

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD

**STUDIUM MOŽNOSTÍ FARMAKOLOGICKÉ
OCHRANY SRDEČNÍCH BUNĚK PŘED OXIDAČNÍM
STRESEM A ANTRACYKLINOVÝMI CYTOSTATIKY**

Disertační práce

Mgr. Hana Jansová

Vedoucí disertační práce:

doc. PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D.

Odborný konzultant:

RNDr. Pavlína Hašková, Ph.D.

Hradec Králové, 2016

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením svého školitele. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové, 2016

Mgr. Hana Jansová

Poděkování

Děkuji svému školiteli **doc. PharmDr. Tomáši Šimůnkovi, Ph.D.**, za odborné vedení a přátelský přístup v průběhu celého mého doktorského studia a za cenné rady a pomoc při přípravě této disertační práce.

Děkuji také svým kolegům a přátelům z Farmaceutické i Lékařské fakulty Univerzity Karlovy, kteří mi pomáhali při tvorbě publikací a s řešením dílčích výzkumných úkolů.

Dále děkuji kolektivu Katedry biochemických věd, paní Aleně Pakostové a zejména kolegům z naší kanceláře za ochotu, všestrannou pomoc a příjemnou atmosféru v průběhu studia.

Děkuji grantovým agenturám za finanční podporu: GAUK 367911, GAČR 13-15008S, UNCE 204019/304019/2012, PRVOUK P40 a SVV 260 294.

V neposlední řadě pak velmi děkuji mé rodině a přátelům za podporu během celého studia.

ABSTRAKT

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD

Kandidát: Mgr. Hana Jansová

Vedoucí práce: Doc. PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D.

Název disertační práce:

STUDIUM MOŽNOSTÍ FARMAKOLOGICKÉ OCHRANY SRDEČNÍCH BUNĚK PŘED OXIDAČNÍM STRESEM A ANTRACYKLINOVÝMI CYTOSTATIKY

I když je rozvoj kardiovaskulárních onemocnění spojen s mnoha rizikovými faktory, předpokládá se, že v mnoha z nich hraje důležitou roli oxidační stres. K jeho vzniku může přispívat i produkce volných radikálů katalyzovaná volnými ionty železa, při které je tvořen velmi reaktivní a toxický hydroxylový radikál. Možnou strategií bránící propagaci oxidačního stresu může být chelatace volného železa. Použití klasických chelátorů železa u patologických stavů bez přetížení organismu železem může být ale spojeno s rizikem toxicity v důsledku deplece železa. Z tohoto důvodu se tato práce zabývá nejen studiem kardioprotektivních vlastností chelátorů železa, ale také od nich odvozených prochelátorů. V této práci jsme se věnovali prochelátorům železa, které nemají téměř žádnou afinitu k iontům železa, dokud nejsou aktivovány v patologických podmínkách oxidačního stresu. Dlouhou dobu se předpokládalo, že oxidační stres je i hlavní příčinou antracyklinové kardiotoxicity, avšak nedávné studie se od této teorie odvrací. V druhé části této práce jsme se proto zaměřili na studium možností farmakologické protekce u antracyklinové kardiotoxicity pomocí katalytických inhibitorů topoisomerasy II a látek poskytujících oxid dusnatý a určení jejich vlivu na antiproliferační účinnost antracyklinů.

Studované chelátory železa byly účinné u oxidačního poškození kardiomyocytů, avšak byla u nich stanovena dávkově závislá toxicita způsobená deplecí železa. Nejvýhodnější poměr protektivního účinku a vlastní toxicity vykázal chelátor salicylaldehydisonikotinoylhydrazon (SIH). Z hodnocených prochelátorů železa pak byl nejvýhodnější prochelátor s boronylovou chránící skupinou odvozený od SIH, BSIH. Nebyla u něj pozorována téměř žádná vlastní toxicita ani v dlouhodobých experimentech a navíc významně bránil oxidačnímu poškození kardiomyocytů. Zjistili jsme, že BSIH je stabilní látkou, avšak po aktivaci na chelatačně účinný

SIH, dochází k rychlému rozkladu této molekuly. Hlavním rozkladným produktem je salicylaldehyd, který si zachovává významné chelatační a tím i protektivní vlastnosti. Prochelátor železa BSIH je tudíž velmi nadějnou látkou vhodnou pro další hodnocení.

