkové, CSc. a dalším spolupracovníkům a kolegům** za výbornou odbornou spolupráci a pomoc při řešení jednotlivých výzkumných úkolů.
- **Pracovnímu kolektivu Ústavu farmakologie** za všestrannou pomoc a příjemnou atmosféru v průběhu celého studia.
- **Rodině a přátelům** za podporu v průběhu celého studia.

Martin Štěrba

Tato dizertační práce vznikla za podpory Výzkumného projektu MSM0021620820 a Grantové agentury České republiky (projekt GAČR 305/03/1511)

Obsah

I. Úvod	7
1. Antracyklinové antineoplastické látky.....	8
2. Antracyklinová kardiotoxicita.....	11
3. Možnosti omezení antracyklinové kardiotoxicity.....	22
4. Farmakologická kardioprotekce vůči antracyklinové kardiotoxicitě.....	24
5. Nové chelátory železa - pyridoxal isonikotinoyl hydrazon (PIH) a jeho analoga.....	37
II. Cíle práce	48
III. Přehled použitých metodik	50
IV. Výsledky	55
1. Antracyklinová kardiotoxicita – možnosti časné detekce na experimentálním modelu.	56
2. Zastoupení vybraných kovových prvků v myokardu s experimentálně navozenou antracyklinovou kardiomyopatií a vliv chelatačního kardioprotektiva (dexrazoxanu).....	57
3. Nový aroylhydrazonový chelátor železa pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazon (o-108) – bezpečnost a potenciální toxicita opakovaného podání látky.....	58
4. Pilotní studium farmakokinetiky aroylhydrazonových chelátorů železa SIH a o-108.....	59
5. Kardioprotektivní účinky aroylhydrazonových chelátorů železa pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazonu (o-108) a salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazonu (SIH) na modelu chronické antracyklinové kardiotoxicity u králíka.....	60
V. Diskuze	65
VI. Závěr	92
VII. Souhrn	95
VIII. Summary	98
IX. Literatura	101
X. Přehled publikační činnosti	126
XI. Přílohy (komentované publikace)	134

Příloha 1: Early detection of anthracycline cardiotoxicity in a rabbit model: left ventricle filling pattern versus troponin T determination.

Příloha 2: Myocardial content of selected elements in experimental anthracycline-induced cardiomyopathy in rabbits.

Příloha 3: Safety and tolerability of repeated administration of pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone in rabbits.

Příloha 4: HPLC determination of a novel aroylhydrazone iron chelator (o-108) in rabbit plasma and its application to a pilot pharmacokinetic study.

- Příloha 5:** Development of high-performance liquid chromatographic determination of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone in rabbit plasma and application of this method to an *in vivo* study.
- Příloha 6:** Cardioprotective effects of a novel iron chelator, pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone, in the rabbit model of daunorubicin-induced cardiotoxicity.
- Příloha 7:** Iron chelator-afforded cardioprotection against chronic anthracycline cardiotoxicity: a study of the salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH).

Seznam použitých zkratek

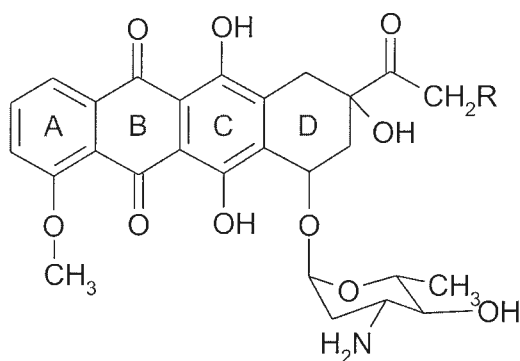
A	maximální rychlost plnění levé komory v pozdní fázi
Ar	aromatické jádro
AUC	plocha pod křivkou
C-G baze	baze cytosin a guanin
Cys	cystein
DFO	deferoxamin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
E	maximální rychlost plnění levé komory v časně fázi
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EKG	elektrokardiogram
EPR	enhanced permeability and retention (usnadněná permeabilita a retence)
FDC	fluoruracil + doxorubicin + cyklofosfamid
Fe	ionty železa
Glu	glukóza
Gly	glycin
HER	receptor pro epiteliální růstový faktor
i.p.	intraperitoneální aplikace
i.v.	intravenózní aplikace
INH	izoniazid
L1	deferipron
LVEF	ejekční frakce levé komory
MDR	mnohočetná léková rezistence
M-mode	jednorozměrná echokardiografie
2D-mode	dvourozměrná echokardiografie
MMRDX	methoxymorfolinodoxorubicin
monoHER	monohydroxyethylrutosid
NF- κ B	jaderný faktor kappa B
NIH	naftaldehyd isonikotinoyl hydrazon
NT-proANP	N-terminální konec pro atriální natriuretický faktor
NT-proBNP	N-terminální konec pro mozkový natriuretický faktor
o-108	pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazon

o-109	pyridoxal 2-fluorbenzoyl hydrazon
p.o.	perorální podání
PBH	pyridoxal benzoyl hydrazon
PCIH	2-pyridylkarbaldehyd isonikotinoyl hydrazon
PEP/LVET	poměr preejekční periody a vypuzovací doby levé komory
pHPMA	konjugáty léčiva s N-(2-hydroxypropyl)methacrylamidem
PIH	pyridoxal isonikotinoyl hydrazon
PKIH	di-2-pyridylketon isonikotinoyl hydrazon
PW	pulzně-Dopplerovská modalita echografického měření
RNV	radionuklidová ventrikulografie
ROS	volné kyslíkové radikály
RR	ribonukleotidreduktáza
SERCA	sarkoendoplazmatická ATPáza
SIH	salicyladehyd isonikotinoyl hydrazon
TLC	tenkovrstvá chromatografie
cTnI	srdeční troponin I
cTnT	srdeční troponin T

I.
ÚVOD

1. Antracyklinové antineoplastické látky

Antracyklinová antibiotika patří mezi jedny z nejčastěji užívaných cytostatik. Již na začátku 60-tých let byl z hub *Streptomyces peucetilus* a *Streptomyces ceruleorubidus* izolován **daunorubicin** (též zvaný daunomycin, rubidomycin) a vzápětí i dosud nejvýznamnější antracyklinový derivát – **doxorubicin** (adriamycin). Jedná se o látky, které se skládají z tetracyklického aglykonu a glykosidicky vázaného aminocukru daunosaminu. Oba deriváty si jsou chemicky velmi podobné (liší se pouze jednou hydroxylovou skupinou na C14, Obr. 1), nicméně je mezi nimi značný rozdíl v indikační šíři. Chinonová část aglykonu (cyklus B) má zásadní význam pro tvorbu volných kyslíkových radikálů redoxní cyklizací (Gewirtz 1999, Minotti 2004).



Obr. 1. Chemická struktura antracyklinu (R= OH doxorubicin, R= H daunorubicin).

1.1. Mechanismus cytostatického účinku

Je pozoruhodné, že i když jsou antracyklinová antineoplastika v klinické praxi úspěšně užívána téměř 35 let, stále není definitivně jasno v otázce jejich mechanismu účinku. Z dosavadních informací vyplývá, že protinádorové působení těchto léčiv je patrně výsledkem poměrně složitých dějů odehrávajících se v maligně transformované buňce. Porozumění mechanismu cytostatického účinku je důležité nejen s ohledem na co nejeftivnější užití těchto látek v protinádorové chemoterapii, ale je třeba mít je také na zřeteli při vývoji potenciálně protektivně působících léčiv. Mechanismus protektivního působení by totiž samozřejmě neměl interferovat s mechanismem protinádorového účinku.

1.1.1. Interkalace

Prvním navrženým mechanismem cytostatického působení antracyklinových cytostatik byla interkalace, tedy „vmezeření“ léčiva do DNA (Pigram 1972). U antracyklinů dochází k vmezeření specificky mezi páry C-G bazí. Tento jev je založen na nekovalentní vazbě (vodíkové můstky, van der Waalsovy síly, elektrostatické a hydrofobní interakce). Vzniklý komplex DNA-antracyklin pak následně brání transkripci a replikaci DNA. V poslední době je role interkalace v klinickém účinku antracyklinových cytostatik do určité míry zpochybňována. Zdá se totiž, že k tomuto ději dochází významnou měrou až při vysokých - klinicky irelevantních - koncentracích cytostatika (Dunkern 2003).

1.1.2. Inhibice topoisomerázy II

Topoisomerázy jsou jaderné enzymy, které se podílejí téměř na všech biologických dějích kde figuruje dvoušroubovice DNA (replikace, transkripce, rekombinace a chromosom utvářející děje). Antracykliny pravděpodobně vytvářejí stabilní ternární komplex topoisomeráza II – DNA a tak inhibují zpětné spojení obou vláken DNA. Důsledkem tohoto jevu dochází ke kumulaci zlomů na dvoušroubovici DNA s následnou indukci programované buněčné smrti - apoptózy (Dunkern 2003, Lothstein 2001). Exprese antiapoptotických proteinů může být jedním z faktorů určujících rezistenci nádoru vůči chemoterapii antracyklinovými antineoplastiky.

1.1.3. Tvorba volných kyslíkových radikálů

Strukturou aglykonu antracyklinových antibiotik je dána schopnost produkce volných kyslíkových radikálů hned dvěma způsoby – jednak redoxní cyklizací a dále tvorbou komplexu s ionty železa (Keizer 1990). Do jaké míry však fakticky přispívá produkce volných kyslíkových radikálů (ROS) k protinádorovému působení, není zcela jasné. Z dostupných informací se zdá, že ROS se účastní na protinádorovém efektu antracyklinů spíše minoritně (Wu 2005), na rozdíl od kardiotoxicity, kde patrně hrají velmi významnou úlohu (Keizer 1990, Gewirtz 1999, Wu 2005). Podrobně jsou zmíněné mechanismy diskutovány v oddílu věnujícímu se kardiotoxicitě.

1.2. Způsob podání a farmakokinetika antracyklinů

Antracykliny se podávají intravenózně, přičemž jiné způsoby podání (např. intraperitoneální) jsou užívány pouze ve zvláštních případech (terapie nádorů peritonea) (Rossi 2003). Výjimkou je novější derivát idarubicin, u něhož je možná také perorální

aplikace. Po intravenózním podání se antracyklinová antibiotika rychle distribuují do celého těla, zvláště pak do ledvin, sleziny, jater, plic a srdce. Tato léčiva se podstatnou měrou váží na intracelulární komponenty (včetně DNA). Distribuční objem doxorubicinu je vyšší než 25 l/kg. Antracykliny patrně nepronikají skrz hematoencefalickou bariéru, ale prochází placentární bariérou do plodu a také do mateřského mléka.

Biotransformace antracyklinů probíhá především v játrech za účasti cytoplazmatických enzymů aldo-keto reduktáz. Vznikají tak alkoholické metabolity (doxorubicinol, daunorubicinol atd.) s mnohem nižší cytostatickou aktivitou, ovšem se značným toxickým potenciálem. Uvedený typ biotransformace se uplatňuje i v jiných tkáních (např. myokard); hydroxylové metabolity se zde mohou aktivně podílet na orgánové toxicitě. Další navržené metabolické cesty zahrnují hydrolyzu glykosidické vazby prostřednictvím NADP-reduktázy a konjugaci s kyselinou glukuronovou a sulfátem.

Největší množství vlastního léčiva (40-50 %) je z organismu **vylučováno** játry, a to z poloviny v nezměněné podobě. Pouze menší část podané dávky léčiva je vyloučena z organismu ledvinami. Pokles plazmatických hladin nejužívanějšího doxorubicinu se odehrává ve 3 fázích s poločasy eliminace $t_{1/2\alpha} = 4,8$ min, $t_{1/2\beta} = 2,6$ h a $t_{1/2\gamma} = 48$ h (Danesi 2002).

1.3. Indikace antracyklinů

Antracyklinová antibiotika vykazují významný cytostatický a pouze mírný antimikrobiální účinek. Minimální bakteriostatická koncentrace je většinou nad hranicí únosné toxicity. Protinádorový účinek těchto látek může být využit v kurativní, ale i adjuvantní, neoadjuvantní či paliativní terapii (Klener 1996, Elbl 2002).

Jak již bylo uvedeno, malý rozdíl v chemické struktuře mezi daunorubicinu a doxorubicinem v chemické struktuře se ukázal být zásadní pro jejich klinické uplatnění. Podstata toho jevu ovšem stále nebyla vysvětlena. Daunorubicin je téměř výhradně užíván v kombinační terapii akutní myeloblastické či lymfoblastické leukémie, v dávce 45-60 mg/m².den. Naproti tomu doxorubicin má spektrum indikací podstatně širší. Užívá se i v léčbě mnohočetného myelomu, Hodgkinových i neHodgkinových lymfomů, jakož i u celé řady solidních tumorů (karcinom prsu, vaječníků, malobuněčný karcinom plic a sarkom měkkých tkání). Doxorubicin se většinou podává v kombinačním chemoterapeutickém režimu. Bývá aplikován jedenkrát za 3 týdny v dávce cca 60-75 mg/m², formou pomalého bolusu či krátkodobé (popř. kontinuální) infúze. Všechny antracykliny je nutné podávat

přísně intravenózně, neboť paravenózní aplikace způsobuje obávanou nekrózu a zánět v okolní tkáni (Klener 1996, Jansen 2003).

1.4. Extrakardiální nežádoucí a toxické účinky antracyklinů

Antracykliny, stejně jako většina ostatních protinádorových léčiv, vykazují pouze relativní selektivitu svého cytostatického účinku. Následkem toho je chemoterapie obsahující tato cytostatika provázena řadou nežádoucích účinků. Pro antracykliny je charakteristická významná myelosuprese, jež může výrazně ovlivnit dávku podaného léčiva. Úbytek leukocytů je nejmarkantnější druhý týden po aplikaci s úpravou ve čtvrtém týdnu terapie. Trombocytopenie a anémie se vyvíjejí obdobně, ale jsou většinou méně výrazné. Bylo pozorováno, že pokles leukocytů po podání doxorubicinu má významný vztah k AUC léčiva a podobně byla nalezena korelace mezi AUC doxorubicinolu a poklesem neutrofilů a trombocytů (Danesi 2002). Jako u dalších cytostatik se přechodně vyskytuje nauzea, zvracení, mukositida a alopecie. V místě podání bývá občas pozorováno zarudnutí, které je v podstatě benigní lokální alergickou reakcí a nemělo by být zaměňováno za náhodné paravenózní podání. Zřídka se vyskytuje „flash“ v obličeji, horečka, konjunktivitida, kožní a nehtové pigmentace (Klener 1996). Mutagenní a karcinogenní potenciál byl prokázán na laboratorních modelech (Goodman 2001). V preklinických experimentech byla u hlodavců a králíků zaznamenána poměrně výrazná nefrotoxicita antracyklinů. Ačkoliv podstata tohoto jevu nebyla dosud vysvětlena, některé práce dokumentují podíl ROS na tomto druhu toxicity. Tomu by též nasvědčoval protektivní účinek dexrazoxanu nejen vůči kardiotoxickým, ale i nefrotoxickým účinkům antracyklinů (Herman 1998, Simunek 2004). Změny v ledvinách bývají charakterizovány jako degenerace epitelí proximálního a distálního tubulu se známkami nekrózy i apoptózy a s přítomností proteinového materiálu v lumen tubulů. V humánní medicíně ovšem nefrotoxicita nebývá závažnější komplikací chemoterapie obsahující terapie antracykliny (Herman 1988).

2. Antracyklinová kardiotoxicita

První zmínky o kardiotoxickém působení antracyklinů se objevily již krátce po jejich zavedení do klinické praxe (Lefrak 1973). Kardiotoxické působení antracyklinových cytostatik se do určité míry vymyká nežádoucím účinkům běžně sledovaných u jiných

cytostatik. Nespecifita cytotoxického působení se nejčastěji projeví na rychle proliferujících tkáních (např. kostní dřev, sliznice aj). Kardiotoxicitu, ačkoliv většinou méně závažnou, však pozorujeme i u některých jiných cytostatik (např. mitoxantron, bleomycin, cyklofosamid, cisplatina, busulfan). V poslední době poutají odbornou pozornost informace o kardiotoxickém působení trastuzumabu - nového biologického léčiva užívaného v léčbě nádorů prsu (jedná se chimérickou monoklonální protilátku proti HER2 receptoru pro růstový faktor) (Routledge 2006). Nejnovější jsou pak informace o kardiotoxickém působení imatinibu – nového léčiva se specifickým mechanismem účinku proti bcr-abl pozitivních formám chronické myeloidní leukémii (Kerkela 2006). Protože antracykliny jsou většinou podávány v kombinaci s dalšími protinádorovými léčivy, je nutné věnovat potenciálnímu negativnímu vlivu dalších farmak na srdeční funkci značnou pozornost (Perez 2004). Vzhledem k tomu, že se kardiotoxicita antracyklinů ukázala být významným omezením jejich klinického užití, možnost redukce tohoto závažného toxického účinku je intenzivně studována.

2.1. Typy antracyklinové kardiotoxicity

Vzhledem k nástupu a charakteru klinických projevů lze rozdělit antracyklinovou kardiotoxicitu na akutní, subakutní, chronickou a pozdní (Hrdina 2000, Gharib a Burnett 2002, Elbl 2002). Nicméně existují různé názory na způsob rozdělení a v literatuře je též možné pozorovat určitou terminologickou nejednotnost (Elbl 2002). Někteří autoři hovoří zjednodušeně o dvou hlavních variantách antracyklinové kardiotoxicity (akutní a chronické) a jejich různých formách (např. chronická forma kardiotoxicity s časným a pozdním nástupem srdeční dysfunkce, Wouters 2005, Ewer a Benjamin 2006).

2.1.1. Akutní kardiotoxicita

Projevy akutní toxicity bývají patrné několik hodin po podání léčiva. Nečastěji se projevují jako přechodné, mírné a obvykle subklinicky probíhající změny srdečního rytmu. Bývají popisovány jako nespecifické změny na EKG křivce – především úseku ST a vlny T, snížená QRS voltáž a/nebo prodloužení QT intervalu. Udáván je také výskyt sinusové, supraventrikulární, komorové a nebo junkční tachykardie (Shan 1996). Závažnější poruchy rytmu se vyskytují zřídka. Ojedinele byly ovšem popsány fatální případy komorových arytmií, nebo vznik náhlého infarktu myokardu. Akutní poruchy rytmu však nejeví závislost na podané dávce, dávkovacím schématu a patrně ani nemají vztah k rozvoji antracyklinové kardiomyopatie (Allen 1992, Elbl 2002).

2.1.2. Subakutní kardiotoxicita.

Vznik subakutní toxicity bývá pozorován v průběhu dnů popř. několika týdnů od začátku podávání antracyklinů. Obecně patří mezi vzácně se vyskytující typ toxicity a častěji je připisován daunorubicinu. V literatuře je nejčastěji popisován vznik toxické perikarditidy, myokarditidy, eventuálně tzv. „myokarditis-perikarditis syndrom“, který může výjimečně končit i smrtí (Allen 1992, Gharib 2002, Elbl 2002). Histopatologické změny v myokardu pokusných zvířat i lidí připomínají do určité míry změny vyvolané akutním podáním katecholaminu nebo histaminu. Bývá přítomna zvýšená eosinofilie myocytů, granulace cytoplazmy, ukládání hyalinního materiálu, polymorfonukleárová a lymfocytární infiltrace v intersticiu (Kantrowitz 1984). Ani pro subakutní toxicitu se dosud bohužel nepodařilo uspokojivě definovat rizikové faktory.

2.1.3. Chronická kardiotoxicita

Chronická kardiotoxicita patří mezi nejobávanější nežádoucí účinky antracyklinových antineoplastik a významně omezuje jejich klinické užití. Je charakterizována vývojem globální dysfunkce levé srdeční komory se známkami městnání v závislosti na kumulativní dávce léčiva (Shan 1996, Danesi 2002, Ewer a Benjamin 2006). Z nových studií vyplývá, že systolické dysfunkci předchází dysfunkce diastolická - tj. srdeční selhání s normální ejekční frakcí (Bu'Lock 1999, Tjeerdsma 1999, Tassan-Mangina 2006, Nagy 2006). Zobrazovací metody často odhalí vznik ireverzibilní dilatační kardiomyopatie; u dětí byl vzácně popsán vznik restriktivního typu kardiomyopatie. Histopatologický nálezn u pacientů s antracyklinovou kardiomyopatií je v principu shodný se změnami indukovanými chronickým podáváním antracyklinů u experimentálních zvířat. Změny jsou fokálního charakteru a postihují difúzně především levou komoru a mezikomorové septum. Ačkoliv tato specifická lokalizace toxického účinku nebyla uspokojivě vysvětlena, je možné, že souvisí se zátěží a metabolickou aktivitou těchto oddílů myokardu. Mezi časné změny patří především vakuolární degenerace představovaná distenzí sarkotubulárního systému. Dále je popisována ztráta myofibril, nejdříve částečná, posléze úplná. V pokročilých stadiích dochází značnou měrou k nekróze myocytů s progresí intersticiální fibrózy (Kantrowitz 1984). Z recentních publikací vyplývá, že vedle nekrózy se na vzniku antracyklinové kardiomyopatie patrně podílí také programovaná buněčná smrt – apoptóza (Nakanuta 2000, Wang 2004, Ueno 2006).

2.1.4. Pozdní kardiotoxicita

Pozdní antracyklinová kardiotoxicita se rozvíjí po jednom roce a dále od ukončení

chemoterapie a často probíhá dlouhou dobu skrytě. K manifestaci pozdní antracyklinové kardiotoxicity dochází obvykle za 2-20 let, tedy mnohdy až v produktivním věku pacientů, kteří v dětství prodělali protinádorovou léčbu (Lipshultz 1991, Aleman 2007). Nález na srdci bývá nejčastěji charakterizován dilatační kardiomyopatií. Stejně jako chronická kardiotoxicita, tak i kardiotoxicita pozdní závisí na celkové kumulativní dávce. Ze srovnání 10-ti dětských klinických studií vyplynulo, že v období sledování 1-20 let (průměr 15,3 roku) od ukončení chemoterapie obsahující antracykliny, mělo subklinické známky kardiotoxicity 14-74 % pacientů, klinické známky 5-19 % pacientů a fatální komplikace byla pozorována v 1,3-1,5 % případů (Elbl 2002). Se zásadním zlepšením prognózy dětských malignit se stává pozdní kardiotoxicita antracyklinů vážným zdravotnickým problémem (Aleman 2007).

2.2. Mechanismus vzniku antracyklinové kardiomyopatie

Ačkoliv je antracyklinová kardiomyopatie předmětem intenzivního odborného zájmu, dosud se nepodařilo dostatečně objasnit mechanismus jejího vzniku. V průběhu let bylo prezentováno několik teorií, které se často nevylučují a hypoteticky se mohou doplňovat. Dosavadní znalosti naznačují poměrně komplexní povahu problému. Nejčastěji je antracyklinová kardiomyopatie spojována s poškozením myokardu volnými kyslíkovými radikály, avšak diskutovány jsou i další možné mechanismy.

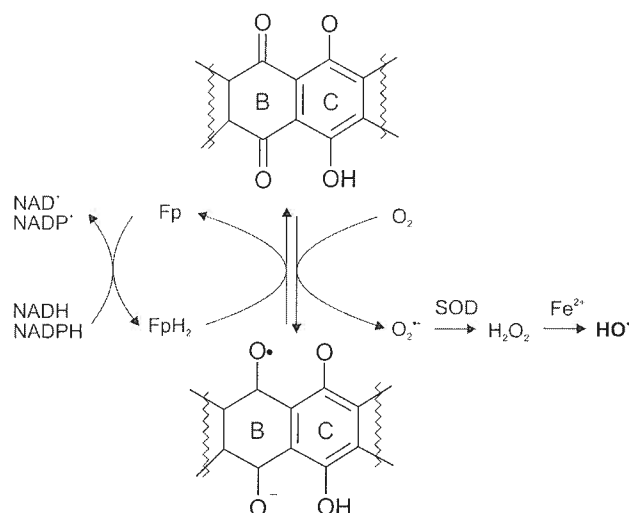
2.2.1. Poškození srdce volnými radikály (ROS)

Antracykliny navozená tvorba ROS (obr. 2) byla opakovaně prokázána v experimentech *in vitro* (Rajagopalan 1988, Link 1996) i *in vivo* (Luo 1997, Bauthiaume 2005). Chemická struktura antracyklinů umožňuje hned dva způsoby, kterými mohou být v organismu produkovány ROS. První možnost je založena na redoxní cyklizaci kruhu B tetraacyklu aglykonu a druhá možnost souvisí s tvorbou komplexu antracyklin – Fe (Keizer 1990, Minotti 2004). Oba způsoby tvorby ROS se mnohem pravděpodobněji podílejí na kardiotoxickém, než na protinádorovém působení (Gewirtz 1999, Wu 2005). Důvodem pro tak významné poškození srdce oxidačním stresem mohou být poměrně malé zásoby přirozených antioxidantů v myokardu ve srovnání s ostatními tkáněmi. V srdci je udávána relativně nízká aktivita superoxidodismutázy, katalázy a glutathionperoxidázy (Levitt 1999).

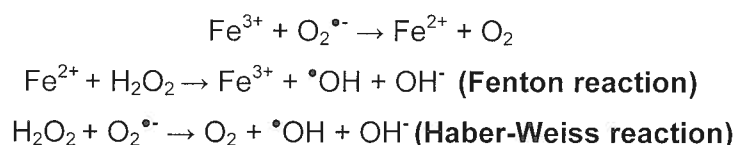
A) Redoxní cyklizace aglykonu antracyklinu

V nepřítomnosti iontů železa, může být kruh B aglykonu antracyklinů redukován a

vzniká tak semichinonový radikál. Interakcí semichinonového radikálu s kyslíkem (tedy za aerobních podmínek) se aglykon zpět oxiduje za vzniku superoxidového radikálu, který dismutuje na peroxid vodíku (obr. 2). Jestliže jsou přítomny železité ionty pak dochází k jejich redukci superoxidovým anionem. Ve smyslu Fentonovy reakce pak mohou železnaté ionty katalyzovat rozklad peroxidu vodíku za vzniku volného hydroxylového radikálu (Keizer 1990, Hrdina 2000, Keller 2000) (obr. 3).



Obr. 2. Schématické znázornění vzniku hydroxylových radikálů prostřednictvím „redoxního cyklu“ antracyklinů. Fp – flavoproteinové enzymy, SOD – superoxid-dismutáza

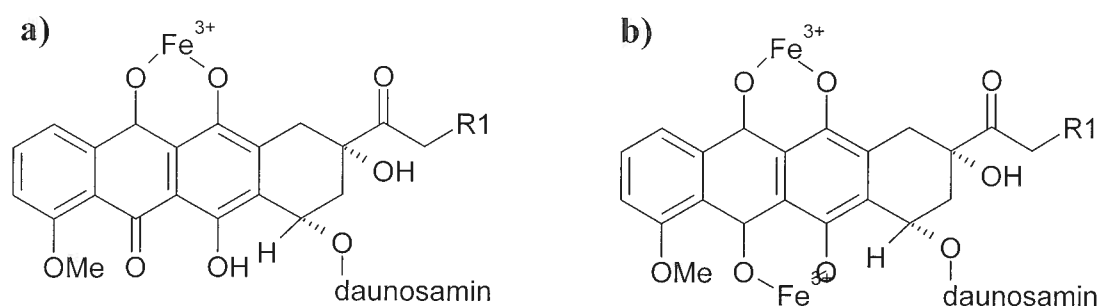


Obr. 3. Fentonova a Haber-Weissova reakce

B) Tvorba ROS prostřednictvím komplexu antracyklin-železo

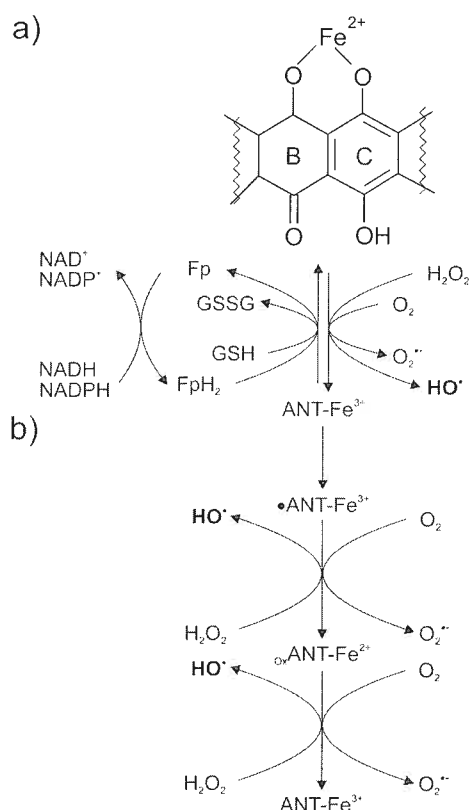
Chemická struktura antracyklinů umožňuje vznik ROS prostřednictvím **komplexů se železem**. V podmínkách *in vitro* se v nižších koncentracích léčiva tvoří komplex s Fe^{3+} v poměru 1:1, ve vyšších koncentracích pak i komplexy 1:2 (obr. 4). V terapeutických koncentracích odpovídajících terapeutické hladině antracyklinu se zdá být pravděpodobnost tvorby komplexů antracyklin-Fe v poměru 1:2 minimální. Nicméně uvnitř kardiomyocytů, kde byla naměřena i řádově vyšší koncentrace antracyklinů, je již tvorba těchto komplexů reálná (Fiallo 1999, Cusack 2003). Dostupnost železa pro tvorbu

komplexu může být též zvýšena vlastním oxidačním stresem, nebo změnou pH uvnitř buněk, protože v těchto podmínkách bylo pozorováno uvolnění labilního Fe z transferinu (Chevion 1993). Vzniklý komplex antracyklin-Fe³⁺ může být redukován (enzymaticky i neenzymaticky) a interakcí s peroxidem vodíku nebo superoxidem se zpět oxiduje - za současného vzniku volných hydroxylových a superoxidových radikálů. Cyklický charakter diskutované reakce předznamenává značné množství ROS, které tímto způsobem vznikají (Malisza 1995, Myers 1998, Fiallo 1999).



Obr. 4. Tvorba komplexů antracyklin-železo; a) v poměru 1:1, b) v poměru 1:2. Daunoubicin R1=CH₃, doxorubicin R1=CH₂OH.

Volné radikály (především superoxidový radikál a peroxid vodíku) jsou i za normálních okolností produkovány buňkami tkání všech aerobních organismů. Jejich negativnímu působení však zabraňují přirozené antioxidanty (glutathion, glutathionperoxidáza, superoxidodismutáza, kataláza). Za fyziologických podmínek je pozorována rovnováha mezi tvorbou ROS a jejich zhasením. Hydroxylové radikály však představují mnohem nebezpečnější látky s velmi vysokým toxickým potenciálem (Liochev 1999, Kehrer 2000). Jejich působením může dojít k závažnému poškození téměř všech buněčných struktur (biomembrán, DNA, proteinů). V poslední době je též intenzivně studována signalizační úloha ROS (Kehrer 2000, Berthiaume 2007). Antracykliny také patrně samy zasahují do regulace homeostázy železa kardiomyocytu a tak pravděpodobnost poškození zprostředkovaného zmiňovanými komplexy narůstá.



Obr. 5. Tvorba hydroxylových radikálů prostřednictvím komplexu ANT-Fe, a) cyklicky v přítomnosti redukcujících systémů (enzymatických i neenzymatických) a b) v nepřítomnosti redukcujících látek. ANT = antracyklin.

2.2.2. Další možné mechanismy vzniku antracyklinové kardiomyopatie

2.2.2.1. Porucha homeostázy kalcia

Mezi další mechanismy, které mohou vysvětlovat nebo doplňovat již diskutované děje podílející se na vzniku antracyklinové kardiomyopatie, patří také porucha homeostázy kalcia v kardiomyocytu. V literatuře lze najít zdánlivě protichůdné informace, týkající se vlivu antracyklinu na obrat kalcia v buňce. Většina prací totiž popisovala přímou stimulaci uvolňování kalcia ze sarkoplazmatického retikula (Boucek 1993, Pessah 2000). Nicméně se zdá, že k tomuto jevu dochází až v supraterapeutických koncentracích antracyklinu. V terapeutických koncentracích cytostatika byl popsán spíše akutní inhibiční vliv tohoto cytostatika na uvolňování vápníku ze sarkoplazmatického retikula (Pessah 2000).

Antracykliny vedou k intracelulární kumulaci kalcia (tzv. „calcium overload“), což má za následek poruchu funkce mitochondrií, depleci vysokoenergetických fosfátů a následně i vznik kontraktilní dysfunkce (Jensen 1986, Holmberg 1990, Berthiaume 2007). Poměrně nedávno byla demonstrována potenciální souvislost mezi antracyklinovou kardiotoxicitou a poruchou buněčné homeostázy kalcia vedoucí k aktivaci kalcium

dependentní proteázy kalpainu. Tato proteáza může být zodpovědná za štěpení významného strukturálního myofilamentu podílejícího se na mechanických vlastnostech a stabilitě sarkomery (Lim 2004, Jang 2004). Přesný mechanismus vzniku poruchy kalciové homeostázy v kardiomyocytech zůstává nejasný. Předpokládá se přímý nebo zprostředkovaný vliv antracyklinů (prostřednictvím ROS nebo 13-OH metabolitů) na vápníkové iontové kanály a/nebo transportní pumpy, popř. se může uplatnit tzv. „sarkoretikulární stres“. V kardiomyocytech králíků, kterým byl opakovaně podáván doxorubicin, byla pozorována nižší množství mRNA pro významný transportér vápníku SERCA 2 (sarco-endo-plasmatic reticulum Ca-ATPase 2) (Arai 1998). S užitím modelu transgenní myši overexprimující SERCA 2 však bylo zjištěno, že ovlivnění tohoto transportéru bude mít spíše kompenzatorní nežli kauzální vztah k rozvoji doxorubicinové kardiomyopatie (Burke 2003). Opakované podávání doxorubicinu negativně ovlivnilo genovou expresi ryanodinového receptoru (ligandem řízený Ca^{2+} kanál sarkoplazmatického retikula) a tento jev byl dán do souvislosti s rozvojem dysfunkce levé srdeční komory. Ryanodinový receptor je významný z hlediska řízení uvolňování kalcia ze sarkoplazmatického retikula, a proto snížení jeho exprese může mít vliv na kontraktilitu myokardu (Arai 1998, Gambliel 2002). Vliv antracyklinu na homeostázu kalcia v kardiomyocytech v klinicky relevantních podmínkách tedy zůstává relativně málo objasněn a vyžaduje další studium.

2.2.2.2. *Tvorba toxicky aktivních metabolitů*

Dalším poznatkem s možným vztahem k podstatě antracyklinové kardiomyopatie je tvorba toxicky aktivních metabolitů. Hlavními metabolity antracyklinů jsou jejich hydroxylové deriváty vznikající redukcí ketoskupiny na C-13 tetracyklu aglykonu (doxorubicinol, daunorubicinol atd.). Tato reakce je katalyzována v organismu všude se vyskytujícími enzymy (NADH dependentní aldo-ketoreduktázy a karbonylreduktázy aj). Předpokládá se však, že pro kardiotoxicitu má zásadní význam především tvorba hydroxylových metabolitů antracyklinů *in situ* v cytoplazmě kardiomyocytu. Byla popisována až 100-násobná koncentrace doxorubicinolu v srdci oproti jeho koncentraci v plazmě. Zatímco koncentrace v srdečních buňkách byly poměrně stálé, v plazmě docházelo k relativně rychlému poklesu hladin metabolitu. Na preklinickém modelu byla také zjištěna alterace farmakokinetiky jak doxorubicinu tak i jeho metabolitu (Cusack 2003) u starších potkanů. Úloha hydroxylového metabolitu v toxicitě doxorubicinu byla též podpořena experimentem provedeným s využitím transgenních myší, které zvýšeně

exprimovaly lidskou karbonylreduktázu (specificky v srdci). Spolu se signifikantně vyšší a rychleji nastupující tvorbou doxorubicinolu byla u transgenních jedinců pozorována výrazně vyšší kardiotoxicita i mortalita (Forrest 2000). V jiném pokusu, kde autoři použili myš s nulovou alelou pro karbonylreduktázu 1, byla u transgenních zvířat pozorována vyšší rezistence vůči akutní doxorubicinové kardiotoxicitě (Olson 2003). Soudí se, že doxorubicinol se může podílet na kardiotoxicitě mateřské látky svým negativním vlivem na sarkoplazmatické retikulum (patrně inhibuje jeho ligandem řízené iontové kanály) (Olson 1988). Dále bylo zjištěno, že doxorubicinol nevratně inaktivuje tzv. iron responsive element 1 (IRE1). Tato molekula hraje významnou roli v regulaci homeostázy železa v kardiomyocytech. V poslední době bylo ukázáno, že taxany mohou stimulovat tvorbu doxorubicinolu a tímto mechanismem by mohl být vysvětlen určitý díl aditivní kardiotoxicity těchto cytostatik při kombinaci s antracykliny (Salvatorelli 2007).

2.2.2.3. *Indukce apoptózy - programované buněčné smrti*

Poté, co byla prokázána účast programované buněčné smrti na protinádorovém účinku antracyklinů, byla pozornost rychle obrácena ke studiu tohoto fenoménu v jejich kardiotoxickém působení. Opakovaně byla zjištěna indukce apoptózy kardiomyocytů v terapeutických koncentracích doxorubicinu a daunorubicinu v podmínkách *in vitro* (Sawyer 1999, Kalivendi 2001, Kotamraju 2002, Khan 2006, Kim 2006) i *in vivo* (Arola 2000, Nakamura 2000, Koh 2002, Dziegiel 2002, Ueno 2006). Byla pozorována korelace apoptózy u antracykliny vyvolané kardiomyopatie s aktivací jaderného faktoru κ B (Wang 2002, 2004), expresí bax proteinu, FAS receptoru (Nakamura 2000, Lien 2005) a transferinového receptoru (Kotamraju 2002).

Jaderný faktor κ B (NF- κ B) byl signifikantně aktivován v kardiomyocytech inkubovaných s doxorubicinem a bylo prokázáno, že se tak děje prostřednictvím oxidačního stresu. Dále se ukázalo, že NF- κ B má v uvedeném modelu proapoptotickou funkci, přičemž inhibice aktivace NF- κ B výrazně snížila výskyt apoptotické smrti myocytů. Vzhledem k opačné úloze tohoto faktoru v nádorových buňkách by však tento mechanismus neměl snižovat protinádorový účinek antracyklinů (Wang 2002). Dle dostupných informací se zdá, že apoptóza kardiomyocytů indukovaná *in vivo* opakovaným podáváním antracyklinů nesouvisí s aktivací tumor supresorového faktoru p53. Za významné lze považovat také zjištění, že u potkanů nárůst apoptoticky zanikajících buněk koreloval s poklesem frakčního zkrácení levé komory (Nakamura 2000). Z uvedených prací vyplývá, že antracykliny jsou schopny navodit apoptotický zánik kardiomyocytů,

nicméně klinický význam tohoto mechanismu buněčné smrti pro rozvoj antracyklinové kardiotoxicity zůstává stále nejasný (Minotti 2004).

2.2.2.4. *Další možné mechanismy*

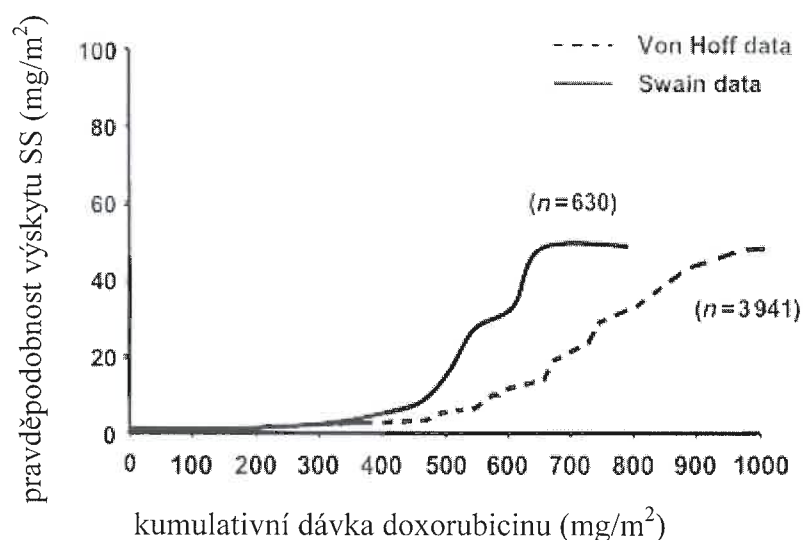
Mezi další děje, které se mohou podílet na vzniku srdečního poškození, patří **uvolnění histaminu** (Klugmann 1986, Decorti 1997). Studována byla též **interakce antracyklinu s vegetativním nervovým systémem**. Doxorubicin inhibuje uvolnění acetylcholinu z nervových zakončení v srdci. Byl také zjištěn pokles počtu β_1 -receptorů a obsahu noradrenalinu v srdečních komorách u králíků s doxorubicinovou kardiomyopatií (Hoyano 1996, Nagami 1997). V souvislosti se srdečním selháním byla popsána časná aktivace sympatiku, nicméně u kumulativní dávky 400-500 mg/m² doxorubicinu byl tento jev potlačen (Nousiainen 2001). Další hypotézy zahrnují přímé a nepřímé **ovlivnění genové exprese řady významných genů** a **účast zánětlivých dějů** (Jeyaseelan 1997, Yi 2005).

2.3. Rizikové faktory antracyklinové kardiomyopatie

Identifikace rizikových faktorů se ukázala být významným nástrojem k omezení kardiotoxicity antracyklinových antineoplastik (přehled rizikových faktorů je uveden v tab.1). Nejvýznamnějším rizikovým faktorem antracyklinové kardiomyopatie je **celková kumulativní dávka léčiva** (von Hoff 1979). Von Hoff retrospektivní analýzou záznamů 3941 pacientů z období 1970-1977 zjistil, že při nízkých kumulativních dávkách je závislost „kumulativní dávka-vznik kardiomyopatie“ lineární, zatímco při vyšších dávkách (nad 550 mg/m²) se uvedená závislost mění na exponenciální (obr. 6). Kumulativní dávka je dnes všeobecně akceptovaný rizikový faktor chronické a pozdní antracyklinové kardiotoxicity (Allen 1992, Gharib 2002, Elbl 2002), avšak striktní omezení celkové kumulativní dávky může negativně ovlivnit odpověď na protinádorovou léčbu. Navíc novější klinické studie naznačují, že z hlediska kardiotoxicity lze za rizikové považovat již nižší kumulativní dávky antracyklinů (400-450 mg/m²) viz obr. 6 (Wouters 2005, Ewer a Benjamin 2006).

Tab. 1. Přehled rizikových faktorů antracyklinové kardiomyopatie

Děti	Dospělí
Celková kumulativní dávka ($>400-450 \text{ mg/m}^2$)	Celková kumulativní dávka ($>400-450 \text{ mg/m}^2$)
Věk < 3 roky	Věk > 65 let
Iradiace mediastina	Iradiace mediastina
Jiná kardiotoxická chemoterapie (cyklofosfamid, vinkristin, bleomycin)	Jiná kardiotoxická chemoterapie (trastuzumab, cyklofosfamid, bleomycin, paklitaxel)
Ženské pohlaví	Ženské pohlaví
Způsob podání - bolus	Způsob podání - bolus
Vrozená srdeční onemocnění	Hypertenze, diabetes, UCHA aj.



Obr. 6. Závislost pravděpodobnosti výskytu srdečního selhání (SS) na kumulativní dávce doxorubicinu (upraveno dle Wouters 2005)

Mezi další faktory, které patrně významně ovlivňují riziko kardiotoxicity, patří také **způsob podání a dávkovací schéma**. Již ve výše zmiňované studii Von Hoff pozoroval signifikantně nižší celkový výskyt kardiotoxicity (2,9 % vs. 0,8 %), při porovnání původního schématu dávkování doxorubicinu (tj. i.v. bolus – 1 x za 3 týdny) s podáváním 1 x týdně (Von Hoff 1979). Torti et al. odhadl, že při podávání doxorubicinu 1x týdně, může být oproti původnímu schématu podáno zhruba o 168 mg/m^2 více (Torti 1983). Ještě významnější snížení rizika kardiotoxicity bylo pozorováno při podávání doxorubicinu

formou 96 h (48 h) kontinuální infúze (Legha 1982). Také metaanalýza randomizovaných klinických studií provedených u dospělých pacientů uvádí významně nižší riziko kardiotoxicity v případě, že antracyklin je podáván infúzí delší než 6 hodin (van Dalen 2006). Na druhou stranu však zvýšené plazmatické koncentrace troponinu T (biomarker srdečního poškození) byly zjištěny jak po podání jako bolus, tak infúzním podání u dětských pacientů (Lipshultz 1997). Ani Levitt et al. nepozoroval žádný rozdíl ve výskytu kardiotoxicity při podání nízké kumulativní dávky daunorubicinu (180 mg/m^2), ať už formou bolusu, či 6-ti hodinové infúze (Levitt 2004). Obdobně jiní autoři nezjistili rozdíl v rozvoji kardiotoxicity u pediatrických pacientů po podání doxorubicinu 360 mg/m^2 i.v. formou bolusu (či krátké infúze) a dlouhodobé (48 h) kontinuální infúze (Lipshultz 2002). Optimální způsob podání antracyklinů je tudíž stále předmětem odborných diskusí.

3. Možnosti omezení antracyklinové kardiotoxicity

Poškození srdce antracykliny může být velmi závažné a často bývá ireverzibilního charakteru s potenciálně fatálními důsledky pro pacienta. Srdeční selhání může ve svém důsledku snižovat kvalitu života pacientů, kteří jsou v kompletní remisi nádorového onemocnění. Z uvedených důvodů je hlavní léčebnou strategií kardiotoxicitě předcházet.

3.1. Respektování rizikových faktorů

Jednou z možností, jak předejít nebo výrazně omezit poškození srdce při léčbě antracykliny, je **důsledná modifikace léčby s přihlédnutím k rizikovým faktorům**. Rozlišujeme rizikové faktory se vztahem k léčivu a se vztahem k pacientovi. Mezi nejdůležitější rizikové faktory patří kumulativní dávka. Z toho plyne, že je třeba se snažit **omezit celkovou kumulativní dávku antracyklinu** podanou pacientovi, avšak s přihlédnutím k závažnosti malignity a k odpovědi na terapii. U dětských pacientů je při volbě celkové kumulativní dávky třeba mít na zřeteli, že po expozici léčivu sice pacient nemusí mít klinické symptomy srdečního selhání, nicméně si může nést do svého života subklinické poškození, které se může manifestovat až v produktivním věku. Podle dostupných informací se zdá být vhodnější podávání antracyklinů spíše **infúzí** než jednorázově (snížení maximální plazmatické koncentrace cytostatika). Při volbě chemoterapie je důležité přihlížet k současnému podání **dalších cytostatik**, kterými je pacient léčen současně nebo byl léčen v minulosti (trastuzumab, bleomycin, cyklofosamid

aj.). Při zvažování rizika by též neměla být opomenuta **iradiace mediastina**. Významná je také anamnéza pacienta s ohledem na jiné **onemocnění kardiovaskulárního systému** (hypertenze, chlopenní vady atd.)

3.2. Vývoj nových antracyklinových derivátů s nižší kardiotoxicitou

Klinický úspěch doxorubicinu a daunorubicinu inicioval extenzivní farmakologický výzkum zaměřující se na nové deriváty a analoga základní antracyklinové struktury, kterých bylo připraveno více jak 2000 (Binaschi 2001). Byla studována celá řada látek, které bohužel ve většině případů měly buď nižší cytostatický účinek, nebo vyšší hemato, kardio či nefrotoxicitu. Některé nové antracyklinové deriváty, označované jako antracykliny 2. a 3. generace, se však ukázaly být zajímavými a dostaly se do klinické praxe. Mezi novější antracykliny patří: **epirubicin, idarubicin, pirarubicin** a antracenový analog **mitoxantron**.

Kardiotoxicita byla zdokumentována u všech antracyklinových derivátů a analogů bez výjimky. Ze srovnávacích studií ale vyplynulo, že relativní kardiotoxický potenciál např. epirubicinu vůči doxorubicinu je cca 60%. V poslední době tedy epirubicin v některých terapeutických schématech nahradil doxorubicin. Z dosavadních poznatků se zdá, že epirubicin (podáván v ekvimolární dávce k doxorubicinu) je minimálně stejně klinicky účinný, avšak s nižším výskytem kardiotoxických komplikací (Findlay 1998, Rosini 2004).

3.3. Cílená distribuce léčiva a vývoj nových lékových forem

Jednou z hlavních příčin nežádoucích systémových účinků chemoterapie je nedostatečná selektivita cytotoxického účinku. Jestliže selektivita cytotoxicity není dána mechanismem účinku, je možné se pokusit o cílenou distribuci léčiva do cílové tkáně (orgánu). Obecně lze rozlišit pasivní a aktivní způsob cílené distribuce léčiv (drug targeting). Pasivní cílená distribuce je založena na vyšší propustnosti cév v nádorových tkáních za současné nižší lymfatické drenáže. Tento jev bývá též označován jako „enhanced permeability and retention effect“ (EPR) a vysvětluje, proč jsou molekuly o vyšší molekulové hmotnosti kumulovány v nádoru. Tohoto jevu lze dosáhnout liposomální enkapsulací antracyklinů (DunoXome[®], Doxyl[®]) nebo konjugací s biopolymery (Hovorka 2002). Druhým způsobem „targetingu“ je reversibilní připojení léčiva k selektivnímu

ligandu, popř. terapeutickému systému. Ligand se může selektivně vázat na receptory převážně exprimovaný na povrchu nádorových buněk a tak určovat distribuci léčiva (Maeda 2000).

4. Farmakologická kardioprotekce u antracyklinové kardiomyopatie

Jak již bylo uvedeno, antracyklinová antibiotika patří mezi často užívaná cytostatika. I přes řadu opatření s cílem redukovat jejich toxicitu je jejich potenciál pro rozvoj kardiotoxicity stále jasně patrný. Jedno z posledních hodnocení expertních skupin (tzv. „expert panel review“) uvádí, že riziko kardiotoxicity je onkology obecně spíše podceňováno (Swain 2004). Protože kardiotoxicita představuje velmi vážné a často ireverzibilní poškození životně důležitého orgánu, je nejúčinnější strategií této komplikaci předcházet. Značná pozornost byla proto věnována možnosti farmakologické kardioprotekce. Tato snaha již přinesla výsledky, které našly uplatnění v klinické praxi. Nejčastěji je mechanismus kardiotoxického působení spojován s produkcí volných kyslíkových radikálů, proto se tímto směrem ubírala většina snažení. Při vývoji látek s kardioprotektivním účinkem by v potaz měla být brána i případná možnost vzniku negativní farmakokinetické či farmakodynamické interakce s antracykliny. Jedním z důsledků takové interakce by též mohlo být snížení protinádorového účinku.

4.1. Zhášedce volných radikálů a antioxidanty jako kardioprotektiva

Velká pozornost byla věnována látkám zhášejícím volné kyslíkové radikály (tzv. scavengery). Mezi nejznámější látky s přímým antioxidačním působením patří **vitamin E** (α – tocopherol). Tato látka patří mezi vitamíny rozpustné v tucích a má relativně nízkou toxicitu. Ve většině experimentálních studií provedených na relevantních chronických modelech antracyklinové kardiotoxicity byl zjištěn pouze částečný či nevýznamný protektivní účinek (Breed 1980, Van Vleet 1980a, Van Vleet 1980b, Milei 1986, Berthiaume 2005). Absence protektivního působení vitaminu E byla také potvrzena i kontrolovaných klinických studiích (Legha 1982, Dorr 1996).

Jedním z nejvýznamnějších antioxidantů, který je přítomen v cytoplazmě, jádře a mitochondriích buněk, je tripeptid glutathion (GluCysGly). Tato látka ale neproniká biologickými membránami, nicméně acetylovaný cystein (**acetylcystein**) se dobře p.o.

podání dobře vstřebává a proniká do buněk, kde se deacetyluje a může sloužit jako intracelulární zdroj cysteinu pro biosyntézu glutathionu (Conklin 2000). Proto bylo potenciální protektivní působení acetylcysteinu studováno i experimentálních podmínkách (acetylcystein 140-200 mg/kg, 30-60 min před daunorubicinem), nicméně pomocí histopatologické vyšetření myokardu kardioprotektivní účinek nebyl na modelu chronické doxorubicinové kardiomyopatie zaznamenán (Herman 1985, Unverferth 1985). Randomizované klinické studie také nepotvrdily kardioprotektivní účinek acetylcysteinu (Dresdale 1982, Myers 1983).

Určité znaky kardioprotektivního účinku byly na morfologické a biochemické úrovni (peroxidace lipidů) popsány též u **melatoninu**. Nicméně účinky této látky byly hodnoceny pouze při nízké kumulativní dávce doxorubicinu (9 mg/kg, Dziegiel 2002). Pilotní experimenty naznačily, že antiapoptotické působení melatoninu se může také projevit v nádorové tkáni a tak oslabovat vlastní antitumorózní účinek antracyklinových cytostatik. Potenciální protektivní účinek melatoninu proto vyžaduje další studium, se zvláštním zaměřením na možné ovlivnění protinádorového účinku antracyklinových antibiotik (Dziegiel 2002, Dziegiel 2003).

Značná pozornost byla také věnována **probukolu**, který byl původně vyvinut jako hypolipidemikum (brzy ovšem bylo dokumentováno jeho významné antioxidační působení). Pro probukol je charakteristická významná distribuce do myokardu, což možná souvisí s vazbou probukolu na kardiolipin. Při kombinaci doxorubicinu a probukolu u potkanů bylo popsáno téměř kompletní ochrana myokardu před doxorubicinem (2,5 mg/kg, i.p., 6 aplikací ve 2 týdnech) navozeným oxidačním stresem (hodnocena byla např. peroxidace lipidů, exprese a aktivita superoxid dismutázy a katalázy, Li 2000).

Intenzivně studovanou skupinou potenciálních kardioprotektiv s antioxidačním účinkem jsou přírodní **flavonoidy**, zejména jejich syntetické a semisyntetické deriváty. Antioxidační účinky flavonoidů jsou založeny jednak na přímém působení proti ROS, ale do určité míry se patrně uplatňuje i jejich chelatační vlastnosti (chelatace iontů železa a mědi). Mezi nejstudovanější látky této skupiny patří frederin a 7-monohydroxyethyl-rutosid (monoHER). Oba semisyntetické deriváty působily kardioprotektivně na myším modelu chronické doxorubicinové kardiomyopatie. Hlavním hodnoceným parametrem byl interval ST hodnocený na telemetricky získaném záznamu EKG. Například monoHER (500 mg/kg, i.p.) aplikovaný 1 hodinu před doxorubicinem (4 mg/kg, po 8 týdnů) zabránil signifikatnímu prodloužení intervalu ST (1.7 ± 0.8 vs 16.9 ± 2.7 ms, $p < 0,001$). Obě látky též neměly negativní vliv na protinádorové působení doxorubicinu a to ani v podmínkách

in vitro ani *in vivo* (van Acker 2000, van Acker 2001). Nicméně poslední studie dokládají, že kardioprotektivní účinek monoHER je pouze krátkodobý a při dlouhodobém sledování (6 měsíců) ztrácel na významnosti (Bruynzeel 2006).

Selen není přímým antioxidantem, nicméně jako součást selenoproteinů (např. glutathionperoxidázy) je významnou částí antioxidantní výbavy všech buněk. V experimentálním uspořádání však suplementace selenu měla pouze nevýrazný či žádný účinek na rozvoj antracyklinové kardiomyopatie (Van Vleet a, b).

Amifostin je užíván k ochraně zdravých buněk při terapeutickém ozařování. Jedná o prolečivo, které je bioaktivováno na účinnou látku WR 1065 (obsahující thiolovou skupinu). Aktivace amifostinu je katalyzována membránově vázaným enzymem alkalickou fosfatázou. S užitím semikvantitativního morfologického hodnocení tato látka na *in vivo* modelu chronické doxorubicinové kardiomyopatie vykazovala signifikantní renální protekci, ale pouze nevýznamný kardioprotektivní účinek. Nefrotoxicita pozorovaná v preklinických experimentech má nejasnou etiopatogenezi, některé práce ale dokumentují její souvislost s antracykliny indukovanou tvorbou ROS v tomto orgánu. Narozdíl od dexrazoxanu, podávaného jako referenční kardioprotektivum, amifostin neovlivnil mortalitu indukovanou opakovaným podáváním doxorubicinu (Herman 2000).

Na akcelerovaném modelu doxorubicinem indukované kardiomyopatie byl hodnocen i betablokátor s výrazným antioxidantním působením – **karvedilol**. Perorálně podaný karvedilol (30 mg/kg, denně) kompletně zabránil mortalitě (25%) navozené opakovaným podáváním doxorubicinu (kumulativní dávka 15 mg/kg), signifikantně omezil úbytek hmotnosti pokusných zvířat a zachoval systolickou srdeční funkci (frakčního zkrácení levé komory na konci experimentu: $54,6 \pm 1,1$ % při kombinaci s karvedilolem vs $38,8 \pm 3,1$ % po samotném doxorubicinu, $p < 0,01$). Bohužel v této studii nebyl nálezný verifikován za pomoci dalších metodických přístupů, jako např. histopatologické vyšetření (Matsui 1999). Další práce ale dokládají, že karvedilol je, narozdíl od jiných beta-blokátorů, schopen výrazně snížit doxorubicinem navozené poškození mitochondrií i celkové poškození myokardu (Oliviera 2004).

Mezi další léčiva, u kterých byl studován kardioprotektivní účinek, patří **trimetazidin**. Tato látka se užívá v léčbě angíny pectoris a jsou jí též prisuzovány antioxidantní vlastnosti. Byla publikována studie hodnotící protektivní účinek trimetazidinu na modelu chronické kardiomyopatie, výsledky však kardioprotektivní účinek neprokázaly (Perletti 1989). V poslední době byla prezentována pilotní klinická studie zkoumající protektivní účinek trimetazidinu na parametry diastolické funkce. U pacientek ($n=24$),

kterým byl podáván dexrazoxan (jako referenční léčivo), bylo zaznamenáno zachování diastolické funkce ve stejné míře jako u nemocných, kterým byl místo dexrazoxanu aplikován trimetazidin (n=22). V této studii však bylo použito malého počtu pacientů a v protokolu klinické studie chyběla kontrolní (placebová) skupina (Tallaricco 2003). Objasnění role trimetazidinu v protekci antracyklinové kardiomyopatie si tedy vyžádá další studium.

V poslední době byly na *in vivo* modelech akcelerované kardiotoxicity (doxorubicin 1 mg/kg, i.p., 15 x za 3 týdny, resp. 5 mg/kg, 1 x týdně po 3 týdny) demonstrovány určité kardioprotektivní účinky erythropoetinu (Hamed 2006) a sildenafilu (Fisher 2005). Nicméně tyto pilotní výsledky je třeba ověřit a identifikovat mechanismy zodpovědné za kardioprotektivní působení.

Kardioprotektivní účinek celé řady látek byl experimentálně hodnocen na akutních *in vivo* modelech, kde byla jednorázově zvířatům podána celá kumulativní dávka antracyklinu nebo její velká část. Závěry těchto studií je třeba interpretovat velmi obezřetně, neboť tyto modely nerespektují charakter chronického srdečního poškození antracykliny. V žádném z uvedených experimentů nebyl vztah k chronické kardiotoxicitě důsledně validován. V akutním pokusu není ani dostatečně prostudováno protektivní působení dexrazoxanu. Je tedy možné, že jednorázové podání vysoké dávky antracyklinů vyvolává toxický účinek odlišným mechanismem narozdíl od opakovaného podávání v průběhu týdnů až měsíců. V literatuře lze najít i do značné míry protichůdné výsledky hodnocení potenciální kardioprotekce těžé látky na modelu akutním a chronickým. Herman na modelu chronické antracyklinové kardiomyopatie nepozoroval v podstatě žádné protektivní působení deferoxaminu (DFO), na rozdíl od dexrazoxanu, což koresponduje s jeho chemickou strukturou. DFO je poměrně hydrofilní molekula, a proto do buněk proniká pouze omezeně prostřednictvím endocytózy (Herman 1994). Naproti tomu, při užití akutního modelu bylo na - úrovni sérových biochemických markerů (např. kreatinkináza MB a laktátdehydrogenáza), markerů oxidačního stresu (např. stanovení redukovaného glutathionu, malonyldialdehydu) a histopatologického vyšetření myokardu - dokladováno protektivní působení této látky (Saad 2001). Obdobně protichůdné jsou i výsledky kardioprotektivních studií hodnotících různé antioxidanty (viz výše).

Na akutním modelu antracyklinové kardiotoxicity byl s převážně pozitivními výsledky studován vliv: vitamínu C (Fujita 1982), vitamínu A (Tesoriere 1994), glutathionu (Yoda 1986), selenu a WR-2721 (Dobric 1998), erdosteínu (Fadillioğlu 2003), flavanoidů (Sadzuka 1997), extraktů ze semen grepu (Bagchi 2003), L-karnitinu (Zeidan

2002), kurkuminu (Venkatesan 1998), trombopoetinu (Li 2006) a dalších látek. Hlavní komplikací chemoterapie obsahující antracyklinová antibiotika je však především chronická a pozdní kardiotoxicita, proto je nutné adekvátně prostudovat potenciálně protektivní účinek uvedených látek i po opakovaném podání antracyklinu.

4.2. Dexrazoxan

Dexrazoxan (ICRF-187) je ve vodě rozpustný S (+) enantiomer razoxanu (ICRF-159), jež je považován za hlavního představitele skupiny bisdioxopiperazinových derivátů strukturně příbuzných EDTA (ethylendiamintetraoctové kyselině). Razoxan byl původně vyvíjen jako protinádorové léčivo, což souvisí s jeho schopností inhibovat katalytickou aktivitu topoisomerázy II a následně indukovat apoptotickou smrt proliferujících buněk (Creighton 1969, Hasinoff 1998). Protinádorový účinek razoxanu byl pozorován v podmínkách *in vitro* i *in vivo*. Již v preklinické fázi byl též zaznamenán zajímavý antimetastatický a kardioprotektivní účinek (Poster 1980). V I. a II. fázi klinického hodnocení byla zjištěna pozitivní terapeutická odpověď u nádorů krku a hlavy, Kaposiho sarkomu, kolorektálního karcinomu aj. Razoxan je poměrně málo rozpustný ve vodě, proto mohl být podáván pouze perorálně. Ve vyšších dávkách byla zjištěna nízká biologická dostupnost tohoto léčiva podaného per os (Creaven 1975). Proto byl izolován pravotočivý optický isomer této látky – dexrazoxan, který umožnil (díky své cca 4x vyšší rozpustnosti ve vodě) intravenózní podání (Herman 1997).

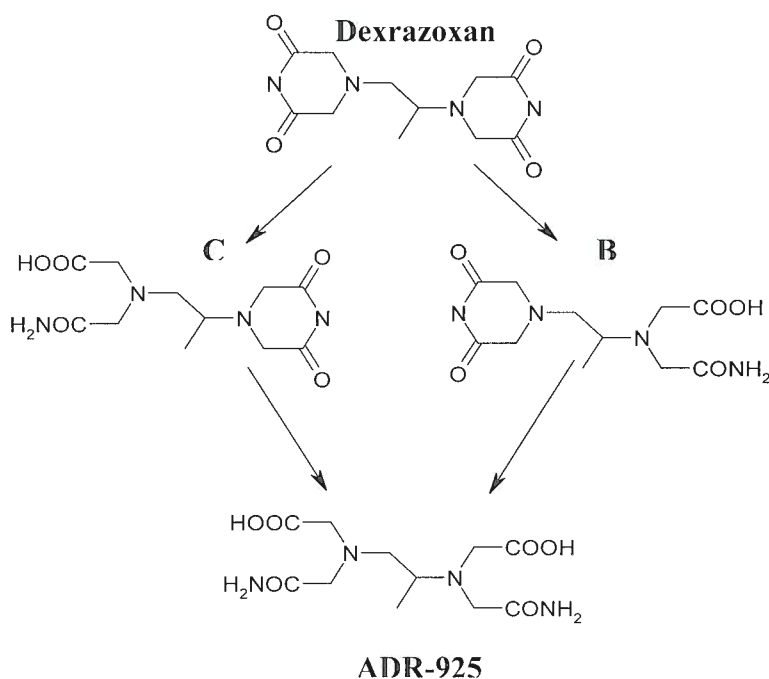
Jednou ze zajímavých vlastností, která byla zjištěna v průběhu preklinického vývoje razoxanu, je jeho kardioprotektivní účinek vůči antracykliny vyvolanému srdečnímu poškození. Je obecně akceptováno, že mechanismus protektivního účinku je dán železo-chelataujícími vlastnostmi této látky. Dexrazoxan je optimálně lipofilní a proto může snadno procházet biologickými membránami pasivní difúzí. Uvnitř kardiomyocytu pak dochází k bioaktivaci - enzymatická hydrolýza obou heterocyklů s katalytickou účastí enzymů dihydropyrimidinamidohydrolázy a dihydroorotázy (Schroeder 2002). Hydrolýza dexrazoxanu pobíhá přes meziprodukty (B, C) s jedním otevřeným cyklem a končí finálním metabolitem ADR – 925, který je velmi blízký EDTA (obr 8).

ADR-925 je silný chelátor železa se stabilitními konstantami 10^{10} a $10^{18,2}$ M^{-1} pro Fe^{2+} a Fe^{3+} . V podmínkách *in vitro* byla prokázána jeho schopnost odnímat ionty železa z komplexu Fe-antracyklin (Hasinoff 1989, Hasinoff 1993, Buss 1993). Dexrazoxan (respektive jeho aktivní metabolit) signifikantně snižuje produkci ROS, která byla

indukována různými antracyklinovými cytostatiky (Malisza 1996).

Teoreticky i komplex ADR-925 s ionty železa může produkovat volné radikály. Termodynamicky je ale tento jev málo pravděpodobný, a proto se v praxi uplatňuje pouze velmi málo. V tomto ohledu se redoxní vlastnosti komplexu ADR-925 s Fe značně liší od komplexů např. EDTA-Fe (Hasinoff 1995, Hasinoff 2003).

Na úrovni *in vitro* (izolované kardiomyocyty) bylo dokumentováno, že dexrazoxan (v závislosti na koncentraci) signifikantně omezuje oxidační stres indukovaný doxorubicinem (0,1-2 μM). Dexrazoxan také významně omezil výskyt programované buněčné smrti kardiomyocytů a závažného poškození mitochondrií. Zajímavé bylo zjištění, že nižší koncentrace daunorubicinu ($\approx 1 \mu\text{M}$) na modelu neonatálních potkaních kardiomyocytů indukovaly především apoptotickou smrt buněk, přičemž koncentrace nad 10 μM (tedy supratherapeutické) měly za následek téměř výhradně nekrotickou smrt. Preinkubace s dexrazoxanem zabránila apoptotické smrti srdečních buněk, avšak neměla již žádný vliv na masivní nekrózu buněk vyvolanou supratherapeutickými koncentracemi daunorubicinu. Uvedený závěr tedy dále podporuje hypotézu, že koncentrace antracyklinových cytostatik neovlivňuje pouze kvantitativní znaky kardiotoxicity, ale může mít i zásadní význam pro kvalitu navozených změn (Hasinoff 2003).



Obr. 8. Intracelulární hydrolýza dexrazoxanu. B a C jsou meziproducty s jedním otevřeným cyklem, ADR-925 je finální produkt enzymatické hydrolýzy dexrazoxanu.

Kardioprotektivní účinek dexrazoxanu byl ověřen na celé řadě preklinických modelů

chronické antracyklinové kardiotoxicity (Herman 1986, Herman 1988, Herman 1988, Dardir 1989, Alderton 1992, Herman 1993, Šimůnek 2004). Signifikantní stupeň kardioprotekce byl zaznamenán u různých antracyklinových derivátů (doxorubicin, daunorubicin, epirubicin a idarubicin), což potvrzuje společný mechanismus vzniku antracyklinové kardiotoxicity. V uvedených studiích provedených na několika živočišných druzích (myš, potkan, králík a pes) byly hodnoceny nejrůznější parametry určující funkční, morfologický a metabolický stav myokardu: srdeční výdej, ejekční frakce (frakční zkrácení) levé komory, morfologie levé komory, antioxidanty v myokardu, plazmatické koncentrace troponinu T, I aj. Například Herman et al. (2000), na modelu chronické doxorubicinové kardiotoxicity (1 mg/kg, 1 x týdně po 12 týdnů) u spontánně hypertenzních potkanů pozoroval 78% mortalitu v důsledků závažného poškození levé komory postihující více jak 1/4 kardiomyocytů (skóre 2-3 na stupnici dle Billinghamové u 71 % jedinců) s přítomností pleurálního výpotku a ascitu, naproti tomu dexrazoxan (25 mg/kg, i.p., 30 min před doxorubicinem) snížil mortalitu na 11 % při signifikantně lepším histopatologickém skóre (1, tj. < 5% kardiomyocytů poškozených bylo přítomno u 70 % zvířat). Při studiu různých dávkovacích schémat bylo zjištěno, že dexrazoxan je třeba podávat před (optimálně 30 min) nebo popř. zároveň s antracyklinem. Čím déle byl dexrazoxan aplikován po doxorubicinu, tím méně byl protektivní účinek patrný (Herman 1993). Dexrazoxan významným způsobem nemodifikuje farmakokinetický profil antracyklinových cytostatik, což vytvořilo předpoklad pro užití kombinace těchto léčiv v klinické praxi (Baldwin 1992, Cusack 2003).

Na preklinických modelech byl studován **extrakardiální protektivní účinek** dexrazoxanu. Bylo pozorováno významné zmírnění nefrotoxicity (glomerulární vakuolizace a skleróza, tubulární atrofie a dilatace s proteinovým precipitátem uvnitř tubulů a intersticiální lymfocytární infiltraací) indukované chronickým podáváním doxorubicinu (Herman 2000). Dexrazoxan (100 mg/kg, i.v.) také omezil vznik akutního nefrotického syndromu vyvolaného jednorázovou aplikací doxorubicinu (5 mg/kg, i.v.) potkanům (např. doxorubicinem navozena proteinurie $108,2 \pm 48,4$ mg/ml byla signifikantně snížena na $12,4 \pm 6,8$ mg/ml, Zima 1998). Intravenózně podaný dexrazoxan též signifikantně redukoval velikost tkáňového poškození po subkutánním podání doxorubicinu (Langer 2000, Jensen 2003).

Farmakokinetika dexrazoxanu po intravenózním podání odpovídá otevřenému dvoukompartmentovému modelu s eliminací probíhající dle kinetiky nultého řádu. Dexrazoxan se rychle distribuuje do tkání přičemž nejvyšší koncentrace byly zjištěny

v játrech, ledvinách a srdci. Nicméně neproniká hematoencefalickou bariérou do CNS. Vazba na plazmatické bílkoviny je minimální (méně než 2 %). Pokles plazmatických koncentrací dexrazoxanu je bifázický a je charakterizován biologickými poločasem eliminace $t_{1/2\alpha} = 15$ min, $t_{1/2\beta} = 140$ min (udávané je i rozmezí 120-240 min). Metabolizován je pomocí enzymu dihydropyrimidinamidohydrolázy a dihydroorotázy (viz výše). Mateřská látka je, stejně jako hydrolytické produkty, významnou měrou eliminována ledvinami (Wiseman 1998). V experimentálních i klinických podmínkách byla vyloučena signifikantní farmakokinetická interakce dexrazoxanu s antracykliny. (Basser 1994, Hochster 1992, Minotti 2004).

Klinický účinek dexrazoxanu byl prokázán v několika studiích u pacientů s různým typem nádoru (přehled je uveden v tab. 4). Bylo zjištěno, že dexrazoxan působí kardioprotektivně u dětí i dospělých, kterým byla podávána různá antracyklinová cytostatika. Například Spyer et al (1992) zjistil, že u pacientek s pokročilým nádorem prsu vyžadujícím vyšší kumulativní dávky doxorubicinu (FDC protokol viz tab. 4) musela být z důvodu kardiotoxicity léčba ukončena u 50 % pacientek v placebové skupině, zatímco za stejných podmínek chemoterapii přerušilo pouze 8 % pacientek v dexrazoxanové skupině (14 pacientek dosáhlo dávky > 1000 mg/m² a to bez známek kardiotoxicity). Ve studii provedené Swainem et al. (1997) se srdeční selhání rozvinulo u 8 % pacientek léčených doxorubicinem (FDC protokol viz tab. 4) a placebem, zatímco ve stejném uspořádání pouze u 1 % pacientek léčených doxorubicinem a dexrazoxanem. V dexrazoxanem léčené skupině byl též zjištěn nižší výskyt protokolem studie definovaných srdečních obtíží (31 vs. 14 %). Z dalších uvedených prací také vyplývá, že podáním dexrazoxanu lze významným způsobem omezit vznik jak klinické, tak i subklinické kardiotoxicity (Elbl 2002b). Dexrazoxan je dosud jediným léčivem, u něhož byl prokázán signifikantní protektivní účinek vůči chronické kardiotoxicitě antracyklinů v kontrolovaných klinických studiích. Nezodpovězenou ovšem stále zůstává otázka potenciálního protektivního působení vůči pozdní kardiotoxicitě antracyklinů. Sledování pacientů v tomto dlouhodobém horizontu stále probíhá. Z posledních výsledků se ovšem zdá, že dexrazoxan chrání myokard i proti pozdní antracyklinové kardiotoxicitě (Elbl 2006).

Názor na optimální indikaci a dávku pro zahájení terapie dexrazoxanem je stále nejasný. V České republice je dexrazoxan (Cardioxane, Novartis) registrován pro prevenci kardiotoxicity způsobené cytostatickou léčbou chemoterapeutickými režimy obsahujícími antracykliny bez další specifikace (SPC, Cardioxan). Zvláštní skupinu tvoří nemocní do 18 let. Vzhledem k žádoucímu dlouhodobému přežití je cílem eliminovat

riziko možného pozdního poškození srdce, a proto může být dexrazoxan indikován u těchto pacientů. U dospělých je dexrazoxan podáván pacientům, u kterých je očekávána kurativní odpověď na vyšší dávku antracyklinů, nebo u nichž je přítomno několik rizikových faktorů. V posledním doporučení American Society for Clinical Oncology (aktualizace 2002) se uvádí, že užití dexrazoxanu by mělo být zváženo u pacientek s metastazujícím karcinomem prsu nebo u pacientů s jinými malignitami při kumulativní dávce doxorubicinu vyšší než 300 mg/m² (Schuchter 2002). Ačkoliv nové studie (Moqrabi 2007) dokládají signifikantní kardioprotektivní účinek dexrazoxanu bez omezení odpovědi nádoru na léčbu (mj. žádný rozdíl v celkovém přežití bez příznaku nemoci do 5-ti let po léčbě) i při léčbě dětských malignit, pro tyto indikace zatím nejsou dostupná žádná klinická doporučení odborných společností. Obvykle se dexrazoxan podává v dávce 1000 mg/m² půl hodiny před antracyklinem (Elbl 2002).

Autor (rok)	Počet pacientů	Pacienti	Fáze / Typ studie	Chemo-terapie	Typ nádoru	Vliv na chemoterapii
Spyer (1992)	150	dospělí	III, R, nb	FDC	CaM	ne
Bu'Lock (1993)	10	děti	I	DOX	sarkom	ne
Huinink (1992)	86	dospělí	III	FDC	CaM	ne
Jelic (1995)	35	dospělí	II	FDC	CaM	ne
Kolaric (1995)	237	dospělí	II, nc	FDC	CaM	ne
Wexler (1996)	38	děti	II, R,	DOX	sarkom	ne
Venturi (1996)	162	dospělí	III, R, db, mc	FEC	CaM	ne
Swain (1997)	534	dospělí	III, R, db,mc	FDC	CaP	ano?
Lopez (1998)	95	dospělí	III,R, nb	FEC	CaM	ne
Lopez (1998)	34	dospělí	III, R, nb	FEC	sarkom	ne
Sparano (1999)	25	dospělí	I	DOX+P	CaM	ne

Tab. 4. Přehled klinických studií hodnotících kardioprotektivní působení dexrazoxanu.

R – randomizovaná studie, nb – nezaslepená, db – dvojité zaslepená, mc – multicentrická studie, FDC = 5-fluoruracil + doxorubicin + cyklofosfamid, DOX = doxorubicin, P = paklitaxel, CaM = karcinom prsu, CaP = karcinom plic.

Ze studie publikované Swainovou et al. (Swain 1997, viz též tab. 4) vyvstala otázka zda dexrazoxan negativním způsobem neovlivňuje protinádorovou účinnost. V této zprávě se autoři věnují dvěma klinickým studiím, které tvořily III. fázi klinického hodnocení dexrazoxanu, s téměř identickým uspořádáním (pacientky s pokročilým nádorem prsu,

chemoterapeutický režim FDC - fluoruracil, doxorubicin, cyklofosfamid). V první studii (n=190) nebyl zaznamenán rozdíl v protinádorové odpovědi mezi skupinou, která dostávala dexrazoxan s spolu s FDC a skupinou dostávající placebo. V druhé studii (n=204) však byla zjištěna rozdílná míra odpovědi (hodnocena podle odpovědi tumoru na léčbu). Zatímco u cca 48 % pacientů byl zaznamenán ústup nádoru po léčbě FDC + dexrazoxan, ve skupině FDC + placebo byla zjištěna odpověď u 61 % nemocných, přičemž rozdíl byl statisticky významný. V následujícím přehledu expertní skupiny na toto téma (expert panel review, Swain 2004) byla tato studie podrobně analyzována a bylo konstatováno, že protinádorová odpověď v dexrazoxanové skupině odpovídá hodnotám obvykle pozorovaným, avšak v placebové skupině byla z neznámého důvodu odpověď vyšší. Z uvedeného vyplývá, že dexrazoxan ani v této studii protinádorovou odpověď nesnížil. Tento závěr je ve shodě s výsledky všech ostatních uskutečněných klinických i preklinických studií a je podporován též meta-analýzou randomizovaných klinických studií zahrnujících 818 pacientů (Seymour 1999). Také další parametry úspěšnosti protinádorové léčby obsahující antracykliny (konkrétně fluoruracil+doxorubicin+cyklofosfamid, fluoruracil+epirubicin+cyklofosfamid), jako je celková doba přežití, či doba přežití bez progresu onemocnění, nebyly v uvedené studii dexrazoxanem signifikantně změněny stejně jako ve studiích ostatních (Swain 2004). Také nové klinické studie dokládají, že účinná kardioprotekce pomocí dexrazoxanu nesnižuje protinádorovou aktivitu antracyklinových cytostatik (Marty 2006).

Významným omezením užití dexrazoxanu v profylaxi antracyklinové kardiomyopatie však mohou být jeho toxické účinky. Klinicky významná je především myelosuprese, která limituje dávku (nicméně vyskytuje se až při relativně vysokých dávkách léčiva). Je vysvětlován inhibicí topoisomerázy II a/nebo inhibicí ribonukleotidreduktázy (enzym se zásadním významem pro syntézu DNA). Podání dexrazoxanu může mít za následek synergismus, protože myelosuprese je jedním z typických toxických účinků většiny chemoterapeutických režimů (Wiseman 1998). Dalším faktorem, který též může být příčinou relativně nízkého užívání dexrazoxanu v klinické praxi, je jeho vysoká cena. Nicméně byly publikovány farmakoekonomické analýzy užití dexrazoxanu v profylaxi antracyklinové kardiomyopatie založené na údajích z výše diskutovaných randomizovaných klinických studií. Závěry těchto prací ukazují, že terapie dexrazoxanem je nákladově-efektivní. Náklady na prevenci jednoho srdečního poškození vzniklého v důsledku terapie FDC pomocí dexrazoxanu byly vyčísleny na cca 5600 USD, přičemž prodloužení života o jeden rok s užitím této terapie vyžaduje cca 2800 USD. Příznivá

klinická i ekonomická hlediska tedy podporují užití dexrazoxanu v klinické praxi (Tonkin 1996, Bates 1997).

4.3. Další chelátory železa jako kardioprotektiva

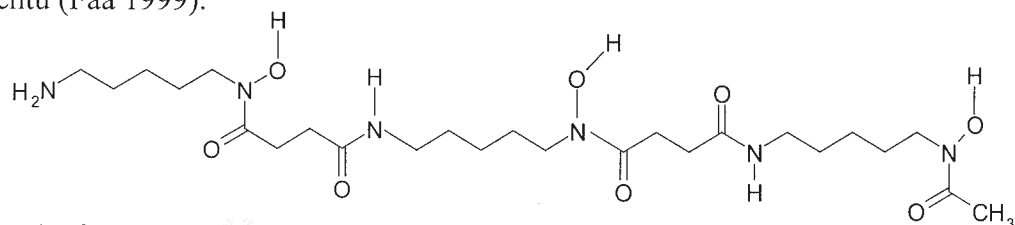
Chelatace železa je dosud jedinou klinicky úspěšnou strategií kardioprotekce vůči srdečnímu poškození indukovanému antracykliny. Zatím se ovšem nepodařilo vyvinout další látku s železo-chelatačními vlastnostmi, která by vykazovala vhodnější, nebo alespoň podobné vlastnosti jako dexrazoxan. Důvodem je především nedostatek vhodných biokompatibilních chelátorů železa, tedy látek se selektivním železo-chelatuujícím účinkem a nízkou toxicitou. Většina chelátorů, které se užívají např. laboratorně, je pro svou nízkou specifitu chelatačního účinku nevhodná pro podání živým organismům. Zde by totiž významnou měrou tvořily komplexy s četnými biogenními prvky (Ca^{2+} , Zn^{2+} atd) a tak zasahovaly do důležitých fyziologických funkcí. Navíc většina běžných chelatačních látek tvoří komplex, který není redoxně inaktivní.

V současné době je k dispozici pouze velmi omezené množství terapeuticky použitelných chelátorů železa. Tyto látky byly v minulosti vyvinuty pro léčbu přetížení organismu železem. Mezi klinicky využitelné chelátory železa patří deferoxamin (DFO), deferipron (L1) a nově je v klinickém hodnocení látka ICL670.

Deferoxamin (DFO)

Deferoxamin (desferrioxamin, DFO) je přirozeně se vyskytující šestivazný (hexadentátní) chelátor železa, který tvoří komplexy s Fe v poměru 1:1. Patří do skupiny tzv. sideroforů, nízkomolekulárních sloučenin produkovaných aerobními a fakultativně anaerobními mikroorganismy. Chemicky je to tris-hydroxámová kyselina (obr. 9), která byla objevena na začátku šedesátých let Prelogem et al, jako metabolický produkt mikroorganismu *Streptomyces pilosus* (Faa 1999).

Vzhledem k chemické struktuře (přítomnost řady hydrofilních skupin a molekulová hmotnost cca 500) má DFO nízkou biologickou dostupnost po perorálním podání. Jako nejefektivnější se proto jeví podání tohoto léčiva formou kontinuální subkutánní infúze po dobu 8 – 12 hodin. DFO má značně krátký biologický poločas eliminace (5-10 min). Z výše uvedených důvodů DFO proniká pouze v omezeném množství do intracelulárního kompartmentu (Faa 1999).

