

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát dizertační práce



**Vliv pozitivně inotropních a antiarytmických farmak na
kardiovaskulární systém**

**The impact of positive inotropic and antiarrhythmic drugs on
cardiovascular system**

MUDr. Radka Kočková

2014

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka na 1. lékařské fakultě UK v Praze

Přednosta oborové rady: Prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.

Školící pracoviště:

II. Interní klinika – Klinika kardiologie a angiologie Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a 1. Lékařské fakulty UK

Fyziologický ústav, Akademie věd ČR Praha

Školitelé:

Prof.MUDr.Aleš Linhart, DrSc. – II. Interní klinika – Klinika kardiologie a angiologie Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a 1. Lékařské fakulty UK

Prof.MUDr.David Sedmera, D.Cs – Fyziologický ústav, Akademie věd ČR Praha a Anatomický ústav 1.lékařské fakulty UK

ABSTRAKT

Embryotoxický vliv změny tepové frekvence vyvolaný podáním léků s antiarytmickým účinkem u kuřecích embryí

V současné době pozorujeme rychle narůstající trend potřeby kardiiovaskulární farmakologické léčby u těhotných žen, avšak chybí nám však dostatečná evidence o možném nežádoucím vlivu této léčby na vyvíjející se plod. Předpokládáme, že antiarytmickými léky navozená bradykardie je hlavním mechanismem rozvoje embryotoxicity. Na modelu kuřecího embrya jsme testovali embryotoxicitu metoprololu, carvedilolu a ivabradinu a dále akutní účinky těchto léků na embryo. Používali jsme k tomu videomikroskopii a ultrazvukového vyšetření. Signifikantní embryotoxicita byla dokumentována u carvedilolu a ivabradinu. U ED4 embryí způsobil metoprolol, carvedilol a ivabradin pokles tepové frekvence o 33%, 27% a 55% ve srovnání s kontrolní skupinou (6%). U ED8 embryí byl tento efekt vyjádřen více, došlo k poklesu o 71%, 54% a 53% ve srovnání s kontrolní skupinou (36%). Srdeční výdej poklesl ve všech testovaných skupinách, ale statistické významnosti dosáhl

pouze ve skupině ED8 s metoprololem. Ačkoliv počet beta-adrenergních receptorů v průběhu embryonálního vývoje klesá, negativní chronotropní odpověď na podaná farmaka s pokročilostí vývoje stoupá a vede k výraznějšímu poklesu srdečního výdeje, který je pravděpodobně hlavním mechanismem předčasného úmrtí embrya. Metoprolol je pro plod v běžných dávkách pravděpodobně bezpečný, zatímco carvedilol a ivabradin mají na plod potenciálně negativní vliv.

Adenylát-cyklázová (AC) signalizační kaskáda kuřecího embrya v průběhu vývoje: vliv podání antiarytmických léků

AC kaskáda hraje hlavní roli v regulaci srdeční kontraktility. Na modelu kuřecího embrya jsme analyzovali množství jejích komponent, adenylát-cykláza 5 (AC 5), G α a G $\beta\gamma$ protein, v různých stádiích embryonálního vývoje u kontrolní skupiny a po podání metoprololu a carvedilolu v ED4, ED8 nebo ED4+ED8. Aplikace farmak ve stádiu ED8 vedla k signifikantní down-regulaci AC 5 (o 40%) a také k poklesu G α proteinu a k poklesu aktivity AC stimulované forskolinem. Zajímavé je, že aplikace farmak mladším embryím ve stádiu ED4 neměla tak výrazný efekt na expresi AC a její aktivitu a vedla jen k signifikantnímu nárůstu exprese G $\beta\gamma$ proteinu. Výsledky naší práce ukazují na silný vliv metoprololu a carvedilolu na AC systém u kuřecích embryí.

Pětiletá retrospektivní analýza souboru pacientů dvou center s toxickou sérovou koncentrací digoxinu

Digoxin patří k nejstarším lékům užívaným v kardiologii především pro léčbu pokročilého srdečního selhání. Cílem práce bylo popsat charakteristiku pacientů s toxickou sérovou koncentrací digoxinu a zaměřit se na možné lékové interakce v souvislosti s mortalitou. V databázi dvou fakultních nemocnic jsme v letech 2001 až 2005 identifikovali 222 (0,2% ze všech hospitalizovaných) pacientů s toxickou sérovou hladinou digoxinu $\geq 3,0$ nmol/l. Průměrný věk byl 78 let, 41% bylo mužů, 14% mělo kreatinin clearance ≥ 60 ml/min a 64% užívalo současně alespoň jeden lék se známou interakcí s digoxinem. Nemocniční mortalita byla 8%. Statisticky signifikantními prediktory mortality byly nízké hodnoty kreatinin clearance ($P=0,01$) a nitrozilní aplikace digoxinu ($P=0,02$). Hraniční statistická významnost byla zjištěna pro sníženou ejekční frakci levé komory ($P=0,05$) a pro malou tělesnou hmotnost ($P=0,08$). Současná léčba ACEI/ARB měla protektivní účinek ($P=0,01$). Toxická sérová koncentrace digoxinu je v současné době relativně vzácná, ale je spojena s vysokým rizikem mortality.

Typicky se vyskytuje u jedinců pokročilého věku, s malou tělesnou hmotností, s renální insuficiencí a polypragmazií. Současná léčba ACE/ARB a BB má pravděpodobně ochranných efekt.

ABSTRACT

Heart rate changes mediate the embryotoxic effect of antiarrhythmic drugs in the chick embryo

A significant increase in cardiovascular medication use during pregnancy has occurred in recent years but only limited evidence on its safety profile is available. We hypothesized that drug-induced bradycardia is the leading mechanism of developmental toxicity. We tested metoprolol, carvedilol, or ivabradine for embryotoxicity and their acute effect on chick embryonic model. We used video microscopy and ultrasound biomicroscopy. Significant dose-dependent mortality was achieved in embryos injected with carvedilol and ivabradine. In ED4 embryos, metoprolol, carvedilol and ivabradine reduced the heart rate by 33%, 27%, and 55%, respectively, compared to controls (6%). In ED8 embryos this effect was more pronounced with a heart rate reduction by 71%, 54%, 53%, respectively (controls 36%). Cardiac output decreased in all tested groups but only proved significant in the metoprolol group in ED8 embryos. The number of β -adrenergic receptors showed a downward tendency during embryonic development but a negative chronotropic effect of tested drugs was increasingly pronounced with embryonic maturity. This effect was associated with reduced cardiac output in chick embryos, probably leading to premature death. Metoprolol in usual doses appears to be relatively safe in pregnancy whereas carvedilol and ivabradine have a potentially adverse effect on the foetus.

Adenylyl cyclase (AC) signalling in the developing chick heart: The deranging effect of antiarrhythmic drugs

We analysed the number of key components of myocardial AC in the developing chick embryo and assessed the impact of metoprolol and carvedilol on this system. Application of these drugs at embryonic day (ED) 8 significantly downregulated (40 %) expression of adenylyl cyclase 5 level, the amount of G_{α} protein and the activity of adenylyl cyclase stimulated by forskolin. Interestingly, when administered at ED4, these drugs did not produce such as profound changes except for markedly increased expression of $G_{i\alpha}$ protein. These data indicate that β -blocking agents can strongly

derange adenylyl cyclase signalling during the early chick embryonic heart development.

Five years two center retrospective analysis of patients with toxic digoxin serum concentration

Digoxin is an old cardiovascular drug used for treatment of advanced chronic heart failure. We aimed to determine main characteristics of patients with toxic digoxin serum concentration with respect to drug interactions and mortality. Databases of two teaching hospitals were retrospectively reviewed from 2001 till 2005 and 222 (0.2% of all admissions) patients with serum digoxin level ≥ 3.0 nmol/ml were identified. The average age was 78 years, 41% males, 14% had creatinine clearance ≥ 60 ml/min, and 64% of patients were prescribed at least one medication with known digoxin interaction. Hospital mortality was 8%. Statistically significant predictors of mortality were low creatinine clearance ($p=0.01$) and intravenous administration of digoxin ($p=0.02$). Borderline association was between mortality and low ejection fraction of the left ventricle ($p=0.05$) and with low body weight ($p=0.08$). Concomitant use of ACEI/ARB was protective ($p=0.01$). Toxic serum digoxin concentration is uncommon finding in modern medicine with relatively high mortality. Typical patient is an elderly with low body weight, renal insufficiency and polypragmasia. Concomitant therapy with ACEI/ARBs and beta-blocker appears to have a protective effect.