V další části této práce jsme se snažili přispět k objasnění mechanismů vedoucích k rozvoji antracyklinové kardiotoxicity a studiu možností farmakologické kardioprotekce. Nebyly jednoznačně potvrzeny kardioprotektivní vlastnosti látek zvyšujících hladiny oxidu dusnatého - anorganických dusičnanů či dusitanů i molsidominu. Molsidomin působil ve vysokých koncentracích rozklad antracyklinů, naopak v nízkých koncentracích zesiloval jejich antiproliferační efekt. Dále jsme se pak zabývali kardioprotektivním účinkem katalytického inhibitoru topoisomerasy II, dexrazoxanu a zjistili jsme, že další katalytické inhibitory topoisomerasy II brání poškození izolovaných kardiomyocytů navozenému antracykliny a zároveň zesilují antiproliferační efekt antracyklinů. Naše výsledky proto potvrzují recentní teorii, že kardioprotektivní účinek dexrazoxanu je způsoben spíše inhibicí topoisomerasy II β v kardiomyocytech než chelatací železa.

ABSTRACT

CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE

FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ

DEPARTMENT OF BIOCHEMICAL SCIENCES

Candidate: Mgr. Hana Jansová

Supervisor: Doc. PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D.

Title of Doctoral Thesis:

**STUDY OF POTENTIAL PHARMACOLOGICAL PROTECTION OF CARDIAC CELLS
AGAINST OXIDATIVE STRESS AND ANTRACYCLINE ANTICANCER DRUGS**

Development of cardiovascular disorders is associated with various risk factors and oxidative stress plays an important role in many of them. Iron-catalysed production of highly toxic and reactive hydroxyl radicals may contribute to oxidative stress. Chelation of free iron seems to be a promising strategy to prevent the propagation of oxidative stress. However, the use of classic iron chelators in pathological conditions without iron overload is associated with the risk of toxicity due to the iron depletion. Hence, this study deals with cardioprotective properties of iron chelators as well as prochelators derived from them. We focused on prochelators with almost no affinity for iron ions until they are activated under disease-specific oxidative stress conditions. For a long time, it has been assumed that oxidative stress is also the main denominator in an anthracycline-induced cardiotoxicity. However, the previous studies suggested alternative mechanism(s). Therefore in the second part of this work, we focused on studying the possibilities of pharmacological protection of anthracycline cardiotoxicity using a catalytic inhibitors of topoisomerase II and compounds providing nitric oxide and the determination of their impact on the antiproliferative efficacy of anthracyclines.

The results of this study confirm that iron chelators are highly effective protective compounds against oxidative stress-induced cardiomyocyte damage, but they also show dose-dependent toxicity caused by iron depletion. Salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH) had the best ratio of protective effect and inherent toxicity. Prochelators of iron represent promising approach to prevent this common limitation of iron chelators. BSIH, the prochelator derived from SIH with boronyl protective group, showed the best properties. There was no inherent toxicity observed even in long-term experiments and moreover it has significantly prevented

oxidative damage in cardiomyocytes. We found that BSIH was stable compound, but after activation for effective chelator SIH, there was a rapid degradation of the molecule. However, the main decomposition product was salicylaldehyde with retained significant chelating ability and cardioprotective properties. Prochelator of iron BSIH is therefore a very promising compound suitable for further evaluations.

In the next part, we tried to contribute to the elucidation of mechanisms leading to anthracycline cardiotoxicity and to study the possibilities of pharmacological cardioprotection. We were unable to confirm the cardioprotective properties of compounds increasing nitric oxide levels; neither inorganic nitrates/nitrites, nor molsidomine. In high concentrations, molsidomine induced decomposition of anthracyclines. On the other hand, in low concentrations, it enhanced their antiproliferative effects. We also examined the cardioprotective effect of catalytic inhibitor of topoisomerase II, dexrazoxane, and we found that also other catalytic inhibitors of topoisomerase II prevented anthracycline-induced damage of isolated cardiomyocytes while they enhanced antiproliferative effects of anthracyclines. Our results therefore support the recent theory that the cardioprotective effect of dexrazoxane is rather due to inhibition of topoisomerase II β in cardiomyocytes than iron chelation.