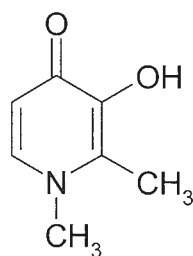


Obr. 9. Chemická struktura DFO

Po úspěchu dexrazoxanu v protekci myokardu vůči antracyklinové kardiotoxicitě byla pozornost upřena k dalším látkám s chelatačním účinkem. Mezi prvními byl tudíž studován potenciálně protektivní účinek DFO, s nímž byly tou dobou největší zkušenosti. Ačkoliv byl zaznamenán určitý stupeň kardioprotekce DFO na akutním *in vivo* modelu doxorubicinové kardiotoxicity (Saad 2001), na modelu chronické doxorubicinové kardiomyopatie nebylo pozorováno žádné kardioprotektivní působení tohoto léčiva. Dexrazoxan (podávaný za stejných podmínek jako DFO) vykazoval signifikantní stupeň kardioprotekce a sloužil zde jako referenční látka. Autoři vysvětlují absenci protektivního působení DFO odlišným kompartmentem v němž tyto látky uplatňují své železo-chelatační vlastnosti. Jak již bylo výše uvedeno, DFO díky svým fyzikálně chemickým vlastnostem proniká do intracelulárního prostoru jen omezeně. Z tohoto důvodu tedy DFO patrně nemůže účinně vyvazovat ionty železa v kardiomyocytech, kde ionty tohoto kovu katalyzují biochemické reakce vedoucí k produkci ROS.

Deferipron

Deferipron (L1, obr. 10) je syntetické léčivo, které bylo prvně připraveno Hiderem a následně patentováno (1982) jako potenciální alternativa k DFO v léčbě onemocnění spojených s přetížením organismu železem (Faa 1999). L1 je dosud jediný perorálně účinný chelátor železa. Patří mezi dvojvazné (bidentátní) chelátory a tvoří s Fe komplexy 3:1. Díky relativně nízké molekulové hmotnosti ($M_r = 139$) a dostatečné lipofilitě proniká intracelulárně a může zde tedy uplatňovat své chelatační vlastnosti. Přestože v průběhu klinických zkoušek byl deferipron podán již tisícům pacientů, dosud neexistuje shoda v otázce jeho bezpečnosti (riziko jaterní fibrózy) a schopnosti navodit negativní bilanci Fe u pacientů s iron-overloadem (Brittenham 2003).



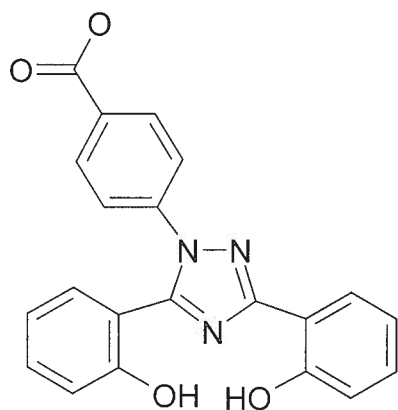
Obr. 10. Chemická struktura deferipronu (L1)

Vysoká Fe-chelatační účinnost a průnik do intracelulárního kompartmentu vytváří podmínky kardioprotektivního působení. Nicméně v literatuře lze nalézt pouze dvě experimentální práce zabývající se touto problematikou (Hasinoff 2002, Xu 2006). První studie byla provedená v *in vitro* podmínkách na modelu primárních neonatálních

kardiomyocytů inkubovaných s doxorubicinem. Deferipron v klinicky dosažitelných koncentracích (2 a 5 μM) významně snížil doxorubicinem (0,6 μM) navozené uvolnění laktát dehydrogenázy do inkubačního media. V tomto pokusu bylo též prokázáno, že deferipron relativně rychle vyvazuje volné ionty železa z komplexu s antracykliny a protektivní působení tohoto chelátoru v (Hasinoff 2002). Na eventuální kardioprotektivní potenciál této látky též poukázala recentní práce provedená na modelu izolovaných spontánně bijících síní (Xu 2006). Deferipron významně zmírnil známky oxidačního stresu, patologické změny v mitochondriální morfologii a poruchu kontraktility davozené inkubací s doxorubicinem (30 μM). Potenciální kardioprotektivní působení deferipronu si tedy vyžaduje další studium na relevantním chronickém *in vivo* modelu antracyklinové kardiotoxicity.

ICL670

ICL670 ($M_r = 373$) je zástupcem nové skupiny chelátorů železa – derivátů bis-hydroxyfenyltriazolu (Tim 2003, obr. 11). Jedná se o trojvazné (tridentátní) chelátory, které tvoří komplexy s Fe v poměru 2:1. Uvedené látky se vyznačují vysokou afinitou k Fe^{3+} a značnou lipofilitou. V současné době je ICL670 ve II. fázi klinického zkoušení (Galanello 2003).



Obr. 11. Chemická struktura ICL670

Vzhledem k relativně časně fázi vývoje látky ICL670 je dostupné pouze omezené množství informací o uplatnění této látky mimo oblast hlavní indikace - přetížení organismu železem. V pilotní *in vitro* studii byla hodnocena za obdobných podmínek jako dexrazoxan a deferipron, nicméně s negativním výsledkem. Na zvoleném modelu se (na rozdíl od uvedených látek) jevila ICL670 jako toxičtější, což by bylo možné vysvětlit její vysokou lipofilitou a možným vyvazováním Fe např. z enzymů (Hasinoff 2003)

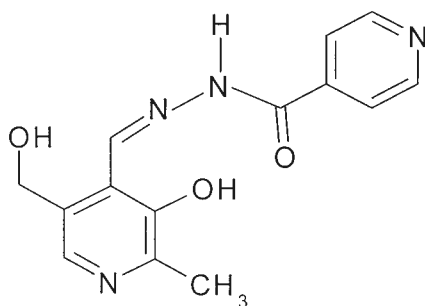
5. Nové chelátory železa - pyridoxal isonikotinoyl hydrazon (PIH) a jeho analoga

5.1. Pyridoxal isonikotinoyl hydrazon

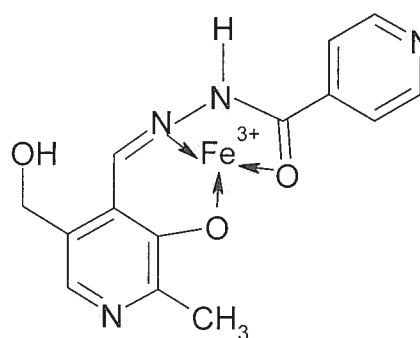
Chelatační účinek pyridoxal isonikotinoyl hydrazonu (PIH) byl objeven Ponkou et al. na konci 70-tých let. V experimentu, kde byly retikulocyty inkubovány s transferinem (s navázaným ^{59}Fe) a izoniazidem (INH je inhibitor hemové syntézy), bylo zjištěno, že se Fe hromadí v různých non-hemových kompartmentech. Autoři zaznamenali, že po přidání pyridoxalu do inkubačního média se z buněk mobilizuje značné množství Fe. Bylo prokázáno, že tento jev byl způsoben přítomností PIH jako produktu chemické reakce mezi pyridoxalem a INH v daném prostředí (Ponka 1979).

5.1.1. Chemická struktura a vlastnosti PIH a jeho analogu

Pyridoxal isonikotinoyl hydrazon (PIH, obr. 12) je sloučenina, kterou lze syntetizovat poměrně rychlým, jednoduchým a efektivním způsobem. Výchozími látkami pro syntézu jsou pyridoxal (vitamin B₆) a izoniazid (INH, antituberkulotikum), tedy látky jasně definované, levné a komerčně dostupné. Poprvé byla tato látka připravena již v 50-tých letech jako potenciální antituberkulotikum odvozené od izoniazidu. Kromě nezanedbatelného antimykobakteriálního působení PIH v podmínkách *in vitro* i *in vivo*, experimentátoři zjistili i protinádorové působení na myším modelu leukémie (Richardson 1995, Buss 2002).



Obr. 12. Chemická struktura PIH



Obr. 13. Komplex PIH-Fe³⁺ (1/2)

Tato látka byla chemicky a fyzikálně definována. Pyridoxal isonikotinoyl hydrazon je molekula o poměrně malé hmotnosti ($M_r = 287$) a relativně vysoké lipofilítě. Jedná se o

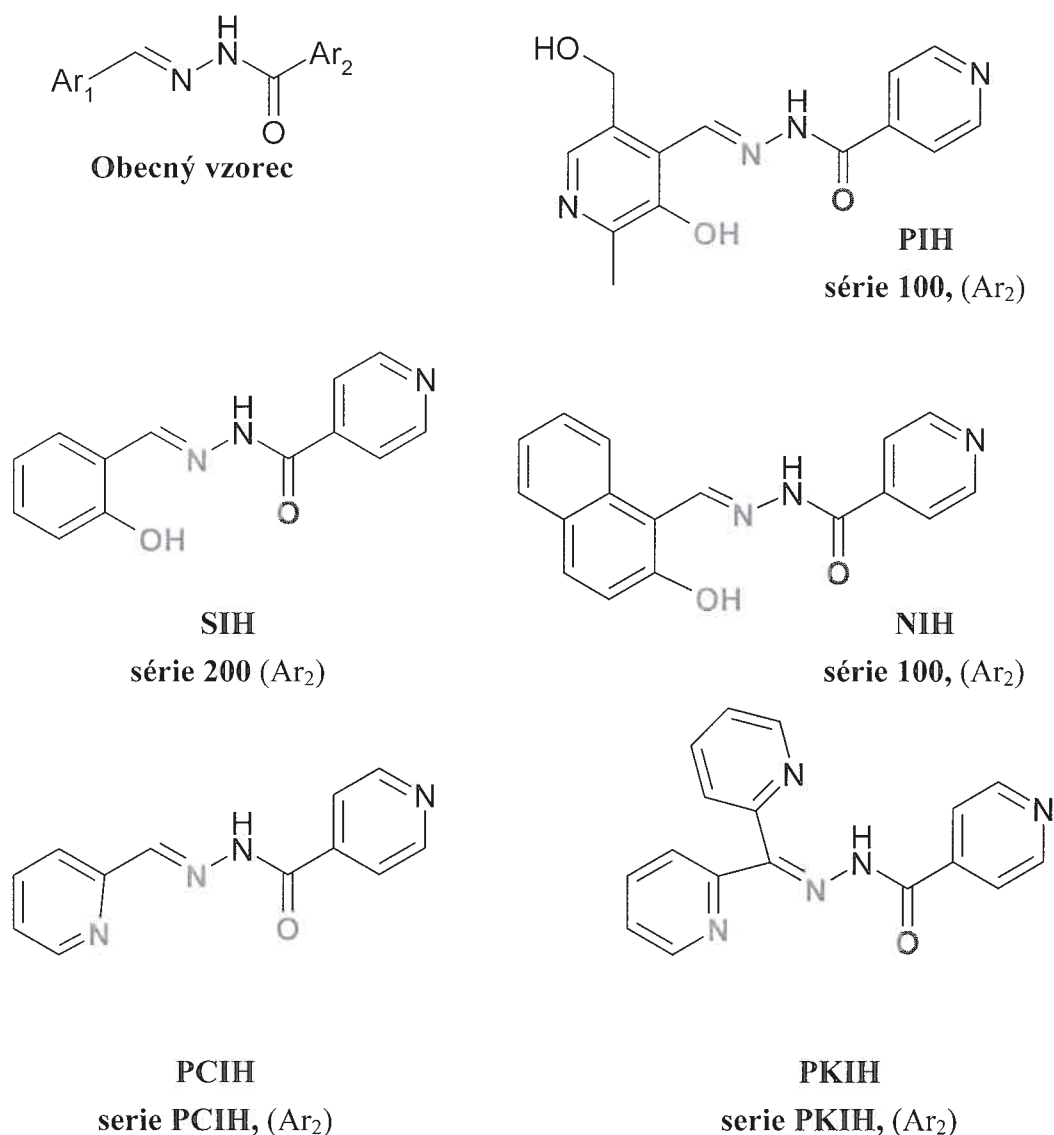
krystalickou látku nažloutlé až intenzivně žluté barvy, přičemž různé soli (hydrochloridy, sulfáty ap) či hydráty se mohou barvou lišit. PIH - volná base je látka poměrně obtížně rozpustná ve vodném prostředí.

Tento fakt vedl experimentátory k aplikaci suspenze PIH base, nebo k alespoň částečnému rozpuštění PIH s užitím různých kosolventů (např. 10% Cremophor EL). Nejnovější přínos v optimalizaci rozpustnosti PIH je patent USA, který popisuje přípravu diprotonizovaných solí PIH (PIH . 2HCl apod.), které vynikají svou až o 2 řády vyšší rozpustností při zachovaném chelatačním působení (Patent USA No 005834492A). Další chemickou vlastností společnou pro všechny hydrazonové analogy je schopnost podstupovat hydrolytickou degradaci v kyselém či zásaditém prostředí, jejíž produktem jsou výchozí reaktanty syntézy hydrazonu (Richardson 1989, Kovarikova 2006). Uvedená skupina látek však donedávna nebyla dostatečně analyticky definována. Pro analýzu PIH a jeho analogů byla totiž dostupná pouze metodika pro UV-spektrofotometrii a ze separačních metod k byla dispozici jen tenkovrstvá chromatografie (TLC). Moderní citlivé a selektivní analytické metody byly vyvinuty relativně nedávno v souvislosti se spoluprací na studii, která je součástí předkládané dizertace (Kovarikova 2004, 2006, Mrkvickova 2007).

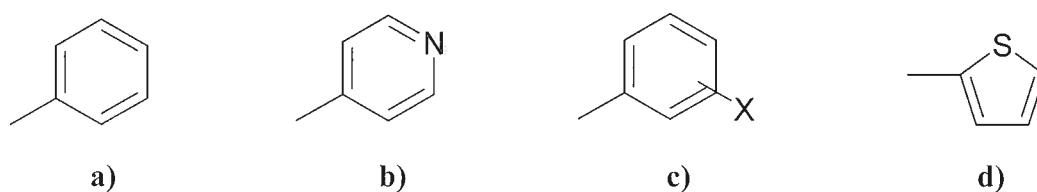
Na rozdíl od některých jiných chelátorů lze PIH pokládat za značně selektivní ligand. Za fyziologických podmínek má relativně nízkou afinitu k Ca^{2+} a Mg^{2+} , má však (stejně jako jeho analogy) určitou afinitu k Zn^{2+} (*in vitro* se v těchto vlastnostech podobá DFO). Studie *in vivo* sledující biliární exkreci Zn^{2+} však tuto vlastnost PIH nepotvrdily (na rozdíl od DFO (Buss 2002).

5.1.2. Analogy PIH

V dnešní době PIH představuje spíše „mateřskou“ látku skupiny aroylhydrazonových chelátorů železa, od které byla odvozena celá řada analogů lišících se svými fyzikálně chemickými i biologickými vlastnostmi. Dosud bylo syntetizováno několik set analogů PIH, a to Schiffovou kondenzací aromatických aldehydů s aromatickými hydrazidy. Většina látek byla odvozena od pyridoxal isonikotinoyl hydrazonu (série 100, PIH), salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazonu (série 200, SIH) a naftaldehyd isonikotinoyl hydrazonu (série 300, NIH), 2-pyridylkarbaldehyd isonikotinoyl hydrazonu (série PCIH), di-2-pyridylketon isonikotinoyl hydrazonu (série PKIH) (obr.14).



Obr. 14. Chemická struktura analogů PIH. Ar₁ a Ar₂ jsou aromatické cykly nebo heterocykly; jednotlivé řady (100, 200, 300, PCIH série, PKIH série) se liší Ar₁, přičemž uvnitř série se látky liší různým Ar₂. PIH = pyridoxal isonikotinoyl hydrazon, SIH = salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon, NIH = naftaldehyd isonikotinoyl hydrazon, PCIH = 2-pyridylkarbaldehyd isonikotinoyl hydrazon, PKIH = di-2-pyridylketon isonikotinoyl hydrazon. Tučně jsou zvýrazněny části molekuly důležité pro tvorbu komplexu.



Obr. 15. Příklady chemické struktury Ar₂ analogů PIH. a) fenyl, b) 4-pyridyl, c) o, m, p-substituovaný halogen fenyl, d) thiofenyl.

5.2. PIH a jeho analoga v *in vitro* studiích

5.2.1. Mobilizace iontů Fe z buněk (*in vitro*)

První studie, která se zabývala chelatačními vlastnostmi PIH, byla publikována v návaznosti na pozorování, že PIH vzniklý spontánně *in situ* v inkubačním mediu je schopen účinně mobilizovat volné ionty železa z retikulocytů (Ponka 1979). Následně byla extenzivně studována možnost snížit nadměrné množství volného Fe v různých typech buněk (hepatocyty, makrofágy, retikulocyty, Changovy buňky aj.) pomocí PIH (Ponka 1988). Tyto experimenty se staly základem pro jednoduchý *in vitro* model pro hodnocení nových chelátorů železa, které by mohly být užity v léčbě přetížení organismu železem. Bylo prokázáno, že PIH je vysoce účinným a Fe-selektivním chelátorem se značnou schopností mobilizovat Fe z buněk. Dále se potvrdilo, že pro mobilizaci Fe z buněk není schopnost chelátoru utvářet komplexy s Fe jediným určujícím faktorem. Zásadní význam mají totiž i další fyzikálně-chemické vlastnosti chelátoru a/nebo komplexu chelátor-Fe (Buss 2002). Podrobně byla na tomto jednoduchém modelu zkoumána kinetika mobilizace Fe z buněk. V komparativních studiích se ukázal být PIH významně účinnější než referenční DFO ve snižování přebytku značeného ^{59}Fe z králičích retikulocytů.

Pozitivní výsledky experimentů s PIH podnítily studium celé řady jeho analogů. Několik analogů PIH vykazovalo významně vyšší schopnost mobilizovat Fe z králičích retikulocytů a K562 buněk. Mezi nejzajímavější látky vzešlé z *in vitro* screeningu patří **salicyladehyd isonikotinoyl hydrazon (SIH)**, **pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazon (látka o-108)**, **pyridoxal 2-fluorobenzoyl hydrazon (látka o-109)**, **2-hydroxynaftaldehyd isonikotinoyl hydrazon (NIH, 311)**. SIH byl výrazně účinnější v indukci uvolnění železa z K562 buněk v porovnání s DFO, L1 i celou sérií jejich derivátů (Zanninelli 1997). Uvedené experimenty dokladují význam dalšího výzkumu analogů PIH jako potenciálních léčiv pro léčbu iron-overloadu.

5.2.2. Antioxidační a cytoprotektivní vlastnosti PIH a jeho analogů (*in vitro*)

Oxidoredukční vlastnosti iontů železa umožňují jedoelektronový přechod mezi jeho dvojmocnou a trojmocnou formou (Fe^{2+} a Fe^{3+}). Tato vlastnost činí ionty železa nejen velmi významné pro humánní fyziologii, ale potenciálně i značně rizikové. Jak již bylo uvedeno, **ionty železa mohou katalyzovat tzv. Haber-Wiessovu reakci**, jejímž produktem jsou extrémně toxické **hydroxylové radikály**. Z tohoto důvodu je volné železo za fyziologických podmínek přítomné v tělních tekutinách jen ve velmi nízkých koncentracích. Přesun a ukládání železa je tedy vázáno na transportní a zásobní proteiny

(transferin a feritin). Při přetížení organismu železem však mohou být tyto mechanismy přesyceny a volné ionty železa pak mohou být příčinou oxidačního stresu (zvláště citlivý je myokard).

Bylo ale zjištěno, že **ionty železa se mohou významně podílet na tvorbě ROS i v případě, že v organismu nejsou přítomny v nadbytku**. Za určitých patologických stavů (ischémie-reperfúze, expozice oxidačně aktivním látkám) může být narušena jinak pečlivě regulovaná buněčná homeostáza železa. Při oxidačním stresu nebo v důsledku sníženého intracelulárního pH se ionty železa neregulovaně uvolňují z vazby na feritin a značně se tak zvyšuje koncentrace katalyticky aktivních iontů železa (Voogd 1992, Chevion 1993).

Za těchto okolností je možné předpokládat, že **látky s chelatačními vlastnostmi mohou účinně předcházet oxidačnímu stresu**. Komplex chelátor-Fe, však musí být redoxně inertní, tj. nesmí se významnou měrou katalyticky uplatňovat v Haber-Weissově reakci. Je známo, že komplex EDTA-Fe je redoxně aktivní a v přítomnosti redukčně aktivních látek (např. askorbátu) může tento chelát katalyzovat Haber-Weissovu reakci. Z uvedených důvodů je samotná EDTA jako potenciální antioxidant zcela nevhodná. DFO (dosud nejužívanější chelátor železa) účasti Fe v produkci ROS účinně zabraňuje, nicméně farmakologický význam této vlastnosti je značně limitován nesnadným průnikem molekuly DFO do intracelulárního kompartmentu (Richardson 1998).

Pyridoxal isonikotinoyl hydrazon působil signifikantně antioxidantně v různých biochemických (*in vitro*) modelech - železem indukované tvorby hydroxylových radikálů (Hermes-Lima 1999), oxidaci 2-deoxyribózy (Hermes-Lima 2000), tvorbě askorboylového radikálu (Mauricio 2003) peroxidaci lipidů (Santos 2001) a indukci zlomů plazmidové DNA (Hermes-Lima 1998). V řadě experimentů bylo působení PIH srovnáno s referenčním DFO, přičemž PIH vykazoval ekvivalentní či vyšší antioxidantní účinek než DFO. PIH v mikromolárních koncentracích dovedl signifikantně zabránit tvorbě hydroxylových radikálů katalyzovaných komplexem EDTA-Fe (v přítomnosti askorbátu) (Hermes-Lima 2000).

V otázce antioxidantního působení je z **analogů PIH** věnována největší pozornost **SIH**. Výrazný antioxidantní účinek SIH byl pozorován již ve výše zmiňovaných experimentech. Poměrně recentní práce dále studovala schopnost SIH ochránit izolované spontánně kontrahující se kardiomyocyty před mohutným oxidačním stresem indukovaným 100 μ M peroxidu vodíku. Preinkubace (15 min) spontánně kontrahujících se kardiomyocytů s mikromolárními koncentracemi SIH zabránila signifikantním změnám

kontraktility. Za identických podmínek bylo hodnoceno i protektivní působení DFO, který byl několikanásobně méně účinný. Přibližně stejných výsledků jako u SIH bylo dosaženo až s užitím přibližně 5-ti násobné koncentraci DFO při dvojnásobně prodloužené době sledování. **Vyšší protektivní účinek SIH** autoři vysvětlují snadnějším vstupem tohoto chelátoru do intracelulárního kompartmentu (Horáčková 2000).

Významné **protektivní působení SIH** též vyplývá z relativně nových experimentů (Šimůnek 2005). Inkubace buněčné linie H9c2 (odvozené od potkaních kardiomyoblastů) po dobu 24 h s peroxidem vodíku v koncentraci 100 μM indukovala signifikantní vzestup intracelulární koncentrace ROS a vznik závažné mitochondriální dysfunkce (mitochondriím je přisuzována ústřední role v buněčném energetickém metabolismu a apoptotické signalizaci). Dále tento masivní oxidační inzult vyvolal statisticky významný časově závislý nárůst nekroticky i apoptoticky zanikajících buněk. Preinkubace (1 h) těchto buněk se SIH nebo SIH.HCl v koncentracích $\geq 3 \mu\text{M}$ kompletně zabránila všem studovaným projevům cytotoxicity. Byla dokumentována klíčová úloha Fe ve studované cytotoxicitě pomocí přidání iontů Fe do inkubačního média, což mělo za následek kompletní potlačení sledovaného protektivního působení. Referenční chelátor železa DFO vykazoval za stejných podmínek pouze částečnou protekci v řádově vyšších koncentracích. Protektivní účinek, avšak v menší míře než u SIH, byl pozorován i u PIH, o-108 a o-109. Na obdobném modelu autor též v pilotních experimentech pozoroval protektivní působení SIH vůči znakům cytotoxicity indukované inkubací buněk H9c2 s 10 μM daunorubicinu. (Šimůnek 2005).

5.2.3. Antiproliferativní a antimikrobiální účinky PIH a jeho analogů (*in vivo*)

Ionty železa, přítomné mimo jiné v řadě enzymů, sehrávají zásadní úlohu v klíčových fyziologických procesech, jako je energetický metabolismus či syntéza DNA. Nádorové buňky více exprimují transferinový receptor 1 (TfR1), což také signalizuje vyšší potřebu iontů železa pro tyto velmi rychle proliferující buňky. Narozdíl od normálních buněk, jsou **maligně transformované buňky značně citlivé k dočasné deprivaci železa**. Blokáda TfR1 prostřednictvím monoklonální protilátky signifikantně inhibuje proliferaci nádorových buněk (Kemp 1992). Proto je věnována pozornost **antiproliferativnímu působení chelátorů železa**. Vzhledem k omezené nabídce komerčně dostupných chelátorů železa vhodných pro podání do organismu, se větší část úvodních experimentů věnovala DFO. Z výsledků několika studií vyplývá, že selektivní deprivace iontů železa pomocí DFO inhibuje proliferaci nádorových buněk (Donfrancesco 1996). Omezený průnik tohoto

chelátoru do intracelulárního kompartmentu je však pravděpodobně významnou překážkou jeho protinádorového účinku.

Jedním z nejvýznamnějších intracelulárních **cílů pro chelátory železa je enzym ribonukleotidreduktáza (RR)**. Tento enzym má esenciální význam pro syntézu DNA a skládá se ze dvou podjednotek. Podjednotka RR1 má za úkol vázat ribonukleotidy jakož i alosterické efekторы, zatímco podjednotka RR2 obsahuje tyrosinový radikál, jenž je stabilizován pomocí iontů železa. Látky inhibující ribonukleotid reduktázu (podjednotku RR2) tak inhibují proliferaci nádorových buněk a spouštějí apoptotickou signalizaci. Z pilotních experimentů vyplývá, že inhibitory RR mohou zcitlivovat nádorové buňky vůči účinku doxorubicinu a cisplatiny (Lin 2004).

Bylo prokázáno, že **několik analogů PIH relativně selektivně inhibuje proliferaci a indukuje apoptotickou buněčnou smrt nádorových buněk**. Například látka odvozená od NIH, konkrétně 2-hydroxynaftaldehyd isonikotinoyl hydrazon (látka 311), velmi účinně inhibuje ribonukleotidreduktázu. Inhibice ribonukleotidreduktázy koreluje s jejím antiproliferativním působením na několika nádorových buněčných liniích. Uvedený účinek byl potlačen pomocí přidání železa do inkubačního média (Chaston 2003). Obdobné výsledky byly též zjištěny i u některých dalších vzdálenějších analogů dipyridylketon isonikotinoyl hydrazonové řady (PKIH řada) (Becker 2003). Další pokusy prokázaly, že SIH a NIH indukují apoptotický zánik nádorových buněk v koncentracích dosažitelných *in vivo* (Buss 2003). I tento účinek byl potlačen přidáním iontů železa. Nejpokročilejší je dosud vývoj thiosemikarbazonového analogu, který též nese určitou strukturální podobnost k PIH. Tato látka (s chráněným názvem Triapine[®]) je nyní v USA ve II. fázi klinického hodnocení jako protinádorové chemoterapeutikum (Chaston 2003, Kalinowski 2005).

Zajímavé je též zjištění, že nejen nádorové buňky, ale též **řada patogenních mikroorganismů je (na rozdíl od hostitele) citlivá k dočasné deprivaci železa**. Z analogů PIH je dosud nejvíce důkazů o **antimalarickém působení SIH a 1-hydroxynaftylaldehyd 2-fluorobenzoyl hydrazonu** vůči *Plasmodium falciparum* (Tsafalck 1996). Antimalarický účinek PIH, SIH a dalších analogů byl *in vitro* pozorován jak u chlorochin senzitivních, tak i rezistentních kmenů. Velmi nízkou IC₅₀ (koncentrace navozující 50% inhibici) měl také analog 311, u něhož byla zjištěna obdobná účinnost u obou kmenů. Studované látky byly antimalaricky účinnější než DFO (Walcourt 2004).

Analogy aroylhydrazonové struktury mají širší antimikrobiální účinky. Například salicylaldehyd salicyloylhydrazon vykazoval antivirotické působení vůči HIV viru. Tento jev byl patrně zprostředkován inhibicí HIV-integrázy (Naemati 1998).

5.3. PIH a jeho analoga ve studiích *in vivo*

5.3.1. Studium indukce exkrece železa pomocí PIH a jeho analogů

První hodnocení PIH v podmínkách *in vivo* bylo provedeno poměrně brzy. Již v roce 1979 Hoy et al. publikoval studii, v níž byl PIH aplikován potkanům s přetížením organismu železem. Autoři sledovali exkreci Fe do moče a stolice před a 24 hodin po orální aplikaci 25, 50 a 100 mg/kg PIH. Byl pozorován signifikantní vzestup exkrece Fe stolicí v závislosti na dávce PIH. V nejvyšší dávce (100 mg/kg) byla exkrece stolicí 8x vyšší v porovnání s kontrolními zvířaty ($p < 0,001$) a exkrece močí cca 2,5x vyšší ($p < 0,001$). Bylo vyloučeno, že by za tento efekt byla odpovědná některá z výchozích látek (pyridoxal či izoniazid), neboť ani jedna z nich (stejně jako jejich kombinace) nenavodila signifikantní exkreci Fe.

Následující experimenty potvrdily, že PIH je efektivním chelátorem železa v podmínkách *in vivo*. Například Johnson et al. podával PIH i.v. v dávce 100 mg/kg potkanům, u kterých bylo přetížení organismu železem předem vyvoláno pomocí opakovaných transfuzí. V tomto pokusu bylo pozorováno více jak 14-ti násobné zvýšení fekální exkrece Fe při současném poklesu množství Fe v játrech cca o 40 % (Johnson 1982). Cikrt et al. studoval biliární exkreci ^{59}Fe po i.p. podání PIH. V dávce 2x 125 mg/kg (s odstupem mezi dávkami 12 h) PIH zvýšil souhrnnou biliární exkreci značeného Fe téměř 35x. První měřitelné množství ^{59}Fe se objevilo ve žluči již za 15 minut, přičemž maximum exkrece izotopu bylo naměřeno mezi 1. - 5. hodinou po podání (Cikrt 1980). Další experimentátoři podávali PIH perorálně v dávce 77 mg/kg potkanům s „iron overloadem“ a pozorovali cca 20-ti násobné zvýšení biliární exkrece značeného ^{59}Fe ve srovnání s kontrolní skupinou (Kim 1987). V novější studii byl PIH aplikován i.p. potkanům s kanylovaným žlučovodem a bylo zaznamenáno cca 50-ti násobné zvýšení biliární exkrece železa (Blaha 1998).

Povzbudivé výsledky s PIH v podmínkách *in vitro* i *in vivo* byly motivací pro snahu najít deriváty či analogy s ještě vyšším účinkem. Po prvotním *in vitro* screeningu analogů PIH, byly vybrané analogy studovány v podmínkách *in vivo*. Například pyridoxal benzaldehyd hydrazon (PBH, látka 101) byl shledán velmi účinným induktorem biliární i renální exkrece železa (Williams 1982). Zajímavý se v tomto pokusu ukázal být i salicylaldehyd benzoyl hydrazon (SBH, látka 201) (Johnson 1982). V další studii byly aplikovány různé analogy PIH i.p. v dávce 56 mg/kg a byla srovnávána schopnost indukovat biliární exkreci železa u potkanů. Zhruba stejný účinek na kumulativní exkreci

Fe byl pozorován v případě PIH a pyridoxal benzoylhydrazonu (PBH), přičemž vyšší účinek vykazoval pyridoxal methoxybenzoyl hydrazon (látka o-107) a pyridoxal 2-fluorbenzoyl hydrazon (látka o-109) (Bláha 1998). V poslední studii byl pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazon (látka o-108) aplikován potkanům s přetížením organismu železem a byl sledován obsah značeného železa ve stolici. I.p. aplikace o-108 v dávkách 25-200 mg/kg vyvolala na dávce závislý nárůst kumulativního obsahu železa ve stolici pokusných zvířat sbírané po 7 dní za současného poklesu Fe v játrech až o 50 % (Link 2003).

5.3.2. Antioxidační vlastnosti PIH

Dosud bylo provedeno málo *in vivo* studií zkoumajících potenciální cytoprotektivní a antioxidační vlastnosti PIH a jeho analogů. Zajímavé výsledky přinesla studie, která zkoumala vliv PIH (10 mg/kg, i.v.) na modelové poškození retiny novorozenech selat navozené asfyxií a následnou reoxygenací. Je známo, že retina reaguje velmi citlivě na toxický účinek ROS vzniklých například v důsledku ischemie-reperfúze. U kontrolních zvířat byl v retině po asfyxií a následné reoxygenaci detekován strmý nárůst koncentrace biomarkerů oxidačního stresu - malondialdehydu (TBARS) a hydroperoxidů. Ve skupině, s premedikací PIH nebyl zjištěn nárůst biomarkerů oxidačního stresu. Elektrofyzilogické vyšetření retiny také zřetelně prokázalo **signifikantní protekci buněk retiny pomocí PIH**.

Na uvedeném modelu byly též zkoumány potenciální protektivní účinky DFO (10 mg/kg, i.v.). Ačkoliv byla zaznamenána signifikantní redukce tvorby ROS v retině, bylo zjištěno, že DFO významně zasáhl do preischemické elektrofyzilogie retiny. Toto pozorování koresponduje s výskytem poruch zraku jako nežádoucího účinku DFO. Funkční hodnocení protekce sítnice pomocí DFO vypovědělo pouze o částečné redukci poškození. Z uvedeného pokusu vyplývá, že PIH v dávkách cca 10x menších než byly užity v experimentech hodnotících PIH u přetížení organismu železem, je schopen navodit signifikantní stupeň protekce retiny na modelu asfyxie-reoxygenace u selat (Bhattacharya 1997). Vzhledem k rostoucímu množství poznatků o úloze přechodných kovů (za normálních okolností hlavně Fe) v produkci ROS, lze předpokládat zvýšený zájem o protektivní působení PIH a zejména některých jeho novějších analogů.

5.3.3. Toxicita PIH a jeho analogů.

Vybraná data vypovídající o toxicitě PIH a jeho analogů lze získat z již citovaných studií. Například Heshko et al. (1981) po podávání PIH (p.o.) v dávce 125-500 mg/kg/den po dobu 10 dní zjistil dobrou snášenlivost a nezaznamenal žádné abnormální změny svědčící pro renální, hepatální nebo hemopoetickou toxicitu. Pomalá i.v. aplikace 100

mg/kg PIH a PBH nevyvolala u potkanů známky akutní toxicity. Na druhou stranu, salicylaldehyd benzoylhydrazon (SBH, látka 101) se ukázal být ve stejném experimentu toxicitější. Není ale vyloučeno, že na známkách akutní toxicity SBH se mohlo podílet extrémní pH roztoku, v němž byl aplikován. Další nepřímou indicií o toxicitě PIH je i poznámka Bhattacharya et al., který udává, že PIH aplikovaný i.v. ve vyšších dávkách (150 mg/kg) u potkanů způsobil kardiovaskulární kolaps (Bhattacharya 1997).

Nekompletní data o akutní toxicitě PIH jsou známa ze studie, kterou provedla firma Ciba-Geigy Ltd. Z nich vyplývá, že p.o. dávka 3 g/kg byla fatální pro všechna zvířata (vedla k pylorické ulceraci), zatímco dávka 1 g/kg byla dobře tolerována (Richardson 1998).

Dále byl studován vliv PIH a SIH po opakovaném podání (v dávce 50 mg/kg, v 10 % Cremophoru) na biochemické, hematologické, morfologické a funkční parametry u králíků. Obě látky byly podávány i.p. 1x týdně po dobu 10-ti týdnů. Nebyl zaznamenán žádný úhyn a zvířata přibývala na váze obdobně jako jedinci v kontrolní skupině. Histopatologické vyšetření na konci experimentu odhalilo pouze mírné změny v ledvinách ve skupině SIH. Ostatní změny byly nekonzistentní a v obdobné míře sledované i v kontrolní skupině (Adamcová 2002, Klimtová 2003).

Jedinou publikovanou studií, která komplexnějším způsobem studovala toxikologický profil PIH na potkanech a myších, je práce provedená Sookvanichsilpem et al. (1991). Tento autorský kolektiv zjistil, že LD₅₀ PIH po jednorázovém p.o. podání je u myší - 5,0 g/kg (samci) a 4,5 g/kg (samice); u potkanů pak - 5,3 g/kg (samci) a 5,0 g/kg (samice). Byla stanovena i LD₅₀ po i.p. podání, kde u myší byly stanoveny hodnoty 1,1 g/kg (samci) a 1,0 g/kg (samice) a u potkanů 1,2 g/kg (samci) a 1,1 g/kg (samice). U umírajících zvířat byla pozorována letargie, únava a hypoaktivita, ale žádné známky třesu, konvulze, salivace ani průjmu. Mikroskopické vyšetření tkání post mortem odhalilo pouze tukovou degeneraci jater a městnání v ledvinách. Histologické vyšetření žaludku, střeva a ledvin neodhalilo žádné patologické změny. Podání 10% Cremophoru EL ve vodě nevykazovalo žádnou toxicitu.

Sookvanichsilp et al. studoval subchronickou toxicitu PIH po p.o. podání v dávkách 100, 400 a 800 mg/kg/den po dobu 90 dní. Zvířata ve všech třech skupinách měla vyšší přírůstek na váze při srovnání s kontrolní skupinou. Ve skupině 800 mg/kg byl zaznamenán úhyn 4 samic a 2 samců v období mezi 6. - 12. týdnem; jeden úhyn (samice) byl zaznamenán i ve skupině 400 mg/kg a to v 11. týdnu experimentu. Ve skupině s nejvyšší dávkou byl zaznamenán vzestup sérových transamináz (korelující s vážností

jaterního poškození, zjištěného v této studii). V dávce 800 mg/kg a 400 mg/kg se objevil také vzestup aktivity alkalické fosfatázy. V játrech byla zaznamenána vakuolizace cytoplazmy jaterních buněk, degenerace jejich jader a v některých případech i mírná nekróza. Závažnost jaterního poškození jevila závislost na podávané dávce. Ve slezině a ledvinách bylo zjištěno vaskulární městnání. Žádná z dávek nezpůsobila změny v hematokritu. Autoři v závěru poznamenávají, že toxicita se projevila až v dávkách mnohem vyšších než se předpokládají pro klinické použití.

5.4. PIH v klinických studiích

Ačkoliv se PIH ve světle údajů z preklinických studií zdá být relativně účinný a málo toxický, existuje málo údajů z klinických studií. Proběhla pouze první fáze klinického hodnocení PIH, v jejímž průběhu byla zjištěna účinnost nižší než se předpokládalo a další klinické studie již bohužel nebyly uskutečněny.

Iniciální část I. fáze klinického hodnocení, zaměřená na volbu dávky a také její snášenlivost, byla provedena v Cleveland Metropolitan General Hospital, OH, USA. Zúčastnilo se jí 5 zdravých dobrovolníků, kterým byla podávána denně se zvyšující dávkou od 2 do 30 mg PIH/kg.den⁻¹ po dva týdny (bez kontroly placebem). Výsledky všech hematologických a biochemických vyšetření byly u všech dobrovolníků v mezích normy. Nevyskytly se ani oftalmologické či audiologické abnormality (Brittenham 1990).

Další část fáze I byla provedena randomizovaným, dvojité zaslepeným způsobem na 11 dobrovolnících trpících „iron overloadem“ v důsledku pravidelných transfúzí. PIH v dávce 30 mg/kg, nebo placebo, byly podávány denně nalačno 30 min po dávce calcium carbonicum po dobu 21 dní. PIH byl relativně dobře snášen a většina pozorovaných subjektivních obtíží se významně nelišila od skupiny dostávající placebo. V hodnocené exkreci Fe byla zřejmá značná individuální variabilita. Průměrná exkrece indukovaná PIH byla stanovena na $0,12 \pm 0,07$ g/den. Uvedená indukce exkrece Fe by stačila ke zpomalení nebo prevenci kumulace Fe u pacientů, kteří nejsou v pravidelném transfúzním režimu, ale byla by nedostatečná u pacientů s pravidelnou transfúzní léčbou přinášející další zátěž Fe. PIH by tedy v uvedeném schématu nebyl schopen zajistit negativní bilanci železa (Brittenham 1990). Nicméně existuje podezření, že tento fakt mohl do značné míry souviset s nevhodně zvolenou farmaceutickou formulací účinné látky (Brittenham 1990; Richardson 1998).

II.

CÍLE PRÁCE

Tato dizertační práce byla zaměřena na studium antracyklinové kardiotoxicity, její časné detekce a změn v myokardiálním zastoupení vybraných kovových prvků. V návaznosti byl studován účinek modelového kardioprotektiva dexrazoxanu a především pak nových lipofilních aroylhydrazonových chelátorů železa a to z hlediska jejich farmakologických, toxikologických a kardioprotektivních vlastností.

Vlastními cíli této práce bylo studium:

1. Možnosti časné detekce antracyklinové kardiotoxicity na experimentálním modelu s užitím echokardiograficky hodnocené diastolické funkce a biochemického markeru srdečního troponinu T.
2. Změn v zastoupení vybraných kovových prvků v myokardu pokusných zvířat s experimentálně navozenou chronickou antracyklinovou kardiomyopatií a modelovou kardioprotekcí pomocí chelátoru železa dexrazoxanu.
3. Bezpečnosti a potenciální toxicity opakovaného podání nového chelátoru železa pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazonu (o-108) u králíka.
4. Farmakokinetiky aroylhydrazonových chelátorů železa salicylaldehydu isonikotinoyl hydrazonu (SIH) a pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazonu (o-108) po jednorázovém i.v. podání u králíka.
5. Potenciálně kardioprotektivních účinků dvou strukturně odlišných aroylhydrazonových chelátorů železa (pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazonu - o-108 a salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazonu – SIH) na modelu chronické antracyklinové kardiotoxicity u králíka.

III.
PŘEHLED POUŽITÝCH METODIK

- 1. Pokusná zvířata:** králíci, Činčila velká, samci (hmotnost $\approx 3,5$ kg). Práce s laboratorními zvířaty byla schválena Odbornou komisí na ochranu zvířat proti týrání při Lékařské fakultě UK v Hradci Králové.
- 2. Anestézie:** neinvazivní měření a další manipulace s pokusnými zvířaty byly prováděny v ketaminové anestézii (50 mg/kg, i.m.), nebo kombinované anestézii ketamin/xylazin (ketamin 50 mg/kg a xylazin 2 mg/kg, i.m.) viz dále. Invazivní měření bylo prováděno v pentobarbitalové anestézii (pentobarbital 30 mg/kg, i.v.).
- 3. Model chronické antracyklinové kardiotoxicity u králíka:** antracyklinová kardiotoxicita byla navozena opakovaným podáváním daunorubicinu (Daunoblastina, 3 mg/kg, 1 x týdně po 10 týdnů). Echokardiografické měření systolické srdeční funkce bylo prováděno na začátku pokusu, ve vybraných intervalech v průběhu pokusu (9., 10. týden, vždy před další aplikací studovaných látek) a na konci experimentu (5-7 dní po poslední aplikaci). Invazivní vyšetření srdeční funkce bylo prováděno na konci pokusu. Odběry vzorku krve pro biochemickou a hematologickou analýzu byly prováděny na začátku, v polovině (5. týden) a na konci experimentu. Odběry krve pro stanovení troponinu T byly prováděny na začátku pokusu, v 5., 8., 10. týdnu a na konci pokusu, není-li dále uvedeno jinak.
- 4. Dávkovací schémata studovaných látek:** **dexrazoxan** – 60 mg/kg, i.p. před každou aplikací daunorubicinu (n=5) viz Příloha 2, **o-108** při studiu jeho bezpečnosti a toxicity (25, 50 a 100 mg/kg, i.p., n=5 v každé skupině) viz Příloha 3, **o-108** při studiu kardioprotekce vůči daunorubicinové kardiotoxicitě (10 a 25 mg/kg, i.p. vždy 30 min před každou aplikací daunorubicinu, n=8 v každé skupině) viz Příloha 6, **SIH** při studiu kardioprotekce (0,5, 1,0 a 2,5 mg/kg, i.v., vždy 10 min před každou aplikací daunorubicinu, n=9 v každé skupině) viz Příloha 7. Samotný SIH byl aplikován i.v. v dávce 1 mg/kg (n=6) Příloha 7. Všechny uvedené látky byly aplikovány 1x týdně po 10 týdnů analogicky jako daunorubicin (n=15) a výsledky byly porovnány s kontrolní (n=11) vehikulovými skupinami (10% cremophor EL, n=11 a roztok kosolventů pro SIH, n=5).

Při studiu farmakokinetiky byly chelátory o-108 a SIH rozpuštěny ve směsi kosolventů (PEG 300, ethanol a fyziologický roztok) a aplikovány králíkům v dávce 10 mg/kg (n=5 a n=4) pomalou intravenózní injekcí (po dobu 3 min) králíkům viz Příloha 4 a 5.

- 5. Hodnocení celkové toxicity:** úhyn a eventuální změny v příjmu potravy/tekutin,

nápadné změny chování a vnější známky toxicity byly sledovány denně ve spolupráci s pracovníci Vivária LF UK HK. Hmotnost zvířat byla měřena týdně.

6. Měření funkčních kardiovaskulárních parametrů

a) neinvazivní hodnocení srdeční funkce: na začátku pokusu a ve vybraných časových intervalech byla systolická srdeční funkce hodnocena echokardiograficky. Pomocí M-mód měření řízeného z 2D zobrazení levé komory v dlouhé ose (B-mód) byly zjištěny rozměry srdce na konci systoly a diastoly a z nich byla vypočítána ejekční frakce levé komory (EF, %). Diastolická srdeční funkce byla hodnocena pomocí pulzního (PW) Dopplerovského hodnocení toku mitrálním ústím (hodnocené parametry: maximální rychlost plnění levé komory v E-fázi, maximální rychlost plnění levé komory v A-fázi, poměr obou parametrů (E/A), čas od zahájení plnění levé komory v E-fázi k dosažení maximální rychlosti plnění (acceleration time) a čas od maxima do konce plnění levé komory v E-fázi (deceleration time). Neinvazivní měření bylo prováděno vždy před aplikací daunorubicinu, resp. kombinace daunorubicinu s chelátorem.

b) invazivní hodnocení srdeční funkce: na konci pokusu byl polyetylenový katétr o definovaném průměru naplněn heparinizovaným fyziologickým roztokem a zaveden do levé komory cestou a. carotis. Změny tlaků byly zaznamenávány, derivatizovány a ukládány pomocí systému ADI vybaveného náležitými snímači a převaděči. Hlavním hodnoceným parametrem byl zejména index kontraktility dP/dt_{max} – tj. maximální vzestup tlaku v isovolumické fázi levé komory; popř. index relaxace levé komory dP/dt_{min} – tj. maximální pokles tlaku v isovolumické fázi diastoly. Simultánně byla zaznamenávána srdeční frekvence a invazivně byl měřen tlak v a. femoralis.

7. Hodnocení biomarkeru srdečního poškození - plazmatické koncentrace troponinu

T: Plazmatické koncentrace srdečního troponinu T byly stanovovány v heparinizované plazmě odebrané ve vybraných časových intervalech (kvantitativní limit = 0,010 $\mu\text{g/l}$) ve spolupráci s Ústavem klinické biochemie a diagnostiky FN HK.

8. Hematologické a biochemické vyšetření krve/plazmy: krev byla odebrána z centrální ušní artérie do doporučených zkumavek a transportována na Ústav klinické biochemie a diagnostiky FN HK k vyšetření.

9. Pitva a posmrtné ohledání: po předávkování pokusných zvířat pentobarbitalem, nebo

okamžitě po zjištění předčasného úhynu vždy následovalo posmrtné ohledání, při kterém byl proveden odběr vybraných orgánů na histologické vyšetření. Při pitvě byla věnována pozornost přítomnosti výpotků v dutině břišní, hrudní, a v perikardu. Eventuální přítomnost makroskopicky patrných abnormalit byla zaznamenána do pitevního protokolu.

- 10. Hodnocení biochemických parametrů v myokardu pokusných zvířat:** vybrané biochemické parametry v myokardu byly hodnoceny ve spolupráci s Doc. MUDr. Michaelou Adamcovou, PhD. z Ústavu fyziologie LFHK (např. kolagen) a nebo Ústavem klinické biochemie a diagnostiky FNHK (analýza vybraných kovových prvků v myokardu pomocí atomové absorpční spektrometrie a plamenové spektrometrie).
- 11. Histologické vyšetření srdce a vybraných orgánů:** histologické vyšetření srdce a vybraných orgánů (játra, ledviny, plíce, tenké střevo) bylo provedeno ve spolupráci s Doc. MUDr. Yvonou Mazurovou, CSc. (Ústav histologie a embryologie, LF HK UK). Vzorky byly odebrány ze standardního místa, byly fixovány v 10% formaldehydu a po zpracování zality do parafinu. Připravené řezy (6 μm) byly barveny (Hematoxylin-eosin a modrý Massonův trichrom) a vyšetřeny pomocí světelné mikroskopie.
- 12. Antiproliferativní a kardioprotektivní studie v podmínkách *in vitro*** (viz Příloha 6 a 7): studium potenciálního vlivu aroylhydrazonových chelatačních látek na antiproliferativní vlastnosti daunorubicinu, stejně tak jako testování potenciálních protektivních účinků těchto chelátorů na buněčných kulturách bylo provedeno ve spolupráci s PharmDr. Tomášem Šimůnkem, PhD. a Mgr. Helenou Kaiserovou (Katedra biochemických věd, FaF UK). Pro účely antiproliferativních studií byla použita buněčná line HL-60 odvozená od buněk humánní promyelocytární leukémie (viz Příloha 6). Pro kardioprotektivních studie v podmínkách *in vitro* byly použity spontánně bijící izolované neonatální potkaní kardiomyocyty. Buněčná morfologie a autofluorescence daunorubicinu byly hodnoceny pomocí invertovaného mikroskopu. Buněčná toxicita byla hodnocena na základě aktivity laktát dehydrogenázy (LDH) v buněčném mediu (viz Příloha 7).
- 13. HPLC analýza aroylhydrazonových chelátorů železa a farmakokinetická analýza** (viz Příloha 4 a 5): vývoj, validace a vlastní provedení HPLC analýz aroylhydrazonových chelátorů železa v plazmě pokusných zvířat bylo provedeno PharmDr. Petrou Kovaříkovou, PhD. (Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv,

FaF UK). Farmakokinetická analýza byla provedena s využitím softwaru Kinetica software, version 4 (Thermo Electron Corporation, USA) ve spolupráci s Ing. Jaroslavem Chládkem, PhD. (Ústav farmakologie, LF HK UK).

14. Statistická analýza: statistická analýza byla prováděna s užitím statistického software Sigmastat 3.0 (SPSS, U.S.A.). Pro určení statistických významností byla použita hladina významnosti $p < 0.05$. Párový t-test byl použit při srovnání výsledků s úvodními hodnotami a ANOVA byla použita pro porovnání výsledků mezi jednotlivými skupinami. Pearsonova nebo Spearmanova analýza byla použita pro zjištění korelací mezi jednotlivými parametry.

Detaily jednotlivých metodických přístupů, jakož i experimentálního uspořádání jsou uvedeny v přílohách (Příloha 1-7).

IV.
VÝSLEDKY

1. Antracyklinová kardiotoxicita – možnosti časně detekce na experimentálním modelu

V této části dizertační práce (viz Příloha 1) byl hodnocen potenciální přínos dvou nezávislých přístupů (echokardiograficky hodnocené diastolické funkce a plazmatické koncentrace srdečního troponinu) pro časnou detekci chronické antracyklinové kardiotoxicity na experimentálním modelu u králíka (n=15). Náležitě hodnocení všech důležitých parametrů trasmitrálního průtoku u králíků se ukázalo být z technických důvodů možné pouze v kombinované anestézii – ketamin/xylazin. Chronická antracyklinová kardiotoxicita byla navozená aplikací daunorubicinu ve validovaném schématu (3 mg/kg, 1 x týdně po 10 týdnu). Parametry diastolické funkce, stejně tak jako odběry plazmy pro stanovení srdečního troponinu T, byly provedeny na začátku pokusu a dále 1x týdně (před každou aplikací) až do konce pokusu (5-7 dní po 10. aplikaci). Vedle kontrolní skupiny (fyziologický roztok 1 ml/kg) hodnocené s užitím výše uvedené kombinované anestézie, byla vzhledem k možnému hemodynamickému vlivu xylazinu utvořena ještě ketaminová skupina, kde byly aplikace prováděny shodně jako v kontrolní skupině, avšak jako anestetikum byl použit pouze samotný ketamin.

Ze získaných výsledků vyplývá, že hodnocení diastolické funkce je poměrně technicky obtížné, a to především s ohledem na vysokou srdeční frekvenci u králíků (až 300 tepů/min). Z tohoto důvodu jsou v anestézii ketaminem hodnotitelné pouze parametry vlny E (stejně výsledky byly získány s užitím jiných injekčních anestetik jako např. midazolam). Naproti tomu kombinovaná anestézie ketamin/xylazin umožnila kvalitní hodnocení všech standardních parametrů diastolické funkce odvozené z Dopplerovského hodnocení trasmitrálního toku a naměřené hodnoty odpovídaly literárním údajům. Nicméně takto získané parametry plnění levé srdeční komory se neukázaly být perspektivní z hlediska hodnocení antracyklinové kardiotoxicity - např. hodnoty E/A naměřené v daunorubicinové skupině na začátku pokusu ($1,37 \pm 0,11$) se významně nelišily od hodnot v závěru pokusu ($1,55 \pm 0,04$; n.s.). Naproti tomu, citlivější katetrizační vyšetření diastolické funkce levé komory (provedené vzhledem k invazivnímu charakteru tohoto přístupu až na konci pokusu) prokázalo přítomnost diastolické dysfunkce ve srovnání s kontrolní skupinou ($dP/dt_{\min} = 2395 \pm 182$ vs. 3852 ± 540 mmHg/s, daunorubicin vs. kontrola, $p < 0,05$). S tímto nálezem do značné míry korespondovaly i naměřené zvýšené koncentrace kalcia ($10,60 \pm 0,67$ vs. $15,79 \pm 2,05$ $\mu\text{g/g}$, kontrola vs. daunorubicin, $p < 0,05$) a celkového kolagenu ($14,43 \pm 0,37$ vs. $19,74 \pm 0,79$ mg/g, kontrola

vs. daunorubicin, $p < 0,05$) v myokardu daunorubicinové skupiny, jakož i progresivní intersticiální fibróza dokumentovaná histologickým vyšetřením. Porucha homeostázy kalcia stejně tak jako změna elastických vlastností myokardu v důsledku fibrotizace jsou známými typickými průvodními znaky diastolické dysfunkce myokardu.

Na rozdíl od náročného hodnocení diastolické funkce se hodnocení plazmatických koncentrace srdečního troponinu T ukázalo být užitečným a perspektivním přístupem pro časnou detekci kardiotoxicity. Detekovatelné koncentrace troponinu T byly naměřeny již v 3.-4. týdnu experimentu (kumulativní dávka daunorubicinu $\approx 100-150 \text{ mg/m}^2$). Koncentrace troponinu T v plazmě ($0,024 \pm 0,008 \text{ } \mu\text{g/l}$) dosáhly statistické signifikance ve srovnání s kontrolní skupinou ($< 0,010 \text{ } \mu\text{g/l}$) již v polovině pokusu; kumulativní dávka daunorubicinu = 200 mg/m^2), tedy v době, kdy ještě nedochází k měřitelným změnám ve funkci levé komory. V druhé polovině pokusu pak koncentrace tohoto biomarkeru srdečního poškození progresivně narůstaly až k hodnotám $0,186 \pm 0,055 \text{ } \mu\text{g/l}$ na konci experimentu.

2. Zastoupení vybraných kovových prvků v myokardu s experimentálně navozenou antracyklinovou kardiomyopatií a vliv chelatačního kardioprotektiva (dexrazoxanu).

Dále byla pozornost zaměřena na hodnocení změn v obsahu vybraných prvků v myokardu králíků s experimentálně navozenou chronickou daunorubicinovou kardiotoxicitou (daunorubicin 3 mg/kg , i.v., 1 x týdně po 10 týdnů, $n=11$) viz Příloha 2. Na konci pokusu byla zjištěna kontraktilita levé komory katetrizačním vyšetřením a po usmrcení zvířete pentobarbitalem byl myokard levé komory odebrán a analyzován s ohledem na koncentrace vybraných kovových prvků (Fe, Se, Ca, Mg, K). Výsledky byly porovnány s kontrolní skupinou (fyziologický roztok, 1 ml/kg , ve stejném schématu jako daunorubicin, $n=10$) a dexrazoxanovou skupinou ($n=5$), kde bylo modelové kardioprotektivum (dexrazoxan 60 mg/kg , i.p.) podáváno vždy 30 min před každou aplikací daunorubicinu.

Podávání daunorubicinu bylo spojeno s předčasnou mortalitou (37 %) a vyšetření kontraktility levé komory provedené na konci experimentu u přežívajících zvířat odhalilo významně sníženou systolickou srdeční funkci (pokles o 59,8 %). Naopak, kompletní přežití a zachovaná kontraktilita levé komory byly zjištěny v dexrazoxanové skupině - index dP/d_{max} se statisticky významně nelišil od hodnot v kontrolní skupině (1411 ± 77 vs.

1245 ± 86 kPa/s) a byl významně vyšší než v daunorubicinové skupině (745 ± 69 kPa/s). Analýza vybraných kovových prvků v myokardu daunorubicinové skupiny odhalila signifikantně vyšší koncentrace vápníku ve srovnání s kontrolní skupinou (o 52,8 %), avšak nižší koncentrace hořčíku (o 10,1 %) a draslíku (o 9,6 %). Zvýšení koncentrací selenu bylo pouze nesignifikantní. Naproti tomu ve skupině, kde byl dexrazoxan podáván vždy 30 min před daunorubicinem, k žádným měřitelným změnám v porovnání s kontrolní skupinou nedošlo. Koncentrace kalcia byly v této skupině signifikantně nižší než ve skupině se samotným daunorubicinem (9,06 ± 0,42 vs. 16,2 ± 2,36 µg/g, p<0,05). Navíc koncentrace kalcia v levé komoře statisticky významně negativně korelovala s indexem kontraktility dP/dt_{max} (p<0,01, R = 0,600). Ačkoliv byla zjištěna signifikantní korelace mezi koncentracemi hořčíku a vápníku, nebo vápníku a selenu, tyto výsledky přímo nekorespondovaly s funkčním poškozením levé komory. Zajímavá také byla absence jakýchkoliv signifikantních rozdílů v celkové koncentraci železa u studovaných skupin.

3. Nový aroylhydrazonový chelátor železa pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazonu (o-108) - bezpečnost a potenciální toxicita opakovaného podání látky.

Bezpečnost a potenciální toxicita pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazonu byla studována (viz Příloha 3) na králících (n=15) ve třech dávkách (25, 50 a 100 mg/kg), podávaných ve stejném schématu, jaký byl předpokládán pro studium kardioprotektivních účinků této látky (tj. aplikace i.p., 1 x týdně po dobu 10-ti týdnů). Výsledky byly porovnány s kontrolní skupinou (fyziologický roztok 1 ml/kg, ve stejném schématu) a skupinou, které bylo aplikováno vehikulum pro chelátor (10%, vodný roztok Cremophoru EL). Hodnoceny byly: změny hmotnosti pokusných zvířat, zevní známky toxicity a eventuální nápadné změny chování, mortalita, funkční kardiovaskulární parametry (echograficky hodnocená ejekční frakce a katetrizačně hodnocená kontraktilita na konci experimentu, EKG), plazmatické koncentrace troponinu T, standardní biochemické vyšetření plazmy/séra a hematologické vyšetření krve, histologicky bylo vyšetřeno srdce, játra, ledviny a další vybrané orgány.

V průběhu studie nebyl zaznamenán předčasný úhyn v žádné ze sledovaných skupin. Nebyly zaznamenány žádné zjevné vnější známky toxicity (jako např. křeče nebo krvácení). S výjimkou skupiny, které byla podávána nejvyšší dávka chelátoru, byl u všech zvířat pozorován v průběhu celého experimentu signifikantní nárůst tělesné hmotnosti ve srovnání se začátkem pokusu. Ve skupině, které byla aplikována nejvyšší dávka o-108

(100 mg/kg), byla v polovině sledovaných intervalů změna tělesné hmotnosti nevýznamná. U této skupiny byla též místy pozorována nižší tendence přijímat potravu a tekutiny a také omezená motorická aktivita (zejména ve dnech po aplikaci chelátoru). U žádného ze sledovaných funkčních kardiovaskulárních parametrů nedošlo k výrazné a statisticky významné změně. Překvapivě byly ve skupinách, kterým byl aplikován chelátor, naměřené zvýšené plazmatické koncentrace srdečního troponinu T. Ke zvýšení koncentrací tohoto biomarkeru docházelo až od 8. resp. 10. týdne experimentu. Uvedený nález byl nejvýraznější a statisticky významný zejména ve skupinách s vyššími dávkami chelátoru – nejvyšší koncentrace srdečního troponinu T v plazmě ($0,106 \pm 0,024 \mu\text{g/l}$) byly naměřeny na konci experimentu ve skupinách s nejvyšší dávkou chelátoru. Podrobné histologické vyšetření myokardu ale ve shodě s funkčními kardiovaskulárními parametry neshledalo žádný rozdíl v porovnání se skupinou, které bylo podáváno samotné vehikulum pro chelátor. Morfologická analýza dalších orgánů (játra, ledviny, plíce, střevo) odhalila pouze mírné změny, které se kvalitativně ani kvantitativně nelišily od nálezů ve skupině, které bylo aplikované samotné vehikulum. Standardní biochemický rozbor plazmy zvířat odhalil pouze mírný pokles celkového proteinu v závěru experimentu a přechodné zvýšení některých parametrů 24 hodin po první aplikaci chelátoru (např. vzestup celkového cholesterolu $1,87 \pm 0,22$ vs. $2,86 \pm 0,20 \mu\text{M}$), nicméně tyto mírné abnormality se normalizovaly v další části pokusu. V průběhu experimentu též došlo k určitému signifikantnímu zvýšení hodnot kreatinémie, ale bez zjevného trendu a dávkové závislosti. K žádnému z uvedených nálezů nebyl zjištěn morfologický korelát svědčící o eventuální orgánové toxicitě. V důsledku podávání chelátoru železa nedošlo k významnému poklesu koncentrací celkového plazmatického železa ani dalších vícemocných biogenních prvků (např. kalcia). Hematologické vyšetření nezjistilo žádné markantní změny související s podáváním chelátoru (nebyly nalezeny známky anémie či jiných hematologických anomálií).

4. Pilotní studium farmakokinetiky aroylhydrazonových chelátorů železa SIH a o-108.

Vzhledem k tomu, že dosud nebyly známy žádné údaje o farmakokinetice studovaných látek, byla v pilotních experimentech poprvé studována farmakokinetika aroylhydrazonových chelátorů železa po jednorázovém i.v. podání (viz Příloha 4 a 5). Kalibrace a validace analytické metody, stejně tak jako časové intervaly pro odběr vzorku,

byly odvozeny z přípravných pokusů, které předcházely vlastním farmakokinetickým studiím. Salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (SIH) a pyridoxal 2-chlorbenzoylhydrazon (o-108) byly rozpuštěny v roztoku kosolventů (PEG 300/ethanol/fyziologický roztok) a aplikovány pomalou i.v. injekcí (3 min) dvěma pilotním skupinám zvířat (n=4 a n=5) v dávce 10 mg/kg. Plazmatické koncentrace postupně stoupaly v průběhu aplikace a v těchto intervalech byla též podle očekávání zjištěna nejvyšší interindividuální variabilita naměřených koncentrací. V případě obou látek byla následně pozorována poměrně rychlá distribuce a také eliminace těchto látek. Plazmatické koncentrace chelátoru klesly pod kvantitativní limit po 60-ti (SIH) resp. 90-ti (o-108) minutách od aplikace a dále již nebylo možné koncentrace chelátoru hodnotit. Pomocí farmakokinetického softwaru byly určeny základní farmakokinetické parametry obou látek (tab. 5). Maximální koncentrace (C_{max}) studovaných chelátorů byly výrazně vyšší v případě o-108 (4,2-krát, při porovnání na molární bázi). Vedle maximálních koncentrací byl shledán i výrazný rozdíl ve zdánlivém distribučním objemu obou látek (4,12-krát, při porovnání na molární bázi) a celkové clearance. Nicméně, u obou studovaných látek byl zjištěn do značné míry srovnatelný a poměrně krátký biologický poločas eliminace.

Tab. 5. Souhrn vybraných základních farmakokinetických parametrů SIH a o-108 po jednorázovém i.v. podání

Parametr	SIH 10 mg/kg i.v.	o-108 10 mg/kg i.v.
C_{max} ($\mu\text{mol/l}$)	108,1 \pm 11,8	336,2 \pm 35,8
t_{max} (min)	2,25 \pm 0,25	2,4 \pm 0,4
V_d (l/kg)	1,48 \pm 0,08	0,352 \pm 0,028
Cl_{tot} (l/min.kg ⁻¹)	0,067 \pm 0,013	0,0092 \pm 0,0009
AUC ($\mu\text{mol/l.min}^{-1}$)	705,5 \pm 146,4	3598 \pm 454,3
$t_{1/2}$ (min)	16,9 \pm 2,8	27,7 \pm 2,98

5. Kardioprotektivní účinky aroylhydrazonových chelátorů železa pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazonu (o-108) a salicylaldehyd isonicotinoyl hydrazonu (SIH) na modelu chronické antracyklinové kardiotoxicitě u králíka

Nejdříve byla věnována pozornost potenciálně kardioprotektivnímu účinku chelátoru o-108 (Příloha 6). Vlastnímu studiu kardioprotektivního účinku chelátoru železa

o-108 předcházelo testování potenciálního vlivu této látky na antiproliferativní účinek daunorubicinu, protože perspektivní kardioprotektivum by nemělo mít negativní vliv na protinádorový účinek antracyklinového cytostatika. S užitím nádorové linie HL-60 bylo zjištěno, že studovaná látka nemá v nižších koncentracích (0,1-10 μM) signifikantní vliv na antiproliferativní účinek daunorubicinu, ba naopak ve vyšších dávkách (30-300 μM) bylo zaznamenáno aditivní synergické působení studované látky. Na základě těchto výsledků proto následovalo studium potenciálně kardioprotektivního účinku chelátoru železa o-108 na modelu chronické daunorubicinové kardiotoxicity u králíka. V této části byla látka o-108 aplikována v dávkách 10 a 25 mg/kg dvěma skupinám pokusných zvířat ($n=8$, v každé skupině), vždy 30 min před každou aplikací daunorubicinu ve standardním schématu (tj. daunorubicin 3 mg/kg, i.v., 1 x týdně po 10 týdnů). Hodnoceny byly tyto parametry: mortalita, změna tělesné hmotnosti, parametry systolické funkce levé komory (ejekční frakce, dP/dt_{max}), plazmatické koncentrace troponinu T, histologické vyšetření srdce a dalších orgánů, standardní biochemické a hematologické vyšetření. Výsledky byly porovnány se skupinou daunorubicinu (samotný daunorubicin 3 mg/kg, i.v., $n=15$), kontrolní (fyziologický roztok 1 ml/kg, i.v., $n=11$), skupinou vehikula (10% Cremophor EL, 2 ml/kg, i.p., $n=11$) a skupinou o-108 (samotný chelator 25 mg/kg, i.p., $n=5$), přičemž uvedené látky byly podávány ve shodném dávkovacím schématu.

V této části studie bylo zjištěno, že chelátor o-108 v nižší dávce (10 mg/kg) kompletně zabraňuje daunorubicinem indukovanému předčasnému úhynu pokusných zvířat (celková mortalita pozorovaná v daunorubicinové skupině dosáhla 33%). Navíc, narozdíl od daunorubicinové skupiny v této skupině nebyl v průběhu celého pokusu zaznamenán žádný signifikantní pokles ejekční frakce levé komory ($63,2 \pm 0,05$ % na začátku pokusu vs. $59,23 \pm 0,98$ %, n.s.). Citlivější katetrizační vyšetření systolické srdeční funkce provedené na konci experimentu odhalilo signifikantně vyšší kontraktilitu levé komory u zvířat, kterým byl podáván chelátor železa o-108 (10 mg/kg), než ve skupině se samotným daunorubicinem (1131 ± 125 vs. 783 ± 53 kPa/s). Výsledky obou nezávislých vyšetření srdeční kontraktility vzájemně dobře korelovaly ($p < 0,001$, $R = 0,880$). Uvedený náález byl dále podpořen závěry histologického vyšetření myokardu levé komory poukazujícího na nižší rozsah a intenzitu poškození srdečního svalu levé komory u zvířat, kterým byl současně podáván chelátor železa o-108 a dále také zmírněným nárůstem troponinu T v této skupině.

Naproti tomu ve skupině, které byla podávána vyšší dávka studovaného chelátoru

ve shodném schématu, byla pozorována výrazná předčasná mortalita (50%). Předčasný úhyn v této skupině ovšem nastal výrazně dříve než v daunorubicinové skupině (již při nízkých kumulativních dávkách antracyklinu $\approx 200\text{-}300 \text{ mg/m}^2$). Uvedenému úhynu nepředcházela pokles ejekční frakce levé komory ani výrazná elevace troponinu T (v pátém týdnu $cTnT = 0,013 \pm 0,006$) a histologické vyšetření myokardu uhynulých zvířat shledalo pouze mírné poškození myokardu. Překvapivě nebyly shledány žádné významné známky kardioprotektivního působení u zvířat, která přežila do konce experimentu – došlo k signifikantnímu poklesu ejekční frakce levé komory ve srovnání se začátkem pokusu ($64,9 \pm 0,4$ vs. $44,7 \pm 4,4$ %; $p < 0,05$) a ve shodě s katetrizačním vyšetřením byl v porovnání s kontrolní skupinou zjištěn signifikantní pokles systolické srdeční funkce ($EF = 44,7 \pm 4,4$ vs. $61,6 \pm 0,9$ %; $dP/dt_{\max} = 691 \pm 101 \text{ kPa/s}$ vs. $1345 \pm 61 \text{ kPa/s}$ $p < 0,05$). Ani většina dalších kardiovaskulárních parametrů se v této skupině nelišila od nálezů ve skupině samotného daunorubicinu.

V další fázi byl studován kardioprotektivní potenciál chemickou strukturou odlišného aroylhydrazonového chelátoru SIH (Příloha 7). Potenciálně kardioprotektivní účinky tohoto chelátoru železa odvozeného od salicylaldehydu byly studovány *in vitro* s užitím izolovaných ventrikulárních kardiomyocytů (daunorubicin $10 \mu\text{M}$, inkubace 48 h) a dále na modelu daunorubicinem indukované chronické kardiotoxicity (daunorubicin 3 mg/kg , i.v., 1 x týdně po dobu 10-ti týdnů) u králíka. Ve studiu kardioprotektivních vlastností SIH v podmínkách *in vitro* byly použity koncentrace $3\text{-}100 \mu\text{M}$, přičemž v podmínkách *in vivo* byly použity 3 dávky ($0,5, 1,0$ a $2,5 \text{ mg/kg}$, i.v.) podané 10 min před každou aplikací daunorubicinu ($n=9$, v každé skupině). *In vitro* byla hodnocena změna buněčné morfologie, aktivita laktát dehydrogenázy v buněčném médiu a kumulace daunorubicinem indukované fluorescence uvnitř kardiomyocytů. *In vivo* byly hodnoceny obdobné parametry jako v předcházející studii zaměřené na chelátor o-108. Výsledky byly porovnány s daunorubicinovou skupinou (samotný daunorubicin, 3 mg/kg , i.v., 1 x týdně po 10 týdnů, $n=15$), kontrolní skupinou (fyziologický roztok 1 ml/kg , i.v., $n=11$), skupinou samotného chelátoru (SIH $1,0 \text{ mg/kg}$, i.v., $n=6$) a skupinou vehikula (roztok farmaceutických kosolventů PEG 300/ethanol ve fyziologickém roztoku, $n=5$).

In vitro bylo zjištěno, že preinkubace srdečních buněk s chelátorem SIH je schopna částečně, avšak signifikantně potlačit ($22\text{-}25$ %, $p < 0,05$) buněčnou toxicitu daunorubicinu (hodnocenou jako aktivitu LDH v buněčném médiu) a do určité míry též zmírnit změny buněčné morfologie navozené daunorubicinem. Měření autofluorescence daunorubicinu

byla zaznamenána nápadná kumulace tohoto cytostatika uvnitř srdečních buněk. Protektivní působení nemělo žádný vliv na kumulaci daunorubicinové autofluorescence uvnitř kardiomyocytů. Přestože studovaný chelátor měl signifikantní protektivní vliv na daunorubicinem navozenou toxicitu, tento účinek v rozmezí koncentrací očekávatelných *in vivo* (tj. cca do 100 μ M SIH), nevykazoval významnou závislost na dávce.

I.v. podání chelátoru SIH v dávce 0,5 a 1 mg/kg mělo významný pozitivní vliv na celkovou mortalitu navozenou daunorubicinem. Zatímco v daunorubicinové skupině byl pozorován celkový předčasný úhyn 33 %, ve skupině s nejnižší dávkou SIH byla mortalita snížena (11 %). Dvojnásobná dávka SIH (1 mg/kg) pak dokonce byla schopna kompletně zamezit úhynu pokusných zvířat. Vedle vlivu na předčasný úhyn měl studovaný chelátor též významný vliv na srdeční funkci. V nižší studované dávce byl významný pokles ejekční frakce levé komory u zvířete, které předčasně uhynulo a v celé skupině pak došlo k poklesu tohoto parametru na konci pokusu ($64,5 \pm 0,5$ vs. $58,8 \pm 0,9$ %, $p < 0,05$). Uvedený pokles byl ale relativně malý, a proto nesignifikantní ve srovnání s kontrolní skupinou (EF = $58,8 \pm 0,9$ vs. $61,7 \pm 0,9$ %, n.s.), na rozdíl od daunorubicinové skupiny kde byl pokles signifikantní již od 9. týdne pokusu). Ve skupině s vyšší dávkou chelátoru (1 mg/kg) byl protektivní účinek této látky na srdeční funkci ještě více vyjádřen. V této skupině nebyl v průběhu celé studie zaznamenán signifikantní pokles ejekční frakce levé komory (EF = $64,6 \pm 1,3$ a $59,6 \pm 2,3$, $p < 0,05$) a naměřené hodnoty se významně nelišily od nálezů v kontrolní skupině ($59,6 \pm 2,3$ vs. $61,7 \pm 0,9$, n.s.). Hodnoty ejekční frakce byly navíc ve většině sledovaných intervalů významně vyšší než v daunorubicinové skupině. Signifikantně vyšší kontraktilita levé komory v této skupině byla též potvrzena prostřednictvím indexu kontraktility dp/dt_{max} (1185 ± 80 vs. 783 ± 53 kPa/s, kombinační skupina vs. daunorubicinová skupina, $p < 0,05$) získaného katetrizačním vyšetřením. Snížený byl též výskyt pleurálního výpotku a ascitu v pitevním nálezu (22% vs. 67% v daunorubicinové skupině). Histologické vyšetření myokardu levé komory odhalilo známky snížené progresse srdečního poškození s převažujícími časnými změnami jako je zvýšená eosinofilie cytoplazmy či začínající degenerace kardiomyocytů. Naproti tomu v daunorubicinové skupině byly patrné známky nejen masivní fokální degenerace srdečních buněk, ale i výrazná intersticiální fibrotizace, jako důsledek dlouhodobého toxického poškození srdečního svalu daunorubicinem. V souladu s tímto pozorováním byl i nález nižší progresse vzestupu plazmatických hladin srdečního troponinu T, ačkoliv tyto hodnoty v závěru dosáhly statistické významnosti.

Na rozdíl od výše diskutovaných výsledků získaných v obou skupinách s nižšími dávkami SIH, ve skupině s nejvyšší podávanou dávkou (2,5 mg/kg) nebyly shledány žádné známky významného protektivní působení. Předčasný úhyn (33%) a funkční parametry levé komory (EF na konci experimentu = $53,9 \pm 1,3$ %, $dP/dt_{\max} = 811 \pm 115$) se významně nelišily od skupiny samotného daunorubicinu. Histologické vyšetření levé komory též odhalilo poškození s výsledky, které se blížily (co do rozsahu i intenzity) nálezům v daunorubicinové skupině.

V.
DISKUZE

Antracyklinová antineoplastika byla poprvé izolována před více než 40-ti lety. Jejich zavedení do klinické praxe významně přispělo k zlepšení odpovědi maligních onemocnění na protinádorovou léčbu. Antracyklinová antibiotika též přispěla k zásadní změně prognózy u pacientů s některými druhy rakoviny (např. akutní leukémie) a dodnes jsou řazena mezi významná základní cytostatika nezastupitelná v některých chemoterapeutických režimech.

Známky kardiotoxicity byly pozorovány již v průběhu prvních klinických hodnocení antracyklinových derivátů. Dalším studiem bylo prokázáno, že lze rozlišit dva základní a do značné míry odlišné druhy antracyklinové kardiotoxicity. Časná (akutní) toxicita totiž nezávisí na kumulativní dávce, probíhá většinou subklinicky a jen zřídka vyžaduje léčbu. Na druhou stranu, s odstupem týdnů až měsíců od léčby se může rozvinout chronická forma antracyklinové kardiotoxicity, jejíž závažnost závisí na celkové kumulativní dávce antracyklinu. Tato forma kardiotoxicity je charakterizována ireverzibilním poškozením myokardu levé komory (vakuolizace cytoplazmy, ztráta myofibril, změna mitochondriální morfologie a zánik kardiomyocytů s následnou progresí intersticiální fibrózy), které se funkčně projevuje jako levostranné srdeční selhání (Ewer a Benjamin 2006). V posledních desetiletích byla rozeznána i tzv. pozdní forma chronické kardiotoxicity, která se může rozvinout i s odstupem mnoha let od ukončení chemoterapie (Lipsultz 1991, Ewer and Benjamin 2006, Aleman 2007).

Protože antracyklinová kardiotoxicita patří k nejobávanějším a zároveň nejhůře léčitelným toxickým účinkům spojeným s protinádorovou chemoterapií, základní strategií je tomuto riziku předcházet. V tomto ohledu patří mezi nejšířejí užívané opatření omezení kumulativní dávky antracyklinu. Poslední studie nicméně prokázaly, že signifikantní nárůst rizika rozvoje kardiotoxicity může nastat již při nižších kumulativních dávkách antracyklinu než se původně předpokládalo (Ewer and Benjamin 2006, Von Hoff 1979). Podle nových informací je hranice 5% výskytu kardiotoxicity překročena již při kumulativní dávce doxorubicinu $400\text{--}450\text{ mg/m}^2$, narozdíl od původních údajů Von Hoffa, který shodné riziko kardiotoxicity odhadoval až při 550 mg/m^2 . Navíc individuální predikce rizika je do značné míry komplikována interindividuální variabilitou výskytu tohoto toxického účinku. Proto je v současnosti před aplikací antracyklinových cytostatik doporučováno neinvazivním způsobem (např. echokardiograficky) vyšetřit funkci levé komory a monitorovat ji i dále v průběhu a po ukončení léčby. Přestože je echograficky stanovená ejekční frakce široce akceptovaným standardem pro monitorování antracyklinové kardiotoxicity, je známo, že tento přístup odhalí až poměrně pokročilé

známky toxicity a nelze jej tedy použít pro odhalení časných známek kardiotoxicity.

Naše zkušenosti založené na echokardiografickém hodnocení daunorubicinové kardiotoxicity na experimentálním modelu u králíka potvrzují výše uvedené závěry. Jak je patrné z předešlých prací (Simunek 2004) i výsledků shrnutých v této dizertaci, k signifikantní změně ejekční frakce levé komory v našich pokusných podmínkách dochází až od 9. týdne pokusu. V tomto období již dochází k poměrně rychlé progresi srdečního poškození a dysfunkce levé komory vedoucím k prvním úhynům. Proto prvním cílem této dizertace bylo zhodnotit přínos dvou nezávislých a v současnosti také hojně diskutovaných přístupů pro možnost časného záchytu chronické antracyklinové kardiotoxicity na experimentálním modelu.

Získané výsledky (viz. Příloha 1) poukázaly na technickou náročnost a omezení hodnocení diastolické funkce u králíka. Vysoká srdeční frekvence totiž znemožňuje hodnotit všechny standardní parametry transmitrálního toku. Proto byla na základě literárních údajů (Young 1990, Nagueh 2000) použita kombinovaná anestézie ketamin/xylazin, která umožnila bezproblémové hodnocení všech zamýšlených parametrů. Výsledky tohoto experimentu ovšem ukázaly, že takto získané parametry nejsou vhodné k hodnocení antracyklinové kardiotoxicity. Mezi možné příčiny tohoto zjištění patří hemodynamické účinky xylazinu jako složky kombinované anestézie. Tato látka i v relativně nízké dávce použité v tomto experimentu (2 mg/kg) sice umožnila kvalitní hodnocení všech parametrů transmitrálního toku, ale, jak vyplynulo z invazivního hemodynamického vyšetření, pouze za cenu výrazného poklesu arteriálního tlaku a srdeční frekvence. Oba tyto parametry mohou mít i samy o sobě významný vliv na výsledky Dopplerovského hodnocení plnění levé komory. Této hypotéze dále odpovídají i výsledky katetrizačně získaného indexu relaxace levé komory (dp/dt_{min}). Výrazný rozdíl v indexu relaxace levé komory mezi kontrolní a ketaminovou skupinou jasně poukazuje na pravděpodobný vliv xylazinu na parametry plnění levé komory v diastolické fázi. K obdobným závěrům také dospěli autoři recentní práce (Stypmann 2007). V této studii bylo mimo jiné zjištěno, že xylazin-obsahující anestézie může mít výrazný vliv nejen na plnění komory hodnocené pomocí pulzního (PW) Dopplerovského měření, ale i na parametry nově užívané diagnostické modality – tkáňového Dopplerovského hodnocení (TDI).

Narozdíl od echokardiograficky hodnoceného plnění levé komory, katetrizační vyšetření umožnilo odhalit daunorubicinem navozenou diastolickou dysfunkci. Tento citlivější a přesnější přístup bylo ovšem možné použít pouze na konci experimentu, a proto

nejsou k dispozici informace o vývoji diastolické funkce v čase. Na druhou stranu tato technika se, vzhledem ke své invazivní podstatě, principiálně nehodí pro časnou detekci změn srdeční funkce. Nález diastolické dysfunkce po opakovaném podání antracyklinu je ovšem ve shodě s našimi předešlými výsledky získanými za standardních podmínek s užitím ketaminové anestézie (Simunek 2004). Porucha homeostázy kalcia a zvýšený výskyt kolagenu (fibrotizace) myokardu levé komory zjištěné v tomto experimentu dále podporují nález patologicky změněné diastolické funkce levé komory. Z těchto informací plyne, že alespoň v našich experimentálních podmínkách není možné použít Dopplerovské vyšetření plnění levé komory pro hodnocení antracyklinové kardiotoxicity. Jedním z limitujících faktorů se totiž ukázala být fyziologicky vysoká srdeční frekvence u králíka (až kolem 300 tepů/min, Suckow a Douglas 1997) a druhým pak výrazný hemodynamický účinek xylazinu. V současné době tedy není běžně k dispozici vyšetřovací technika, která by za těchto náročných podmínek umožnila neinvazivně a citlivě hodnotit diastolickou funkci, bez nutnosti použít anestetika s výrazným vlivem na hemodynamiku. To dokresluje i skutečnost, že technické obtíže s objektivním hodnocením diastolické funkce v klinické praxi pomocí Dopplerovské echokardiografie bývají v současnosti stále častěji diskutovány v recentní literatuře (Arques 2007).