OSNOVA:

ABSTRAKT	2
OSNOVA:.....	5
1. ÚVOD	6
2. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE.....	7
3. MATERIÁL A METODIKA.....	8
3.1 Inkubace embrya a aplikace léků	8
3.2 Testování embryotoxicity	9
3.3 Ex ovo videomikroskopie a vyšetření ultrazvukem.....	9
3.4 Dávky antiarytmických léků	10
3.5 Analýza beta-adrenergických receptorů	10

3.6 Hodnocení aktivity adenylát-cyklázy	11
3.7 Elektroforéza a Western blot analýza – exprese adenylát-cyklázy a G proteinu	11
3.8 Analýza souboru pacientů s digoxinovou toxicitou.....	11
4. VÝSLEDKY	12
4.1 Embryotoxicita metoprololu, carvedilolu a ivabradinu	12
4.2 Funkční efekt farmak v časném embryonálním stádiu ED 4.....	13
4.3 Funkční efekt v embryonálním stádiu ED8	14
4.4 Beta-adrenergní receptory v průběhu vývoje.....	15
4.5 Aktivita adenylát-cyklázy	16
4.6 Exprese adenylát-cyklázy a G proteinu v průběhu vývoje	17
4.7 Výsledky pětileté retrospektivní analýzy souboru pacientů dvou center s toxickou sérovou koncentrací digoxinu.....	18
5. DISKUZE	19
5.1 Embryotoxický vliv změny tepové frekvence vyvolaný podáním léků s antiarytmickým účinkem u kuřecích embryí.....	19
5.2 Adenylát-cyklázová signalizační kaskáda kuřecího embrya v průběhu vývoje: vliv podání antiarytmických léků	22
5.3 Pětiletá retrospektivní analýza souboru pacientů dvou center s toxickou sérovou koncentrací digoxinu	23
6. ZÁVĚRY	24
7. POUŽITÁ LITERATURA	25
SEZNAM PUBLIKACÍ DOKTORANDA	29

1. ÚVOD

Srdeční arytmie se objevují v průběhu celého života člověka. Je doloženo, že s přibývajícím věkem jejich výskyt roste. Arytmie se však mohou vyskytovat již v průběhu prenatálního vývoje jedince, a ačkoliv je jejich prevalence v tomto období nízká, představují velice závažný problém, který může vést až k úmrtí jedince. Jsou však i další důvody, které nás nutí zkoumat vliv antiarytmických léků na jedince v časně fázi jeho vývoje. Přibývá totiž těhotných žen, které musí užívat farmakologickou léčbu také v průběhu

těhotenství. Díky pokroku v oblasti dětské chirurgie srdce u komplexních vrozených vad se nejen snížila mortalita těchto dětských pacientů, ale kvalita jejich života se zlepšila natolik, že v dospělosti umožňuje koncepci u žen, u kterých by to dříve bylo nemyslitelné. Avšak i po zcela úspěšných kardiochirurgických výkonech zůstávají v srdečních oddělech jizvení, která jsou potenciálním zdrojem arytmogeneze (1) a takové ženy jsou častěji nuceny užívat léky i v průběhu těhotenství. Dalším problematickým jevem je stále narůstající průměrný věk těhotných žen, u kterých musíme čelit výskytu chronických onemocnění, vyžadujících často farmakologickou léčbu, která zahrnuje samozřejmě také léky s antiarytmickým efektem. Přestože je těhotenství zcela fyziologický stav, dochází v jeho průběhu ke snížení prahu pro rozvoj arytmii vlivem hormonálních, metabolických a hemodynamických změn (2).

V současné době bohužel stále chybí dostatek vědecky podložených informací o vlivu lékové terapie na vývoj plodu a v klinické praxi tak často nezbyvá než vycházet především z empirických zkušeností. Příkladem může být fibrilace síní v průběhu těhotenství, u které není žádný jednoznačně doporučený postup, který by vedl k úpravě srdečního rytmu matky a přitom jednoznačně neohrozil vývoj plodu.

Digoxin je nejstarším lékem užívaným v interní medicíně a v kardiologii více než 200 let především pro léčbu srdečního selhání. Je unikátní svým současným antiarytmickým a pozitivně inotropním účinkem. K jeho hlavním nevýhodám patří úzké terapeutické rozmezí a možnost potenciálního rozvoje digoxinové toxicity, která představuje závažný klinický stav provázený vysokou mortalitou. Prozatím jsou známy jen některé faktory, které se na rozvoji digoxinové toxicity mohou podílet. Důležité je proto zjistit prevalenci digoxinové toxicity v dospělé populaci v době moderní kardiologické léčby a snažit se také určit prozatím neidentifikované faktory, které se na jejím rozvoji podílejí.

2. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

Cíl 1 - Důkladné prozkoumání adrenergní signalizační kaskády srdce na modelu kuřecího embrya s využitím různě selektivních blokátorů beta-adrenergních receptorů a ivabradinu, které představují běžně užívané léky v klinické kardiologii. Pro tato farmaka je společný jejich negativně chronotropní účinek na myokard, který vede následně k rozvoji výrazné

bradykardie. Protože srdeční frekvence je v době embryonálního a fetálního vývoje hlavním faktorem ovlivňujícím srdeční výdej (3), předpokládali jsme, že těmito třemi léky navozená bradykardie povede k sníženému srdečnímu výdeji vzhledem k limitovanému mechanismu kompenzace podle Frank-Starlinga. Tento mechanismus je v časných stádiích embryonálního vývoje výrazně limitován převažující trabekulizací myokardu a přítomností pouze tenké vrstvy kompaktního myokardu. (4) Předpokládali jsme, že je to právě bradykardie, provázená poklesem srdečního výdeje, která působí negativně na vývoj jedince prenatalně.

Cíl 2 – Objasnit vliv beta-blokátorů (BB) na adenylát-cyklázovou regulační kaskádu v časných stádiích vývoje u kuřecího embrya. Tato regulační kaskáda je přímo zodpovědná za řízení kontraktility myokardu.

Cíl 3 - Prozkoumat vliv dlouhodobé léčby beta-adrenergními blokátory a ivabradinem v době embryonálního vývoje srdce a jejího vlivu na přežívání zárodků a změny v srdeční morfogeneze na modelu kuřecího embrya.

Cíl 4 – Objasnit příčiny digoxinové toxicity u pacientů pokročilého věku, výskyt klinických známek a komplikací, které tuto klinickou jednotku provázejí, s ohledem na komorbidity a antropometrické ukazatele nemocných.

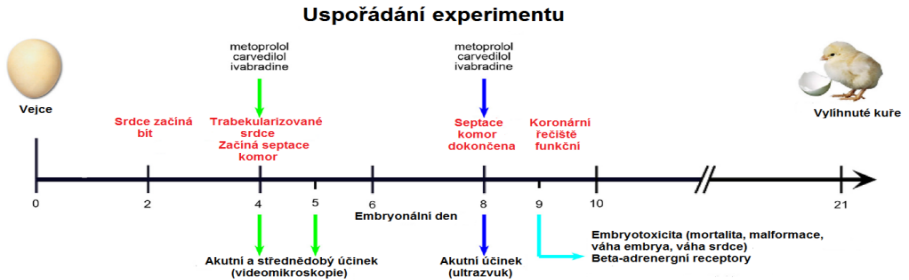
3. MATERIÁL A METODIKA

3.1 Inkubace embrya a aplikace léků

Oplodněná slepičí vejce bílé leghornky byla inkubována ve specializovaném inkubátoru při teplotě 38°C a vlhkosti 75%, byla otáčena pravidelně ve 4 hodinových intervalech. Takto byla vejce inkubována až do 3-19 embryonálního dne vývoje (ED). Při dosažení cílového dne vývoje, byl do skořápky vejce vytvořen nůžkami malý otvor, kterým byl aplikován testovaný přípravek ředěný ve fyziologickém roztoku (Obrázek 1) a inkubace pokračovala až do stanoveného dne. Takto jsme postupovali pro účely testování vlivu BB a ivabradinu na embryotoxicitu a rozvoj teratogenicity a dále pro měření počtu a aktivity beta-adrenergních receptorů a AC.

Pro účely sledování akutního účinku testovaných farmak s pomocí ultrasonografie a videomikroskopie byla kuřecí embrya inkubována ex ovo až do stádia ED4 či ED8. Ex ovo inkubovaná embrya byla umístěna ve speciální šestiúhelníkovité misce (5) v inkubátoru při teplotě 38°C a vlhkosti 75%.

Obrázek 1 Morfologie ED4 a ED8 (vývojového stadia kuřecího embrya) a demonstrace jednotlivých metod pro získání dat a jejich analýzu.