OBSAH

1	ÚVOD	10
2	TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1	Železo	11
2.1.1	<i>Role železa v organismu</i>	11
2.1.2	<i>Metabolismus železa</i>	12
2.1.3	<i>Patofyziologie železa</i>	16
2.2	Reaktivní formy kyslíku a dusíku, oxidační a nitrační stres	19
2.2.1	<i>Reaktivní formy kyslíku a dusíku</i>	20
2.2.2	<i>Antioxidační mechanismy</i>	22
2.3	Chelatace železa v medicíně	27
2.3.1	<i>Využití chelátorů železa</i>	27
2.3.2	<i>Přehled chelátorů železa</i>	28
2.3.3	<i>Prochelátory železa</i>	33
2.4	Antracyklinová antibiotika	37
2.4.1	<i>Mechanismy protinádorového účinku</i>	38
2.4.2	<i>Antracyklinová kardiotoxicita</i>	40
2.4.3	<i>Možnosti kardioprotekce</i>	42
3	CÍLE PRÁCE	47
4	KOMENTÁŘE K PRACÍM	48
4.1	Porovnání protektivních vlastností vybraných chelátorů a od nich odvozených prochelátorů železa U modelového oxidačního poškození kardiomyocytů	49
4.2	Studium kardioprotektivních vlastností a toxicit chelátoru a prochelátoru železa SIH a BSIH a jejich rozkladných produktů	52
4.3	Studium aktivace prochelátoru železa BHAPI na chelatačně účinný HAPI a jejich protektivních vlastností u modelu katecholaminové kardiotoxicity <i>in vitro</i>	55

4.4	Katalytické inhibitory topoisomerasy II modulují rozdílně toxicitu antracyklinů v srdečních a nádorových buňkách	57
4.5	Ovlivnění antracyklinové kardiotoxicity nově syntetizovanými analogy dexrazoxanu	59
4.6	Protektivní účinek anorganických dusičnanů a dusitanů proti antracyklinové kardiotoxicitě.....	61
4.7	Studium vlivu molsidominu na kardiotoxické a antiproliferační účinky antracyklinů.....	63
5	SOUHRNNÁ DISKUSE	65
6	ZÁVĚRY.....	71
7	PODÍL PŘEDKLADATELKY NA PUBLIKACÍCH ZAHRNUTÝCH V DISERTAČNÍ PRÁCI	73
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	76
9	SEZNAM ZKRATEK	95
10	PŘEHLED PUBLIKACÍ ZAHRNUTÝCH V DISERTAČNÍ PRÁCI.....	99
11	PŘEHLED DALŠÍCH PUBLIKACÍ.....	101
12	PREZENTACE NA KONFERENCÍCH	102
13	PŘÍLOHY.....	104
13.1	Publikace I.....	104
13.2	Publikace II	128
13.3	Publikace III.....	142
13.4	Publikace IV	174
13.5	Publikace V	197
13.6	Publikace VI.....	219
13.7	Publikace VII.....	237
13.8	Publikace VIII	261

1 ÚVOD

Tato disertační práce byla vypracována jako součást širšího a dlouhodobého výzkumu realizovaného na pracovištích Farmaceutické a Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Zabývá se studiem kardioprotektivních vlastností klinicky užívaných i experimentálních chelátorů a prochelátorů železa (Fe) u patologických stavů spojených s oxidačním stresem. Druhá část je pak zaměřena na studium mechanismů antracyklinové kardiotoxicity a hledání nových možností farmakologické kardioprotekce.

Na Katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty probíhá v rámci výzkumné skupiny molekulární a buněčné toxikologie pod vedením doc. PharmDr. Tomáše Šimůnka, Ph.D. *in vitro* výzkum využití chelátorů Fe u oxidačního poškození kardiomyocytů. V rámci mezinárodní spolupráce s Duke University (NC, USA), jmenovitě prof. Katherine J. Franz, Ph.D., jsme se v rámci této práce věnovali novým prochelátorům Fe, které se aktivují na chelatačně účinné látky působením oxidačního stresu. Dalším nosným tématem naší výzkumné skupiny je *in vitro* výzkum antracyklinové kardiotoxicity a studium vlivu nových látek na kardiotoxicitu a antiproliferační aktivitu antracyklinů. Na Ústavu farmakologie Lékařské fakulty probíhá, nyní pod vedením doc. PharmDr. Martina Štěrby, Ph.D., komplementární výzkum možností farmakologické protekce antracyklinové kardiotoxicity na chronickém *in vivo* modelu antracyklinové kardiotoxicity. Nová potenciální kardioprotektiva jak z řad chelátorů Fe, tak i analogů dexrazoxanu, jsou syntetizována na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty pod vedením doc. PharmDr. Kateřiny Vávrové, Ph.D. a PharmDr. Jaroslava Roha, Ph.D. Bioanalytické hodnocení a výzkum farmakokinetických parametrů studovaných látek probíhá na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv pod vedením doc. PharmDr. Petry Kovaříkové, Ph.D.