Přestože echografické hodnocení plnění levé komory se neukázalo být perspektivní s ohledem na hodnocení vývoje antracyklinové kardiotoxicity, v této studii byly poodhaleny metodické poznatky, které by mohly mít širší význam z hlediska experimentálního kardiovaskulárního výzkumu. Například xylazin bývá v různých kombinacích (nejčastěji právě s ketaminem) velmi často používán pro anestézii laboratorních zvířat za účelem echografických měření a nebo různých dalších neinvazivních a zejména invazivních vyšetření (Rungwerth 2004; Bull 2003; Derumeaux 2002; Nagueh 2000; Pennock 1997; Hoit 1995; Litwin 1994; Young 1990). Přestože xylazinová složka zaručí optimální hlubokou anestézii, při akceptovatelném útlumu dechu a velmi dobré myorelaxaci, zjištěné údaje mj. naznačují, že tato látka může mít velmi významný vliv na výsledky získané za těchto podmínek. Nálezy získané v této části dizertace pak korespondují se závěry dalších studií z poslední doby dokumentující vliv xylazinu na echokardiograficky hodnocené parametry, jakož i další kardiovaskulární parametry (Chaves 2001). Uvedené závěry se vztahují i na řadu dalších α_2 -mimetik používaných v kombinačních anestetických režimech (např. medetomidin). Vzhledem k tomu, že v experimentálním výzkumu bývají často používány i vyšší dávky xylazinu (nebo příbuzných α_2 -mimetik) nelze vyloučit vliv anestetika i na jiné sledované parametry

než ryze kardiovaskulární – rozsáhlé změny v hemodynamice mohou potenciálně ovlivnit i např. farmakokinetické parametry léčiv. Z uvedených výsledků tedy plyne, že vedle výhod a možností xylazinové anestézie v experimentálním výzkumu je třeba počítat i s jejími limitacemi.

Narozdíl od technicky komplikovaného a na zkušenosti echografisty náročného hodnocení diastolické funkce, byl troponin T prokázán jako velmi užitečný a citlivý marker časného poškození myokardu. V této pilotní studii byly vůbec poprvé pravidelně a systematicky hodnoceny plazmatické koncentrace tohoto markeru v průběhu celého rozvoje chronické antracyklinové kardiotoxicity. Absence významného nárůstu po první aplikaci není překvapivá, neboť teprve kumulace změn spojených s opakovaným podáváním antracyklinu vede k rozvoji srdečního poškození. Ačkoliv absence detekovatelných hladin po prvním podání cytostatika je souladu s řadou dalších pozorování v experimentálním uspořádání i v klinické praxi (Herman 1998, Adamcova 2005), někteří autoři v recentních publikacích (Cardinale 2006, Kilickap 2006) naměřili mírně zvýšené hladiny troponinu T a I již po prvním chemoterapeutickém cyklu a domnívají se, že tyto výsledky jsou schopny identifikovat pacienty s vysokou pravděpodobností rozvoje antracyklinové kardiotoxicity. Zatím ovšem není možné definitivně zhodnotit význam a eventuální predikční sílu těchto výsledků, neboť pro tyto účely by byla třeba delší doba sledování a větší počet pacientů. Není vyloučeno, že tyto velmi časně elevace troponinu T v plazmě mohou souviset s možnou přítomností kardiovaskulárních rizikových faktorů u některých pacientů již před aplikací daunorubicinu. Tento faktor se nemohl projevit ve výsledcích naší studie, protože v našem experimentu byla použita pouze intaktní zvířata.

V této práci byl demonstrován nárůst koncentrací troponinu T nad detekční limit již ve čtvrtém týdnu pokusu a signifikantní nárůst oproti kontrolní skupině byl zjištěn již o týden později – tj. při relativně nízké kumulativní dávce daunorubicinu (200 mg/m²). Ve druhé části pokusu pak byl zaznamenán progresivní nárůst koncentrací troponinu T, což odpovídá kumulativnímu charakteru antracyklinové kardiotoxicity. Protože v této pilotní skupině bylo studováno pouze omezené množství pokusných zvířat, není možné spolehlivě usuzovat na individuální predikční hodnotu koncentrací troponinu T. Nicméně v předchozí studii jsme poukázali na to, že hladiny troponinu T negativně korelují s kontraktilitou levé komory (Simunek 2003). V experimentálních podmínkách se tedy troponin T zdá být nejcitlivějším v současnosti dostupným biomarkerem antracyklinové kardiotoxicity, přičemž jeho signifikantní elevace předchází i poklesu systolické funkce levé komory, jako stále nejčastěji doporučovanému parametru pro hodnocení a monitorování antracyklinové

kardiotoxicity (Elbl 2002, Gersl 1994, Simunek 2004). Uvedená studie též potvrdila vhodně zvolené odběrové intervaly (1., 5., 8., 10. a 11. týden) pro stanovení troponinu T pro další experimentální studium kardioprotektivních vlastností chelatačních látek. Získané výsledky též naznačují, že troponin T si zasluhuje další zkoumání, jak v experimentálním uspořádání, kde může napomoci objektivněji a přesněji hodnotit kardiotoxické a potenciální kardioprotektivní působení léčiv, tak i v klinické praxi, kde by mohl s předstihem určit pacienty, u nichž dochází k subklinickým známkám kardiotoxicity. Včasné odhalení takového rizika může dovolit provést patřičné úpravy dávkovacího schématu chemoterapie, či snížit riziko progresse toxického poškození myokardu pomocí současného podávání kardioprotektiva dexrazoxanu.

Protože se soudí, že v patogenezi antracyklinové kardiotoxicity sehrávají důležitou úlohu ionty kovů (zvláště pak železa), v další části této práce byla věnována pozornost studiu změn v obsahu vybraných kovových prvků v myokardu pokusných zvířat u nichž byla navozena experimentální antracyklinová kardiomyopatie. Výsledky byly porovnány s nálezy získanými u skupiny, které bylo vždy před aplikací daunorubicinu podáváno klinicky užívané kardioprotektivum - dexrazoxan. Přestože několik studií dokládá výrazné změny v homeostáze železa v srdečních buňkách exponovaných antracyklinům, v této studii nebyla na našem klinicky relevantním modelu antracyklinové kardiotoxicity zaznamenána žádná změna v zastoupení tohoto prvku. I když některé práce naznačují, že interakce antracyklinu s tzv. „iron-regulatory proteins“ (IRP) může vést ke zvýšení exprese transferinového receptoru v srdečních buňkách (Kotamraju 2002, Xu 2003) a tak následně zvýšit celkové množství tohoto prvku v kardiomyocytech, závěry námi provedené studie tuto hypotézu nepodporují. Naopak, tyto výsledky spíše naznačují, že zásah antracyklinů do homeostázy železa v kardiomyocytech je na první pohled méně nápadný a ve své molekulární podstatě výrazně komplexnější a jsou v souladu s nálezy dalších autorů (Xu 2005). Na základě všech těchto nálezů se zdá pravděpodobnější, že spíše než ve změnách celkového absolutního obsahu železa v srdečních buňkách může vlivem antracyklinových cytostatik docházet k indukci změn v relativním zastoupení iontů železa v jednotlivých buněčných kompartmentech. Bylo například prokázáno, že antracykliny významným způsobem inhibují mobilizaci železa z feritinu (Kwok 2003, Kwok 2004). Dočasná imobilizace těchto buněčných zásob železa může mít, vzhledem k esenciálnímu významu tohoto prvku pro buněčný metabolismus, výrazný negativní dopad na osud kardiomyocytů. Nelze však vyloučit, že se naopak může jednat o obranný mechanismus, který by měl omezit progresi železem katalyzovaného poškození srdečních buněk (Xu 2005).

Protože se všeobecně předpokládá, že dexrazoxan účinkuje prostřednictvím svého železo-chelatujícího aktivního metabolitu (látka ADR-925), bylo tudíž zajímavé studovat eventuální změny v myokardiálních koncentracích železa po aplikaci tohoto léčiva. Absence signifikantních změn v myokardiálním zastoupení iontů železa zjištěná v této studii by se mohla zdát překvapivá, nicméně je třeba zdůraznit, že dexrazoxan byl aplikován pouze 1 x týdně (stejně tak jako daunorubicin) a odběr tkání probíhal až s několikadenním odstupem po poslední aplikaci látky (5-7 dní). Je tedy pravděpodobné, že v období mezi jednotlivými aplikacemi mohlo dojít ke kompenzaci poklesu iontů železa v myokardu prostřednictvím zvýšené exprese transferinového receptoru. Na druhou stranu je také možné, že dexrazoxan, respektive jeho aktivní metabolit ADR-925, mobilizuje železo z kardiomyocytů pouze velmi omezeně a jeho kardioprotektivní účinek spíše spočívá v dočasném vyvázání katalyticky aktivních volných iontů železa.

Nejvýznamnější změna v zastoupení prvků v myokardu levé komory po opakovaném podávání daunorubicinu byla nalezena při hodnocení koncentrací kalcia. Tento poznatek se zdá být ještě zajímavější ve světle signifikantní negativní korelace tohoto parametru s indexem kontraktility levé komory (dp/dt_{max}). Kauzální vztah tohoto pozorování k daunorubicinové kardiotoxicitě dále podporuje nepřítomnost signifikantní změny v myokardiální koncentraci kalcia ve skupině, u které bylo dosaženo účinné kardioprotekce pomocí dexrazoxanu. Z literárních pramenů (Minotti 2004, Olson 2005, Kim 2006) je známo, že antracykliny významně interferují s homeostázou kalcia v kardiomyocytech, což ve svém důsledku může vyústit v přetížení buňky kalciumem (tzv. kalcium overload). Dlouhodobě zvýšené hladiny vápníku v cytoplazmě vedou mimo jiné k aktivaci kalcium-dependentních proteáz, které mohou být zodpovědné za řadu dalších patologických dějů odehrávajících se v kardiomyocytech. Relativně nedávno bylo na modelu izolovaných adultních kardiomyocytů demonstrováno, že doxorubicin může významným způsobem navodit aktivaci kalpainu, a to již v relativně nízkých koncentracích (Lim 2004). Tato specifická Ca-dependentní proteáza je schopna vysoce efektivně štěpit několik významných substrátů – např. troponiny (významné myofilamentární regulační proteiny), titin (strukturální protein důležitý pro stabilitu sarkomery) nebo ankyrin a fodrin (proteiny důležité pro správnou funkci a ukotvení Na^+/K^+ -ATPázy, Inserte 2005). Zvýšené koncentrace cytosolického kalcia mimo jiné vedou k hromadění tohoto prvku uvnitř mitochondrií a tímto způsobem je dále regulována signalizace vedoucí k buněčné smrti (apoptotické nebo nekrotické) (Wallace 2003).

Dosud bylo navrženo několik mechanismů, které mohou být zodpovědné (nebo

spoluzodpovědné) za poruchu homeostázy kalcia navozenou antracykliny. Předpokládá se, že tato cytostatika mohou poruchu v homeostáze kalcia navodit buď přímo, nebo prostřednictvím volných radikálů či 13-OH antracyklinových metabolitů. Všechny tyto cesty mohou vést k výraznému zásahu do struktury nebo funkce vápníkových kanálů a pump. Mezi nejdiskutovanější cíle toxického účinku antracyklinů na buněčnou kalciovou homeostázu patří SERCA (Olson 2005). Tato vápníková pumpa je zodpovědná za návrat kalcia do sarkoplazmatického retikula v diastolické fázi srdečního cyklu. Bylo prokázáno, že chronické podávání antracyklinů vede k snížené myokardiální expresi a funkci SERCA (Arai 1998, Olson 2005). Tomu, že antracykliny ovlivňují funkci a/nebo expresi SERCA spíše až sekundárně (např. prostřednictvím tvorby ROS uvnitř kardiomyocytů) napovídají výsledky studie, ve které byl doxorubicin podáván geneticky modifikovaným zvířatům s kardiálně specificky zvýšenou expresí SERCA (Burke 2003). Tento zásah do myokardiálního genomu totiž nevedl k významně zvýšené rezistenci myokardu pokusných zvířat vůči antracyklinové kardiotoxicitě. Kardioprotektivní účinek dexrazoxanu, který byl pozorován i naší práci (Příloha 2) tedy může spočívat v prevenci produkce ROS a tím následně zabránění i poškození klíčových proteinů regulujících homeostázu kalcia v kardiomyocytech. S touto hypotézou korespondují i poznatky získané na jiných modelech kardiovaskulárních onemocnění (např. ischemicko-reperfúzní poškození). Zde byla jasně prokázána kauzální souvislost produkce ROS v reperfúzní fázi s poškozením funkce a/nebo exprese SERCA (Inserte 2005, French 2006). V této souvislosti je též velmi zajímavé, že v recentní studii bylo prokázáno, že dexrazoxan je působí kardioprotektivně nejen vůči antracyklinové kardiotoxicitě, ale i proti ischemicko-reperfúznímu poškození srdce (Ramu 2006). Je tedy zřejmé, že na rozvoji antracyklinové kardiotoxicity a ischemicko reperfúzního poškození se podílejí do značné míry podobné molekulární mechanismy.

Vzestup koncentrace kalcia v myokardu pokusných zvířat v daunorubicinové skupině byl doprovázen mírnějším, avšak signifikantním poklesem obsahu magnézia. Podobný nález byl popsán u řady jiných modelů srdečního selhání (např. "pacingem" navozené srdeční selhání u psa, Hagney 1998), stejně tak jako v bioptických vzorcích odebraných pacientům se srdečním selháním (Ralston 1989). Pokles obsahu hořčíku, který odpovídal míře srdečního poškození, byl též popsán v myokardiálních vzorcích od pacientů, kterým byla podávána antracyklinová cytostatika (Sartoni 1991). Mechanismus vedoucí k tomuto stavu není zatím objasněn. S poklesem obsahu hořčíku může též souviset pokles v obsahu draslíku. Je totiž známo, že ionty hořčíku inhibují eflux K^+

prostřednictvím inhibice ATP-dependentního K^+ kanálu; při nedostatku hořečnatých iontů pak mohou být draselné ionty vyšší měrou depletovány ven z buněk. Uvedený vztah byl v této studii podpořen poměrně těsnou korelací obsahu obou iontů v myokardu pokusných zvířat a obdobný vztah byl popsán i jinými autory u pacientů se srdečním selháním (Ralston 1989). V naší studii dexrazoxan navíc dovedl antagonizovat nejen pokles myokardiálního obsahu hořčíku, avšak zároveň i draslíku (viz Příloha 2).

Myokardiální koncentrace selenu byly v daunorubicinové skupině pouze nesignifikantně zvýšené. Je možné, že za tuto tendenci zodpovídá daunorubicinem indukovaná exprese glutathion peroxidázy, jako hlavní metabolicky aktivní formu selenu. Zvýšená exprese tohoto enzymu, jako reakce na daunorubicinem indukovaný oxidační stres v myokardu levé komory, byla opakovaně popsána dalšími autory (Yin 1998). V souladu s touto hypotézou byl též zjištěn snížený obsah tohoto prvku ve skupině, které byl podáván dexrazoxan jako modelové kardioprotektivum.

V uvedeném pokusu dexrazoxan dokázal plně zabránit nejen daunorubicinem navozeným změnám v myokardiálním zastoupení jednotlivých prvků, ale v souladu s tím také navodil účinnou kardioprotekci a zabránil předčasnému úhynu pokusných zvířat. Významný kardioprotektivní účinek dexrazoxanu byl opakovaně dokumentován na klinicky relevantních experimentálních modelech (Herman 1998), ale i v četných klinických studiích (Swain 2004, Elbl 2005, Marty 2006). Dexrazoxan je tak dosud jedinou látkou s jasně prokázaným kardioprotektivním účinkem jak v experimentálních podmínkách, tak v klinické praxi. Na základě dostupných informací se kardioprotekce pomocí dexrazoxanu zdá být výrazně perspektivnější než podávání klasických antioxidantů (např. vitamin C, E, acetylcystein; Legha 1982, Dorr 1996, Dresdale 1982, Myers 1983). Hlavním mechanismem kardioprotektivního působení dexrazoxanu je, alespoň podle dostupných informací, chelatace volných iontů železa prostřednictvím aktivního metabolitu (ADR-925). Uvedený rozdíl v účinku scavengeru/antioxidantů a dexrazoxanu je poměrně zajímavý s ohledem na to, že oba kardioprotektivní přístupy jsou zaměřeny na stejný patogenetický mechanismus antracyklinové kardiotoxicity – produkci volných kyslíkových radikálů (Minotti 2004). Možný rozdíl v praktické účinnosti obou kardioprotektivních intervencí může přímo souviset se strategií, jakou tyto látky proti ROS působí. Zatímco scavengery a látky posilující přirozenou antioxidační kapacitu myokardu inaktivují již utvořené ROS, principem účinku dexrazoxanu (resp. jeho aktivního metabolitu) je tvorbě ROS předcházet. Vzhledem k tomu, že antracyklinová cytostatika produkují především hydroxylové radikály, které jsou známé svou extrémně vysokou

reaktivitou a ultrakrátkým poločasem, je možné, že potlačení cyklické tvorby ROS je z kardioprotektivního hlediska výrazně výhodnější. Navíc při současné indukci inducibilní NO syntázy mohou superoxidové radikály také interagovat s NO, což vede k vysoce reaktivnímu a cytotoxickému peroxynitritu (Fogli 2004).

Protože jsou volné ionty železa dávány do kauzální souvislosti s produkcí ROS, kardioprotektivní strategie využívající látky selektivně chelatující železo se zdá být velmi perspektivní. Další výzkum chelátorů železa jako potenciálních kardioprotektiv ovšem významně omezuje nedostatek vhodných léčiv s těmito vlastnostmi. Deferoxamin, v klinické praxi nejužívanější chelátor železa, se na rozdíl od dexrazoxanu ukázal být pro účely kardioprotekce nevhodný (Herman 1994). Hlavní příčinou uvedeného faktu je relativně vysoká hydrofilita tohoto léčiva omezující jeho prostup tohoto chelátoru do srdečních buněk. Antioxidačně působící lipofilní chelátory železa, které mohou snadno procházet do intracelulárního kompartmentu a vyvazovat ionty železa, si tedy jako potenciální kardioprotektiva zaslouhují další pozornost.

Aroylhydrazonové chelátory železa se zdají být jednou z nejzajímavějších skupin lipofilních látek selektivně vázajících ionty železa. Na základě celé řady experimentů provedených v laboratoři našeho spolupracovníka prof. Poňky (McGill University, Canada) byly vybrány dva nejnadějnější analogy (pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazon – o-108 a salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon - SIH), které reprezentují dvě významné vývojové linie nových chelatačních látek odvozených od „mateřské látky“ pyridoxal isonikotinoyl hydrazonu (PIH). Přes zajímavé farmakologické vlastnosti těchto látek (Buss 2002, Yu 2006), zůstává otázkou jejich bezpečnost a potenciální toxicita, a to zejména po jejich opakovaném podání. Studium akutní toxicity obou látek (provedené na Ústavu experimentální biofarmacie, ÚEBF, ProMed s.r.o) naznačovalo poměrně nízkou toxicitu o-108. Po p.o. podání maximální podatelné dávky 4 g/kg myším došlo k úhynu pouze 40 % jedinců, přičemž i.p. podání stejné dávky vedlo k úhynu 90 % pokusných zvířat. V případě SIH (ve formě hydrochloridu) byla po p.o. aplikaci stejné maximální dávky pozorována pouze 10% mortalita, nicméně po i.p. podání byla již pozorován kompletní úhyn a LD₅₀ byla stanovena na 285 mg/kg. V případě i.p. podání byla pozorována i určitá lokální reakce v místě podání a není vyloučeno, že se tento jev mohl ve vyšších dávkách určitým způsobem spolupodílet na celkové toxicitě.

V rámci této dizertace byly studovány bezpečnostní aspekty a eventuální orgánová toxicita opakovaného podání pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazonu u králíka ve třech dávkách 25, 50 a 100 mg/kg u králíka. Uvedené dávky byly zvoleny s ohledem na

přecházející studii indukce exkrece železa u hypertransfundovaných potkanů (25-200 mg/kg) (Link 2003). Dávkovací schéma a způsob podání použité v naší studii (i.p., 1 x týdně po dobu 10-ti týdnů) byly vybrány s ohledem na zamýšlené studium kardioprotektivních vlastností této látky na modelu daunorubicinem indukované kardiotoxicity u králíka (Gersl 1994, Simunek 2004). Také při studiu exkrece železa pomocí chelátoru o-108 byla hodnocena celková kumulativní exkrece tohoto prvku v horizontu jednoho týdne po jednorázovém podání látky (Link 2003). Při použití chelátoru o-108 jak pro eventuální kardioprotektivní účinky, tak i s ohledem na případnou léčbu přetížení organismu železem, je z principu nutné opakované podávání této látky. Před dalším studiem farmakologických vlastností o-108 tedy bylo třeba aspoň předběžně zjistit jeho tolerabilitu, případné neočekávané farmakodynamické účinky (ve smyslu „safety pharmacology“) a potenciální orgánovou toxicitu po opakovaném podávání této látky. Vzhledem k tomu, že v obou případných indikacích je patologicky postižený kardiovaskulární systém, zvláštní pozornost byla věnována právě kardiovaskulárním parametrům.

V průběhu celé studie nebyl zaznamenán žádný úhyn a nebyly pozorovány zjevné vnější známky toxicity. To svědčí o tom, že opakované podávání chelatační látky s sebou nepřineslo zásadní, život ohrožující toxický účinek, který by nebyl odhalen při studiu akutní toxicity této látky (viz výše). Nicméně, sledování vývoje tělesných hmotností pokusných zvířat v průběhu experimentu upozornilo na skupinu s nejvyšší dávkou chelátoru (na rozdíl od ostatních skupin zde nebyl přírůstek hmotnosti setrvale signifikantní). Tento náález do určité míry korespondoval s přechodně nižší tendencí pokusných zvířat přijímat potravu a vodu, jakož i se sníženou motorickou aktivitu v období 1-2 dnů po aplikaci chelátoru. Nicméně, vzhledem k přechodnému charakteru pozorovaných změn byl celkový přírůstek tělesné hmotnosti pozitivní a nebyl statisticky významně nižší než ve skupině, které bylo podáváno vehikulum. Ačkoliv se jedná o chelátor železa s účinkem prokázaných v podmínkách *in vitro* i *in vivo*, v průběhu celé studie nebyl zaznamenán pokles celkového sérového železa ani anemické obtíže s tímto související. Toto pozorování není podezřelé, neboť aroylhydrazonové chelátory jsou schopny vázat pouze volné ionty železa, kterých je v intaktním organismu, oproti organismu přetíženého železem, pouze velmi omezené množství (do 5 %, Ponka 1997, Aisen 2000). Studovaný chelátor nemůže vyvazovat ionty železa vázané v zásobních (feritin) či transportních proteinech (transferin) a tak své železo-chelatační vlastnosti mohl uplatnit pouze v tzv. labilní části intracelulárních zásob železa (labile iron pool) (Buss

2002). Vzhledem k omezenému množství iontů železa v tomto kompartmentu, jeho vysokému stupni mobility a dávkovacímu schématu chelátoru, lze očekávat, že uvedené ztráty byly bez problému kompenzovány zvýšenou expresí transferinového receptoru, popř. přechodně zvýšenou střevní absorpcí železa. Plazmatické koncentrace dalších významných biogenních prvků (např. kalcia) nebyly podáváním chelátoru o-108 ovlivněny, což opět ukazuje na relativně vysokou chelatační selektivitu této látky vůči iontům železa uváděnou v literatuře (Richardson a Ponka 1998, Buss 2002).

V průběhu studie byly zaznamenány pouze malé změny standardních biochemických parametrů. Nebylo pozorováno žádné zvýšení plazmatické aktivity jaterních transamináz, s čímž korespondovaly negativní výsledky histologického vyšetření jaterní tkáně. Za 24 hodin po aplikaci chelátoru došlo pouze k mírným a přechodným biochemickým změnám (např. zvýšený celkový cholesterol), které se stabilizovaly v průběhu pokusu. Ve skupinách, kterým byl podáván chelátor železa, došlo také k určitým fluktuacím kreatininémie, nicméně ani v tomto případě nebyl zaznamenán významný trend či dávková závislost. Při histologickém vyšetření ledvin byly shledány pouze mírné změny, které neměly vztah k dávce chelátoru a byly kvalitativně i kvantitativně velmi blízké změnám pozorovaným ve skupině vehikula. Přestože použité vehikulum je dodnes používáno pro solubilizaci parenterálních lékových přípravků obsahujících např. taxany nebo cyklosporin jsou známy informace o určitém nefrotoxickém potenciálu této pomocné látky (Gelderblom 2001).

Jediným statisticky významným a zároveň překvapivým nálezem spojeným s opakovaným podáváním chelátoru o-108 s ohledem na kardiovaskulární systém bylo zvýšení plazmatických koncentrací troponinu T. Přestože tento nález nejevil jasnou závislost na dávce chelátoru, nejvyšší a statisticky signifikantní hodnoty byly pozorovány ve skupině po podání nejvyšších dávek chelátoru. K těmto výsledkům ale nebyl nalezen žádný morfologický nebo funkční korelát, ačkoliv absolutní hodnoty tohoto v biomarkeru naznačovaly, že by změny na této úrovni již měly být patrné. Podrobné histopatologického vyšetření myokardu v této skupině ukázalo pouze na velmi mírné změny, přičemž nebylo možné nalézt kvalitativní nebo kvantitativní rozdíl v závislosti na dávce chelátoru. Navíc obdobné změny, dokonce i o něco nápadnější, byly pozorovány i ve skupině vehikula, kde k zvýšení plazmatických koncentrací troponinu nedošlo. Funkční vyšetření (ejekční frakce levé komory stejně tak jako index kontraktility dP/dt_{max}) dokumentují zcela normální systolickou funkci levé komory bez náznaku podezřelých změn v porovnání s kontrolní i vehikulovou skupinou. Dále nebyly pozorovány žádné rozdíly v arteriálním krevním tlaku,

srdeční frekvenci a nebyl také zaznamenán výskyt výrazných elektrofyziologických abnormalit. Zvýšené plazmatické koncentrace troponinu T tedy v tomto případě nebyly asociovány s žádnými výraznými kardiovaskulárními abnormalitami, takže příčina a význam tohoto pozorování zůstává nejasná.

Druhý studovaný chelátor - salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (SIH) - byl podáván intravenózně králíkům v dávce 1 mg/kg (referenční skupina pro studium kardioprotekce SIH, viz Příloha 6). Tento chelátor obdobně jako v předchozím případě analog o-108 nezpůsobil žádný předčasný úhyn pokusných zvířat. O dobré tolerabilitě SIH také svědčí výrazný pozitivní přírůstek tělesné hmotnosti zjištěný v této skupině, jakož i absence jakýchkoliv vnějších známek toxicity, změn v chování či příjmu vody a potravy pokusných zvířat. Podávání SIH nevedlo ke vzniku žádných hematologickým či biochemických abnormalit, což je též důležité s ohledem na bezpečnost opakovaného podávání této chelatační látky. Na rozdíl od výše diskutovaného chelátoru o-108, opakované podávání SIH nevedlo k významnému zvýšení plazmatických koncentrací troponinu T a tyto hodnoty plně odpovídaly výsledkům získaným v kontrolní skupině. Z těchto pilotních výsledků ovšem samozřejmě nelze spolehlivě odhadnout eventuální rizika či toxicitu spojenou s opakovaným podáním SIH, mimo jiné s ohledem na to, že zde nebyla provedena eskalace dávky chelátoru. Nicméně v předchozích experimentech byl SIH intraperitoneálně podáván králíkům v dávce 50 mg/kg (tj. 50x vyšší) při stejném schématu pokusu (Klimtova 2003). Intraperitoneální podání chelátoru bylo zvoleno s ohledem na omezenou rozpustnost SIH. V této studii nebyly pozorovány žádné změny kardiovaskulárních parametrů a hladiny troponinu T se opět nelišily od kontrolní a vehikulové skupiny (Klimtova 2003). Jediným zjištěným rozdílem byly určité změny v morfologii ledvin, i když k tomuto nálezu mohlo přispět vehikulum - Cremofor EL. Signifikantní nárůst koncentrací troponinu T v plazmě nebyl nalezen ani po opakovaném podání mateřské látky celé této skupiny chelátorů - pyridoxal isonikotinoyl hydrazonu (PIH, 50 mg/kg, i.p.). Ani u tohoto chelátoru, který je chemickou strukturou ještě bližší k o-108, nebyl zaznamenán signifikantní negativní vliv na žádný z celé řady hodnocených kardiovaskulárních parametrů (Simunek 2001).

Aroylhydrazonové chelátory jsou pokládány za významnou skupinu látek selektivně chelatujících železo. Jejich účinek byl opakovaně prokázán na modelech přetížení organismu železem jak v podmínkách *in vitro*, tak i *in vivo*. V literatuře však nebyly dostupné v podstatě žádné informace o osudu těchto látek v organismu. Dosud tedy bylo možné na osud aroylhydrazonových chelátorů v živém organismu usuzovat pouze

nepřímo na základě studií exkrece železa po jejich podání. Z těchto údajů plyne, že uvedené látky navozují významnou a dávkově závislou exkreci po perorálním podání (Hoy 1979, Cikrt 1980, Bláha 1998, Buss 2002). Proto lze u těchto látek očekávat poměrně dobrou biologickou dostupnost. Aroylhydrazony navozená exkrece iontů železa probíhala téměř výlučně žlučí do stolice (nárůst exkrece močí byl zanedbatelný) (Bláha 1998, Buss 2002). Signifikantní nárůst exkrece byl pozorován cca do šesté hodiny po perorálním podání chelátorů, s maximem během prvních tří hodin (Bláha 1998). Je ovšem nutné zdůraznit, že v těchto studiích nebyly hodnoceny vlastní aroylhydrazonové chelátory, ale pouze ionty železa. Není také vyloučeno, že parentní látka může mít výrazně jinou farmakokinetiku, než její komplex se železem.

Příčinou absence základních farmakokinetických údajů, charakterizujících osud těchto potenciálních léčiv v organismu, byla především nedostupnost moderních selektivních a přesných analytických metod, vhodných pro hodnocení těchto látek. Z kvantitativních analytických metod byly donedávna v literatuře dostupné pouze spektrofotometrické a potenciometrické stanovení a prostá tenkovrstvá chromatografie (Richardson 1989, Poňka 1994). Ačkoliv tyto analytické metody mohou být vhodné pro některé jednoduché laboratorní aplikace, jejich postavení v moderní farmaceutické analýze je dnes spíše okrajové. Uvedené metody se navíc vzhledem k nízké selektivitě a citlivosti nehodí pro bioanalytické hodnocení léčiv ve farmakokinetických studiích. Proto musely být pro tyto účely vyvinuty a validovány zcela nové metody založené na vysokoúčinné kapalinové chromatografii ve spojení s detekcí v ultrafialové oblasti (HPLC-UV) (Kovarikova 2004). Tyto metody byly použity k hodnocení čistoty substancí chelátorů použitých v této dizertaci a sloužily též pro pilotní hodnocení stability těchto látek ve zvolených vehikulech (Kovarikova 2006). Uvedené metody byly dále adaptovány a validovány dle směrnic FDA pro bioanalytické studie pro účely stanovení o-108 a SIH v plazmě pokusných zvířat (Dr. Kovaříková, Farmaceutická fakulta UK v Hradci Králové). Oběma pilotním studiím farmakokinetiky aroylhydrazonových chelátorů železa předcházely předpokusy, jejichž cílem bylo definovat kalibrační rozmezí chelatačních látek, intervaly pro odběr biologického vzorku, jeho objem a eventuální vliv techniky odběru, předanalytického zpracování vzorku a podmínek jeho uchování do provedení analýzy. Tyto informace byly důležité pro úpravu analytické metody a její validaci, jakož i pro optimalizaci podmínek farmakokinetického experimentu.

Pro účely pilotních farmakokinetických studií (Přílohy 4 a 5) bylo použito intravenózní podání obou léčiv a relativně vyšší podávaná dávka (10 mg/kg) tak, aby

citlivost metody dovolila dostatečně dlouhé sledování průběhu plazmatických koncentrací (kvantifikační limity pro SIH a o-108 byly 1,08 a 2,51 μM). Vzhledem k přítomnosti nevodných složek vehikula bylo podání studovaných látek provedeno formou pomalé intravenózní injekce. Maximální koncentrace chelátoru bylo dosaženo v obou případech ke konci aplikace (2-3 min), ale c_{max} obou chelátorů se v přepočtu na ekvimolární dávku významně lišila - c_{max} o-108 byla cca. 4,2-krát vyšší než v případě SIH. Poměrně značný rozdíl mezi oběma chelátory byl též pozorován v případě zdánlivého distribučního objemu. Zdánlivý distribuční objem SIH (cca. 1,5 l/kg) signalizující významnou distribuci do celkové tělesné vody (tedy do extracelulárního i intracelulárního kompartmentu) a určitou retenci ve tkáních nebyl zásadním překvapením, protože tento údaj odpovídá fyzikálně-chemickým vlastnostem tohoto chelátoru a předcházejícím experimentům na *in vitro* i *in vivo* úrovni. Na druhou stranu určitým překvapením byl relativně malý distribuční objem o-108 (0,35 l/kg), neboť tato hodnota sice přesahuje celkový extracelulární objem (cca. 0,2 l/kg), ale zdaleka neodpovídá předpokládaným hodnotám. Chelátor o-108 je totiž ještě významně lipofilnější než výše diskutovaný SIH - $\log P$ (SIH) = 1,75 a $\log P$ (o-108) = 2,74 (tj. rozdíl v rozdělovacím koeficientu je přibližně 10-ti násobný). Navíc v *in vitro* o-108 studiích jednoznačně prokazoval výraznou schopnost průniku do intracelulárního kompartmentu a to dokonce i lépe než SIH (Buss 2002, Buss 2003). Jedním z možných vysvětlení je významnější vazba o-108 na plazmatické bílkoviny. Na tento jev by mimo jiné mohla poukazovat již zmíněná vyšší lipofilita tohoto chelátoru. Kromě toho, ačkoliv byly v obou případech použity pro formulaci chelátorů shodné kosolventy, SIH byl pro účely těchto studií použit jako sůl (hydrochlorid), což usnadnilo jeho rozpustnost ve vodných roztocích. Příprava soli o-108 se ale ukázala být z chemických důvodů nemožná, a proto musel být tento chelátor podáván jako volná báze. Není vyloučeno, že ve vodném systému obtížně rozpustný chelátor o-108 se po pomalém intravenózním podání významnou měrou solubilizoval v krvi za účasti vysoké vazby látky na plazmatické proteiny. Tomu by také mohla nasvědčovat shoda v poměru naměřených maximálních koncentrací o-108 a SIH (4,12) s poměrem zdánlivých distribučních objemů těchto látek (4,21). Nepřímým dokladem distribuce chelátoru o-108 do intracelulárního kompartmentu byl ovšem především kardioprotektivní účinek této látky, který vykazoval obdobnou dávkovou závislost jako SIH (viz dále).

V případě obou chelátorů byl zjištěn rychlý pokles koncentrací těchto látek v plazmě korespondující s poměrně rychlou distribucí. Relativně rychlý pokles plazmatických koncentrací ovšem následoval i v další fázi, což svědčí o rychlé eliminaci

těchto látek. Za 60 (SIH), respektive 90 (o-108) minut po aplikaci studovaných látek pokusným zvířatům poklesly koncentrace těchto látek v plazmě pod kvantitativní limit (LLOQ) a dále již nebylo možné tyto chelátory analyticky hodnotit, při definované přesnosti a správnosti stanovení. S tímto pozorováním korespondovaly poměrně krátké biologické poločasy eliminace obou chelátorů (cca 17 a 28 minut). Z těchto parametrů lze odvozovat, že ke kompletní eliminaci studovaných látek dochází za cca 68-85 min (v případě SIH), respektive za 112-140 min (v případě o-108). Rozdíl v biologických poločasech obou chelátorů je sice signifikantní ($p < 0,05$), ale nikoliv zásadně odlišný. V obou případech byl biologický poločas eliminace relativně krátký. Je třeba podotknout, že se patrně nejedná o náhodné pozorování, ale spíše o vlastnost mající určitý vztah k chemické struktuře aroylhydrazonových chelátorů, neboť byla nalezena v úvodních pokusech s představitelem další série aroylhydrazonových analogů (PCTH) byla nalezena sledovali obdobně rychlou eliminaci jako v případě o-108 (nepublikované výsledky).

Tyto pilotní farmakokinetické studie jsou prvními údaji o farmakokinetice aroylhydrazonových chelátorů vůbec. Studium v této oblasti bylo výrazně komplikováno a z časového hlediska též pozdrženo nezbytným vývojem validních analytických metod. Narozdíl od jiných skupin léčiv zde nebylo možné opřít se o žádné literární údaje týkající se analýzy chemickou strukturou blízkých látek. Ke studiu kardioprotektivních vlastností SIH již bylo možné využít některé poznatky z těchto farmakokinetických experimentů (např. volba časového odstupu pro podání daunorubicinu). Nicméně je zřejmé, že zde diskutované experimenty spíše představují úvod do studia farmakokinetiky těchto chelatačních látek. Pro kompletní objasnění farmakokinetiky těchto potenciálních léčiv a určení všech důležitých farmakokinetických parametrů (biologická dostupnost, vazba na plazmatické proteiny, koncentrace v klíčových tkáních jako např. myokard, exkrece atd.) je však nutné vyvinout ještě řádově citlivější analytickou metodu. Vzhledem k slabé přirozené fluorescenci těchto látek se jako nejperspektivnější jeví nejnovější detekční přístup – hmotnostní spektrometrie (MS) a této možnosti je také v současné době věnována pozornost. V průběhu této fáze bylo dále zjištěno, že studované látky jsou do určité míry chemicky labilní v plazmě, ačkoliv jsou téměř zcela stabilní ve fyziologickém roztoku o fyziologickém pH. Při analýze vzorků z farmakokinetických experimentů bylo v některých případech také možné detekovat chromatografické píky odpovídající produktům štěpení hydrazonové vazby parentních chelátorů. Protože není vyloučena možná souvislost mezi krátkým biologickým poločasem a hydrolýzou hydrazonové vazby chelátorů, v současnosti je ve spolupráci s odborníky na farmaceutickou analýzu a chemii

(Dr. Kovaříková a Dr. Vávrová, FaF UK) věnována pozornost možnosti obměny chemické struktury s cílem optimalizovat farmakokinetické vlastnosti těchto látek.

V návaznosti na další studie byl studován potenciálně kardioprotektivní účinek chelátoru železa o-108 po intraperitoneálním podání u králíka (Příloha 6). Základním předpokladem pro perspektivní kardioprotektivum je ovšem absence negativního vlivu látky na protinádorový účinek antracyklinového cytostatika. Proto vlastnímu studiu kardioprotektivního účinku o-108 předcházela analýza eventuálního vlivu této látky na antiproliferativní účinek daunorubicinu. Vzhledem ke klinickému užití daunorubicinu byla pro tento účel vybrána buněčná line HL-60 ustavená v roce 1977 odvozením od buněk akutní myeloidní leukémie. Podle očekávání daunorubicin inhiboval proliferaci HL-60 buněk již ve velmi nízkých koncentracích (IC_{50} byla nižší než 2,5 nM). Také samotný chelátor o-108 do určité míry inhiboval proliferaci buněk této nádorové linie ($IC_{50} \approx 30 \mu\text{M}$). Ani toto zjištění není zcela překvapivé, neboť bylo opakovaně demonstrováno, že aroylhydrazonové chelátory železa mají různě vyjádřen i protinádorový účinek (Richardson 1995). Mechanismus tohoto účinku není zcela jasný, nicméně se předpokládá, že tyto látky jsou inhibují ribonukleotidreduktázu a indukovat programovaný zánik nádorových buněk (Kalinowski 2005). Tento enzym má zásadní význam pro biosyntézu deoxyribózy jako základního stavebního kamenu pro syntézu DNA. Některé chelátory železa s podobným mechanismem účinku jsou v současné době v pokročilé fázi preklinického hodnocení a první z nich (triapin) je v pokročilém stadiu II. fáze klinického hodnocení (Yu 2006).

Nejdůležitějším zjištěním ovšem bylo, že o-108 nijak neomezuje antiproliferativní účinek daunorubicinu, alespoň ve zvolené koncentraci cytostatika, která se blížila IC_{50} daunorubicinu ($\approx 2,66 \text{ nM}$). Záměrně byla pro tento pokus zvolena takto nízká koncentrace daunorubicinu tak, aby inhibice proliferace nádorových buněk byla pouze částečná a eventuální vliv chelatační látky (ať již negativní nebo pozitivní) byl jasně patrný. Z uvedeného pokusu je zřejmé, že o-108 v nízkých koncentracích (do 30 μM) nemá na proliferaci HL60 buněk žádný vliv. Naopak, ve vyšších koncentracích (30-300 μM) chelator vykazoval aditivní antiproliferativní účinek k působení daunorubicinu. Přestože u SIH nebyl vliv na antiproliferativní účinek daunorubicinu studován, lze očekávat, že výsledky by se neměly výrazně lišit od studie s o-108. Naopak, je spíše pravděpodobné, že aditivní antiproliferativní účinek SIH by mohl být ještě významnější a to již při nižších koncentracích chelátoru. Jak bylo již dříve demonstrováno na několika různých

nádorových liniích, aroylhydrazonové chelátory odvozené od salicyladehydu mají signifikantně vyšší protinádorový účinek, než analogy odvozené od pyridoxalu, mezi které patří výše diskutovaný chelátor o-108 (Richardson 1995, Yu 2006). Ačkoliv se z uvedených výsledků vyplývá, že tyto chelátory významně nepotlačují protinádorový účinek daunorubicinu, v případě pokročilejšího vývoje těchto látek by to bylo třeba potvrdit v širším rozpětí koncentrací CRC, nádorových buněčných linií a s užitím *in vivo* modelů.

Na podkladě příznivých výsledků testování vlivu chelátoru o-108 na antiproliferativní vlastnosti daunorubicinu bylo přistoupeno k hodnocení eventuálního kardioprotektivního účinku této látky vůči daunorubicinem navozené kardiotoxicitě u králíka. V předcházejících studiích (Gersl 1994, Simunek 2004) bylo prokázáno, že model daunorubicinem indukované kardiomyopatie sdílí klíčové morfologické, funkční a biochemické znaky s chronickou antracyklinovou kardiotoxicitou pozorovanou v klinické praxi. Daunorubicin je sice - vzhledem ke své indikační šíři - v protinádorové chemoterapii užíván výrazně méně často než doxorubicin, nicméně pro účely modelování antracyklinové kardiotoxicity u králíka se toto léčivo ukázalo být výrazně vhodnější (Klimtova 2003). Při podávání doxorubicinu ve stejné a nižší dávce než v případě daunorubicinu (3 a 2 mg/kg) se totiž u králíků projeví poměrně výrazné známky extrakardiální toxicity (zejména nefrotoxicita a hematotoxicita), což vedlo k vysokému předčasnému úhynu a horší reprodukovatelnosti kardiotoxického účinku. Volba daunorubicinu jako modelového antracyklinu by ovšem neměla mít vliv na aplikovatelnost výsledků studia kardioprotekce, neboť kardiotoxicita je skupinovým toxickým účinkem (tzv. „class effect“). Všechny dosud známé antracyklinové deriváty totiž v patřičné kumulativní dávce navodí výrazné poškození levé komory s identickými základními rysy. Shodný mechanismus kardiotoxického účinku u všech antracyklinových cytostatik plyne i z univerzálnosti kardioprotektivního účinku dexrazoxanu vůči všem antracyklinovým derivátům, což bylo prokázáno jak na experimentálních modelech, tak i v klinické praxi (Cvetkovic 2005). Vysoce signifikantní kardioprotektivní účinek dexrazoxanu na našem experimentálním modelu byl též dokumentován jak v této dizertační práci, tak i v dalších publikacích našeho kolektivu (Simunek 2004). Všechny tyto údaje svědčí o vhodnosti zvoleného experimentálního modelu pro účely studia kardioprotekce nových potenciálních léčiv (Perik 2004).

Dávky chelátoru o-108 (10 a 25 mg/kg) použité pro studium potenciálního kardioprotektivního působení této látky vůči daunorubicinem indukované kardiotoxicitě

byly odvozeny ze studia bezpečnosti a toxicity opakovaného podání o-108 (diskutováno výše) a z předpokusů, které byly provedeny s ohledem na potenciální rizika spojená s opakovaným společným podáním chelátoru a daunorubicinu. Časový odstup od podání daunorubicinu zvolený v tomto experimentu byl shodný s intervalem použitým ve výše diskutované studii s modelovým kardioprotektivem dexrazoxanem.

V nižší podávané dávce (10 mg/kg) studovaný chelátor kompletně zabránil daunorubicinem navozené mortalitě (33 % vs 0 %) a žádné ze zvířat v této skupině nejevilo vnější známky toxicity, které byly patrné v daunorubicinové skupině (snížená motorická aktivita, letargie, nápadné snížení příjmu vody a krmiva). Vzhledem ke kumulativní dávce daunorubicinu v období výskytu předčasného úhynu, pitevními nálezy (přítomnost pleurálních výpotků a ascitu) a histologickému vyšetření myokardu (vážné poškození levé komory), lze důvodně předpokládat, že předčasný úhyn pozorovaný v daunorubicinové skupině nastal v důsledku chronické antracyklinové kardiotoxicity navozené opakovaným podáváním daunorubicinu. Vedle významného pozitivního vlivu studovaného chelátoru na celkové přežití zvířat byl zaznamenán i signifikantní protektivní účinek této látky na systolickou srdeční funkci. Zatímco v daunorubicinové skupině došlo k výraznému poklesu ejekční frakce levé komory již od 9. týdne pokusu s následnou progresí poruchy systolické funkce až do konce experimentu, ve skupině, které byl také podáván chelátor železa o-108 (10 mg/kg), nedošlo v průběhu celého pokusu k žádné významné změně tohoto parametru. Navíc, v této skupině byla ejekční frakce levé komory signifikantně vyšší ve většině sledovaných intervalů než ve skupině se samotným daunorubicinem. Validitu těchto výsledků potvrdilo další nezávislé vyšetření srdeční kontraktility provedené na konci experimentu prostřednictvím katetrizace levé komory. I zde nebyl shledán statisticky signifikantní rozdíl v kontraktilitě levé komory mezi kombinační a kontrolní skupinou. A naopak podávání chelátoru spolu s daunorubicinem vedlo k signifikantně vyšším hodnotám indexu kontraktility levé komory, než při podávání samotného daunorubicinu. Zajímavým a důležitým nálezem byla i signifikantní korelace mezi oběma způsoby hodnocení systolické srdeční funkce a to i s ohledem na fakt, že echografické vyšetření srdeční funkce, přes svoje četné výhody, obsahuje určitý díl subjektivního posouzení a klade v tomto smyslu vysoké nároky na vyšetřujícího echografistu (Elbl 2002). Výsledky vyšetření funkce levé komory lze považovat za ještě zajímavější ve světle výše diskutovaného kompletního přežití v kombinační skupině. V této skupině byla všem pokusným zvířatům podána celá plánovaná kumulativní dávka a srdeční funkce byla hodnocena ve všech zamýšlených intervalech. Naproti tomu

v daunorubicinové skupině jedinci s nejvíce vyjádřenou kardiotoxicitou předčasně uhynuli, a proto nemohli být zahrnuti do hodnocení srdeční funkce v posledních intervalech. Nadějně závěry funkčního vyšetření levé komory byly dále podpořeny výsledkem histopatologického vyšetření myokardu. V kombinační skupině byl v porovnání s daunorubicinou skupinou shledán nižší rozsah a intenzita poškození myokardu levé komory. Těmto výsledkům napovídal i nižší výskyt výpotků v kombinační skupině a také méně vyjádřený vzestup troponinu T. Celkově lze tedy shrnout, že podání chelátoru železa o-108 v dávce 10 mg/kg přineslo významné a nadějně kardioprotektivní účinky.

Vzhledem k povzbudivým výsledkům dosažených s nižší dávkou chelátoru byly výsledky získané ve vyšší dávce (25 mg/kg) poměrně překvapivé, a to jak vzhledem k předčasnému úhynu poloviny pokusných zvířat, tak i s ohledem na kardiovaskulární parametry. Významný předčasný úhyn pozorovaný v této skupině s největší pravděpodobností nesouvisel s poškozením myokardu. Tato hypotéza se opírá o negativní výsledky morfologického vyšetření myokardu uhynulých jedinců a také nízké hladiny troponinu v plazmě odebrané v období před výskytem úhynu, což koresponduje s nízkou kumulativní dávkou antracyklinu. Konkrétní příčinu předčasného úhynu se nepodařilo identifikovat. U přežívajících zvířat totiž nebyly shledány žádné zásadní změny ve studovaných parametrech a objektivní histologické vyšetření většiny vnitřních orgánů uhynulých bylo znemožněno výraznými posmrtnými procesy (autolýza). Nicméně postupný signifikantní pokles tělesné hmotnosti, jenž předcházal jednotlivým úhynům naznačuje, že příčinou smrti nebyla náhlá příhoda, ale spíše progresivní toxický účinek. Podávání samotného chelátoru i jeho kombinace v nižší dávce s daunorubicinem byly ovšem pokusnými zvířaty dobře tolerovány. Z tohoto důvodu byl nápadný předčasný úhyn v kombinační skupině s pouze 2,5-krát vyšší dávkou chelátoru relativně nečekaný a pravděpodobně bude souviset s potenciací některého z extrakardiálních účinků antracyklinových cytostatik.

Absenci kardioprotektivního působení chelátoru o-108 ve vyšší studované dávce lze s ohledem na zřejmý kardioprotektivní účinek této látky v nižší studované dávce považovat za ještě překvapivější než výše diskutovaný předčasný úhyn. Zatímco dávkově závislý výskyt toxicity je za určitých okolností dobře odůvodnitelný, vymizení kardioprotektivního účinku s vyšší dávkou chelátoru je do značné míry neobvyklým pozorováním. Uvedený závěr ovšem podporují výsledky téměř všech provedených vyšetření a dokládá jej také statistická analýza. V kombinační skupině s 25 mg/kg o-108 byly identifikovány změny, které se statisticky nelišily od skupiny, které byl podáván

samotný daunorubicin a v obou případech byly statisticky odlišné od hodnot v skupině kontrolní či vehikulové skupině. Nelze předpokládat, že by se na výsledku mohly podílit nestandardní podmínky pokusu, protože užitý model je osvědčený, dobře reprodukovatelný a dexrazoxanem validovaný (Gersl 1994, Simunek 2004). Zásadní rozdíl v kardioprotektivní odpovědi na dávku studovaného chelátoru nemůže být ani jednoduše vysvětlen sezonními vlivy nebo nízkou kvalitou zvířat, neboť studium kardioprotekce v obou skupinách probíhalo paralelně a zvířata byla do těchto skupin náhodně rozdělena. Tato studie je vůbec první, která popsala uvedenou dávkovou závislost kardioprotektivního účinku. Z výsledků této práce ale nebylo možné uspokojivě vysvětlit podstatu tohoto jevu, ačkoliv se nabízelo několik možných hypotéz, které s tímto pozorováním mohly mít určitou souvislost. Například nebylo jisté, zda-li za těmito výsledky nemohla být kolísavá absorpce chelátoru z peritonea nebo jiné farmakokinetické vlastnosti studované látky. V době provedení tohoto experimentu nebylo ani zřejmé, jestli se jedná pouze o specifickou vlastnost tohoto konkrétního studovaného chelátoru, nebo má-li má tento jev širší platnost. V neposlední řadě zde byl i předcházející nález zvýšených plazmatických koncentrací troponinu T po opakovaném podání samotného o-108. Tento jev by za určitých okolností mohl souviset paradoxní dávkovou závislostí účinku pozorovanou v této části dizertační práce.

V další části tohoto projektu tudíž byla věnována pozornost studiu kardioprotektivního působení strukturně odlišného aroylhydrazonového chelátoru železa salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazonu (SIH, Příloha 7). V předchozích experimentech bylo demonstrováno, že tato látka je schopna navodit významnou a na koncentraci závislou ochranu srdečních buněk před účinky modelového oxidačního stresu vyvolaného peroxidem vodíku a to již ve velmi nízkých koncentracích (Horackova 2000, Simunek 2005a). Navíc, z dosud nepublikovaných pozorování na buněčné úrovni se zdá, že SIH je z hlediska ochrany srdečních buněk vůči volným kyslíkovým radikálům ještě účinnější než pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazon (o-108) nebo mateřská látka celé této skupiny chelátorů - pyridoxal isonikotinoyl hydrazon (PIH). SIH již ve velmi nízkých koncentracích (od 3 μM) zabránil mitochondriální dysfunkci a nejen nekrotické, ale i apoptotické smrti srdečních buněk v důsledku oxidačního poškození (Simunek 2005a). Protože uvedené patologické děje patrně sehrávají také velmi důležitou roli v patogenezi antracyklinové kardiotoxicity, jevil se SIH být ideálním kandidátem pro další studium kardioprotekce.

V první fázi studie byly sledovány časné děje následující po dvoudenní inkubaci srdečních buněk s nejvyššími klinicky relevantními koncentracemi daunorubicinu (10 μM ,

Minotti 2004). Po expozici kardiomyocytů daunorubicinem došlo (v souladu s pozorováním jiných autorů, Minotti 2004) k nápadným změnám v buněčné morfologii, ustala spontánní kontraktilita myocytů (nebo byla výrazně narušena) a v cytoplasmě se objevily znaky rozvíjející se vakuolizace. Při studiu toxicity daunorubicinu na buněčné úrovni též byla pozorována významná kumulace daunorubicinové autofluorescence uvnitř srdečních buněk. Toto originální pozorování odpovídá a dále podporuje zjištění plynoucí z farmakokinetických studií zaměřených na tkáňově specifickou farmakokinetiku tohoto cytostatika. Analyticky totiž bylo prokázáno, že koncentrace antracyklinu v myokardu po významnou dobu mnohonásobně převyšují koncentrace v plazmě (Minotti 2004). Tento děj byl v uvedeném pokusu demonstrován i na buněčné úrovni a experimentální model použitý v této práci by v budoucnu mohl pomoci definovat mechanismy zodpovědné za tento jev. Na buněčné úrovni bylo dále ukázáno, že preinkubace kardiomyocytů s chelátorem SIH má signifikantní protektivní účinek vůči daunorubicinové toxicitě. Nicméně v koncentračním rozmezí chelátoru, které lze očekávat v podmínkách *in vivo* (viz stanovené plazmatické koncentrace), nebylo pozorováno další zvýšení protektivního účinku v závislosti na koncentraci chelátoru. Uvedený částečný, avšak signifikantní protektivní účinek, ovšem nijak nesouvisel se změnami v kumulaci daunorubicinové fluorescence uvnitř srdečních buněk, takže se tento mechanismus pravděpodobně nepodílí na kardioprotektivním účinku studovaného chelátoru.

V *in vivo* části byl sledován vliv SIH na daunorubicinem navozenou chronickou kardiotoxicitu u králíka. S ohledem na to, že v případě dříve studovaného chelátoru o-108 nebylo možné vyloučit vliv zpožděné absorpce nebo proměnlivé biologické dostupnosti na kardioprotektivní účinek této látky, jakož i jeho dávkovou závislost, pro studium kardioprotektivních účinků SIH bylo zvoleno intravenózní podání této látky, aby byl vliv těchto faktorů eliminován. Pro demonstraci dávkové závislosti potenciálního kardioprotektivního účinku byly použity tři dávky SIH (0,5, 1 a 2,5 mg/kg), přičemž časový odstup od daunorubicinu byl zvolen s přihlédnutím k rychlé distribuci chelátoru do tkání plynoucí z prvních výsledků pilotního studia farmakokinetiky této látky.

Výsledky studia kardioprotektivních vlastností SIH byly do značné míry podobné těm, které byly zjištěny v předchozí studii s o-108. V případě SIH nebyl zaznamenán žádný předčasný úhyn, který by zjevně souvisel s extrakardiální toxicitou opakovaného podávání chelátoru spolu daunorubicinem (ke všem úhynům v tomto experimentu došlo ve stejném období jako v daunorubicinové skupině a v souvislosti s rozvojem dysfunkce levé komory). Naopak SIH měl pozitivní vliv na mortalitu spojenou s kardiotoxickým účinkem

daunorubicinu. Již ve skupině s nejnižší dávkou chelátoru v kombinaci s daunorubicinem byl celkový úhyn významně redukován (11 vs. 33 %). Podle očekávání pozorovanému úhynu přecházel nápadný pokles ejekční frakce levé komory a vzestup plazmatických koncentrací troponinu T. Dvojnásobná dávka chelátoru (1,0 mg/kg) již zajistila kompletní přežití všech pokusných zvířat a na rozdíl od daunorubicinové skupiny žádné z pozorovaných jedinců nejevilo před koncem pokusu zjevné známky pokročilé toxicity.

Pokles ejekční frakce pozorovaný ve skupině, které byl podáván SIH v nejnižší studované dávce byl poměrně nízký, a proto dosáhl statistické významnosti v porovnání s výchozími hodnotami až v úplném závěru experimentu. Výsledky neinvazivního i invazivního hodnocení pak ve vzájemné shodě indikovaly pouze nesignifikantní pokles kontraktility ve srovnání s kontrolní skupinou. Na druhou stranu je třeba zdůraznit, že SIH v této dávce nedovedl zabránit vážnému výraznému poškození srdeční funkce u všech zvířat (předčasnému úhynu předcházel nápadný pokles ejekční frakce). Naproti tomu vyšší dávka chelátoru (1,0 mg/kg) již byla schopna zcela zabránit nejen předčasnému úhynu, ale zároveň i systolické dysfunkci levé komory navozené daunorubicinem. Ejekční frakce levé komory se v této skupině v průběhu celého pokusu významně neměnila a byla ve většině intervalů významně vyšší než v daunorubicinové skupině. Tyto výsledky byly potvrzeny následným katetrizačním vyšetřením kontraktility levé komory na konci experimentu. V obou skupinách byly též méně časté a nápadné známky městnání (hydrothorax a ascites) a také histologické vyšetření u přežívajících zvířat odhalilo známky nižší progresse daunorubicinové kardiotoxicity. Histologické vyšetření v kombinačních skupinách shledalo především evidentní rozdíl v rozsahu intersticiální fibrózy, která byla markantní v daunorubicinové skupině, ale jen minimálně patrná v obou kombinačních skupinách s nižšími dávkami chelátoru (SIH 0,5 a 1,0 mg/kg). Na rozdíl od daunorubicinové skupiny zde tedy byla patrná změna v nástupu a celkové progresi myokardiálního poškození, což do značné míry koresponduje s výsledky vyšetření plazmatických hladin troponinu T.

I když výsledky obou nižších studovaných dávek SIH jeví známky určité dávkové závislosti kardioprotektivního účinku, při dalším zvýšení dávky chelátoru již nebylo možné rozpoznat žádné známky kardioprotekce. Celková mortalita se rozsahem ani dobou výskytu prakticky nelišila od daunorubicinové skupiny. Také výsledky funkčního vyšetření shodně poukazovaly na stejně významný pokles systolické funkce levé komory jako v případě daunorubicinové skupiny. S těmito nálezy korespondovaly závěry morfologického hodnocení myokardu levé komory a další provedená vyšetření.

V této části dizertační práce tedy bylo prokázáno, že aroylhydrazonové chelátory

železa mohou navodit, patrně díky svým železo chelatačním vlastnostem, významným způsobem ochránit srdce před toxickými účinky antracyklinu. Vedle dexrazoxanu se tak jedná o první studie jasně demonstrující signifikantní kardioprotektivní účinek látek chelatujících železo. Signifikantní kardioprotektivní účinek byl prokázán jak na buněčném modelu tak i na modelu chronické antracyklinové kardiotoxicity. Tyto výsledky tedy napovídají, že ionty železa hrají významnou roli v patogenezi antracyklinové kardiotoxicity, a proto si tento mechanismus jistě zaslouhuje další studium. Na druhou stranu, přinejmenším v případě aroylhydrazonových chelátorů železa studovaných této dizertační práci, uvedený kardioprotektivní účinek nevykazoval obvyklou dávkovou závislost. Zatímco na buněčné úrovni byla v rozmezí farmakologických koncentrací chelátoru pozorována pouze absence další progresse protektivního účinku v závislosti na koncentraci chelátoru, v *in vivo* studiích byl při vyšších dávkách chelátoru dokumentován výrazný zlom v kardioprotektivním účinku. Vzhledem k zjevné shodě v charakteru dávkové závislosti mezi na sobě nezávisle provedenými studiemi s chelátory o-108 a SIH, nelze tato pozorování považovat za náhodné. Shodné rysy dávkové závislosti kardioprotektivního účinku lze navíc rozpoznat při analýze dříve provedené studie s mateřskou látkou celé skupiny chelatačních látek – PIH (Simunek 2005b, Gersl 2004). Nižší dávky chelátoru (25 mg/kg, i.p.) měly pozitivní vliv na především na celkové přežití pokusných zvířat (Simunek 2005b), následné zvýšení dávky (50 mg/kg), ale namísto předpokládaného zvýšení účinku vedlo k vymizení jakýchkoliv známek kardioprotekce (Gersl 2004).

Všechny dosud studované aroylhydrazonové chelátory železa (o-108, SIH a PIH) tedy vykazují do značné míry paradoxní dávkovou závislost kardioprotektivního účinku a to bez ohledu na strukturu aroylhydrazonu, způsob podání a časový odstup od antracyklinu. Příčinu tohoto jevu nelze z provedených experimentů přímo určit, nicméně nabízí se několik možných hypotéz. V případě o-108 se jako podezřelé mohlo jevit zvýšení plazmatických hladin troponinu T po opakovaném podání samotného chelátoru. Avšak, nejenže tento jev nekorespondoval s dalšími kardiovaskulárními parametry, ale žádné známky podobného účinku nebyly pozorovány u dalších studovaných aroylhydrazonů (SIH a PIH) (Simunek 2001, Klíntova 2003), u kterých byla zjištěna obdobná dávková závislost kardioprotektivního účinku. Tento jev též nemůže souviset s proměnlivou absorpcí nebo biologickou dostupností chelátorů, protože SIH byl podáván intravenózně a odpověď na podávanou dávku byla obdobná jako u dalších aroylhydrazonů (o-108 a PIH). Ze studia farmakokinetiky aroylhydrazonových chelátorů železa též vyplynul poměrně

značný rozdíl v zdánlivém distribučním objemu mezi SIH a o-108, nicméně ani tento údaj evidentně neměl žádný vliv na kardioprotektivní účinek studovaných látek. Naproti tomu u obou studovaných chelátorů byl zjištěn mnohonásobně kratší biologický poločas než je udáváný pro antracykliny (Danesi 2002). Tento nepoměr by za určitých okolností mohl mít praktický dopad na kardioprotektivní účinek studovaných látek. Několikanásobně kratší biologický poločas je ovšem udáváný i u klinicky ověřeného kardioprotektiva dexrazoxanu (Hochster, 1998), takže tento fakt nemusí být hlavním problémem. Na druhou stranu dexrazoxan je uvnitř buněk bioaktivován na aktivní metabolit (látka ADR-925), který je (narozdíl od parentní látky) relativně značně hydrofilní a lze předpokládat, že by uvnitř srdečních buněk mohl setrvávat a účinkovat delší dobu. Tato vlastnost aroylhydrazonovým chelátorům chybí a není vyloučeno, že to může představovat i určitou limitaci z hlediska kardioprotektivního účinku těchto látek. Je tedy možné, že spíše než zvýšení dávky chelátoru by ke zlepšení kardioprotektivního přispělo prodloužení expozice myokardu nižším dávkám chelátoru. Toho by bylo možné dosáhnout podáváním chelátoru formou déle trvajících infúzí nebo optimalizací chemické struktury chelátoru vedoucí k delšímu biologickému poločasu.

Jak již bylo diskutováno výše, antracykliny významným a velmi komplexním způsobem zasahují do buněčné homeostázy železa (Xu 2005). V nižších dávkách námi studovaných chelátorů může docházet k žádoucímu vyvázání omezeného množství volného železa přítomného v cytoplazmě kardiomyocytů a tím je navozen kardioprotektivní účinek. Vyšší dávky chelátoru, ačkoliv jsou dobře tolerovány samotné, by ale v kombinaci s daunorubicinem mohly do určité míry přispět k poruše jemně regulované homeostázy iontů železa v srdečních buňkách. I mírné prohloubení dysbalance buněčné homeostázy železa primárně navozené antracykliny by pak, vzhledem k esenciálnímu významu tohoto prvku pro normální funkci kardiomyocytů, mohlo být zodpovědné za zvrát pozitivního kardioprotektivního účinku chelátoru. Jak bylo opakovaně prokázáno *in vitro* i *in vivo*, tyto chelátory rychle pronikají buněčnými membránami a vyvazují volné ionty železa a určitou měrou je i mobilizují z buněk ven. V tomto ohledu je třeba vzít v potaz, že se chelatační účinek aroylhydrazonů může lišit od dexrazoxanu. Nástup intracelulární chelatace volných iontů železa patrně bude v případě dexrazoxanu spíše pozvolnější, neboť je zprostředkovaný látkou až ADR-925, která z dexrazoxanu vzniká postupnou enzymatickou bioaktivací. Eventuální zásah dexrazoxanu do homeostázy železa by tedy mohl být méně výrazný. Aroylhydrazonové chelátory mohou navíc také mobilizovat ionty železa ven z kardiomyocytů, zatímco v případě hydrofilního ADR-925 je

spíše pravděpodobnější, že volné ionty železa uvnitř buněk jen dočasně vyváže, což nemusí nutně způsobit závažnější změny v celkové bilanci tohoto prvku. Dále bylo nepřímo prokázáno, že mobilizace iontů železa prostřednictvím aroylhydrazonových chelátorů je do určité míry aktivní a tedy na energii závislý proces (Buss 2002). S přihlédnutím k tomuto poznatku, nelze vyloučit, že tento jev nabývá na významu při vyšších dávkách (koncentracích) chelátoru a ve svém důsledku by to pro srdeční buňky mohlo být i určitou metabolickou zátěží. Samotné antracykliny totiž výrazným negativním způsobem zasahují do aerobního energetického metabolismu srdečních buněk a významně snižují buněčné koncentrace ATP (Minotti 2004). Konkrétní molekulární podstata interakce antracyklinů a chelatačních látek s ionty železa a vztah těchto dějů ke kardioprotektivnímu účinku je tedy stále poměrně nejasný a vyžaduje další studium.

Přestože studované aroylhydrazonové chelátory železa navodily signifikantní protekci vůči antracyklinové kardiotoxicitě, tento kardioprotektivní činek byl ve srovnání s modelovým léčivem (dexrazoxanem) méně vyjádřen. Zatímco dexrazoxan na našem modelu dovedl téměř kompletně ochránit myokard před vznikem chronické antracyklinové kardiotoxicity (Simunek 2004), v případě protektivních účinků aroylhydrazonových chelátorů se sice jedná o významné zlepšení, ale protekce byla ve všech studovaných případech pouze částečná (především s ohledem na nejcitlivější parametry jako je troponin T nebo histologické vyšetření). Na podkladě těchto zjištění se tedy nabízí otázka, zda-li je účinek dexrazoxanu dán pouze chelatací iontů železa (Hasinoff 1998, Minotti 2004) nebo se na kardioprotektivním účinku tohoto léčiva podílejí i další mechanismy. Je totiž možné, že účinek aktivního metabolitu dexrazoxanu (látka ADR-925), který se strukturně podobá EDTA, se neomezuje pouze na ionty železa, ale určitou měrou může tato látka uvnitř buněk ovlivňovat i další vícemocné biogenní prvky (jako například vápník). Porucha buněčné homeostázy vápníku byla opakovaně pozorována (Minotti 2004, Olson 2005, Kim 2006) v souvislosti s kardiotoxickým působením antracyklinu a byla také ukázána v této práci. Navíc kardioprotektivní účinek dexrazoxanu v našem pokusu evidentně souvisel s absencí zvýšených hodnot celkového vápníku v levé komoře. Námi zvažovaná hypotéza by tedy znamenala, že dexrazoxan prostřednictvím chelatace iontů železa zabraňuje rozvoji daunorubicinem navozeného oxidačního stresu a zároveň též určitou měrou vyvazuje vápenaté ionty (v cytoplasmě a eventuálně v mitochondriích) a tímto mechanismem zabraňuje i patologické buněčné signalizaci spojené se zvýšenými koncentracemi kalcia. Chelatace kalcia se v souvislosti s podáváním dexrazoxanu může zásadní měrou uplatnit právě v myokardu, neboť až tam je parentní léčivo bioaktivováno na aktivní metabolit,

chemickou strukturou příbuzný EDTA (Hasinoff 1998, Cvetkovic 2005). Oba předpokládané mechanismy kardioprotekce spolu mohou přímo souviset (volné radikály vniklé za katalytické účasti iontů železa mohou vést k poruše homeostázy kalcia a přetížení buňky těmito ionty), ale mohou probíhat i nezávisle na sobě, protože antracykliny jsou schopny přímo ovlivňovat funkci kalciových transportérů a iontových kanálů (Minotti 2004). V nedávné době též bylo prokázáno, že antracyklinová kardiotoxicita zatím neznámým mechanismem souvisí s aktivací významné kalcium-dependentní proteázy – kalpainu (Lim 2004), která štěpí důležitá sarkomerální myofilamenta (např. titin). Mezi další substráty této proteázy patří i regulační proteiny myokardu – troponiny (Barta 2003, Barta 2005), které jsme na našem modelu detekovali v plazmě. Dexrazoxanem navozená chelatace cytoplazmatického kalcia uvnitř kardiomyocytů by také za určitých okolností mohla vést k zabránění aktivace kalpainu a tím chránit myokard před závažným poškozením plynoucím z účinku této proteázy. Kalcium dále významně reguluje funkci mitochondrií a signalizaci vedoucí k zániku buňky jak apoptózou tak nekrotózou, přičemž všechny tyto uvedené děje jsou spojovány s rozvojem antracyklinové kardiotoxicity (Wallace 2003, Berthiaume 2005).

Námi studované aroylhydrazonové chelátory železa mají za fyziologických podmínek narozdíl od látky ADR-925 zanedbatelnou afinitu k iontům vápníku. Protože bylo ale prokázáno, že jsou schopny navodit signifikantní kardioprotektivní účinek, je vysoce pravděpodobné, že ionty železa sehrávají v patogenezi antracyklinové kardiotoxicity významnou úlohu. Na základě dostupných údajů ovšem nelze vyloučit, že pro maximální kardioprotektivní účinek může být také důležitá intracelulární chelatace vápenatých iontů. Pro vyvrácení nebo potvrzení těchto hypotéz, stejně jako pro hlubší pochopení patogeneze antracyklinové kardiotoxicity a pro úspěšný vývoj nových účinných kardioprotektiv je tudíž nutné další studium zaměřené na látky chelatuující ionty železa a popř. také vápníku. Nicméně lze doufat, že i námi získané výsledky mohou být určitým příspěvkem k dalšímu studiu jak mechanismů zodpovědných za rozvoj antracyklinové kardiotoxicity, tak i účinné kardioprotekce.

VI.
ZÁVĚR

- Echokardiografické hodnocení plnění levé komory se narodil od stanovení plazmatických koncentrací troponinu T neukázalo být přínosné z hlediska časné detekce chronické daunorubicinové kardiotoxicity na experimentálním modelu.
- Bylo potvrzeno, že troponin T je vysoce citlivým biomarkerem antracyklinové kardiotoxicity, který si zasluhuje další pozornost.
- Antracyklinová kardiotoxicita je spojena se změnami koncentrací některých kovových prvků v myokardu levé komory (Ca, Mg, K), přičemž jiné (např. Fe) zůstávají nezměněny.
- Signifikantně zvýšené koncentrace vápníku v myokardu pokusných zvířat významně korelovaly s mírou systolické dysfunkce levé komory.
- Dexrazoxan zabránil nejen předčasnému úhynu a srdeční dysfunkci navozené daunorubicinem, ale dovedl zamezit i výše uvedeným změnám v myokardiálním zastoupení kovových prvků.
- Opakované podávání nového aroylhydrazonového chelátoru železa o-108 se ukázalo být poměrně dobře snášeno a nebyla detekována žádná významná orgánová toxicita.
- Chelátory o-108 a SIH neměly negativní vliv ani na srdeční funkci ani morfologii, ačkoliv ve vyšších dávkách o-108 byl stanoven signifikantní nárůst troponinu T.
- Pilotní studium farmakokinetiky aroylhydrazonových chelátorů železa u králíka poukázalo mj. na rychlou distribuci, ale i eliminaci studovaných látek. Detailnější studium osudu těchto chelátorů v organismu vyžaduje citlivější analytickou metodu.
- Rychlá eliminace se zdá být společnou vlastností aroylhydrazonových chelátorů železa a její příčiny a možnost optimalizace farmakokinetických vlastností těchto látek si vyžaduje další studium.
- Aroylhydrazonové chelátory železa (o-108 a SIH) jsou na experimentálním modelu schopny kompletně zabránit předčasnému úhynu a navodit signifikantní stupeň kardioprotekce vůči chronické antracyklinové kardiotoxicitě .
- Uvedený kardioprotektivní účinek ovšem vykazuje neobvyklou dávkovou závislost a to bez ohledu na chemickou strukturu aroylhydrazonových chelátorů a způsob jejich podání.
- Ačkoliv je kardioprotektivní potenciál aroylhydrazonových chelátorů zřejmý a signifikantní, v porovnání s dexrazoxanem se jednalo pouze o částečnou ochranu

myokardu před kardiotoxicitou daunorubicinu.

- Vzhledem k dosaženým výsledkům není vyloučeno, že pro plný kardioprotektivní účinek je významná nejen intracelulární chelatace iontů železa, ale potenciálně i dalších vícemocných biogenních prvků (např. kalcia).
- Hlubší poznání antracyklinové kardiotoxicity, vysvětlení dávkové závislosti kardioprotektivního účinku aroylhydrazonových chelátorů, jakož i eventuální úloha dalších kovů v patogeneze antracyklinové kardiotoxicity vyžaduje další studium.

VII.
SOUHRN

V této dizertační práci byly studovány: 1/ možnosti časné detekce antracyklinové kardiotoxicity pomocí echokardiograficky hodnocené diastolické funkce a biochemického markeru troponinu T na experimentálním modelu u králíka, 2/ změny v zastoupení vybraných kovových prvků v myokardu levé komory zvířat s navozenou antracyklinovou kardiotoxicitou a kardioprotekcí pomocí dexrazoxanu, 3/ bezpečnost a eventuální toxicita opakovaného podání nových aroylhydrazonových chelátorů železa - pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazonu (o-108) a salicylaldehyd isonicotinoyl hydrazonu (SIH), 4/ farmakokinetika obou chelátorů železa po jednorázovém intravenózním podání králíkům v pilotním experimentu, 5/ potenciálně kardioprotektivní účinky o-108 a SIH na modelu daunorubicinem indukované chronické kardiotoxicity u králíka, včetně dávkové závislosti.

Bylo zjištěno, že Dopplerovské hodnocení levé komory u králíka je poměrně technicky náročné vzhledem k relativně vysoké fyziologické srdeční frekvenci u králíka. Kvalitní hodnocení všech standardních parametrů bylo možné pouze v kombinované anestézii obsahující xylazin. Tento echografický přístup narozdíl od citlivějšího katetrizačního vyšetření nebyl schopen odhalit diastolickou dysfunkci navozenou daunorubicinem, přičemž tento fakt může souviset s hemodynamickými účinky xylazinu. Srdeční troponin T se narozdíl od náročného echografického vyšetření ukázal být vhodným a citlivým biomarkerem chronické antracyklinové kardiotoxicity. Signifikantní elevace troponinu T byly naměřeny již před polovinou experimentu v nízké kumulativní dávce daunorubicinu (200 mg/m^2) a koncentrace progresivně stoupaly až do konce experimentu.

V další části práce bylo zjištěno, že antracyklinová kardiotoxicita je spojena se signifikantními změnami v koncentracích vybraných kovových prvků v myokardu levé komory. Jedním z nejvýznamnějších nálezů se ukázalo být signifikantní zvýšení myokardiálních koncentrací vápníku, přičemž tento nález jako jediný významně koreloval s katetrizačně hodnocenou systolickou dysfunkcí levé komory. Modelové kardioprotektivum dexrazoxan dovedlo zamezit nejen předčasnému úhynu a systolické srdeční dysfunkci, ale i změnám v zastoupení kovových prvků v levé komoře. Opakované podání daunorubicinu ani jeho kombinace s dexrazoxanem neměla vliv na myokardiální koncentrace iontů železa.

Opakované podávání nových chelátorů železa o-108 a SIH nebylo spojeno s výraznou orgánovou toxicitou ani změnami funkčních kardiovaskulárních parametrů. Nebyly pozorovány známky sideropenie, anémie nebo jiných změn v krevním obraze. Pozorované změny biochemických parametrů byly převážně mírné, nevykazovaly dávkovou závislost, což odpovídá absenci významných změn v morfologii studovaných

orgánů (např. játra, ledviny). Ve skupině s vyšší dávkou o-108 byly stanoveny zvýšené koncentrace troponinu T, nicméně k tomu nebyl nalezen žádný morfologický nebo funkční korelát.

Pilotní studium farmakokinetiky aroylhydrazonových chelátorů železa po intravenózním podání u králíka odhalilo poměrně rychlou distribuci, ale i eliminaci obou chelátorů. Maximální koncentrace chelátoru přepočtené na ekvimolární dávku byly u o-108 oproti SIH více jak čtyřnásobně vyšší, zatímco distribuční objem o-108 byl stejným poměrem nižší. U obou chelátorů byl zjištěn relativně krátký biologický poločas eliminace. Detailnější studium farmakokinetiky stejně tak jako příčiny krátkého biologického poločasu, jakož i možnost jejich cíleného ovlivnění vyžadují ještě citlivější analytickou metodu a další podrobné studium.

V poslední části této práce bylo zjištěno, že jak o-108 tak SIH kompletně zabraňují daunorubicinem navozenému předčasnému úhynu pokusných zvířat a zabránit rozvoji systolické srdeční dysfunkce. Tyto látky též významně snížily intenzitu a progresi morfologických změn navozených daunorubicinem, jakož i vzestup koncentrací troponinu T. Při 2,5-násobném zvýšení dávky o-108 se vyskytla zatím blíže neurčená toxicita nesouvisející s poškozením myokardu. Překvapivě ale v této skupině u přežívajících zvířat nebyly zaznamenány žádné známky kardioprotekce. Obdobně také v nejvyšší dávce chelátoru SIH, který byl narozdíl od o-108 podáván i.v., nebyly zjištěny žádné kardioprotektivní účinky. Oba chelátory tedy bez evidentního vztahu k chemické struktuře a způsobu podání byly schopny navodit signifikantní kardioprotekci proti antracyklinové kardiotoxicitě, nicméně jejich neobvyklá dávková závislost, stejně jako mechanismy za ni zodpovědné, vyžadují další studium.

VIII.
SUMMARY

In this Ph.D. thesis, following aims were addressed: 1/ early detection of anthracycline cardiotoxicity on the experimental rabbit model using echocardiographically examined diastolic function and biomarker troponin T, 2/ changes in concentrations of selected metals in the left ventricular myocardium of animals with experimentally induced anthracycline cardiotoxicity and dexrazoxan afforded cardioprotection, 3/ safety and possible toxicity of repeated administration of novel aroylhydrazone chelators – pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone (o-108) and salicylaldehyde isonicotinoyl (SIH), 4/ pharmacokinetics of both iron chelators after single dose i.v. administration to rabbits 5/ potentially cardioprotective effects of o-108 and SIH on the model of daunorubicin-induced chronic cardiotoxicity in rabbits including the dose response relationships.

It was revealed that Doppler evaluation of the left ventricular filling is technically demanding with respect to the relatively high heart rate which is physiological in rabbits. High quality evaluation of all standard parameters was feasible only in the combined anaesthesia containing xylazin. In contrast to more sensitive examination of the left ventricular diastolic function performed via catheterisation measurement this echocardiographic approach was unable to identify diastolic dysfunction induced by daunorubicin. This fact might be related to the haemodynamic effects of xylazin. Unlike complicated echographic examination, cardiac troponin T was shown as useful and sensitive biomarker of chronic anthracycline cardiotoxicity. Significant elevation of troponin T was determined even before the middle of the study, i.e., at the low cumulative dose of daunorubicin (200 mg/m²) and concentrations were progressively increasing until the end of the experiment.

Furthermore, it was revealed that anthracycline cardiotoxicity is associated with significant changes in concentration of selected metals in the left ventricular myocardium. One of the most significant findings was the increase in myocardial calcium concentrations. This was the only finding which significantly correlated with the left ventricular dysfunction. Model cardioprotectant dexrazoxane was able not only to prevent the premature mortality and systolic dysfunction but also changes in metal concentrations in the left ventricle. Repeated administration of neither daunorubicin nor its combination with dexrazoxane had no impact on myocardial total iron levels.

Repeated administration of novel iron chelators (o-108 and SIH) was not associated with the significant organ toxicity or changes in functional cardiovascular parameters. No signs of sideropenia, anaemia or blood count changes were observed. The changes in biochemical parameters were mostly mild, without dose-response relationship which corresponded with the absence of distinct changes in morphology of studied organs (e.g., liver, kidney). In the group with the highest dose of o-108, the increased concentrations of troponin T were determined, however, no functional or morphological correlate was found.

Pilot study of pharmacokinetics of aroylhydrazone iron chelators after i.v. single

dose administration in rabbits revealed quite rapid distribution as well as elimination of both chelators under study. In the equimolar dose, maximum concentrations of the chelator were more than four times higher in the o-108, whereas volume of distribution of this chelator was in the same ratio lower than in SIH. In both chelators, relatively short biological half-life of elimination was observed. More detailed study of pharmacokinetics and reason of their short biological half-lives as well as the possibility to optimize them through targeted modification of the chemical structure deserve more sensitive analytical methods and further study.

In the final part of this thesis it was revealed that both chelators o-108 and SIH are able to completely prevent the premature mortality and significantly mitigated left ventricular dysfunction induced by daunorubicin. Both chelators also decreased the progression and intensity of morphological signs of daunorubicin cardiotoxicity as well as plasma troponin T raise. However, using 2,5-fold higher dose, an unknown toxicity (unrelated to the myocardial damage) appeared. Surprisingly, in the surviving animals no cardioprotection was observed. Analogically, in the case of SIH, which was administered i.v. (in contrast to o-108), no cardioprotective effects were detectable in the highest studied dose. Both chelators, irrespectively to their chemical structures or routes of administration, were able to afford significant cardioprotection against chronic anthracycline cardiotoxicity. Nevertheless, unusual dose-dependence and mechanism involved in this observation merit further study.