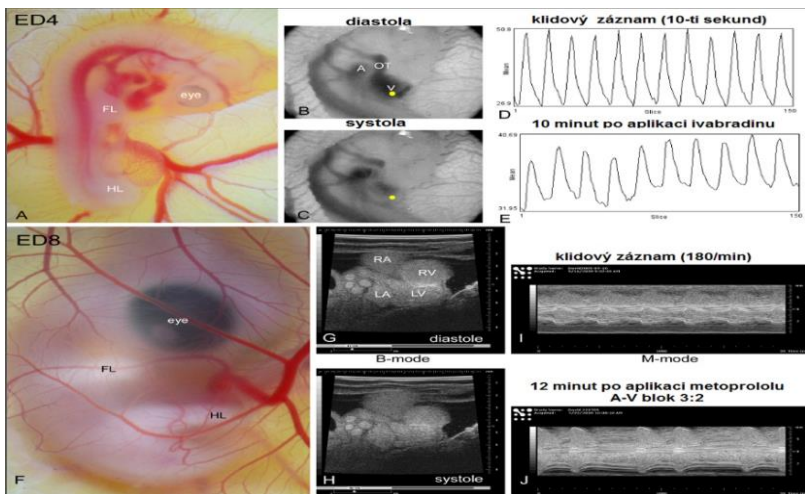
3.2 Testování embryotoxicity

Embryotoxický vliv byl testován in ovo aplikací různých dávek metoprololu, carvedilolu nebo ivabradinu do amniotického vaku ve stádiu ED4 a ED8. U kontrolní skupiny byl intramnioticky aplikován fyziologický roztok. Embrya byla dále in ovo inkubována až do ED9. Následně byla embrya vyňata z vejce, byla přesně změřena jejich mokrá a suchá váha a váha embryonálních srdcí. (Obrázek 1)

3.3 Ex ovo videomikroskopie a vyšetření ultrazvukem

Kuřecí embrya inkubovaná ex ovo, byla vyšetřena ve stádiu ED4 videomikroskopicky a ve stádiu ED8 ultrazukovou metodou. Po dobu vyšetření byla embrya udržována při teplotě 37.5 °C. Farmaka byla aplikována intraamnioticky jehlou. Během videomikroskopie byly zaznamenávány 10 sekund dlouhé smyčky každou minutu po celkovou dobu 30 minut digitálním fotoaparátem Canon G5 spojeným s disekčním mikroskopem Leica SMZ 16. Srdeční objemy embryí byly zhodnoceny pomocí rovnice pro elipsoid (6) a dále byla hodnocena tepová frekvence embrya (Obrázek 2). Ultrazuková biomikroskopie byla prováděna s přístrojem Vevo 760, upraveným pro kuřecí embrya (5). Každé dvě minuty po celkovou délku 30 minut byl zaznamenán M-mode řez oběma srdečními komorami a B-mode smyčka s projekcí na dlouhou a krátkou osu komor. Z M-mode záznamu byla zjištěna tepová frekvence a ze záznamu projekce v dlouhé ose byl s pomocí Simpsonovy rovnice vypočten tepový objem a srdeční výdej (srdeční výdej ($\mu\text{l}/\text{min}$) = tepový objem (μl) * tepová frekvence (n/min) (Obrázek 2).

Obrázek 2 Dole: Videomikroskopie u ED4 kuřecího embrya se záznamem tepové frekvence (A-E) zobrazující negativní inotropní efekt ivabradinu. Mikrofotografie a ultrazvukové vyšetření v B-modu a M-modu u ED8 kuřecího embryonálního stádia (F-J) dokumentující negativně chronotropní a dromotropní efekt metoprololu. A – atrium, FL – fore limb, HL – hind limb, LA – left atrium, LV – left ventricle, OT – outflow tract, RA – right atrium, RV – right ventricle, V – ventricle. Žluté tečky označují bod zájmu, kde byl detekován záznam tepové frekvence (D, E). Upraveno podle(7)



3.4 Dávky antiarytmických léků

Na jedno vejce (průměrně 57g) bylo podáno 200 μl (μg) metoprololu. Tato dávka představuje 16x vyšší dávku než je maximální doporučená dávka pro dospělého člověka (70 kg). Dávka 50 μl (μg) carvedilolu představuje 4x vyšší dávku než je maximální doporučená denní dávka pro dospělého člověka. Dávka 200 μl (μg) ivabradinu je 7x vyšší než maximální doporučená dávka pro dospělého člověka.

3.5 Analýza beta-adrenergických receptorů

Příprava membrán kardiomyocytů k detekci počtu beta-adrenergických receptorů byla provedena následujícím způsobem. Srdce kuřecích embryí byla rozmělněna, homogenizována ve speciálním pufru obsahující kompletní spektrum proteázových inhibitorů (Roche Diagnostics). Následně byla směs

buněčných fragmetů (jader, membrán) izolována pomocí centrifugace. Množství beta-adrenergických receptorů bylo stanoveno pomocí speciální vazebné eseje obsahující neselektivního beta-adrenergického antagonistu ($[^3\text{H}]\text{CGP12177}$). Nеспецифické vazby byly následně identifikovány inkubací s radioaktivně značeným L-propranololem (10 μM). Radioaktivita na filtrech byla měřena pomocí scintilační metody v 5 ml CytoScint (ICN Biomedicals). Množství receptorů bylo měřeno ve všech vzorcích opakovaně ve 3-5 pokusech a z nich každý byl proveden třikrát.

3.6 Hodnocení aktivity adenylát-cyklázy

Po přípravě buněčných membrán výše popsaným způsobem byla hodnocena aktivita AC měřením míry konverze $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ na $[\text{}^{32}\text{P}]\text{cAMP}$, tedy metodou podle Solomona a kol. (8). Membrány kardiomyocytů (20 μg bílkoviny) byly inkubovány se speciální reakční směsí (100 μl). Aktivita stimulované AC byla měřena po přidání 10 μM isoprenalinu nebo 10 μM forskolinu. Separace od nově vytvořeného $[\text{}^{32}\text{P}]\text{cAMP}$ byla provedena s užitím suché chromatografie na aluminiových sloupcích (9).

3.7 Elektroforéza a Western blot analýza – exprese adenylát-cyklázy a G proteinu

Vzorky membrán kardiomyocytů byly naředěny Laemmliho puřem a elektroforeticky byly uvolněné bílkoviny přeneseny na nitrocelulóзовou membránu, blokovány 5% mlékem bez tuku v TBS a dále byly inkubovány s relevantními primárními protilátkami přes noc při 4 $^{\circ}\text{C}$. Dále byly vystaveny sekundárním protilátkám proti králičímu imunoglobulínu. Získané imunoblotty byly znázorněny pomocí zesílené chemoluminiscentní techniky v souladu s doporučeními výrobce (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) a byly digitalizovány a analyzovány kvantitativně pomocí programu ImageQuantTM TL (Amersham Biosciences).

3.8 Analýza souboru pacientů s digoxinovou toxicitou

Na základě údajů z databáze centrálního oddělení biochemie dvou fakultních nemocnic v Praze (Všeobecná fakultní nemocnice a Ústřední vojenská nemocnice) jsme získali soubor 222 pacientů interních oddělení v pětiletém časovém období od roku 2001 až 2005 včetně, kteří měli toxickou sérovou hladinu digoxinu v hodnotách ≥ 3.0 nmol/ml. Ve stejném období bylo na tato

interní oddělení postupně přijato celkem 116,276 pacientů. Veškeré medicínské záznamy těchto 222 pacientů byly důsledně analyzovány zkušeným kardiologem. Pro statistické hodnocení byl použit Fisherův exaktní test a metoda logistické regrese k posouzení souvislosti toxické hladiny digoxinu s jednotlivými charakteristikami jednotlivců v souboru. Studie vyhověla požadavkům Helsinské deklaráce pro studie s pacienty.

4. VÝSLEDKY

4.1 Embryotoxicita metoprololu, carvedilolu a ivabradinu

Mortalita kontrolní skupiny (fyziologický roztok) byla 14% u embryí stádia ED4 a 6% u stádia ED8. Podání zvyšující se dávky metoprololu ED4 embryím nevedlo ke statisticky odlišné mortalitě. Avšak u ED8 embryí došlo po aplikaci 200 µl metoprololu k mortalitě 39%. Velmi významně zvýšená mortalita byla zjištěna u ED4 embryí po aplikaci 200 µl carvedilolu – 86%. U stejné dávky carvedilolu byla u ED8 embryí mortalita 44%. Významná závislost mortality (80%) na dávce podaného ivabradinu byla zjištěna u ED4 embryí po aplikaci 200 µl ivabradinu (Tabulka 1). U ED8 embryí byl tento efekt méně vyjádřen s mortalitou 10% při stejné dávce ivabradinu (Tabulka 2). Mokré a suché váhy embryí a embryonálních srdcí se statisticky signifikantně nelišily mezi jednotlivými skupinami (Tabulka 1,2).