Tato spolupráce mezi různými pracovišti nám zajišťuje komplexní přístup ve studiu možností farmakologické ochrany kardiomyocytů před oxidačním stresem a antracyklinovými cytostatiky. V roce 2012 se tato pracoviště, spolu s dalšími, stala součástí centra pro výzkum toxických a protektivních účinků léčiv na kardiovaskulární systém, které je jedním z univerzitních výzkumných center Univerzity Karlovy v Praze (UNCE 204019).

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 ŽELEZO

Železo (Fe) náleží do skupiny tzv. přechodných kovů, které mají ve valenční vrstvě elektronového obalu alespoň jeden nespárovaný elektron. Díky této vlastnosti je schopné snadno přijímat a poskytovat elektrony a účastnit se tak řady oxidačně-redukčních reakcí. Fe je důležitý biogenní prvek, který je nezbytný prakticky pro všechny živé organismy. Jeho nepostradatelnost spočívá právě ve schopnosti železnatých iontů přecházet v železité a naopak. To ho předurčuje k tomu, být součástí oxidačních a redukčních enzymů. V organismu existuje ale i Fe volné, které je schopno spontánně katalyzovat reakce, při kterých vznikají volné radikály (Halliwell, 2007; Reelfs et al., 2010).

2.1.1 Role železa v organismu

Fe je v lidském těle nejhojnějším přechodným prvkem, který je díky svému redoxnímu potenciálu a flexibilitě koordinačních vazeb důležitou složkou mnoha biochemických procesů v buňce a nepostradatelnou součástí funkčních skupin různých proteinů (Galey, 2001). Proteiny obsahující železo mohou být klasifikovány dle mnoha kritérií. V této práci jsou členěny dle koordinační chemie Fe.

2.1.1.1 Hemoproteiny

Jejich základní stavební složkou je hem, který vzniká začleněním Fe do protoporfyrinu IX enzymem ferrohelasou. Fe je v těchto proteinech vázáno ke čtyřem dusíkovým atomům porfyrinového kruhu a další jednou nebo dvěma vazbami k proteinu.

Hemoproteiny lze dle funkce rozdělit na přenašeče kyslíku, jejichž hlavními zástupci jsou hemoglobin a myoglobin. Další skupinou jsou aktivátory molekulárního kyslíku, kam patří cytochromoxidasa, peroxidasy, katalasy a početná skupina cytochromů P₄₅₀. Zde nalezneme řadu velmi významných enzymů nezbytných pro buněčné dýchání, antioxidační ochranu a metabolismus eobiotik a xenobiotik. Třetí skupinu hemoproteinů představují, v přírodě hojně zastoupené, cytochromy *a*, *b* a *c*, které slouží jako přenašeče elektronů (Crichton et al., 2001).

2.1.1.2 Fe-S proteiny

Fe je v těchto proteinech vázáno přímo na síru, tvoří tak tzv. Fe-S klastry, které jsou spojené s polypeptidovým řetězcem nejčastěji pomocí thiolových skupin cysteinu. Fe-S proteiny se vyskytují buď jako samostatné proteiny, anebo jsou součástí enzymových komplexů (Beinert et al., 1997). Tyto proteiny mají různé životně důležité funkce, jako je elektronový transport, replikace DNA, kontrola genové exprese a další (Crack et al., 2012; Crack et al., 2014; Fontecave, 2006).

2.1.1.3 Další proteiny obsahující Fe

Jde o různorodou skupinu proteinů s rozličnými funkcemi. Patří sem například katechol a Rieskeho dioxygenasy, které se podílí na degradaci aromatických molekul; lipoxygenasy, které oxidují mastné kyseliny a vznikají tak leukotrieny a lipoxiny, které jsou cílem protizánětlivých látek. Dalšími zástupci jsou isopenicilin-*N*-synthasa a deacetoxycefalosporin-*C*-synthasa, kteří se účastní syntézy β -laktamových antibiotik. Dále sem náleží enzymy důležité pro posttranslační modifikaci aminokyselin (např. prolylhydroxylasa) a enzym nezbytný pro syntézu DNA, RNA a bílkovin (ribonukleotidreduktasa). Důležitými proteiny zajišťujícími transport a skladování železa jsou transferriny, ferritiny. (Crichton et al., 2001).