IX.
LITERATURA

- Achtari C, Hohlfeld P. Cardiotoxic transplacental effect of idarubicin administered during the second trimester of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2000 Aug;183(2):511-2.
- Adamcova M, Machackova J, Gersl V, Pelouch V, Simunek T, Klimtova I, Hrdina R, Ponka P. Cardiac troponin T following repeated administration of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone in rabbits. *Physiol Res.* 2002;51(5):443-8.
- Adamcova M, Sterba M, Simunek T, Potacova A, Popelova O, Mazurova Y, Gersl V. Troponin as a marker of myocardial damage in drug-induced cardiotoxicity. *Expert Opin Drug Saf.* 2005 May;4(3):457-72.
- Aisen P, Enns C, Wessling-Resnick M. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001 Oct;33(10):940-59.
- Aleman BM, van den Belt-Dusebout AW, De Bruin ML, van 't Veer MB, Baaijens MH, Boer JP, Hart AA, Klokman WJ, Kuenen MA, Ouwens GM, Bartelink H, van Leeuwen FE. Late cardiotoxicity after treatment for Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2007 Mar 1;109(5):1878-86.
- Alderton PM, Gross J, Green MD. Comparative study of doxorubicin, mitoxantrone, and epirubicin in combination with ICRF-187 (ADR-529) in a chronic cardiotoxicity animal model. *Cancer Res.* 1992 Jan 1;52(1):194-201.
- Al-Ismail S, Whittaker JA. Systolic time interval as index of schedule--dependent doxorubicin cardiotoxicity in patients with acute myelogenous leukaemia. *Br Med J.* 1979 May 26;1(6175):1392-5.
- Al-Ismail SA, Whittaker JA. Systolic time interval to predict doxorubicin cardiotoxicity. *Lancet.* 1978 Jun 17;1(8077):1315.
- Allen A. The cardiotoxicity of chemotherapeutic drugs. *Semin Oncol.* 1992 Oct;19(5):529-42.
- Arai M, Tomaru K, Takizawa T, Sekiguchi K, Yokoyama T, Suzuki T, Nagai R. Sarcoplasmic reticulum genes are selectively down-regulated in cardiomyopathy produced by doxorubicin in rabbits. *J Mol Cell Cardiol.* 1998 Feb;30(2):243-54.
- Arola OJ, Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM. Acute doxorubicin cardiotoxicity involves cardiomyocyte apoptosis. *Cancer Res.* 2000 Apr 1;60(7):1789-92.
- Arques S, Roux E, Ambrosi P, Sbragia P, Gelisse R, Pieri B, Luccioni R. Accuracy of bedside tissue Doppler echocardiography for the prediction of in-hospital mortality in elderly patients with acute heart failure with preserved left ventricular systolic function. Comparison with B-type natriuretic peptide measurement. *Int J Cardiol.* 2007 Feb 5; [Epub ahead of print]
- Auner HW, Tinchon C, Linkesch W, Tiran A, Quehenberger F, Link H, Sill H. Prolonged

monitoring of troponin T for the detection of anthracycline cardiotoxicity in adults with hematological malignancies. *Ann Hematol.* 2003 Apr;82(4):218-22. Epub 2003 Mar 25.

Bagchi D, Sen CK, Ray SD, Das DK, Bagchi M, Preuss HG, Vinson JA. Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Mutat Res.* 2003 Feb-Mar;523-524:87-97.

Bakker M, Droz JP, Hanauske AR, Verweij J, van Oosterom AT, Groen HJ, Pacciarini MA, Domenigoni L, van Weissenbruch F, Pianezzola E, de Vries EG. Broad phase II and pharmacokinetic study of methoxy-morpholino doxorubicin (FCE 23762-MMRDX) in non-small-cell lung cancer, renal cancer and other solid tumour patients. *Br J Cancer.* 1998;77(1):139-46.

Baldwin JR, Phillips BA, Overmyer SK, Hatfield NZ, Narang PK. Influence of the cardioprotective agent dexrazoxane on doxorubicin pharmacokinetics in the dog. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1992;30(6):433-8.

Barrett CM, Lewis FL, Roaten JB, Sweatman TW, Israel M, Cleveland JL, Lothstein L. Novel extranuclear-targeted anthracyclines override the antiapoptotic functions of Bcl-2 and target protein kinase C pathways to induce apoptosis. *Mol Cancer Ther.* 2002 May;1(7):469-81.

Barnabe N, Zastre JA, Venkataram S, Hasinoff BB. Deferiprone protects against doxorubicin-induced myocyte cytotoxicity. *Free Radic Biol Med.* 2002 Jul 15;33(2):266-75.

Barta J, Toth A, Edes I, Vaszily M, Papp JG, Varro A, Papp Z. Calpain-1-sensitive myofibrillar proteins of the human myocardium. *Mol Cell Biochem.* 2005 Oct;278(1-2):1-8.

Barta J, Toth A, Jaquet K, Redlich A, Edes I, Papp Z. Calpain-1-dependent degradation of troponin I mutants found in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem.* 2003 Sep;251(1-2):83-8.

Basser RL, Sobol MM, Duggan G, Cebon J, Rosenthal MA, Mihaly G, Green MD. Comparative study of the pharmacokinetics and toxicity of high-dose epirubicin with or without dexrazoxane in patients with advanced malignancy. *J Clin Oncol.* 1994 Aug;12(8):1659-66.

Bates M, Lieu D, Zagari M, Spiers A, Williamson T. A pharmacoeconomic evaluation of the use of dexrazoxane in preventing anthracycline-induced cardiotoxicity in patients with stage IIIB or IV metastatic breast cancer. *Clin Ther.* 1997 Jan-Feb;19(1):167-84.

Berthiaume JM, Oliveira PJ, Fariss MW, Wallace KB. Dietary vitamin E decreases doxorubicin-induced oxidative stress without preventing mitochondrial dysfunction. *Cardiovasc Toxicol.* 2005;5(3):257-67.

Berthiaume JM, Oliveira PJ, Fariss MW, Wallace KB. Dietary vitamin E decreases doxorubicin-induced oxidative stress without preventing mitochondrial dysfunction. *Cardiovasc Toxicol.*

2005;5(3):257-67.

Benvenuto GM, Ometto R, Fontanelli A, Fortunato A, Ruffini PA, Fosser V, Morandi P. Chemotherapy-related cardiotoxicity: new diagnostic and preventive strategies. *Ital Heart J.* 2003 Oct;4(10):655-67.

Berthiaume JM, Wallace KB. Adriamycin-induced oxidative mitochondrial cardiotoxicity. *Cell Biol Toxicol.* 2007 Jan;23(1):15-25.

Binaschi M, Bigioni M, Cipollone A, Rossi C, Goso C, Maggi CA, Capranico G, Animati F. Anthracyclines: selected new developments. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents.* 2001 Aug;1(2):113-30.

Berthiaume JM, Oliveira PJ, Fariss MW, Wallace KB. Dietary vitamin E decreases doxorubicin-induced oxidative stress without preventing mitochondrial dysfunction. *Cardiovasc Toxicol.* 2005;5(3):257-67.

Blaha K, Cikrt M, Nerudova J, Ponka HF. Biliary iron excretion in rats following treatment with analogs of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone. *Blood.* 1998 Jun 1;91(11):4368-72.

Boucek RJ Jr, Buck SH, Scott F, Oquist NL, Fleischer S, Olson RD. Anthracycline-induced tension in permeabilized cardiac fibers: evidence for the activation of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum. *J Mol Cell Cardiol.* 1993 Mar;25(3):249-59.

Bountiukos M, Doorduijn JK, Roelandt JR, Vourvouri EC, Bax JJ, Schinkel AF, Kertai MD, Sonneveld P, Poldermans D. Repetitive dobutamine stress echocardiography for the prediction of anthracycline cardiotoxicity. *Eur J Echocardiogr.* 2003 Dec;4(4):300-5.

Breed JG, Zimmerman AN, Dormans JA, Pinedo HM. Failure of the antioxidant vitamin E to protect against adriamycin-induced cardiotoxicity in the rabbit. *Cancer Res.* 1980 Jun;40(6):2033-8

Brockmeier FK, Rosland GA, Finne PH. Cardiomyopathy induced by anthracycline-derivates. *Acta Paediatr Scand.* 1984 May;73(3):387-91.

Brittenham GM. Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone. Effective iron chelation after oral administration. *Ann N Y Acad Sci.* 1990;612:315-26.

Brittenham GM, Nathan DG, Olivieri NF, Porter JB, Pippard M, Vichinsky EP, Weatherall DJ. Deferiprone and hepatic fibrosis. *Blood.* 2003 Jun 15;101(12): 5090-1.

Bruynzeel AM, Vormer-Bonne S, Bast A, Niessen HW, van der Vijgh WJ. Long-term effects of 7-mono-hydroxyethylrutoside (monoHER) on DOX-induced cardiotoxicity in mice. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2006 Dec 20; [Epub ahead of print]

Bull DA, Bailey SH, Rentz JJ, Zebrack JS, Lee M, Litwin SE, Kim SW. Effect of Terplex/VEGF-

165 gene therapy on left ventricular function and structure following myocardial infarction. VEGF gene therapy for myocardial infarction. *J Control Release*. 2003 Dec 5;93(2):175-81.

Bu'Lock FA, Gabriel HM, Oakhill A, Mott MG, Martin RP. Cardioprotection by ICRF187 against high dose anthracycline toxicity in children with malignant disease. *Br Heart J*. 1993 Aug;70(2):185-8.

Bu'Lock FA, Mott MG, Oakhill A, Martin RP. Left ventricular diastolic filling patterns associated with progressive anthracycline-induced myocardial damage: A prospective study. *Pediatr Cardiol*. 1999 Jul-Aug;20(4):252-63.

Burke BE, Olson RD, Cusack BJ, Gambliel HA, Dillmann WH. Anthracycline cardiotoxicity in transgenic mice overexpressing SR Ca²⁺-ATPase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Apr 4;303(2):504-7.

Buss JL, Arduini E, Ponka P. Mobilization of intracellular iron by analogs of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) is determined by the membrane permeability of the iron-chelator complexes. *Biochem Pharmacol*. 2002 Dec 15;64(12):1689-701.

Buss JL, Hermes-Lima M, Ponka P. Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and its analogues. *Adv Exp Med Biol*. 2002;509:205-29.

Buss JL, Neuzil J, Gellert N, Weber C, Ponka P. Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone analogs induce apoptosis in hematopoietic cells due to their iron-chelating properties. *Biochem Pharmacol*. 2003 Jan 15;65(2):161-72.

Buss JL, Neuzil J, Ponka P. Oxidative stress mediates toxicity of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone analogs. *Arch Biochem Biophys*. 2004 Jan 1;421(1):1-9.

Cardinale D, Colombo A, Sandri MT, Lamantia G, Colombo N, Civelli M, Martinelli G, Veglia F, Fiorentini C, Cipolla CM. Prevention of high-dose chemotherapy-induced cardiotoxicity in high-risk patients by angiotensin-converting enzyme inhibition. *Circulation*. 2006 Dec 5;114(23):2474-81.

Conklin KA. Dietary antioxidants during cancer chemotherapy: impact on chemotherapeutic effectiveness and development of side effects. *Nutr Cancer*. 2000;37(1):1-18.

Corna G, Santambrogio P, Minotti G, Cairo G. Doxorubicin paradoxically protects cardiomyocytes against iron-mediated toxicity: Role of reactive oxygen species and ferritin. *J Biol Chem*. 2004. Creaven PJ, Allen LM, Alford DA. The bioavailability in man of ICRF-159 a new oral antineoplastic agent. *J Pharm Pharmacol*. 1975 Dec;27(12):914-8.

Creighton AM, Hellmann K and Whitecross S (1969) Antitumour activity in a series of bisdiketopiperazines. *Nature (Lond)* 22: 384-385.

- Cusack BJ, Mushlin PS, Voulelis LD, Li X, Boucek RJ Jr, Olson RD. Daunorubicin-induced cardiac injury in the rabbit: a role for daunorubicinol? *Toxicol Appl Pharmacol.* 1993 Feb;118(2):177-85.
- Cusack BJ, Musser B, Gambliel H, Hadjokas NE, Olson RD. Effect of dexrazoxane on doxorubicin pharmacokinetics in young and old rats. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2003 Feb;51(2):139-46.
- Cusack BJ, Young SP, Vestal RE, Olson RD. Age-related pharmacokinetics of daunorubicin and daunorubicinol following intravenous bolus daunorubicin administration in the rat. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1997;39(6):505-12.
- Cvetkovic RS, Scott LJ. Dexrazoxane: a review of its use for cardioprotection during anthracycline chemotherapy. *Drugs.* 2005;65(7):1005-24.
- Danesi R, Fogli S, Gennari A, Conte P, Del Tacca M. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of the anthracycline anticancer drugs. *Clin Pharmacokinet.* 2002; 41(6): 431-44.
- Dardir M, Herman EH, Ferrans VJ. Effects of ICRF-187 on the cardiac and renal toxicity of epirubicin in spontaneously hypertensive rats. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1989;23(5):269-75.
- Decorti G, Candussio L, Klugmann FB, Strohmayer A, Mucci MP, Mosco A, Baldini L. Adriamycin-induced histamine release from heart tissue in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1997;40(4):363-6.
- Derumeaux G, Mulder P, Richard V, Chagraoui A, Nafeh C, Bauer F, Henry JP, Thuillez C. Tissue Doppler imaging differentiates physiological from pathological pressure-overload left ventricular hypertrophy in rats. *Circulation.* 2002 Apr 2;105(13):1602-8.
- Dickgreber NJ, Welte T, Gillissen A, Dunlop D, Eberhardt W, Wagner T, Swinson D, Capriati A, O'Byrne K; Phase II open-label study of MEN 10755 in patients with small cell lung cancer extensive disease (SCLC-ED). *Proc Am Soc Clin Oncol* 22: page 703, 2003 (abstr 2829).
- Dobric S, Dragojevic-Simic V, Bokonjic D, Milovanovic S, Marincic D, Jovic P. The efficacy of selenium, WR-2721, and their combination in the prevention of adriamycin-induced cardiotoxicity in rats. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 1998;17(3-4):291-9.
- Dobsak P, Siegelova J, Wolf JE, Rochette L, Eicher JC, Vasku J, Kuchtickova S, Horiky M. Prevention of apoptosis by deferoxamine during 4 hours of cold cardioplegia and reperfusion: in vitro study of isolated working rat heart model. *Pathophysiology.* 2002 Oct;9(1):27.
- Donfrancesco A, Deb G, De Sio L, Cozza R, Castellano A. Role of deferoxamine in tumor therapy. *Acta Haematol.* 1996;95(1):66-9.
- Dorr RT. Cytoprotective agents for anthracyclines. *Semin Oncol.* 1996 Aug;23(4 Suppl 8):23-34.

Dresdale AR, Barr LH, Bonow RO, Mathisen DJ, Myers CE, Schwartz DE, d'Angelo T. Prospective randomized study of the role of N-acetyl cysteine in reversing doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Am J Clin Oncol*. 1982 Dec;5(6):657-63.

Dunkern TR, Wedemeyer I, Baumgartner M, Fritz G, Kaina B. Resistance of p53 knockout cells to doxorubicin is related to reduced formation of DNA strand breaks rather than impaired apoptotic signaling. *DNA Repair (Amst)*. 2003 Jan 2; 2(1): 49-60.

Dziegiel P, Jethon Z, Suder E, Sopol M, Rabczynski J, Surowiak P, Zabel M. Role of exogenous melatonin in reducing the cardiotoxic effect of daunorubicin and doxorubicin in the rat. *Exp Toxicol Pathol*. 2002 Feb;53(6):433-9.

Dziegiel P, Podhorska-Okolow M, Surowiak P, Ciesielska U, Rabczynski J, Zabel M. Influence of exogenous melatonin on doxorubicin-evoked effects in myocardium and in transplantable Morris hepatoma in rats. *In Vivo*. 2003 Jul-Aug;17(4):325-8.

Dziegiel P, Surowiak P, Rabczynski J, Zabel M. Effect of melatonin on cytotoxic effects of daunorubicin on myocardium and on transplantable Morris hepatoma in rats. *Pol J Pathol*. 2002;53(4):201-4.

Elbl L et al., Poškození srdce protinádorovou léčbou, Grada, Praha, 2002.

Elbl L, Hrstkova H, Tomaskova I, Blazek B, Michalek J. Long-term serial echocardiographic examination of late anthracycline cardiotoxicity and its prevention by dexrazoxane in paediatric patients. *Eur J Pediatr*. 2005 Nov;164(11):678-84.

Elbl L, Hrstkova H, Tomaskova I, Michalek J. Late anthracycline cardiotoxicity protection by dexrazoxane (ICRF-187) in pediatric patients: echocardiographic follow-up. *Support Care Cancer*. 2006 Feb;14(2):128-36.

Ewer and Benjamin. Doxorubicin cardiotoxicity: Clinical Aspects, Recognition, Monitoring, Treatment and prevention in: *Cancer and the Heart*, Eds. Ewer MS and Yeh E. BC Decker Inc, Hamilton 2006, pp. 9-33.

Fadillioglu E, Yilmaz HR, Erdogan H, Sogut S. 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*. 2003 Sep 30;191(2-3):153-8.

Fiallo LMM, Garnier-Suillerot A, Matzanke B, Kozłowski H. How Fe³⁺ binds anthracycline antitumour compounds: The myth and the reality of a chemical sphinx. *Journal of Inorganic Biochemistry*, Volume 75, Issue 2, 15 June 1999, Pages 105-115.

Findlay BP, Walker-Dilks C. Epirubicin, alone or in combination chemotherapy, for metastatic breast cancer. Provincial Breast Cancer Disease Site Group and the Provincial Systemic Treatment

- Disease Site Group. *Cancer Prev Control*. 1998 Jun;2(3):140-6.
- Fisher PW, Salloum F, Das A, Hyder H, Kukreja RC. Phosphodiesterase-5 inhibition with sildenafil attenuates cardiomyocyte apoptosis and left ventricular dysfunction in a chronic model of doxorubicin cardiotoxicity. *Circulation*. 2005 Apr 5;111(13):1601-10.
- Fogli S, Nieri P, Breschi MC. The role of nitric oxide in anthracycline toxicity and prospects for pharmacologic prevention of cardiac damage. *FASEB J*. 2004 Apr;18(6):664-75.
- Forrest GL, Gonzalez B, Tseng W, Li X, Mann J. Human carbonyl reductase overexpression in the heart advances the development of doxorubicin-induced cardiotoxicity in transgenic mice. *Cancer Res*. 2000 Sep 15;60(18):5158-64.
- French JP, Quindry JC, Falk DJ, Staib JL, Lee Y, Wang KK, Powers SK. Ischemia-reperfusion-induced calpain activation and SERCA2a degradation are attenuated by exercise training and calpain inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006 Jan;290(1):H128-36.
- Fujita K, Shinpo K, Yamada K, et al. Reduction of Adriamycin® toxicity by ascorbate in mice and guinea pigs. *Cancer Res* 1982;42:309–16.
- Galanello R, Piga A, Alberti D, Rouan MC, Bigler H, Sechaud R. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of ICL670, a new orally active iron-chelating agent in patients with transfusion-dependent iron overload due to beta-thalassemia. *J Clin Pharmacol*. 2003 Jun;43(6):565-72.
- Gambliel HA, Burke BE, Cusack BJ, Walsh GM, Zhang YL, Mushlin PS, Olson RD. Doxorubicin and C-13 deoxydoxorubicin effects on ryanodine receptor gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Mar 1;291(3):433-8.
- Geetha A, Sankar R, Marar T, Devi CS. Alpha-tocopherol reduces doxorubicin-induced toxicity in rats--histological and biochemical evidences. *Indian J Physiol Pharmacol*. 1990 Apr;34(2):94-100.
- Gelderblom H, Verweij J, Nooter K, Sparreboom A. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *Eur J Cancer*. 2001 Sep;37(13):1590-8.
- Gersl V, Hrdina R. Noninvasive polygraphic cardiac changes in daunorubicin-induced cardiomyopathy in rabbits. *Sb Ved Pr Lek Fak Karlovy Univerzity Hradci Kralove*. 1994;37(2):49-55.
- Gersl V, Sterba M, Simunek T, Kaplanova J, Adamcova M, Klimtova I, Cermakova E, and Mazurova Y Study of the effects of PIH in daunorubicin-induced cardiomyopathy in rabbits. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004 31:A197.
- Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol*. 1999 Apr

1;57(7):727-41.

Gharib MI, Burnett AK. Chemotherapy-induced cardiotoxicity: current practice and prospects of prophylaxis. *Eur J Heart Fail.* 2002 Jun; 4(3): 235-42.

Goodman Gilman A, Hardman JG, Limbard LE and et al. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th edition, McGraw- Hill publishing, 2001, 1427-1428.

Haigney MC, Wei S, Kaab S, Griffiths E, Berger R, Tunin R, Kass D, Fisher WG, Silver B, Silverman H. Loss of cardiac magnesium in experimental heart failure prolongs and destabilizes repolarization in dogs. *J Am Coll Cardiol.* 1998 Mar 1;31(3):701-6.

Hamed S, Barshack I, Luboshits G, Wexler D, Deutsch V, Keren G, George J. Erythropoietin improves myocardial performance in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Eur Heart J.* 2006 Aug;27(15):1876-83.

Hardenbergh PH, Recht A, Gollamudi S, Come SE, Hayes DF, Shulman LN, O'Neill A, Gelman RS, Silver B, Harris JR. Treatment-related toxicity from a randomized trial of the sequencing of doxorubicin and radiation therapy in patients treated for early stage breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1999 Aug 1;45(1):69-72.

Hasinoff BB. NADPH-cytochrome-P450 reductase promotes hydroxyl radical production by the iron complex of ADR-925, the hydrolysis product of ICRF-187 (dexrazoxane). *Free Radic Res.* 1995 Apr;22(4):319-25.

Hasinoff BB. The interaction of the cardioprotective agent ICRF-187 [(+)-1,2-bis(3,5-dioxopiperazinyl-1-yl)propane]; its hydrolysis product (ICRF-198); and other chelating agents with the Fe(III) and Cu(II) complexes of adriamycin. *Agents Actions.* 1989 Mar;26(3-4):378-85.

Hasinoff BB, Kala SV. The removal of metal ions from transferrin, ferritin and ceruloplasmin by the cardioprotective agent ICRF-187 [(+)-1,2-bis(3,5-dioxopiperazinyl-1-yl)propane] and its hydrolysis product ADR-925. *Agents Actions.* 1993 May;39(1-2):72-81.

Hasinoff BB, Schnabl KL, Marusak RA, Patel D, Huebner E. Dexrazoxane (ICRF-187) protects cardiac myocytes against doxorubicin by preventing damage to mitochondria. *Cardiovasc Toxicol.* 2003;3(2):89-99.

Hasinoff BB, Patel D, Wu X. *Free Radic Biol Med.* 2003 Dec 1;35(11):1469-79. The oral iron chelator ICL670A (deferasirox) does not protect myocytes against doxorubicin. *Free Radic Biol Med.* 2003 Dec 1;35(11):1469-79.

Hayakawa H, Komada Y, Hirayama M, Hori H, Ito M, Sakurai M. Plasma levels of natriuretic peptides in relation to doxorubicin-induced cardiotoxicity and cardiac function in children with cancer. *Med Pediatr Oncol.* 2001 Jul;37(1):4-9.

Herman EH, el-Hage A, Ferrans VJ. Protective effect of ICRF-187 on doxorubicin-induced cardiac and renal toxicity in spontaneously hypertensive (SHR) and normotensive (WKY) rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1988 Jan;92(1):42-53.

Herman EH, Ferrans VJ. Preclinical animal models of cardiac protection from anthracycline-induced cardiotoxicity. *Semin Oncol.* 1998a Aug;25(4 Suppl 10):15-21.

Herman EH, Ferrans VJ. Pretreatment with ICRF-187 provides long-lasting protection against chronic daunorubicin cardiotoxicity in rabbits. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1986;16(2):102-6.

Herman EH, Ferrans VJ. Timing of treatment with ICRF-187 and its effect on chronic doxorubicin cardiotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1993;32(6):445-9.

Herman EH, Ferrans VJ, Myers CE, Van Vleet JF. 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.* 1985 Jan;45(1):276-81.

Herman EH, Ferrans VJ, Young RS, Hamlin RL. Pretreatment with ICRF-187 allows a marked increase in the total cumulative dose of doxorubicin tolerated by beagle dogs. *Drugs Exp Clin Res.* 1988;14(9):563-70.

Herman EH, Lipshultz SE, Rifai N, Zhang J, Papoian T, Yu ZX, Takeda K, Ferrans VJ. Use of cardiac troponin T levels as an indicator of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Cancer Res.* 1998b Jan 15;58(2):195-7.

Herman EH, Zhang J, Ferrans VJ. Comparison of the protective effects of desferrioxamine and ICRF-187 against doxorubicin-induced toxicity in spontaneously hypertensive rats. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1994;35(2):93-100.

Herman EH, Zhang J, Chadwick DP, Ferrans VJ. Comparison of the protective effects of amifostine and dexrazoxane against the toxicity of doxorubicin in spontaneously hypertensive rats. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2000;45(4):329-34.

Herman EH, Zhang J, Rifai N, Lipshultz SE, Hasinoff BB, Chadwick DP, Knapton A, Chai J, Ferrans VJ. The use of serum levels of cardiac troponin T to compare the protective activity of dexrazoxane against doxorubicin- and mitoxantrone-induced cardiotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2001 Oct;48(4):297-304.

Hermes-Lima M, Nagy E, Ponka P, Schulman HM. The iron chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) protects plasmid pUC-18 DNA against *OH-mediated strand breaks. *Free Radic Biol Med.* 1998 Nov 15;25(8):875-80.

Hermes-Lima M, Ponka P, Schulman HM. The iron chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) and its analogues prevent damage to 2-deoxyribose mediated by ferric iron plus ascorbate.

- Biochim Biophys Acta. 2000 Oct 18;1523(2-3):154-60.
- Hermes-Lima M, Santos NC, Yan J, Andrews M, Schulman HM, Ponka P. EPR spin trapping and 2-deoxyribose degradation studies of the effect of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) on *OH formation by the Fenton reaction. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Feb 2;1426(3):475-82.
- Hochster H, Liebes L, Wadler S, Oratz R, Wernz JC, Meyers M, Green M, Blum RH, Speyer JL. Pharmacokinetics of the cardioprotector ADR-529 (ICRF-187) in escalating doses combined with fixed-dose doxorubicin. *J Natl Cancer Inst*. 1992 Nov 18;84(22):1725-30.
- Hoit BD, Khoury SF, Kranias EG, Ball N, Walsh RA. In vivo echocardiographic detection of enhanced left ventricular function in gene-targeted mice with phospholamban deficiency. *Circ Res*. 1995 Sep;77(3):632-7.
- Horackova M, Ponka P, Byczko Z. The antioxidant effects of a novel iron chelator salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone in the prevention of H₂O₂ injury in adult cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*. 2000 Aug 18;47(3):529-36.
- Horwitz LD, Sherman NA, Kong Y, Pike AW, Gobin J, Fennessey PV, Horwitz MA. Lipophilic siderophores of *Mycobacterium tuberculosis* prevent cardiac reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Apr 28;95(9):5263-8.
- Hovorka O, St'astny M, Etrych T, Subr V, Strohalm J, Ulbrich K, Rihova B. Differences in the intracellular fate of free and polymer-bound doxorubicin. *J Control Release*. 2002 Apr 23;80(1-3):101-17.
- Hoyano, Y. et al.: Acute presynaptic inhibition by doxorubicin of negative chrono- and inotropic responses to parasympathetic nerve stimulation in isolated, blood-perfused dog atrium. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 1996, 27, p. 37-41.
- Chaston TB, Lovejoy DB, Watts RN, Richardson DR. Examination of the antiproliferative activity of iron chelators: multiple cellular targets and the different mechanism of action of triapine compared with desferrioxamine and the potent pyridoxal isonicotinoyl hydrazone analogue 311. *Clin Cancer Res*. 2003 Jan;9(1):402-14.
- Chaves AA, Weinstein DM, Bauer JA. Non-invasive echocardiographic studies in mice: influence of anesthetic regimen. *Life Sci*. 2001 Jun 1;69(2):213-22.
- Chevion M, Jiang Y, Har-El R, Berenshtein E, Uretzky G, Kitrossky N. Copper and iron are mobilized following myocardial ischemia: possible predictive criteria for tissue injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Feb 1;90(3):1102-6.
- Inserte J, Garcia-Dorado D, Hernando V, Soler-Soler J. Calpain-mediated impairment of Na⁺/K⁺-ATPase activity during early reperfusion contributes to cell death after myocardial ischemia. *Circ*

Res. 2005 Sep 2;97(5):465-73.

Jacobus Pharm Co: Water soluble orally effective iron chelator United States Patent US005834492A.

Jang YM, Kendaiah S, Drew B, Phillips T, Selman C, Julian D, Leeuwenburgh C. Doxorubicin treatment in vivo activates caspase-12 mediated cardiac apoptosis in both male and female rats. *FEBS Lett.* 2004 Nov 19;577(3):483-90.

Jelinkova M, Strohalm J, Etrych T, Ulbrich K, Rihova B. Starlike vs. classic macromolecular prodrugs: two different antibody-targeted HPMA copolymers of doxorubicin studied in vitro and in vivo as potential anticancer drugs. *Pharm Res.* 2003 Oct;20(10):1558-64.

Jensen JN, Lock-Andersen J, Langer SW, Mejer J. Dexrazoxane-a promising antidote in the treatment of accidental extravasation of anthracyclines. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 2003; 37(3): 174-5.

Jeyaseelan R, Poizat C, Wu HY, Kedes L. Molecular mechanisms of doxorubicin-induced cardiomyopathy. Selective suppression of Reiske iron-sulfur protein, ADP/ATP translocase, and phosphofructokinase genes is associated with ATP depletion in rat cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 1997 Feb 28;272(9):5828-32.

Kalinowski DS, Richardson DR. The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. *Pharmacol Rev.* 2005 Dec;57(4):547-83.

Kalivendi SV, Kotamraju S, Zhao H, Joseph J, Kalyanaraman B. Doxorubicin-induced apoptosis is associated with increased transcription of endothelial nitric-oxide synthase. Effect of antiapoptotic antioxidants and calcium. *J Biol Chem.* 2001 Dec 14;276(50):47266-76.

Kantrowitz NE, Bristow MR. Cardiotoxicity of antitumor agents. *Prog Cardiovasc Dis.* 1984 Nov-Dec;27(3):195-200.

Kehrer JP. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology.* 2000 Aug 14;149(1):43-50.

Kehrer JP. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology.* 2000;149:43-50.

Keizer HG, Pinedo HM, Schuurhuis GJ, Joenje H. Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmacol Ther.* 1990;47(2): 219-31.

Kemp JD, Thorson JA, Stewart BC, Naumann PW. Inhibition of hematopoietic tumor growth by combined treatment with deferoxamine and an IgG monoclonal antibody against the transferrin receptor: evidence for a threshold model of iron deprivation toxicity. *Cancer Res.* 1992 Aug 1;52(15):4144-8.

- Kerkela R, Grazette L, Yacobi R, Iliescu C, Patten R, Beahm C, Walters B, Shevtsov S, Pesant S, Clubb FJ, Rosenzweig A, Salomon RN, Van Etten RA, Alroy J, Durand JB, Force T. Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate. *Nat Med.* 2006 Aug;12(8):908-16. Epub 2006 Jul 23.
- Kim DS, Kim HR, Woo ER, Kwon DY, Kim MS, Chae SW, Chae HJ. Protective effect of calceolarioside on adriamycin-induced cardiomyocyte toxicity. *Eur J Pharmacol.* 2006 Jul 10;541(1-2):24-32.
- Khan M, Varadharaj S, Shobha JC, Naidu MU, Parinandi NL, Kutala VK, Kuppusamy P. C-phycocyanin ameliorates doxorubicin-induced oxidative stress and apoptosis in adult rat cardiomyocytes. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006 Jan;47(1):9-20.
- Kilickap S, Barista I, Akgul E, Aytemir K, Aksoyek S, Aksoy S, Celik I, Kes S, Tekuzman G. cTnT can be a useful marker for early detection of anthracycline cardiotoxicity. *Ann Oncol.* 2005 May;16(5):798-804.
- Kim SY, Kim SJ, Kim BJ, Rah SY, Chung SM, Im MJ, Kim UH. Doxorubicin-induced reactive oxygen species generation and intracellular Ca²⁺ increase are reciprocally modulated in rat cardiomyocytes. *Exp Mol Med.* 2006 Oct 31;38(5):535-45.
- Klener P. Protinádorová chemoterapie. *Galen, Praha* 1996, 328-333.
- Klimtova I, Simunek T, Mazurova Y, Hrdina R, Gersl V, Adamcova M. Comparative study of chronic toxic effects of daunorubicin and doxorubicin in rabbits. *Hum Exp Toxicol.* 2002 Dec;21(12):649-57.
- Klimtova I, Simunek T, Mazurova Y, Kaplanova J, Sterba M, Hrdina R, Gersl V, Adamcova M, Ponka P. A study of potential toxic effects after repeated 10-week administration of a new iron chelator--salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH) to rabbits. *Acta Medica (Hradec Kralove).* 2003;46(4):163-70.
- Klugmann FB, Decorti G, Candussio L, Grill V, Mallardi F, Baldini L. Inhibitors of adriamycin-induced histamine release in vitro limit adriamycin cardiotoxicity in vivo. *Br J Cancer.* 1986 Nov;54(5):743-8.
- Koh E, Ueda Y, Nakamura T, Kobayashi A, Katsuta S, Takahashi H. Apoptosis in young rats with adriamycin-induced cardiomyopathy--comparison with pirarubicin, a new anthracycline derivative. *Pediatr Res.* 2002 Feb;51(2):256-9.
- Kotamraju S, Chitambar CR, Kalivendi SV, Joseph J, Kalyanaraman B. Transferrin receptor-dependent iron uptake is responsible for doxorubicin-mediated apoptosis in endothelial cells: role of oxidant-induced iron signaling in apoptosis. *J Biol Chem.* 2002 May 10;277(19):17179-87.

- Kovarikova P, Mokry M, Klimes J, Vavrova K. Chromatographic methods for the separation of biocompatible iron chelators from their synthetic precursors and iron chelates. *J Sep Sci*. 2004 Dec;27(17-18):1503-10.
- Kovarikova P, Mokry M, Klimes J, Vavrova K. HPLC study on stability of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone. *J Pharm Biomed Anal*. 2006 Jan 23;40(1):105-12.
- Langer SW, Sehested M, Jensen PB. Treatment of anthracycline extravasation with dexrazoxane. *Clin Cancer Res*. 2000 Sep; 6(9): 3680-6.
- Lefrak EA, Pitha J, Rosenheim S, Gottlieb JA. A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. *Cancer*. 1973 Aug;32(2):302-14.
- Legha SS, Wang YM, Mackay B, Ewer M, Hortobagyi GN, Benjamin RS, Ali MK. Clinical and pharmacologic investigation of the effects of alpha-tocopherol on adriamycin cardiotoxicity. *Ann N Y Acad Sci*. 1982;393:411-8.
- Levitt G. Cardioprotection. *Br J Haematol*. 1999 Sep;106(4):860-9.
- Levitt GA, Dorup I, Sorensen K, Sullivan I. Does anthracycline administration by infusion in children affect late cardiotoxicity? *Brit. J. Haematol*. 2004 Feb; 124 (4):463-468.
- Li J, Gwilt PR. The effect of age on the early disposition of doxorubicin. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2003 May;51(5):395-402. Epub 2003 Apr 01.
- Li K, Sung RY, Huang WZ, Yang M, Pong NH, Lee SM, Chan WY, Zhao H, To MY, Fok TF, Li CK, Wong YO, Ng PC. Thrombopoietin protects against in vitro and in vivo cardiotoxicity induced by doxorubicin. *Circulation*. 2006 May 9;113(18):2211-20.
- Li T, Singal PK. Adriamycin-induced early changes in myocardial antioxidant enzymes and their modulation by probucol. *Circulation*. 2000 Oct 24;102(17):2105-10.
- Lien YC, Lin SM, Nithipongvanitch R, Oberley TD, Noel T, Zhao Q, Daosukho C, St Clair DK. Tumor necrosis factor receptor deficiency exacerbated Adriamycin-induced cardiomyocytes apoptosis: an insight into the Fas connection. *Mol Cancer Ther*. 2006 Feb;5(2):261-9.
- Lim CC, Zuppinger C, Guo X, Kuster GM, Helmes M, Eppenberger HM, Suter TM, Liao R, Sawyer DB. Anthracyclines induce calpain-dependent titin proteolysis and necrosis in cardiomyocytes. *Biol Chem*. 2004 Feb 27;279(9):8290-9.
- Lin ZP, Belcourt MF, Cory JG, Sartorelli AC. Stable suppression of the R2 subunit of ribonucleotide reductase by R2-targeted siRNA sensitizes p53(-/-) HCT-116 colon cancer cells to DNA-damaging agents and ribonucleotide reductase inhibitors. *J Biol Chem*. 2004 Apr 19 [Epub ahead of print].

- Link G, Tirosh R, Pinson A, Hershko C. 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.* 1996;127:272-8.
- Link G, Ponka P, Konijn AM, Breuer W, Cabantchik ZI, Hershko C. Effects of combined chelation treatment with pyridoxal isonicotinoyl hydrazone analogs and deferoxamine in hypertransfused rats and in iron-loaded rat heart cells. *Blood* 2003 May 15;101(10):4172-9.
- Liochev SI. The mechanism of "Fenton-like" reactions and their importance for biological systems. A biologist's view. *Met Ions Biol Syst.* 1999;36:1-39.
- Lipshultz SE, Colan SD, Gelber RD, Perez-Atayde AR, Sallan SE, Sanders SP. Late cardiac effects of doxorubicin therapy for acute lymphoblastic leukemia in childhood. *N Engl J Med.* 1991 Mar 21;324(12):808-15.
- Lipshultz SE, Giantris AL, Lipsitz SR, Kimball Dalton V, Asselin BL, Barr RD, Clavell LA, Hurwitz CA, Moghrabi A, Samson Y, Schorin MA, Gelber RD, Sallan SE, Colan SD. Doxorubicin administration by continuous infusion is not cardioprotective: the Dana-Farber 91-01 Acute Lymphoblastic Leukemia protocol. *J Clin Oncol.* 2002 Mar 15;20(6):1677-82.
- Lipshultz SE, Rifai N, Sallan SE, Lipsitz SR, Dalton V, Sacks DB, Ottlinger ME. Predictive value of cardiac troponin T in pediatric patients at risk for myocardial injury. *Circulation.* 1997 Oct 21;96(8):2641-8.
- Litwin SE, Katz SE, Morgan JP, Douglas PS. Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat. *Circulation.* 1994 Jan;89(1):345-54.
- Lopez M, Vici P, Di Lauro K, Conti F, Paoletti G, Ferraironi A, Sciuto R, Giannarelli D, Maini CL. Randomized prospective clinical trial of high-dose epirubicin and dexrazoxane in patients with advanced breast cancer and soft tissue sarcomas. *J Clin Oncol.* 1998 Jan;16(1):86-92.
- Lothstein L, Israel M, Sweatman TW. Anthracycline drug targeting: cytoplasmic versus nuclear--a fork in the road. *Drug Resist Updat.* 2001 Jun; 4(3): 169-77.
- Luo X, Evrovsky Y, Cole D, Trines J, Benson LN, Lehotay DC. Doxorubicin-induced acute changes in cytotoxic aldehydes, antioxidant status and cardiac function in the rat. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1360:45-52.
- Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release.* 2000 Mar 1;65(1-2):271-84.
- Moghrabi A, Levy DE, Asselin B, Barr R, Clavell L, Hurwitz C, Samson Y, Schorin M, Dalton VK, Lipshultz SE, Neuberg DS, Gelber RD, Cohen HJ, Sallan SE, Silverman LB. Results of the

- Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium Protocol 95-01 for children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2007 Feb 1;109(3):896-904.
- Malarkodi KP, Balachandar AV, Varalakshmi P. The influence of lipoic acid on adriamycin induced nephrotoxicity in rats. The influence of lipoic acid on adriamycin induced nephrotoxicity in rats. *Mol Cell Biochem*. 2003 May;247(1-2):15-22.
- Malisza K. L. and Hasinoff B. B. 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*. 1995 Aug 1;321(1):51-60.
- Malisza KL, Hasinoff BB. Inhibition of anthracycline semiquinone formation by ICRF-187 (dexrazoxane) in cells. *Free Radic Biol Med*. 1996;20(7):905-14.
- Marty M, Espie M, Llombart A, Monnier A, Rapoport BL, Stahalova V; Dexrazoxane Study Group. 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*. 2006 Apr;17(4):614-22.
- Matsui H, Morishima I, Numaguchi Y, Toki Y, Okumura K, Hayakawa T. Protective effects of carvedilol against doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *Life Sci*. 1999;65(12):1265-74.
- Mauricio AQ, Lopes GK, Gomes CS, Oliveira RG, Alonso A, Hermes-Lima M. Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone inhibits iron-induced ascorbate oxidation and ascorbyl radical formation. *Biochim Biophys Acta*. 2003 Mar 17;1620(1-3):15-24.
- Milei J, Boveris A, Llesuy S, Molina HA, Storino R, Ortega D, Milei SE. Amelioration of adriamycin-induced cardiotoxicity in rabbits by prenylamine and vitamins A and E. *Am Heart J*. 1986 Jan;111(1):95-102.
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*. 2004 Jun;56(2):185-229.
- Mordente A, Minotti G, Martorana GE, Silvestrini A, Giardina B, Meucci E. Anthracycline secondary alcohol metabolite formation in human or rabbit heart: biochemical aspects and pharmacologic implications. *Biochem Pharmacol*. 2003 Sep 15;66(6):989-98.
- Mrkvickova Z, Kovarikova P, Klimes J, Kalinowski D, Richardson DR. Development and validation of HPLC-DAD methods for the analysis of two novel iron chelators with potent anti-cancer activity. *J Pharm Biomed Anal*. 2007 Mar 12;43(4):1343-51.
- Murren J, Modiano M, Clairmont C, Lambert P, Savaraj N, Doyle T, Sznol M. Phase I and pharmacokinetic study of triapine, a potent ribonucleotide reductase inhibitor, administered daily

- for five days in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res.* 2003 Sep 15;9(11):4092-100.
- Myers C. The role of iron in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Semin Oncol.* 1998 Aug;25(4 Suppl 10):10-4.
- Myers C, Bonow R, Palmeri S, Jenkins J, Corden B, Locker G, Doroshow J, Epstein S. A randomized controlled trial assessing the prevention of doxorubicin cardiomyopathy by N-acetylcysteine. *Semin Oncol.* 1983 Mar;10(1 Suppl 1):53-5.
- Nagami K, Yoshikawa T, Suzuki M, Wainai Y, Anzai T, Handa S. Abnormal beta-adrenergic transmembrane signaling in rabbits with adriamycin-induced cardiomyopathy. *Jpn Circ J.* 1997 Mar;61(3):249-55.
- Nagueh SF, Kopelen HA, Lim DS, Zoghbi WA, Quinones MA, Roberts R, Marian AJ. Tissue Doppler imaging consistently detects myocardial contraction and relaxation abnormalities, irrespective of cardiac hypertrophy, in a transgenic rabbit model of human hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation.* 2000 Sep 19;102(12):1346-50.
- Nagy AC, Tolnay E, Nagykalnai T, Forster T. Cardiotoxicity of anthracycline in young breast cancer female patients: the possibility of detection of early cardiotoxicity by TDI. *Neoplasma.* 2006;53(6):511-7.
- Nakamura T, Ueda Y, Juan Y, Katsuda S, Takahashi H, Koh E. Fas-mediated apoptosis in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats: In vivo study. *Circulation.* 2000 Aug 1;102(5):572-8.
- Nakamura T, Ueda Y, Juan Y, Katsuda S, Takahashi H, Koh E. Fas-mediated apoptosis in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats: In vivo study. *Circulation.* 2000 Aug 1;102(5):572-8.
- Nousiainen T, Vanninen E, Jantunen E, Remes J, Ritanen E, Vuolteenaho O, Hartikainen J. Neuroendocrine changes during the evolution of doxorubicin-induced left ventricular dysfunction in adult lymphoma patients. *Clin Sci (Lond).* 2001 Dec;101(6):601-7.
- Okumura H, Iuchi K, Yoshida T, Nakamura S, Takeshima M, Takamatsu H, Ikeno A, Usuda K, Ishikawa T, Ohtake S, Matsuda T. Brain natriuretic peptide is a predictor of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Acta Haematol.* 2000;104(4):158-63.
- Oliveira PJ, Bjork JA, Santos MS, Leino RL, Froberg MK, Moreno AJ, Wallace KB. Carvedilol-mediated antioxidant protection against doxorubicin-induced cardiac mitochondrial toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004 Oct 15;200(2):159-68.
- Olson LE, Bedja D, Alvey SJ, Cardounel AJ, Gabrielson KL, Reeves RH. Protection from doxorubicin-induced cardiac toxicity in mice with a null allele of carbonyl reductase 1. *Cancer Res.* 2003 Oct 15;63(20):6602-6.

- Olson RD, Gambliel HA, Vestal RE, Shadle SE, Charlier HA Jr, Cusack BJ. Doxorubicin cardiac dysfunction: effects on calcium regulatory proteins, sarcoplasmic reticulum, and triiodothyronine. *Cardiovasc Toxicol.* 2005;5(3):269-83.
- Olson RD, Li X, Palade P, Shadle SE, Mushlin PS, Gambliel HA, Fill M, Boucek RJ Jr, Cusack BJ. Sarcoplasmic reticulum calcium release is stimulated and inhibited by daunorubicin and daunorubicinol. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2000 Dec 1;169(2):168-76.
- Olson RD, Mushlin PS, Brenner DE, Fleischer S, Cusack BJ, Chang BK, Boucek RJ Jr. Doxorubicin cardiotoxicity may be caused by its metabolite, doxorubicinol. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 May;85(10):3585-9.
- Park JW. Liposome-based drug delivery in breast cancer treatment. *Breast Cancer Res.* 2002;4(3):95-9.
- Park JW, Hong K, Kirpotin DB, Colbern G, Shalaby R, Baselga J, Shao Y, Nielsen UB, Marks JD, Moore D, Papahadjopoulos D, Benz CC. Anti-HER2 immunoliposomes: enhanced efficacy attributable to targeted delivery. *Clin Cancer Res.* 2002 Apr;8(4):1172-81.
- Pennock GD, Yun DD, Agarwal PG, Spooner PH, Goldman S. Echocardiographic changes after myocardial infarction in a model of left ventricular diastolic dysfunction. *Am J Physiol.* 1997 Oct;273(4 Pt 2):H2018-29.
- Perez EA, Rodeheffer R. Clinical cardiac tolerability of trastuzumab. *J Clin Oncol.* 2004 Jan 15;22(2):322-9.
- Perletti G, Monti E, Paracchini L, Piccinini F. Effect of trimetazidine on early and delayed doxorubicin myocardial toxicity. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1989 Nov-Dec;302:280-9.
- Perik, P.J., Van Den Berg, M.P., De Vries, E.G.E., Van Veldhuisen, D.J. Experimental animal model for anthracycline-induced heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2004 Jun;6(4):375-6.
- Perletti G, Monti E, Paracchini L, Piccinini F. Effect of trimetazidine on early and delayed doxorubicin myocardial toxicity. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1989 Nov-Dec;302:280-9.
- Pessah IN, Durie EL, Schiedt MJ, Zimanyi I. Sarcoplasmic reticulum calcium release is stimulated and inhibited by daunorubicin and daunorubicinol. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2000 Dec 1;169(2):168-76.
- Piga A, Francini G, Pein F, et al.: Cardioprotection by Cardioxane (dexrazoxane) in breast cancer patients at increased risk for anthracycline induced cardiotoxicity. *Proceedings of the American Association for Cancer Research* 34: A-1359, 228, 1993.
- Platel D, Bonoron-Adele S, Robert J. Role of daunorubicinol in daunorubicin-induced

cardiotoxicity as evaluated with the model of isolated perfused rat heart. *Pharmacol Toxicol.* 2001 May;88(5):250-4.

Ponka P. Tissue-specific regulation of iron metabolism and heme synthesis: distinct control mechanisms in erythroid cells. *Blood.* 1997 Jan 1;89(1):1-25.

Ponka P, Borova J, Neuwirt J, Fuchs O. Mobilization of iron from reticulocytes. Identification of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone as a new iron chelating agent. *FEBS Lett.* 1979 Jan 15;97(2):317-21.

Ponka P, Richardson D, Baker E, Schulman HM, Edward JT. Effect of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and other hydrazones on iron release from macrophages, reticulocytes and hepatocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1988 Oct 13;967(1):122-9.

Ponka P, Richardson DR, Edward JT, Chubb FL. Iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class. Relationship of the lipophilicity of the apochelator to its ability to mobilise iron from reticulocytes in vitro. *Can J Physiol Pharmacol.* 1994 Jun;72(6):659-66.)

Poster DS, Penta J, Marsoni S, Bruno S, Macdonald JS. Bis-diketopiperazine derivatives in clinical oncology: ICRF-159. *Cancer Clin Trials.* 1980;3(4):315-20.

Rajagopalan S, Politi PM, Sinha BK, Myers CE. Adriamycin-induced free radical formation in the perfused rat heart: implications for cardiotoxicity. *Cancer Res.* 1988;48:4766-9.

Ralston MA, Murnane MR, Kelley RE, Altschuld RA, Unverferth DV, Leier CV. Magnesium content of serum, circulating mononuclear cells, skeletal muscle, and myocardium in congestive heart failure. *Circulation.* 1989 Sep;80(3):573-80.

Ramu E, Korach A, Houminer E, Schneider A, Elami A, Schwalb H. Dexrazoxane prevents myocardial ischemia/reperfusion-induced oxidative stress in the rat heart. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2006 Oct;20(5):343-8.

Richardson DR. Novel chelators for central nervous system disorders that involve alterations in the metabolism of iron and other metal ions. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Mar;1012:326-41.

Richardson DR, Ponka P. Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and its analogs: potential orally effective iron-chelating agents for the treatment of iron overload disease. *J Lab Clin Med.* 1998 Apr;131(4):306-15.

Richardson D, Vitolo LW, Baker E, Webb J. Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and analogues. Study of their stability in acidic, neutral and basic aqueous solutions by ultraviolet-visible spectrophotometry. *Biol Met.* 1989;2(2):69-76.

Richardson DR, Tran EH, Ponka P. The potential of iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl

- hydrazone class as effective antiproliferative agents. *Blood*. 1995 Dec 1;86(11):4295-306.
- Rossi CR, Mocellin S, Pilati P, Foletto M, Quintieri L, Palatini P, Lise M. Pharmacokinetics of intraperitoneal cisplatin and doxorubicin. *Surg Oncol Clin N Am*. 2003 Jul; 12(3): 781-94.
- Rossini F, Terruzzi E, Perego D, Miccolis I, Rivolta F, Manca E, Pogliani EM. Long-term follow-up of patients with intermediate or high-grade non-Hodgkin lymphoma treated with a combination of cyclophosphamide, epirubicin, vincristine, and prednisone. *Cancer*. 2004 Jan 15;100(2):350-5.
- Routledge HC, Rea DW, Steeds RP. Monitoring the introduction of new drugs--Herceptin to cardiotoxicity. *Clin Med*. 2006 Sep-Oct;6(5):478-81.
- Rungwerth K, Schindler U, Gerl M, Schafer S, Licher T, Busch AE, Ruetten H. Inhibition of Na⁺-H⁺ exchange by cariporide reduces inflammation and heart failure in rabbits with myocardial infarction. *Br J Pharmacol*. 2004 Aug;142(7):1147-54.
- Saad SY, Najjar TA, Al-Rikabi AC. The preventive role of deferoxamine against acute doxorubicin-induced cardiac, renal and hepatic toxicity in rats. *Pharmacol Res*. 2001 Mar;43(3):211-8.
- Sadzuka, T. Sugiyama, K. Simio, N. Kinase and S. Hirota, Protective effect of flavonoids on doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicol. Lett.* 92 (1997), pp. 1–7.
- Safra T. Cardiac safety of liposomal anthracyclines. *Oncologist*. 2003;8 Suppl 2:17-24.
- Santos NC, Castilho RF, Meinicke AR, Hermes-Lima M. The iron chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone inhibits mitochondrial lipid peroxidation induced by Fe(II)-citrate. *Eur J Pharmacol*. 2001 Sep 28;428(1):37-44.
- Salvatorelli E, Menna P, Gianni L, Minotti G. Defective taxane stimulation of epirubicinol formation in the human heart: insight into the cardiac tolerability of epirubicin-taxane chemotherapies. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007 Feb;320(2):790-800.
- Sapra P, Allen TM. Ligand-targeted liposomal anticancer drugs. *Prog Lipid Res*. 2003 Sep;42(5):439-62.
- Sartori S, Nielsen I, Tassinari D, Maestri A, Abbasciano V. Intracellular magnesium concentrations and acute anthracycline-induced cardiotoxicity. *Br J Cancer*. 1991 Oct;64(4):785-7.
- Sawyer DB, Fukazawa R, Arstall MA, Kelly RA. Daunorubicin-induced apoptosis in rat cardiac myocytes is inhibited by dexrazoxane. *Circ Res*. 1999 Feb 19;84(3):257-65.
- Seymour L, Bramwell V, Moran LA. 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*. 1999 Apr;3(2):145-59.

Shan K, Lincoff AM, Young JB. Anthracycline-induced cardiotoxicity. *Ann Intern Med.* 1996 Jul 1;125(1):47-58.

Schroeder PE, Davidson JN, Hasinoff BB. Dihydroorotase catalyzes the ring opening of the hydrolysis intermediates of the cardioprotective drug dexrazoxane (ICRF-187). *Drug Metab Dispos.* 2002 Dec;30(12):1431-5.

Schuchter LM, Hensley ML, Meropol NJ, Winer EP; American Society of Clinical Oncology Chemotherapy and Radiotherapy Expert Panel. 2002 update of recommendations for the use of chemotherapy and radiotherapy protectants: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol.* 2002 Jun 15;20(12):2895-903.

Simunek T, Boer C, Bouwman RA, Vlasblom R, Versteilen AM, Sterba M, Gersl V, Hrdina R, Ponka P, de Lange JJ, Paulus WJ, Musters RJ. SIH -a novel lipophilic iron chelator-protects H9c2 cardiomyoblasts from oxidative stress-induced mitochondrial injury and cell death. *J Mol Cell Cardiol.* 2005a Aug;39(2):345-54.

Simunek T., Klimtova I., Hrdina R., Gersl V., Mazurova Y., Machackova J., Ponka P., Holečková M. The effects of repeated administration of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone on cardiovascular system in rabbits. *Biomarkers and Environment* 2001; 4 (Suppl. 1): 93-97.

Simunek T, Klimtova I, Kaplanova J, Sterba M, Mazurova Y, Adamcova M, Hrdina R, Gersl V, Ponka P. Study of daunorubicin cardiotoxicity prevention with pyridoxal isonicotinoyl hydrazone in rabbits. *Pharmacol Res.* 2005b Mar;51(3):223-31.

Simunek T, Klimtova I, Adamcova M, Gersl V, Hrdina R, Sterba M, Kaplanova J, Mazurova. Cardiac troponin T as an indicator of reduced left ventricular contractility in experimental anthracycline-induced cardiomyopathy. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2003 Nov;52(5):431-4.

Simunek T, Klimtova I, Kaplanova J, Mazurova Y, Adamcova M, Gersl V, Hrdina R, Sterba M, Hrdina R., Gersl V. Rabbit model for in vitro study of anthracycline-induced heart failure and for the evaluation of protective agents. *Eur J Heart Fail.* 2004 Jun;6(4):377-387.

Smith BJ, Ashford RF, Bakowski M, Hellman K, Newton K, Phillips R, Lambert J, Jones R, Peters N, Evans M. A trial of high-dose 5-fluorouracil with razoxane or adriamycin in the treatment of advanced adenocarcinoma of the gastrointestinal tract. *Am J Clin Oncol.* 1983 Aug;6(4):481-4.

Snowden JA, Hill GR, Hunt P, Carnoutsos S, Spearing RL, Espiner E, Hart DN. Assessment of cardiotoxicity during haemopoietic stem cell transplantation with plasma brain natriuretic peptide. *Bone Marrow Transplant.* 2000 Aug;26(3):309-13.

Stypmann J, Engelen MA, Breithardt AK, Milberg P, Rothenburger M, Breithardt OA, Breithardt G, Eckardt L, Cordula PN. Doppler echocardiography and tissue Doppler imaging in the healthy

rabbit: differences of cardiac function during awake and anaesthetised examination. *Int J Cardiol.* 2007 Feb 7;115(2):164-70.

Swain SM, Whaley FS, Gerber MC, Weisberg S, York M, Spicer D, Jones SE, Wadler S, Desai A, Vogel C, Speyer J, Mittelman A, Reddy S, Pendergrass K, Velez-Garcia E, Ewer MS, Bianchine JR, Gams RA. Cardioprotection with dexrazoxane for doxorubicin-containing therapy in advanced breast cancer. *J Clin Oncol.* 1997 Apr;15(4):1318-32.

Swain SM, Vici P. The current and future role of dexrazoxane as a cardioprotectant in anthracycline treatment: expert panel review. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2004 Jan;130(1):1-7.

Tallarico D, Rizzo V, Di Maio F, Petretto F, Bianco G, Placanica G, Marziali M, Paravati V, Gueli N, Meloni F, Campbell SV. Myocardial cytoprotection by trimetazidine against anthracycline-induced cardiotoxicity in anticancer chemotherapy. *Angiology.* 2003 Mar-Apr;54(2):219-27.

Tam TF, Leung-Toung R, Li W, Wang Y, Karimian K, Spino M. Iron chelator research: past, present, and future. *Curr Med Chem.* 2003 Jun;10(12):983-95.

Tassan-Mangina S, Codorean D, Metivier M, Costa B, Himmerlin C, Jouannaud C, Blaise AM, Elaerts J, Nazeyrollas P. Tissue Doppler imaging and conventional echocardiography after anthracycline treatment in adults: early and late alterations of left ventricular function during a prospective study. *Eur J Echocardiogr.* 2006 Mar;7(2):141-6.

Tesoriere L, Ciaccio M, Valenza M, Bongiorno A, Maresi E, Albiero R, Livrea MA. Effect of vitamin A administration on resistance of rat heart against doxorubicin-induced cardiotoxicity and lethality. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994 Apr;269(1):430-6.

Tjeerdsma G, Meinardi MT, van Der Graaf WT, van Den Berg MP, Mulder NH, Crijns HJ, de Vries EG, van Veldhuisen DJ. Early detection of anthracycline induced cardiotoxicity in asymptomatic patients with normal left ventricular systolic function: autonomic versus echocardiographic variables. *Heart.* 1999 Apr;81(4):419-23.

Tonkin K, Bates M, Lieu D, Arundell E, Williamson T, Zagari M. Dexrazoxane cardioprotection for patients receiving FAC chemotherapy: a pharmacoeconomic evaluation. *Can J Oncol.* 1996 Nov;6(2):458-73.

Torti FM, Bristow MR, Howes AE, Aston D, Stockdale FE, Carter SK, Kohler M, Brown BW Jr, Billingham ME. Reduced cardiotoxicity of doxorubicin delivered on a weekly schedule. Assessment by endomyocardial biopsy. *Ann Intern Med.* 1983 Dec;99(6):745-9.

Tsafack A, Loyevsky M, Ponka P, Cabantchik ZI. Mode of action of iron (III) chelators as antimalarials. IV. Potentiation of desferal action by benzoyl and isonicotinoyl hydrazone derivatives. *J Lab Clin Med.* 1996 Jun;127(6):574-82.

- Ueno M, Kakinuma Y, Yuhki K, Murakoshi N, Iemitsu M, Miyauchi T, Yamaguchi I. Doxorubicin induces apoptosis by activation of caspase-3 in cultured cardiomyocytes in vitro and rat cardiac ventricles in vivo. *J Pharmacol Sci.* 2006 Jun;101(2):151-8.
- Unverferth DV, Leier CV, Balcerzak SP, Hamlin RL. Usefulness of a free radical scavenger in preventing doxorubicin-induced heart failure in dogs. *Am J Cardiol.* 1985 Jul 1;56(1):157-61.
- van Acker FA, Boven E, Kramer K, Haenen GR, Bast A, van der Vijgh WJ. Frederine, a new and promising protector against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Clin Cancer Res.* 2001 May;7(5):1378-84.
- van Acker FA, van Acker SA, Kramer K, Haenen GR, Bast A, van der Vijgh WJ. 7-monohydroxyethylrutoside protects against chronic doxorubicin-induced cardiotoxicity when administered only once per week. *Clin Cancer Res.* 2000 Apr;6(4):1337-41.
- van Asbeck BS, Georgiou NA, van der Bruggen T, Oudshoorn M, Nottet HS, Marx JJ. Anti-HIV effect of iron chelators: different mechanisms involved. *J Clin Virol.* 2001 Feb;20(3):141-7.
- van Dalen EC, van der Pal HJ, Caron HN, Kremer LC. Different dosage schedules for reducing cardiotoxicity in cancer patients receiving anthracycline chemotherapy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006 Oct 18;(4):CD005008.
- Van Vleet and V.J. Ferrans , Evaluation of vitamin E and selenium protection against chronic adriamycin toxicity in rabbits. *Cancer Treat. Rep.* 1980a, 64: 315–17.
- Van Vleet JF, Ferrans VJ, Weirich WE. Cardiac disease induced by chronic adriamycin administration in dogs and an evaluation of vitamin E and selenium as cardioprotectants. *Am J Pathol.* 1980b Apr;99(1):13-42.
- Venkatesan N. Curcumin attenuation of acute adriamycin myocardial toxicity in rats. *Br J Pharmacol.* 1998 Jun;124(3):425-7.
- Venturini M, Michelotti A, Del Mastro L, Gallo L, Carnino F, Garrone O, Tibaldi C, Molea N, Bellina RC, Pronzato P, Cyrus P, Vinke J, Testore F, Guelfi M, Lionetto R, Bruzzi P, Conte PF, Rosso R. 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.* 1996 Dec;14(12):3112-20.
- Villamarin S, Mansilla S, Ferrer-Miralles N, Priebe W, Portugal J. A comparative analysis of the time-dependent antiproliferative effects of daunorubicin and WP631. *Eur J Biochem.* 2003 Feb;270(4):764-70.
- Villani F, Galimberti M, Monti E, Cova D, Lanza E, Rozza-Dionigi A, Favalli L, Poggi P. Effect of ICRF-187 pretreatment against doxorubicin-induced delayed cardiotoxicity in the rat. *Toxicol Appl*

Pharmacol. 1990 Feb;102(2):292-9.

Voogd A, Sluiter W, van Eijk HG, Koster JF. Low molecular weight iron and the oxygen paradox in isolated rat hearts. *J Clin Invest.* 1992 Nov;90(5):2050-5.

Von Hoff DD, Layard MW, Basa P, Davis HL Jr, Von Hoff AL, Rozenzweig M, Muggia FM. Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. *Ann Intern Med.* 1979 Nov;91(5):710-7.

Wallace KB. Doxorubicin-induced cardiac mitochondrionopathy. *Pharmacol Toxicol.* 2003 Sep;93(3):105-15.

Wang S, Konorev EA, Kotamraju S, Joseph J, Kalivendi S, Kalyanaraman B. Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms. intermediacy of H₂O₂- and p53-dependent pathways. *Biol Chem.* 2004 Jun 11;279(24):25535-43.

Wang S, Kotamraju S, Konorev E, Kalivendi S, Joseph J, Kalyanaraman B. Activation of nuclear factor-kappaB during doxorubicin-induced apoptosis in endothelial cells and myocytes is proapoptotic: the role of hydrogen peroxide. *Biochem J.* 2002 Nov 1;367(Pt 3):729-40.

Wexler LH, Andrich MP, Venzon D, Berg SL, Weaver-McClure L, Chen CC, Dilsizian V, Avila N, Jarosinski P, Balis FM, Poplack DG, Horowitz ME. *J Clin Oncol.* 1996 Feb;14(2):362-72.

Wiseman LR, Spencer CM. Dexrazoxane. A review of its use as a cardioprotective agent in patients receiving anthracycline-based chemotherapy. *Drugs.* 1998 Sep;56(3):385-403.

Wouters KA, Kremer LC, Miller TL, Herman EH, Lipshultz SE. Protecting against anthracycline-induced myocardial damage: a review of the most promising strategies. *Br J Haematol.* 2005 Dec;131(5):561-78.

Wu X, Hasinoff BB. The antitumor anthracyclines doxorubicin and daunorubicin do not inhibit cell growth through the formation of iron-mediated reactive oxygen species. *Anticancer Drugs.* 2005 Jan;16(1):93-9.

Xu LJ, Jin L, Pan H, Zhang AZ, Wei G, Li PP, Lu WY. Deferiprone protects the isolated atria from cardiotoxicity induced by doxorubicin. *Acta Pharmacol Sin.* 2006 Oct;27(10):1333-9.

Yin X, Wu H, Chen Y, Kang YJ. Induction of antioxidants by adriamycin in mouse heart. *Biochem Pharmacol.* 1998 Jul 1;56(1):87-93.

Yoda Y, Nakazawa M, Abe T, Kawakami Z. Prevention of doxorubicin myocardial toxicity in mice by reduced glutathione. *Cancer Res.* 1986 May;46(5):2551-6.

Youdim MB, Stephenson G, Ben Shachar D. Ironing iron out in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases with iron chelators: a lesson from 6-hydroxydopamine and iron chelators, desferal and VK-28. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Mar;1012:306-25.

Young MS, Magid NM, Wallerson DC, Godwit RS, Devereux RB, Carter JN, Im J, Hall MA, Borer JS: Echocardiographic left ventricular mass measurement in small animals: anatomic validation in normal and aortic regurgitant rabbits. *American Journal of Noninvasive Cardiology* 4: 145 - 153, 1990.

Yu Y, Wong J, Lovejoy DB, Kalinowski DS, Richardson DR. Chelators at the cancer coalface: desferrioxamine to Triapine and beyond. *Clin Cancer Res.* 2006 Dec 1;12(23):6876-83.

Zanninelli G, Glickstein H, Breuer W, Milgram P, Brissot P, Hider RC, Konijn AM, Libman J, Shanzer A, Cabantchik ZI. Chelation and mobilization of cellular iron by different classes of chelators. *Mol Pharmacol.* 1997 May;51(5):842-52.

Zeidan Q, Strauss M, Porras N, Anselmi G. Differential long-term subcellular responses in heart and liver to adriamycin stress. Exogenous L-carnitine cardiac and hepatic protection. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 2002 Jul;34(3):315-21.

Zima T, Tesar V, Crkovska J, Stejskalova A, Platenik J, Teminova J, Nemecek K, Janebova M, Stipek S. ICRF-187 (dexrazoxan) protects from adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats. *Nephrol Dial Transplant.* 1998 Aug;13(8):1975-9.

X.

PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI

A) Původní práce in extenso v recenzovaných odborných časopisech (celkem 17, z toho 11 s IF)

Štěrba M, Popelová O, Šimůnek T, Mazurová Y, Potáčová A, Adamcová M, Gunčová I, Kaiserová H, Palička V, Poňka P, Geršl V. Iron chelation-afforded cardioprotection against chronic anthracycline cardiotoxicity: a study of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH). TOXICOLOGY 2007. Accepted 13. 3. 2007. In Press.

Štěrba M, Šimůnek T, Popelová O, Potáčová A, Adamcová M, Mazurová Y, Holečková M, Geršl V. Early detection of anthracycline cardiotoxicity in a rabbit model: left ventricle filling pattern versus troponin T determination. PHYSIOL RES. 2006. Accepted 27. 9. 2006. In Press.

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

Štěrba M, Šimůnek T, Mazurová Y, Adamcová M, Popelová O, Kaplanová J, Poňka P, Geršl V. Safety and tolerability of repeated administration of pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone in rabbits. HUM EXP TOXICOL. 2005 Nov;24(11):581-9.

Štěrba M, Šimůnek T, Mazurová Y, Popelová O, Adamcová M, Poňka P, Geršl V. Study of organ toxicity of repeated administration of novel iron chelator o-108 in rabbits. BIOMARKERS ENVIRONMENT. 2004;5(5):40-2.

Štěrba M, Kaplanová J, Šimůnek T, Klimtová I, Mazurová Y, Adamcová M, Čermáková E, Hrdina R, Geršl V, Poňka P. The effects of iron chelators (pyridoxal isonicotinoyl hydrazone, salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone) on selected parameters in rabbits. BIOMARKERS ENVIRONMENT. Supp 1, 10-13, 2003.

Šimůnek T, **Štěrba M**, Holečková M, Kaplanová J, Klimtová I, Adamcová M, Geršl V, Hrdina R. Myocardial content of selected elements in experimental anthracycline-induced cardiomyopathy in rabbits. BIOMETALS. 2005 Apr;18(2):163-9.

Adamcová M, **Štěrba M**, Klimtová I, Šimůnek T, Hrdina R, Geršl V, Poňka P. Cardiac troponins following repeated administration of an iron chelator-salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH)-in rabbits. ACTA MEDICA (HRADEC KRALOVE). 2003;46(4):171-4.

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

Kovaříková P, Klimeš J, **Štěrba M**, Popelová O, Geršl V, Poňka P. HPLC determination of novel aroyl hydrazone iron chelator (o-108) in rabbit plasma and its application to a pilot

pharmacokinetic study. *J. CHROM B ANALYT TECHNOL BIOMED LIFE SCI.* 2006 Jul 11;838(2):107-12.

Kovaříková P, Klimeš J, Štěrbá M, Popelová O, Mokry M, Geršl V, Poňka P. Development of high-performance liquid chromatographic determination of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone in rabbit plasma and the application of this method to an in vivo study. *J. SEP. SCI.* 2005 Aug;28(12):1300-6.

Šimůnek T, Klimtová I, Kaplanová J, Štěrbá M, Mazurová Y, Adamcová M, Hrdina R, Geršl V, Poňka P. Study of daunorubicin cardiotoxicity prevention with pyridoxal isonicotinoyl hydrazone in rabbits. *PHARMACOL RES.* 2005 Mar;51(3):223-31.

Adamcová M, Potáčová A, Čajnáková H, Hrbatová L, Štěrbá M, Popelová O, Šimůnek T, Poňka P, Geršl V. Evaluation of ECG time intervals in a rabbit model of anthracycline-induced anthracycline-induced cardiomyopathy: a useful tool for assessment of cardioprotective agents. *PHYSIOL RES.* 2007, In Press.

Klimtová I, Šimůnek T, Mazurová Y, Kaplanová J, Štěrbá M, Hrdina R, Geršl V, Adamcová M, Poňka P. A study of potential toxic effects after repeated 10-week administration of a new iron chelator--salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH) to rabbits. *ACTA MEDICA (HRADEC KRALOVE).* 2003;46(4):163-70.

Šimůnek T, Klimtová I, Kaplanová J, Mazurová Y, Adamcová M, Štěrbá M, Hrdina R, Geršl V. Rabbit model for in vitro study of anthracycline-induced heart failure and for the evaluation of protective agents. *EUR J HEART FAIL.* 2004 Jun;6(4):377-87.

Šimůnek T, Boer C, Bouwman RA, Vlasblom R, Versteilen AM, Štěrbá M, Geršl V, Hrdina R, Poňka P, de Lange JJ, Paulus WJ, Musters RJ. SIH - a novel lipophilic iron chelator - protects H9c2 cardiomyoblasts from oxidative stress-induced mitochondrial injury and cell death. *J MOL CELL CARDIOL.* 2005 Aug;39(2):345-54.

Šimůnek T, Klimtová I, Adamcová M, Geršl V, Hrdina R, Štěrbá M, Kaplanová J, Mazurová Y. Cardiac troponin T as an indicator of reduced left ventricular contractility in experimental anthracycline-induced cardiomyopathy. *CANCER CHEMOTHER PHARMACOL.* 2003 Nov;52(5):431-4.

Manuskripty t.č. v recenzním řízení (2)

Šimůnek T, Štěrbá M, Popelová O, Kaiserová H, Potáčová A, Adamcová M, Mazurová Y, Poňka P, Geršl V. Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) and its analogs as protectants against anthracycline-induced cardiotoxicity. *HEAMOGLOBIN.*

Kaiserová H, Šimůnek T, Štěrbá M, den Hartog GJM, Schröterová L, Popelová O, Geršl V, Kvasničková E, Bast A. New iron chelators in anthracycline-induced cardiotoxicity. *CARDIOVASC.*

TOXICOLOGY.

B) Přehledové publikace (3 z toho 1 v časopise s IF)

Adamcová M, Štěrba M, Šimůnek T, Potáčová A, Popelová O, Geršl V. Regulatory proteins of the myocardium and heart failure. EUR J HEART FAIL. 2006 Jun;8(4):333-42.

Adamcová M, Štěrba M, Šimůnek T, Potáčová A, Popelová O, Mazurová Y, Geršl V. Troponin as a marker of myocardial damage in drug-induced cardiotoxicity. EXPERT OPIN DRUG SAF. 2005;4(3):457-72.

Potáčová A, Adamcová M, Štěrba M, Popelová O, Geršl V. Role matrixových metaloproteináz při srdečním selhání. ČS.FYZIOL. 2005;54(4):168-175.

C) Studijní texty (1)

Geršl V, Štěrba M. Vegetativní nervový systém (4 kapitoly) - Fendrich et al. Farmakologie pro farmaceuty II, t.č. v tisku.

D) Abstrakty (39)

Štěrba M, Lenčo J, Pávková I, Studničková K, Geršl V. Aplikace proteomické analýzy do studia antracyklinem-indukované kardiomyopatie na experimentálním modelu. X. Vědecká konference LF a FN HK, Hradec Králové, 25. 1. 2006. Sborník abstraktů z konference str. 67.

Štěrba M, Popelová O, Šimůnek T, Mazurová Y, Potáčová A, Adamcová M, Kaiserová H, Poňka P, Geršl V. Pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazon jako kardioprotektivum u antracykliny indukované kardiotoxicity. 56. Farmakologické dny. Bratislava 6.-8. 9. 2006, Slovenská republika. Sborník abstraktů z konference str. 28.

Štěrba M, Kaplanová J, Popelová O, Adamcová M, Mazurová Y, Šimůnek T, Čermáková E, Geršl V, Poňka P. Study of potential cardioprotective effects of a novel group of aroylhydrazone iron chelators in daunorubicin cardiotoxicity in rabbits. ACTA MEDICA (HRADEC KRÁLOVÉ). 2005; 48(2):117.

Štěrba M, Šimůnek T, Popelová O, Geršl V. Echografické hodnocení diastolické funkce u králíka – nástroj pro časnou detekci chronické kardiotoxicity daunorubicinu na experimentálním modelu? XXXIII. Den mladých kardiologů ČKS. Praha, 6. 5. 2005. Sborník abstraktů z konference str. 18.

Štěrba M, Popelová O, Kovaříková P, Šimůnek T, Vávrová K, Poňka P, Geršl V: Pilot study on plasma pharmacokinetics of a novel iron chelator salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone. 1st Congress of the International Biology Society, Praha (BIOIRON 2005), ČR, May 22-26, 2005;

P237. Sborník abstraktů z konference str. 98.

Štěrbá M, Popelová O, Šimůnek T, Adamcová M, Geršl V: Study on prediction of anthracycline-induced heart failure using doppler evaluation of left ventricular filling. *J MOL CELL CARDIOL.* 2005; 38(6):1070.

Štěrbá M, Popelová O, Šimůnek T, Potáčová A, Adamcová M, Mazurová Y, Poňka P, Geršl V: Studium nových potenciálně kardioprotektivních chelátorů železa na modelu daunorubicinem indukované chronické kardiomyopatie u králíka. *ČS. FYZIOL.* 2005; 54(4):213.

Štěrbá M, Šimůnek T, Kaplanová J, Adamcová M, Mazurová Y, Geršl V. Otázka časné predikce antracyklinové kardiomyopatie na experimentálním in vivo modelu. *FOLIA PHOENIX* 2005, suppl. 1:38.

Štěrbá M, Adamcová M, Mazurová Y, Šimůnek T, Kaplanová J, Geršl V, Ponka P. A study of repeated 10 week administration of new iron chelating agent (pyridoxal o-chlorobenzoyl hydrazone) in rabbits in vivo. *FUNDAM. CLIN. PHARMACOL.* 2004; 14 (1 suppl):117.

Štěrbá M, Šimůnek T, Mazurová Y, Adamcová M, Kaplanová J, Čermáková E, Geršl V, Ponka P. Tolerability study of repeated administration of pyridoxal o-chlorobenzoyl hydrazone (a novel iron chelator) in rabbits. 7th International Symposium on Chelating Agents in Biomedicine, Toxicology and Therapeutic, Plzeň, 3. - 8.7. 2004. 2004; 8(2):60.

Štěrbá M, Klimtová I, Šimůnek T, Kaplanová J, Adamcová M, Mazurová Y, Ponka P, Geršl V. Otázka kardioprotektivního působení PIH (pyridoxal isonikotinoyl hydrazonu) i antracyklinové kardiomyopatie u králíků in vivo. *ČS. FYZIOL* 2003;52:A24.

Štěrbá M, Kaplanová J, Šimůnek T, Klimtová I, Mazurová Y, Adamcová M, Čermáková E, Hrdina R, Geršl V, Poňka P. The effects of iron chelators (pyridoxal isonicotinoyl hydrazone, salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone) on selected parameters in rabbits *BIOMARKERS AND ENVIROMENT. SUPP* 2003; 1:10-13.

Lenčo J, **Štěrbá M**, Brychta M, Mazurová Y, Popelová O, Geršl V and Stulík J. Proteomic analysis in the study of anthracycline-induced cardiomyopathy. *MOL CEL PROTEOMICS* 2006, 5 (10 supp.), S83.

Šimůnek T, **Štěrbá M**, Popelová O, Kaiserová H, Potáčová A, Adamcová M, Mazurová Y, Poňka P, Geršl V. Assesment of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) and its analogs as cardioprotectans in anthracycline-induced cardiomyopathy. 16th International conference on Chelators (ICOC). October 25-31, 2006, Limassol, Cyprus, Abstract book p. 53.

Popelová O, **Štěrbá M**, Potáčová A, Šimůnek T, Adamcová M, Mazurová Y, Poňka P, Geršl V. Iron chelation as promising strategy of cardioprotection against anthracycline-induced cardiotoxicity. France - New EU members 7th meeting, New Frontiers in Cardiovascular Research,

Debrecen 5th - 8th October 2006, Hungary. Abstract book p. 80.

Popelová O, **Štěrbá M**, Kovaříková P, Šimůnek T, Vávrová K, Poňka P, Geršl V. pilotní studie farmakokinetiky salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazonu a pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazonu. 56. Farmakologické dny. Bratislava 6.-8. 9. 2006, Slovenská republika. Sborník abstraktů z konference str. 28.

Popelová O, **Štěrbá M**, Kovaříková P, Adamcová M, Mazurová Y, Kaplanová J, Šimůnek T, Poňka P, Geršl V: Study of potential cardioprotective effects of a novel iron chelator (pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazon; o-108) in daunorubicin cardiotoxicity in rabbits. X. Vědecká konference LF a FN HK, Hradec Králové, 24. 4. 2006. Sborník abstraktů z konference.

Šimůnek T, **Štěrbá M**, Klímová I, Kaplanová J, Popelová O, Adamcová M, Mazurová Y, Hrdina R, Geršl V: Model srdečního selhání navozeného opakovanou aplikací antracyklinů u králíka. COR VASA. 2005; 47(9):K143.

Šimůnek T, **Štěrbá M**, Klímová I, Kaplanová J, Popelová O, Adamcová M, Mazurová Y, Hrdina R, Geršl V: Model srdečního selhání navozeného opakovanou aplikací antracyklinů u králíka. XXXI. Den mladých kardiologů, Praha, ČR, 28. 6. 2005;16-17. Sborník abstraktů z konference str. 89.

Šimůnek T, **Štěrbá M**, Popelová O, Boer C, Musters RJP, Poňka P, Geršl V. Iron chelation for protection against oxidative stress-induced myocardial injury. 1st Congress of the International Biology Society (BIOIRON 2005), Praha, 22. - 27. 5. 2005. Sborník abstraktu z konference str. 89.

Adamcová M, **Štěrbá M**, Šimůnek T, Potáčková A, Popelová O, Mazurová Y, Geršl V: Cardiac troponins as markers of myocardial damage in experimental studies. J MOL CELL CARDIOL. 2005; 38(6):1000.

Šimůnek T, **Štěrbá M**, Popelová O, Adamcová M, Holečková M, Geršl V: Treatment with dexrazoxane (ICRF-187) reduces myocardial calcium overload in the experimental anthracycline-induced heart failure in rabbits. J MOL CELL CARDIOL. 2005; 38(6):1067.

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

Šimůnek T, **Štěrbá M**, Holečková M, Kaplanová J, Adamcová M, Klímová I, Geršl V, Hrdina R. Myocardial profile of selected elements in experimental anthracycline-induced cardiomyopathy in rabbits. 6th meeting France - New CEE members-New Frontiers in Basic Cardiovascular Research, 24. – 27. 9.2004. Sborník abstraktů z konference str. 41.

Geršl V, **Štěrbá M**, Šimůnek T, Kaplanová J, Adamcová M, Klímová I, Čermáková E, Mazurová Y. Study of the effects of PIH in daunorubicin-induced cardiomyopathy in rabbits. CLIN EXP

PHARMACOL PHYSIOL 2004 suppl;31:A197.

Adamcová M, Štěrbá M, Šimůnek T, Geršl V, Kaplanová J, Mazurová Y, Poňka P. Cardiac troponin T levels following new iron chelator on a rabbit model of daunorubicin-induced cardiomyopathy. 6th meeting France - New CEE members-New Frontiers in Basic Cardiovascular Research, 24. – 27. 9.2004. Sborník abstraktů z konference str. 13.

Šimůnek T, Štěrbá M, Klímtová I, Kaplanová J, Mazurová Y, Adamcová M, Hrdina R, Geršl V, Čermáková E, Poňka P. Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone – a potent lipophilic iron chelator – reduces daunorubicin- induced toxicity in rabbits. 7th International Symposium on Chelating Agents in Biomedicine, Toxicology and Therapeutic, Plzeň, 3. - 8. 7. 2004. Sborník abstraktů z konference.

Šimůnek T, Štěrbá M, Holečková M, Kaplanová J, Klímtová I, Adamcová M, Geršl V, Hrdina R. Myocardial content of selected elements in experimental daunorubicin-induced cardiomyopathy in rabbits - effects of dexrazoxane pre-treatment. 7th International Symposium on Chelating Agents in Biomedicine, Toxicology and Therapeutic, Plzeň, 3. - 8.7. 2004. Sborník abstraktů z konference.

Potáčová A, Adamcová M, Štěrbá M, Popelová O, Šimůnek T, Mazurová Y, Geršl V.: Cardiac remodeling and the role of matrix metalloproteinases in chronic anthracycline cardiotoxicity. J MOL CELL CARDIOL. 2006; 40:1001.

Potáčová A, Adamcová M, Štěrbá M, Popelová O, Mazurová Y, Geršl V. Remodelace myokardu na modelu daunorubicinové kardiomyopatie. ČS. FYZIOL. 2005;54(4):213.

Šimůnek T, Adamcová M, Štěrbá M, Popelová O, Klímtová I, Hrdina R, Geršl V: Left ventricular contractility and cardiac troponin T plasma concentrations in experimental anthracycline-induced cardiomyopathy in rabbits. Joint International Meeting of the Physiological Society and FEPS, Bristol, UK, 20-23.7. 2005; Sborník abstraktů z konference str. 131P.