Tabulka 1 Výsledky u embryí léčených ve 4-denním stádiu * $p < 0,05$, † průměr ± SE, †průměr získaný výpočtem z celkového objemu srdcí

ED4	Dávka	N	Exitus	Mortalita	Váha embrya	Váha srdce (g) [†]
Metoprolol	0	11	1	9	1,425 ± 0,114	0,0127
	2	21	0	0	1,652 ± 0,157	0,0014
	20	12	0	0	1,375 ± 0,162	0,0146
	40	21	2	10	1,736 ± 0,162	0,0164
	200	16	0	0	1,388 ± 0,120	0,0157
Carvedilol	0	5	0	0	1,317 ± 0,085	0,0156
	2	6	0	0	1,264 ± 0,078	0,0145
	20	13	1	8	1,350 ± 0,149	0,0142
	40	15	1	7	1,416 ± 0,071	0,0156
	200	14	12	86*	1,405 ± 0,152	0,0163
ivabradin	0	13	3	23	0,791 ± 0,056	0,0107
	2	10	1	10	0,810 ± 0,889	0,0093
	20	10	1	10	0,814 ± 0,079	0,0088
	40	29	16	55*	0,821 ± 0,103	0,0092
	200	15	12	80*	0,694 ± 0,164	0,0090

Tabulka 2 Výsledky u embryí léčených v 8-denním stádiu *p<0,05, † průměr ± SE, †průměr získaný výpočtem z celkového objemu srdcí

ED8	Dávka	N	Exitus	Mortalita	Váha embrya	Váha srdce (g)[†]
metoprolol	0	19	2	11	1,502±0,179	0,0165
	2	20	0	0	1,830±0,178	0,0184
	20	20	1	5	1,717±0,146	0,0190
	40	15	0	0	1,332±0,163	0,0135
	200	23	9	39*	1,604±0,097	0,0135
carvedilol	0	3	0	0	1,257±0,064	n.d.
	2	5	1	20	1,249±0,114	0,0138
	20	16	0	25	1,339±0,142	0,0137
	40	15	4	0	1,366±0,129	0,0151
	200	16	7	44*	1,314±0,175	0,0105
ivabradin	0	12	0	0	1,592±0,147	0,0118
	2	12	1	8	1,439±0,163	0,0109
	20	12	2	17	1,573±0,147	0,0117
	40	12	0	0	1,510±0,156	0,0150
	200	20	2	10	1,444±0,191	0,0127

4.2 Funkční efekt farmak v časném embryonálním stádiu ED 4

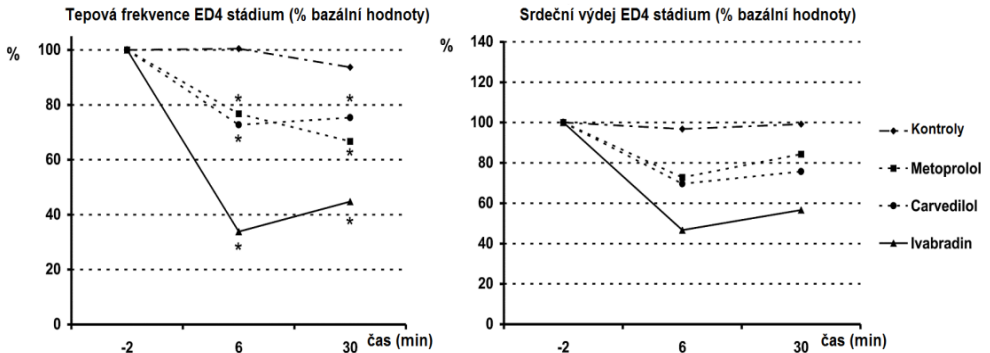
Metoprolol vedl k poklesu tepové frekvence (TF) o 33% a k poklesu srdečního výdeje o 16% ve 30 minutách (min) po podání ED4 ex ovo embryím. V kontrolní skupině došlo ve 30 min k poklesu TF o 6% a k poklesu srdečního výdeje o 1%. Rozdíl v poklesu TF byl mezi skupinami statisticky signifikantně odlišný s $P=0,009\%$, ale rozdíl v srdečním výdeji statistické významnosti nedosáhl ani v rámci stejné skupiny ($P=0,930$) ani při porovnání obou skupin ($P=0,503$). Pro názornost byly trendy těchto sledovaných parametrů vyjádřeny normalizovanými hodnotami bez naznačení chyb měření (Obrázek 3).

Maximální negativně chronotropní účinek carvedilolu u ED4 embryí byl dosažen již 6 minut po aplikaci, kdy došlo k poklesu o 27% ($P=0,0003$) a k dalšímu poklesu TF po dobu sledování (30 min) již nedošlo. Rozdíl mezi TF v této skupině byl oproti kontrolní skupině statisticky významný v 6. i ve 30. min s $P=0,001$ a $P=0,047$. Statisticky významný rozdíl v srdečním výdeji mezi skupinou carvedilolu ED4 a kontrolní skupinou zjištěn nebyl (Obrázek 3).

Podání ivabradinu ED4 embryím vedlo k poklesu TF po 30 min sledování o 55%. Tento rozdíl byl vysoce statisticky významný s $P<0,001$. Srdeční výdej ve skupině ivabradinu poklesl ve 30 min až o 43% oproti původním

hodnotám, ale v porovnání s kontrolní skupinou nebylo dosaženo statistické významnosti ($P=0,986$). (Obrázek 3)

*Obrázek 3 Srdeční frekvence a srdeční výdej, embryonální stádium ED4. Pokles tepové frekvence vede k poklesu srdečního výdeje. * $P<0,05$ statisticky významný rozdíl. Upraveno podle (7).*



4.3 Funkční efekt v embryonálním stádiu ED8

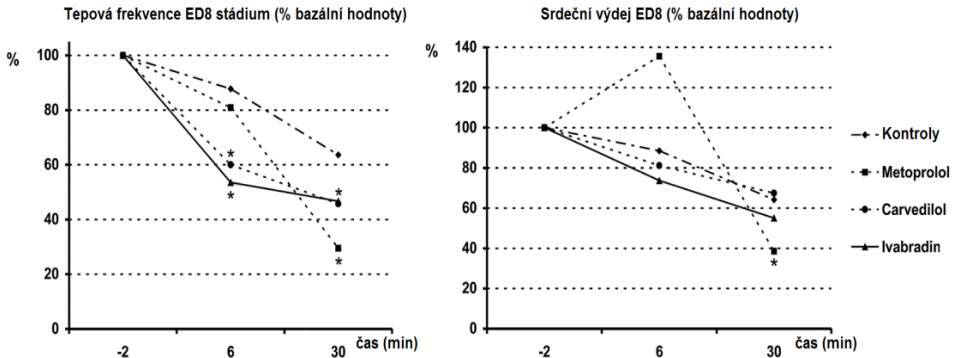
U vývojově pokročilejších ED8 embryí byl negativně chronotropní efekt metoprololu ještě více vyjádřen než tomu bylo u ED4. TF poklesla v průběhu 30 min o 71% ($P<0,001$) v porovnání s kontrolní ED8 skupinou, kde došlo k poklesu jen o 36% ($P<0,001$). Rozdíl mezi skupinami byl ve 30 min statisticky významný s $P=0,011$. V obou skupinách došlo k významnému poklesu srdečního výdeje společně s poklesem TF, o 61% to bylo ve skupině s metoprololem a o 36% v kontrolní skupině. Tento rozdíl byl statisticky významný s $P=0,001$. (Obrázek 4).

U ED8 po podání 50 μ l Carvedilolu došlo k poklesu TF o 54% původních hodnot ($P<0,001$) ve 30 min. Srovnání s kontrolní skupinou ukázalo statisticky významný rozdíl s $P=0,037$. Ve skupině s carvedilolem byl vzestup tepového objemu v 6 a 30 minutách statisticky významný a vedl jen k pomalému poklesu srdečního výdeje spolu s klesající TF. Výsledkem byl jen mírný pokles srdečního výdeje, který nedosáhl statistické významnosti oproti kontrolní skupině. U obou skupin došlo k poklesu srdečního výdeje o 36% a 33% ve 30 min (Obrázek 4).

U ED8 embryí po aplikaci ivabradinu došlo k poklesu TF o 53% ($P<0,001$) ve 30 min. Proti kontrolní skupině byl tento rozdíl statisticky pouze hraniční

s $P=0,052$. Srdeční výdej poklesl o 45% ve skupině s ivabradinem a o 36% v kontrolní skupině ($P=0,128$), tento rozdíl nebyl statisticky významný (Obrázek 4).

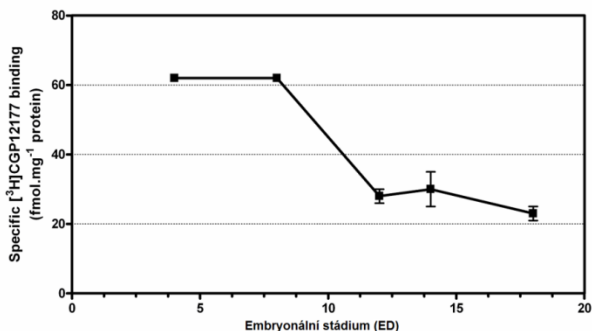
*Obrázek 4 Srdeční frekvence a srdeční výdej, embryonální stádium ED8. Pokles tepové frekvence vede k poklesu srdečního výdeje. * $P<0,05$ statistický významný rozdíl. Upraveno podle (7).*



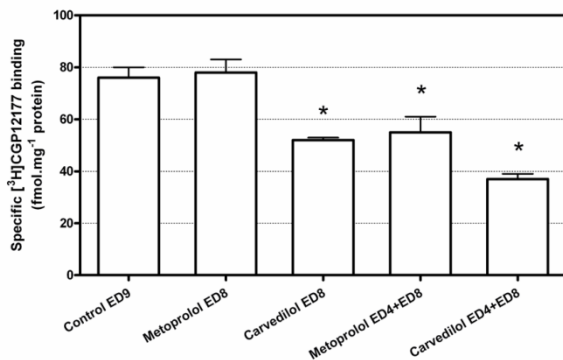
4.4 Beta-adrenergní receptory v průběhu vývoje

V experimentu byl zaznamenán jednoznačný klesající trend v počtu beta-adrenergních receptorů v průběhu vývoje kuřecího embrya (ED4-ED18). (Obrázek 5) Množství beta-adrenergních receptorů se mezi ED8 embryi inkubovanými 24 hodin s metoprololem a kontrolní ED9 skupinou nelišilo. U ED8 embryi stejná doba inkubace s carvedilolem vedla k redukcí počtu beta-adrenergních receptorů ve srovnání s kontrolní skupinou (56 versus 72 fmol/mg bílkoviny). Je zajímavé, že embrya časnějšího ED4 stádia inkubovaná s metoprololem a carvedilolem měla výrazně nižší počet beta-adrenergních receptorů ve srovnání s kontrolní skupinou a také s vývojově staršími ED8 embryi. Průměrné množství beta-adrenergních receptorů ve skupinách ED4 + ED8 embryi s metoprololem byla 55 fmol/mg bílkoviny; ED4 + ED8 embryi léčených carvedilolem jen 37 fmol/mg bílkoviny (Obrázek 6).