Adamcová M, Geršl V, Štěrbá M, Klímtová I, Šimůnek T. Changes of cardiac troponin T in daunorubicin-induced cardiomyopathy. J MUSCLE RES CELL MOTIL 2003;24:342.

Kovaříková P, Klimeš J, Štěrbá M, Popelová O, Mokřý M., Geršl V, Poňka P. Development of HPLC determination of a novel drug candidate -salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone – in rabbit plasma and its application to in vivo study. Pokroky v chromatografii a elektroforéze 2005 & Chiranal 2005, Olomouc, 7. - 10. 2. 2005. Sborník abstraktů z konference str. 79.

Kaiserová H, Šimůnek T, den Hartog, Štěrbá M, Schröterová L, Popelová O, Kvasničková E, Geršl V, Bast A. New Iron chelators in doxorubicin-induced cardiotoxicity. International Workshop on Anthracycline Cardiotoxicity: Molecular Mechanisms and Clinical Correlates. October 20th - 21th, 2006, Como (Italy), Abstract book p. 42-44.

Šimůnek T, Bouwman RA, Boer C, Štěrbá M, Geršl V, Hrdina R, Paulus W, de Lange JJ, Poňka

P, Musters RJP. The novel lipophilic iron chelator salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone protects cardiomyocytes against H₂O₂-induced mitochondrial depolarization 7th International Symposium on Chelating Agents in Biomedicine, Toxicology and Therapeutic, Plzeň, 3. - 8. 7. 2004. Sborník abstraktů z konference.

Šimůnek T, Musters RJP, Boer C, Poňka P, **Štěřba M**, Geršl V. Prevence poškození myokardu volnými kyslíkovými radikály pomocí různých chelátorů železa. ČS. FYZIOL. 2005; 54(4):212.

Adamcová M, Potáčová A, Šimůnek T, Kaiserová H, **Štěřba M**, Popelová O, Geršl V. Activation of matrix metalloproteinases following anthracycline exposure of H9C2 rat cardiomyoblasts. France - New EU members 7th meeting, New Frontiers in Cardiovascular Research, Debrecen 5th - 8th October 2006, Hungary, Abstract book p. 83.

Šimůnek T, Adamcová M, Kaiserová H, Potáčová A, **Štěřba M**, Popelová O, Kvasničková E, Geršl V. In vitro study of cardiac troponins as biochemical markers of anthracycline-induced cardiotoxicity. France - New EU members 7th meeting, New Frontiers in Cardiovascular Research, Debrecen 5th - 8th October 2006, Hungary, Abstract book p. 83.

Klimtová I, Šimůnek T, Hrdina R, Geršl V, Macháčková J, Mazurová Y, Kaplanová J, **Štěřba M**. Srovnání toxických účinků daunorubicinu a doxorubicinu po opakovaném podání u králíku. ČS. FYZIOL. 2001; 50 (4): 164.

E) Sdělení na sjezdech, konferencích a odborných akcích (celkem 47, z toho 20 zahraničních/ s mezinárodní účastí, jako první autor 14)

XI.
PŘÍLOHY

Přehled příloh dizertační práce

Příloha 1

Štěrbá M, Šimůnek T, Popelová O, Potáčková A, Adamcová M, Mazurová Y, Geršl V. Early detection of anthracycline cardiotoxicity in a rabbit model: left ventricle filling pattern versus troponin T determination. *Physiol Res*. 2007. Accepted 27. 9. 2006. In press.

Příloha 2

Šimůnek T, Štěrbá M, Holečková M, Kaplanová J, Klimtová I, Adamcová M, Geršl V, Hrdina R. Myocardial content of selected elements in experimental anthracycline-induced cardiomyopathy in rabbits. *Biometals* 2005 Apr;18(2):163-9.

Příloha 3

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

Příloha 4

Kovaříková P, Klimeš J, Štěrbá M, Popelová O, Geršl V, Poňka P. HPLC determination of a novel aroylhydrazone iron chelator (o-108) in rabbit plasma and its application to a pilot pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2006 Jul 11;838(2):107-12.

Příloha 5

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

Příloha 6

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

Příloha 7

Štěrbá M, Popelová O, Šimůnek T, Mazurová Y, Potáčková A, Adamcová M, Gunčová I, Kaiserová H, Palička P, Poňka P, Geršl V. Iron chelation-afforded cardioprotection against chronic anthracycline cardiotoxicity: a study of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH). *Toxicology* 2007. Accepted 13. 3. 2007. In press.

PŘÍLOHA 1

Štěrbá M, Šimůnek T, Popelová O, Potáčová A, Adamcová M, Mazurová Y, Holečková M, Geršl V.: **Early detection of anthracycline cardiotoxicity in a rabbit model: left ventricle filling pattern versus troponin T determination.** *Physiol Res.* 2007, in press.

Main title:

Early detection of anthracycline cardiotoxicity in a rabbit model: left ventricle filling pattern versus troponin T determination

Running title: Early detection of anthracycline cardiotoxicity in rabbits

M. ŠTĚRBA¹✉, T. ŠIMŮNEK², O. POPELOVÁ¹, A. POTÁČOVÁ³, M. ADAMCOVÁ³,
Y. MAZUROVÁ⁴, M. HOLEČKOVÁ⁵, V. GERŠL¹

Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Hradec Králové, ¹Department of Pharmacology, ³Department of Physiology, ⁴Department of Histology and Embryology and ²Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Biochemical Sciences and ⁵University Teaching Hospital in Hradec Králové, Department of Clinical Biochemistry and Diagnostics, Czech Republic

✉ Corresponding author: Martin Štěrba, Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Hradec Králové, Department of Pharmacology, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové 1, Czech Republic.

Tel.: +420 495 816 312; Fax: +420 495 518 509.

E-mail address: sterbam@lfhk.cuni.cz (M. Štěrba).

Summary

Anthracycline cardiotoxicity represents a serious risk of anticancer chemotherapy. The aim of the present pilot study was to explore and compare the potential of both the left ventricular (LV) filling pattern evaluation and cardiac troponin T (cTnT) plasma levels determination for the early detection of daunorubicin-induced cardiotoxicity in rabbits. The echocardiographic measurements of transmitral LV inflow as well as cTnT determinations were performed weekly for 10 weeks in daunorubicin (3 mg/kg weekly) and control groups (n=5, each). Surprisingly, no significant changes in LV-filling pattern were observed through the study, most likely due to the xylazine-containing anaesthesia, necessary for appropriate resolving of the E and A waves. In contrast, to the echographic measurement the dP/dt_{min} index obtained invasively at the end of the study revealed a significant impairment in LV relaxation, which was further supported by observed disturbances in myocardial collagen content and calcium homeostasis. However, at the same time cTnT plasma levels were progressively rising in the daunorubicin-treated animals from the 5th week ($0.024 \pm 0.008 \mu\text{g/l}$) until the end of experiment ($0.186 \pm 0.055 \mu\text{g/l}$). Therefore, in contrast to complicated non-invasive evaluation of diastolic function, cTnT is shown to be early and sensitive marker of anthracycline-induced cardiotoxicity in the rabbit model.

Keywords: daunorubicin, anthracyclines, cardiotoxicity, early detection, diastolic dysfunction, cardiac troponin T.

1. Introduction

Anthracycline antibiotics (e.g. doxorubicin, daunorubicin, epirubicin) are among the most effective chemotherapeutic agents in the treatment of both haematological and solid malignancies (Yee 2005 *et al.*, Chabner 2006 *et al.*). Cardiotoxicity, however, represents a serious adverse reaction that largely limits their therapeutic potential and threatens the cardiac function of cancer survivors. All anthracycline derivatives may induce cardiac damage that can result even in life-threatening complication of chemotherapy. The main risk is associated with their chronic administration, when severe cardiomyopathy and heart failure may develop later in the course or any time after completion of the treatment (Von Hoff *et al.* 1979, Hrdina *et al.* 2000, Gharib and Burnett 2002).

As the anthracycline-induced cardiotoxicity is largely irreversible, it is crucial to detect the myocardial injury at its earliest possible stage. Among the first approaches employed for sensitive and reliable detection of anthracycline cardiotoxicity was the endocardial biopsy. However, its invasive nature hinders and in fact nearly prevents its routine use in seriously sick oncologic patients. Actual recommendations for cardiac monitoring of anthracycline-treated patients are mostly based on the non-invasive examination of the left ventricular (LV) systolic function, since its decline is a well-known hallmark of anthracycline cardiotoxicity (Alexander *et al.* 1979, Shan *et al.* 1996, Tjeerdsma *et al.* 1999, Elbl *et al.* 2003, Elbl *et al.* 2005). Both echocardiography and radioventriculography are employed, however, relatively low sensitivity of these approaches do not allow covering the early phases of myocardial injury and therefore rather more pronounced and distinct cardiotoxicity can be revealed (Shan 1996 *et al.*, Tjeerdsma *et al.* 1999, Suter *et al.* 2002).

While the effect of anthracyclines on the systolic function and its prognostic value is well established, the status of diastolic function, which actually may precede the impairment in contractility, remains to be clarified. As the diastolic function can be estimated non-invasively by Doppler echocardiography, its serial evaluation is well feasible. Several clinical studies dealing with the assessment of the diastolic function in anthracycline-treated patients were carried out and resulted in rather variable and in some cases also contradictory outcomes (Marchandise *et al.* 1989, Ewer *et al.* 1994, Bu'Lock *et al.* 1999, Bossi *et al.* 2001, Clements *et al.* 2002, Nousiainen *et al.* 2002, Elbl *et al.* 2003, Nakamae *et al.* 2004). However, these findings could potentially be affected by

heterogeneity of patients (e.g. with respect to age, sex and anamnesis), dosage scheme, combination of chemotherapeutics, presence of chest irradiation, and the liquid load enhancing the excretion of metabolites. Interestingly, to our knowledge, there is no available data on the changes of the diastolic function in time obtained from a validated and well-reproducible experimental model of anthracycline-induced cardiomyopathy.

Apart from the examination of cardiac function, the modern advances in monitoring of chemotherapy-induced cardiotoxicity have brought the selective biochemical markers of cardiac injury into the focus. This approach theoretically might be of special value from the standpoint of early cardiotoxicity detection, since a low level release of myocardial biomolecules might be detected using sensitive analytical methods before any impairment of the heart function occurs (Petricoin *et al.* 2004). To date, probably the most interesting results have been described with cardiac troponins (Specchia *et al.* 2005, Adamcova *et al.* 2005, Lipshultz *et al.* 2004, Herman *et al.* 1998, Lipshultz *et al.* 1997) although other biochemical markers - e.g. natriuretic peptides - are also studied (Horacek *et al.* 2005, Koh *et al.* 2004). While both cardiac troponin T and I are at present firmly settled as biomarkers in the diagnosis of myocardial infarction, their potential role in the early diagnosis of chemotherapy-induced cardiotoxicity and particularly in its early stages is not completely understood yet.

Several clinical as well as experimental studies have reported rise of cardiac troponins during or after the anthracycline treatment (Herman 1998, Adamcova 2005). Moreover, some authors suggest that even subtle early elevations of cardiac troponins in plasma of anthracycline treated patients might predict occurrence of chronic or delayed cardiotoxicity (Cardinale 2004). However, the exact value of elevated cardiac troponins for diagnosis and reliable prediction of chronic or late anthracycline cardiotoxicity is not well established yet and it deserves further studies. So far, most studies have used only few different selected time points for troponin T determination, which offer only limited information and does not allow to fully understand the role of troponin T as a biomarker during the whole anthracycline treatment. To date, there is a lack of systematic longitudinal study examining troponin T levels before and periodically through out the period of the development of chronic anthracycline cardiotoxicity.

The aim of the present pilot study was therefore to explore and compare the potential of both the LV-filling pattern evaluation and plasma troponin T determination for an early detection of daunorubicin-induced cardiotoxicity in rabbits.

2. Material and methods

2.1. Experimental animals

Fifteen Chinchilla male rabbits (3.5-4.5 kg at the beginning of the study) were used in this study. They were housed under a 12h light cycle, constant temperature and humidity. The animals had free access to water and a standard laboratory pellet diet. The animal experiments were performed in accordance with the “Guide for the care and use of laboratory animals“ (1996) and under the supervision of the Ethical Committee of the Medical Faculty in Hradec Králové.

2.2. Experimental design

In this study both the LV-filling pattern and plasma levels of troponin T were examined weekly in the daunorubicin and control groups (n=5, each) during 10 weeks. For appropriate evaluation of all parameters of the LV-filling the combined anaesthetic regimen (ketamine+xylazine) used by others for this purpose (Rungwerth *et al.* 2004; Nagueh *et al.* 2000; Litwin *et al.* 1994) had to be employed. However, since xylazine itself may have certain haemodynamic effects, another group of animals examined under ketamine alone (the ketamine group, n=5) was introduced to the study. The daunorubicin group was injected with daunorubicin (3 mg/kg, once weekly for 10 weeks) in a validated schedule for induction of daunorubicin cardiomyopathy (Gersl and Hrdina 1994; Simunek *et al.* 2004). Control and ketamine groups were receiving saline (2 ml/kg, once weekly, 10 weeks).

Blood for cardiac troponin T analysis was sampled weekly immediately after the Doppler measurements. The heart rate was determined from ECG. Body weight gain at the end of the study was determined. At the end of the experiment (i.e. 4 – 5 days after the last administration), invasive haemodynamic measurements were performed. The animals had been killed with pentobarbital overdose and their hearts were excised. The removed hearts underwent histological as well as biochemical examination.

2.3. Echocardiography

Since the echographic examination is unfeasible in conscious rabbits, the animals were anaesthetized with injectable anaesthetics. The ketamine group was anaesthetised with ketamine alone (50 mg/kg, i.m.), while in the control and daunorubicin groups combined anesthesia was used (ketamine 50 mg/kg + xylazine 2 mg/kg, i.m.). After the appropriate depth of anaesthesia was reached (approx. 10 min), the rabbits were placed on

the table on the left lateral decubitus. The echocardiograms were obtained using a GE Vingmed CFM 800 apparatus (GE Vingmed Ultrasound, Norway) equipped with a 7.5 MHz standard paediatric probe. The apical four-chamber view was obtained by means of the left parasternal approach. The HPRF (High Pulse Repetition Frequency) mode of pulse-wave Doppler imagining was used to study the LV- filling. The mitral inflow was recorded through a sample volume of 1.2 mm placed at the tips of the mitral valve leaflets. Evaluated parameters (peak filling rates of E and A wave, acceleration and deceleration times) were determined from 3-5 cardiac cycles, while at least 3 different Doppler recordings were obtained during each examination.

2.4. Invasive haemodynamic measurements

In pentobarbital anaesthesia, the left carotid artery was prepared and a PE catheter (length 300 mm, inner diameter 1.0 mm), filled-in with heparinized (10 IU/ml) saline was introduced into the left heart ventricle. After a 15-minute equilibration period, the measurement of the following parameters was performed: the heart rate (HR), maximal rate of the pressure rise in the isovolumic phase of the systole (the maximum of the first derivative of LV pressure - dp/dt_{max}) and the maximal rate of pressure decline in the isovolumic phase of diastole (the minimum of the first derivative of LV pressure - dp/dt_{min}). Arterial blood pressure (BP) measurement was performed using another PE catheter inserted into the right femoral artery. An ADI PowerLab 8SP apparatus (Adinstruments, Australia) with appropriate transducers and the software CHART for Windows 3.4.11 were used for pressure measurements, their differentiation and recording.

2.5. Plasma levels of cardiac troponin T

Concentrations of cardiac troponin T (cTnT) were determined in heparinized plasma samples using an Elecsys Troponin T STAT Immunoassay on an Elecsys 2010 immunoassay analyzer (Roche, Switzerland) according to the manufacturer's instructions. This third-generation assay is based on electrochemiluminescence immunoassay technology (ECLIA) using two mouse monoclonal antibodies in a sandwich format (two step assay). These antibodies show no cross reactivity with skeletal TnT for concentrations up to 1000 mg/ml (0.005%). The detection limit for the cTnT determination was 0.010 $\mu\text{g/l}$ and values below this detection limit were considered to be zero.

2.6. Biochemical analysis of LV samples

Samples taken from the identical parts of the LV of the excised hearts were dried and after cooling period they were weighed and digested by microwave digestion with nitric acid and hydrogen peroxide. The total calcium content in the prepared samples was measured photometrically using flame photometry (Eppendorf, Efox 5053, Germany). Results are expressed as $\mu\text{g/g}$ of dry tissue.

The collagenous proteins of the LV myocardium were determined as hydroxyproline concentration with an adjustment by factor 7.46 as previously described (Pelouch *et al.* 1995). Hydroxyproline concentration was measured as follows: homogenates of myocardial tissue (6.3%) were hydrolyzed with the equal volume of 4.2 mol/l NaOH at 120 °C for 20 min. Oxidation of the hydrolyzate (0.1 ml) was started with the addition of chloramine-T reagent (0.9 ml) at 25 °C and was stopped after 50 min by adding Ehrlich's aldehyde reagent (1.0 ml). After incubation of samples at 65 °C for 20 minutes the absorbance of developed chromophore was read at 550 nm.

2.7. Histological examination

After macroscopic examination, the heart was dissected and the tissue blocks of the transversely sectioned left and right cardiac ventricles and left atrium (incl. auricle) were taken for histological examination. The material was fixed by immersion in 4 % formaldehyde for 5 – 7 days. Paraffin sections (6 μm thick) were stained with haematoxylin-eosin and Masson's blue trichrome. Photomicrographs were made with a Lucia G software version 4.51 (Laboratory Imaging, Prague, Czech Republic). A six-point scale (Score 0 - 5) for the semiquantitative evaluation of histopathological changes in the myocardium was used as previously described (Simunek *et al.* 2004).

2.8. Statistical analysis

All results are expressed as mean \pm S.E.M. The statistical software SigmaStat for Windows 3.0 (Jandel, Germany) was used in this study. Significances of the differences were estimated using the One Way ANOVA unpaired test (comparison between groups) or the Paired t-test (comparison with the initial value within one group). The data without a normal distribution were evaluated using the nonparametric tests: Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks and Wilcoxon Signed Rank Test.

3. Results

3.1. General toxicity

One premature death was observed in the daunorubicin group (in the 7th week). All animals in the control and ketamine groups survived until the end of the experiment. With respect to the initial body weights (control group = 4.04 ± 0.14 kg, daunorubicin group = 3.81 ± 0.11 kg, ketamine group = 4.04 ± 0.24 kg), a significant increase of this parameter was observed at the end of the study in the ketamine (111.54 ± 2.62 %, $p < 0.05$) and control (117.18 ± 2.06 %, $p < 0.05$) groups, while in the daunorubicin group it remained unchanged (98.97 ± 7.33 %, n.s.). The final body weights in the daunorubicin group were also statistically lower than those determined in the control group ($p < 0.05$).

3.2. LV-filling pattern assessed by echocardiography

The parameters of transmitral inflow were evaluated serially weekly, for 10 weeks, in two groups of rabbits (daunorubicin and control) anaesthetised with the combined ketamine – xylazine regimen as well as in the ketamine group, where ketamine only anaesthesia was employed. The results are summarised in Fig. 2 (E-wave, A-wave, E/A) and Fig. 3 (acceleration time, deceleration time). No significant changes in any parameter were observed in the control group. Surprisingly, no significant trend in any parameter could be recognized also in the daunorubicin group, either in a comparison with the beginning of the experiment or in a comparison with the control group. Only few significant - however inconsistent - changes were observed in the daunorubicin group in comparison with the control group and no clear tendency could be distinguished. Unlike in control and daunorubicin groups, where typical biphasic filling was observed (Fig. 1B), only a one high peak was observed in ketamine group (Fig. 1A) - despite the maximal horizontal sweep setting. Therefore, here one could determine only the maximal peak-filling rate (E) and its acceleration and deceleration times. In comparison with both other groups, markedly different values were obtained in these parameters during the whole experiment, while only few other significant changes were noted (elevation of the maximal peak filling rate in the 7th week and a moderate decrease in deceleration time in the 7th and 8th weeks).

3.3. Invasive haemodynamic measurements

At the end of the study, the invasive haemodynamic measurements were performed. The parameters of the LV-relaxation (dp/dt_{\min}) and contractility (dp/dt_{\max}) are shown in Fig. 4. A significantly lower dp/dt_{\min} was determined in the daunorubicin group in

comparison with the control group. However, an even more prominent difference in dP/dt_{min} was apparent between the control and ketamine groups, which suggest a significant impact of xylazine on this parameter. Furthermore, Fig. 4 clearly demonstrates the significantly lower LV contractility (dP/dt_{max}) in the daunorubicin group as compared to the control group. Other haemodynamic parameters are summarised in Table 1. Although the mean heart rate was rather lower in the daunorubicin than in the control group, this did not reach statistical significance, whereas the difference in blood pressure was more prominent and significant. Importantly, both the latter parameters were significantly lower in the control group (combined anaesthesia) than in the ketamine group, which again points out the profound haemodynamic effect of xylazine.

3.4. Plasma levels of cardiac troponin T

Plasma cTnT levels in both the control and the ketamine groups were almost completely below the detection limit (i.e. $<0.010 \mu\text{g/l}$). Only a slight elevation above this limit was witnessed in few rare cases. In contrast, a marked progressive rise of cTnT levels was observed in the daunorubicin group commencing with the 3-4th week and reaching the statistical significance in the 5th week (Fig. 5).

3.5. Biochemical analysis of LV samples

The myocardial content of total calcium in the LV samples was determined to be 10.25 ± 1.36 , 10.60 ± 0.67 , and $15.79 \pm 2.05 \mu\text{g/g}$ of dry tissue for ketamine, control, and daunorubicin groups, respectively. While very close values of total myocardial calcium were observed in the ketamine and control groups, a statistically significant elevation of total calcium concentration was found in the daunorubicin group.

The total amount of collagen (i.e. both soluble and insoluble) in the LV myocardium was significantly higher in the daunorubicin group ($19.74 \pm 0.79 \text{ mg/g}$ wet weight) than in the control and ketamine groups (14.43 ± 0.37 and $12.95 \pm 1.4 \text{ mg/g}$ wet weight, respectively).

3.6. Histological examination

In the LV myocardium obtained at the end of experiment from the ketamine and control groups (Fig. 6 A,B), only weak signs of myocardial changes were detected. Only several scattered myocytes appeared to have increased eosinophilia of the cytoplasm, disintegration of myofibrils or pyknotic nuclei - Score 1. These changes were also

observed in other parts of the heart wall without apparent local differences. On the contrary, a massive injury with the foci of necrotic cardiomyocytes, followed by a conspicuous macrophagic infiltrate (Score 3), and signs of progressive interstitial fibrosis (Score 4) were observed in the LV myocardium of all animals treated with daunorubicin (Fig. 6C). The most intensive morphological changes (particularly with respect to fibrosis) were observed in the LV free wall. Similar findings with somewhat lower incidence were also witnessed in the cardiac septum. The right ventricle wall was distinctly less damaged in this way. In the left atrium wall, the foci of scattered necrotic cardiomyocytes prevailed but no granular or fibrotic tissue was observed.

4. Discussion

Introduction of anthracycline antibiotics in the late 1960s represented one of the most important breakthroughs in modern oncology. Unfortunately, the risk of potentially fatal cardiomyopathy and heart failure remains to represent a major complication with potentially severe consequences. The early detection of anthracycline cardiomyopathy is therefore crucial for patient's prognosis, since timely intervention (discontinuation of anthracycline treatment or indication of the cardioprotective agent - dexrazoxane) may allow preserving of both myocardial integrity and function.

In our previous experiments, we have demonstrated that repeated 10-week daunorubicin administration (3 mg/kg weekly) is able to induce marked cardiomyopathy and impairment of systolic function in rabbits. However, the decline in the LV ejection fraction was significant only by the end of the 10-week experiment (Simunek *et al.* 2004). These findings correspond with rather lower sensitivity of the echographically-estimated ejection fraction (Shan *et al.* 1996). Therefore, the present study was designed to systematically investigate and compare the feasibility and utility of two independent approaches (echographically examined LV filling pattern and plasma levels of troponin T) for early determination of anthracycline-induced cardiotoxicity in rabbits. In this study, we show that relatively high heart rate (though physiological in this species) makes Doppler evaluation of the LV-filling troublesome. As we also attempted to perform the Doppler measurements using other anaesthetics (e.g. a benzodiazepine midazolam) instead of ketamine without any improvement, wrong anesthesia cannot be blamed from this complication (unpublished results). In contrast, combinational anaesthetic regimen containing xylazine improved significantly the quality of Doppler recordings of transmitral

inflow and the typical biphasic pattern has been reached (Fig. 1B). This improved quality of the recordings was obtained only at the expense of profound changes in the heart rate as well as other key cardiovascular variables (Table 1). Interestingly, this combination of injectable anaesthetics is, indeed, quite frequently used in experimental research and it can be also found in numerous echocardiographic studies performed on rabbits, rats and mice (Rungwerth *et al.* 2004; Bull *et al.* 2003; Derumeaux *et al.* 2002; Chaves *et al.* 2001; Teraoka *et al.* 2000; Tokudome *et al.* 2000; Nagueh *et al.* 2000; Pennock *et al.* 1997; Hoit *et al.* 1995; Litwin *et al.* 1994; Young *et al.* 1990).

In this study, we followed for the first time the LV-filling pattern in animals treated with daunorubicin in a standard schedule used for the induction of anthracycline cardiomyopathy. Surprisingly, no significant consistent changes in any parameter evaluated (E, A, E/A, acceleration time, deceleration time) could be observed during the whole study. With few rare exceptions, these values were similar to those in the control group. These results are also comparable to those referred for control groups in the literature (Rungwerth *et al.* 2004; Nagueh *et al.* 2000). Despite of the negative findings of the echographic part of this study, the diastolic dysfunction was clearly proved by more sensitive invasive measurement performed at the end of the study - the dP/dt_{min} index (maximal rate of pressure decline in the isovolumic phase of diastole) was significantly reduced (Fig. 4). The invasiveness of this approach, however, markedly complicates the practical employment of this method and therefore its potential repeated use in clinical setting is, indeed, virtually unfeasible. The discrepancy observed between the non-invasive and invasive evaluation of the LV diastolic function in the present experiment is supposed to be likely related to the lower sensitivity and specificity of the Doppler measurement of the LV-filling together with the confounding effects of xylazine-containing anaesthesia, which significantly altered the hemodynamic parameters.

Our previous findings (Simunek *et al.* 2004) as well as other indices from this study strongly support the validity of the results of invasive measurements pointing out the significant abnormality in the diastolic function. The impairment in lusitropic properties of LV is known to be dependent on both myocyte component (represented mainly by calcium handling abnormality) and non-myocyte component (connective tissue proliferation creating the basis for myocardial fibrosis) (Katz 2001). In the present study, the biochemical analysis of LV samples obtained from daunorubicin treated animals revealed both significant impairment of total myocardial calcium content and marked elevation of the amount of collagenous proteins, which was also documented histologically (Fig. 6).

Other morphological findings well documented typical left ventricular myocardial injury induced by chronic anthracycline treatment and are well in line with previous reports (Herman 1985, Simunek 2004).

In contrast to numerous complications experienced with serial evaluations of the LV- filling pattern, the troponin T plasma level determination is shown to be easy to obtain and a very sensitive marker of daunorubicin-induced cardiotoxicity. These experiments were first to systematically study the elevations of troponin T in plasma through out the whole course of development of anthracycline cardiotoxicity. We have experienced detectable elevations above the detection limit already since the 3-4th week (i.e. at cumulative dose of daunorubicin $\approx 100-150 \text{ mg/m}^2$), while commencing with the 5th week, the rise of this marker became statistically significant (cumulative dose of daunorubicin $\approx 200 \text{ mg/m}^2$). The progressive increase in cTnT levels well corresponds with the successive nature of chronic anthracycline cardiotoxicity, where the cardiac risk depends on the cumulative dose (von Hoffa *et al.* 1979). Our results thus suggest that - at least in our experimental conditions - troponin T is the earliest and very useful marker of cardiac toxicity induced by daunorubicin. Moreover, troponin T is a marker which may find applicability in other laboratory animal species (e.g. mouse, rat) employed for the modelling of anthracycline cardiotoxicity and evaluation of potential cardioprotectants (Wallace *et al.* 2004, Adamcova *et al.* 2005) and, indeed, it can be also used in the clinical practice.

In conclusion, using the standard echocardiography equipment, Doppler evaluation of the LV-filling pattern in rabbits seems to be complicated within the physiological heart rate. Xylazine-containing anaesthesia enables high quality evaluation of diastolic filling in this species; this approach, however, does not have a predictive value for the development of myocardial damage induced by daunorubicin. In contrast to the Doppler assessment of diastolic function, cardiac troponin T was shown to be a sensitive marker of early daunorubicin cardiotoxicity, which may be used in different animal species as well as in clinical practice. Therefore, cTnT deserves further experimental as well as clinical research as a biomarker of anthracycline-induced cardiotoxicity.

Acknowledgements

The authors would like to thank Mrs. L. Koželuhová for her skilful technical assistance during the whole study and Assoc Prof. B. Mánek for his kind review of English. This study was supported by the Research Project of the Czech Ministry of Education Youth and Sports MSM0021620820.

References

- ADAMCOVA M, GERSL V, HRDINA R, MELKA M, MAZUROVA Y, VAVROVA J, PALICKA V, KOKSTEIN Z. Cardiac troponin T as a marker of myocardial damage caused by antineoplastic drugs in rabbits. *J Cancer Res Clin Oncol* **125**: 268-274, 1999.
- ADAMCOVA M, ŠTERBA M, ŠIMUNEK T, POTACOVA A, POPELOVA O, MAZUROVA Y, GERSL V: Troponin as a marker of myocardial damage in drug-induced cardiotoxicity. *Expert Opin Drug Saf* **4**: 457-472, 2005.
- ALEXANDER J, DAINIAK N, BERGER HJ, GOLDMAN L, JOHNSTONE D, REDUTO L, DUFFY T, SCHWARTZ P, GOTTSCHALK A, ZARET BL. Serial assessment of doxorubicin cardiotoxicity with quantitative radionuclide angiography. *N Engl J Med* **300**:278-83, 1979.
- BOSSI G, LANZARINI L, LAUDISA ML, KLERSY C, RAISARO A, ARICO M: Echocardiographic evaluation of patients cured of childhood cancer: a single center study of 117 subjects who received anthracyclines. *Med Pediatr Oncol* **36**: 593-600, 2001.
- BU'LOCK FA, MOTT MG, OAKHILL A, MARTIN RP: Left ventricular diastolic filling patterns associated with progressive anthracycline-induced myocardial damage: A prospective study. *Pediatr Cardiol* **20**: 252-263, 1999.
- BULL DA, BAILEY SH, RENTZ JJ, ZEBRACK JS, LEE M, LITWIN SE, KIM SW: Effect of Terplex/VEGF-165 gene therapy on left ventricular function and structure following myocardial infarction. VEGF gene therapy for myocardial infarction. *J Control Release* **93**: 175-181, 2003.
- CARDINALE D, SANDRI MT, COLOMBO A, COLOMBO N, BOERI M, LAMANTIA G, CIVELLI M, PECCATORI F, MARTINELLI G, FIORENTINI C, CIPOLLA CM: Prognostic value of troponin I in cardiac risk stratification of cancer patients undergoing high-dose chemotherapy. *Circulation* **109**:2749-2754, 2004.
- CHAVES AA, WEINSTEIN DM, BAUER JA: Non-invasive echocardiographic studies in mice: influence of anesthetic regimen. *Life Sci* **69**: 213-222, 2001.
- Chabner BA, Amrein PC, Druker B, Michaelson MD, Mitsiades CS, Gross PE, Ryan DP, Ramachandra S, Richardson PG, Supko, Wilson WH. Antineoplastic Agents. In: *Goodman & Gillman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*. BURTON LL, LAZO JS, PARKER KL, The McGraw-Hill Companies, New York, 2006, pp 1315-1404.
- CLEMENTS IP, DAVIS BJ, WISEMAN GA: Systolic and diastolic cardiac dysfunction early after the initiation of doxorubicin therapy: significance of gender and concurrent mediastinal radiation. *Nucl Med Commun* **23**: 521-527, 2002.
- DERUMEAUX G, MULDER P, RICHARD V, CHAGRAOUI A, NAFEH C, BAUER F, HENRY

JP, THUILLEZ C: Tissue Doppler imaging differentiates physiological from pathological pressure-overload left ventricular hypertrophy in rats. *Circulation* **105**:1602-1608, 2002.

ELBL L, HRSTKOVA H, TOMASKOVA I, BLAZEK B, MICHALEK J. Long-term serial echocardiographic examination of late anthracycline cardiotoxicity and its prevention by dexrazoxane in paediatric patients. *Eur J Pediatr* **164**: 678-84, 2005

ELBL L, HRSTKOVA H, CHALOUPKA V. The late consequences of anthracycline treatment on left ventricular function after treatment for childhood cancer. *Eur J Pediatr* **162**: 690-6, 2003.

EWER MS, ALI MK, GIBBS HR, SWAFFORD J, GRAFF KL, CANGIR A, JAFFE N, THAPAR MK: Cardiac diastolic function in pediatric patients receiving doxorubicin. *Acta Oncol* **33**: 645-649, 1994.

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

GHARIB MI, BURNETT AK: Chemotherapy-induced cardiotoxicity: current practice and prospects of prophylaxis. *Eur J Heart Fail* **4**: 235-242, 2002.

HOIT BD, KHOURY SF, KRANIAS EG, BALL N, WALSH RA: In vivo echocardiographic detection of enhanced left ventricular function in gene-targeted mice with phospholamban deficiency. *Circ Res* **77**: 632-637, 1995.

HERMAN EH, EL-HAGE AN, FERRANS VJ, ARDALAN B. Comparison of the severity of the chronic cardiotoxicity produced by doxorubicin in normotensive and hypertensive rats. *Toxicol Appl Pharmacol* **78**:202-214, 1985.

HERMAN EH, LIPSHULTZ SE, RIFAI N, ZHANG J, PAPOIAN T, YU ZX, TAKEDA K, FERRANS VJ. Use of cardiac troponin T levels as an indicator of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Cancer Res* **58**: 195-7, 1998.

HORACEK JM, PUDIL R, TICHY M, JEBAVY L, STRASOVA A, PRAUS R, ZAK P, MALY J. The use of biochemical markers in cardiotoxicity monitoring in patients treated for leukemia. *Neoplasma* **52**: 430-4, 2005.

HRDINA R, GERSL V, KLIMTOVA I, SIMUNEK T, MACHACKOVA J, ADAMCOVA M: Anthracycline-induced cardiotoxicity. *Acta Medica (Hradec Kralove)* **43**: 75-82, 2000.

JENSEN BV, SKOVSGAARD T, NIELSEN SL: Functional monitoring of anthracycline cardiotoxicity: a prospective, blinded, long-term observational study of outcome in 120 patients. *Ann Oncol* **13**: 699-709, 2002.

KATZ, A.M.: Physiology of the heart. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2001.

KOH E, NAKAMURA T, TAKAHASHI H. Troponin-T and brain natriuretic peptide as predictors for adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Circ J* **68**:163-7, 2004.

LITWIN SE, KATZ SE, MORGAN JP, DOUGLAS PS: Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat. *Circulation* **89**: 345-354, 1994.

LIPSHULTZ SE, RIFAI N, DALTON VM, LEVY DE, SILVERMAN LB, LIPSITZ SR, COLAN SD, ASSELIN BL, BARR RD, CLAVELL LA, HURWITZ CA, MOGHRABI A, SAMSON Y, SCHORIN MA, GELBER RD, SALLAN SE: The effect of dexrazoxane on myocardial injury in doxorubicin-treated children with acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* **351**:145-53, 2004.

LIPSHULTZ SE, RIFAI N, SALLAN SE, LIPSITZ SR, DALTON V, SACKS DB, OTTLINGER ME. Predictive value of cardiac troponin T in pediatric patients at risk for myocardial injury. *Circulation* **96**:2641-8, 1997.

MARCHANDISE B, SCHROEDER E, BOSLY A, DOYEN C, WEYNANTS P, KREMER R, POULEUR H: Early detection of doxorubicin cardiotoxicity: interest of Doppler echocardiographic analysis of left ventricular filling dynamics. *Am Heart J* **118**: 92-98, 1989.

MINOTTI G, MENNA P, SALVATORELLI E, CAIRO G, GIANNI L: Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* **56**: 185-229, 2004.

NAGUEH SF, KOPELEN HA, LIM DS, ZOGHBI WA, QUINONES MA, ROBERTS R, MARIAN AJ: Tissue Doppler imaging consistently detects myocardial contraction and relaxation abnormalities, irrespective of cardiac hypertrophy, in a transgenic rabbit model of human hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* **102**: 1346-1350, 2000.

NAKAMAE H, TSUMURA K, AKAHORI M, TERADA Y, YAMANE T, HAYASHI T, SAITO I, KANEKO M, OKAMOTO N, ICHIHARA Y, OHTA K, HINO M: QT dispersion correlates with systolic rather than diastolic parameters in patients receiving anthracycline treatment. *Intern Med* **43**: 379-387, 2004.

NOUSIAINEN T, VANNINEN E, JANTUNEN E, PUUSTINEN J, REMES J, RANTALA A, VUOLTEENAHO O, HARTIKAINEN J: Natriuretic peptides during the development of doxorubicin-induced left ventricular diastolic dysfunction. *J Intern Med* **251**: 228-234, 2002.

PELOUCH V, MILEROVA M, OSTADAL B, HUCIN B, SAMANEK M: Differences between atrial and ventricular protein profiling in children with congenital heart disease. *Mol Cell Biochem* **147**: 43-49, 1995.

PENNOCK GD, YUN DD, AGARWAL PG, SPOONER PH, GOLDMAN S: Echocardiographic

changes after myocardial infarction in a model of left ventricular diastolic dysfunction. *Am J Physiol* **273**: H2018-29, 1997.

Petricoin EF, Rajapaske V, Herman EH, Arekani AM, Ross S, Johann D, Knapton A, Zhang J, Hitt BA, Conrads TP, Veenstra TD, Liotta LA, Sistare FD. Toxicoproteomics: serum proteomic pattern diagnostics for early detection of drug induced cardiac toxicities and cardioprotection. *Toxicol Pathol* **32**: 122-30, 2004.

RUNGWERTH K, SCHINDLER U, GERL M, SCHAFFER S, LICHER T, BUSCH AE, RUETTEN H: Inhibition of Na⁺-H⁺ exchange by cariporide reduces inflammation and heart failure in rabbits with myocardial infarction. *Br J Pharmacol* **142**: 1147-1154, 2004.

SHAN K, LINCOFF AM, YOUNG JB: Anthracycline-induced cardiotoxicity. *Ann Intern Med* **125**: 47-58, 1996.

SIMUNEK T, KLIMTOVA I, KAPLANOVA J, MAZUROVA Y, ADAMCOVA M, ŠTERBA M, HRDINA R, GERSL V: Rabbit model for in vivo study of anthracycline-induced heart failure and for the evaluation of protective agents. *Eur J Heart Fail* **6**: 377-387, 2004.

SPECCHIA G, BUQUICCHIO C, PANSINI N, DI SERIO F, LISO V, PASTORE D, GRECO G, CIUFFREDA L, MESTICE A, LISO A. Monitoring of cardiac function on the basis of serum troponin I levels in patients with acute leukemia treated with anthracyclines. *J Lab Clin Med* **145**: 212-20, 2005.

SUTER TM, MEIER B. Detection of anthracycline-induced cardiotoxicity: is there light at the end of the tunnel? *Ann Oncol* **13**:647-9, 2002.

TERAOKA K, HIRANO M, YAMAGUCHI K, YAMASHINA A: Progressive cardiac dysfunction in adriamycin-induced cardiomyopathy rats. *Eur J Heart Fail* **2**: 373-378, 2000.

TJEERDSMA G, MEINARDI MT, VAN DER GRAAF WT, VAN DEN BERG MP, MULDER NH, CRIJNS HJ, DE VRIES EG, VAN VELDHUISEN DJ. Early detection of anthracycline induced cardiotoxicity in asymptomatic patients with normal left ventricular systolic function: autonomic versus echocardiographic variables. *Heart* **81**:419-23, 1999.

TOKUDOME T, MIZUSHIGE K, NOMA T, MANABE K, MURAKAMI K, TSUJI T, NOZAKI S, TOMOHIRO A, MATSUO H: Prevention of doxorubicin (adriamycin)-induced cardiomyopathy by simultaneous administration of angiotensin-converting enzyme inhibitor assessed by acoustic densitometry. *J Cardiovasc Pharmacol* **36**: 361-368, 2000.

VON HOFF DD, LAYARD MW, BASA P, DAVIS HL JR, VON HOFF AL, ROZENCWEIG M, MUGGIA FM: Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. *Ann Intern Med* **91**: 710-717, 1979.

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

YEE GC: Oncologic Disorders. In: *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*. DiPiro JT, Talbert RL, Yee GC, Matzke GR, Wells BG, Posey MI (Eds), The McGraw-Hill Companies, New York, 2005, pp 2279-558.

YOUNG MS, MAGID NM, WALLERSON DC, GODWEIT RS, DEVEREUX RB, CARTER JN, IM J, HALL MA, BORER JS: Echocardiographic left ventricular mass measurement in small animals: anatomic validation in normal and aortic regurgitant rabbits. *American Journal of Noninvasive Cardiology* **4**: 145 - 153, 1990.

Table 1 Heart rate and blood pressure at the end of the study

	HR (min⁻¹)	BP (mmHg)
ketamine	298 ± 8	96 ± 6
control	206 ± 14 k	75 ± 8 k
daunorubicin	178 ± 23	51 ± 2 c

HR = heart rate, BP = mean arterial blood pressure. Statistical significance (ANOVA, $p < 0.05$) in comparison with the control group - "c" and the ketamine group - "k".

Figure legends

Fig. 1: Left ventricular transmitral inflow in rabbits – anaesthetized with a) ketamine 50 mg/kg or b) a combination of ketamine 50 mg/kg and xylazine 2 mg/kg. “E” – early (passive) and “A” – latter (active) component of the left ventricular filling.

Fig. 2: Peak filling rates of the passive and active components of the left ventricular filling and their ratio during the experiment. “E – wave” - early, passive component, “A – wave” - latter, active component, and E/A - ratio of both peak filling rates. Statistical significance – “*” in comparison with the initial values within each group (paired t-test, $p < 0.05$) and “c” with the control group (ANOVA, $p < 0.05$).

Fig. 3: Acceleration and deceleration times during the experiment. Statistical significance – “*” in comparison with the initial values within each group (paired t-test, $p < 0.05$) and “c” with the control group (ANOVA, $p < 0.05$).

Fig. 4: Maximal rate of pressure decline in the isovolumic phase of diastole (dp/dt_{min}) and maximal rate of the pressure rise in the isovolumic phase of the systole (dp/dt_{max}) determined invasively at the end of the study. Statistical significance (ANOVA, $p < 0.05$), “n.s.” – not significant.

Fig. 5: Cardiac troponin T plasma concentrations in the time-course of the study. Statistical significance – “*” in comparison with the initial values within each group (paired t-test, $p < 0.05$) and “c”, “k” with the control group and ketamine group (ANOVA, $p < 0.05$), respectively.

Fig. 6: Histological examination of the left ventricular myocardium.

In both saline-receiving groups: ketamine (Fig A) and control (Fig B), increased eosinophilia of cytoplasm (E – homogeneously eosinophilic cells; X – eosinophilic strips in the cytoplasm of myocytes), woven myocytes (W) and some scattered pyknotic nuclei (arrows) are the only present changes (score 1). C – normal cardiomyocytes. In a sharp contrast, repeated administration of daunorubicin (Fig C) causes a massive injury of the myocardium (score 4). The number of intensely eosinophilic cells (E) decreases whereas the foci of necrotic (N) cardiomyocytes, followed by a conspicuous macrophagic infiltrate

(M), markedly increase in size and number. Healing process, i.e. the progressive interstitial fibrosis subsequently develops in this group. At first, the granulation tissue appears that mature to fibrotic tissue (marked by bundles of collagen fibers – F1). Finally, fibrotic scars of different size may also develop (F2). Masson's blue trichrome. Bar 30 μm .

Fig. 1

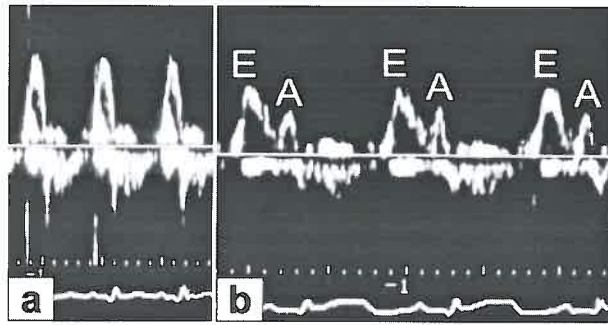


Fig. 2

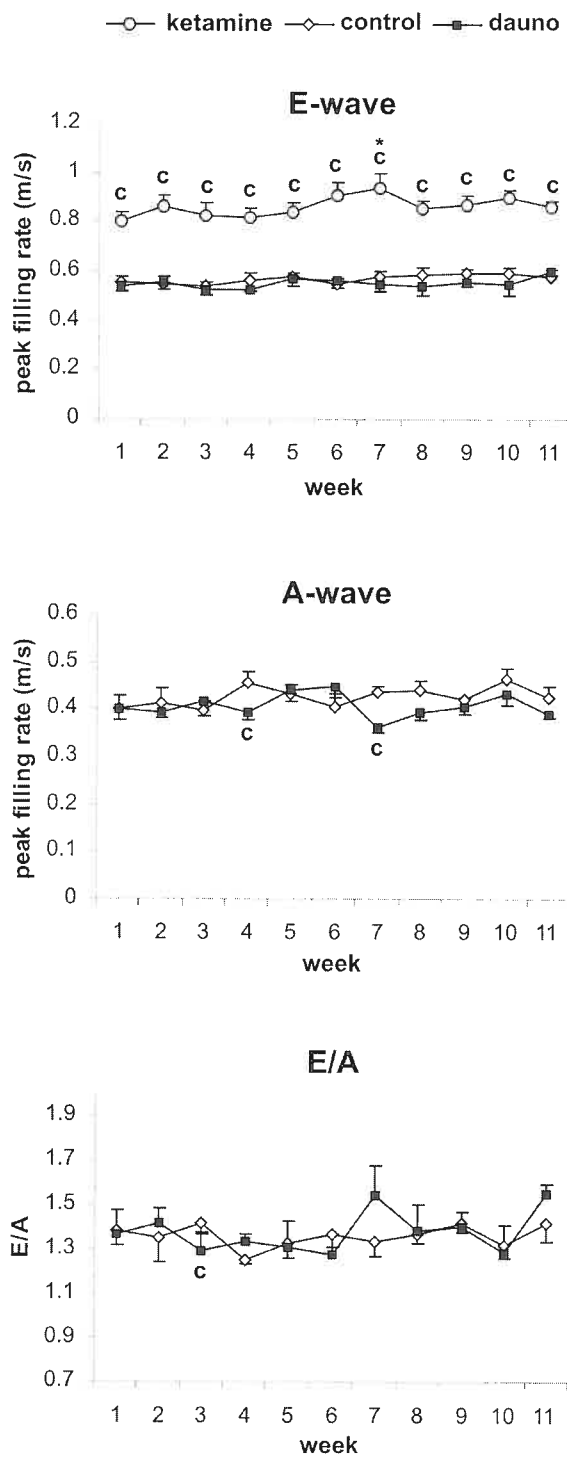


Fig. 3

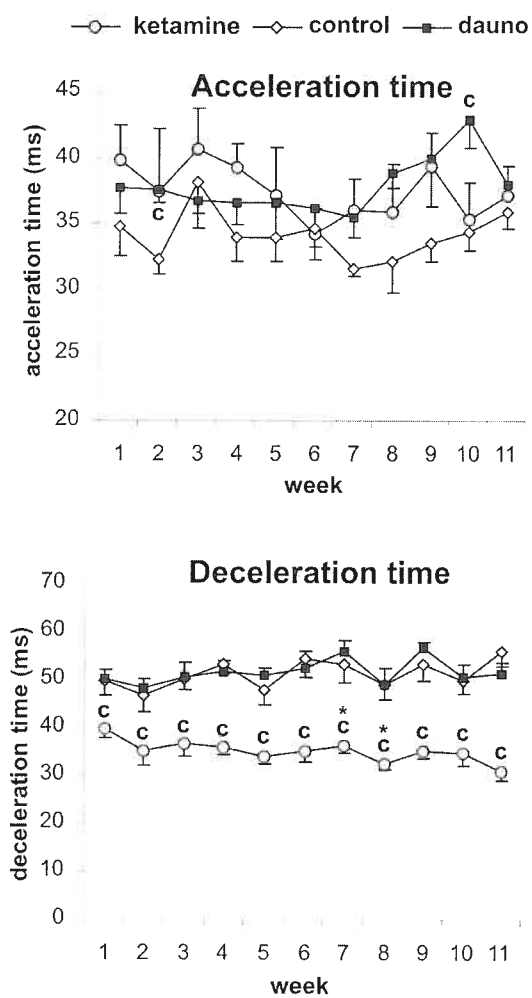


Fig. 4

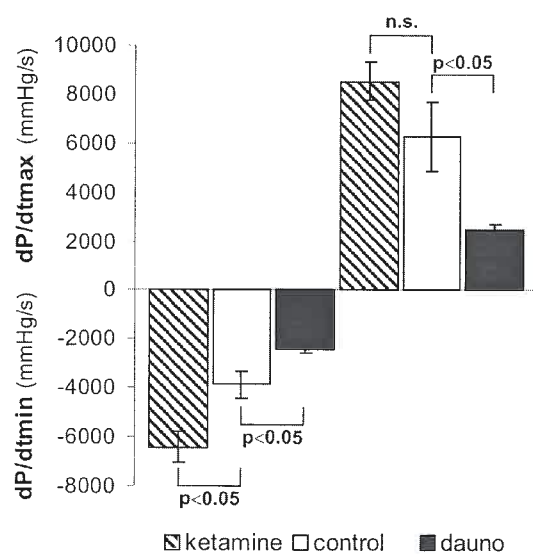


Fig. 5

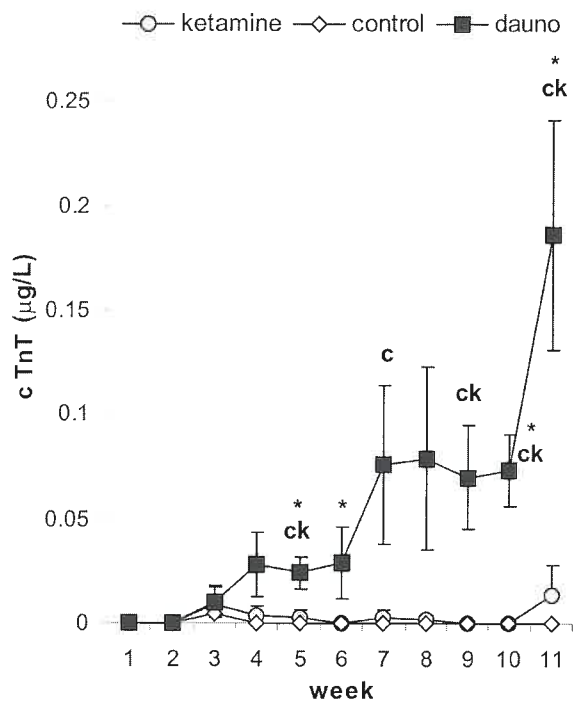
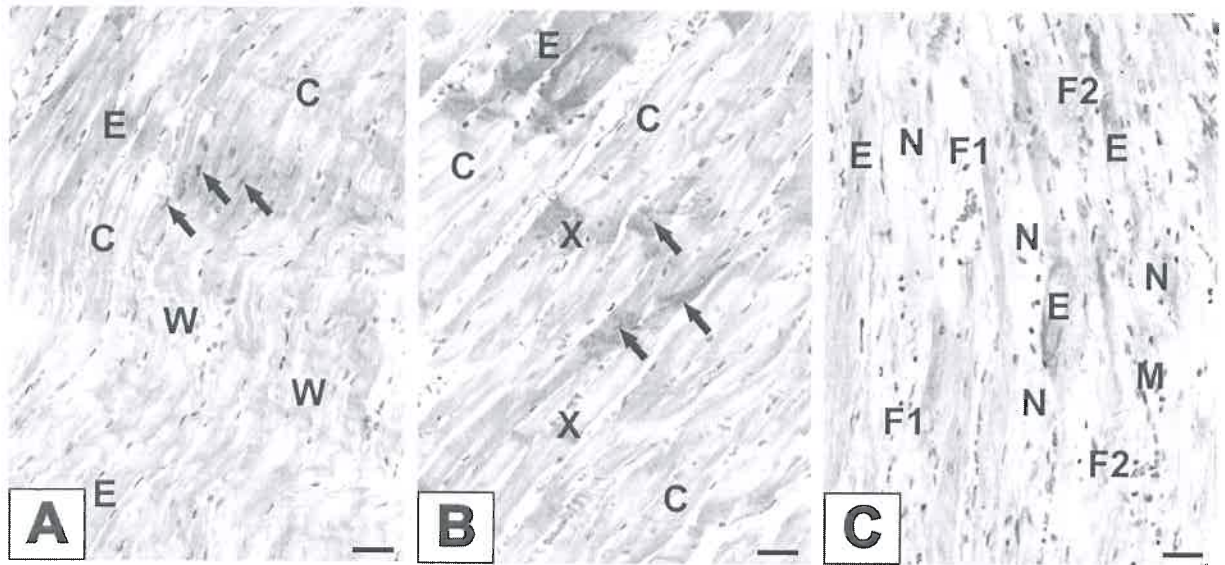


Fig. 6



PŘÍLOHA 2

Šimůnek T, Štěrba M, Holečková M, Kaplanová J, Klimtová I, Adamcová M, Geršl V, Hrdina R: **Myocardial content of selected elements in experimental anthracycline-induced cardiomyopathy in rabbits.** *Biometals*. 2005; 18(2): 163-9.

Myocardial content of selected elements in experimental anthracycline-induced cardiomyopathy in rabbits

Tomáš Šimůnek^{1,*}, Martin Štěřba², Magdaléna Holečková³, Jana Kaplanová³, Ivona Klímtová¹, Michaela Adamcová², Vladimír Geršl² & Radomír Hrdina¹

Charles University in Prague, ¹Faculty of Pharmacy, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic; ²Faculty of Medicine, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové, Czech Republic; ³University Teaching Hospital, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic; * Author for correspondence (Tel: +420-495-067-422; Fax: +420-495-512-665; E-mail: simunek@faf.cuni.cz)

Received 24 August 2004; accepted 7 October 2004; Published online: March 2005

Key words: anthracycline, calcium overload, cardiotoxicity, dexrazoxane, myocardial content of elements

Abstract

Cardiotoxicity represents the main drawback of clinical usefulness of anthracycline antineoplastic drugs. In this study, a content of selected elements (Ca, Mg, K, Se, Fe) in the post-mortem removed samples of the myocardial tissue was studied in three groups of rabbits: 1) control group (i.v. saline; $n = 10$); 2) daunorubicin-receiving animals (DAU; 3 mg/kg, i.v.; $n = 11$); 3) animals receiving cardioprotective iron-chelating agent dexrazoxane (DEX; 60 mg/kg, i.p.; $n = 5$) prior to DAU. Drugs were administered once weekly for 10 weeks. 5–7 days after the last administration, cardiac left ventricular contractility (dP/dt_{max}) was significantly decreased in DAU-treated animals (745 ± 69 versus 1245 ± 86 kPa/s in the control group; $P < 0.05$), while in the DEX+DAU group it was insignificantly increased (1411 ± 77 kPa/s). Of the myocardial elements' content studied, a significant increase in total Ca against control (16.2 ± 2.4 versus 10.6 ± 0.9 $\mu\text{g/g}$ of dry tissue; $P < 0.05$) was determined in the DAU-group, which was accompanied with significant decreases in Mg and K. In the heart tissue of DEX-pretreated animals, no significant changes of elements' content were found as compared to controls, while the Ca content was in these animals significantly lower than in the DAU group (9.1 ± 0.4 versus 16.2 ± 2.4 $\mu\text{g/g}$; $P < 0.05$). Hence, in this study we show that systolic heart failure induced by chronic DAU administration is primarily accompanied by persistent calcium overload of cardiac tissue and the protective action of DEX is associated with the restoration of normal myocardial Ca content.

Introduction

Anthracycline (ANT) antineoplastic antibiotics (e.g., doxorubicin and daunorubicin) rank among the most effective anticancer drugs ever developed (Calabresi & Chabner 2001). Cardiotoxicity, however, represents a serious adverse effect that continues to limit their therapeutic potential and threatens the cardiac function of many patients with cancer. The main risk of anthracyclines is associated with their chronic administration, when severe cardiomyopathy and congestive heart failure

may develop any time after the completion of the treatment (Shan *et al.* 1996; Hrdina *et al.* 2000).

The precise pathogenesis of anthracycline-induced cardiotoxicity is still uncertain, and it is most likely of multifactorial origin (Minotti *et al.* 2004). Nevertheless, pivotal role is attributed to the iron-catalyzed intramyocardial production of reactive oxygen species (ROS), which cause damage of various targets in the myocardial cells (Doroshov 1983; Rajagopalan *et al.* 1988). Free cellular iron has been shown to participate in the ROS production, both as a catalyst of the hydroxyl

radicals' production (via the Haber–Weiss reaction) and by forming the ANT-Fe complexes (Olson & Mushlin 1990; Gille *et al.* 1997). The importance of iron in the ethiopathogenesis of anthracycline-induced cardiotoxicity has been confirmed by the high protective efficiency of dexrazoxane (ICRF-187) – the only clinically approved cardioprotectant so far (Wiseman *et al.* 1998; Swain *et al.* 2004). Dexrazoxane apparently protects cardiomyocytes against anthracycline-induced damage through its potent metal-chelating hydrolysis product ADR-925, which acts by displacing iron bound to anthracycline or chelating free or loosely bound iron and thus preventing the iron-based ROS damage (Buss *et al.* 1993; Hasinoff *et al.* 1998). Importantly, iron chelation has also been shown to possess antiproliferative effects against malignant cells (Richardson 1997) and the Fe chelating cardioprotective strategy can thus also result in enhanced antitumour activity (Kwok & Richardson 2000).

In rabbit, chronic administration of anthracyclines causes reproducible cardiac damage, similar to those observed in humans, and the rabbit is thus considered to be a satisfactory animal model for experimental anthracycline cardiomyopathy induction (Herman & Ferrans 1998). Choice of daunorubicin as a model anthracycline as well as its dosage schedule was based upon our previous studies (Geršl & Hrdinā 1994; Klimtovā *et al.* 2002).

The aim of this study was to experimentally induce the anthracycline cardiomyopathy in rabbits, with subsequent analysis of the myocardial content of selected elements (Ca, Mg, K, Se, Fe) and their correlations. Furthermore, the effects of concurrent cardioprotective administration of dexrazoxane were investigated.

Methods

Study design

Medium size Chinchilla male rabbits with average body weight 3.3 kg at the beginning of the experiment were used. The animals were maintained in an air-conditioned room, allowed free access to a standard pellet rabbit diet and tap water. The study was performed under the supervision of the Ethical Committee of the Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Hradec Králové,

and it conforms to the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85–23, revised 1985).

Three groups of experimental animals were used:

1. Control group (10 animals) received saline (1 ml/kg, i.v.)
2. DAU group (11 animals) received daunorubicin (Cèrubidine, Bellon Rhône-Poulenc Rorer, France – 3 mg/kg – i.e. approximately 50 mg/m², i.v.)
3. DEX+DAU group (5 animals) received dexrazoxane (Cardioxane, Chiron B.V., The Netherlands – 60 mg/kg, i.p.), 30 min prior to daunorubicin (3 mg/kg, i.v.)

All substances were administered once weekly for 10 weeks. 5–7 days after the last administration, invasive contractility measurements had been performed in surviving animals which were then sacrificed with pentobarbitone overdose. Samples of the left ventricular myocardial tissue were then immediately removed for determinations of elements' content.

Determination of myocardial content of selected elements

Content of calcium (Ca), magnesium (Mg), potassium (K), selenium (Se) and iron (Fe) was measured in samples of the left ventricular myocardium. Samples were dried and after cooling period they were weighed and digested by microwave digestion with nitric acid and hydrogen peroxide. Magnesium, iron and selenium were determined using graphite furnace atomic absorption spectrometry (Unicam, Solaar 959, U.K.). Calcium and potassium were measured photometrically using flame photometry (Eppendorf, Efox 5053, Germany). Results are expressed as ng/g of dry tissue, selenium as µg/g of dry tissue.

Left ventricular contractility measurement

In pentobarbitone anaesthesia (Nembutal Sodium inj., Abbott, U.S.A. – 30 mg/kg i.v.), a polyethylene catheter filled with heparinized (10 IU/ml) saline was introduced via the left carotide artery into the left heart ventricle. Maximal rate (maximum of the first derivative) of the pressure rise in

the isovolumic phase of the systole – dP/dt_{\max} was determined as an index of the left ventricular contractile function, using ADI PowerLab/8SP (Adinstruments, Australia).

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm S.E.M. The statistical software SigmaStat for Windows 2.0 (Jandel, Germany) was used in this study. Significance of differences between groups was estimated using One Way ANOVA unpaired test or Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks (data without normal distribution). Pearson correlation analysis was used to describe the relations between the variables. $P < 0.05$ was used as a level of statistical significance, unless indicated otherwise.

Results

Mortality

In the DAU group, four animals of 11 (37%) died or were moribund and had to be sacrificed prematurely. In the other two groups (control and DEX + DAU) no premature deaths occurred.

Left ventricular contractility

As seen in Figure 1, left ventricular contractility was in 7 surviving DAU-treated animals significantly reduced to 59.8% of the control values. In

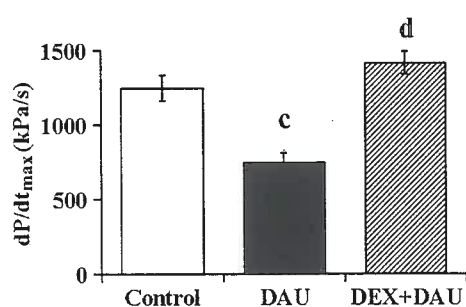


Figure 1. Left ventricular contractility after the 10-week treatment with daunorubicin alone (DAU) or in a combination with dexrazoxane (DEX + DAU). dP/dt_{\max} – maximal rate of the pressure rise in the isovolumic phase of the systole. Statistical significance (ANOVA, $P < 0.05$): c – comparison with control group, d – comparison with DAU group.

dexrazoxane-pretreated rabbits, the dP/dt_{\max} values did not differ significantly from control and were significantly higher than in the DAU-group.

Myocardial content of selected elements

Results are summarized in Table 1. In the DAU group, a significant increase in total myocardial calcium and decrease in magnesium and potassium contents were detected. In animals, where dexrazoxane was administered prior to daunorubicin, no significant changes were found as compared to control group, while calcium content was in these animals significantly lower than in the DAU group.

Correlation analyses

In order to assess potential connections between the left ventricular contractility and the elements' content as well as the interrelationships among the elements, Pearson correlation analysis was performed. Of the 15 pairs of variables tested, those with statistically significant correlation are listed in Table 2. Regarding the cardiac contractility, negative correlation was detected with calcium content (Figure 2). Furthermore left ventricular Ca content also correlated with Mg and Se (negative and positive correlations, resp.). The strongest positive correlation was observed between the contents of Mg and K (Figure 3).

Discussion

Changes in various ionic concentrations and their ratios in cardiac cells are known to be important features that accompany heart failure, including that resulting from anthracycline-induced cardiomyopathy. While there have been performed numerous *in vitro* studies with isolated cardiac preparations or cells and mostly dealing with acute effects of anthracyclines, we have carried out a whole-animal study, with repeated administration of the daunorubicin and subsequent determination of various elements' content in the post-mortem removed samples of the left ventricular tissue. Furthermore, effects of pre-treatment with dexrazoxane, a well established cardioprotective agent, were studied. We assume that our experimental model can mimic changes in human

Table 1. Myocardial content of selected elements.

	Calcium ($\mu\text{g/g}$)	Magnesium ($\mu\text{g/g}$)	Potassium ($\mu\text{g/g}$)	Iron ($\mu\text{g/g}$)	Selenium (ng/g)
Control	10.6 \pm 0.86	31.8 \pm 0.52	249 \pm 5	2.92 \pm 0.21	7.31 \pm 1.40
Daunorubicin	16.2 \pm 2.36 c	28.6 \pm 0.91 c	225 \pm 5 c	2.84 \pm 0.24	10.94 \pm 2.55
Daunorubicin + dexrazoxane	9.06 \pm 0.42 d	29.7 \pm 0.87	227 \pm 14	2.47 \pm 0.08	8.26 \pm 0.46

Results are expressed per gram of dry left ventricular tissue. Statistical significance (ANOVA, $P < 0.05$): c – comparison with control group, d – comparison with daunorubicin group.

Table 2. Variables with statistically significant correlations, given as Pearson's correlation coefficients.

Variables	Correlation coefficient	Significance
$dP/dt_{\text{max}}/\text{Ca}$	-0.60	$P < 0.01$
Ca/Mg	-0.42	$P < 0.05$
Ca/Se	0.59	$P < 0.005$
Mg/K	0.73	$P < 0.0001$

myocardium that accompany the heart failure development after the chronic anthracycline-containing chemotherapy as well as the protection against this cardiotoxicity with dexrazoxane. The period between the last administration and performed measurements was intended to allow elimination of the drugs from the organism. Measured values of both contractility and the content of elements thus reflect the long-term myocardial changes, which persist after the wash-out of daunorubicin and dexrazoxane, rather than their acute effects.

Repeated 10-week DAU administration (in a cumulative dose of 30 mg/kg, i.e., approximately

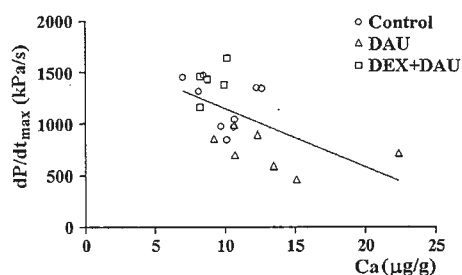


Figure 2. Scatterplot of the left ventricular contractility (dP/dt_{max}) versus post-mortem-determined left ventricular total calcium content. LV contractility was measured out immediately before the killing of animals and taking samples of the cardiac tissue for elements' content analysis.

500 mg/m^2) resulted in premature death of 37% of animals as well as in significant left ventricular contractility reduction, indicating the heart failure development. Administration of dexrazoxane 30 min before each DAU application was associated with 0% mortality and complete preservation of the contractility, further confirming its high cardioprotective efficiency found in different animal models (Imondi *et al.* 1996; Herman & Ferrans 1998).

As shown in our previous paper (Adamcova *et al.* 2003), repeated daunorubicin administration results in rabbits in pronounced remodelling of the protein composition of cardiac muscle, where the concentrations of both metabolic and contractile proteins are significantly reduced, while the amount of collagen is significantly higher in comparison with control group. In the dexrazoxane pre-treated rabbits, the concentrations of individual protein fractions were shown to be mostly comparable to those of the control group.

Regarding the myocardial content of studied elements, in the present study, the most pronounced difference between the control and DAU groups was observed in the content of calcium – a significant increase to 153% of the control values

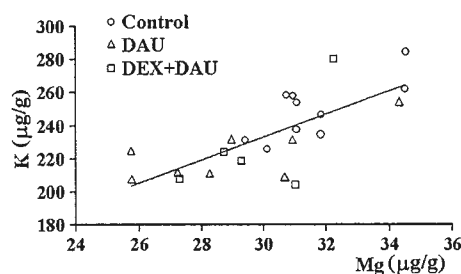


Figure 3. Scatterplot of the post-mortem-determined left ventricular total magnesium and potassium contents.

was noticed in the daunorubicin-receiving group. Abnormal myocardial calcium handling, usually manifested as increased calcium concentrations in cytosol and known as 'calcium overload of cardiac cells', is reported to be one of the most important features of anthracycline-induced cardiomyopathy. Anthracyclines have been shown to activate the calcium release from sarcoplasmic reticulum (Holmberg & Williams 1990; Pessah *et al.* 1990) as well as they may interfere with its accumulation (Halili-Rutman *et al.* 1997). This results in a decrease in the amplitude of Ca^{2+} transients caused by an increased diastolic and decreased peak systolic Ca^{2+} concentrations (Temma *et al.* 1997). The cardiomyocytes' calcium overload leads to mitochondrial function disturbances, ATP depletion and contractility impairment. In our study, decreased left ventricular contractility in daunorubicin-receiving rabbits was found to negatively correlate with increased calcium left ventricular content, which confirms the above discussed findings, obtained from *in vitro* experiments. Dexrazoxane, whose cardioprotective effect is attributed to iron chelating action of its hydrolysis product ADR-925 and thus oxidative stress reduction, has been shown to normalize the Ca content (Table 1). Indeed, the 'free-radical' and 'calcium overload' putative pathways of anthracycline-induced cardiotoxicity seem to go hand in hand as numerous papers have shown the link between the cellular ROS imbalance and calcium homeostasis disturbances (Burton *et al.* 1990; Holmberg *et al.* 1991).

Distinct increase in total calcium was in the myocardium of DAU group of rabbits accompanied with less pronounced, though statistically significant decreases in magnesium and potassium contents. Indeed, Mg is known to be closely linked with various abnormalities that accompany heart failure: it is important for operation of the Na^+/K^+ pump, responsible for electrochemical gradient across the cytoplasmic membrane, and Mg is an important co-factor of many enzymatic cellular reactions involved in the energetic metabolism (Saris *et al.* 2000; Delva 2003). Magnesium concentration is also known to influence the sarcoplasmic reticulum to sequester calcium (Chiesi & Inesi 1981). Decrease in myocardial Mg content has been shown in experimental heart failure induced by rapid ventricular pacing in dogs (Haigney *et al.* 1998), as well as in the biopsies from

heart failure patients (Ralston *et al.* 1989). Regarding the anthracycline-induced cardiotoxicity, in a clinical study by Sartori *et al.* (1991), intracellular Mg content decreases paralleled the severity of cardiac disturbances in patients receiving doxorubicin or epirubicin-containing chemotherapy. The mechanism causing this cardiac Mg loss is unknown. Romani & Scarpa (1992) reported an efflux of 10% to 15% of total cellular magnesium within 10 min from isolated rat hearts in response to 10 $\mu\text{mol/L}$ norepinephrine, which suggests that neurohumoral activation in heart failure may result in the loss of cardiac Mg.

Intracellular magnesium is known to produce a block of the outward movement of K^+ (Ishihara *et al.* 1989), so the reduction of intracellular magnesium may favor the efflux of potassium from the cells. Intracellular Mg is also able to block the efflux of K^+ through a channel known as ATP-dependent K^+ channel (Horie *et al.* 1987). By analogy, intracellular Mg reduction favors the efflux of K^+ also through this channel. The modulating action of Mg on both the above-mentioned channels would explain the reduction in cell potassium seen in our study as well as the Mg/K correlation, the strongest one seen in our study (Table 2, Figure 3). Similar strong direct Mg/K correlation was found in the tissues of heart failure patients studied by Ralston *et al.* (1989).

While the DAU-induced increase in total myocardial Ca content was completely prevented with dexrazoxane pre-treatment, the decreases in myocardial Mg and K were affected with DEX only partially and insignificantly. As this DEX administration fully prevented contractility impairment, and the observed DAU-induced Mg and K content decreases do not correlate with contractility impairment, the Mg/K changes do not seem to play pivotal role in the DAU-induced heart failure.

Assuming the central role of iron in the pathophysiology of anthracycline-induced cardiotoxicity as well as in the dexrazoxane-afforded protection, myocardial content of Fe in both experimental groups was of our great interest. However, no significant changes were detected in either group. In a recent *in vitro* study, Kwok & Richardson (2003) showed 3–5 fold increased accumulation of Fe into ferritin in cardiomyocytes exposed acutely to various anthracyclines, apparently through the inhibition of the ferritin iron mobilization pathway. The present study, however,

does not indicate any longer-lasting significant myocardial Fe accumulation, as in our *in vivo* model of chronic anthracycline cardiotoxicity only slight and insignificant decrease could be observed. Similarly, dexrazoxane pre-treatment has resulted only in a statistically insignificant trend towards Fe content reduction. Reasons for the lack of more pronounced iron content decrease in dexrazoxane-pretreated group may include the fact that ADR-925 probably only shields free or loosely bound intramyocardial iron and prevents its participation in ROS production, rather than mobilizes it from the cells. Furthermore, the week interval since the last DAU or DEX + DAU administration could have permitted restoration of initial Fe levels.

A tendency to an increase in selenium concentration in daunorubicin group may reflect an up-regulation of glutathione peroxidase (GSX). GSX has been shown to serve as a major metabolic form of selenium (Cheng *et al.* 1998) and this enzyme has been reported to be strongly inducible by oxidative stress. This has been shown also in various models of anthracycline cardiotoxicity (Yin *et al.* 1998). DEX pre-treatment has partially attenuated this Se content increase, which may reflect oxidative stress reduction. However, as neither change reached the level of statistical significance, these findings have to be interpreted with a great caution.

In conclusion, in the present study, experimental cardiomyopathy and systolic heart failure were developed using repeated 10-week administration of daunorubicin. We have performed left ventricular contractility measurements, analysis of total myocardial content of selected elements and tried to study possible relations between those parameters. Our data support the hypothesis of crucial role of calcium overload as a hallmark of anthracycline-induced cardiotoxicity, which is mostly derived from *in vitro* experiments. Furthermore, disturbances of magnesium and potassium homeostasis were observed and those seem to be closely related. The dexrazoxane-afforded protection was associated with the restoration of normal Ca content.

Acknowledgements

Skilful technical assistance of Mrs. Ludmila Koželuhová is gratefully acknowledged. The

authors have been supported by the Czech Science Foundation (grant GA CR 305/03/1511), and the Czech Ministry of Education (Research Projects CEZ 111500001 and 11600002, Research Centre LN00B125).

References

- Adamcova M, Pelouch V, Gersl V, Kaplanova J, Mazurova Y, Simunek T, Klimtova I, Hrdina R. 2003 Protein profiling in daunorubicin-induced cardiomyopathy. *Gen Physiol Biophys* **22**, 411–419.
- Burton KP, Morris AC, Massey KD, Buja LM, Hagler HK. 1990 Free radicals alter ionic calcium levels and membrane phospholipids in cultured rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* **22**, 1035–1047.
- Buss JL, Hasinoff BB. 1993 The one-ring open hydrolysis product intermediates of the cardioprotective agent ICRF-187 (dexrazoxane) displace iron from iron-anthracycline complexes. *Agents Actions* **40**, 86–95.
- Calabresi P, Chabner BA. 2001 Chemotherapy of neoplastic diseases. In: Hardman JG, Limbird LE, eds. *Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*, 10th edition. New York: McGraw-Hill, 1381–1459.
- Cheng WH, Ho YS, Valentine BA, Ross DA, Combs GF Jr, Lei XG. 1998 Cellular glutathione peroxidase is the mediator of body selenium to protect against paraquat lethality in transgenic mice. *J Nutr* **128**, 1070–1076.
- Chiesi M, Inesi G. 1981 Mg^{2+} and Mn^{2+} modulation of Ca^{2+} transport and ATPase activity in sarcoplasmic reticulum vesicles. *Arch Biochem Biophys* **208**, 586–592.
- Delva P. 2003 Magnesium and heart failure. *Mol Aspects Med* **24**, 79–105.
- Doroshov JH. 1983 Anthracycline antibiotic-stimulated superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical production by NADH dehydrogenase. *Cancer Res* **43**, 543–551.
- Gersl V, Hrdina R. 1994 Noninvasive polygraphic cardiac changes in daunorubicin-induced cardiomyopathy in rabbits. *Sb Ved Pr Lek Fak Karlovy Univerzity Hradci Kralove* **37**, 49–55.
- Gille L, Nohl H. 1997 Analyses of the molecular mechanism of adriamycin-induced cardiotoxicity. *Free Radic Biol Med* **23**, 775–782.
- Halili-Rutman I, Hershko C, Link G, Rutman AJ, Shainberg A. 1997 Inhibition of calcium accumulation by the sarcoplasmic reticulum: a putative mechanism for the cardiotoxicity of adriamycin. *Biochem Pharmacol* **54**, 211–214.
- Haigney MC, Wei S, Kaab S, Griffiths E, Berger R, Tunin R, Kass D, Fisher WG, Silver B, Silverman H. 1998 Loss of cardiac magnesium in experimental heart failure prolongs and destabilizes repolarization in dogs. *J Am Coll Cardiol* **31**, 701–706.
- Hasinoff BB, Hellmann K, Herman EH, Ferrans VJ. 1998 Chemical, biological and clinical aspects of dexrazoxane and other bisdioxopiperazines. *Curr Med Chem* **5**, 1–28.
- Herman EH, Ferrans VJ. 1998 Preclinical animal models of cardiac protection from anthracycline-induced cardiotoxicity. *Semin Oncol* **25**, 15–21.
- Holmberg SR, Cumming DV, Kusama Y, Hearse DJ, Poole-Wilson PA, Shattock MJ, Williams AJ. 1991 Reactive oxygen species modify the structure and function of the

- cardiac sarcoplasmic reticulum calcium-release channel. *Cardioscience* 2, 19-25.
- Holmberg SR, Williams AJ. 1990 Patterns of interaction between anthraquinone drugs and the calcium-release channel from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Circ Res* 67, 272-283.
- Horie M, Irisawa H, Noma A. 1987 Voltage-dependent magnesium block of adenosine-triphosphate-sensitive potassium channel in guinea-pig ventricular cells. *J Physiol* 387, 251-272.
- Hrdina R, Gersl V, Klímtová I, Šimunek T, Macháková J, Adamcová M. 2000 Anthracycline-induced cardiotoxicity. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 43, 75-82.
- Imondi AR, Della Torre P, Mazue G, Sullivan TM, Robbins TL, Hagerman LM, Podesta A, Pinciroli G. 1996 Dose-response relationship of dexrazoxane for prevention of doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice, rats, and dogs. *Cancer Res* 56, 4200-4204.
- Ishihara K, Mitsuiye T, Noma A, Takano M. 1989 The Mg^{2+} block and intrinsic gating underlying inward rectification of the K^+ current in guinea-pig cardiac myocytes. *J Physiol* 419, 297-320.
- Klímtová I, Šimunek T, Mazurova Y, Hrdina R, Gersl V, Adamcová M. 2002 Comparative study of chronic toxic effects of daunorubicin and doxorubicin in rabbits. *Hum Exp Toxicol* 21, 649-657.
- Kwok JC, Richardson DR. 2000 The cardioprotective effect of the iron chelator dexrazoxane (ICRF-187) on anthracycline-mediated cardiotoxicity. *Redox Rep* 5, 317-324.
- Kwok JC, Richardson DR. 2003 Anthracyclines induce accumulation of iron in ferritin in myocardial and neoplastic cells: inhibition of the ferritin iron mobilization pathway. *Mol Pharmacol* 63, 849-861.
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. 2004 Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 56, 185-229.
- Olson RD, Mushlin PS. 1990 Doxorubicin cardiotoxicity: analysis of prevailing hypotheses. *FASEB J* 4, 3076-3086.
- Pessah IN, Durie EL, Schiedt MJ, Zimanyi I. 1990 Anthraquinone-sensitized Ca^{2+} release channel from rat cardiac sarcoplasmic reticulum: possible receptor-mediated mechanism of doxorubicin cardiomyopathy. *Mol Pharmacol* 37, 503-514.
- Rajagopalan S, Politi PM, Sinha BK, Myers CE. 1988 Adriamycin-induced free radical formation in the perfused rat heart: implications for cardiotoxicity. *Cancer Res* 48, 4766-4769.
- Ralston MA, Murnane MR, Kelley RE, Altschuld RA, Unverferth DV, Leier CV. 1989 Magnesium content of serum, circulating mononuclear cells, skeletal muscle, and myocardium in congestive heart failure. *Circulation* 80, 573-580.
- Richardson DR. 1997 Potential of iron chelators as effective antiproliferative agents. *Can J Physiol Pharmacol* 75, 1164-1180.
- Romani A, Scarpa A. 1992 Regulation of cell magnesium. *Arch Biochem Biophys* 298, 1-12.
- Saris NE, Mervaala E, Karppanen H, Khawaja JA, Lewenstam A. 2000 Magnesium. An update on physiological, clinical and analytical aspects. *Clin Chim Acta* 294, 1-26.
- Sartori S, Nielsen I, Tassinari D, Maestri A, Abbasciano V. 1991 Intracellular magnesium concentrations and acute anthracycline-induced cardiotoxicity. *Br J Cancer* 64, 785-787.
- Schimmel KJ, Richel DJ, van den Brink RB, Guchelaar HJ. 2004 Cardiotoxicity of cytotoxic drugs. *Cancer Treat Rev* 30, 181-191.
- Shan K, Lincoff AM, Young JB. 1996 Anthracycline-induced cardiotoxicity. *Ann Intern Med* 125, 47-58.
- Swain SM, Vici P. 2004 The current and future role of dexrazoxane as a cardioprotectant in anthracycline treatment: expert panel review. *J Cancer Res Clin Oncol* 130, 1-7.
- Tam TF, Leung-Toung R, Li W, Wang Y, Karimian K, Spino M. 2003 Iron chelator research: past, present, and future. *Curr Med Chem* 10, 983-995.
- Temma K, Chugun A, Akera T, Hara Y, Sasaki T, Kondo H. 1997 Ca^{2+} overloading causes the negative inotropic effect of doxorubicin in myocytes isolated from guinea-pig hearts. *Eur J Pharmacol* 322, 235-242.
- Wiseman LR, Spencer CM. 1988 Dexrazoxane. A review of its use as a cardioprotective agent in patients receiving anthracycline-based chemotherapy. *Drugs* 56, 385-403.
- Yin X, Wu H, Chen Y, Kang YJ. 1998 Induction of antioxidants by adriamycin in mouse heart. *Biochem Pharmacol* 56, 87-93.