Obrázek 5 Vývoj počtu beta-adrenergních receptorů u kuřecího embrya. Upraveno podle (7).



Obrázek 6 Down-regulace beta-adrenergických receptorů u kuřecího embrya v důsledku podání BB. * $P < 0,05$ statistický významný rozdíl. Upraveno podle (7).

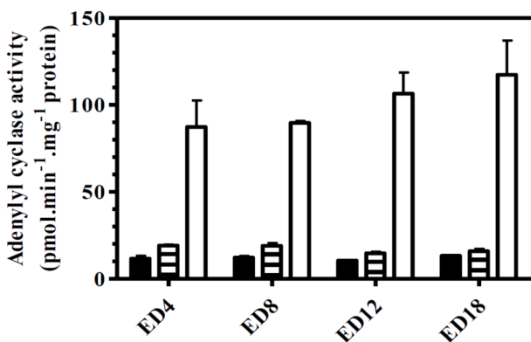


4.5 Aktivita adenylát-cyklázy

Aktivita AC v kardiomyocytech kuřecích embryí nebyla významně odlišná mezi ED4 a ED18 vývojového stádia. Isoprenalin, který je beta-adrenergním agonistou, zvýšil hodnoty AC o 40-45% proti normálním hodnotám. Forskolin, přímý aktivátor AC katalytické subjednotky a Gs proteinu, zvýšil aktivitu enzymu až 10x. Lze říci, že se míra stimulačního účinku těchto přípravků na aktivitu AC nelišila významně mezi jednotlivými vývojovými stádii kuřecího embrya. Nicméně nelze nezmínit, že byla zaznamenána mírná klesající tendence u isoprenalinem stimulované aktivity AC v pozdějších stádiích embryonální vývoje. Aplikace metoprololu a carvedilolu ve stádiích ED4 nebo ED4+ED8 neovlivnily aktivitu AC měřenou v ED9 stádiu. Obě tyto látky však významně snížily forskolinem stimulovanou aktivitu AC, pokud

byly aplikovány v ED8 stádiu vývoje. K poklesu této aktivity došlo také u kuřecích embryí po aplikaci carvedilolu v ED4+ED8 stádiu, ale tento vliv nedosáhl statistické významnosti. (Obrázek 7).

Obrázek 13 Aktivita AC u kuřecího embrya v průběhu ontogeneze. Bazální hodnoty AC (plné sloupce), isoprenalinem stimulovaná hodnota AC (příčně pruhované sloupce), forskolinem stimulovaná hodnota AC (prázdné sloupce). Hladina AC byla měřena na membránách kardiomyocytů různých vývojových stádií. Všechny hodnoty jsou uváděny jako průměr \pm směrodatná odchylka (SMOD). Upraveno podle (10).



4.6 Expresse adenylát-cyklázy a G proteinu v průběhu vývoje

Pomocí metody Western Blot bylo hodnoceno množství AC 5 a α podjednotky stimulačního (Gs) a inhibičního (Gi) proteinu, které představují klíčové komponenty AC signalizační kaskády, na jednotlivých vývojových stádiích kuřecího embrya. Výskyt dominantní srdeční izoformy AC5 se v časných vývojových stádiích neměnil a k poklesu o více než 30% došlo až v ED12-ED18. Zatímco množství AC5 nebylo v časných stádiích ED4 ovlivněno účinky metoprololu a carvedilolu, jejich podání na ED8 stádiu vedlo k významnému poklesu (o cca 40-50%) AC5. Pokud byly BB podány současně v ED4 a ED8 stádiu, došlo k poklesu aktivity AC5, ale pokles byl mnohem méně výrazný (cca o 20%).

Množství subjednotek G proteinu (Gs a Gi) je v časných stádiích vývoje velmi malé. K dramatickému nárůstu počtu subjednotek G proteinu dochází v období ED4-ED8. Následně již množství α podjednotek G proteinu zůstává relativně nezměněno až do ED18. U embryí léčených metoprololem a carvedilolem

v ED4 stádiu nedošlo k významnějšímu ovlivnění množství G α . Ovšem aplikace metoprololu v ED8 stádiu a ED4+ED8 vedla k poklesu (o cca 40%) exprese G α . Je zajímavé, že v experimentu nebylo dosaženo stejného efektu na expresi G α u embryí léčených ve stejném období carvedilolem. Aplikace obou BB ve stádiu ED4 a aplikace carvedilolu v ED8 nebo ED4+ED8 stádiu výrazně zvýšila (o cca 60%) množství G α hodnoceno v ED9. Aplikace metoprololu u kuřecích embryí v ED8 nebo ED4+ED8 nevedla ke změnám množství G α proteinu.

4.7 Výsledky pětileté retrospektivní analýzy souboru pacientů dvou center s toxickou sérovou koncentrací digoxinu

Základní charakteristika našeho souboru 222 pacientů s toxickou sérovou hladinou digoxinu přesahující hodnoty $\geq 3,0$ nmol/ml je vyjádřena v Tabulce 3. Celková mortalita v průběhu hospitalizace byla 8,1%. Z toho kardiovaskulární mortalita, která byla prokazatelně v souvislosti s toxicitou digoxinu, dosáhla v celém souboru 1,8%. Při studiu dalších přidružených onemocnění jednotlivých pacientů v našem souboru lze z relevantních údajů zmínit, že jen 14% pacientů mělo normální funkci ledvin vyjádřeno hodnotou clearance kreatininu ≥ 60 ml/min. Statisticky signifikantním prediktorem mortality v našem souboru byla nízká hodnota clearance kreatininu s $P=0,02$ (Odds Ratio 0,95), ale nikoliv sérová koncentrace kreatininu s $P=0,15$ (Odds Ratio 1,00).

Tabulka 3 Charakteristika souboru

Charakteristika	Počet pacientů v souboru n=222
Věk (roky)	77,6 (9,3)
Ženské pohlaví <i>n</i> (%)	130 (59)
Váha (kg)	72,8 (16,3)
K ⁺ v séru (mmol/l)	4,6 (0,8)
Kreatinin v séru (μ mol/l)	199,4 (139,2)
Clearance kreatininu (ml/min)	35,9 (22,6)
Denní dávka digoxinu (mg)	0,195 (0,100)
Podání digoxinu per os <i>n</i> (%)	184 (73)
Hladina digoxinu v séru (nmol/l)	4,5 (2,2)
Ejektční frakce levé komory (%)	42,4 (13,7)

Data jsou uváděna jako průměrné hodnoty +/- SMODCH případně jako počet a procentuálně zastoupení nemocných.

Celkem 64% pacientů našeho souboru užívalo alespoň jeden preparát se známou lékovou interakcí s digoxinem, která vede ke zvýšení jeho sérové hladiny. Dokonce 7% pacientů užívalo tři a více takovýchto léků současně. Všechny potenciální lékové interakce v našem souboru jsme detailně analyzovali také ve vztahu k mortalitě či přežívání. Zjistili jsme statisticky signifikantní pozitivní korelaci mezi užíváním léku ze skupiny angiotenzin konvertujícího enzymu a blokátoru angiotenzinového receptoru (ACEI/ARB) a přežíváním. Tyto dvě lékové skupiny měly v našem souboru protektivní účinek, neboť mortalita u pacientů bez této medikace byla 13,46% a mortalita ve skupině pacientů léčených preparáty ze skupiny ACEI/ARB byla 3,37%. Tento rozdíl je statisticky významný ($p=0,01$). Tyto dvě skupiny pacientů ať již s či bez léčby preparáty ACEI/ARB se od sebe jinak ničím statisticky významně nelišily. Rozdíl nebyl ve věku (77 průměrný věk versus 78 let), v ejekční frakci levé komory (s léčbou 41% versus bez léčby 45%), sérově hladině draslíku (4,7 mmol/l u ACEI/ARB či 4,5 mmol/l bez ACEI/ARB), v hodnotě clearance kreatininu (34,8 ml/min u ACEI/ARB a 34,1 ml/min bez ACEI/ARB).