PŘÍLOHA 3

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

Safety and tolerability of repeated administration of pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone in rabbits

M Štěrba*¹, T Šimůnek², Y Mazurová¹, M Adamcová¹, O Popelová¹, J Kaplanová¹, P Poňka³ and V Geršl¹

¹Faculty of Medicine in Hradec Králové, Charles University in Prague, Hradec Králové, Czech Republic;

²Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Hradec Králové, Czech Republic;

³Lady Davis Institute for Medical Research, McGill University, Montreal, Canada

Recently, pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone (o-108) has been identified as an effective iron chelator [Link *et al.*, *Blood* 2003; 101: 4172–79]. Since chronic treatment would be necessary in its potential indications, in the present study, the safety and tolerability of this agent after repeated administration was determined. Three doses of o-108 (25, 50, 100 mg/kg, in 10% Cremophor EL) were administered intraperitoneally, once weekly, for 10 weeks to three groups ($n=5$ each) of Chinchilla male rabbits. The effects on biochemical, haematological and cardiovascular parameters were examined during the experiment; histopathological examination was performed at the end of the experiment. Results were compared with control (saline 2 mL/kg, $n=11$) and vehicle groups (10% Cremophor EL, 2 mL/kg, $n=12$). No premature deaths occurred; the well-being of animals was evidenced by their body weight gain, although lower

gain was observed with the highest dose (100 mg/kg). Significant elevations of cardiac troponin T plasma concentrations were observed with the highest dose of o-108, but no abnormalities were found in the cardiovascular function and only minor and inconsistent changes in haematological and biochemical parameters were observed. Histopathological examinations of selected organs revealed only weak and reversible changes through all studied groups. Thus, the data from this study suggest that o-108 remains a promising drug from the standpoint of the possibility of its repeated administration and warrants further investigation. *Human & Experimental Toxicology* (2005) 24, 581–589

Key words: iron chelator; o-108; pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone

Introduction

While iron (Fe) is a vital element for virtually all living organisms, it also presents a risk of serious injury. The biological importance, as well as the toxicity of iron, is based on its ability to readily precede one electron transmission between its Fe^{3+} and Fe^{2+} forms.¹ Free iron is able to efficiently catalyze the formation of extremely toxic hydroxyl radicals via a process known as the Haber–Weiss reaction.² Thus, either an excess of iron in the body or disruption of its tightly regulated homeostasis at the cellular level may have a severe impact on human health. Iron chelation has been shown to be an effective therapeutic approach in the treatment of patients

suffering from both acute iron intoxication and chronic iron overload.^{3,4} Iron overload develops as a result of treatment with repeated transfusions, which are necessary for patients suffering from hereditary diseases of haematopoiesis, such as β -thalassaemia. This chronic iron burden is accompanied with severe damage and subsequent failure of the heart and parenchymal organs. To date, iron chelation is the only strategy that considerably prolongs the lifespan of these patients.⁵

In addition, iron chelation appears to be a successful approach in many non-overload conditions. Some iron chelators were shown to have various attractive pharmacological properties, e.g., cardioprotective, neuroprotective, anticancer, or antimicrobial.^{6–9} The antioxidant effects of iron chelators are based on their ability to prevent iron-catalyzed formation of hydroxyl radicals, which are known to be the most toxic form of reactive

*Correspondence: Martin Štěrba, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine in Hradec Králové, Charles University in Prague, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové 1, Czech Republic
E-mail: sterbam@lfhk.cuni.cz

Received 10 January 2005; revised 1 August 2005; accepted 22 August 2005

oxygen species (ROS) with a short half-life and a powerful destructive effect.

Progress in this area is unfortunately hindered by a lack of selective and non-toxic ligands. Deferoxamin (DFO) remains the only widely used chelator, despite its drawbacks. This drug must be administered by long subcutaneous infusions and, because of its hydrophilic nature, it cannot easily permeate into the cells. The first orally active iron chelator, deferiprone, which was designed to overcome some DFO disadvantages, remains a controversial subject concerning its safety and efficacy.^{10,11} Thus, there is an urgent need to develop new effective and non-toxic iron chelators.

Pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone (agent o-108) is a novel and selective iron chelator from the group of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) analogues.^{12,13} Analogous to PIH, o-108 is a tridentate iron chelator selectively forming 2:1 complexes with Fe³⁺. Due to the presence of a halogen moiety and the replacement of the pyridine ring by benzene, this agent is even more lipophilic than its parent compound. Therefore, o-108 can reach the intracellular targets more efficiently. Its ability to mobilize iron was demonstrated both *in vitro* and *in vivo*. Agent o-108 was even more effective than PIH in the mobilisation of ⁵⁹Fe from reticulocytes and K506 cells.^{14,15} Ortho-halogenated derivatives of pyridoxal benzoyl hydrazone were shown to be less toxic *in vitro* than its *meta* or *para* substituted derivatives.¹⁵ In a recent study, oral administration of o-108 to hypertransfused ⁵⁹Fe-ferritin-tagged rats led to linear dose-dependent cumulative (7 days) radioiron excretion, ranging from 2.3 ± 1.8% at 25 mg/kg to 42.6 ± 7.7% at 200 mg/kg, expressed as the percentage of injected radioactivity. The residual hepatic radioactivity observed in this experiment was negatively correlated to radioiron excretion induced by o-108.¹⁶

Although o-108 has been shown to possess interesting pharmacodynamic properties, the safety of this agent remains unknown and is the subject of the present study. The dosage of o-108 and the design of our experiments were based on the first *in vivo* study demonstrating its efficacy.¹⁶ Since the therapy of iron overload (as well as its use in other potential indications) would require repeated administration of this agent, a knowledge of the potential hazards in this schedule may be of value. This study was therefore designed to assess the preliminary tolerability and safety of repeated weekly administration of o-108 in three escalating doses in rabbits.

Material and methods

Chemicals

Pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone (o-108) was synthesized by Schiff-base condensation of pyridoxal and 2-chlorobenzoylhydrazide as previously described.¹⁷ The structure and purity of the compound was confirmed using NMR and HPLC with UV detection. Cremophor EL (Sigma-Aldrich, Czech Republic), ketamine (Calypsol inj., Gedeon Richter, Hungary), Aqua pro injectione (Biotika, Slovakia), and pentobarbital (Nembutal Sodium, Abbott, USA) were used in the experiment.

Animals

Adult medium-size Chinchilla male rabbits with an average initial weight of 3.5 ± 0.1 kg were housed under a 12-h light cycle, constant temperature and humidity. The animals had free access to water and a standard laboratory pellet diet. All experimental procedures were performed under ketamine anaesthesia (50 mg/kg, i.m.). Final invasive haemodynamic measurements were carried out under pentobarbital anaesthesia (30 mg/kg, i.v.). The experiments were performed in accordance with the 'Guide for the Care and Use of Laboratory Animals' (1996) and under the supervision of the Ethical Committee of the Medical Faculty in Hradec Králové.

Experimental design

Fifteen rabbits were randomly divided into three groups. Pyridoxal o-chlorobenzoyl hydrazone (o-108) was partially dissolved in 10% aqueous Cremophor EL and administered intraperitoneally to the three groups of animals (*n* = 5, each), once weekly for 10 weeks, in three escalating doses (25, 50 and 100 mg/kg). Standard biochemical and haematological analyses of blood samples, as well as non-invasive evaluations of cardiac function, were performed repeatedly during the experiment as described below. The body weight gain and animal behaviour were recorded weekly. Finally, 4 to 5 days after the administration of the last dose, the invasive haemodynamic measurements were performed. The animals were then overdosed with pentobarbital and autopsy followed by histopathological evaluation was carried out. The results were compared with groups receiving vehicle (10% aqueous solution of Cremophor EL; 2 mL/kg, *n* = 12) or saline (control-saline; 2 mL/kg, *n* = 11).

Biochemical and haematological analysis

Blood was sampled for standard biochemical and haematological analyses instantly before and

24 hours after the first administration and also before the fifth administration of the drug and at the end of the experiment. For the determination of standard plasma/serum biochemical parameters, a fully automatic clinical chemistry analyser (HITA-CHI 737, Hitachi, Tokyo, Japan) was used in accordance with the manufacturer's recommendations. Haematological parameters were measured by means of a Coulter T890 counter (Beckman Coulter, Fullerton, USA). Additionally, plasma concentrations of cardiac troponin T (cTnT) as a specific marker of cardiac damage were determined using the Elecsys Troponin T STAT immunoassay on an Elecsys 2010 immunoassay analyser (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland) with the detection limit of 0.010 ng/mL. The determination of troponin T was performed in the plasma samples taken before and 24 hours after the first and before the fifth, eighth and tenth administrations and at the end of the experiment.

Non-invasive cardiac measurements

Non-invasive cardiac function measurements (echocardiography; ECG) were carried out before the first and fifth administrations and at the end of the experiment. ECG was recorded with an ADI PowerLab/8SP, software Chart for Windows v. 3.4.11 (Adinstruments, Castle Hill, Australia). Echocardiographic examination was performed using GE Vingmed CFM 800A echocardiograph (GE Vingmed Ultrasound, Horten, Norway) equipped with a standard paediatric 7.5 MHz probe. The left ventricle was visualized in its long axis by means of the left parasternal approach and guided M-mode measurement at the tips of the mitral valve was performed. The end-systolic and end-diastolic diameters were obtained and used for the determination of the left ventricular ejection fraction (LVEF).

Invasive haemodynamic measurements

At the end of the experiment, heart rate (HR), mean blood pressure in the femoral artery (BP) and the index of contractility (dP/dt_{max}) were measured invasively using an ADI PowerLab/8SP (Adinstruments, Castle Hill, Australia) and software Chart for Windows (v. 3.4.11). The left carotid artery was prepared and a PE catheter filled-in with heparinized (10 IU/mL) saline was introduced into the left heart ventricle to measure the maximal pressure rise in the isovolumic phase of systole (maximum of the first derivative of LV pressure: dP/dt_{max}). For the arterial blood pressure measurement, a PE cannula was inserted into the right femoral artery. All parameters were recorded after a 15-min equilibration period.

Histopathological examination

Tissue blocks of the transversely sectioned left and right cardiac ventricles, left kidney, left liver lobule, left caudal lung lobule, duodenum (approximately 3 cm below the pyloric sphincter), and striated muscle tissue (from the left quadriceps femoral muscle) were fixed by immersion in 4% formaldehyde for 5 to 7 days. Paraffin sections (6 μ m thick) were stained with haematoxylin-eosin (H&E) and Masson's blue trichrome. Photomicrographs were made with a Lucia G software version 4.51 (Laboratory Imaging, Prague, Czech Republic) in the Department of Medical Biology, Faculty of Medicine in Hradec Králové.

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm SEM. The statistical software SigmaStat for Windows 3.0 (Jandel, Germany) was used in this study. Significances of differences between groups were determined using the one way ANOVA unpaired test or Kruskal-Wallis ANOVA on ranks (data without normal distribution). Significances within the group (comparison with the initial values) were evaluated using the paired *t*-test or the Wilcoxon Signed Rank test. $P < 0.05$ was used as the level of statistical significance.

Results

No premature deaths relating to the treatment occurred throughout the experiments. No seizures, manifest changes in animal behaviour or overall appearance were observed during the study. However, somewhat reduced locomotive activity and tendency to reduced feed intake were noted in the group treated with the highest dose (100 mg/kg) of o-108. The relative body weight gain was significant in control and vehicle groups during the whole study. The animals treated with the highest dose of the drug had the lowest body weight gain (insignificant in five of 11 measurements). The body weights in the course of the study are shown in Figure 1.

Plasma biochemistry (Table 1) revealed predominantly minor and inconsistent changes in most of studied parameters through all the groups. The levels of plasma ions in animals treated with o-108 were always in physiological limits and mostly followed the fluctuation seen in control and vehicle groups. The total plasma protein did not change in the first half of the experiment. However, at the end of the study, a slight drop was observed in the vehicle group and also (somewhat more marked) in the groups treated with 50 and 100 mg/kg of o-108. This change was also significant when compared to

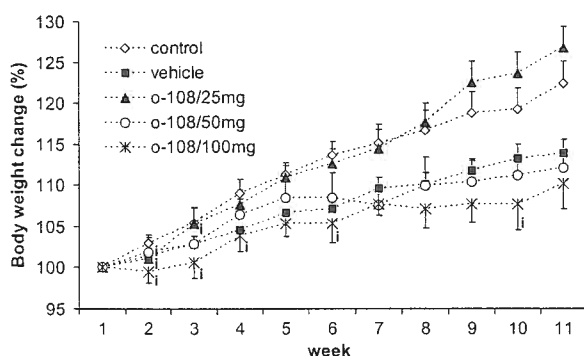


Figure 1 Body weight changes during the study. Statistical significance: 'i' insignificant body weight gain (paired *t*-test, $P < 0.05$) in comparison with the initial values within one group – all other body weights were significantly increased, (ANOVA, $P < 0.05$) comparison between the groups – no significant differences were observed. The absolute initial values at the beginning of the study were: 3.45 ± 0.11 (control group), 3.42 ± 0.09 (vehicle group), 3.55 ± 0.03 (o-108/25 mg group), 3.54 ± 0.09 (o-108/50 mg group), 3.38 ± 0.07 (o-108/100 mg group) – $P = NS$.

the control and vehicle groups. Similar results were obtained for plasma albumin. Nevertheless, the values of total plasma protein and albumin did not fall below the physiological limits in either group.

No elevations in alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP) or total serum bilirubin were observed either 24 hours after the administration of the first dose or later. Minor changes in lactate dehydrogenase (LDH) followed those seen in the control and vehicle groups. Plasma cholesterol levels were somewhat higher 24 hours after the first o-108 administration compared with the initial values. Similar, though less pronounced changes occurred in the vehicle group. Weak and transient fluctuation of plasma lipids had fully normalized during the experiment. While only little oscillation in creatininaemia occurred in the control and vehicle groups, scattered elevation was seen in animals treated with o-108. This observation became significant only at the end of experiment with the lowest dose of the chelator when compared to initial values, whereas no significance was found in comparison with other groups.

Moderate elevations in cardiac troponin T plasma concentrations above the detection limit (Figure 2) were found in the control and vehicle groups. Similar findings were also present in the case of lowest and middle dose of studied compound. However, in the group treated with 100 mg/kg of o-108, the rise was more prominent and significantly different from both the initial values and the control and vehicle groups.

No changes in blood cell count were observed in animals treated with any dose of the chelator. A

mild, though significant rise in the mean cell volume was present in the group receiving middle and higher doses of o-108. Other haematological parameters oscillated similarly in all groups. The overview of selected haematological parameters is given in Table 2.

Non-invasive echocardiographic measurements (Figure 3) showed no significant changes with the exception of a slightly higher ejection fraction at the end of the experiment in 25 and 100 mg/kg o-108 receiving animals, compared to both control and vehicle groups. Nevertheless, all these changes were well within physiological limits. No significant changes in cardiac contractility, blood pressure and heart rate were detected (Table 3). Furthermore, no gross changes in ECG were observed in any group.

The histopathological study of selected organs revealed only weak and reversible changes through all studied groups. Groups of cardiomyocytes with eosinophilic (intensely stained) cytoplasm were also found in controls (Figure 4a), and represented in majority reversible changes. Scattered degenerated myocytes were observed in both the o-108-treated/animals (Figure 4c) and the vehicle group (Figure 4b). The kidney parenchyma revealed slight changes, particularly in the epithelium of the proximal and distal tubules: increased eosinophilia and a small number of pyknotic (shrunk) nuclei were found in the group with the vehicle (Figure 5b), less in the group with o-108 (Figure 5c). Other organs under study were free of any pathological changes.

Discussion

Iron chelation has recently become a promising concept of pharmacological intervention in a number of pathologies. To date, it is the only way of prolonging the lifespan of patients suffering from iron overload. Iron selective ligands of higher lipophilicity may easily penetrate the cell and prevent the iron-catalysed intracellular formation of free radical species. Moreover, dexrazoxane, which is intracellularly hydrolysed to form the iron chelator ADR-925, is the only well-documented cardioprotectant against anthracycline-induced cardiac damage, in which ROS are believed to be the key players.¹⁸ Interesting antioxidant properties were also reported for the lead compound of the aroylhydrazone chelators – PIH.^{19–22} A significant degree of cardioprotection against hydrogen peroxide induced injury was reported for another analogue of o-108.^{23,24} Furthermore, several other pharmacodynamic properties (e.g., antiproliferative

Table 1 Selected biochemical parameters

Parameter/group	Before the first administration	After the first administration	Before the fifth administration	End of study
Sodium (mmol/L)				
Control	138.7 ± 1.2	140.5 ± 0.9*	139.1 ± 1.0	141.4 ± 0.5*
Vehicle	140.4 ± 1.3	139.9 ± 0.7	140.7 ± 0.9	142.9 ± 0.8
o-108/25 mg	142.5 ± 0.7	142 ± 0.9	140.8 ± 0.5	141.8 ± 0.8
o-108/50 mg	140.6 ± 0.5	142.4 ± 0.5	139.4 ± 1.2	140.6 ± 0.9
o-108/100 mg	140.2 ± 0.7	141.8 ± 0.7*	143.4 ± 1.0*	141.8 ± 0.6
Potassium (mmol/L)				
Control	3.6 ± 0.2	3.9 ± 0.2*	3.5 ± 0.2	3.4 ± 0.1
Vehicle	3.7 ± 0.1	3.9 ± 0.1	3.6 ± 0.1	3.4 ± 0.3
o-108/25 mg	3.7 ± 0.1	4.0 ± 0.1	3.9 ± 0.1	4.0 ± 0.1
o-108/50 mg	3.8 ± 0.1	4.3 ± 0.1*	3.7 ± 0.1	3.2 ± 0.1*
o-108/100 mg	3.9 ± 0.2	4.2 ± 0.2	3.7 ± 0.2	3.4 ± 0.1
Calcium (mmol/L)				
Control	3.11 ± 0.05	3.61 ± 0.09*	3.09 ± 0.05	3.15 ± 0.04
Vehicle	2.94 ± 0.05	3.37 ± 0.06*	3.06 ± 0.04	2.89 ± 0.04
o-108/25 mg	3.21 ± 0.05	3.30 ± 0.10	3.26 ± 0.19	3.11 ± 0.29
o-108/50 mg	3.07 ± 0.06	3.47 ± 0.09*	3.06 ± 0.09	2.98 ± 0.08
o-108/100 mg	3.11 ± 0.05	3.25 ± 0.13	3.12 ± 0.05	2.86 ± 0.06*
Iron-serum (µmol/L)				
Control	40.9 ± 3.4	31.6 ± 2.4*	34.9 ± 2.6	46.1 ± 1.8
Vehicle	34.2 ± 1.7	26.5 ± 2.4*	32.1 ± 2.1	43.7 ± 2.7*
o-108/25 mg	36.5 ± 4.1	22.2 ± 5.6	35.5 ± 4.6	42.8 ± 3.6
o-108/50 mg	29.5 ± 4.4	27.3 ± 3.5	35.8 ± 3.2	41.1 ± 2.9*
o-108/100 mg	30.1 ± 5.4	20.8 ± 2.9	31.0 ± 2.8	46.8 ± 2.7*
Cholesterol (µmol/L)				
Control	1.81 ± 0.48	1.41 ± 0.27	1.53 ± 0.31	0.97 ± 0.17
Vehicle	1.50 ± 0.15	1.80 ± 0.17*	1.16 ± 0.16*	1.15 ± 0.17
o-108/25 mg/kg	1.73 ± 0.42	2.28 ± 0.32*	1.71 ± 0.37	1.19 ± 0.25
o-108/50 mg/kg	1.42 ± 0.26	2.18 ± 0.37*	1.36 ± 0.23	1.10 ± 0.14
o-108/100 mg/kg	1.87 ± 0.22	2.86 ± 0.20*cv	1.64 ± 0.15	1.08 ± 0.13*
Creatinine (µmol/L)				
Control	112.7 ± 4.5	109.5 ± 5.4	118.2 ± 6.6	106.8 ± 8.1
Vehicle	109.1 ± 4.7	100.1 ± 5.5*	106.4 ± 4.8	111.3 ± 3.8
o-108/25 mg/kg	105.0 ± 1.5	97.3 ± 3.7	115.0 ± 5.6	150.1 ± 8.7*
o-108/50 mg/kg	110.2 ± 2.6	129.8 ± 22.4	111.0 ± 3.8	117.6 ± 7.8
o-108/100 mg/kg	103.0 ± 6.4	144.2 ± 19.5	112.8 ± 5.5*	127.8 ± 14.3
ALT (µkat/L)				
Control	1.19 ± 0.15	1.37 ± 0.13	1.22 ± 0.18	0.99 ± 0.18
Vehicle	1.51 ± 0.24	1.77 ± 0.31	1.19 ± 0.12	0.92 ± 0.05*
o-108/25 mg/kg	1.91 ± 0.31	1.94 ± 0.28	1.40 ± 0.13	1.13 ± 0.13*
o-108/50 mg/kg	1.69 ± 0.35	1.50 ± 0.25	1.06 ± 0.16	0.97 ± 0.18
o-108/100 mg/kg	1.28 ± 0.14	1.41 ± 0.26	0.68 ± 0.15*	0.70 ± 0.15*
AST (µkat/L)				
Control	0.60 ± 0.11	0.86 ± 0.07	0.75 ± 0.17	0.68 ± 0.06
Vehicle	0.67 ± 0.09	1.24 ± 0.31	0.52 ± 0.05	0.68 ± 0.04
o-108/25 mg/kg	0.70 ± 0.13	0.55 ± 0.06*	0.56 ± 0.09	0.70 ± 0.05
o-108/50 mg/kg	0.55 ± 0.15	0.53 ± 0.04	0.49 ± 0.04	0.51 ± 0.06
o-108/100 mg/kg	0.71 ± 0.10	0.62 ± 0.11	0.42 ± 0.06	0.66 ± 0.20
ALP (µkat/L)				
Control	2.16 ± 0.32	1.32 ± 0.16*	2.10 ± 0.26	1.93 ± 0.21
Vehicle	2.73 ± 0.46	1.93 ± 0.36	2.10 ± 0.32	1.73 ± 0.28*
o-108/25 mg/kg	2.27 ± 0.23	1.51 ± 0.20*	2.10 ± 0.31	1.76 ± 0.26
o-108/50 mg/kg	2.76 ± 0.48	1.61 ± 0.25	2.46 ± 0.48*	2.05 ± 0.50*
o-108/100 mg/kg	3.92 ± 0.86	2.27 ± 0.64*	2.81 ± 0.65*	2.37 ± 0.64*
Bilirubin (µmol/L)				
Control	2.8 ± 0.5	2.8 ± 0.3	2.5 ± 0.2	2.9 ± 0.3
Vehicle	2.8 ± 0.5	2.1 ± 0.3	2.5 ± 0.5	2.5 ± 0.3
o-108/25 mg/kg	3.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0	2.5 ± 0.3
o-108/50 mg/kg	2.6 ± 0.3	2.4 ± 0.4	1.6 ± 0.3*	2.6 ± 0.3
o-108/100 mg/kg	3.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0	2.0 ± 0.3*	3.0 ± 0.0
Albumin (g/L)				
Control	55.0 ± 0.9	52.6 ± 1.1	53.9 ± 1.3	55.3 ± 0.9
Vehicle	56.5 ± 0.8	52.1 ± 0.5*	55.5 ± 0.8	53.4 ± 0.9*
o-108/25 mg/kg	51.0 ± 0.9vh	49.5 ± 2.7*	52.6 ± 2.8	49.2 ± 3.3*c
o-108/50 mg/kg	56.3 ± 0.6	53.4 ± 0.8*	54.8 ± 1.1	47.7 ± 1.3*cv
o-108/100 mg/kg	57.4 ± 0.8c	54.1 ± 0.7*	55.8 ± 1.0	50.5 ± 1.3*
LDH (µkat/L)				
Control	8.53 ± 1.25	12.88 ± 1.24*	7.00 ± 1.33	7.80 ± 0.62
Vehicle	5.85 ± 0.75	13.89 ± 3.11*	13.89 ± 3.11*	8.98 ± 0.82*
o-108/25 mg/kg	6.71 ± 0.71	9.97 ± 1.91	9.97 ± 1.91	10.7 ± 1.48*
o-108/50 mg/kg	6.56 ± 1.26	9.99 ± 1.11	9.99 ± 1.11	7.84 ± 1.71
o-108/100 mg/kg	9.44 ± 1.26	13.81 ± 1.39	8.40 ± 0.66	7.91 ± 1.01

Statistical significance: *comparison with the initial values within one group (paired *t*-test, *P* < 0.05); c: comparison with the control group; v: comparison with vehicle group; h: comparison with highest dose (100 mg/kg) group, (ANOVA, *P* < 0.05).

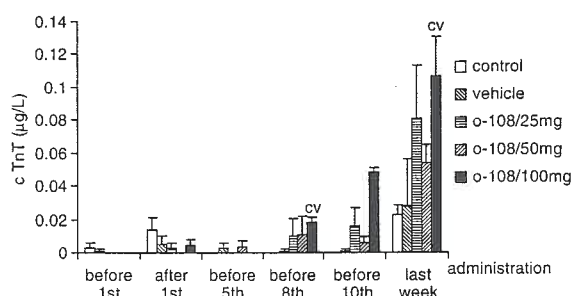


Figure 2 Cardiac troponin T plasma concentrations. Statistical significance: *(paired *t*-test, $P < 0.05$) comparison with the initial values, (ANOVA, $P < 0.05$) comparison between treatments: c, comparison with control group; v, comparison with vehicle group.

and antimalarial) were already reported for some pyridoxal *o*-chlorobenzoyl hydrazone analogues.^{9,25-27} Thus, besides the interesting iron excretion properties of this novel chelator *o*-108,¹⁶ a number of other potential uses is opening.

Besides the research focused on potentially beneficial pharmacodynamic properties of any new chemical entity, it is no less important to assess also its safety and tolerability. This approach is considered to be of value even in the early part of drug development, since it may save the budget and accelerate the whole process of identifying pharmacologically active compounds with acceptable toxicity. Much interest in this field is dedicated to a recently constituted discipline, safety pharmacology, which has become an essential interface of pharmacology and toxicology in non-clinical settings.²⁸

This study was designed as a preliminary safety pharmacological study of the novel iron chelating agent *o*-108 after its repeated administration. The dosage schedule used in this experiment was derived from the study focused on weekly cumulative iron excretion following single administration of the chelator.¹⁶ The study presented herein shows that this novel iron chelator was well tolerated, though at

Table 2 Selected haematological parameters

Parameter/group	Before the first administration	Before the fifth administration	End of study
Leukocytes ($\times 10^9/L$)			
Control	7.1 \pm 0.5	6.5 \pm 0.7	5.1 \pm 0.5*
Vehicle	6.6 \pm 0.3	6.0 \pm 0.3*	5.5 \pm 0.7
<i>o</i> -108/25 mg/kg	6.2 \pm 0.5	7.5 \pm 0.7*	6.0 \pm 0.5
<i>o</i> -108/50 mg/kg	6.9 \pm 0.2	6.3 \pm 0.6	5.1 \pm 0.7
<i>o</i> -108/100 mg/kg	6.3 \pm 0.9	7.7 \pm 0.7	5.2 \pm 0.3
Erythrocytes ($\times 10^{12}/L$)			
Control	5.72 \pm 0.18	5.99 \pm 0.10	5.83 \pm 0.12
Vehicle	5.84 \pm 0.18	5.56 \pm 0.14*	5.68 \pm 0.12
<i>o</i> -108/25 mg/kg	5.68 \pm 0.19	5.60 \pm 0.15	5.34 \pm 0.18
<i>o</i> -108/50 mg/kg	5.92 \pm 0.13	5.86 \pm 0.16	5.38 \pm 0.15
<i>o</i> -108/100 mg/kg	5.88 \pm 0.07	5.56 \pm 0.09	5.68 \pm 0.12
MCV (fl)			
Control	67.3 \pm 0.9	69.6 \pm 1.1	69.0 \pm 0.7
Vehicle	68.8 \pm 1.1	70.9 \pm 0.8*	69.0 \pm 1.0
<i>o</i> -108/25 mg/kg	66.8 \pm 0.4	66.8 \pm 1.1	69.9 \pm 1.3
<i>o</i> -108/50 mg/kg	66.3 \pm 1.0	69.6 \pm 0.8*	70.4 \pm 1.4*
<i>o</i> -108/100 mg/kg	66.4 \pm 0.4	70.1 \pm 1.1*	69.9 \pm 0.7*
Haemoglobin (g/L)			
Control	125.3 \pm 3.4	132.9 \pm 1.8*	130.4 \pm 1.8
Vehicle	128.1 \pm 3.1	126.7 \pm 2.9	129.5 \pm 2.2
<i>o</i> -108/25 mg/kg	120.3 \pm 5.5	118.8 \pm 2.7*c	118.3 \pm 5.2
<i>o</i> -108/50 mg/kg	127.2 \pm 2.6	132.6 \pm 2.7	120.4 \pm 4.0
<i>o</i> -108/100 mg/kg	125.4 \pm 1.9	127.8 \pm 1.3	123.4 \pm 3.7
Haematocrit			
Control	0.385 \pm 0.012	0.417 \pm 0.008*	0.402 \pm 0.007
Vehicle	0.399 \pm 0.009	0.393 \pm 0.008	0.391 \pm 0.008
<i>o</i> -108/25 mg/kg	0.379 \pm 0.013	0.374 \pm 0.009c	0.373 \pm 0.017
<i>o</i> -108/50 mg/kg	0.392 \pm 0.008	0.407 \pm 0.010*	0.379 \pm 0.012
<i>o</i> -108/100 mg/kg	0.391 \pm 0.004	0.404 \pm 0.007*	0.386 \pm 0.012
Thrombocytes ($\times 10^9/L$)			
Control	469 \pm 58	399 \pm 28	445 \pm 31
Vehicle	330 \pm 21	352 \pm 19	370 \pm 31
<i>o</i> -108/25 mg/kg	327 \pm 23	448 \pm 72	355 \pm 31
<i>o</i> -108/50 mg/kg	305 \pm 34	341 \pm 25	327 \pm 26
<i>o</i> -108/100 mg/kg	306 \pm 34	357 \pm 43	349 \pm 31

Statistical significance: *(paired *t*-test, $P < 0.05$) comparison with the initial values, (ANOVA, $P < 0.05$); c: comparison with control group; v: comparison with vehicle group.

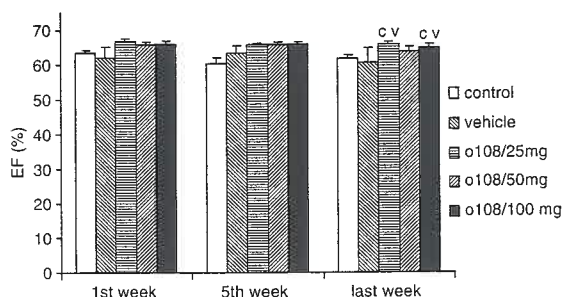


Figure 3 Left ventricular ejection fraction. Statistical significance: *(paired *t*-test, $P < 0.05$) comparison with the initial values, (ANOVA, $P < 0.05$) comparison between treatments: c, with control group; v, with vehicle group.

the highest dose (100 mg/kg) it caused minor disturbances in animal activity, weight gain and plasma biochemistry. The selectivity of chelation was evidenced by invariability of plasma levels of biologically important ions (e.g., calcium). In intact (i.e., non-iron overloaded) animals, the majority of iron is present in haemoproteins (hemoglobin, myoglobin, etc.), transport protein (transferin) and storage proteins (ferritin), and hence is mostly inaccessible to the chelator. Thus, the absence of sideropenia is a positive observation and may be explained by the limited amount of iron, which is present in the chelatable pool in the intact animals.

The determination of plasma enzymes (e.g., ALT, AST) as well as the histopathological examination of the liver did not reveal any abnormalities induced by the administration of the chelator. Changes in lipid metabolism were transient and should be interpreted as negligible. On the other hand, the scattered elevation of creatinaemia warrants further vigilance, despite the negative result of careful

Table 3 Invasive cardiovascular measurements

	dP/dt_{max} ($kPa \cdot s^{-1}$)	BP (mmHg)	HR (min^{-1})
Control	1344.8 ± 61.2	103.9 ± 2.9	286.9 ± 18.1
Vehicle	1152.6 ± 88.7	99.2 ± 4.1	309.2 ± 6.1
o-108/25 mg/kg	1457.1 ± 37.6	95.2 ± 7.3	320.5 ± 6.5
o-108/50 mg/kg	1389.5 ± 48.7	93.7 ± 2.5	303.8 ± 5.7
o-108/100 mg/kg	1357.8 ± 123.5	87.4 ± 4.6	312.8 ± 2.9

dP/dt_{max} : maximal rate of the pressure rise in the isovolumic phase of the systole; BP: mean blood pressure in the right femoral artery; HR: heart rate.

histological evaluation. At the level of light microscopic observation and with the use of basic histological staining methods, it was not possible to distinguish clearly the changes either within the different dosage schedules of the chelator or in comparison with the control and vehicle groups. Mild changes occasionally found in the vehicle group might be associated with the previously described effects of Cremophor EL.^{29,30} The presence of very slight ultrastructural changes cannot be excluded at this time and may be the subject of further investigation. Somewhat higher cardiac troponin T plasma concentrations in the highest dose of the chelator had no correlate in either myocardial histopathology or in functional cardiovascular parameters. Although there were no marked gross changes in ECG, a specific telemetric study should be performed before the final statement. Nonetheless, especially in high dose schedules of o-108, it might be relevant to monitor cardiac functions.

In conclusion, the repeated 10-week administration of the novel iron chelator pyridoxal *o*-chlorobenzoyl hydrazone in three escalating doses (25, 50 and 100 mg/kg weekly) did not induce any

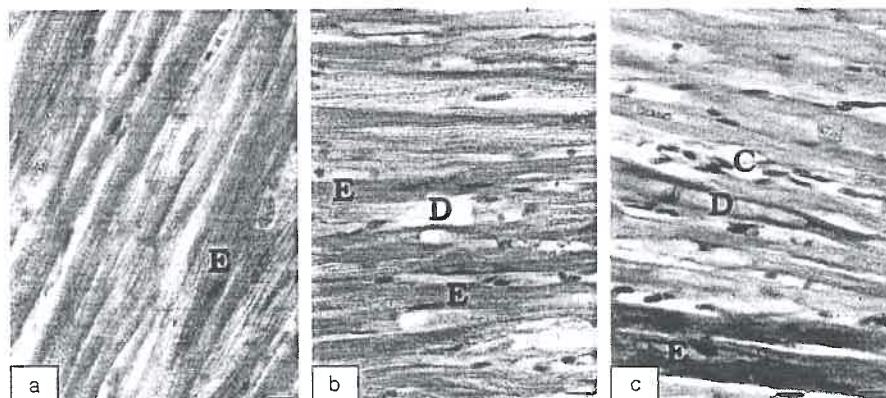


Figure 4 Myocardium of the left ventricular wall (a, control group; b, vehicle group; c, o-108/100 mg/kg group). Some cardiomyocytes revealed intensely eosinophilic cytoplasm (E) not only in the group treated with the vehicle (b) and o-108 (c) but also in control animals (a). As the number of those cells is low, the changes cannot be described as pathological. Scattered degenerated cells (D) were present in both tested groups (b, c). Since the number of those myocytes was low, no typical mononuclear infiltrate followed. C, capillary. Masson's blue trichrome. Bar 10 μm .

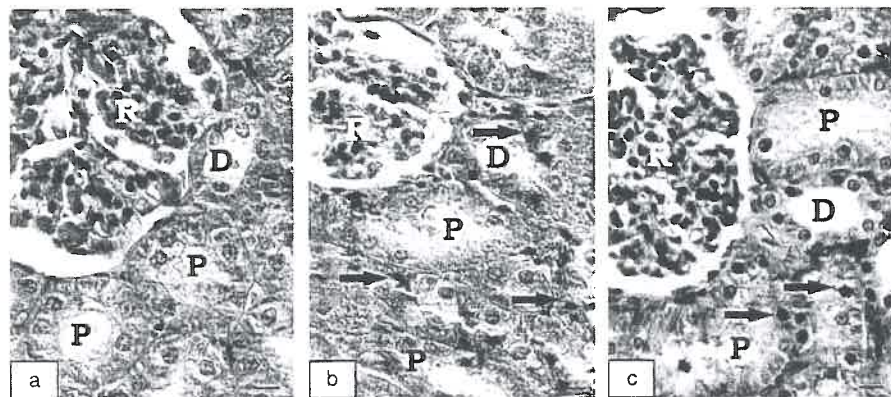


Figure 5 Kidney (a, control group; b, vehicle group; c, o-108/100 mg group). Cortex with renal corpuscles (R); glomerular capillaries are marked by erythrocytes. Only proximal (P) and distal (D) tubules were slightly damaged in the group with o-108 (c), a little more in the vehicle group (b) compared with controls (a). Intensely eosinophilic cytoplasm appeared in some cells, mostly those of the proximal tubules in the group with 100 mg/kg o-108 (c); their nuclei became pyknotic (dark-stained) – arrows. Most of the proximal (P) and distal (D) tubules in the kidneys of rabbits in the vehicle group (b) showed higher eosinophilia and granulated cytoplasm, and also the number of pyknotic nuclei was rather higher (arrows). Masson's blue trichrome. Bar 10 μ m.

premature deaths and was generally well-tolerated in rabbits. No distinct abnormalities could be observed in most biochemical, haematological, histopathological and functional parameters. Hence, the data from this study suggest that pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone (o-108) is a promising drug from the standpoint of the possibility of its repeated administration and it warrants further investigation.

Acknowledgements

The authors would like to thank L Koželuhová for her skilful technical assistance during the whole study. This study was supported by a grant from the GA CR No. 305/03/1511.

References

- 1 Aisen P, Enns C, Wessling-Resnick M. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; **33**: 940–59.
- 2 Liochev SI. The mechanism of 'Fenton-like' reactions and their importance for biological systems. A biologist's view. *Met Ions Biol Syst* 1999; **36**: 1–39.
- 3 Baranwal AK, Singhi SC. Acute iron poisoning: management guidelines. *Indian Pediatr* 2003; **40**: 534–40.
- 4 Wong C, Richardson DR. Beta-thalassaemia: emergence of new and improved iron chelators for treatment. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; **35**: 1144–49.
- 5 Chaston TB, Richardson DR. Iron chelators for the treatment of iron overload disease: relationship between structure, redox activity, and toxicity. *Am J Hematol* 2003; **73**: 200–10.
- 6 Voest EE, Vreugdenhil G, Marx JJ. Iron-chelating agents in non-iron overload conditions. *Ann Intern Med* 1994; **120**: 490–99.
- 7 Richardson DR. Novel chelators for central nervous system disorders that involve alterations in the metabolism of iron and other metal ions. *Ann NY Acad Sci* 2004; **1012**: 326–41.
- 8 Buss JL, Torti FM, Torti SV. The role of iron chelation in cancer therapy. *Curr Med Chem* 2003; **10**: 1021–34.
- 9 Walcourt A, Loyevsky M, Lovejoy DB, Gordeuk VR, Richardson DR. Novel aroylhydrazones and thiosemicarbazone iron chelators with anti-malarial activity against chloroquine-resistant and -sensitive parasites. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; **36**: 401–407.
- 10 Olivieri NF, Brittenham GM, McLaren CE, Templeton DM, Cameron RG, McClelland RA *et al.* Long-term safety and effectiveness of iron-chelation therapy with deferoxamine for thalassaemia major. *New Engl J Med* 1998; **339**: 417–23.
- 11 Brittenham GM, Nathan DG, Olivieri NF, Pippard MJ, Weatherall DJ. Deferiprone versus desferrioxamine in thalassaemia, and T2* validation and utility. *Lancet* 2003; **361**: 183–84.
- 12 Buss JL, Hermes-Lima M, Ponka P. Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and its analogues. *Adv Exp Med Biol* 2002; **509**: 205–29.
- 13 Baker E, Richardson D, Gross S, Ponka P. Evaluation of the iron chelation potential of hydrazones of pyridoxal, salicylaldehyde and 2-hydroxy-1-naphthylaldehyde using the hepatocyte in culture. *Hepatology* 1992; **15**: 492–501.
- 14 Buss JL, Arduini E, Ponka P. Mobilization of intracellular iron by analogs of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) is determined by the membrane permeability of the iron-chelator complexes. *Biochem Pharmacol* 2002; **64**: 1689–701.
- 15 Buss JL, Arduini E, Shephard KC, Ponka P. Lipophilicity of analogs of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) determines the efflux of iron complexes and

- toxicity in K562 cells. *Biochem Pharmacol* 2003; **65**: 349–60.
- 16 Link G, Ponka P, Konijn AM, Breuer W, Cabantchik ZI, Hershko C. Effects of combined chelation treatment with pyridoxal isonicotinoyl hydrazone analogs and deferoxamine in hypertransfused rats and in iron-loaded rat heart cells. *Blood* 2003; **101**: 4172–79.
 - 17 Edward JT, Gauthier M, Chubb FL, Ponka P. Synthesis of new acylhydrazones as iron-chelating compounds. *J Chem Eng Data* 1988; **33**: 538–40.
 - 18 Hasinoff BB, Hellmann K, Herman EH, Ferrans VJ. Chemical, biological and clinical aspects of dexrazoxane and other bisdioxopiperazines. *Curr Med Chem* 1998; **5**: 1–28.
 - 19 Bhattacharya M, Ponka P, Hardy P, Hanna N, Varma DR, Lachapelle P *et al.* Prevention of postasphyxia electroretinal dysfunction with a pyridoxal hydrazone. *Free Rad Biol Med* 1997; **22**: 11–16.
 - 20 Mauricio AQ, Lopes GK, Gomes CS, Oliveira RG, Alonso A, Hermes-Lima M. Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone inhibits iron-induced ascorbate oxidation and ascorbyl radical formation. *Biochim Biophys Acta* 2003; **1620**: 15–24.
 - 21 Santos NC, Castilho RF, Meinicke AR, Hermes-Lima M. The iron chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone inhibits mitochondrial lipid peroxidation induced by Fe(II)-citrate. *Eur J Pharmacol* 2001; **428**: 37–44.
 - 22 Simunek T, Klimtova I, Kaplanova J, Šterba M, Mazurova Y, Adamcova M *et al.* Study of daunorubicin cardiotoxicity prevention with pyridoxal isonicotinoyl hydrazone in rabbits. *Pharmacol Res* 2005; **51**: 223–31.
 - 23 Horackova M, Ponka P, Byczko Z. The antioxidant effects of a novel iron chelator salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone in the prevention of H₂O₂ injury in adult cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2000; **47**: 529–36.
 - 24 Simunek T, Boer C, Bouwman RA, Vlasblom R, Versteilen AM, Šterba M *et al.* SIH – a novel lipophilic iron chelator-protects H9c2 cardiomyoblasts from oxidative stress-induced mitochondrial injury and cell death. *J Mol Cell Cardiol* 2005; **39**: 345–54.
 - 25 Buss JL, Neuzil J, Gellert N, Weber C, Ponka P. Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone analogs induce apoptosis in hematopoietic cells due to their iron-chelating properties. *Biochem Pharmacol* 2003; **65**: 161–72.
 - 26 Yuan J, Lovejoy DB, Richardson DR. Novel di-2-pyridyl-derived iron chelators with marked and selective antitumor activity: *in vitro* and *in vivo* assessment. *Blood* 2004; **104**: 1450–58.
 - 27 Golenser J, Domb A, Teomim D, Tsafack A, Nisim O, Ponka P *et al.* The treatment of animal models of malaria with iron chelators by use of a novel polymeric device for slow drug release. *J Pharmacol Exp Therapeut* 1997; **281**: 1127–35.
 - 28 Claude JR, Claude N. Safety pharmacology: an essential interface of pharmacology and toxicology in the non-clinical assessment of new pharmaceuticals. *Toxicol Letts* 2004; **151**: 25–28.
 - 29 Gelderblom H, Verweij J, Nooter K, Sparreboom A, Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *Eur J Cancer* 2001; **37**: 1590–98.
 - 30 Sokol PP, Capodagli LC, Dixon M, Holohan PD, Ross CR, Coulson R *et al.* Cyclosporin A and vehicle toxicity in primary cultures of rabbit renal proximal tubule cells. *Am J Physiol* 1990; **259**: C897–903.

PŘÍLOHA 4

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



HPLC determination of a novel aroylhydrazone iron chelator (*o*-108) in rabbit plasma and its application to a pilot pharmacokinetic study

Petra Kovaříková^{a,*}, Jiří Klimeš^a, Martin Štěrba^b, Olga Popelová^b,
Vladimír Geršl^b, Přemysl Poňka^c

^a Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

^b Department of Pharmacology, Faculty of Medicine in Hradec Králové, Šimkova 870, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

^c Lady Davis Institute for Medical Research, McGill University, Montreal, PQ, Canada H3A 2T5

Received 13 February 2006; accepted 14 April 2006

Available online 24 May 2006

Abstract

A high performance liquid chromatographic method for the determination of a biocompatible iron chelator, pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone (*o*-108), in rabbit plasma was developed and validated. The separation was achieved on a C18 column with the mobile phase composed of a mixture of 0.01 M phosphate buffer (pH 6) with the addition of EDTA (2 mM), methanol and acetonitrile (42:24:14; v/v/v). The method was validated with respect to selectivity, linearity (0.8–150 µg/mL), intra- and inter-day variability and stability. This method was successfully applied to the analysis of the samples obtained from a pilot pharmacokinetic experiment, in which the chelator was administered intravenously to rabbits. © 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone; *o*-108; Iron chelator; HPLC; Pharmacokinetics

1. Introduction

Iron chelation therapy represents the only effective principle of how to reduce iron burden in patients suffering from chronic iron overload [1]. Furthermore, recent information strongly suggests that free iron plays an important role in a number of human pathologies [2]. Thus, the principle of selective iron chelation represents a unique approach for a novel drug development. To date, iron chelators have been reported to demonstrate antioxidative, antiproliferative, antimicrobial, cardioprotective and neuroprotective effects [3–9].

Pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone (Fig. 1) is a selective iron chelator belonging to the group of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) analogues. *Ortho*-108 is a yellowish, crystalline substance which can be readily prepared by Schiff-base condensation from pyridoxal and 2-chlorobenzoyl hydrazide [10]. Since this chelator is more lipophilic than its lead compound (PIH), it can reach the intracellular tar-

gets more effectively. Furthermore, *o*-108 is more effective in the mobilization of iron from reticulocytes and K562 cells [11,12]. *Ortho*-halogenated analogues of PIH were shown to be less toxic than the *meta* and *para* substituted ones [12]. A recent study has shown good tolerability and safety of *o*-108 after weekly repeated administration to rabbits [13]. Oral and intraperitoneal administration of *o*-108 has induced significantly dose-dependent cumulative excretion of radiolabelled iron in a model of the iron-overloaded rat [14].

Although *o*-108 seems to have promising pharmacodynamic properties, there is no precise and selective analytical method suitable for the determination of *o*-108 or another pyridoxal benzoyl hydrazone derivative in biological material. From that point, it is clear why bioavailability, half-life of elimination and other basic pharmacokinetic parameters of these compounds remain undetermined. While nearly hundreds of aroylhydrazones have been synthesized and successfully tested for biological activity, there is only our recent analytical contribution which reports about the development of a HPLC technique suitable for the determination of a structurally related agent—salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH) in plasma [15]. However, chromatographic conditions for the analysis of purity and stability of

* Corresponding author. Tel.: +420 495 067 111; fax: +420 49 55 124 23.

E-mail address: Petra.Kovarikova@faf.cuni.cz (P. Kovaříková).

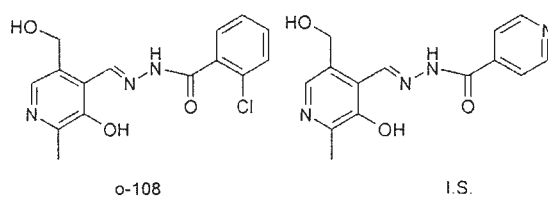


Fig. 1. The chemical structures of *o*-108 and the internal standard (PIH).

o-108 have already been developed in our previously reported paper [16].

The aim of this study was to develop and validate a chromatographic method for the determination of *o*-108 in rabbit plasma and to employ this method in a pilot pharmacokinetic experiment.

2. Experimental

2.1. Materials

Pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone (*o*-108) and PIH were prepared according to the procedures described in our previous study [14]. The structure and purity of these compounds were confirmed by FTIR (a Nicolet Impact 400 spectrophotometer, Thermo, Madison, USA), ^1H and ^{13}C NMR (a Varian Mercury-Vx BB 300 instrument, Palo Alto, USA, operating at 300 MHz for ^1H , 75 MHz for ^{13}C) and HPLC methods [14]. Methanol, acetonitrile, phosphate buffer ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), EDTA, and phosphoric acid were purchased from Lachema (Brno, Czech Republic). Water was purified employing reverse osmosis. Solid phase extraction (SPE) tubes—Discovery[®] DSC-C8 1 mL/100 mg and a vacuum SPE manifold were obtained from Sigma Aldrich (Munich, Germany). Drug-free rabbit plasma was obtained either from the ZOO Servis—(Dvur Kralove, Czech Republic) or from the Faculty of Medicine in Hradec Králové (Hradec Králové, Czech Republic).

2.2. Chromatographic system and conditions

The chromatographic system LC 20A (Shimadzu, Duisburg, Germany) consisted of a DGU-20A3 degasser, LC-20 AD pumps, a SIL-20 AC autosampler, a CTO-20AC column oven, a SPD-20AC UV-vis detector, and a CBM-20AC communication module was used in this study. The separation was achieved on an analytical chromatographic column 250 mm \times 4.6 mm (LiChrospher 100, RP-18, 5 μm) protected with a guard column (Purospher RP-18, 5 μm) purchased from Merck (Darmstadt, Germany). The column oven was set at 25 °C. The mixture of a phosphate buffer (0.01 M NaH_2PO_4 with addition of appropriate amount of EDTA to obtain a concentration of 2 mM, pH 6.0—adjusted with the use of phosphoric acid), methanol and acetonitrile in a ratio 42:24:14 (v/v/v) was employed as a mobile phase. The flow rate 1.0 mL/min was used for the analyses. The detection was performed at 288 nm, the injection volume was 100 μL and the samples in the autosampler were kept at 15 °C. The chromatographic data were processed employing the

LC-solution software, version 2.21 SP1 (Shimadzu, Duisburg, Germany).

2.3. Preparation of the stock and spiking solutions

The stock solutions of *o*-108 and I.S. (9 and 4 mg/mL, respectively) were prepared by dissolving an appropriate amount of the substance in methanol. The spiking solutions of *o*-108 (9.0–0.048 mg/mL) and I.S. (2.5 mg/mL) were obtained by appropriate dilution of the stock solution with methanol. These solutions were used to prepare the calibration and quality control (QC) samples. The stock and spiking solutions were stored at 4 °C for 3 days.

2.4. Calibration and QC samples preparation

The calibration samples were prepared by addition of 10 μL of appropriate spiking solutions to 600 μL of drug-free plasma to get nine different samples. Each sample contained *o*-108 in a defined concentration (150–0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and I.S. in a concentration of 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Before SPE extraction, 10 μL of 10 mM EDTA were added into each sample. The same procedure was used to obtain QC samples. These samples were used for the validation procedure and stability testing proposes.

2.5. Sample preparation and solid-phase extraction procedure

The SPE tubes (C8) were conditioned using 1 mL of methanol, followed by 1 mL of phosphate buffer (pH 7). The plasma samples (calibration, QC and *in vivo* study samples) were added into the SPE tube and passed through using vacuum with suction of 5 mmHg. The column was further washed using 1 mL of phosphate buffer (0.01 M NaH_2PO_4 with addition appropriate amount of EDTA to get a concentration of 2 mM; pH 6.0). Finally, the analytes were eluted using 0.7 mL of methanol. Before HPLC analysis, the samples were diluted using 0.7 mL of phosphate buffer (0.01 M NaH_2PO_4 with 2 mM EDTA, pH 6.0).

2.6. Method validation

2.6.1. Selectivity

Selectivity of the method was assessed by analyses of blank plasma samples obtained from eight rabbits.

2.6.2. Linearity

The linearity of the method was evaluated using calibration samples of nine different concentrations of *o*-108 (150, 105, 83, 40, 33, 17, 4, 1 and 0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in the presence of 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of internal standard. The calibration curves were constructed by plotting the peak area ratios (*o*-108/I.S.) to the corresponding concentrations of *o*-108. The accuracy of the calibration curves was tested by a comparison of the back-calculated concentrations and the nominal concentrations for all calibration levels.

2.6.3. Precision, accuracy and the lower limit of quantification (LLOQ)

The QC samples of five different concentrations (150, 83, 29, 1.2 and 0.8 µg/mL) were prepared and analysed according to the procedures described in Sections 2.4 and 2.5. The precision (R.S.D.) and accuracy (percentage of recovery) of these analyses were calculated to obtain intra-day variation. The inter-day variation was calculated from the results of the analyses of the QC samples performed at 3 different days. LLOQ was determined as the concentration which can be evaluated with the precision and accuracy of at least 20% and 80–120%, respectively. Furthermore, the analyte response at this level should be at least five-times higher than the response of the blank sample [17].

2.6.4. Recovery of the extraction procedure

The recovery of the extraction procedure was evaluated using the QC samples at three different concentrations of *o*-108 (150, 40 and 0.8 µg/mL) and one concentration of I.S. (40 µg/mL). The recovery was calculated by comparing the peak areas of extracted samples and peak areas of unextracted standards.

2.6.5. Stability

The stability of the stock and spiking solutions stored at 4 °C for 3 days was tested. The stability of the samples kept in the autosampler (15 °C) for 24 h was assessed as well. The stability of the chelator in plasma (both freeze–thaw stability and the long-term stability) was tested using the QC samples ($n = 30$) of three different concentrations of *o*-108 (150, 40 and 1 µg/mL). These QC samples were prepared (Section 2.4) and frozen immediately (−80 °C). After 1 h, a half of these samples (five per each concentration) were thawed at room temperature and treated immediately. The rest of the samples were stored at −80 °C for 30 days. After this time period, the samples were thawed at room temperature and analysed instantly. The stability of the chelator in plasma was expressed as the difference between the concentrations of *o*-108 determined in the QC samples analysed immediately after preparation and the QC samples analysed after the stability procedure. The conditions used in the stability study have reflected the situations encountered during the real samples handling, storage, and preparation.

2.7. Pharmacokinetic experiment

The Chinchilla male rabbits ($n = 5$) weighing 3.5–4.5 kg were used in this pilot pharmacokinetic study. The animals were housed under a 12-h light cycle, constant temperature and humidity. The animals had free access to water and a standard laboratory pellet diet. The animals were fasted overnight before entering the pharmacokinetic study. The experiments were performed in accordance with the “Guide for the care and use of laboratory animals” (1996) and were approved by The Ethical Committee of the Medical Faculty in Hradec Králové.

The rabbits were anaesthetized with pentobarbital (Nembutal, 30 mg/kg, i.v.). The left carotid artery was prepared and a

PE-cannula was introduced through the artery to the aorta to allow prompt sampling of blood. Due to the limited solubility of *o*-108, the solution for intravenous administration was designed using saline and pharmaceutically acceptable co-solvents PEG 300 and ethanol in a ratio of 5:4:1 (v/v/v). The chelator *o*-108 was administered at a dose of 10 mg/kg by a slow (3 min) intravenous injection through a cannula (Neoflon) inserted into the marginal ear vein. Blood sampling (1.5 mL) was performed 5 min before drug administration (blank), during drug administration (1st, 2nd and 3rd min), and subsequently in the selected intervals (through a range of 4–210 min). The volume loss was compensated with sterile saline. The blood was harvested into heparinized tubes (Vacuette) and centrifuged as soon as possible ($2000 \times g$). Plasma was collected and frozen immediately (−80 °C). The non-compartmental pharmacokinetic analysis was performed using Kinetica software, version 4 (Thermo Electron Corporation, Waltham, USA).

3. Results and discussion

3.1. Method development

The chromatographic separation previously developed for the determination of purity of *o*-108 was modified to be suitable for analyses of this chelator in plasma. Due to the similarity in the chemical structure and anticipated closeness in the extraction recovery, PIH was chosen as the internal standard. The composition of the mobile phase was changed in order to reach a sufficient separation of *o*-108 and I.S. in an acceptable run-time and without interferences with possible metabolites of the chelator (pyridoxal and 2-chlorobenzoyl hydrazone).

Different SPE conditions were tested to reach an acceptable and reproducible recovery of both *o*-108 and I.S. At the beginning of the experiment, the effectiveness of the isolation procedure on different SPE columns (C18, C8 and phenyl) was investigated. Since the highest recovery was reached on a C8 column, this sorbent was chosen for further sample clean up procedure optimization. The addition of a small amount of EDTA into the phosphate buffer (used to wash the SPE column) improved the recovery of both *o*-108 and I.S. Two different organic solvents (methanol, acetonitrile or their mixture) were tested to remove the analytes from the SPE columns. In comparison with acetonitrile, methanol gave higher recoveries of both compounds.

3.2. Method validation

3.2.1. Selectivity

The chromatogram of the blank plasma sample is shown in Fig. 2. No interferences were detected at the retention times of either *o*-108 or I.S.

3.2.2. Linearity

The relationship between the peak area ratios (*o*-108/I.S.) and appropriate concentrations was linear over the tested range (0.8–150 µg/mL). The typical equation of the calibration curve ($n = 3$) was: $y = 0.0362x + 0.007$. The correlation coefficient (r^2)

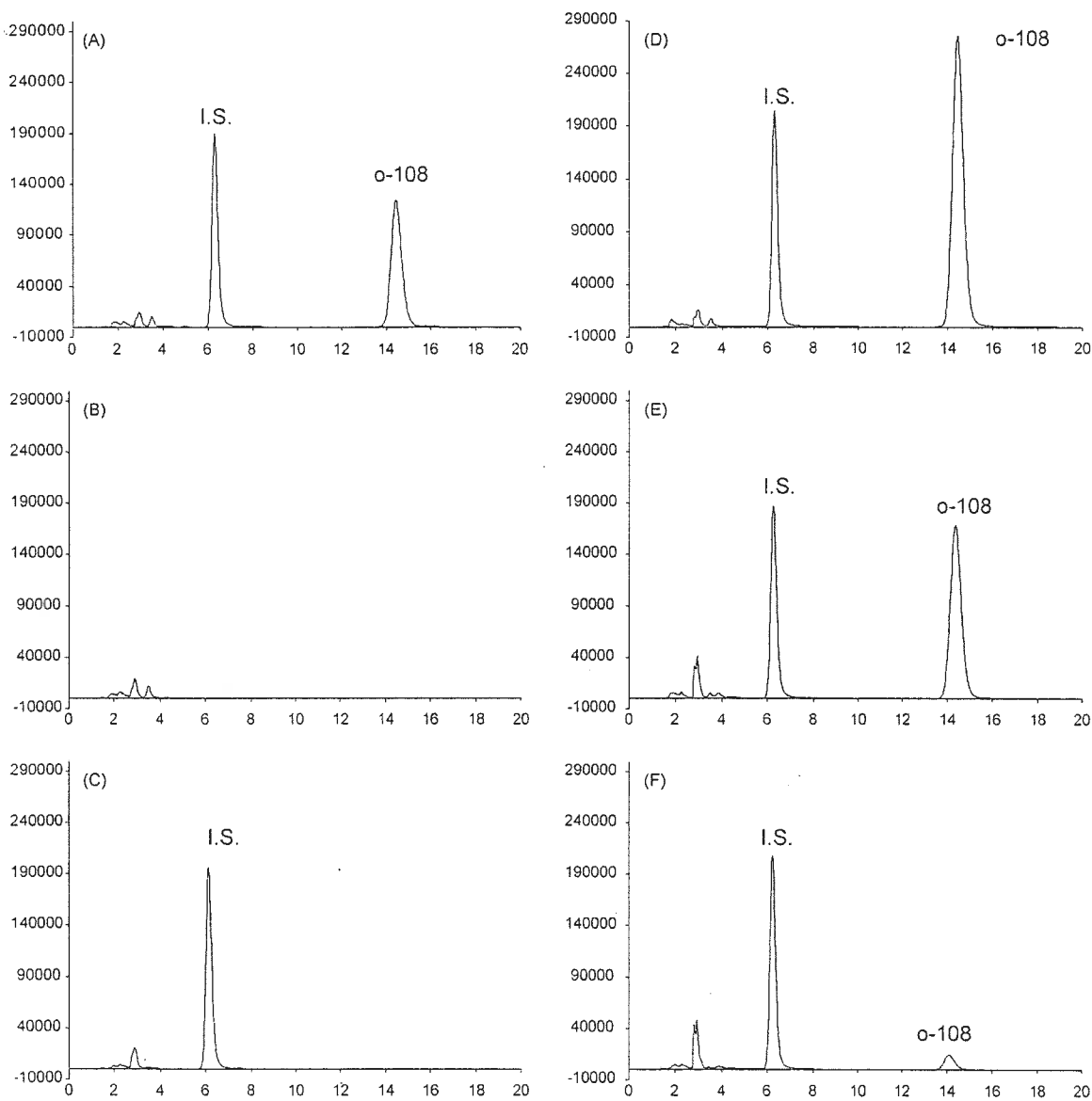


Fig. 2. The chromatograms of extracted plasma samples: (A) spiked samples (40 µg/mL both *o*-108 and I.S.); (B) blank sample; (C) spiked sample (40 µg/mL of I.S.); (D) sample taken in the 3th min of the pharmacokinetic experiment ($c_{max} = 101$ µg/mL); (E) sample taken in the 5th min of the pharmacokinetic experiment (45 µg/mL); (F) sample taken in the 60th min of the *in vivo* experiment (3 µg/mL).

of all calibration curves was ≥ 0.999 . The back-calculated concentrations for all concentration levels are shown in the Table 1. The representative chromatogram of the sample spiked with *o*-108 and I.S. is shown in Fig. 2.

3.2.3. Precision, accuracy and the lower limit of quantification, extraction recovery

The intra- and inter-day precision and accuracy through the concentration range of the QC samples are shown in

Table 1
Summary of the back-calculated concentrations of the calibration curves for *o*-108

Theoretical concentration (µg/mL)	150.0	105.0	83.3	40.0	33.3	17.0	4.17	1.0	0.8
Back-calculated concentration (µg/mL)	146.40	107.56	82.22	39.64	32.78	16.58	3.96	0.90	0.72
Back-calculated concentration (%)	97.60	97.62	98.70	99.10	98.45	97.51	94.90	90.13	90.45

Table 2
The intra-day precision and accuracy of the assay

Concentration added ($\mu\text{g/mL}$)	Concentration found ($\mu\text{g/mL}$) \pm S.D.	Precision (R.S.D.%)	Accuracy (%)	<i>n</i>
Intra-day				
150.0	152.05 \pm 1.90	1.25	101.37	5
83.3	80.63 \pm 1.51	1.87	96.79	5
29.0	28.30 \pm 0.17	0.60	98.59	5
1.2	1.275 \pm 0.56	4.39	106.31	5
0.8064	0.8924 \pm 0.0174	1.95	110.67	5

Table 3
Inter-day precision and accuracy of the assay

Concentration added ($\mu\text{g/mL}$)	Concentration found ($\mu\text{g/mL}$) \pm S.D.	Precision (R.S.D.%)	Accuracy (%)	<i>n</i>
Inter-day				
150.0	150.56 \pm 2.76	1.84	100.38	15
83.3	81.86 \pm 4.38	5.36	98.28	15
29.0	28.35 \pm 0.457	1.61	98.31	15
1.2	1.2618 \pm 0.056	4.43	105.15	15
0.8064	0.8969 \pm 0.078	8.71	113.74	15

Tables 2 and 3. The lower limit of quantification was determined to be 0.8 $\mu\text{g/mL}$. The precision and accuracy of the assay at LLQO are presented in Tables 2 and 3. The results of the validation procedure indicated a satisfying intra- and inter-day variation of the assay according to the given recommendation [17]. The recovery of the SPE procedure is shown in Table 4. Although the extraction recovery was not totally complete, it was consistent, precise and reproducible, which is in line with the FDA Guideline [16].

3.2.4. Stability

The stock and spiking solutions were stable under the stored conditions. The samples maintained in the autosampler at 15 °C were stable during the time of the study (24 h). The results of the freeze–thaw and long-term stability study are shown in Table 5. These results indicated that the stability of the chelator was within an acceptable range ($\pm 15\%$ deviation from the nominal concentration of the analyte) [17].

3.2.5. Pharmacokinetic experiment

In a pilot pharmacokinetic experiment, the plasma concentration–time profile of the novel iron chelator *o*-108 after intravenous administration was determined. After injection

Table 4
The effectiveness of the SPE procedure for isolation of *o*-108 from rabbit plasma

Analyte	Concentration added ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%) \pm S.D.	R.S.D. (%)	<i>n</i>
Extraction recovery				
<i>o</i> -108	150.0	86.30 \pm 3.18	3.68	3
	29.0	83.89 \pm 1.35	1.61	3
	0.8064	83.19 \pm 2.45	2.95	3
I.S.	40	78.80 \pm 2.46	3.13	6

Table 5
The stability of *o*-108 in plasma after one freeze–thaw cycle and after storage at -80 °C for 30 days

Concentration added ($\mu\text{g/mL}$)	Percentage remaining	R.S.D. (%)	<i>n</i>
Stability after freeze–thaw procedure			
150.0	98.28	4.49	3
40.0	94.63	1.15	3
1.0	96.16	8.56	3
Long-term stability			
150.0	91.08	0.72	3
40.0	94.90	0.71	3
1.0	94.94	5.30	3

The results are expressed as the percentage of the concentration remaining at the end of the stability study.

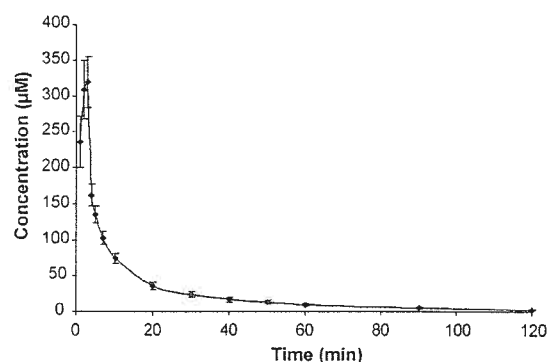


Fig. 3. The plasma concentration–time profile (mean \pm S.E.M.) after i.v. administration of the chelator (*o*-108, 10 mg/kg) to rabbits (*n* = 5).

tion of the chelator in a dose of 10 mg/kg BW, the following concentration–time profile was obtained (Fig. 3). Relatively fast distribution and elimination were observed. The maximal plasma concentrations of *o*-108 on the molar base were surprisingly higher than those previously obtained for its analogue SIH [16]. The basic pharmacokinetic parameters of *o*-108 obtained through the non-compartmental pharmacokinetic analysis are shown in Table 6. The representative chromatograms of the plasma samples taken in the different time period of the pharmacokinetic experiment are shown in the Fig. 2.

Table 6
The basic pharmacokinetic parameters of *o*-108 obtained through non-compartmental pharmacokinetic analysis

Parameter	<i>o</i> -108 (10 mg/kg, i.v.)
c_{max} ($\mu\text{mol/L}$)	236.2 \pm 35.8
t_{max} (min)	2.4 \pm 0.4
V_z (L/kg)	0.352 \pm 0.028
Cl_{tot} ($\text{L}/\text{min kg}^{-1}$)	0.0092 \pm 0.0009
AUC ($\mu\text{mol/L min}^{-1}$)	3598 \pm 454.3
$t_{1/2}$ (min)	27.7 \pm 2.98

c_{max} : maximal concentration determined in the study; t_{max} : time in which c_{max} was determined; V_z : apparent volume of distribution; Cl_{tot} : total clearance; AUC: area under curve of concentration–time profile; $t_{1/2}$: elimination half-life.

4. Conclusion

In this study, for the first time a simple, precise and accurate HPLC method suitable for the determination of *o*-108 in plasma was developed. Prior to HPLC analysis, the SPE procedure was used to effectively isolate the chelator from rabbit plasma. The developed analytical methodology was validated with respect to selectivity, linearity, precision, accuracy, and stability. All validation parameters were within acceptable limits and in line with the guidelines. The applicability of the method was confirmed by the analysis of the plasma sample obtained from a pharmacokinetic experiment. LLOQ of the method allowed to follow a concentration–time profile up to the 120th min after i.v. administration of the chelator to rabbits. This study provides the first information about the plasma concentration–time profile and basic pharmacokinetic parameters of the novel aroylhydrazone chelator *o*-108 in rabbits.

Acknowledgement

This study was supported by the research projects MSM0021620822 and MSM0021620820.

References

- [1] D.S. Kalinowski, D.R. Richardson, *Pharmacol. Rev.* 57 (2005) 547.
- [2] T.F. Tham, R. Lejny-Toung, W. Li, Y. Wang, K. Karimian, M. Spino, *Curr. Med. Chem.* 10 (2003) 983.
- [3] T. Simunek, C. Boer, R.A. Bouwman, R. Vlasblom, A.M.A.M. Versteilen, M. Štěrba, V. Geršl, R. Hrdina, P. Poňka, J.J. de Lange, W.J. Paulus, R.J. Musters, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 39 (2005) 345.
- [4] T.B. Chaston, R.N. Watts, J. Yuan, D.R. Richardson, *Clin. Cancer Res.* 10 (2004) 7365.
- [5] E.E. Voest, G. Vreugdenhil, J.J.M. Marx, *Ann. Intern. Med.* 120 (1994) 490.
- [6] J.L. Buss, F.M. Torti, S.V. Torti, *Curr. Med. Chem.* 10 (2003) 1021.
- [7] S.M. Swain, P. Vici, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 130 (2004) 1.
- [8] Z.I. Cabantchik, H. Glickstein, J. Golenser, M. Loyevsky, A. Tsafack, *Acta Haematol.* 95 (1996) 70.
- [9] D.R. Richardson, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1012 (2004) 326.
- [10] J.L. Buss, M. Hermes-Lima, P. Poňka, *Adv. Exp. Med. Biol.* 509 (2002) 205.
- [11] J.L. Buss, E. Arduini, P. Poňka, *Biochem. Pharmacol.* 64 (2002) 1689.
- [12] J.L. Buss, E. Arduini, K.C. Shepard, P. Poňka, *Biochem. Pharmacol.* 65 (2003) 349.
- [13] M. Štěrba, T. Simunek, Y. Mazurova, O. Popelová, J. Kaplanova, P. Poňka, V. Geršl, *Hum. Exp. Toxicol.* 24 (2005) 1.
- [14] G. Link, P. Poňka, A.M. Konin, W. Breuer, Z.I. Cabantchik, C. Hersko, *Blood* 101 (2003) 4172.
- [15] P. Kovaříková, M. Mokry, J. Klimeš, K. Vavrova, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 1503.
- [16] P. Kovaříková, J. Klimeš, M. Štěrba, O. Popelová, M. Mokry, V. Geršl, P. Poňka, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 1300.
- [17] CDER and CVM, *Bioanalytical Method Validation, Guidance for Industry*, May 2001 (<http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>).

PŘÍLOHA 5

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

Petra Kovaříková¹
 Jiří Klimeš¹
 Martin Štěrba²
 Olga Popelová²
 Milan Mokry¹
 Vladimír Geršl²
 Přemysl Poňka³

¹Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague; Hradec Králové, Czech Republic

²Department of Pharmacology, Faculty of Medicine in Hradec Králové, Hradec Králové, Czech Republic

³LadyDavis Institute for Medical Research, McGill University, Montreal, Canada

Development of high-performance liquid chromatographic determination of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone in rabbit plasma and application of this method to an *in vivo* study

An analytical methodology appropriate for the determination of the novel drug candidate salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH) in rabbit plasma has been developed and validated. Desirable chromatographic separation was achieved on a C₁₈ column employing a mixture of phosphate buffer (0.01 M NaH₂PO₄ · 2 H₂O with 2 mM EDTA, pH 6.0) and methanol (53:47; v/v) as the mobile phase. In order to develop a suitable sample preparation procedure, different methods have been tested (solid-phase extraction, liquid-liquid extraction, and protein precipitation). Protein precipitation using 0.1 M HClO₄ and acetonitrile allowed the highest recoveries of the analyte to be reproducibly attained. The analytical methodology developed in this study was validated with respect to linearity (0.26–30.0 µg/mL), accuracy, precision, selectivity, recovery, and stability. A concentration of 0.26 µg/mL was determined as the LLOQ. The chromatographic method was applied to a preliminary plasma pharmacokinetic study. This study has provided the first information about the concentrations of SIH in plasma of a living subject. These results could have a significant impact on further progress in the development of this promising compound.

Key Words: Salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone; SIH; Iron-chelator; Pharmacokinetics; HPLC

Received: February 15, 2005; revised: April 21, 2005; accepted: April 26, 2005

DOI 10.1002/jssc.200500077

1 Introduction

Iron chelation represents the only effective therapeutic approach for facilitating iron excretion and reducing the iron burden and toxicity in patients suffering from hereditary anaemia, such as β-thalassemia [1]. Moreover, iron chelation seems to be a promising principle for the development of novel therapeutics effective in a number of other important indications. To date, biocompatible iron chelators have been reported to demonstrate antioxidative, antiproliferative, antimicrobial, cardioprotective, and neuroprotective effects [2–6]. Despite these intriguing results, the number of selective biocompatible iron chelators is unfortunately quite low. Salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH, Fig. 1) is a novel effective iron chelator belonging to the group of pyridoxal isonicotinoyl

Correspondence: Dr. Petra Kovaříková, Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic.
 Phone: +420 495067256 Fax: +420 495 512423.
 E-mail: kovarikova@faf.cuni.cz.

Abbreviations: SIH, salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone; SIHHCl, salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone hydrochloride; o-108, pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt.

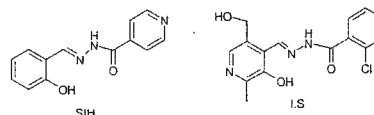


Figure 1. Chemical structures of SIH and I.S. (pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone).

hydrazone (PIH) analogues [7]. Nowadays, SIH is one of the most intensively investigated iron chelators. It exhibits surprisingly powerful antioxidative, antimalarial, antitubercular, and antiproliferative effects on the *in vitro* level and the first *in vivo* studies have been already performed [8–11]. Furthermore, preliminary experiments indicated good tolerability and low toxicity of this chelator [12–13].

SIH is a crystalline substance (coloured from light to bright yellow) which can be readily synthesized by Schiff-base condensation from commercially available precursors – isoniazid and salicylaldehyde. Since SIH is poorly soluble in aqueous media of neutral pH, a water-soluble salt (SIH · HCl) has been prepared [14]. This study employs SIH · HCl as a form with a more favourable profile from the pharmaceutical point of view. SIH forms complexes with free or loosely-bound iron preferentially in stoichio-

metry 2:1. The pK_a values (3.34; 8.29; and 9.8) of this chelator were determined using potentiometric titration [15].

The determination of a promising drug candidate in the biological material plays a very important role already in the early stages of a novel drug development. An accurate and well defined analytical methodology allows description of the disposition of the drug in the organism. Moreover, it is an essential tool for the determination of basic pharmacokinetic parameters, such as biological availability, half-life of elimination, clearance, etc. Although SIH is under intensive pharmacological investigation, to date no analytical method appropriate for the determination of either SIH or another PIH analogue in biological fluids is available. However, the development of a chromatographic method for the evaluation of SIH has been described in our previous study [14]. Plasma pharmacokinetics is considered to be the first and basic step for the determination of the fate of a drug in the organism.

The aim of this study was to develop and validate a chromatographic method for the determination of SIH in rabbit plasma and apply this assay to an *in vivo* study.

2 Experimental

2.1 Chemicals and materials

SIH·HCl was prepared according to the procedure described in our previous study [14]. The internal standard – pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone (o-108) – was synthesized by condensation of pyridoxal with 2-chlorobenzoyl hydrazone, as described previously [16]. The structure and purity of these compounds were confirmed by FTIR (Nicolet Impact 400 spectrophotometer), ^1H and ^{13}C NMR spectra (Varian Mercury-Vx BB 300 instrument, operating at 300 MHz for ^1H , 75 MHz for ^{13}C), and HPLC methods [14].

Methanol, acetonitrile, phosphate buffer ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), EDTA, NaOH, and HClO_4 were purchased from Lachema (Czech Republic). Water was purified using reverse osmosis.

Discovery SPE columns (DSC-18, DSC-18Lt, DSC-8, DSC-Ph, DSC-CN) and vacuum SPE manifold were purchased from Supelco (Germany). Chromabond® SPE (C4) columns were purchased from Macherey-Nagel (Germany). An LT-2 shaker and a Unimed centrifuge (Czech Republic) were used in this study. Standard drug-free rabbit plasma was obtained either from ZOO Service Dvůr Králové (Czech Republic) or from the Faculty of Medicine in Hradec Králové (Czech Republic).

2.2 Chromatographic instrumentation and conditions

A Spectra-Physics chromatographic system (Watrex, Czech Republic) equipped with an isocratic pump (Costa-

metric 3500), an automatic injector (AS 1000), and a UV/VIS detector (UV 3000HR) was used in these experiments. HPLC data were processed with the aid of SpectraSystem Software – PC 1000 version 3.0 (Thermo Separation Products, USA) working under the control of an OS/2 Warp operating system.

Desirable chromatographic separation was achieved on a chromatographic column (250 × 4.6 mm) with LiChrospher® RP-18, 5 μm as the stationary phase (Merck, Germany) protected with a Purospher® RP-18, 5 μm guard column (Merck, Germany). A mixture of methanol and phosphate buffer (0.01 M NaH_2PO_4 ; pH 6.0 adjusted with 1 M NaOH) in a ratio 47:53 (v/v) was used as the mobile phase. In order to prevent formation of complexes of the chelator with the loosely bound iron in the chromatographic system, EDTA was added to the aqueous part of the mobile phase at a concentration of 2 mM. The flow rate was 0.9 mL/min and the detector was set at 288 nm.

2.3 Preparation of stock solutions, spiking solutions, calibration and quality control samples (QC)

Stock solutions of SIH and o-108 I.S. (4 mg/mL) were prepared by dissolving appropriate amounts of the substance in methanol. Spiking solutions of SIH (32–3600 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and internal standard (1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were obtained by appropriate dilution of the stock solutions with a mixture of methanol/water (1:1, v/v). Calibration samples and QC samples were prepared by spiking the drug-free plasma with SIH spiking solutions to obtain final concentrations (0.26–30.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

2.4 Sample preparation procedures tested in this study

The effectiveness of isolation (recovery) of SIH from plasma was evaluated using three different sample pretreatment techniques. For this purpose, the plasma samples were prepared as follows: 0.6 mL of drug-free plasma were spiked with 5 μL of the SIH spiking solution to obtain concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Ten μL of EDTA (10 mM) were added to the sample. Thereafter, the samples were treated employing the procedures described below. Each sample pretreatment procedure was performed at least in triplicate. The extraction recovery was determined by comparing the peak area of SIH obtained by the direct injection of appropriately diluted standard solution with that obtained by the extraction procedure.

2.4.1 Solid-phase extraction (SPE)

SPE columns with different types of silica gel modified RP-sorbents (DSC-18, DSC-18Lt, DSC-8, Chromabond® C-4, DSC-Ph, DSC-CN) were tested. All columns were conditioned with 1 mL of methanol followed by 1 mL of

phosphate buffer (pH 7). The spiked plasma samples were applied to the columns and slowly passed through by applying vacuum. Interferences from plasma were removed using 1 mL of phosphate buffer (pH 7). Finally, 1–2 mL of methanol or acetonitrile was used to elute SIH from the columns. The effect of pH on the extraction was studied by adding phosphate buffer of different pH to the sample.

2.4.2 Precipitation

The spiked plasma samples were precipitated using different volumes (0.6–1.8 mL) of methanol, acetonitrile, or their mixture in different ratios. The effect of pH on the precipitation was tested through the addition of a small volume (10 μ L) of acid (0.1 M HCl, 0.1 M HClO₄) or base (0.1 M NaOH) either to the sample or to the precipitation medium. All samples were mechanically vortexed and centrifuged at 1500 \times g for 5 min. The whole volume of supernatant was transferred to a laboratory tube and mixed with the appropriate volume of phosphate buffer pH 7 (0.3–1.5 mL).

2.4.3 Liquid-liquid extraction (L-L extraction)

Six mL of either ether or chloroform was employed to extract SIH from plasma samples. The influence of different pH was tested by the addition of a small amount of phosphate buffer to the spiked plasma samples. The samples were vortexed for 10 min and centrifuged at 1500 \times g (5 min). The organic layer was harvested and dried under a stream of nitrogen. Dry extract was reconstituted in 1 mL of mobile phase.

2.5 Validation procedure

2.5.1 Sample clean up for validation purposes

According to the results of the plasma pretreatment study, the protein precipitation procedure (Section 2.4.2) employing 10 μ L of HClO₄ followed by 900 μ L of acetonitrile was selected for validation. After the addition of the precipitation agent, the samples were mechanically vortexed and centrifuged at 1500 \times g for 5 min. The entire volume of supernatant was removed and diluted with 500 μ L of phosphate buffer (pH 7.0) before the HPLC analysis.

2.5.2 Linearity and lower limit of quantification (LLOQ)

The linearity of the method was evaluated by analysis of the calibration samples prepared at six different concentrations of SIH (0.26–30.0 μ g/mL). The calibration curve was constructed by plotting the ratios of the peak areas (SIH/I.S.) against the corresponding concentration. The lower limit of quantification (LLOQ) was set as the concentration where the analyte response of a spiked sample

was five times higher than the response of a blank sample and where the analyte response had a precision of 20% and an accuracy of 80–120% [17].

2.5.3 Precision and accuracy

Intra- and inter-day precisions as well as the accuracy of the method were tested by analyzing the QC samples at three different concentrations of SIH (1.5, 15, and 30 μ g/mL). The precision determined at each concentration level (except at LLOQ) should not exceed 15% of the coefficient of variation (CV). The mean value of accuracy should be within 15% of the actual concentration (except at LLOQ) [17].

2.5.4 Recovery

The recovery of the plasma pretreatment procedure was studied at four different concentrations of QC samples (0.26, 0.5, 10, and 30 μ g/mL) and one concentration of I.S. (10 μ g/mL). At each concentration level, three QC samples were prepared and analyzed in triplicate.

2.5.5 Selectivity

The selectivity of the method was studied using rabbit plasma obtained from 6 healthy animals (ZOO Service Dvůr Králové) and 4 drug-free plasma samples taken in the *in vivo* study. Taken together, the selectivity was assessed using plasma sampled from 10 healthy rabbits.

2.5.6 Stability

The stability of the stock and spiking solutions stored at the laboratory temperature for 8 and 1 h, respectively, and the stability of the samples placed in an autosampler (set at 20°C) for 20 h was evaluated. These time intervals were selected with respect to the time period for which the solutions were allowed to stand under the conditions mentioned above. The stability of SIH in plasma in one freeze-thaw cycle was tested using QC samples of three different concentrations of SIH. The QC samples were frozen immediately after preparation and stored at –80°C for 8 h (the longest period for which the samples were kept frozen in the *in vivo* study). The samples were subsequently thawed and treated instantly as described earlier. The freeze-thaw stability was assessed as the ratio of SIH determined in the frozen-thawed QC samples and those samples analyzed immediately after preparation.

2.2.7 *In vivo* study

Four Chinchilla male rabbits of an average weight of 4.0 \pm 0.2 kg were used in this preliminary *in vivo* study. The animals were housed under a 12-hour light cycle, constant temperature and humidity. The animals had free access to water and a standard laboratory pellet diet. Twelve hours before the study access to the diet was

restricted. The experiments were performed in accordance with the "Guide for the care and use of laboratory animals" (1996) and under the supervision of the Ethical Committee of the Medical Faculty in Hradec Králové.

The rabbits were anaesthetized with pentobarbital (Nembutal, 30 mg/kg, *i.v.*). The left carotid artery was prepared and a PE-cannula was introduced through the artery into the aorta to allow prompt sampling of blood. Due to the limited solubility of SIH · HCl, the solution for intravenous administration was designed using saline and pharmaceutically acceptable co-solvents PEG 300 and ethanol in a ratio of 2:4:1 (*v/v/v*). Salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone was administered at a dose of 10 mg/kg (free base) by a slow (3 min) intravenous injection through a cannula (Neoflon) inserted into the marginal ear vein. Blood sampling (1 mL) was performed five minutes before drug administration (blank), during drug administration (1st, 2nd, and 3rd minute), and subsequently in the selected range (4–180 min). The volume loss was compensated with sterile saline. The blood was harvested into heparinised tubes (Vacurette) and centrifuged as soon as possible (2000 × *g*, 5°C). Plasma was collected and frozen immediately (–80°C). All samples were analyzed within 8 h.