Zaznamenali jsme statistický trend nižší mortality u pacientů současně léčených medikamenty ze skupiny BB. Mortalita ve skupině pacientů léčených těmito preparáty byla 3,03% zatímco ve skupině neléčené BB byla mortalita 10,67%, což představuje statický trend s $P=0,07$ viz Tabulka 3. Pro ostatní léky běžně užívané v moderní kardiologii jako jsou kyselina acetylsalicylová, furosemid, hydrochlorothiazid, statinové preparáty, warfarin, které se vyskytly v analyzovaném souboru, jsme žádnou další statisticky signifikantní závislost nenalezli. Dále jsme neprokázali žádnou statisticky signifikantní závislost mezi léky, které mají známou přímou lékovou interakci s digoxinem, například amiodaron, carvedilol, verapamil, spironolacton, omeprazol, makrolidová antibiotika, a mortalitou

5. DISKUZE

5.1 Embryotoxický vliv změny tepové frekvence vyvolaný podáním léků s antiarytmickým účinkem u kuřecích embryí

Studovány byly tři různé léky s antiarytmickým účinkem a s velmi silným bradykardizujícím potenciálem. Metoprolol je středně silně selektivní BB (blokuje beta 1 adrenergní receptory), s negativně chronotropním a negativně

inotropním účinkem (11). Carvedilol patří k neselektivním BB, které přímo inhibují beta-1 a beta-2 receptory přítomné v myokardu ale také v buňkách cévní stěny (11). Jeho široce blokující efekt na adrenergní receptory vede k negativně chronotropnímu efektu, méně vyjádřenému negativně inotropnímu efektu (12), a dále snižuje afterload (dotížení). Ivabradin je relativně novým lékem s přímým účinkem na tzv. „funny“ (I_f) kanály přítomnými v sinusovém uzlu ve vysoké koncentraci. Tím je umožněn silný bradykardizující efekt ivabradinu bez současného negativně inotropního účinku (13).

Několik retrospektivních studií sledujících nežádoucí účinky BB (například metoprololu) na plod u těhotných žen neprokázalo zvýšený výskyt malformací u novorozenců (14, 15). Metoprolol je v současnosti doporučen pro léčbu supraventrikulárních arytmií (SVT) v průběhu těhotenství ve třídě I s úrovní evidence B, s poznámkou, že by tyto léky neměly být podávány v prvním trimestru těhotenství, jestliže je to možné (16). Lze říci, že zkušenosti z observačních studií u těhotných žen korelují s našimi nálezy, ve kterých nebyly nalezeny malformace srdce, ale ani jiné malformace u kuřecích embryí léčených v kritickou fázi jejich vývoje metoprololem. Nemůžeme však potvrdit domněnku, že je užívání metoprololu v prvním trimestru provázeno vyšším rizikem pro vývoj plodu. Naše nálezy ukazují spíše menší citlivost mladších ED4 embryí vůči účinkům metoprololu a carvedilolu, přestože mají relativně vyšší množství přítomných beta-adrenergních receptorů. V placebem kontrolované studii u těhotných žen léčených BB atenololem nedošlo k vyššímu výskytu malformací u plodů, ale novorozenci léčených matek měli častěji bradykardii (17). Také my jsme prokázali silné negativně chronotropní účinky metoprololu u kuřecího embrya u více vyspělých jedinců ED8 ve srovnání s kontrolní skupinou. Bradykardií způsobený pokles srdečního výdeje souvisí také s faktem, že převažující myokardiální trabekulizace nad hmotou kompaktního myokardu levé komory fetálního srdce neumožňuje plný efekt Frankova-Starlingova mechanismu, který se uplatňuje u dospělých jedinců (18). Nedostatečný srdeční výdej může způsobit úmrtí jedince, které bylo v našem experimentu pozorováno u ED8 kuřecích embryí po aplikaci 200 μ l metoprololu. Jak již bylo publikováno v dřívějších experimentech, hypoxie způsobená lehkou až středně významnou bradykardií může být mechanismem úmrtí jedince (19).

Také v kontrolní skupině jsme také pozorovali pokles tepové frekvence, který nebyl významný u ED4 embryí, ale statistické významnosti dosáhl u vývojově

starších ED8 embryí. Na tomto fenoménu se mohlo podílet osychání amniotické membrány a tlak ultrazvukové sondy.

Prozatím chybí zkušenost s vlivem carvedilolu na lidský plod. Na základě našeho experimentu můžeme říci, že vysoké dávky carvedilolu (200 μ l) vedou k významným nežádoucím účinkům na vyvíjejícího se jedince v období embryonálního i fetálního vývoje. Tato dávka carvedilolu je 16x vyšší, než běžně doporučená dávka pro dospělého pacienta. Vedla k rozvoji velmi signifikantních epizod dlouhých asystolií a nakonec ke smrti jedince. Nižší dávka 50 μ l carvedilolu se ukázala jako významně bezpečnější a významná embryotoxicita nebyla prokázána. Působením carvedilolu došlo k významnému poklesu tepové frekvence u ED8 embryí, ale pokles srdečního výdeje nedosáhl statistické významnosti.

Bezpečností profil ivabradinu v těhotenství není znám. V našem experimentu jsme prokázali významnou embryotoxicitu ivabradinu v časných vývojových stádiích a domníváme se, že další studium této problematiky je nutné. Specializované „funny“ kanály pacemakerových buněk jsou přítomny v myokardu již ve velmi časných stádiích a postupně dochází k jejich koncentraci do sinoatriálního a atrioventrikulárního uzlu (20, 21). Proto není překvapením, že má ivabradin velmi silný negativně chronotropní účinek na vyvíjející se srdce, jak prokázal *in vitro* Sarre a kol. (20, 21) a my tento vliv potvrzujeme ve studii *in vivo*.

V našem experimentu jsme prokázali přítomnost funkčních beta-adrenergických receptorů v časně fázi vývoje, u ED4 embryí. Již v dříve publikovaných pracích je dokumentována vrůstající citlivost srdce vůči beta-mimetickým lékům v závislosti stupni vývoje jedince, s maximálním účinkem na ED9 kuřecí embrya (22). Tento nálezn je zcela ve shodě s naším pozorováním vyšší akutní citlivosti vůči BB u ED8 embryí oproti ED4 embryonálnímu stádiu. Zajímavé je, že tento fenomén nemůže být přičten vyššímu počtu beta-adrenergických receptorů, protože jsme dokumentovali naopak klesající tendenci počtu receptorů v průběhu vývoje od stádií ED4 až do ED18. Předpokládáme, že lepší propojení receptorů a efektorů (coupling) zvyšuje jejich efektivitu v pozdějších vývojových stádiích, což by mohlo vysvětlit jejich vyšší citlivost vůči účinkům beta-mimetických látek. Dále jsme prokázali, že dlouho trvající účinek BB vede k poklesu počtu (down-regulaci) beta-adrenergických receptorů v časných vývojových stádiích. Ze tří testovaných

látek byl tento efekt nejvíce vyjádřen u carvedilolu, neselektivního BB, oproti metoprololu, který patří ke středně selektivním BB.

5.2 Adenylát-cyklázová signalizační kaskáda kuřecího embrya v průběhu vývoje: vliv podání antiarytmických léků

V následující práci jsme hodnotili vliv dvou často užívaných BB, metoprololu a carvedilolu, na klíčové komponenty a funkci AC signalizační kaskády v průběhu vývoje kuřecího embrya.

Naše současná experimentální data ukazují, že ačkoliv dochází k poklesu predominantní srdeční izoformy AC 5 v průběhu vývojového období embrya mezi ED12 až ED18, aktivita enzymu zůstává stabilní v průběhu celého prenatalního vývoje kuřecího embrya, což je ve shodě s předchozími pracemi (23, 24). Paralelně těmto nálezům jsme zjistili vzestup Gs a Gi proteinu v období mezi ED4 a ED8 embryonálního vývoje. Podobný vzestup srdečního Gi v průběhu časného vývoje kuřecího embrya prokázali také ostatní autoři (24). Výsledky našich předchozích prací a také prací jiných autorů ukazují jasný pokles počtu beta-adrenergních receptorů v myokardu v průběhu prenatalní ontogeneze (7, 25, 26). Na základě všech těchto poznatků se domníváme, že vývoj počtu beta-adrenergních receptorů, G proteinů a AC není v průběhu vývoje zcela jednoduše koordinován. Je také důležité zmínit, že částečný pokles beta-adrenergních receptorů v pozdějších stádiích vývoje embrya byl následován jen částečně sníženou aktivitou isoprenalinem indukované aktivity AC. Tento údaj nutí pomyslet na možnost tzv. receptorové rezervy, takže ne všechny beta-adrenergní receptory musí být nezbytně spojeny s AC signalizační kaskádou a být schopny přenosu signálu na efektorový mechanismus. Již dříve bylo prokázáno, že receptorová rezerva beta-adrenergních receptorů výrazně kolísá v různých tkáních a také mezidruhově (27-29). Na základě těchto informací lze tedy předpokládat, že se na zvýšené citlivosti vůči lékům s beta-mimetickými účinky v pozdějších fázích vývoje podílí kvalitnější propojení beta-adrenergních receptorů se signalizační AC kaskádou. V předchozí práci jsme pozorovali významný pokles v počtu beta-adrenergních receptorů u kuřecích embryí po podání BB na stádiu ED4 nebo ED8 nebo ED4+ED8 (7). Naše výsledky ukazují, že aplikace metoprololu a carvedilolu ve stádiu ED8, ale nikoliv ve stádiích ED4 nebo ED4+ED8, významně snižují aktivitu AC stimulované forskolinem. Bazální hodnoty či hodnoty AC aktivity stimulované isoprenalinem se však za

těchto podmínek signifikantně nelišily. Tato diskrepance může být alespoň částečně vysvětlena poklesem množství G proteinu, který byl zaznamenán u kuřecích embryí léčených BB ve ED8 stádiu. Forskolin zvyšuje aktivitu AC nejen přímým účinkem, ale také cestou aktivace Gs proteinu (30) a proto i nižší množství G proteinu může odpovídat za nižší účinek tohoto preparátu na stimulaci AC.