3 Results and discussion

3.1 Adaptation of chromatographic conditions

The chromatographic conditions developed previously for the evaluation of the purity and stability of SIH and related compounds were partially modified to be convenient for determination of SIH in plasma samples [14]. Due to the analogy in the chemical structure, chelating properties, closeness in chromatographic behaviour as well as expected similarity in precipitation recovery, pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone was chosen as the optimal internal standard.

3.2 Optimization of the sample preparation procedure

In order to develop the best sample preparation procedure, the methods of SPE, liquid-liquid extraction, and protein precipitation were tested. In non-overloaded individuals the amount of free iron in plasma is negligible. Nevertheless, despite the chelating selectivity of SIH, a certain (minor) amount of complexes with some biometals in plasma (*e.g.* Zn²⁺) might be formed and these may interfere with the reliability of the method. Therefore, EDTA was added into the samples in excess to prevent formation of these complexes.

3.2.1 SPE

Because of the various advantages of SPE (*e.g.* simplicity, reproducibility, and ability to give relatively clean samples), this technique was evaluated initially. In com-

Table 1. The extraction recoveries of SIH at a concentration of 10 µg/mL determined with different types of silica gel modified SPE columns.

Type of RP sorbent	Mean recovery (%) ± SD (<i>n</i> = 3)	CV (%)
C18 Lt	58.51 ± 0.71	1.21
C18	62.50 ± 1.41	2.34
C8	66.25 ± 2.57	3.88
C4	69.67 ± 3.06	4.39
CN	48.50 ± 0.70	1.46
Phenyl	40.00 ± 1.41	3.54

parison with methanol, acetonitrile ensured a more effective elution of SIH from all the columns. **Table 1** shows the percentages of analyte recovered employing SPE columns of different sorbents (2 mL of acetonitrile were used for the analyte elution). The highest, yet still insufficient, recovery was reached with the C4 column (69%). Further modification of the pH of the organic eluent or the plasma did not enhance the effectiveness of extraction. The rather low recovery of SPE might be caused by strong retention of the analyte on the SPE sorbent. Since SPE under the conditions tested in this study was not able to optimally recover SIH from plasma, other sample preparation procedures were tested.

3.2.2 Protein precipitation

Plasma protein precipitation was investigated as another sample pretreatment technique. Due to the chemical characteristics of SIH (the sensitivity to degradation in water solutions of both high and low pH and the ability to form complexes with the multivalent ions), organic solvents (methanol, acetonitrile, or their mixture) were selected as a protein precipitation media of choice. The highest recovery (80%) was obtained using acetonitrile; however, the volume of this solvent had to exceed 3 times the volume of precipitated plasma. Attempts to modify this approach using a minor amount of an acid or a base (0.1 M HCl or 0.1 NaOH) did not improve the recovery of SIH. On the contrary, when 10 µL of HClO₄ (0.1 M) was added to the sample just before acetonitrile, the extraction recovery reached 85% even though the total volume of the precipitating agent was reduced to a half. **Table 2** summarizes the data on the protein precipitation study. Although optimal recovery of the analyte (95–100%) was not achieved, protein precipitation led to reproducible and consistent results with an acceptable recovery of SIH.

3.2.3 L-L extraction

In comparison with SPE or protein precipitation, L-L extraction represents a less convenient sample preparation technique. Thus, this procedure was investigated

Table 2. Absolute recoveries of SIH (10 µg/mL) reached employing different organic solvents as the precipitation agents.

Precipitation agent (PA)	PA/plasma (v/v) ratio	Mean recovery [%] ± SD (n = 6)	CV [%]
Methanol	3	58.42 ± 2.72	4.63
Methanol/acetonitrile (1:1)	3	73.83 ± 3.38	4.58
Acetonitrile	3	80.30 ± 4.88	6.07
0.1 M HClO ₄ /Acetonitrile	1.5	84.70 ± 1.53	1.80

Table 3. Assessment of LLOQ of SIH in rabbit plasma.

Concentration added [µg/mL]	Concentration found [µg/mL]	Accuracy [%]
0.2649	0.2905	109.67
	0.2978	112.34
	0.2712	102.38
Mean	0.2865	108.15
SD	0.0137	5.1834
CV [%]	4.79	4.79

only partially with the principal aim of ascertaining whether this approach could improve the recovery of SIH. Therefore, only ether and chloroform were employed as organic solvents with different pH values of the sample. Obtained recoveries did not reach the values attained with either SPE or precipitation (< 60%).

Due to the reproducible results and the highest recovery, protein precipitation employing 10 µL of HClO₄ and 900 µL of acetonitrile was selected as the optimal sample treatment technique prior to HPLC analysis. This analytical methodology was validated for application in the *in vivo* study.

3.3 Validation

3.3.1 Linearity and LLOQ

The linearity of the calibration curve was determined in a range of 0.26–30.0 µg/mL. The following regression equation was obtained: $y = 0.2898x + 0.0179$ ($R^2 =$

0.9994). The limit of quantification was assessed to be 0.26 µg/mL (see **Table 3**).

3.3.2 Accuracy, precision, selectivity, and absolute recovery

The intra- and inter-day precision and accuracy of the method reached acceptable values (**Table 4**) [17]. The selectivity of the method was assessed by the analysis of plasma sampled from 10 healthy animals. **Figure 2** compares the chromatogram of an analyzed sample from the *in vivo* study with the chromatogram of a blank plasma sample. It is obvious that there were no interferences at the retention time of either SIH or I.S.

The mean absolute recoveries of SIH and I.S. (at the concentration of 10 µg/mL) ($n = 6$) were calculated to be $84.70 \pm 1.53\%$ with $CV = 1.80\%$ and $89.33 \pm 4.64\%$ with $CV = 5.2\%$, respectively. The mean recoveries of SIH at concentrations of 0.5 and 30 µg/mL ($n = 3$) were assessed to be $82.0 \pm 1.53\%$ with $CV = 1.87\%$ and $83.45 \pm 1.30\%$ with $CV = 1.56\%$, respectively. The mean recovery ($n = 3$) at LLOQ was determined to be $83.75 \pm 3.53\%$ with $CV = 4.22\%$.

3.3.3 Stability

The stock and spiking solutions of SIH and I.S. were stable in the tested period (8 and 1 h). The samples maintained in the autosampler were stable during the time of observation (20 h). The experiment focused on the stability of SIH in plasma after freeze-thaw procedure revealed

Table 4. Intra- and inter-day precision and accuracy of the method.

Intraday (n = 3)			
Concentration added [µg/mL]	Mean concentration found ± SD	Precision (CV%)	Accuracy [%]
30	32.04 ± 0.44	1.38	106.81
15	14.63 ± 0.59	4.03	97.53
1.5	1.44 ± 0.05	3.29	95.78
Intraday (n = 6)			
Concentration added [µg/mL]	Mean concentration found ± SD	Precision (CV%)	Accuracy [%]
30	28.63 ± 0.39	1.37	95.44
15	15.10 ± 0.86	5.70	100.45
1.5	1.53 ± 0.04	2.78	102.00

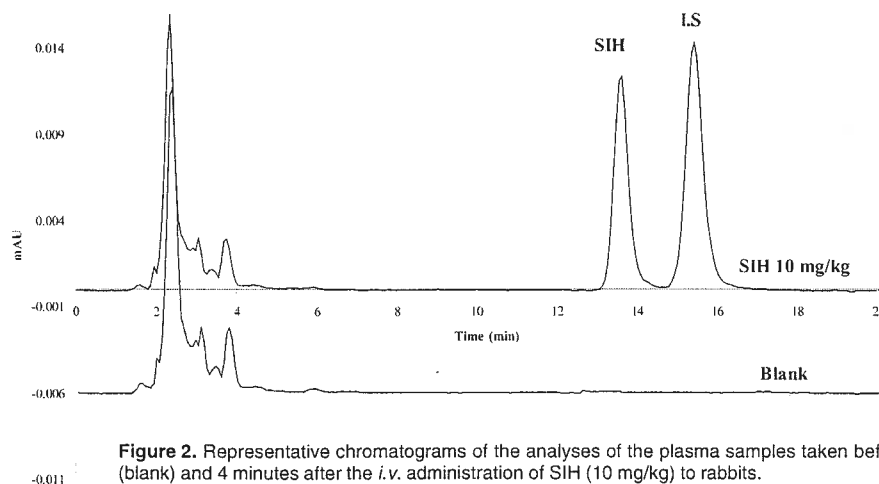


Figure 2. Representative chromatograms of the analyses of the plasma samples taken before (blank) and 4 minutes after the *i.v.* administration of SIH (10 mg/kg) to rabbits.

Table 5. Stability of SIH in plasma samples ($n = 4$) after freeze-thaw procedure.

Mean concentration of SIH [$\mu\text{g/mL}$] \pm SD – instant analysis	Mean concentration of SIH [$\mu\text{g/mL}$] \pm SD after freeze-thaw procedure	Mean recovery [%] of SIH \pm SD; CV [%] after freeze-thaw procedure
28.83 ± 1.35	24.96 ± 0.82	86.57 ± 2.84 ; 3.28
11.40 ± 0.22	10.54 ± 0.59	92.45 ± 5.15 ; 5.57
0.71 ± 0.03	0.69 ± 0.02	97.18 ± 2.75 ; 2.83

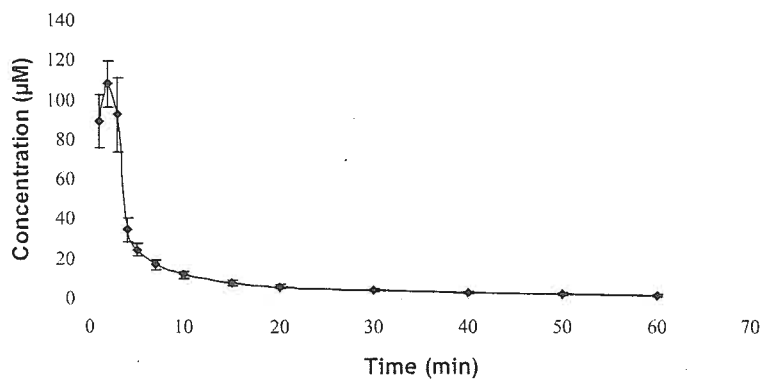


Figure 3. SIH plasma concentration-time profile (mean \pm SEM) after *i.v.* administration of the chelator to rabbits ($n = 4$) at the dose of 10 mg/kg.

a drop of the concentration of the chelator. The concentrations of SIH determined in both QC samples treated instantly after preparation and QC samples treated after freeze-thaw procedure are shown in Table 5.

3.4 *In vivo* study

The analytical methodology developed in this study was successfully applied to a preliminary *in vivo* experiment. Representative chromatograms of the blank and sample from this study are shown in Fig. 2. Plasma concentration-

time profile of SIH after its *i.v.* administration (10 mg/kg) to rabbits ($n = 4$) is shown in Fig. 3. A relatively quick distribution and elimination of the drug were observed. Therefore, the sensitivity of the analytical method allowed examination of plasma concentrations only up to 60 min after administration. Nevertheless, the method covers approximately two orders of magnitude decrease in plasma concentrations of the active compound. This study has provided for the first time the real plasma concentrations of SIH in the living organism. However, more sensitive detection might be desirable for the ultimate defi-

dition of the fate of this drug in the organism. For this purpose we have also tested the use of the fluorescence detection in the same setting. Unfortunately, due to poor natural fluorescence of SIH this approach did not distinctly improve the sensitivity of the method. The structure of SIH does not offer an ideal method of derivatization to obtain a product with significant fluorescence. From this point, MS or radio-detection appear to be convenient for a long-term follow up with concentrations below 1 μM .

4 Concluding remarks

In this study, for the first time precise and accurate analytical methodology appropriate for the determination of SIH in biological material is described. Moreover, the practical applicability of this method was confirmed in an *in vivo* experiment. An RP-HPLC method previously developed for the purity and stability evaluation of SIH was modified and employed in this study. Different sample preparation techniques were investigated (SPE, L-L extraction, and plasma protein precipitation) in order to develop the optimal procedure for the isolation of SIH from rabbit plasma. Since protein precipitation employing 0.1 M HClO_4 and acetonitrile was identified as the optimal technique, it was used in the *in vivo* experiment. The whole analytical methodology was validated with respect to linearity, precision, accuracy, selectivity, recovery, and stability. This study has revealed the first information about the concentrations of SIH which could be expected in plasma after administration of the chelator to the living organism. Thus, it could be a considerable contribution to further progress in the development of this compound.

Acknowledgements

This study was supported by the Research Project MSM 0021620822 from the Ministry of Education, Youth and Sports and Research Grants GAUK 395/2004/BCH/FAF and GACR 305/03/1511.

References

- [1] J.P. Kushner, J.P. Porter, N.F. Olivieri, *Hematology (Am. Soc. Hematom. Educ. Program)* **2001**, 47–61.
- [2] E.E. Voest, G. Vreugdenhil, J.J.M. Marx, *Ann. Intern. Med.* **1994**, *120*, 490–499.
- [3] J.L. Buss, F.M. Torti, S.V. Torti, *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 1021–1034.
- [4] S.M. Swain, P. Vici, *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* **2004**, *130*, 1–7.
- [5] Z.I. Cabantchik, H. Glickstein, J. Golenser, M. Loyevsky, A. Tsafack, *Acta Haematol.* **1996**, *95*, 70–77.
- [6] D.R. Richardson, *Ann. N Y Acad. Sci.* **2004**, *1012*, 326–341.
- [7] J.L. Buss, P. Poňka, *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.* **2003**, *1619*, 177–186.
- [8] T. Šimůnek, R.A. Bouwman, C. Boer, J.J. de Lange, R.J.P. Musters, *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2004**, *36*, 759.
- [9] M.J. Hearn, International Patent Application WO 02/43668, 2001.
- [10] M. Horáčková, P. Poňka, Z. Byczko, *Cardiovasc. Res.* **2002**, *64*, 1689–1701.
- [11] J. Golenser, A. Domb, D. Teomim, A. Tsafack, O. Nisim, P. Poňka, W. Eiling, Z.I. Cabantchik, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1997**, *281*, 1127–1135.
- [12] I. Klímtová, T. Šimůnek, Y. Mazurová, J. Kaplanová, M. Štěrba, R. Hrdina, V. Gerši, M. Adamcová, P. Poňka, *Acta Medica* **2003**, *46*, 163–170.
- [13] M. Adamcová, M. Štěrba, I. Klímtová, T. Šimůnek, R. Hrdina, V. Gerši, P. Poňka, *Acta Medica* **2003**, *46*, 171–174.
- [14] P. Kovaříková, M. Mokry, J. Klimeš, K. Vávrová, *J. Sep. Sci.* **2004**, *27*, 1503–1510.
- [15] D.R. Richardson, M.L. Vitolo, G.T. Hefter, P.M. May, B.W. Clare, J. Webb, *Inorg. Chim. Acta* **1990**, *170*, 165–170.
- [16] P. Poňka, J. Borová, J. Neuwirt, O. Fuchs, *FEBS Lett.* **1979**, *97*, 317–321.
- [17] CDER and CVM, Bioanalytical Method Validation, Guidance for Industry, May 2001 <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.htm>.

PŘÍLOHA 6

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

Cardioprotective Effects of a Novel Iron Chelator, Pyridoxal 2-Chlorobenzoyl Hydrazone, in the Rabbit Model of Daunorubicin-Induced Cardiotoxicity

Martin Štěrbá, Olga Popelová, Tomáš Šimůnek, Yvona Mazurová, Anna Potáčková, Michaela Adamcová, Helena Kaiserová, Přemysl Poňka, and Vladimír Geršl

Department of Pharmacology (M.Š., O.P., V.G.), Department of Histology and Embryology (Y.M.), and Department of Physiology (A.P., M.A.), Faculty of Medicine in Hradec Králové and Department of Biochemical Sciences, Faculty of Pharmacy (T.Š., H.K.), Charles University in Prague, Hradec Králové, Czech Republic; and Lady Davis Institute for Medical Research, Departments of Physiology and Medicine, McGill University, Montreal, Quebec, Canada (P.P.)

Received July 24, 2006; accepted September 25, 2006

ABSTRACT

Iron chelation is the only pharmacological intervention against anthracycline cardiotoxicity whose effectiveness has been well documented both experimentally and clinically. In this study, we aimed to assess whether pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone (*o*-108, a strong iron chelator) can provide effective protection against daunorubicin (DAU)-induced chronic cardiotoxicity in rabbits. First, using the HL-60 leukemic cell line, it was shown that *o*-108 has no potential to blunt the antiproliferative efficacy of DAU. Instead, *o*-108 itself moderately inhibited cell proliferation. In vivo, chronic DAU treatment (3 mg/kg weekly for 10 weeks) induced mortality (33%), left ventricular (LV) dysfunction, a troponin T rise, and typical morphological LV damage. In contrast, all animals treated with 10 mg/kg *o*-108 before DAU survived without a significant drop in the LV ejection fraction (63.2 ± 0.5 versus $59.2 \pm 1.0\%$, beginning versus

end, not significant), and their cardiac contractility (dP/dt_{max}) was significantly higher than in the DAU-only group (1131 ± 125 versus 783 ± 53 kPa/s, $p < 0.05$), which corresponded with histologically assessed lower extent and intensity of myocardial damage. Although higher *o*-108 dose (25 mg/kg) was well tolerated when administered alone, in combination with DAU it led to rather paradoxical and mostly negative results regarding both cardioprotection and overall mortality. In conclusion, we show that shielding of free intracellular iron using a potent lipophilic iron chelator is able to offer a meaningful protection against chronic anthracycline cardiotoxicity. However, this approach lost its potential with the higher chelator dose, which suggests that iron might play more complex role in the pathogenesis of this disease than previously assumed.

Although introduced more than 40 years ago, anthracycline antineoplastic drugs (ANT) have remained among the most effective and widely used anticancer chemotherapeutics in clinical practice (Yee et al., 2005). Their clinical utility is, however, largely limited by adverse reactions accompanying their use. Besides reversible and often well manageable adverse effects typical for most of the anticancer drugs (e.g., nausea, myelosuppression), there is a well documented risk of severe complication, which legitimately warrants the high-level vigilance—anthracycline cardiotoxicity (Hrdina et al.,

2000; Minotti et al., 2004). Both the chronic (Von Hoff et al., 1979) and delayed (Lipshultz et al., 1991) types of ANT cardiotoxicity are associated with cardiomyopathy and irreversible damage of left ventricular myocardium, which functionally manifests itself as congestive heart failure.

Although the precise mechanisms involved in the chronic ANT cardiotoxicity still remain to be determined, there is a general agreement that reactive oxygen species (ROS) play an important role there (Hrdina et al., 2000). Therefore, numerous experimental cardioprotective interventions have been focused on ROS scavengers, including the “classic” antioxidants like vitamin E or acetylcysteine. After some promising initial experience, obtained mostly in acute experimental settings, mixed, contradictory, or solely negative outcomes were reported from both chronic experimental models and clinical studies (Legha et al., 1982; Myers et al., 1983; Herman et al., 1985; Berthiaume et al., 2005). From the numer-

This study was supported by a Research Project of the Czech Ministry of Education Youth and Sports MSM0021620820 and a grant from the Czech Science Foundation (GACR 305/05/P156). P.P. acknowledges the support from the Canadian Institutes of Health Research.

Article, publication date, and citation information can be found at <http://jpet.aspetjournals.org>.
doi:10.1124/jpet.106.111468.

ABBREVIATIONS: ANT, anthracycline; DAU, daunorubicin; LV, left ventricular; ROS, reactive oxygen species; ICRF-187, dexrazoxane; *o*-108, pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone; PIH, pyridoxal isonicotinoyl hydrazone; LVEF, left ventricular ejection fraction; ICL670, deferasirox.

ous agents tested so far, only very few are currently in further development (Iliskovic et al., 1999; Abou-El-Hassan et al., 2003; Oliveira et al., 2004; Fisher et al., 2005). At present, the only drug with a well evidenced cardioprotective effect, in both experimental and clinical settings, is dexrazoxane (ICRF-187), prodrug yielding metal-chelating metabolites (Herman and Ferrans, 1986; Speyer et al., 1992; Swain et al., 1997; Marty et al., 2006). These active metabolites supposedly shield the so-called "labile iron pool" inside the cardiomyocytes and/or replace iron from complexes with ANTs and thereby prevent excessive production of ROS and particularly hydroxyl radicals (Hasinoff et al., 1998). Importantly, in most of recent clinical studies, dexrazoxane did not interfere with anticancer efficacy of ANTs (Swain and Vici, 2004; Marty et al., 2006), which is in agreement with a recent experimental study showing that ROS are not among the main mediators of their anticancer effect (Wu and Hasinoff, 2005). Thus, intracellular iron chelation is the only well established and successful strategy for cardioprotection in patients treated with higher cumulative doses of ANTs (Cvetkovic and Scott, 2005). Unfortunately, because of the myelosuppressive potential and high costs, the use of dexrazoxane is limited to selected groups of patients, such as those given more than 300 mg/m² doxorubicin (or equivalent). It is estimated that only 6 to 7% of patients receiving ANTs are treated with dexrazoxane in Europe (Swain and Vici, 2004).

Apart from dexrazoxane, the data on possible cardioprotective properties of other iron chelators are surprisingly limited. Deferoxamine, the most widely used iron chelator for the treatment of iron overload, failed as a cardioprotectant in a chronic in vivo model of ANT cardiotoxicity (Herman et al., 1994). This observation is explainable by a hydrophilic nature of this drug, which is responsible for a limited entry of this agent into the cardiomyocytes. In vitro, bidentate iron chelator deferiprone was shown to have a cardioprotective potential (Barnabe et al., 2002), whereas another strong novel chelator ICL670 was ineffective under similar conditions (Hasinoff et al., 2003). In part, iron chelation may be also involved in the cardioprotective effects of flavonoid monoHER (Bruynzeel et al., 2006). We have previously reported that pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH), an aroylhydrazone iron chelator (Ponka et al., 1979; Baker et al., 1992), is capable of improving survival and slightly ameliorating the cardiotoxicity induced by chronic ANT treatment in rabbits (Simunek et al., 2005b). On the other hand, PIH is nowadays understood to be rather a "parent compound", from which a number of novel analogs are being derived. These advanced chelators are strong, selective for iron, and have improved cell penetration as well as excellent antioxidant properties (Simunek et al., 2005a). Pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone (*o*-108; Fig. 1) is among the most promising candidates (Link et al., 2003), and it was shown to be safe and well tolerated

after repeated administration to rabbits (Sterba et al., 2005). Therefore, the main goal of the present study was to assess whether *o*-108 has cardioprotective properties against chronic daunorubicin (DAU) cardiotoxicity without compromising its antiproliferative efficacy.

Materials and Methods

Animals

Adult Chinchilla male rabbits of an average initial weight of 3.44 ± 0.04 kg were housed under a 12-h light cycle, constant temperature, and humidity. The animals had free access to water and a standard laboratory pellet diet. Before experimental procedures, the animals were fasting overnight. All experiments were performed under ketamine anesthesia (50 mg/kg i.m.). Final invasive hemodynamic measurements were carried out under pentobarbital anesthesia (30 mg/kg i.v.). All experiments were performed in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the U.S. National Institutes of Health (NIH publication, 1996) and under the supervision of the Ethical Committee of the Faculty of Medicine in Hradec Králové.

Chemicals

Pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone (*o*-108) was synthesized in-house by a Schiff-base condensation of pyridoxal and 2-chlorobenzoylhydrazone as described previously (Link et al., 2003). The structure and purity of the compound was confirmed employing ¹H and ¹³C NMR, infrared spectroscopy, and high-performance liquid chromatography with UV detection (Kovarikova et al., 2004). Cremophor EL (Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic), daunorubicin (Daunoblastina; Pharmacia, Nerviano, Italy), ketamine (Narketan inj.; Gedeon Richter, Budapest, Hungary), Aqua pro injectione (Biotika, Martin, Slovakia), saline (Natrium Chloratum; Biotika), and pentobarbital (Nembutal sodium; Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) were used in the experiment.

Experimental Design

First, a study addressing potential effects of *o*-108 on the antiproliferative properties of DAU was performed, as this compound may only have value when it does not compromise the anticancer effect of anthracyclines. Thereafter, chronic anthracycline cardiomyopathy was induced in rabbits in a standard and previously validated schedule (DAU 3 mg/kg i.v., once weekly for 10 weeks, *n* = 15) (Gersl and Hrdina, 1994; Simunek et al., 2004). Control animals received saline (1 ml/kg i.v., *n* = 11), and another group was injected with the vehicle for the chelator (10% Cremophor EL i.p., *n* = 5) in the same scheme. The investigated iron chelator *o*-108 was partially dissolved in 10% Cremophor EL and administered intraperitoneally either alone (25 mg/kg i.p., *n* = 5) or in two doses (10 or 25 mg/kg, *n* = 8 each) 30 min before each DAU administration (3 mg/kg i.v.).

Body weight was recorded weekly, whereas mortality, general appearance, and behavior were observed daily. Noninvasive echocardiographic measurements were performed at the beginning of the study, later in weeks 9 and 10, and finally at the end of experiment (5–7 days after the last administration of drugs). Blood for cardiac troponin T determination was sampled before the 1st, 5th, 8th, and 10th administration, as well as at the end of the study. Standard biochemical and hematological parameters were determined from blood sampled before the 1st and 5th administrations and at the end of study. Five to seven days after the last administration, invasive hemodynamic measurements were performed. Thereafter, the animals had been overdosed with pentobarbital, and autopsy was performed. Heart and selected organs were excised and prepared for histological examination.

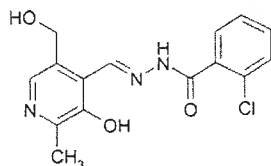


Fig. 1. Chemical structure of pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone (*o*-108).

Proliferation Studies with HL-60 Cells

HL-60 human acute promyelocytic leukemia cell line was obtained from ATCC (Manassas, VA). Cells were maintained in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Sigma-Aldrich), 1% penicillin/streptomycin (PAA, Pasching, Austria), and grown in humidified atmosphere at 37°C in 5% CO₂. Medium was renewed every 2 to 3 days. For proliferation studies, the cells were seeded at a density of 10⁵ cells/ml. Tested substances (*o*-108 and/or DAU) had been added, and cells were allowed to proliferate under standard conditions. The test concentrations of *o*-108 were chosen after pilot experiments and ranged from 0.1 to 300 μM. For combination assays, 2.5 nM DAU concentration was used, which was shown in our previous experiments to induce partial growth inhibition. To dissolve *o*-108, dimethyl sulfoxide (0.2%, v/v) was used, and it was present in the culture medium of all groups. At this concentration, dimethyl sulfoxide had no effect on cellular proliferation. To quantify the number of viable cells after each treatment, at 48 and/or 72 h of incubation, trypan blue unstained cells were counted using a Bürker's hemocytometer under a light microscope.

Cardioprotection Studies in Rabbits

Echocardiography. Noninvasive LV systolic function measurements were carried out in rabbits using a GE Vingmed CFM 800A echocardiograph (GE Vingmed Ultrasound, Horten, Norway) equipped with a pediatric 7.5-MHz probe. The LV long axis view was obtained through the left parasternal approach, and a guided M-mode measurement at the tips of the mitral valve was performed. The left ventricular ejection fraction (LVEF) was calculated from the LV end-diastolic and end-systolic dimensions determined from at least four heart cycles in each measurement. Individual LVEF values were determined as means of at least three independent examinations.

Invasive Hemodynamic Measurements. In pentobarbital anesthesia, the left carotid artery was prepared and a polyethylene catheter (length 300 mm, inner diameter 1.0 mm), filled-in with heparinized (10 IU/ml) saline, was introduced into the left heart ventricle. After a 15 min-equilibration period, the maximum of the first derivative of LV pressure rise in the isovolumic phase of the systole (dP/dt_{max}, an index of LV contractility) was obtained together with heart rate. For the arterial blood pressure measurement, a polyethylene cannula was inserted into the right femoral artery. The ADI PowerLab/8SP (ADInstruments Pty Ltd., Castle Hill, Australia) with appropriate transducers and the software Chart for Windows 3.4.11 were used for pressure measurements, their differentiation, and recording.

Cardiac Troponin T Determination. Cardiac troponin T, as a selective and sensitive marker of heart damage induced by chemotherapeutics (Adamcova et al., 2005), was determined in heparinized plasma using an Elecsys Troponin T STAT Immunoassay (Roche, Basel, Switzerland) and an Elecsys 2010 (Roche) immunoassay analyzer with the detection limit of 0.010 ng/ml. The values below this detection limit were considered to be zero.

Standard Biochemical and Hematological Analyses. Routine biochemical parameters were determined in plasma/serum using an automatic analyzer (Hitachi 737; Hitachi, Tokyo, Japan) at the Institute of Clinical Biochemistry and Diagnostics; hematological parameters were measured using an automatic analyser Coulter T890 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) at the Institute of Clinical Hematology, University Teaching Hospital in Hradec Králové.

Histological Examination. Tissue blocks of the transversely sectioned left and right cardiac ventricles, left kidney, left liver lobule, left caudal lung lobule, and duodenum (~3 cm below the pyloric sphincter) were fixed by immersion in 4% neutral formaldehyde for 5 to 7 days. Paraffin sections (6-μm thick) were stained with hematoxylin-eosin and Masson's blue trichrome. Photomicrographs were made with a Lucia G software version 4.51 (Laboratory Imag-

ing, Prague, Czech Republic) at the Department of Medical Biology and Genetics, Faculty of Medicine in Hradec Králové.

Statistical Analysis

The statistical software SigmaStat for Windows 3.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) was used in this study. All data are expressed as mean ± S.E.M. Significances of the differences were estimated using one-way ANOVA unpaired test (comparison between groups) or paired *t* test (comparison with the initial value within each group). Data without a normal distribution were evaluated using the non-parametric tests: Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks and Wilcoxon Signed Rank Test. Correlation analysis was performed using Spearman's method and regression analysis. *P* ≤ 0.05 was used as the level of statistical significance unless indicated otherwise.

Results

Proliferation Studies with HL-60 Cells

As seen in Fig. 2A, *o*-108 dose-dependently inhibited the proliferation of HL-60 cells. At the end of 72-h incubation, the chelator concentration required for 50% growth inhibition (the IC₅₀ value) was shown to be ≈30 μM. Further dose escalation resulted in pronounced cytotoxic action. DAU (2.5 nM) significantly inhibited proliferation of HL-60 cell to 62% of control values. At low doses (0.1 – 10 μM), *o*-108 did not significantly influence the DAU action, whereas at higher concentrations, an additive antiproliferative effect was detected (Fig. 2B).

Cardioprotection Studies in Rabbits

General Toxicity. All animals from control, vehicle, and *o*-108 (alone) groups survived until the end of the experiment. In contrast, repeated 10-week administration of DAU induced overall mortality of 33%, which was preceded with reduced food intake and signs of lethargy. On the other hand, all animals treated with DAU together with a 10 mg/kg dose of *o*-108 survived until the scheduled end of experiment, and no apparent changes in appearance or behavior were observed. Combination of DAU with a higher dose of *o*-108 (25 mg/kg) led to premature death of a half of animals. Nevertheless, the timings of death occurrences varied significantly in this study. Although DAU alone induced mortality in the last 2 weeks of the experiment (a similar pattern as previously reported; Simunek et al., 2004) in the group treated with a combination of *o*-108 in the higher dose, the mortality occurred earlier, around the middle of the study. The details on survival during the study are shown in Fig. 3.

Body weight changes in the course of the study are shown in Fig. 4. In most groups, body weight gain was significant commencing with the 3rd week compared with the initial values within each group. In contrast, only insignificant weight gain was witnessed in a combination of daunorubicin with the 25 mg/kg dose of the chelator, which eventually turned into a significant decrease between weeks 4 and 6. At the end of the experiment, the final mean body weights in the daunorubicin group were significantly lower compared with the control group, whereas in *o*-108 (10 mg/kg) + DAU group, the body weights were close to those observed in the vehicle group. On the other hand, the body weight of animals treated with *o*-108 (25 mg/kg) + DAU was significantly lower compared with most other groups under study, including the daunorubicin alone group (Fig. 4).

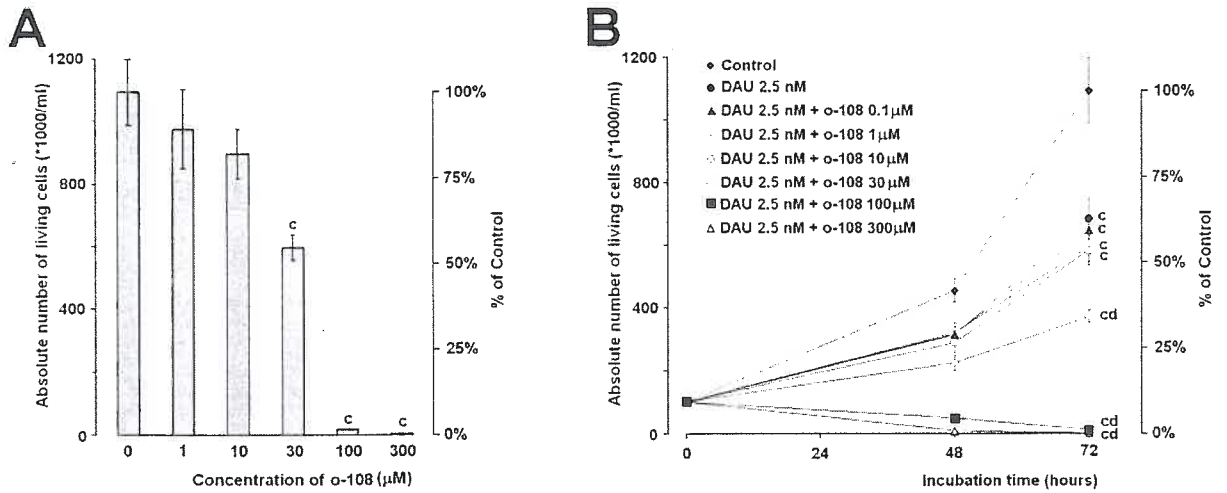


Fig. 2. Cancer cell proliferation studies. A. effect of o-108 on proliferation of HL-60 promyelocytic leukemia cell line. Absolute and relative cell numbers at the end of 72h incubation. B. effects of o-108 on antiproliferative action of daunorubicin (2.5 nM). Statistical significance (ANOVA; $P < 0.05$): c, comparison with control group; and d, comparison with 2.5 nM DAU group; $n = 4$ independent experiments for each group.

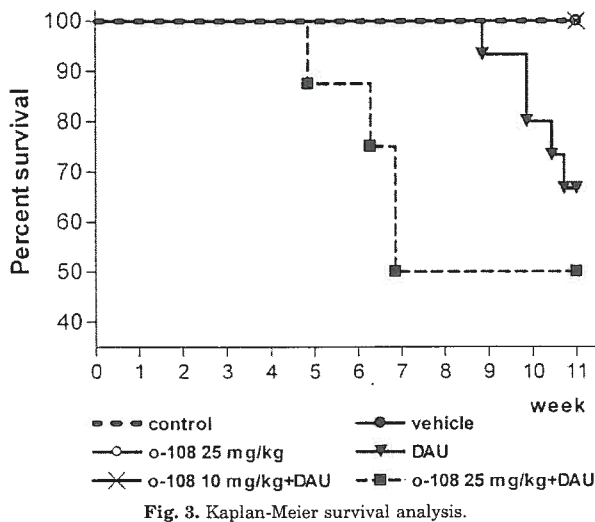


Fig. 3. Kaplan-Meier survival analysis.

Echocardiography. Echocardiographically determined LVEF revealed a progressive decline in LV systolic function in DAU-treated animals (Fig. 5). In contrast, there was no significant change in this parameter during the whole study in the o-108 (10 mg/kg) + DAU group. Furthermore, LVEF values in this group did not statistically differ from those determined in controls, and the LVEF was mostly also significantly higher than in the daunorubicin group. On the other hand, administration of o-108 (25 mg/kg) + DAU led to a fall in the LVEF resembling the administration of DAU alone.

Invasive Hemodynamic Measurements. LV contractility ($\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$), assessed at the end of the experiment, was significantly reduced in daunorubicin-treated animals (Fig. 6). In contrast, significantly higher values were obtained with DAU in combination with the lower dose of o-108. Moreover, these results did not statistically differ from those determined in the control and vehicle groups. On the other

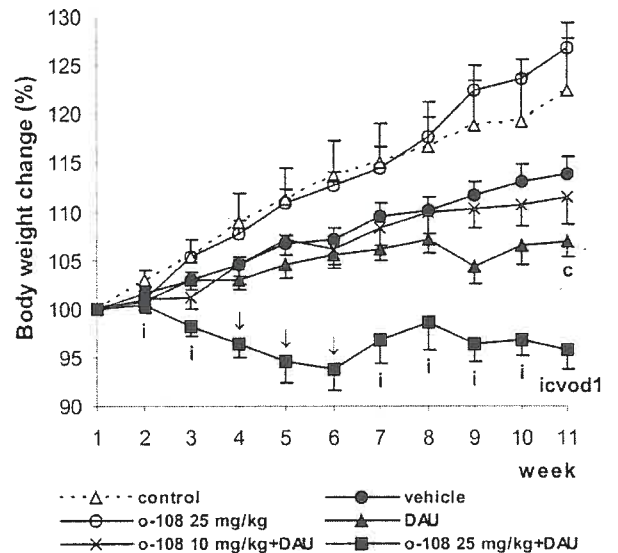


Fig. 4. Body weight changes during the study. Statistical significance within each group ($P < 0.05$, paired t test): (\downarrow) a statistically significant decrease or (i) an insignificant body weight change in comparison with the initial values. Where no symbol is given, a significant increase is meant. Statistical significance (ANOVA, $P < 0.05$) in comparison with: c, control group; v, vehicle group; o, o-108 alone (25 mg/kg); d, daunorubicin group; and l, o-108 (10 mg/kg) + daunorubicin.

hand, a combination of DAU with the higher dose of the chelator induced changes in the LV contractility similar to those seen in the DAU only group. Furthermore, correlation analysis of both parameters of the LV systolic function ($\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$ and LVEF) showed a significant positive relationship between these parameters (Fig. 7). Arterial blood pressure and heart rate values, as determined together with contractility, are shown in Table 1.

Cardiac Troponin T Plasma Concentrations. Repeated treatment with DAU induced a significant elevation in plasma concentration of cardiac troponin T commencing

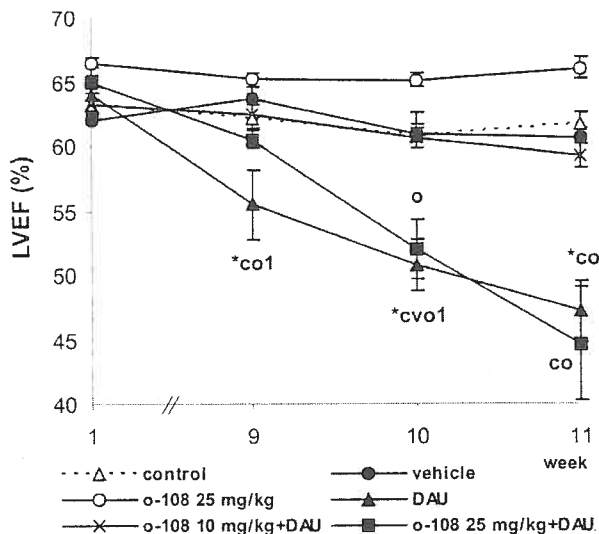


Fig. 5. LVEF during the experiment. Statistical significance ($P < 0.05$), paired t test: *, comparison with the initial values within each group. Statistical significance ($P < 0.05$, ANOVA) in comparison with: c, control group; v, vehicle group; o, 25 mg/kg *o*-108 (alone); and 1, *o*-108 (10 mg/kg) + daunorubicin.

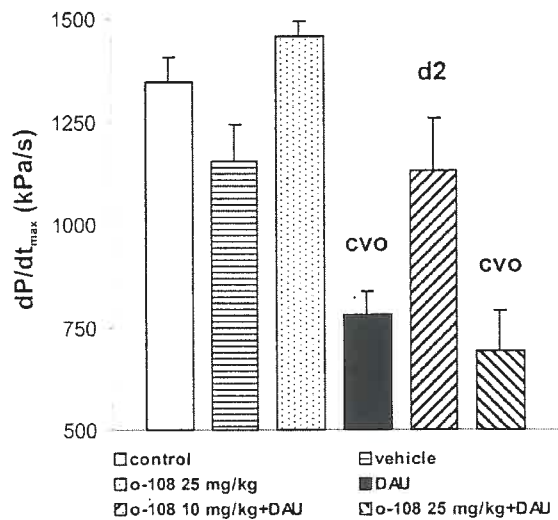


Fig. 6. Left ventricular contractility (dP/dt_{max}) at the end of the experiment. Statistical significance ($P < 0.05$, ANOVA): comparison with groups: c, control; v, vehicle; o, 25 mg/kg *o*-108 (alone); d, daunorubicin; and 2, *o*-108 (25 mg/kg) + daunorubicin.

with the 8th week (Fig. 8). Cardiac troponin T elevations were also determined in the combination group treated with 25 mg/kg *o*-108. On the other hand, markedly suppressed elevation of this marker was observed in the group treated with daunorubicin together with *o*-108 in the lower dose. At the end of the experiment, slightly increased levels of troponin T were detectable in animals treated with *o*-108 alone; nevertheless, these values did not reach the significance with respect to either the control or vehicle groups.

Biochemical and Hematological Analyses. The follow-up of serum biochemistry (Table 2) in the DAU group revealed a significant elevation in creatinine, cholesterol,

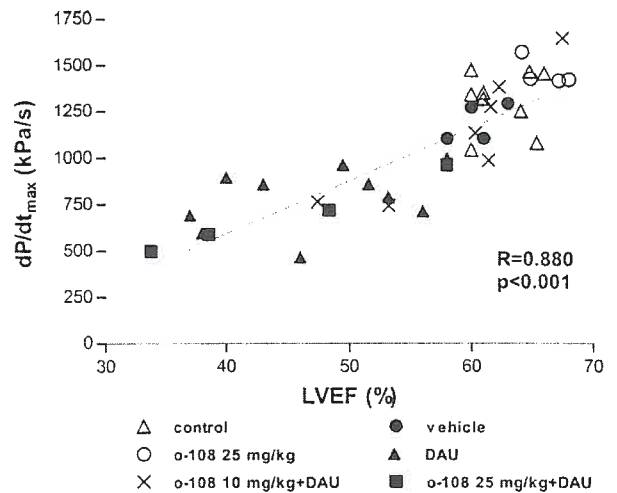


Fig. 7. Scatterplot of the left ventricular contractility (dP/dt_{max}) versus LVEF. dP/dt_{max} index of contractility obtained invasively, LVEF was obtained noninvasively through echocardiographic examination. R , correlation coefficient. P statistical significance was determined by the Spearman correlation analysis.

TABLE 1
Invasive hemodynamic measurements: blood pressure (BP) and heart rate (HR)

Group	BP	HR
	mm Hg	min ⁻¹
Control	105.1 ± 3.0	306.7 ± 6.3
Vehicle	99.2 ± 4.1	309.2 ± 6.1
<i>o</i> -108 (25 mg/kg)	87.1 ± 3.5	320.5 ± 6.5
Daunorubicin	79.0 ± 4.0 cv1	270.4 ± 10.4 cvo
<i>o</i> -108 (10 mg/kg) + DAU	94.0 ± 3.0	277.4 ± 5.6 vo
<i>o</i> -108 (25 mg/kg) + DAU	84.6 ± 10.7 c	262.2 ± 6.8 cvo

Statistical significance ($P < 0.05$, ANOVA: comparison with groups: c, control; v, vehicle; o, 25 mg/kg *o*-108 (alone); and 1, *o*-108 (10 mg/kg) + daunorubicin.

and triglycerides, whereas a significant decrease was observed in total protein, ALP, and serum iron. The coadministration of either dose of *o*-108 mostly did not significantly change the trends observed in the group receiving DAU alone, although with the 10 mg/kg dose, most of changes were generally slightly less pronounced.

With respect to hematological parameters, repeated administration of DAU induced significant decreases in the counts of leukocytes and erythrocytes, hematocrit, and hemoglobin, whereas, at the same time, the mean cell volume and red cell distribution width tended to increase (Table 3). Cotreatment with either dose of *o*-108 led to similar results; the only significant difference appeared in the value of the mean cell volume, which increased at the end of experiment in the *o*-108 (10 mg/kg) + DAU group.

Post Mortem Examination. Pleural effusion (hydrothorax), often accompanied with pericardial effusion (hydropericardium), was present in 10 of 15 (67%) daunorubicin-receiving animals, whereas ascites were less frequent (4/15, i.e., 27%) and usually also less severe. The combination of DAU with 10 mg/kg *o*-108 caused hydrothorax in only 25% of animals (2/8), and no ascites was observed. The same treatment employing the higher dose of the chelator induced hydrothorax in 75% animals surviving until the end of experiment (3/4), whereas no distinguishable effusion was ap-

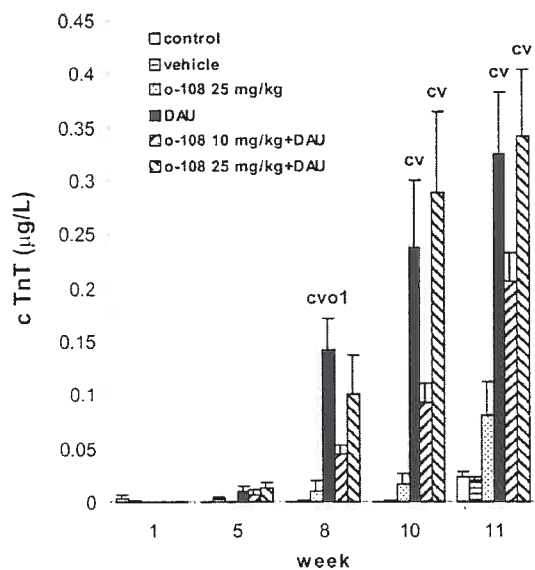


Fig. 8. Cardiac troponin T plasma concentrations during the experiment. Statistical significance ($P < 0.05$, ANOVA) in comparison with: c, control group; v, vehicle group; o, *o*-108 25 mg/kg (alone); and l, *o*-108 (10 mg/kg) + daunorubicin.

parent in four prematurely dying animals. No other abnormalities were observed.

Histological Examinations. In comparison with control animals (Fig. 9a), as well as other groups under study (Fig. 9, b, c, e, and f), DAU treatment induced a massive focal damage of the left-ventricular myocardium (Fig. 9d). The large groups of degenerating to necrotic cells frequently accompanied with a mononuclear infiltration were observed (Fig. 9d). The resulting damage was so profound that the extent of healing process (gradual replacement of necrotic cells by the fibrotic tissue) was insufficient, which resulted into the partial disintegration of myocardium in these areas.

Basically similar features of myocardial damage were also observed in the LV in animals treated with *o*-108 (10 mg/kg) + DAU. Nevertheless, both the extent and intensity of this injury, as well as the amount of the fibrotic scar tissue, were apparently less expressed (Fig. 9e). Therefore, the overall integrity of the myocardial tissue was not markedly altered. On the other hand, the combination of DAU with higher (25 mg/kg) dose of the chelator (Fig. 9f) led to myocardial injury broadly comparable with that after the treatment with DAU alone. However, a difference could be found in the less prominent disintegration of the myocardial tissue in this case. In contrast, only mild changes were detected in the prematurely dead animals of this group. In comparison with the LV, the myocardium of the right ventricle was always less damaged. Interestingly, in both groups treated with DAU in combination with *o*-108, these changes were less expressed than in DAU alone group.

With respect to the biochemical changes (namely the increased creatinine level), suggesting impaired glomerular filtration, our interest was also directed to the histopathological examination of the kidney. In comparison with controls (Fig. 10a), a severe damage of parenchyma was found in the kidney of group treated with DAU alone (Fig. 10d). Toxic

damage developed, particularly in the cortical tubules, mostly in the form of tubular nephritis. The whole range of changes, i.e., from hyaline degeneration to the necrosis of the epithelial cells of many proximal and distal convoluted tubules in the cortex, less of the collecting tubules in the medulla were found, which documented the subsequent development of the damage. The volume of hyaline casts within the lumina of tubules varied from case to case (Fig. 10d).

No substantial differences in kidney morphology were found in animals treated with the vehicle for *o*-108 (10% Cremophor) and *o*-108 alone (Fig. 10, b and c). These mild changes were only more focal and slightly less expressed in the *o*-108 only group. In comparison with DAU treatment, the less severe damage was observed similarly in both doses (10 and 25 mg/kg) of *o*-108 in combination with DAU (Fig. 10, e and f). Hyaline degeneration of different intensity in most of the proximal, less distal convoluted tubules, and scattered hyaline cast in the lumina of these tubules were characteristics of the above-mentioned groups. Only small number of necrotic epithelial cells in cortical tubules was present. No abnormalities were observed in other evaluated organs in either group.

Discussion

Lack of interference with anticancer efficacy of ANTs is considered to be a principal prerequisite for a perspective cardioprotective agent. Hence, in the first part we have focused on this using the promyelocytic leukemia cell line HL-60. It is clearly shown that *o*-108, in a concentration range that might be expected in vivo (Kovarikova et al., 2006), does not have potential to blunt the extensive antiproliferative efficacy of DAU. Moreover, *o*-108 itself was shown to have moderate antiproliferative potential, which is in line with previous observations (Richardson et al., 1995). It should be noted that some other aroylhydrazones (particularly those derived from salicylaldehyde, 2-hydroxy-1-naphthylaldehyde or di-2-pyridylketone) has been shown to be significantly more efficient from this point of view (Richardson et al., 1995; Le and Richardson, 2004; Yuan et al., 2004; Kalinowski and Richardson, 2005). The present findings are in concert with latest experimental and clinical data, which conclude that chelator-based cardioprotective approach employing dexrazoxane does not have an impact on the anticancer efficacy of ANTs (Swain and Vici, 2004; Wu and Hasinoff, 2005; Marty et al., 2006), despite some previous concerns (Swain et al., 1997). With this in mind, *o*-108 certainly remains to be a very good candidate for further cardioprotective studies.

The main aim of the present study was to explore possible cardioprotective effects of *o*-108 against anthracycline-induced chronic cardiac toxicity. The model used in the present study was previously analyzed and has been shown as appropriate and suitable for this purpose (Simunek et al., 2004). The use of DAU instead of doxorubicin is based on our previous study, in which DAU administered weekly to rabbits was shown to induce less severe extracardiac toxicity and mortality along with well reproducible cardiac injury (Klimtova et al., 2002). Dexrazoxane, as a positive control, was previously capable of affording effective cardioprotection in our model that again supports its relevance. Furthermore, it was recently pointed out that, in rabbits, the cardiomyo-

TABLE 2
Selected biochemical parameters

Parameter/Group	Beginning of the Study	Before the 5th Administration	End of the Study
Iron (μM)			
Control	40.9 \pm 3.4	34.9 \pm 2.6	46.1 \pm 1.8
Vehicle	34.2 \pm 1.7	32.1 \pm 2.1	43.7 \pm 2.7*
<i>o</i> -108 (25 mg/kg)	36.5 \pm 4.2	35.5 \pm 4.6	42.8 \pm 3.6
DAU	29.8 \pm 3.7	24.2 \pm 2.2c	15.4 \pm 2.6*cvo
<i>o</i> -108 (10 mg/kg) + DAU	28.2 \pm 2.3	19.9 \pm 1.9*cvo	22.8 \pm 2.0*cvo
<i>o</i> -108 (25 mg/kg) + DAU	54.0 \pm 2.4vd1	20.9 \pm 3.0*cvo	17.2 \pm 2.1*cvo
Creatinine (μM)			
Control	112.7 \pm 4.5	112.6 \pm 6.6	119.6 \pm 8.1
Vehicle	109.1 \pm 4.8	106.4 \pm 4.8	111.3 \pm 3.8
<i>o</i> -108 (25 mg/kg)	105.0 \pm 1.5	115.0 \pm 5.6	150.8 \pm 8.7*
DAU	99.4 \pm 4.4	108.8 \pm 4.9	163.8 \pm 25.6*
<i>o</i> -108 (10 mg/kg) + DAU	117.4 \pm 3.9	128.5 \pm 3.6*	134.4 \pm 4.2*
<i>o</i> -108 (25 mg/kg) + DAU	98.1 \pm 8.3	136.4 \pm 15.8*	213.8 \pm 24.3*cv
Protein (g/l)			
Control	60.8 \pm 1.4	61.3 \pm 1.6	62.7 \pm 1.2
Vehicle	62.8 \pm 1.4	62.9 \pm 1.1	60.1 \pm 0.9*
<i>o</i> -108 (25 mg/kg)	60.1 \pm 1.1	60.9 \pm 1.6	57.3 \pm 4.4
DAU	62.3 \pm 0.9	62.7 \pm 1.2	47.5 \pm 1.5*cv
<i>o</i> -108 (10 mg/kg) + DAU	60.2 \pm 0.7	66.4 \pm 1.8*2	51.8 \pm 1.1*c
<i>o</i> -108 (25 mg/kg) + DAU	63.7 \pm 1.0	58.6 \pm 1.0	42.2 \pm 1.8*cv
Albumin (g/l)			
Control	55.0 \pm 0.9	53.9 \pm 0.9	55.3 \pm 0.9
Vehicle	56.5 \pm 0.7	55.5 \pm 0.8	53.4 \pm 0.9*
<i>o</i> -108 (25 mg/kg)	51.0 \pm 2.8	52.6 \pm 2.9	49.2 \pm 3.3
DAU	57.2 \pm 1.0	57.3 \pm 0.9	33.1 \pm 3.6*cv
<i>o</i> -108 (10 mg/kg) + DAU	57.2 \pm 0.7	58.3 \pm 1.4d2	41.9 \pm 1.7*c
<i>o</i> -108 (25 mg/kg) + DAU	61.0 \pm 1.3	50.3 \pm 2.3*	27.2 \pm 1.6*cv
Cholesterol (μM)			
Control	1.81 \pm 0.49	1.53 \pm 0.31	0.97 \pm 0.17*
Vehicle	1.51 \pm 0.15	1.16 \pm 0.16*	1.15 \pm 0.17
<i>o</i> -108 (25 mg/kg)	1.73 \pm 0.42	1.71 \pm 0.37	1.19 \pm 0.25
DAU	1.16 \pm 0.16	1.44 \pm 0.26	2.50 \pm 0.35*c
<i>o</i> -108 (10 mg/kg) + DAU	1.81 \pm 0.30	2.90 \pm 0.43v	3.04 \pm 0.43*cv
<i>o</i> -108 (25 mg/kg) + DAU	1.89 \pm 0.20	4.59 \pm 0.78*cvd	7.65 \pm 3.22cvo
TAG (mM)			
Control	0.95 \pm 0.11	1.18 \pm 0.14v	0.92 \pm 0.05
Vehicle	0.85 \pm 0.09	0.63 \pm 0.05*	0.79 \pm 0.06
<i>o</i> -108 (25 mg/kg)	0.85 \pm 0.14	0.77 \pm 0.04	1.14 \pm 0.27
DAU	0.84 \pm 0.07	0.91 \pm 0.07	2.11 \pm 0.42*v
<i>o</i> -108 (10 mg/kg) + DAU	0.63 \pm 0.06	1.12 \pm 0.27*	1.77 \pm 0.29*v
<i>o</i> -108 (25 mg/kg) + DAU	0.86 \pm 0.15	2.33 \pm 0.53*v	8.78 \pm 4.68cv
ALT ($\mu\text{kat/l}$)			
Control	1.19 \pm 0.15	1.22 \pm 0.18	0.99 \pm 0.12
Vehicle	1.51 \pm 0.24	1.19 \pm 0.12	0.92 \pm 0.05*
<i>o</i> -108 (25 mg/kg)	1.91 \pm 0.31	1.40 \pm 0.13	1.13 \pm 0.13*
DAU	1.10 \pm 0.10	1.09 \pm 0.12	0.88 \pm 0.19
<i>o</i> -108 (10 mg/kg) + DAU	1.08 \pm 0.13	0.94 \pm 0.14	0.74 \pm 0.08*
<i>o</i> -108 (25 mg/kg) + DAU	1.05 \pm 0.11	0.80 \pm 0.07	0.73 \pm 0.11*
AST ($\mu\text{kat/l}$)			
Control	0.60 \pm 0.11	0.75 \pm 0.17	0.68 \pm 0.06
Vehicle	0.67 \pm 0.09	0.52 \pm 0.05	0.68 \pm 0.04
<i>o</i> -108 (25 mg/kg)	0.70 \pm 0.13	0.56 \pm 0.09	0.70 \pm 0.05
DAU	0.66 \pm 0.11	0.64 \pm 0.06	0.85 \pm 0.22
<i>o</i> -108 (10 mg/kg) + DAU	0.46 \pm 0.07	0.59 \pm 0.16	0.52 \pm 0.04
<i>o</i> -108 (25 mg/kg) + DAU	0.82 \pm 0.09	0.45 \pm 0.11*	0.48 \pm 0.03*
ALP ($\mu\text{kat/l}$)			
Control	2.16 \pm 0.32	2.09 \pm 0.26	1.93 \pm 0.21
Vehicle	2.73 \pm 0.46	2.10 \pm 0.32*	1.73 \pm 0.23*
<i>o</i> -108 (25 mg/kg)	2.28 \pm 0.23	2.11 \pm 0.30	1.76 \pm 0.26
DAU	2.78 \pm 0.32	2.35 \pm 0.17	0.86 \pm 0.12*
<i>o</i> -108 (10 mg/kg) + DAU	2.53 \pm 0.44	2.27 \pm 0.36	1.79 \pm 0.37*
<i>o</i> -108 (25 mg/kg) + DAU	3.40 \pm 0.40	1.49 \pm 0.26*	0.73 \pm 0.03*

Statistical significance ($P < 0.05$); Paired *t*-test; * paired comparison with the initial values within each group. ANOVA, comparison with c, control group; v, vehicle group; o, *o*-108 (25 mg/kg) (alone); d, daunorubicin group; 1, *o*-108 (10 mg/kg) + DAU; and 2, *o*-108 (25 mg/kg) - DAU.

cyte calcium handling and structure and function of myocardial sarcomere reflect, both in normal and failing heart, the human system more accurately than in rodents (Marian, 2005).

In this study, the chelator *o*-108 was administered to rabbits in two doses (10 and 25 mg/kg) 30 min before each DAU injection. The timing and route of administration was

adopted from previous successful studies with dexrazoxane, whereas the dosage was derived from the study on the safety and tolerability of the repeated administration of this drug (Sterba et al., 2005). The results of the present study showed that 10 mg/kg *o*-108, administered before DAU, was able to completely abolish the daunorubicin-induced mortality. The well being of the animals in this group was evidenced by

TABLE 3
Hematological parameters

Parameter/Group	Beginning of the Study	Before the 5th Administration	End of the Study
Leukocytes ($\times 10^9/l$)			
Control	7.1 \pm 0.5	6.5 \pm 0.7	5.1 \pm 0.5*
Vehicle	6.6 \pm 0.3	6.0 \pm 0.3*	5.5 \pm 0.7
<i>o</i> -108 (25 mg/kg)	6.9 \pm 0.2	6.3 \pm 0.6	5.1 \pm 0.7
DAU	5.4 \pm 0.3	4.4 \pm 0.4	3.3 \pm 0.5* ^v
<i>o</i> -108 (10 mg/kg) + DAU	6.8 \pm 0.9	6.2 \pm 0.9	2.7 \pm 0.3* ^{cv}
<i>o</i> -108 (25 mg/kg) + DAU	5.1 \pm 0.5	5.3 \pm 0.8	3.0 \pm 0.7
Erythrocytes ($\times 10^{12}/l$)			
Control	5.72 \pm 0.18	6.00 \pm 0.10	5.83 \pm 0.12
Vehicle	5.84 \pm 0.18	5.56 \pm 0.14*	5.68 \pm 0.12
<i>o</i> -108 (25 mg/kg)	5.68 \pm 0.19	5.60 \pm 0.15	5.34 \pm 0.18
DAU	6.13 \pm 0.19	4.49 \pm 0.13* ^{cvo}	4.00 \pm 0.23* ^{cv}
<i>o</i> -108 (10 mg/kg) + DAU	6.11 \pm 0.20	5.13 \pm 0.28*	4.51 \pm 0.24* ^{cv}
<i>o</i> -108 (25 mg/kg) + DAU	6.38 \pm 0.20	3.98 \pm 0.43* ^{cvo1}	4.01 \pm 0.27* ^{cv}
Hemoglobin (g/l)			
Control	125.3 \pm 3.4	132.9 \pm 1.8*	130.4 \pm 1.8
Vehicle	128.1 \pm 3.1	126.7 \pm 2.9	129.5 \pm 2.2
<i>o</i> -108 (25 mg/kg)	120.3 \pm 5.5	118.8 \pm 2.7	118.3 \pm 5.2
DAU	131.5 \pm 2.8	100.9 \pm 2.9* ^{cv}	83.7 \pm 4.7* ^{cvo1}
<i>o</i> -108 (10 mg/kg) + DAU	130.0 \pm 3.8	108.7 \pm 6.7*	98.9 \pm 4.8* ^{cvo}
<i>o</i> -108 (25 mg/kg) + DAU	136.8 \pm 3.4	87.8 \pm 9.9* ^{cv}	83.0 \pm 4.9* ^{cvo}
Hematocrit			
Control	0.385 \pm 0.012	0.417 \pm 0.007*	0.402 \pm 0.007
Vehicle	0.399 \pm 0.009	0.393 \pm 0.008	0.391 \pm 0.008
<i>o</i> -108 (25 mg/kg)	0.379 \pm 0.013	0.374 \pm 0.009	0.373 \pm 0.017
DAU	0.393 \pm 0.010	0.317 \pm 0.008* ^c	0.273 \pm 0.016* ^{cvo1}
<i>o</i> -108 (10 mg/kg) + DAU	0.413 \pm 0.010	0.351 \pm 0.023*	0.334 \pm 0.016* ^{cv}
<i>o</i> -108 (25 mg/kg) + DAU	0.429 \pm 0.008	0.294 \pm 0.034* ^c	0.279 \pm 0.013* ^{cvo}
MCV (fL)			
Control	67.3 \pm 0.9	69.6 \pm 1.1	69.0 \pm 0.7
Vehicle	68.8 \pm 1.1	70.9 \pm 0.8*	69.0 \pm 1.0
<i>o</i> -108 (25 mg/kg)	66.8 \pm 0.4	66.8 \pm 1.1	69.9 \pm 1.3
DAU	60.0 \pm 4.5	70.7 \pm 0.9*	68.3 \pm 1.5*
<i>o</i> -108 (10 mg/kg) + DAU	67.6 \pm 0.9	68.4 \pm 0.8	74.1 \pm 1.2* ^d
<i>o</i> -108 (25 mg/kg) + DAU	67.5 \pm 1.1	67.2 \pm 6.0	70.1 \pm 2.4
RDW (%)			
Control	15.6 \pm 0.4	13.7 \pm 0.3*	13.9 \pm 0.3*
Vehicle	13.8 \pm 0.6	13.4 \pm 0.3	14.4 \pm 0.5
<i>o</i> -108 (25 mg/kg)	13.6 \pm 0.8	14.9 \pm 0.8*	15.1 \pm 0.2
DAU	16.2 \pm 0.6 ^{v1}	21.1 \pm 0.9* ^{cv}	24.0 \pm 0.7* ^{cv}
<i>o</i> -108 (10 mg/kg) + DAU	13.7 \pm 0.2	19.3 \pm 1.2*	21.7 \pm 1.2* ^{cv}
<i>o</i> -108 (25 mg/kg) + DAU	14.9 \pm 0.4	20.7 \pm 1.5* ^{cv}	26.4 \pm 1.2* ^{cv}
Trombocytes ($\times 10^9/l$)			
Control	469 \pm 57	399 \pm 28	445 \pm 38
Vehicle	330 \pm 21	352 \pm 19	370 \pm 31
<i>o</i> -108 (25 mg/kg)	327 \pm 23	448 \pm 73	355 \pm 29
DAU	394 \pm 44	331 \pm 44	306 \pm 65
<i>o</i> -108 (10 mg/kg) + DAU	230 \pm 27 ^c	221 \pm 60	287 \pm 36
<i>o</i> -108 (25 mg/kg) + DAU	205 \pm 15 ^{cd}	189 \pm 81	252 \pm 60

Statistical significance ($P < 0.05$, paired *t*-test); * paired comparison with the initial values. Statistical significance ($P < 0.05$, ANOVA) in comparison with c, control group; v, vehicle group; o, *o*-108 (25 mg/kg) (alone); d, daunorubicin group; and 1, *o*-108 (10 mg/kg) + DAU. MCV, mean cell volume; RDW, red blood cell distribution.

significant body weight gain similar to that determined in the vehicle group and without significant differences compared with controls. Furthermore, the echocardiographically determined LVEF showed no significant drop in the LV systolic function during the whole study. These values were significantly improved compared with the group treated with DAU alone. The even more sensitive invasive measurement of the cardiac contractility (dP/dt_{max}), performed at the end of experiment, clearly revealed significantly better LV performance in the *o*-108-treated (10 mg/kg) animals. These findings are even more encouraging in the light of 100% survival in this group, because all animals under study were invasively examined, including those with potential cardiac deterioration. This is not the case of the DAU-only group in which those animals with the most severe cardiac failure died prematurely. Furthermore, at the end of study, both parameters of systolic function (LVEF and dP/dt_{max}) have shown a very good correlation. Cardiac troponin T plasma rise, as a result

of myocardial injury, was also less pronounced in the group treated with the chelator, which corresponds with the lower extent and intensity of the LV myocardial damage, as assessed by histological examination.

With this in mind, rather surprising, however, unequivocal results were obtained when the same cotreatment was realized with the 2.5-fold higher dose (25 mg/kg) of the chelator. First, the mortality was worse than in animals treated with DAU alone. However, the early timing of the premature mortality (in relatively low cumulative doses of DAU) is unlikely to be attributed to cardiac damage. This hypothesis was also evidenced by the absence of marked histopathological changes in myocardium together with the minimal levels of troponin T determined before the death cases. The most conspicuous biochemical finding in the *o*-108 (25 mg/kg) + DAU group was progressively increasing creatinemia, particularly at the end of the study—more pronounced than in DAU alone and even more marked in comparison with com-

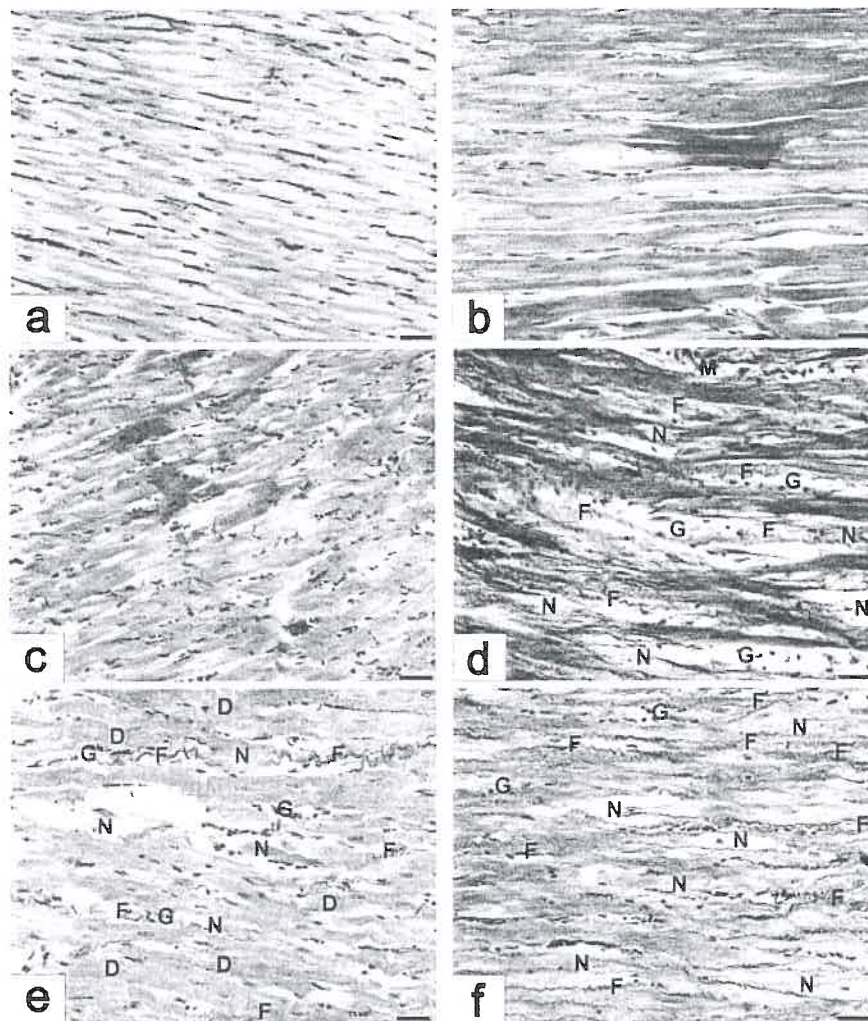


Fig. 9. The myocardium of the left-ventricular wall. a, control group. Intact myocardium; typical cross-striated myofibrils fill in the cytoplasm of cardiomyocytes except for the endoplasm (a pale-stained region) around the nucleus; rich capillary network around the columns of cardiomyocytes with chains of erythrocytes marked the boundaries between adjacent cells. b, vehicle. Very mild signs of myocardial damage come through the presence of myocytes with intensely eosinophilic (dark-stained) cytoplasm, in which here and there, the pyknotic nucleus appears; necrotic cells are present only rarely. c, *o*-108 (25 mg/kg). Similar changes as in the previous group—scattered groups of cardiomyocytes with intensely eosinophilic (dark-stained) cytoplasm represent only fine changes within the myocardium. d, daunorubicin (3 mg/kg). Massive focal toxic damage of the heart is depicted by large groups of degenerating cells (the majority of cells in the picture) to necrotic cells (N) frequently accompanied with a mononuclear infiltrate (M); this damage is so profound that the following formation of the granular tissue (G) with vessels, which subsequently becomes mature fibrotic scar tissue (F), is not sufficient and the process results in partial focal disintegration of the myocardium (compare it with all other groups). e, *o*-108 (10 mg/kg) + DAU. Although the character of myocardial damage is similar to the DAU group, the extent and intensity of this injury, as well as the amount of the granular (G) and following fibrotic scar tissue (F), are markedly less expressed; thus, the integrity of the myocardial tissue is not compromised. D, degenerating cell; N, necrotic cell. f, *o*-108 (25 mg/kg) + DAU. The myocardial injury in this group is more comparable with that after the treatment with DAU alone; i.e., a large number of degenerating and necrotic cells and the fibrotic tissues (F) are observed; on the other hand, the granular tissue is of a smaller amount here; the basic difference, compared with the previous group, is that the disintegration of the myocardial tissue is less prominent in this case; darker-stained cells are those with intensely eosinophilic cytoplasm. Masson's blue trichrome; bar, 30 μ m.

bination of DAU with the lower dose of the chelator. Surprisingly, these biochemical changes were not followed by corresponding morphological findings in surviving animals (only modest to medium changes of the similar pattern as in the DAU group). Unfortunately, the kidneys, as well as most of other organs, could not be appropriately examined in prematurely dead animals due to the autolysis. Therefore, it is not feasible to draw definitive conclusions on the cause of the mortality observed in this group from the present study, and

this is supposed to be addressed in further experiments designed for this purpose.

Although the occurrence of premature deaths unrelated to heart injury was quite surprising, the absence of marked cardioprotection with an increased dose of the chelator caused even more curiosity. With respect to these findings, it should be noted that repeated administration of *o*-108 alone to rabbits in the same schedule had no distinct impact on either the morphology or function of the heart or other or-

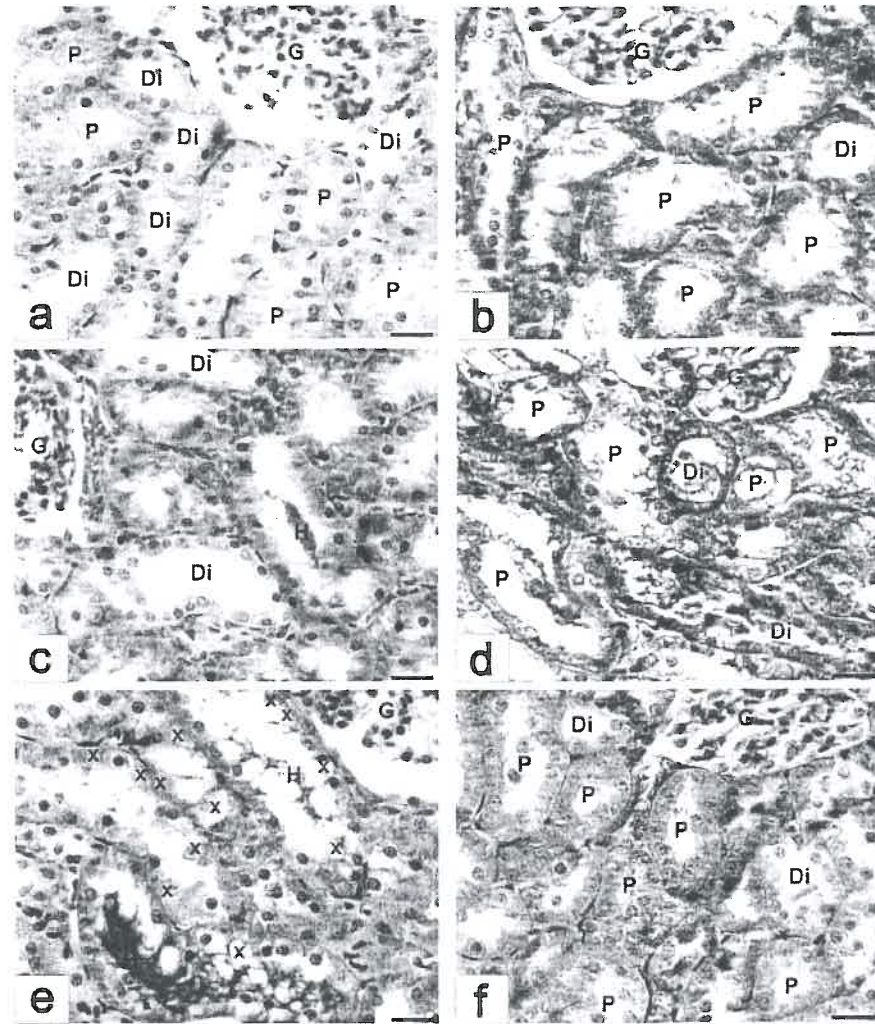


Fig. 10. The cortex of the kidney. a, control group: normal appearance of the cortex; a part of the glomerulus (G) is surrounded by Bowman's capsule with a slit for primary urine between its both layers. P, proximal convoluted tubules; Di, distal convoluted tubules. b, Vehicle. The hyaline degeneration of epithelial cells, depicted by increased eosinophilia of the cytoplasm (because of small eosinophilic granules, the remnants of the mitochondria), is present in most of the proximal tubules (P) but also in many distal tubules (Di). Here, all tubules reveal hyaline degeneration; here and there, larger groups of necrotic cells are present in the epithelium, and their remnants appear within the lumina of the tubules. G, glomerulus. c, *o*-108 (25 mg/kg). The character of morphological changes is comparable with the previous group but they are less expressed. Here and there, the hyaline casts (H) are present within the lumina of the tubules (here in the proximal tubule). Di, distal tubules lined with undamaged epithelium; G, glomerulus. d, daunorubicin (3 mg/kg). Acute focal tubular nephritis is characterized by the presence of numerous necrotic cells in both proximal (P) and distal (Di) tubules; the remaining lining epithelia reveals hyaline degeneration (dark-stained cells). G, glomerulus. e, *o*-108 (10 mg/kg) + DAU. Protective influence of *o*-108 in coadministration with DAU is well visible, despite the presence of hyaline degeneration of different intensity in most of the proximal and less in the distal (not shown) convoluted tubules; only a small number of necrotic cells (x) and scattered hyaline cast (H) are present. G, glomerulus. f, *o*-108 (25 mg/kg) + DAU. Similar extent of the damage as in the previous group is shown. Most of the tubules reveal that the hyaline degeneration of the epithelium, scatter dark pyknotic nuclei, are also present in the epithelial cells. P, proximal tubule; Di, distal tubule; G, glomerulus. Masson's blue trichrome; bar, 20 μ m

gans, even in the dose of 100 mg/kg (Sterba et al., 2005). The findings from the present study cannot be attributed to interindividual or seasonal variability, because these animals were randomized for *o*-108 cotreatment and the same experimental conditions were employed. Moreover, the model used in this study is experienced to be well reproducible (Gersl and Hrdina, 1994; Simunek et al., 2004). The authors rather suggest that it is a causal observation, because a similarly unusual pattern of dose-response relationship was also witnessed previously during an extension of our study of cardio-

protective effect of another aroylhydrazone iron chelator, PIH. Whereas 25 mg/kg PIH in our model seemed to have positive effects on DAU-induced mortality and cardiac function (Simunek et al., 2005b), further escalation of the PIH dose to 50 mg/kg resulted in negative outcomes in terms of both overall mortality and cardioprotective effects (Gersl et al., 2004).

Several hypotheses might be proposed to explain the findings described above; e.g., a very recent study on the pharmacokinetics of *o*-108 (Kovarikova et al., 2006) and salicylal-

dehyde isonicotinoyl hydrazone (another aroylhydrazone iron chelator with high antioxidative potential) (Simunek et al., 2005a) suggested that these chelators generally possess relatively short terminal half-lives of elimination (Kovarikova et al., 2005). This might be a limitation in the light of the relatively long stay of anthracyclines and their metabolites in myocardium (Cusack et al., 1995). Our results suggest that the chelator administered at the optimal dose may chelate the intracellular labile iron pool inside the cardiomyocytes and thereby afford meaningful cardioprotection. Nevertheless, further boosting of the cardioprotective efficacy might rather require a longer intracellular half-life instead of its higher peak concentrations; as in this case, some perturbations in the cellular iron metabolism in the cardiomyocytes already compromised with an anthracycline may appear.

Recent studies suggest that anthracyclines (and/or their 13-OH metabolites) are able to significantly impair cellular iron homeostasis (Kwok and Richardson, 2004; Xu et al., 2005). Kwok and Richardson (2003) demonstrated that anthracyclines are capable of causing marked perturbations in iron storage in ferritin and its subsequent release. It is plausible that very intensive chelation, such as that induced with ICL670 treatment (Hasinoff et al., 2003) or with high doses of aroylhydrazones, might "overshoot" the optimal degree of chelation and subsequently contribute to the iron metabolism imbalance caused by anthracyclines. As this effect might be associated with the peak concentrations, perhaps it could be helpful to administer aroylhydrazones by longer infusions or in smaller doses before and possibly also after anthracyclines. Furthermore, even better might be to improve the pharmacokinetic properties of *o*-108 through mild modification of its chemical structure.

In conclusion, the present study has shown that the novel iron chelator *o*-108 does not have any negative impact on the antiproliferative efficacy of daunorubicin. Moreover, the chelator itself has moderate antiproliferative effects that are additive to those of DAU. Furthermore, besides dexrazoxane, this study is the first to support the iron chelation concept as an effective cardioprotective strategy against chronic type of anthracycline cardiotoxicity; administration of *o*-108 (10 mg/kg) was able to completely overcome the daunorubicin-induced mortality along with marked improvement in cardiac function and morphology. However, the surprising dose dependence experienced in this study suggests that the role of iron in this process might be more complex than originally supposed. Hence, further studies of iron chelation-based cardioprotection are needed to determine the potential of this approach and to obtain deeper insight into the pathogenesis of the anthracycline cardiotoxicity.

Acknowledgments

We thank Ludmila Koželuhová for skillful technical assistance during the whole study and Associate Professor Bohuslav Mánek for the kind review of English grammar. We also thank Shan Soe-Lin and Alex D. Sheftel for reading the manuscript and helpful suggestions.

References

- Abou-El-Hassan MA, Rabelink MJ, van der Vijgh WJ, Bast A, and Hoeben RC (2003) A comparative study between catalase gene therapy and the cardioprotector monohydroxyethylrutoside (MonoHER) in protecting against doxorubicin-induced cardiotoxicity in vitro. *Br J Cancer* 89:2140–2146.
- Adamcova M, Sterba M, Simunek T, Potacova A, Popelova O, Mazurova Y, and Gersl V (2005) Troponin as a marker of myocardial damage in drug-induced cardiotoxicity. *Expert Opin Drug Saf* 4:457–472.
- Barnabe N, Zastre JA, Venkataram S, and Hasinoff BB (2002) Deferiprone protects against doxorubicin-induced myocyte cytotoxicity. *Free Radic Biol Med* 33:266–275.
- Baker E, Richardson D, Gross S, and Ponka P (1992) Evaluation of the iron chelation potential of hydrazones of pyridoxal, salicylaldehyde and 2-hydroxy-1-naphthylaldehyde using the hepatocyte in culture. *Hepatology* 15:492–501.
- Berthiaume JM, Oliveira PJ, Fariss MW, and Wallace KB (2005) Dietary vitamin E decreases doxorubicin-induced oxidative stress without preventing mitochondrial dysfunction. *Cardiovasc Toxicol* 5:257–267.
- Bruynzeel AM, Mul PP, Berkhof J, Bast A, Niessen HW, and van der Vijgh WJ (2006) The influence of the time interval between monoHER and doxorubicin administration on the protection against doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 58:699–702.
- Cvetkovic RS and Scott LJ (2005) Dexrazoxane: a review of its use for cardioprotection during anthracycline chemotherapy. *Drugs* 65:1005–1024.
- Cusack BJ, Young SP, and Olson RD (1995) Daunorubicin and daunorubicinol pharmacokinetics in plasma and tissues in the rat. *Cancer Chemother Pharmacol* 35:213–218.
- Fisher PW, Salloum F, Das A, Hyder H, and Kukreja RC (2005) Phosphodiesterase-5 inhibition with sildenafil attenuates cardiomyocyte apoptosis and left ventricular dysfunction in a chronic model of doxorubicin cardiotoxicity. *Circulation* 111:1601–1610.
- Gersl V and Hrdina R (1994) Noninvasive polygraphic cardiac changes in daunorubicin-induced cardiomyopathy in rabbits. *Sborník vědeckých prací Lékařské fakulty Karlovy University v Hradci Králové* 37:49–55.
- Gersl V, Sterba M, Simunek T, Kaplanova J, Adamcova M, Klimtova I, Cermakova E, and Mazurova Y (2004) Study of the effects of PIH in daunorubicin-induced cardiomyopathy in rabbits. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 31:A197.
- Hasinoff BB, Hellmann K, Herman EH, and Ferrans VJ (1998) Chem, biological and clinical aspects of dexrazoxane and other bisdioxopiperazines. *Curr Med Chem* 5:1–28.
- Hasinoff BB, Patel D, and Wu X (2003) The oral iron chelator ICL670A (deferasirox) does not protect myocytes against doxorubicin. *Free Radic Biol Med* 35:1469–1479.
- Herman EH and Ferrans VJ (1986) Pretreatment with ICRF-187 provides long-lasting protection against chronic daunorubicin cardiotoxicity in rabbits. *Cancer Chemother Pharmacol* 16:102–106.
- Herman EH, Ferrans VJ, Myers CE, and Van Vleet JF (1985) Comparison of the effectiveness of (+/-)-1,2-bis(3,5-dioxopiperazinyl-1-yl)propane (ICRF-187) and *N*-acetylcysteine in preventing chronic doxorubicin cardiotoxicity in beagles. *Cancer Res* 45:276–281.
- Herman EH, Zhang J, and Ferrans VJ (1994) Comparison of the protective effects of desferrioxamine and ICRF-187 against doxorubicin-induced toxicity in spontaneously hypertensive rats. *Cancer Chemother Pharmacol* 35:93–100.
- Hrdina R, Gersl V, Klimtova I, Simunek T, Machackova J, and Adamcova M (2000) Anthracycline-induced cardiotoxicity. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 43:75–82.
- Iliskovic N, Hasinoff BB, Maliszka KL, Li T, Danelisen I, and Singal PK (1999) Mechanisms of beneficial effects of probucol in adriamycin cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem* 196:43–49.
- Kalinowski DS and Richardson DR (2005) The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. *Pharmacol Rev* 57:547–583.
- Klimtova I, Simunek T, Mazurova Y, Hrdina R, Gersl V, and Adamcova M (2002) Comparative study of chronic toxic effects of daunorubicin and doxorubicin in rabbits. *Hum Exp Toxicol* 21:649–657.
- Kovarikova P, Klimes J, Sterba M, Popelova O, Gersl V, and Ponka P (2006) HPLC determination of novel aroylhydrazone iron chelator (*o*-108) in rabbit plasma and its application to a pilot pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 838:107–112.
- Kovarikova P, Klimes J, Sterba M, Popelova O, Mokry M, Gersl V, and Ponka P (2005) Development of high-performance liquid chromatographic determination of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone in rabbit plasma and application of this method to an in vivo study. *J Sep Sci* 28:1300–1306.
- Kovarikova P, Mokry M, Klimes J, and Vavrova K (2004) Chromatographic methods for the separation of biocompatible iron chelators from their synthetic precursors and iron chelates. *J Sep Sci* 27:1503–1510.
- Kwok JC and Richardson DR (2003) Anthracyclines induce accumulation of iron in ferritin in myocardial and neoplastic cells: inhibition of the ferritin iron mobilization pathway. *Mol Pharmacol* 63:849–861.
- Kwok JC and Richardson DR (2004) Examination of the mechanism(s) involved in doxorubicin-mediated iron accumulation in ferritin: studies using metabolic inhibitors, protein synthesis inhibitors, and lysosomotropic agents. *Mol Pharmacol* 65:181–195.
- Le NT and Richardson DR (2004) Iron chelators with high antiproliferative activity up-regulate the expression of a growth inhibitory and metastasis suppressor gene: a link between iron metabolism and proliferation. *Blood* 104:2967–2975.
- Legha SS, Wang YM, Mackay B, Ewer M, Hortobagyi GN, Benjamin RS, and Ali MK (1982) Clinical and pharmacologic investigation of the effects of alpha-tocopherol on adriamycin cardiotoxicity. *Ann NY Acad Sci* 393:411–418.
- Link G, Ponka P, Konijn AM, Breuer V, Cabantchik ZI, and Hershko C (2003) Effects of combined chelation treatment with pyridoxal isonicotinoyl hydrazone analogs and deferoxamine in hypertransfused rats and in iron-loaded rat heart cells. *Blood* 101:4172–4179.
- Lipshultz SE, Colan SD, Gelber RD, Perez-Atayde AR, Sallan SE, and Sanders SP (1991) Late cardiac effects of doxorubicin therapy for acute lymphoblastic leukemia in childhood. *N Engl J Med* 324:808–815.
- Marian AJ (2005) On mice, rabbits, and human heart failure. *Circulation* 111:2276–2279.
- Marty M, Espie M, Llombart A, Monnier A, Rapoport BL, and Stahalova V (2006) Multicenter randomized phase III study of the cardioprotective effect of dexrazox-

- ane (Cardioxane(R)) in advanced/metastatic breast cancer patients treated with anthracycline-based chemotherapy. *Ann Oncol* 17:614-622.
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, and Gianni L (2004) Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 56:185-229.
- Myers C, Bonow R, Palmeri S, Jenkins J, Corden B, Locker G, Doroshow J, and Epstein S (1983) A randomized controlled trial assessing the prevention of doxorubicin cardiomyopathy by *N*-acetylcysteine. *Semin Oncol* 10:53-55.
- Oliveira PJ, Bjork JA, Santos MS, Leino RL, Froberg MK, Moreno AJ, and Wallace KB (2004) Carvedilol-mediated antioxidant protection against doxorubicin-induced cardiac mitochondrial toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 200:159-168.
- Ponka P, Borova J, Neuwirt J, and Fuchs O (1979) Mobilization of iron from reticulocytes. Identification of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone as a new iron chelating agent. *FEBS Lett* 97:317-321.
- Richardson DR, Tran EH, and Ponka P (1995) The potential of iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class as effective antiproliferative agents. *Blood* 86:4295-4306.
- Sterba M, Simunek T, Mazurova Y, Adamcova M, Popelova O, Kaplanova J, Ponka P, and Gersl V (2005) Safety and tolerability of repeated administration of pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone in rabbits. *Hum Exp Toxicol* 24:581-589.
- Simunek T, Boer C, Bouwman RA, Vlasblom R, Versteilen AM, Sterba M, Gersl V, Hrdina R, Ponka P, de Lange JJ, et al. (2005a) SIH-a novel lipophilic iron chelator-protects H9c2 cardiomyoblasts from oxidative stress-induced mitochondrial injury and cell death. *J Mol Cell Cardiol* 39:345-354.
- Simunek T, Klimtova I, Kaplanova J, Mazurova Y, Adamcova M, Sterba M, Hrdina R, and Gersl V (2004) Rabbit model for in vivo study of anthracycline-induced heart failure and for the evaluation of protective agents. *Eur J Heart Fail* 6:377-387.
- Simunek T, Klimtova I, Kaplanova J, Sterba M, Mazurova Y, Adamcova M, Hrdina R, Gersl V, and Ponka P (2005b) Study of daunorubicin cardiotoxicity prevention with pyridoxal isonicotinoyl hydrazone in rabbits. *Pharmacol Res* 51:223-231.
- Speyer JL, Green MD, Zeleniuch-Jacquette A, Wernz JC, Rey M, Sanger J, Kramer E, Ferrans V, Hochster H, and Meyers M (1992) ICRF-187 permits longer treatment with doxorubicin in women with breast cancer. *J Clin Oncol* 10:117-127.
- Swain SM and Vici P (2004) The current and future role of dexrazoxane as a cardioprotectant in anthracycline treatment: expert panel review. *J Cancer Res Clin Oncol* 130:1-7.
- Swain SM, Whaley FS, Gerber MC, Weisberg S, York M, Spicer D, Jones SE, Wadler S, Desai A, Vogel C, et al. (1997) Cardioprotection with dexrazoxane for doxorubicin-containing therapy in advanced breast cancer. *J Clin Oncol* 15:1318-1332.
- Von Hoff DD, Layard MW, Basa P, Davis HL Jr, Von Hoff AL, Rozenzweig M, and Muggia FM (1979) Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. *Ann Intern Med* 91:710-717.
- Wu X and Hasinoff BB (2005) The antitumor anthracyclines doxorubicin and daunorubicin do not inhibit cell growth through the formation of iron-mediated reactive oxygen species. *Anticancer Drugs* 16:93-99.
- Xu X, Persson HL, and Richardson DR (2005) Molecular pharmacology of the interaction of anthracyclines with iron. *Mol Pharmacol* 68:261-271.
- Yuan J, Lovejoy DB, and Richardson DR (2004) Novel di-2-pyridyl-derived iron chelators with marked and selective antitumor activity: in vitro and in vivo assessment. *Blood* 104:1450-1458.
- Yee GC (2005) Oncologic disorders, in *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach* (DiPiro JT, Talbert RL, Yee GC, Matzke GR, Wells BG, Posey MI eds) pp 2279-2558, The McGraw-Hill Companies, New York.

Address correspondence to: Dr. Martin Štěrba, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine in Hradec Králové, Charles University in Prague, Šimkova 870, Hradec Králové 1, 500 38, Czech Republic. E-mail address: sterbam@lfhk.cuni.cz

PŘÍLOHA 7

Štěrbá M, Popelová O, Šimůnek T, Mazurová Y, Potáčová A, Adamcová M, Gunčová I, Kaiserová H, Palička V, Poňka P, Geršl V: **Iron chelation-afforded cardioprotection against chronic anthracycline cardiotoxicity: a study of sylicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH).** *Toxicology*. 2007, in press.

Title:

Iron chelation-afforded cardioprotection against chronic anthracycline cardiotoxicity: a study of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH)

Running title:

SIH as a cardioprotectant against anthracycline cardiotoxicity

Martin Štěřba^{a,*}, Olga Popelová^a, Tomáš Šimůnek^b, Yvona Mazurová^c, Anna Potáčová^d, Michaela Adamcová^d, Ivana Gunčová^c, Helena Kaiserová^b, Vladimír Palička^e, Přemysl Poňka^f, Vladimír Geršl^a.

(a) Department of Pharmacology, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Šimkova 870, Hradec Kralove, 500 38, Czech Republic.

(b) Department of Biochemical Sciences, Faculty of Pharmacy, Charles University in Prague, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic.

(c) Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Šimkova 870, Hradec Kralove, 500 38, Czech Republic.

(d) Department of Physiology, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Šimkova 870, Hradec Kralove, 500 38, Czech Republic.

(e) Department of Clinical Biochemistry and Diagnostics, University Hospital, Sokolská 581, Hradec Králové, 500 05, Czech Republic.

(f) Lady Davis Institute for Medical Research, Departments of Physiology and Medicine, McGill University, 3755 Cote Ste-Catherine Road, Montreal, Quebec H3T 1E2, Canada

Keywords: Cardioprotection; Iron chelator; Cardiotoxicity; Anthracyclines; Salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone; SIH.

*Corresponding author:

Martin Štěřba

Department of Pharmacology

Faculty of Medicine in Hradec Králové

Charles University in Prague

Šimkova 870, Hradec Králové 1, 500 38.

Czech Republic.

Tel.: +420 495 816 312; Fax: +420 495 513 597.

E-mail address: sterbam@lfhk.cuni.cz

Abstract

Pyridoxal-derived aroylhydrazone iron chelators have been previously shown as effective cardioprotectants against chronic anthracycline cardiotoxicity. In this study we focused on a novel salicylaldehyde analogue (salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone – SIH), which has been recently demonstrated to possess marked and dose-dependent protective effects against oxidative injury of cardiomyocytes. Therefore, in the present study the cardioprotective potential of SIH against daunorubicin (DAU) cardiotoxicity was assessed *in vitro* (isolated rat ventricular cardiomyocytes; DAU 10 μ M, 48h exposure) as well as *in vivo* (chronic DAU-induced cardiomyopathy in rabbits; DAU 3 mg/kg, *i.v.* weekly, 10 weeks). *In vitro*, SIH (3 –100 μ M) was able to partially, but significantly decrease the LDH leakage from cardiomyocytes. *In vivo*, SIH co-administration was capable to reduce (SIH dose of 0.5 mg/kg *i.v.*) or even to completely prevent (1.0 mg/kg, *i.v.*) the DAU-induced mortality. Moreover, the latter dose of the chelator significantly improved the left ventricular function (LV $dP/dt_{max} = 1185 \pm 80$ vs. 783 ± 53 kPa/s in the DAU group; $P < 0.05$) and decreased the severity of the myocardial morphological changes as well as the plasma levels of cardiac troponin T. Unfortunately, further escalation of the SIH dose (to 2.5 mg/kg) resulted in a nearly complete reversal of the protective effects as judged by the overall mortality, functional, morphological as well as biochemical examinations. Hence, this study points out that aroylhydrazone iron chelators can induce a significant cardioprotection against anthracycline cardiotoxicity; however, they share the curious dose-response relationship which is unrelated to the chemical structure or the route of the administration of the chelator.

1. Introduction

Cardiotoxicity ranks among the most serious and hardly manageable toxic effects of anticancer chemotherapy. It is particularly dangerous due to the significant vulnerability of the cardiomyocytes to the oxidative damage, a very limited regenerative potential of the myocardial tissue, and the cardinal physiological importance of the heart. Besides some novel anticancer drugs, which have been only recently recognized as potentially cardiotoxic (e.g., imatinib, trastuzumab) (Ewer et al., 2005, Kerkela et al., 2006), anthracyclines (e.g., doxorubicin and daunorubicin) have remained for more than forty years the main threat regarding the cardiac safety of the patients undergoing cancer treatment (Minotti et al., 2004; Jones et al., 2006).

From the clinical point of view, it is the chronic type of anthracycline cardiotoxicity which represents the major problem. Its risk is known to be closely related to the cumulative dose of anthracyclines (von Hoff et al., 1979). The anthracycline-induced myocardial injury is typically characterized by a progressive myofibrillar loss and degeneration of the left ventricular (LV) cardiomyocytes ultimately resulting in dilated cardiomyopathy and congestive heart failure (Herman et al., 1997). In addition, the cardiac injury may manifest itself even after a considerable delay (4–20 years) and therefore it can compromise the cardiac function of survivors of childhood cancers even during their productive adulthood (Lipshultz et al., 1991).

Despite extensive scientific efforts, the molecular basis of anthracycline cardiotoxicity remains enigmatic, which significantly hampers the rational development of both less cardiotoxic anthracycline derivatives as well as effective pharmacological cardioprotectants. The only cardioprotective drug with well-evidenced efficacy in both experimental and clinical settings is dexrazoxane – ICRF-187 (Cvetkovic and Scott, 2005). Today it is generally believed that dexrazoxane acts as a pro-drug which is bioactivated to the metal chelating compound ADR-925. The latter agent has been shown to chelate free or loosely bound iron within the cardiac cells and/or displace iron from its complexes with anthracyclines and thus it prevents the formation of reactive oxygen species, particularly the extremely toxic hydroxyl radicals (Hasinoff et al., 1998, Kwok and Richardson, 2000). Unfortunately, the clinical effectiveness of dexrazoxane is partially counterbalanced by its myelotoxicity which may aggravate the myelosuppression induced by anthracyclines and by its higher costs (Cvetkovic and Scott, 2005).

Furthermore, there was a suspicion of decreased tumor response in dexrazoxane co-treated patients in one arm of a single clinical study (Swain et al., 1997), although other studies did not confirm this (Swain et al., 2004). All the arguments given above may be responsible for the recent estimation that in Europe cardioprotection with dexrazoxane is employed only in 6 – 7 % of anthracycline-treated patients (Swain et al., 2004).

Although iron chelation seems to be a plausible mechanism of cardioprotective intervention against anthracycline cardiotoxicity, the potential of this approach was not appropriately appraised yet. So far, only several iron chelating agents have been examined (Link et al., 1996; Saad et al., 2001; Barnabe et al., 2002; Hasinoff et al., 2003; Xu et al., 2006) and, importantly, only very few *in vivo* studies on the relevant chronic models have been performed (Herman et al., 1994; Herman 1997, Bruynzeel et al., 2006). Interestingly, the well-known iron chelator deferoxamine failed to protect against chronic anthracycline treatment, which was explained by the hydrophilicity of this compound preventing its sufficient distribution into the heart cells (Herman et al., 1994). On the other hand, we have recently shown that the lipophilic aroylhydrazone iron chelator pyridoxal 2-chlorbenzoylhydrazone (o-108) has a significant potential to decrease the toxicity of anthracyclines on the validated model of chronic daunorubicin cardiotoxicity in rabbits (Štěrba et al., 2006). However, surprisingly, the cardioprotection disappeared with a higher dose of o-108 which raised certain controversy concerning both the latter agent as well as other pyridoxal-derived aroylhydrazones, including the PIH – a “mother compound” of this class of iron chelators (Šimunek et al., 2005b).

In the present study, we have focused on a salicylaldehyde-derived chelator, salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH, Fig. 1), which has been recently shown to have very strong and concentration-dependent antioxidant properties on the *in vitro* model of hydrogen peroxide-induced oxidative stress in cardiac cells (Šimunek et al., 2005). The main aim of the present study is therefore to establish whether SIH is able to elicit significant cardioprotection against anthracycline cardiotoxicity both *in vitro*, using isolated rat ventricular cardiomyocytes, and *in vivo*, employing the rabbit model of chronic daunorubicin-induced cardiomyopathy (Gersl et al., 1994; Šimunek et al., 2004).

2. Materials and methods

2.1. Animals

Adult Chinchilla male rabbits (n=60) of an average initial weight of 3.52 ± 0.05 kg

were housed under a 12h light cycle, constant temperature and humidity. The animals had free access to water and a standard laboratory pellet diet. Before experimental procedures the animals were fasting overnight. All experiments were performed under ketamine anesthesia (50 mg/kg, i.m.). Final invasive hemodynamic measurements were carried out under pentobarbital anesthesia (30 mg/kg, i.v.). All experiments were performed in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH publication, 1996) and under the supervision of the Ethical Committee of the Faculty of Medicine in Hradec Králové.

2.2. Drugs and chemicals

Salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH) was synthesized in-house by a Schiff-base condensation of salicylaldehyde and isoniazid. In order to improve the solubility of the compound, the free base was converted into its hydrochloride salt according to the published protocol (Kovarikova et al., 2004) and this form of SIH was used in *in vivo* part of the present study, where solubility is an issue. The structure and purity of the compound was confirmed employing ^1H and ^{13}C NMR, IR spectroscopy and HPLC with UV detection (Kovarikova et al., 2004). Daunorubicin (DAU, Daunoblastina, Pharmacia, Italy), ketamine (Narketan inj., Gedeon Richter, Hungary), Aqua pro injectione (Biotika, Slovakia), saline (Natrium Chloratum, Biotika, Slovakia) and pentobarbital (Nembutal Sodium, Abbott, U.S.A.), polyethylenglycol 300 (PEG 300, Macrogolum 300, Jan Kulich, Czech Republic) and ethanol (Ethanolum, Jan Kulich, Czech Republic) of the pharmaceutical grade were used in the experiment. The SIH solution was always prepared fresh immediately before the drug administration using the mixture of pharmaceutically acceptable co-solvents PEG 300, ethanol and saline (4/1/2, v/v/v).

2.3. Experimental design

In the first part of the study, the cardioprotective potential of SIH against daunorubicin (DAU) toxicity was evaluated *in vitro* using spontaneously beating isolated rat neonatal ventricular cardiomyocytes (NVCM). Then, the cardioprotective properties of this agent were assessed *in vivo* at the whole animal level using the validated model of chronic DAU-induced cardiotoxicity in rabbits (Gersl et al., 1994, Simunek et al., 2004).

2.4. Cardioprotection studies *in vitro*

Primary cardiomyocyte cultures were prepared from 2-day-old neonatal Wistar rats.

All procedures were supervised and approved by the Ethical Committee of the Faculty of Pharmacy, Charles University in Prague. The animals were anaesthetized with CO₂, and decapitated. The chests were opened and the hearts were collected in an ice-cold ADS buffer. The ventricles were thoroughly minced and serially digested with a mixture of collagenase (0.25 mg.mL⁻¹; Gibco) and pancreatin (0.4 mg.mL⁻¹; Sigma) solution at 37°C. The cell suspension was placed on a large (15 cm) Petri dish and left for 2 hours at 37°C in order to separate the myocytes (floating in the medium) from fibroblasts (attached to the dish). The myocyte suspension was collected and viable cells counted using trypan blue exclusion. Cells were plated on gelatin-coated 12-well plates at a density of 800.000 cells per well in the DMEM/F12 (1:1) growth medium containing 10% horse serum, 5% FCS, 1% Pen/Strep and 4% sodium pyruvate. After 40 h the medium was renewed and the serum concentration was lowered to 5% (FCS). The medium was changed once more after another 24 h and the experiments were performed on day 4 after the isolation using both serum and a pyruvate-free medium.

NVCM were incubated for 48 hours with 10 μM of daunorubicin alone or together with 3 – 100 μM of SIH dissolved in DMSO (0.3% final concentration in all groups). During the incubations, cellular morphology and contractile activity were followed, using an inverted fluorescence microscope Nikon Eclipse TS100 equipped with a digital cooled camera (1300Q, VDS Vosskühler, Germany) and software NIS-Elements AR 2.20 (Laboratory Imaging, Czech Republic). Daunorubicin autofluorescence was visualized using epifluorescence analysis (λ_{ex} : 560 ± 20 nm, λ_{em} : 630 ± 30 nm).

LDH leakage assay

The medium was sampled after 24 and 48 hours. Activity of released lactate dehydrogenase (LDH, a standard marker of cytotoxicity and cellular breakdown) was assayed in Tris-HCl buffer (pH 8.9) containing 35 mM of lactic acid (Sigma Aldrich) and 5 mM of NAD⁺ (MP Biomedicals). The rate of NAD⁺ reduction was monitored spectrometrically at 340 nm (Helios β, Unicam). LDH activity was calculated using the molar absorption coefficient $\varepsilon = 6.22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

2.5. Cardioprotection studies *in vivo*

The chronic DAU cardiotoxicity was induced in rabbits using our well-established schedule involving once-weekly administration of daunorubicin (DAU, 3 mg/kg, *i.v.*, n=15), for the period of 10 weeks. The examined agent SIH was administered

intravenously over the period of 3 min using a pediatric BD Neoflon™ cannula (24GA, Becton Dickinson Infusion Therapy, Sweden) in three corresponding doses (0.5 mg/kg, 1 mg/kg, and 2.5 mg/kg) 10 minutes before every DAU administration to the three groups of animals (SIH 0.5 mg/kg+DAU, SIH 1 mg/kg+DAU, SIH 2.5 mg/kg+DAU, n=9 in each). The results were compared with the control group receiving saline (1 ml/kg, i.v., n=11), the SIH-only group (SIH 1.0 mg/kg, n=6), and vehicle group (the mixture of co-solvents prepared as described in Drugs and chemicals, i.v., n=5). After each intravenous administration the cannula and vein were carefully washed with a small volume of the saline in order to prevent local irritation of the vein or surrounding tissue.

Body weight was recorded weekly, while mortality, general appearance, and behavior were observed daily. Non-invasive echocardiographic measurements were performed at the beginning of the study and later in weeks 9 and 10 and finally at the end of the experiment (5 – 7 days after the last administration of drugs). Blood for cardiac troponin T (cTnT) determination was sampled before the 1st, 5th, 8th and 10th administration as well as at the end of the study. Standard biochemical and hematological parameters were determined from blood sampled before the 1st and 5th administrations and at the end of study. At the end of the experiment, invasive hemodynamic measurements were performed. Thereafter, the animals had been overdosed with pentobarbital and autopsy was performed, hearts were excised and prepared for histological examination.

2.5.1. Echocardiography

Non-invasive LV systolic function examinations were carried out using a GE Vingmed CFM 800A echocardiograph (Horten, Norway) equipped with a pediatric 7.5 MHz probe. The LV long axis view was obtained through the transthoracic left parasternal approach and a guided M-mode measurement at the tips of the mitral valve was performed. The left ventricular ejection fraction (LVEF) was calculated as described previously (Simunek et al., 2004) from the LV end-diastolic and end-systolic dimensions determined from at least four heart cycles in each measurement. Individual LVEF values were determined as means of at least three independent examinations.

2.5.2. Invasive hemodynamic measurements

In pentobarbital anesthesia, the left carotid artery was prepared and a PE catheter (length, 300 mm, inner diameter, 1.0 mm), filled-in with heparinized (10 IU/mL) saline was introduced into the left heart ventricle. After a 15 minute-equilibration period, the

maximum of the first derivative of LV pressure rise in the isovolumic phase of the systole (dP/dt_{max} , an index of LV contractility) was obtained together with heart rate (HR). For the arterial blood pressure (BP) measurement, a PE cannula was inserted into the right femoral artery. The ADI PowerLab/8SP (Adinstruments, Australia) with appropriate transducers and the software Chart for Windows 3.4.11 were used for pressure measurements, their differentiation and recording. The individual values of each parameter were determined as an average obtained from at least ten cardiac cycles.

2.5.3. Cardiac troponin T determination

Cardiac troponin T was determined in heparinized plasma using an Elecsys Troponin T STAT Immunoassay (Roche, Switzerland) and an Elecsys 2010 (Roche, Switzerland) immunoassay analyzer with the detection limit of 0.010 ng/mL. The values below this detection limit were considered to be zero.

2.5.4. Histological examination of the myocardium

Tissue blocks of the transversely sectioned left and right cardiac ventricles were fixed by immersion in 4% neutral formaldehyde for 3 days. Paraffin sections (6 μ m thick) were stained with hematoxylin-eosin (H&E) and Masson's blue trichrome. Photomicrographs were made with a Cybernetics software version 4.51 (Prague, Czech Republic) at the Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine in Hradec Králové.

2.5.5. Standard biochemical and hematological analyses

Routine biochemical parameters were determined in plasma/serum using an automatic analyser Modular (Japan). Hematological parameters were measured using an automatic analyser Coulter T890 (U.S.A.).

2.6. Statistical analysis

The statistical software SigmaStat for Windows 3.0 (SPSS, U.S.A.) was used in this study. Significances of the differences were estimated using the One Way ANOVA unpaired test (comparison between groups) or Paired t-test (comparison with the initial value within each group). All data are expressed as mean \pm S.E.M. $P \leq 0.05$ was used as the level of statistical significance.

3. Results

3.1. Cardioprotection studies *in vitro*

Daunorubicin-treated cultured cardiomyocytes initially increased beating rate, which was followed by irregular activity, disruption of the cellular monolayer and eventually contractile arrest. NVCM generally enlarged cellular volume and the nuclear structure became distinctive. Cytoplasmic vacuolization and granulation were observed. Eventually, formation of cell debris was conspicuous (Fig. 2). Epifluorescence microscopy revealed marked accumulation of daunorubicin into the cardiomyocytes: both diffuse and punctuate red fluorescence was observed. In cells co-incubated with SIH (3 – 100 μ M) the daunorubicin-induced morphological alterations were slightly less pronounced; however SIH had no apparent effect either on daunorubicin intracellular accumulation or distribution. As seen in Fig 3, daunorubicin exposure resulted in progressive and significant release of lactate dehydrogenase (LDH) to the culture medium – at 24 and 48 hours its activity was 3.2 and 5.9 fold higher, respectively, than in the control (untreated) cells. SIH partially but significantly reduced the daunorubicin-induced LDH release (Fig. 3). However, no apparent dose-dependency was observed, as the LDH activity reduction achieved with 3 μ M SIH (22%) was only marginally improved by raising the concentration to 30 or 100 μ M SIH (25% both).

3.2. Cardioprotection studies *in vivo*

3.2.1. Animal survival and overall toxicity

No premature deaths were observed in the control, vehicle and SIH-only groups. DAU treatment induced 33% mortality, whereas only 11 % animals (1 out of 9) died prematurely in the group co-treated with 0.5 mg/kg of SIH. Moreover, complete survival was reached with 1 mg/kg of SIH. However, in the group co-treated with the highest dose of the chelator (2.5 mg/kg), 33% mortality (3 out of 9) was witnessed. In all cases the timing of deaths was similar as in the DAU group (i.e., between the 9th and the last week). Before the deaths the animals reduced their food and water intake and exhibited signs of lethargy. No apparent specific signs of toxicity (e.g., bleeding or seizures) were observed. The body weight changes (beginning vs. end) are summarized in Table 1.

3.2.2. Echographically-determined LV function

The chronic DAU treatment induced a progressive decline in the LVEF (Fig. 4). A

less prominent decrease in this parameter was present in the group co-treated with 0.5 mg/kg of the SIH, although a considerable decrease in the LVEF was observed in one animal from this group that died prematurely. At the end of the study, the LVEF of the surviving animals declined to some degree and became significantly lower in comparison with the initial values, although the change did not become significant in comparison with both the control and vehicle groups. Importantly, no significant drop in the LVEF was observed in SIH 1 mg/kg+DAU group. Moreover, until the end of the experiment, in this group the LVEF was significantly higher in a comparison with the DAU group. Nevertheless, a significant decrease of the LVEF was observed again in the highest (2.5 mg/kg) dose of SIH in combination with DAU.

3.2.3. Invasive hemodynamic measurements

Repeated DAU administration induced LV contractility impairment, i.e., a significant reduction (by 42%) of the LV dp/dt_{max} index was observed (Fig. 5). In comparison with the DAU group, dp/dt_{max} was significantly improved in the SIH 1mg/kg+DAU group and no statistical difference from the control group was determined. In the surviving animals from the SIH 0.5 mg/kg+DAU group the decrease in the dp/dt_{max} was less profound and hence it was not significant. However, these results were not improved enough to reach the significance in comparison with the DAU group. Corresponding with previous results, in the SIH 2.5 mg/kg+DAU group the surviving animals had a comparable contractility to that of the rabbits treated with DAU only.

While no significant difference in blood pressure was determined in the vehicle, SIH and control groups, daunorubicin induced a significant decline in this parameter (Table 2). Although a significant decrease in this parameter was also determined in all groups co-treated with SIH, the decline was not so marked as in the animals treated with DAU only. A similar response was found comparing the heart rates determined at the end of the experiment during the invasive measurement (Table 2).

3.2.4. Cardiac troponin T plasma concentrations

Cardiac troponin T (cTnT) levels were in the DAU group markedly and progressively increasing in the second half of the study (Fig. 6). Up to the 10th week of the experiment, cTnT levels in all groups receiving the combination of SIH and DAU were apparently suppressed and in the case of the SIH 1mg/kg+DAU group these concentrations were not significantly different in comparison to the control group. At the

end of the study, all the three SIH co-treated groups tend to differ from animals receiving daunorubicin only; however, at the end of the experiment, the cTnT concentrations in all these groups were significantly, more or less higher in comparison with both the control and vehicle groups.

3.2.5. Post-mortem examinations and following histological evaluation of the myocardium

During autopsy no pleural effusions and ascites were found in the control, vehicle and SIH-only groups. A pleural effusion was present in 67% (10/15) of daunorubicin treated animals, whereas lower incidence was found in the SIH co-treated groups - 22% (2/9) in both, the SIH 0.5 mg/kg+DAU and SIH 1.0 mg/kg+DAU groups, and 44% (4/9) in the SIH 2.5 mg/kg+DAU group. The ascites was found in 27% of the DAU treated animals (4/15) and in 11 % of animals co-treated with both, 1.0 and 2.5 mg/kg of SIH. No effusion in the abdominal cavity was found in the SIH 0.5+DAU group.

Comparing with intact animals of the control group (Fig. 7g), only mild changes, based on a focal cellular damage, which early stages are reversible and only randomly result into the degeneration of cardiomyocytes (without a prominent concomitant mononuclear infiltrate), were present in the LV myocardium obtained from the vehicle group (Fig. 7a). The similar character and intensity of changes were also observed in the SIH-only group (Fig. 7b). In a sharp contrast, chronic DAU treatment induced typical histopathological picture of the intensive focal toxic damage of the myocardium, i.e. the whole spectrum of cellular changes up to the necrosis of cardiomyocytes followed by mononuclear infiltrate, were present (Fig. 7f). Moreover, besides these pathological changes, a significant interstitial fibrosis was present as a result of healing process in chronically injured myocardium. The comparable character and intensity of changes were also observed in the SIH 2.5+DAU group only the extent of fibrosis was a bit less prominent (Fig. 7e). However, the LV myocardium from the both combination groups receiving lower doses of the chelator appeared to be less affected by the DAU treatment (Figs. 7c, 7d). The most striking difference was in the extent of typical fibrotic scar tissue (i.e. dense collagen connective tissue). Although the number of necrotic cells was slightly lower, the mononuclear infiltrate and the amount of granulation tissue, both typical for the beginning of healing process, were more conspicuous. Hence, in these two groups delayed development of the myocardial damage was apparent.

3.2.6 Biochemical and hematological analyses

Importantly, the chelator itself did not induce any marked biochemical abnormality. As it can be seen in Table 3, most of the biochemical changes induced by repeated DAU administration were also present in the groups co-treated with either SIH dose. In some parameters (e.g. creatinine) the biochemical changes were less pronounced in the SIH 0.5 mg/kg+DAU group and contrary, they were rather more marked in the group co-treated with 2.5 mg/kg. DAU treatment also induced typical hematological changes (Table 4), i.e. decreased leukocyte and erythrocyte counts, decreased hemoglobin and hematocrit. Similar results were also obtained in the groups co-treated with the SIH. At the end of the experiment, the decrease in the leukocyte counts was somewhat more pronounced in the case of the SIH 1 mg/kg+DAU group and it became significant in comparison with the DAU group. This effect, however, was not dependent on the dose of the chelator as in the group co-treated with SIH 2.5 mg/kg the decline in this parameter was not significant in comparison with the DAU group. Most of studied hematological parameters tend to change less markedly in the SIH 0.5+DAU group than in the DAU group and both other groups receiving the combination of SIH and DAU.

4. Discussion

Despite the decades of intensive research and development, dexrazoxane, a prodrug of the iron-chelating compound ADR-925, has remained the only drug with clearly proven ability to significantly decrease the risk and severity of chronic anthracycline cardiotoxicity. Interestingly, although numerous antioxidants were reported as encouraging in the models of acute toxicity (Fujita et al., 1982; Yoda et al., 1986; Tesoriere et al., 1994), they were shown to have only weak, partial or no cardioprotective effect in chronic experimental setting (Van Vleet et al., 1980a,b; Breed et al., 1980; Herman et al., 1985; Berthiaume et al., 2005) as well as in controlled clinical studies (Legha et al., 1982; Dresdale et al., 1982; Myers et al., 1983). This suggests that from the viewpoint of chronic anthracycline cardiotoxicity, the prevention of ROS formation through the iron chelation is superior to ROS scavenging or boosting of the cellular antioxidative defence. Previously, we have shown that certain amelioration of chronic anthracycline cardiotoxicity can be reached using a prototype aroylhydrazone iron chelator PIH (Simunek et al., 2005). Even better results and clearly significant cardioprotection have been recently obtained with the novel PIH analogue pyridoxal 2-

chlorbenzoyl hydrazone (o-108) (Sterba et al., 2006). Although this compound was well tolerated alone even in high doses (Sterba et al., 2005), in combination with DAU extracardiac toxicity it appeared to result in a profound body weight loss and early premature mortality in the higher dose of the compound. Even more surprising and rather curious was the observation that there was lack of any cardioprotective effect of this compound in surviving animals receiving the higher dose of the chelator and the real cardioprotective potential of the iron chelation using aroylhydrazones remained opened.

In the present study we have focused on the novel salicylaldehyde-derived iron chelator SIH, which was recently shown to efficiently protect both H9C2 cardiomyoblasts and isolated cardiomyocytes against hydrogen peroxide-induced oxidative injury (Horackova et al., 2002; Simunek et al., 2005a). In the latter study it has been clearly demonstrated that this agent is able to prevent the ROS-induced necrotic as well as apoptotic cell death of cardiac cells and mitochondrial injury at very low concentrations - virtually full protection was achieved using 3 μM of SIH. Importantly, all the latter processes are supposed to play a major role in the anthracycline cardiotoxicity development (Green and Leeuwenburgh, 2002; Wallace, 2003; Oliviera and Wallace, 2006). Furthermore, it is very unlikely that SIH would blunt the anticancer effects of anthracyclines, as we have shown previously the opposite in the case of o-108 (Sterba et al., 2006), and SIH as well as other non-pyridoxal derived series of aroylhydrazones, are known to be much more potent antiproliferative agents than o-108 or PIH (Richardson et al., 1995; Yuan et al., 2004; Kalinowski et al., 2005).

In the first part of the present study we have investigated whether SIH, in pharmacologically relevant concentrations, is capable to protect isolated ventricular cardiomyocytes against DAU toxicity. We have shown that DAU treatment induced conspicuous changes in a cellular morphology, abolished spontaneous beating of cardiac cells and produced progressive LDH release which implies a loss of integrity of the sarcolemma and therefore decreased viability of cardiomyocytes. On the other hand, SIH pretreatment was capable to induce a significant degree of protection against DAU toxicity as it is can be seen from both improved cellular morphology and LDH release. However, in the concentration range selected on the basis of our recent pilot pharmacokinetic study in rabbits (Kovarikova et al., 2005); we were unable to describe any clear concentration dependency of this effects. Furthermore, while in the previous studies SIH pretreatment in the concentrations as low as 3 μM was capable to guarantee nearly complete protection against massive (100 μM) hydrogen peroxide-induced

oxidative injury, here the cardioprotective potential against the DAU-induced toxicity was apparently limited. Hence, from the *in vitro* part of this study it is evident that SIH can afford significant though only partial protection against DAU-induced toxicity which, however, tends to be neither improved nor impaired in the higher concentrations of the chelator.

In the *in vivo* part of the study we have administered SIH before every DAU injection with the aim to protect the heart against chronic anthracycline cardiotoxicity. Intravenous route of SIH administration was selected in order to overcome possible problems with delayed or varying drug absorption, which could potentially take place in our previous studies, where PIH as well as o-108 were administered intraperitoneally only partially dissolved in its vehicle (Simunek et al., 2005b; Šterba et al., 2006). This concern is well-founded, since dexrazoxane was shown to have a decreasing cardioprotective potential when it was administered with a significant delay after the anthracycline (Herman et al., 1993). Furthermore, the timing and dose-range for this study were selected with respect to the results of our preliminary experiments designed to assess the tolerability of SIH and DAU co-administration and with regard to a recent pilot pharmacokinetic study (Kovarikova et al., 2005) which revealed rapid distribution of SIH and a rather short half-life of the chelator. In order to clearly describe whether SIH can elicit cardioprotective effects in a dose-dependent manner, in the present study we have employed three different SIH doses.

Using our well-established (Gersl et al., 1994) and dexrazoxane-validated rabbit model of chronic daunorubicin cardiotoxicity (Simunek et al., 2004), we have shown that SIH administration has a potential to significantly abate anthracycline-induced mortality, LV function impairments, morphology changes as well as other parameters. Incomplete, however, significant improvements in the above mentioned parameters were obtained using the lowest studied dose of SIH (0.5 mg/kg). The occurrence of cardiac-related mortality was improved by nearly 20% and a decrease in cardiac function apparently less severe than in the DAU group was found. In surviving animals from this group (90%), the LVEF significantly dropped only at the end of the study, but the absolute decline was quite low and therefore these values were not significantly lower in comparison with the control group but at the same time they were not clearly significantly improved with regard to the DAU group. These outcomes were further supported and were in concert with the LV dp/dt_{max} index measured through the LV catheterization at the end of experiment. The histological examination of the LV myocardium in survivors of this

group has shown moderate prevalence of early stages of developing chronic myocardial damage and, on the other hand, the reduction of fibrotic scar tissue formation (i.e. the final stage of chronic cardiomyopathy) which can be explained by delayed onset of the DAU toxicity.

The dose escalation of the chelator to 1 mg/kg led to even better results. First, this SIH dose was able to completely overcome DAU-induced mortality. Furthermore, no significant changes in the LVEF were observed in this group during the whole study. Moreover, even more precise and sensitive examinations of the cardiac function performed through the LV catheterization further supported these findings. The dp/dt_{max} index was significantly improved with respect to the DAU group and no significant difference could be found in comparison with the control group. The rise of cTnT was apparently less pronounced, although significant at the end of the study. In accordance with these findings, a slower progression of the myocardial damage, confirmed by histological examination, was a bit more pronounced compared with previous group. All the results discussed above were even more encouraging in the light of the complete survival which means that all animals received a complete cumulative dose and each of them was evaluated from the all aspects designed by the protocol.

However, further escalation of the dose (to 2.5 mg/kg) did not improve quite optimistic outcomes described above. On the contrary, all the benefits as judged by the overall mortality, LV function and morphology were nearly completely lost. In contrast to our previous study with o-108 (Sterba et al., 2006), the mortality observed in the present group occurred in the same time intervals as in the DAU group and was associated with a progressive decline in the LV function, typical post-mortem examination findings, and histopathological picture. Thus, it is very likely that these deaths were due to the myocardial injury induced by anthracyclines. The present findings cannot be simply explained by the limited margins of safety of the studied chelator, as SIH administered alone in the same schedule had no negative functional and morphological effects on the heart or the cardiovascular system. Furthermore, no such changes were also described previously with o-108 (Sterba et al., 2005), which has been shown to have a similar curious dose-dependency of the cardioprotective effect on this model. While in the case of o-108, some concerns might have been present with respect to the elevated cTnT (albeit it was not accompanied with abnormalities in myocardial function or morphology) (Sterba et al., 2005), it is obvious from the present study that nothing like that can be applied to SIH. This is in line with the results of our previous study addressing the safety of SIH

(Klimtova et al., 2003), where it was shown that repeated administration of SIH in the dose of 50 mg/kg (*i.p.*, as such high doses of SIH can not be administered *i.v.* due to limited solubility) did not induced any deterioration of the myocardial function and morphology, and no significant elevation of the cTnT was determined.

Taking together our current data as well as those of the previous studies dealing with the cardioprotective effects of two other aroylhydrazones (Simunek et al., 2005b; Šterba et al., 2006), it seems that all these iron chelators derived either from salicylaldehyde or pyridoxal have a significant cardioprotective potential against anthracycline cardiotoxicity. Nevertheless, all the aroylhydrazone chelators studied so far have shown the same and rather bizarre dose-dependency irrespectively on the route of administration, vehicle and timing before the DAU administration. Thus, based on the summary of these results it can be seen as a kind of class effect whose basis, however, cannot be fully explained at this moment. On the other hand, all these chelators definitely share some properties, either pharmacokinetic or pharmacodynamic, and one or more of them are likely to be a key to this phenomenon.

For example, all these compounds have been recently shown to possess short biological half-lives (Kovarikova et al., 2005, 2006), which are much lower than the terminal half-life of elimination of anthracyclines (Cusack et al., 1995; Danesi et al., 2002). On the other hand, the clinically effective agent dexrazoxane, which does not share this surprising dose-dependency, has also a considerably shorter terminal half-life of elimination than anthracyclines (Hochster, 1998), and therefore this is not likely to be the main problem. On the other hand, dexrazoxane, in contrast to aroylhydrazones, is a prodrug which is mostly bioactivated at the site of its effect (*i.e.*, inside the cardiomyocytes) to produce the hydrophilic metal-chelating metabolite ADR-925. It can be speculated that in comparison with aroylhydrazones, the relatively high hydrophilicity of ADR-925 could be associated with a considerably longer stay of this active metabolite inside the cardiac cells and this can be the substantial benefit which may be also associated with the significant, consistent and dose-dependent effect of dexrazoxane.

Comparing the *in vitro* and *in vivo* results from the present study from the viewpoint of dose-dependency, in both models we failed to get a clear dose-dependent response. While *in vitro* there was only lack of further improvement of the observed effect, in the chronic *in vivo* model we have described a loss of the cardioprotective effect. Importantly, all these chelators were well-tolerated when they were repeatedly administered to experimental animals, which implies that under physiological conditions short-term iron

deprivation is not harmful for the cells and tissues including the cardiac one. On the other hand, the high doses of chelators could present certain stress for the heart repeatedly exposed to anthracyclines. Interestingly, it has been shown that anthracyclines and/or their metabolites induce significant and complex changes in iron homeostasis in the cardiac cells (Minotti et al., 1998; Kotamraju et al., 2002, Kwok and Richardson, 2003, 2004; Xu et al., 2005). Hence, it is possible that in high doses the strong chelators can contribute to the complex impairment of the iron homeostasis induced by anthracyclines and this could counterbalance the antioxidant protection obtained by the lower SIH doses. It can be speculated that higher doses of SIH are associated with a certain degree of iron mobilization from the cardiomyocytes while ADR-925 may rather temporarily shield the labile iron pool within the intracellular without iron mobilization. Furthermore, some previous experiments suggested that complexes of aroylhydrazones with iron formed within the cells are at least in part actively exported out of the cells (Buss et al., 2002). This energy-demanding process could predominate in the high peak plasma concentrations of the chelator and cause further burden for the cardiac cells withstanding the toxic anthracycline insult.

Though the protective effects of aroylhydrazones (SIH, PIH, o-108) were apparent and significant, they never reached the nearly complete degree of protection which was previously shown on the same model with dexrazoxane (Simunek et al., 2004). Aroylhydrazones and particularly SIH are known to be excellent and fast intracellular iron chelators (Zanninelli et al., 1997; Buss et al., 2002) with ability to significantly reduce oxidative damage in numerous models (Bhattacharya et al., 1997, Horackova et al., 2002, Simunek et al., 2005a; Kurz et al., 2006). Therefore, it is plausible that besides iron chelation, other effects of dexrazoxane and/or its active metabolite contribute to its impressive cardioprotective efficacy. It should be noted that, in contrast to aroylhydrazones, the chelating effects of ADR-925 as an EDTA-like compound are not selective for iron. Therefore, it cannot be excluded that ADR-925 may also have, for example, a certain impact on the myocardial calcium homeostasis which was repeatedly reported to be seriously compromised by the anthracycline treatment (Temma et al. 1997; Simunek et al., 2005c) and it can be also prevented by dexrazoxane (Simunek et al., 2005c). Several further mechanisms have been proposed as responsible for the development of anthracycline-induced intracellular calcium overload – either as direct effects of anthracyclines and/or their 13-OH metabolites on the Ca pump and ion channels (Halili-Rutman et al, 1997), or mediated via anthracycline-induced oxidative stress.

Hence, it seems, that although iron is involved in the development of anthracycline cardiotoxicity, it can play rather complex and delicate role and other molecular mechanisms can also participate on this pathology (Minotti et al., 1999). Indeed, more studies are needed to either support or deny these hypotheses.

In conclusion, we have shown that SIH as well as other arolyhydrazones are able to elicit significant cardioprotection against anthracycline-induced cardiotoxicity. However, despite the consistent and dose-dependent effects described on numerous models of oxidative injury, SIH failed to further improve the cardioprotective response with increasing doses – both *in vitro* and *in vivo*. Although the present study raised several hypothesis which can be responsible for this phenomenon, further studies on iron chelators as a cardioprotectants are needed to explain the present findings and further contribute to the current understanding of the mechanisms involved in the development of chronic anthracycline cardiotoxicity.

Acknowledgements

The authors wish to thank Mrs. Ludmila Latýnová for her skilful technical assistance during the whole study and Assoc. Prof. Bohuslav Mánek for his kind review of English. This study was supported by Research Projects of the Czech Ministry of Education Youth and Sports MSM0021620820 and MZO 00179906 and a grant from the Czech Science Foundation (GACR 305/05/P156).

References

- Barnabe N., Zastre J.A., Venkataram S., Hasinoff B.B., 2002. Deferiprone protects against doxorubicin-induced myocyte cytotoxicity. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 266-275.
- Berthiaume J.M., Oliveira P.J., Fariss M.W. and Wallace K.B., 2005. Dietary vitamin E decreases doxorubicin-induced oxidative stress without preventing mitochondrial dysfunction. *Cardiovasc. Toxicol.* 5, 257-267.
- Berthiaume J.M., Wallace K.B., 2007. Adriamycin-induced oxidative mitochondrial cardiotoxicity. *Cell. Biol. Toxicol.* 23, 15-25.
- 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 Radic. Bio. Med.* 22, 11-16.
- Breed J.G., Zimmerman A.N., Dormans J.A., Pinedo H.M., 1980. Failure of the antioxidant vitamin E to protect against adriamycin-induced cardiotoxicity in the rabbit. *Cancer Res.* 40:2033-2038.
- Bruynzeel A.M., Mul P.P., Berkhof J., Bast A., Niessen H.W. and van der Vijgh W.J., 2006. The influence of the time interval between monoHER and doxorubicin administration on the protection against doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 58, 699-702.
- Buss J.L., Hermes-Lima M., Ponka P., 2002. Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and its analogues. *Adv. Exp. Med. Biol.* 509, 205-229.
- Cvetkovic R.S. and Scott L.J., 2005. Dexrazoxane: a review of its use for cardioprotection during anthracycline chemotherapy. *Drugs* 65, 1005-1024.
- Cusack B.J., Young S.P., Olson R.D., 1995. Daunorubicin and daunorubicinol pharmacokinetics in plasma and tissues in the rat. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 35, 213-218.
- Danesi R., Fogli S., Gennari A., Conte P., Del Tacca M., 2002. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of the anthracycline anticancer drugs. *Clin. Pharmacokinet.* 41, 431-444.
- Dresdale A.R., Barr L.H., Bonow R.O., Mathisen D.J., Myers C.E., Schwartz D.E., d'Angelo T., 1982. Prospective randomized study of the role of N-acetyl cysteine in reversing doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Am. J. Clin. Oncol.* 5, 657-663.
- Ewer M.S., Vooletich M.T., Durand J.B., Woods M.L., Davis J.R., Valero V., Lenihan D.J., 2005. Reversibility of trastuzumab-related cardiotoxicity: new insights based on clinical course and

response to medical treatment. *J. Clin. Oncol.* 23, 7820-7826

Fujita K., Shinpo K., Yamada K., et al., 1982. Reduction of Adriamycin® toxicity by ascorbate in mice and guinea pigs. *Cancer. Res.* 42, 309–316.

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

Green P.S and Leeuwenburgh C., 2002. Mitochondrial dysfunction is an early indicator of doxorubicin-induced apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1588, 94-101.

Halili-Rutman I., Hershko C., Link G., Rutman A.J., Shainberg A., 1997. Inhibition of calcium accumulation by the sarcoplasmic reticulum: a putative mechanism for the cardiotoxicity of adriamycin. *Biochem. Pharmacol.* 54, 211–214.

Hasinoff B.B., Hellmann K., Herman E.H. and Ferrans V.J., 1998. Chemical, biological and clinical aspects of dexrazoxane and other bisdioxopiperazines. *Curr. Med. Chem.* 5, 1-28.

Hochster H.S., 1998. Clinical pharmacology of dexrazoxane. *Semin. Oncol.* 25, 37-42.

Herman E.H., Zhang J., Hasinoff B.B., Chadwick D.P., Clark J.R. Jr., Ferrans V.J., 1997. Comparison of the protective effects against chronic doxorubicin cardiotoxicity and the rates of iron (III) displacement reactions of ICRF-187 and other bisdiketopiperazines. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 40, 400-408.

Herman E.H., Ferrans V.J., 1993. Timing of treatment with ICRF-187 and its effect on chronic doxorubicin cardiotoxicity. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 32, 445-449.

Horackova M., Ponka P., Byczko Z., 2002. The antioxidant effects of a novel iron chelator salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone in the prevention of H₂O₂ injury in adult cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* 47, 529-536.

Jones R.L., Swanton C., Ewer M.S., 2006. Anthracycline cardiotoxicity. *Expert. Opin. Drug Saf.* 5, 791-809.

Kalinowski D.S. and Richardson D.R., 2005. The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. *Pharmacol. Rev.* 57, 547-583.

Kerkela R., Grazette L., Yacobi R., Iliescu C., Patten R., Beahm C., Walters B. Shevtsov S., Pesant S., Clubb F.J., Rosenzweig A., Salomon R.N., Van Etten R.A., Alroy J., Durand J.B., Force T., 2006. Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate. *Nat. Med.* 12, 908-916.

Klimtova I., Simunek T., Mazurova Y., Kaplanova J., Štěřba M., Hrdina R., Gersl V., Adamcova M., Ponka P., 2003. A study of potential toxic effects after repeated 10-week administration of a

new iron chelator--salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH) to rabbits. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 46, 163-170.

Kovarikova P., Mokry M., Klimes J. and Vavrova K., 2004. Chromatographic methods for the separation of biocompatible iron chelators from their synthetic precursors and iron chelates. *J. Sep. Sci.* 27, 1503-1510.

Kovarikova P., Klimes J., Sterba M., Popelova O., Gersl V. and Ponka P., 2006. HPLC determination of novel aroylhydrazone iron chelator (o-108) in rabbit plasma and its application to a pilot pharmacokinetic study. *J. Chrom. B.* 838, 107-112.

Kovarikova P., Klimes J., Sterba M., Popelova O., Mokry M., Gersl V. and Ponka P., 2005. Development of high-performance liquid chromatographic determination of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone in rabbit plasma and application of this method to an in vivo study. *J. Sep. Sci.* 28, 1300-1306.

Kotamraju S., Chitambar C.R., Kalivendi S.V., Joseph J., Kalyanaraman B., 2002. Transferrin receptor-dependent iron uptake is responsible for doxorubicin-mediated apoptosis in endothelial cells: role of oxidant-induced iron signaling in apoptosis. *J. Biol. Chem.* 277, 17179-17187.

Kurz T., Gustafsson B., Brunk U.T., 2006. Intralysosomal iron chelation protects against oxidative stress-induced cellular damage. *FEBS J.* 273, 3106-3117.

Kwok J.C. and Richardson D.R., 2000. The cardioprotective effect of the iron chelator dexrazoxane (ICRF-187) on anthracycline-mediated cardiotoxicity. *Redox. Rep.* 5, 317-324.

Kwok J.C. and Richardson D.R., 2003. Anthracyclines induce accumulation of iron in ferritin in myocardial and neoplastic cells: inhibition of the ferritin iron mobilization pathway. *Mol. Pharmacol.* 63, 849-861.

Kwok J.C. and Richardson D.R., 2004. Examination of the mechanism(s) involved in doxorubicin-mediated iron accumulation in ferritin: studies using metabolic inhibitors, protein synthesis inhibitors, and lysosomotropic agents. *Mol. Pharmacol.* 65, 181-195.

Link G., Tirosh R., Pinson A., Hershko C., 1996. Role of iron in the potentiation of anthracycline cardiotoxicity: identification of heart cell mitochondria as a major site of iron-anthracycline interaction. *J. Lab. Clin. Med.* 127, 272-278.

Lipshultz S.E., Colan S.D., Gelber R.D., Perez-Atayde A.R., Sallan S.E. and Sanders S.P., 1991. Late cardiac effects of doxorubicin therapy for acute lymphoblastic leukemia in childhood. *N. Engl. J. Med.* 324, 808-815.

Minotti G., Cairo G., Monti E., 1999. Role of iron in anthracycline cardiotoxicity: new tunes for an old song? *FASEB J.* 13, 199-212.

Minotti G., Recalcati S., Mordente A., Liberi G., Calafiore A.M., Mancuso C., Preziosi P., Cairo G., 1998. The secondary alcohol metabolite of doxorubicin irreversibly inactivates aconitase/iron regulatory protein-1 cytosolic fractions from human myocardium. *FASEB J.* 12, 541-552.

Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., Gianni L., 2004. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.* 56, 185-229.

Oliveira P.J. and Wallace K.B., 2006. Depletion of adenine nucleotide translocator protein in heart mitochondria from doxorubicin-treated rats - relevance for mitochondrial dysfunction. *Toxicology.* 220, 160-168.

Richardson D.R., Tran E.H., Ponka P., 1995. The potential of iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class as effective antiproliferative agents. *Blood* 86, 4295-4306.

Simunek T., Boer C., Bouwman R.A., Vlasblom R., Versteilen AM., Sterba M., Gersl V., Hrdina R., Ponka P., de Lange J.J., Paulus W.J. and Musters R.J., 2005. SIH-a novel lipophilic iron chelator-protects H9c2 cardiomyoblasts from oxidative stress-induced mitochondrial injury and cell death. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 39, 345-354.

Simunek T., Klimtova I., Kaplanova J., Sterba M., Mazurova Y., Adamcova M., Hrdina R., Gersl V. and Ponka P., 2005. Study of daunorubicin cardiotoxicity prevention with pyridoxal isonicotinoyl hydrazone in rabbits. *Pharmacol. Res.* 51, 223-231.

Simunek T., Sterba M., Holeckova M., Kaplanova J., Klimtova I., Adamcova M., Gersl V., Hrdina R., 2005. Myocardial content of selected elements in experimental anthracycline-induced cardiomyopathy in rabbits. *Biometals.* 18, 163-169.

Simunek T., Klimtova I., Kaplanova J., Mazurova Y., Adamcova M., Sterba M., Hrdina R., Gersl V., 2004. Rabbit model for in vivo study of anthracycline-induced heart failure and for the evaluation of protective agents. *Eur. J. Heart Fail.* 6, 377-387.

Sterba M., Simunek T., Mazurova Y., Adamcova M., Popelova O., Kaplanova J., Ponka P., Gersl V., 2005. Safety and tolerability of repeated administration of pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone in rabbits. *Hum. Exp. Toxicol.* 24, 581-589.

Sterba M., Popelova O., Simunek T., Mazurova Y., Potacova A., Adamcova M., Kaiserova H., Ponka P., Gersl V., 2006. Cardioprotective effects of a novel iron chelator, pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone, in the rabbit model of daunorubicin-induced cardiotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319, 1336-1347.

Saad S.Y., Najjar T.A., Al-Rikabi A.C., 2001. The preventive role of deferoxamine against acute doxorubicin-induced cardiac, renal and hepatic toxicity in rats. *Pharmacol. Res.* 43, 211-218.

Swain S.M. and Vici P., 2004. The current and future role of dexrazoxane as a cardioprotectant in anthracycline treatment: expert panel review. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 130, 1-7.

Temma K., Chugun A., Akera T., Hara Y., Sasaki T., Kondo H., 1997. Ca²⁺ overloading causes the negative inotropic effect of doxorubicin in myocytes isolated from guinea-pig hearts. *Eur. J. Pharmacol.* 322, 235-242.

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, 430-436.

Yoda Y., Nakazawa M., Abe T., Kawakami Z., 1986. Prevention of doxorubicin myocardial toxicity in mice by reduced glutathione. *Cancer Res.* 46, 2551-2556.

Yuan J., Lovejoy D.B. and Richardson D.R., 2004. Novel di-2-pyridyl-derived iron chelators with marked and selective antitumor activity: in vitro and in vivo assessment. *Blood* 104, 1450-1458.

Zanninelli G., Glickstein H., Breuer W., Milgram P., Brissot P., Hider R.C., Konijn A.M., Libman J., Shanzer A., Cabantchik Z.I., 1997. Chelation and mobilization of cellular iron by different classes of chelators. *Mol. Pharmacol.* 51, 842-852.

Van Vleet J.F. and Ferrans V.J., 1980. Evaluation of vitamin E and selenium protection against chronic adriamycin toxicity in rabbits. *Cancer Treat. Rep.* 64, 315-317.

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, 13-42.

Von Hoff D.D., Layard M.W., Basa P., Davis H.L. Jr., Von Hoff A.L., Rozenzweig M. and Muggia F.M., 1979. Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. *Ann. Intern. Med.* 91, 710-717.

Wallace K.B., 2003. Doxorubicin-induced cardiac mitochondrionopathy. *Pharmacol. Toxicol.* 93, 105-115.

Xu L.J., Jin L., Pan H., Zhang A.Z., Wei G., Li P.P., Lu W.Y., 2006. Deferiprone protects the isolated atria from cardiotoxicity induced by doxorubicin. *Acta Pharmacol. Sin.* 27, 1333-1339.

Xu X., Persson H.L., Richardson D.R., 2005. Molecular Pharmacology of the Interaction of Anthracyclines with Iron. *Mol. Pharmacol.* 68, 261-271.

Legends to tables:

Table 1. Body weight changes in the study. Statistical significance ($P < 0.05$): Paired t-test): (*) paired comparison with the initial values within each group. ANOVA: comparison with: (c) control group, (v) vehicle group.

Table 2. Blood pressure and heart rate. Statistical significance ($P \leq 0.05$, ANOVA) in comparison with: (c) control group, (v) vehicle group, (s) SIH 1 mg/kg (alone), (2,5) SIH 2.5 mg/kg+DAU. BP - blood pressure, HR - heart rate, DAU - daunorubicin.

Table 3. Selected hematological parameters. Statistical significance ($P < 0.05$, paired t-test): (*) paired comparison with the initial values. Statistical significance ($P < 0.05$, ANOVA) in comparison with: (c) control group, (v) vehicle group, (s) SIH 1 mg/kg (alone), (d) daunorubicin group, (½) SIH 0.5 mg/kg+DAU. DAU - daunorubicin.

Table 4. Selected biochemical parameters. Statistical significance ($P < 0.05$, paired t-test): (*) paired comparison with the initial values. Statistical significance ($P < 0.05$, ANOVA) in comparison with: (c) control group, (v) vehicle group, (s) SIH 1 mg/kg (alone), (d) daunorubicin group, (½) SIH 0.5 mg/kg+DAU, (2.5) SIH 2.5 mg/kg+DAU. DAU - daunorubicin, TAG - triacylglycerides.

Legends to figures

Fig. 1. Chemical structure of aroylhydrazone iron chelators - salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH) and pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone (o-108)

Fig. 2. Overlay of phase contrast and epifluorescence images of neonatal ventricular cardiomyocytes incubated for 48 hours with 10 μM of daunorubicin – alone or in a combination with 30 μM SIH. Bar: 20 μm

Fig. 3: Time-dependent effects of SIH (3 – 100 μM) on daunorubicin toxicity to rat neonatal ventricular cardiomyocytes *in vitro*. Lactate dehydrogenase (LDH) activity released from the cells into extracellular media. Statistical significance (ANOVA; $P < 0.05$) c: comparison with control group; d – comparison with DAU group; $n=6$ experiments for each group.

Fig. 4. Echographically determined left ventricular ejection fraction (LVEF, %). DAU – daunorubicin and SIH - salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone. Statistical significance in comparison with: “*”— the initial values (paired t-test, $p<0.05$), “v” – vehicle, “c” – control, “s” – SIH only, “1/2” – SIH 0.5 mg/kg+DAU and “1” – SIH 1 mg/kg+DAU groups

Fig. 5. Index of the left ventricular contractility (dP/dt_{max}). The index of the left ventricular contractility was determined at the end of the experiment through the left ventricular catheterization. DAU – daunorubicin and SIH - salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone. Statistical significance (ANOVA, $p<0.05$) in comparison with: “v” – vehicle, “c” – control and “s” – SIH only groups.

Fig. 6. Plasma concentrations of the cardiac troponin T. DAU – daunorubicin and SIH - salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone. Statistical significance (ANOVA, $p<0.05$) in comparison with: “v” – vehicle, “c” – control and “s” – SIH only groups.

Fig. 7. Ventricular myocardium.

The myocardium influenced by repeated administration of either the vehicle (a) or the

SIH (b) showed the comparable extent of rather mild changes: only scattered larger or smaller groups of cardiomyocytes with signs of developing cellular damage (woven myocytes – arrow, intensely eosinophilic, stripped cytoplasm because of subsequent fragmentation of myofibrils) and with only few degenerated cells were surrounded by the fields of largely undamaged, less eosinophilic (E) myocytes.

In DAU-treated groups (c-f) the effect of SIH co-treatment in different doses is demonstrated (c-e). The partial cardioprotective effect was found in animals pretreated with 0.5 mg/kg and 1.0 mg/kg of the SIH (the latter with slightly better results); although the characteristic features of chronic focal toxic damage – the cardiomyopathy - were developed: larger groups of degenerated and necrotic (N) cardiomyocytes accompanied with leuko-macrophagic infiltrate (I) and followed by the formation of granulation tissue (G) up to the fibrotic scar formation (arrows) - both, the degenerative process and fibrosis were diminished here.

On the other hand, using 2.5 mg/kg of the SIH, similar focal disintegration of the myocardium like after the DAU only was present: numerous necrotic myocytes were accompanied with conspicuous inflammatory infiltrate (I) and granulation tissue (G), which subsequently became mature fibrotic tissue (arrows); dark-stained myocytes were those with intensely eosinophilic cytoplasm (increased eosinophilia represents the first, still reversible change in cardiomyocytes in response to harmful agent). The basic difference in the group treated with DAU only was increased volume of the fibrotic scar tissue (arrows) and less pronounced mononuclear infiltrate (I), although, the number of necrotic cells (N) was high. The administration of saline in control animals (g) did not induce any notable changes in the myocardium. Masson's blue trichrome. Bar 50 μm .

Table 1. Body weight changes in the study.

Group	initial body weight (kg)	Final body weight (kg)
Control	3.45 ± 0.11	4.18 ± 0.12*
Vehicle	3.42 ± 0.11	4.31 ± 0.31*
SIH 1 mg/kg	3.49 ± 0.04	4.14 ± 0.13*
DAU	3.34 ± 0.11	3.66 ± 0.14* cv
0.5 mg/kg SIH+DAU	3.46 ± 0.04	4.02 ± 0.13*
1 mg/kg SIH+DAU	3.82 ± 0.14	3.83 ± 0.14 v
2.5 mg/kg SIH+DAU	3.68 ± 0.10	3.61 ± 0.09 cv

Table 2. Blood pressure and heart rate.

Group	BP (mmHg)	HR (min ⁻¹)
Control	105.1 ± 3.0	306.7 ± 6.3
Vehicle	110.9 ± 4.8	319.1 ± 5.6
SIH 1 mg/kg	103.0 ± 6.9	332.0 ± 7.5
DAU	79.0 ± 4.0 cvs2.5	270.4 ± 10.4 cvs
SIH 0.5 mg/kg+DAU	91.2 ± 2.8 cv	276.9 ± 8.4 vs
SIH 1 mg/kg+DAU	90.0 ± 2.9 cv	276.1 ± 6.3 cvs
SIH 2.5 mg/kg+DAU	90.8 ± 4.1 cv	260.5 ± 12.1 cvs

Table 3. Selected hematological parameters.

Parameter/group	Beginning of the study	Before the 5 th administration	End of the study
<u>Leukocytes (x 10⁹/L)</u>			
Control	7.12 ± 0.52	6.49 ± 0.66	5.05 ± 0.46 *
Vehicle	6.62 ± 0.51	8.57 ± 0.57	5.44 ± 0.53 *
SIH 1 mg/kg	6.64 ± 0.89	9.12 ± 0.92	5.77 ± 0.73
DAU	5.35 ± 0.34	4.39 ± 0.44 cvs	3.26 ± 0.48 *cvs
SIH 0.5 mg/kg+DAU	6.60 ± 0.59	5.10 ± 0.49	3.87 ± 0.82 *
SIH 1 mg/kg+DAU	6.75 ± 0.78	3.81 ± 0.26 *cvs	2.03 ± 0.26 *cvsd
SIH 2.5 mg/kg+DAU	5.51 ± 0.62	4.29 ± 0.41 s	2.74 ± 0.64 cvs
<u>Erythrocytes (x 10¹²/L)</u>			
Control	5.72 ± 0.18	5.99 ± 0.10	5.83 ± 0.12
Vehicle	6.40 ± 0.21	6.06 ± 0.29	5.95 ± 0.21
SIH 1 mg/kg	5.99 ± 0.27	5.87 ± 0.12	5.68 ± 0.11
DAU	6.13 ± 0.19	4.49 ± 0.13 *cvs	4.00 ± 0.23 *cvs
SIH 0.5 mg/kg+DAU	6.26 ± 0.26	4.68 ± 0.22 *cvs	4.42 ± 0.21 *
SIH 1 mg/kg+DAU	6.06 ± 0.13	4.14 ± 0.19 *cvs	3.83 ± 0.16 *cvs
SIH 2.5 mg/kg+DAU	5.62 ± 0.24	4.25 ± 0.29 cvs	3.88 ± 0.56 cv
<u>Hemoglobin (g/L)</u>			
Control	125.3 ± 3.4	132.9 ± 1.8 *	130.4 ± 1.8
Vehicle	140.2 ± 3.3	135.0 ± 5.0	133.4 ± 3.6
SIH 1 mg/kg	135.5 ± 4.2	133.8 ± 1.9	129.5 ± 3.5
DAU	131.5 ± 2.8	100.9 ± 2.9 *cvs	83.7 ± 4.7 *cvs½
SIH 0.5 mg/kg+DAU	133.8 ± 3.8	99.8 ± 4.3 *cvs	96.7 ± 4.9 *cvs
SIH 1 mg/kg+DAU	136.6 ± 2.9	93.3 ± 3.9 *cvs	83.4 ± 2.8 *cvs½
SIH 2.5 mg/kg+DAU	131.0 ± 2.5	100.6 ± 6.2 *cvs	75.5 ± 6.8 *cvs½
<u>Hematocrit</u>			
Control	0.385 ± 0.012 vs½	0.417 ± 0.007 *	0.402 ± 0.007
Vehicle	0.436 ± 0.013	0.425 ± 0.017	0.421 ± 0.012
SIH 1 mg/kg	0.428 ± 0.010	0.424 ± 0.008	0.408 ± 0.010
DAU	0.393 ± 0.010	0.316 ± 0.008 *cvs	0.273 ± 0.016 *cvs½
SIH 0.5 mg/kg+DAU	0.427 ± 0.012	0.395 ± 0.065	0.323 ± 0.015 *cvs

SIH 1 mg/kg+DAU	0.416 ± 0.008	0.300 ± 0.012 * cvs	0.291 ± 0.009 * cvs
SIH 2.5 mg/kg+DAU	0.407 ± 0.007	0.331 ± 0.018 *	0.260 ± 0.018 * cvs ^{1/2}
<u>Thrombocytes (x 10⁹/L)</u>			
Control	468.9 ± 57.5	398.9 ± 27.8	444.5 ± 37.7
Vehicle	303.0 ± 26.8	311.5 ± 57.2	294.4 ± 27.0
SIH 1 mg/kg	251.7 ± 10.5c	274.2 ± 21.0	263.7 ± 19.1
DAU	393.5 ± 43.8	331.2 ± 44.4	305.5 ± 64.5
SIH 0.5 mg/kg+DAU	257.8 ± 32.6c	191.1 ± 30.1 cd	225.6 ± 31.7 c
SIH 1 mg/kg+DAU	247.2 ± 15.6c	220.3 ± 35.4 c	256.7 ± 34.8 c
SIH 2.5 mg/kg+DAU	215,6 ± 27.7cd	184.0 ± 23.1 cd	271.7 ± 82.7

Table 4. Selected biochemical parameters.

Parameter/group	Beginning of the study	Before the administration	5 th End of the study
Iron (µmol/L)			
Control	40.9 ± 3.4 d	34.9 ± 2.6 v	46.1 ± 1.8
Vehicle	38.4 ± 5.2	45.0 ± 2.1	43.2 ± 2.9
SIH 1 mg/kg	40.2 ± 3.6	38.3 ± 2.9	34.9 ± 5.9
DAU	29.8 ± 3.7	24.2 ± 2.2 cvs	15.4 ± 2.6 * cvs
SIH 0.5 mg/kg+DAU	33.2 ± 2.9	15.0 ± 2.0 * cvsd	22.5 ± 3.6 c
SIH 1 mg/kg+DAU	42.5 ± 2.9 d	17.6 ± 2.8 * cvs	26.0 ± 4.7 c
SIH 2.5 mg/kg+DAU	44.8 ± 2.1 d	18.6 ± 1.0 * cvs	19.9 ± 1.8 * c
Creatinine (µmol/L)			
Control	112.7 ± 4.5	112.6 ± 6.6	119.6 ± 8.1
Vehicle	100.6 ± 6.5	125.4 ± 13.0	128.8 ± 10.7
SIH 1 mg/kg	103.0 ± 7.7	113.7 ± 4.8	109.3 ± 6.3
DAU	99.4 ± 4.4	108.8 ± 4.9	163.8 ± 25.6 *
SIH 0.5 mg/kg+DAU	105.0 ± 5.8	128.0 ± 4.2	135.6 ± 5.9
SIH 1 mg/kg+DAU	113.6 ± 5.1	125.1 ± 4.6	138.1 ± 15.9
SIH 2.5 mg/kg+DAU	109.3 ± 3.9	116.8 ± 5.4	181.2 ± 13.5 * cv
Urea (mmol/L)			
Control	7.20 ± 0.49	6.89 ± 0.47	7.35 ± 0.41
Vehicle	6.76 ± 0.54	8.64 ± 0.63 d	6.62 ± 0.39
SIH 1 mg/kg	8.02 ± 0.51	7.55 ± 0.24	6.98 ± 0.49
DAU	6.46 ± 0.40	6.66 ± 0.40	8.57 ± 1.21
SIH 0.5 mg/kg+DAU	6.33 ± 0.56	7.39 ± 0.37	7.09 ± 0.35
SIH 1 mg/kg+DAU	7.03 ± 0.46	7.91 ± 0.26 d	7.46 ± 0.69
SIH 2.5 mg/kg+DAU	8.54 ± 0.42 d½	7.24 ± 0.28	8.92 ± 0.50
Protein (g/L)			
Control	60.8 ± 1.4	61.3 ± 1.6	62.7 ± 1.2
Vehicle	62.8 ± 2.3	67.4 ± 1.3	61.7 ± 1.1
SIH 1 mg/kg	61.7 ± 1.3	65.4 ± 0.7 *	59.3 ± 0.6 c
DAU	62.3 ± 0.9	62.7 ± 1.2	47.5 ± 1.5 * cvs
SIH 0.5 mg/kg+DAU	58.4 ± 1.3	62.2 ± 1.3	50.2 ± 2.6 cvs
SIH 1 mg/kg+DAU	60.5 ± 1.2	61.7 ± 1.0	52.4 ± 1.4 * cvs
SIH 2.5 mg/kg+DAU	64.3 ± 0.7	62.1 ± 0.9	47.6 ± 2.1 * cvs
Cholesterol (µmol/L)			
Control	1.81 ± 0.49	1.53 ± 0.31	0.97 ± 0.17 *
Vehicle	1.14 ± 0.14	1.33 ± 0.34	1.09 ± 0.25
SIH 1 mg/kg	1.51 ± 0.18	1.32 ± 0.17	1.02 ± 0.08 *
DAU	1.16 ± 0.16 ½	1.44 ± 0.26	2.50 ± 0.35 * c
SIH 0.5 mg/kg+DAU	2.12 ± 0.19	2.14 ± 0.30	3.19 ± 0.72 cvs
SIH 1 mg/kg+DAU	0.85 ± 0.09 ½	1.61 ± 0.20 *	2.44 ± 0.41 * c
SIH 2.5 mg/kg+DAU	0.87 ± 0.22 ½	1.69 ± 0.48 *	3.54 ± 0.70 cvs

TAG (mmol/L)

Control	0.95 ± 0.11	1.18 ± 0.14	0.93 ± 0.05
Vehicle	0.88 ± 0.18	0.76 ± 0.12	1.32 ± 0.30
SIH 1 mg/kg	1.14 ± 0.22	0.66 ± 0.05 c2.5	1.05 ± 0.13
DAU	0.84 ± 0.07	0.91 ± 0.07	2.11 ± 0.42 *c
SIH 0.5 mg/kg+DAU	0.79 ± 0.05	1.13 ± 0.16	2.90 ± 1.07
SIH 1 mg/kg+DAU	0.64 ± 0.06	0.82 ± 0.08	1.60 ± 0.24 *
SIH 2.5 mg/kg+DAU	1.01 ± 0.12	1.64 ± 0.48	4.12 ± 0.47 *cvs

ALT (μkat/L)

Control	1.19 ± 0.15	1.22 ± 0.18	1.00 ± 0.12
Vehicle	1.43 ± 0.17 sd	1.43 ± 0.19	1.03 ± 0.09
SIH 1 mg/kg	0.78 ± 0.29	1.41 ± 0.16	1.18 ± 0.15
DAU	1.10 ± 0.10 s	1.09 ± 0.12	0.88 ± 0.19
SIH 0.5 mg/kg+DAU	1.05 ± 0.17 s	1.35 ± 0.24	1.02 ± 0.16
SIH 1 mg/kg+DAU	1.10 ± 0.18 s	0.87 ± 0.04	0.72 ± 0.05
SIH 2.5 mg/kg+DAU	0.73 ± 0.12 s	0.70 ± 0.13 vs½	1.29 ± 0.59

AST (μkat/L)

Control	0.60 ± 0.11	0.75 ± 0.17	0.66 ± 0.06
Vehicle	1.32 ± 0.33	0.91 ± 0.11	0.96 ± 0.06
SIH 1 mg/kg	1.18 ± 0.36	0.87 ± 0.24	0.97 ± 0.28
DAU	0.66 ± 0.11	0.64 ± 0.06	0.85 ± 0.22
SIH 0.5 mg/kg+DAU	0.49 ± 0.09	0.93 ± 0.30	0.93 ± 0.45
SIH 1 mg/kg+DAU	0.56 ± 0.04	0.53 ± 0.05	0.42 ± 0.03 cvsd
SIH 2.5 mg/kg+DAU	0.51 ± 0.05	0.54 ± 0.06	2.38 ± 1.87

Fig. 1.

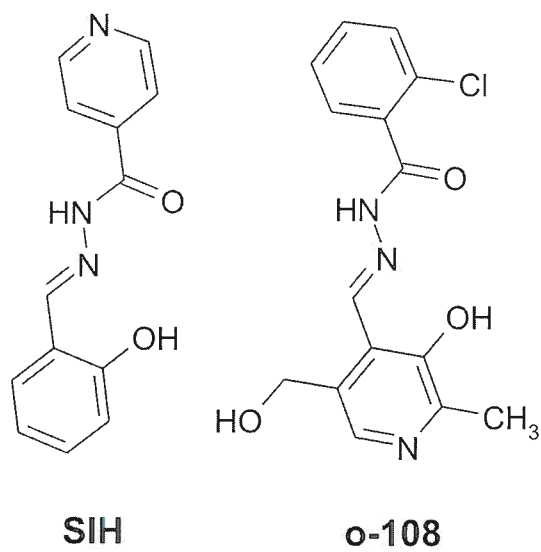


Fig. 2.

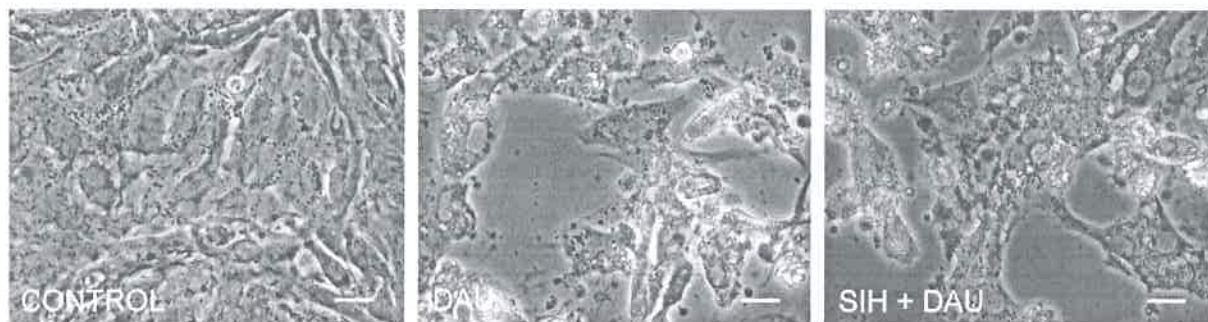


Fig. 3.

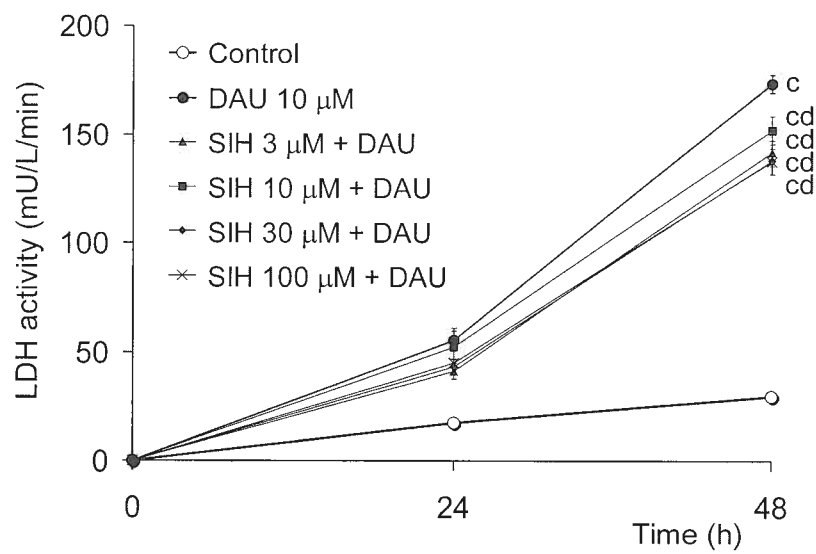


Fig. 4 .

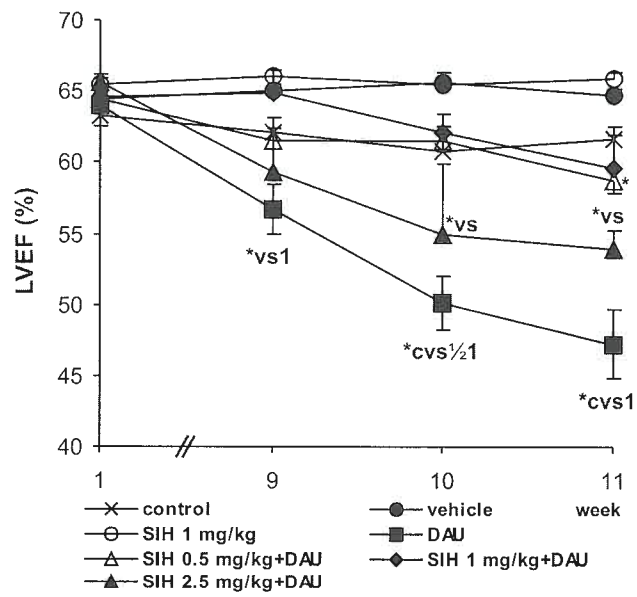


Fig. 5.

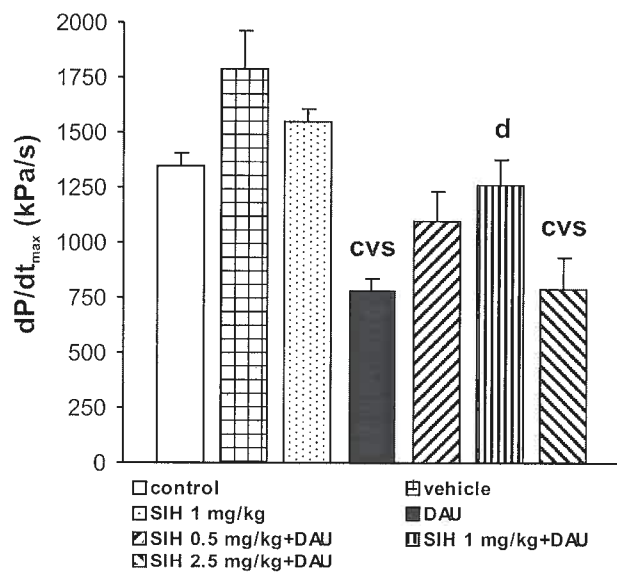


Fig. 6.

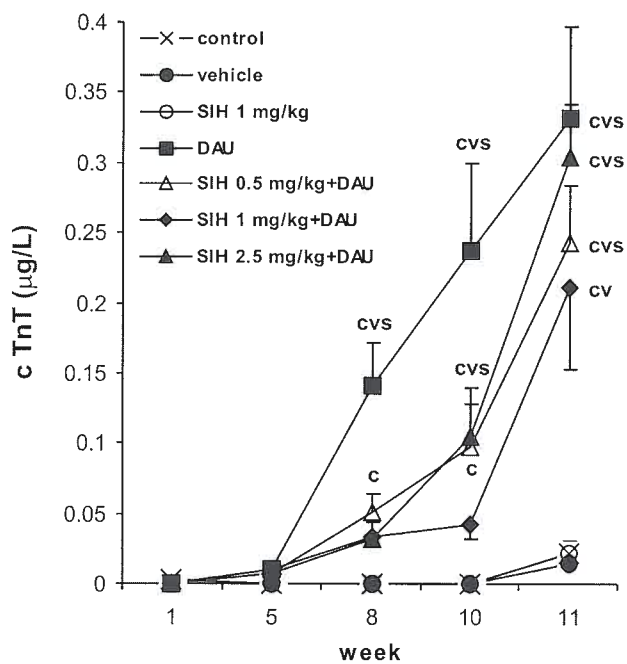


Fig. 7.