5.3 Pětiletá retrospektivní analýza souboru pacientů dvou center s toxickou sérovou koncentrací digoxinu

V naší práci dokumentujeme vzácný výskyt digoxinové toxicity v dospělé populaci, který je však provázen vysokým rizikem mortality. Zjistili jsme, že jen 14% pacientů v našem souboru mělo normální funkci ledvin s hodnotou clearance kreatininu ≥ 60 ml/min. Byla to snížená hodnota clearance kreatininu, která byla statisticky signifikantním prediktorem mortality pacientů v našem souboru, a nikoliv absolutní hodnota sérového kreatininu. Naše zjištění jednoznačně podporuje rutinní kalkulaci clearance kreatininu s pomocí Cockcroftovy-Gaultovy rovnice namísto posuzování funkce ledvin pouze na základě sérové koncentrace kreatininu (31). Pozitivní prediktivní hodnota nízké clearance kreatininu ve vztahu k mortalitě pacientů v našem souboru může být vysvětlena známými farmakodynamickými charakteristikami digoxinu. Asi 70% digoxinu je z lidského organismu vylučováno v původní formě pomocí aktivní funkce ledvin. To platí jen u těch pacientů, kde je zachována normální funkce ledvin (11).

V naší práci prokazujeme, že charakteristiky souboru jakými jsou pohlaví, dávka digoxinu, sérová hladina draslíku, věk, sérová hladina digoxinu, neměly statisticky signifikantní souvislost s mortalitou pacientů v našem souboru, na čemž se může podílet nižší mortalita v souboru. Zjistili jsme pouze hraniční souvislost nízké systolické funkce levé komory vyjádřené ejekční frakcí.

Na základě detailní analýzy současně podávané medikace jsme zjistili, že 64% pacientů užívalo alespoň jeden lék s prokázaným vlivem na zvýšení hladiny sérového digoxinu. Přesto se nám nepodařilo prokázat vliv tohoto jevu na mortalitu u pacientů v našem souboru. Zajímavým zjištěním byl nález ochranného efektu současné léčby farmaky ze skupiny ACEI/ARB. Mortalita pacientů léčených těmito preparáty byla statisticky signifikantně nižší. Ochranný účinek ACEI/ARB může být vysvětlen také jejich schopností mírně zdržovat v lidském organismu draslík, ačkoliv v našem souboru nebyly

hodnoty koncentrace draslíku v séru signifikantní odlišné. Dále přichází v úvahu potenciálně antiarytmický efekt ACEI/ARB. Zajímavé je také zjištění statistického trendu, který ukazuje na možný ochranný vliv současného podávání léků ze skupiny BB.

Po statistické adjustaci ke skupině pacientů našeho souboru, u kterých byla data kompletní (141 pacientů), jsme prokázali pozitivní korelaci nitrožilně podaného digoxinu s mortalitou kde $p=0,02$ (odds ratio 32,56). Tento nálezn však musí být vykládán s opatrností, neboť více nemocní pacienti byli častěji léčeni právě nitrožilní aplikací digoxinu. Statistická závislost mortality na stupni systolické dysfunkce vyjádřené ejekční frakcí levé komory byla po adjustaci ještě výraznější než v celém souboru s $p=0,05$ (odds ratio 0,95). Systolická funkce levé komory je známým silným prediktorem mortality pacientů, jak ukázala řada přechozích klinických studií (32-34).

Dále jsme v této podskupině pacientů s kompletními daty pozorovali hraniční statistickou závislost mortality na tělesné hmotnosti s trendem vyšší mortality u pacientů s nižší tělesnou hmotností ($p=0,08$) (odds ratio 0,94). Tento jev může být vysvětlen farmakodynamickými vlastnostmi digoxinu, neboť až 50% tělesného obsahu digoxinu je vázáno na receptory kosterního svalstva. (11). Tato naše pozorování jsou v soulasu s nálezem řady předchozích studií, které ukazují na horší průběh otravy digoxinem u pacientů pokročilého věku (35) a u žen (36). Tito pacienti mají vyšší riziko rozvoje digoxinové toxicity s těžším průběhem otravy.

6. ZÁVĚRY

V našem experimentu na kuřecích embryích jsme prokázali, že v průběhu vývojového období kuřecího embrya dochází postupně k poklesu počtu beta-adrenergických receptorů v myokardu a také k poklesu predominantní srdeční izoformy AC 5 a současně k vzestupu množství Gs a Gi proteinu. Přes uvedené změny jsme přitom prokázali jen částečně snížený efekt podání isoprenalinu v pozdějších stádiích vývoje. Toto pozorování si vysvětlujeme dvěma mechanismy, tzv. receptorovou rezervou a kvalitnějším spojením mezi receptorem a efektoem – excitation-contraction coupling. Receptorovou rezervou myslíme nadbytečný počet beta-adrenergických receptorů v myokardu, z nichž jen část je spojena s AC signalizační kaskádou umožňující přenos signálu na efektorový mechanismus.

V další části našeho experimentu zaměřeného na vliv antiarytmické léčby na vývoj kardiovaskulárního aparátu u kuřecích embryí jsme prokázali, že citlivost vůči negativně chronotropnímu účinku zkoumaných preparátů metoprololu, carvedilolu a ivabradinu stoupá přímo úměrně se stupněm embryonálního vývoje jedince. Podařilo se nám potvrdit naši hypotézu, ve které jsme předpokládali, že srdce kuřecího embrya nemá dostatečné kompenzační mechanismy, kterými by dokázalo zachovat dostatečný srdeční výdej i při farmaky navozené bradykardii. V našem experimentu jsme prokázali pokles srdečního výdeje odpovídajícího stupni farmaky navozené bradykardie, který se podílel na úmrtí embryí.

Dále se nám podařilo prokázat, že dlouhodobě podávané BB v experimentu na kuřecích embryích mohou v některých případech negativně ovlivnit expresi beta-adrenergických receptorů, G proteinu a adenylát-cyklázy kardiomyocytů. Tyto komponenty představují klíčovou signalizační kaskádu potřebnou pro normální embryonální vývoj jedince.

Závěrem naší experimentální práce bychom chtěli zdůraznit, aby lékaři, kteří jsou stále častěji nuceni předepisovat léky těhotným ženám, byli maximálně obeznámeni s jejich potenciálně negativními účinky na vyvíjející se plod. Na základě našich zkušeností z experimentu se domníváme, že je metoprolol v běžných dávkách pravděpodobně bezpečný u těhotných žen. Ivabradine a carvedilol však mohou vést k potenciálně nežádoucím účinkům na plod a to právě na základě ovlivnění jeho tepové frekvence.

V klinické části našeho výzkumu jsme prokázali, že se v době moderní kardiologické terapie digoxinová toxicita vyskytuje vzácně, ale je spojena s vysokou mortalitou. Typicky se digoxinová toxicita vyskytuje u jedinců pokročilého věku, s nízkou tělesnou hmotností (častěji ženy), s renální insuficiencí a s polypragmazií. Současná léčba ACEI/ARB a BB má pravděpodobně protektivní vliv z hlediska mortality.

7. POUŽITÁ LITERATURA

1. BALAJI S, and HARRIS L. *Atrial arrhythmias in congenital heart disease*. *Cardiol Clin* 20: 2002, 459-468, vii.

2. FERRERO S, COLOMBO BM, and RAGNI N. *Maternal arrhythmias during pregnancy*. *Arch Gynecol Obstet* 269: 2004, 244-253.

3. DUNNIGAN A, HU N, BENSON DW, JR., et al. *Effect of heart rate increase on dorsal aortic flow in the stage 24 chick embryo*. *Pediatr Res* 22: 1987, 442-444.
4. SEDMERA D. *Function and form in the developing cardiovascular system*. *Cardiovasc Res* 91: 2011, 252-259.
5. MCQUINN TC, BRATOEVA M, DEALMEIDA A, et al. *High-frequency ultrasonographic imaging of avian cardiovascular development*. *Dev Dyn* 236: 2007, 3503-3513.
6. SEDMERA D, GROBETY M, REYMOND C, et al. *Pacing-induced ventricular remodeling in the chick embryonic heart*. *Pediatr Res* 45: 1999, 845-852.
7. KOCKOVA R, SVATUNKOVA J, NOVOTNY J, et al. *Heart rate changes mediate the embryotoxic effect of antiarrhythmic drugs in the chick embryo*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 304: 2013, H895-902.
8. SALOMON Y, LONDOS C, and RODBELL M. *A highly sensitive adenylate cyclase assay*. *Anal Biochem* 58: 1974, 541-548.
9. WHITE AA. *Separation and purification of cyclic nucleotides by alumina column chromatography*. *Methods Enzymol* 38: 1974, 41-46.
10. HEJNOVA L, HAHNOVA K, KOCKOVA R, et al. *Adenylyl cyclase signaling in the developing chick heart: the deranging effect of antiarrhythmic drugs*. *Biomed Res Int* 2014: 2014, 463123.
11. OPIE LH, GERSH B.J. *Drugs for the Heart 6th edition*. 2005.
12. BRIXIUS K, BUNDKIRCHEN A, BOLCK B, et al. *Nebivolol, bucindolol, metoprolol and carvedilol are devoid of intrinsic sympathomimetic activity in human myocardium*. *Br J Pharmacol* 133: 2001, 1330-1338.
13. SULFI S, and TIMMIS AD. *Ivabradine -- the first selective sinus node I(f) channel inhibitor in the treatment of stable angina*. *Int J Clin Pract* 60: 2006, 222-228.
14. RASHBA EJ, ZAREBA W, MOSS AJ, et al. *Influence of pregnancy on the risk for cardiac events in patients with hereditary long QT syndrome*. *LQTS Investigators*. *Circulation* 97: 1998, 451-456.

15. SANDSTROM B. *Antihypertensive treatment with the adrenergic beta-receptor blocker metoprolol during pregnancy.* Gynecol Invest 9: 1978, 195-204.
16. BLOMSTROM-LUNDQVIST C, SCHEINMAN MM, ALIOT EM, et al. *ACC/AHA/ESC guidelines for the management of patients with supraventricular arrhythmias--executive summary. a report of the American college of cardiology/American heart association task force on practice guidelines and the European society of cardiology committee for practice guidelines (writing committee to develop guidelines for the management of patients with supraventricular arrhythmias) developed in collaboration with NASPE-Heart Rhythm Society.* J Am Coll Cardiol 42: 2003, 1493-1531.
17. RUBIN PC, BUTTERS L, LOW RA, et al. *Atenolol in the treatment of essential hypertension during pregnancy.* Br J Clin Pharmacol 14: 1982, 279-281.
18. SEDMERA D, PEXIEDER T, RYCHTEROVA V, et al. *Remodeling of chick embryonic ventricular myoarchitecture under experimentally changed loading conditions.* Anat Rec 254: 1999, 238-252.
19. DANIELSSON BR, SKOLD AC, and AZARBAYJANI F. *Class III antiarrhythmics and phenytoin: teratogenicity due to embryonic cardiac dysrhythmia and reoxygenation damage.* Curr Pharm Des 7: 2001, 787-802.
20. SARRE A, PEDRETTI S, GARDIER S, et al. *Specific inhibition of HCN channels slows rhythm differently in atria, ventricle and outflow tract and stabilizes conduction in the anoxic-reoxygenated embryonic heart model.* Pharmacol Res 61: 2010, 85-91.
21. AANHAANEN WT, MOMMERSTEEG MT, NORDEN J, et al. *Developmental origin, growth, and three-dimensional architecture of the atrioventricular conduction axis of the mouse heart.* Circ Res 107: 2010, 728-736.

22. OSTADAL B, JANATOVA T, KRAUSE EG, et al. *Analysis of the cardiotoxic effect of isoproterenol in chick embryo*. J Physiol (Paris) 78: 1982, 867-869.
23. ALEXANDER RW, GALPER JB, NEER EJ, et al. *Non-co-ordinate development of beta-adrenergic receptors and adenylate cyclase in chick heart*. Biochem J 204: 1982, 825-830.
24. HALVORSEN SW, and NATHANSON NM. *Ontogenesis of physiological responsiveness and guanine nucleotide sensitivity of cardiac muscarinic receptors during chick embryonic development*. Biochemistry 23: 1984, 5813-5821.
25. PHILLIPS MT, KIRBY ML, and STEWART DE. *Cyclic AMP in normal and sympathetically aneural chick hearts during development*. J Mol Cell Cardiol 18: 1986, 827-835.
26. STEWART DE, KIRBY ML, and ARONSTAM RS. *Regulation of beta-adrenergic receptor density in the non-innervated and denervated embryonic chick heart*. J Mol Cell Cardiol 18: 1986, 469-475.
27. BROWN L, DEIGHTON NM, BALS S, et al. *Spare receptors for beta-adrenoceptor-mediated positive inotropic effects of catecholamines in the human heart*. J Cardiovasc Pharmacol 19: 1992, 222-232.
28. JACKSON DA, and NATHANSON NM. *Subtype-specific regulation of muscarinic receptor expression and function by heterologous receptor activation*. J Biol Chem 270: 1995, 22374-22377.
29. DHEIN S, ROHNERT P, MARKAU S, et al. *Cardiac beta-adrenoceptors in chronic uremia: studies in humans and rats*. J Am Coll Cardiol 36: 2000, 608-617.
30. ALOUSI AA, JASPER JR, INSEL PA, et al. *Stoichiometry of receptor-Gs-adenylate cyclase interactions*. Faseb J 5: 1991, 2300-2303.
31. COCKCROFT DW, and GAULT MH. *Prediction of creatinine clearance from serum creatinine*. Nephron 16: 1976, 31-41.

32. BIGGER JT, JR., FLEISS JL, KLEIGER R, et al. *The relationships among ventricular arrhythmias, left ventricular dysfunction, and mortality in the 2 years after myocardial infarction.* Circulation 69: 1984, 250-258.
33. *Risk stratification and survival after myocardial infarction.* N Engl J Med 309: 1983, 331-336.
34. VOLPI A, DE VITA C, FRANZOSI MG, et al. *Determinants of 6-month mortality in survivors of myocardial infarction after thrombolysis. Results of the GISSI-2 data base. The Ad hoc Working Group of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI)-2 Data Base.* Circulation 88: 1993, 416-429.
35. HANRATTY CG, MCGLINCHEY P, JOHNSTON GD, et al. *Differential pharmacokinetics of digoxin in elderly patients.* Drugs Aging 17: 2000, 353-362.
36. RATHORE SS, WANG Y, and KRUMHOLZ HM. *Sex-based differences in the effect of digoxin for the treatment of heart failure.* N Engl J Med 347: 2002, 1403-1411.

SEZNAM PUBLIKACÍ DOKTORANDA

Publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace

1. Sedmera D, **Kockova R**, Vostarek F, Raddatz E. Arrhythmias in the developing Heart. Acta Physiol (Oxf). 2014 Nov 1, **IF=4,251**
2. Hejnova L, Hahnová K, **Kockova R**, Svatunkova J, Sedmera D, Novotny J. Adenylyl cyclase signalling in the developing chick heart: the deranging effect of antiarrhythmic drugs. Biomed Res Ing. 2014 Jun; 2014:463123, **IF=2.706**
3. **Kockova R**, Svatunkova J, Novotny J, Hejnova L, Ostadal B, Sedmera D. Heart rate changes mediate the embryotoxic effect of antiarrhythmic drugs in the chick embryo. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2013 Mar 15;304(6):H895-902, **IF=3.626**

4. Kockova R, Skvaril J, Cernohous M, Maly M, Kocka V, Linhart A. Five year two center retrospective analysis of patients with toxic digoxin serum concentration. *Int J Cardiol.* 2011 Feb 3;146(3):447-8, **IF=5,509**

5. Kockova R, Kocka V, Kiernan T, Fahy GJ. Ibutilide-induced cardioversion of atrial fibrillation during pregnancy. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2007 May;18(5):545-7, **IF=3.475**

Publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace

1. Sramko M, Peichl P, Wichterle D, Tintera J, Weichet J, Maxian R, Pansisinova S, **Kockova R**, Kautzner J. Clinical value of assessment of left atrial late gadolinium enhancement in patients undergoing ablation of atrial fibrillation. *Int J Cardiol.* 2015 Jan 20;179:351-7, **IF=5,509**

2. Vecera J, Bartunek J, Vanderheyden M, Kotrc M, **Kockova R**, Penicka M. Three-dimensional echocardiography-derived vena contracta area at rest and its increase during exercise predicts clinical outcome in mild-moderate functional mitral regurgitation. *Circ J.* 2014 Oct 24;78(11):2741-9, **IF=3,685**

3. Skvaril J, **Kockova R**, Danickova K, Sedlon P. Chronic radial artery occlusion after transradial catheterization. Re-canalization via an ipsilateral ulnar artery. *Acta Cardiol* 2012; 67(1): 367-70, **IF=0,61**

Bez IF

1. Kočková R. Novinky v zobrazovacích metodách u srdečního selhání. *Postgrad Med.* 2014 April; 16(Příloha 1):13-21.