2.1.2 Metabolismus železa

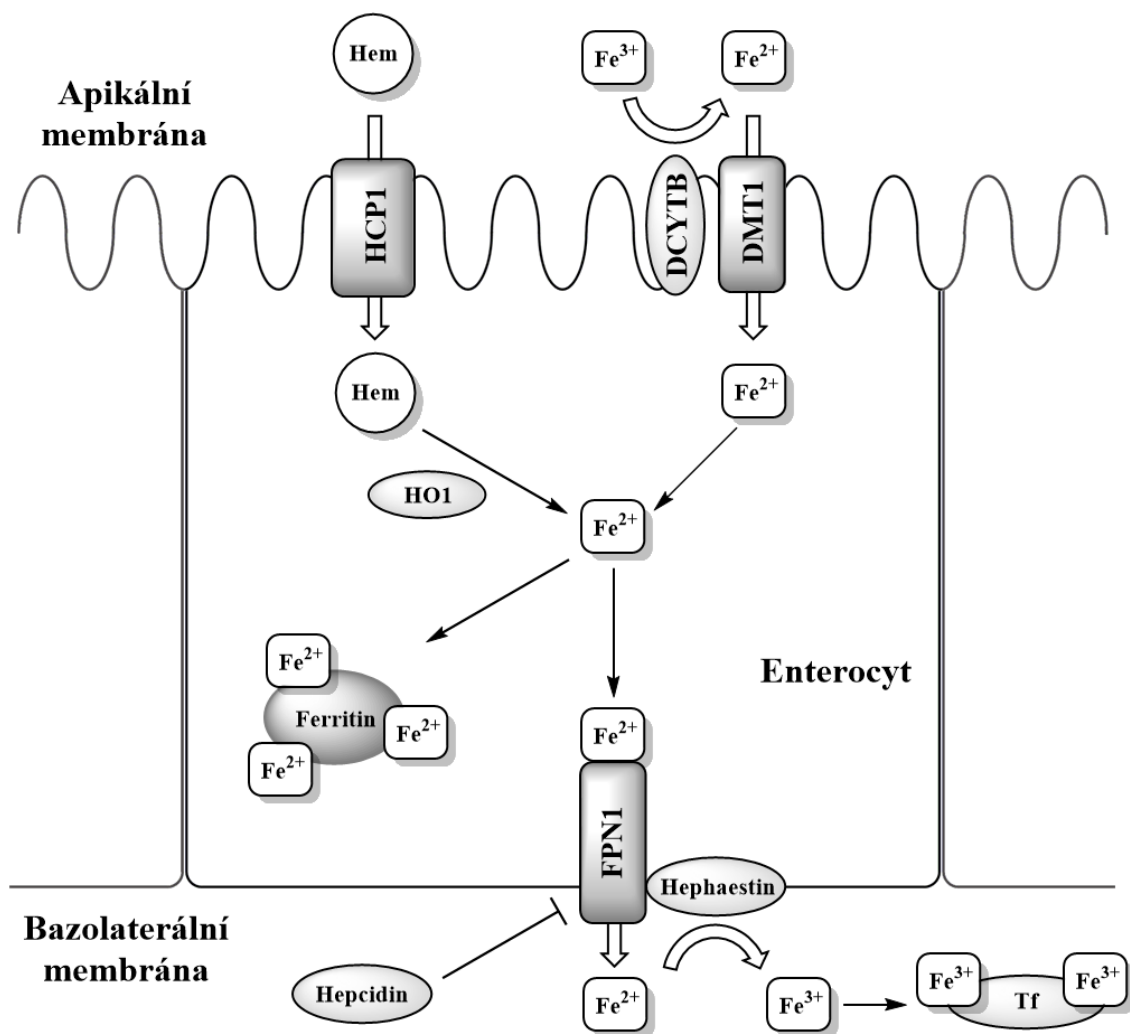
Lidské tělo obsahuje přibližně 45 mg Fe/kg, přičemž je tato hodnota vyšší u mužů než u žen. Zhruba 70 % tohoto množství je součástí molekul transportujících kyslík, hemoglobinu v červených krvinkách, myoglobinu ve svalech a dalších enzymů obsahujících Fe. Zbytek Fe se nachází ve formě zásobního Fe vázaného na ferritin a je zde také velmi malé množství Fe volného (50 – 100 μ M) (Epsztejn et al., 1999; Goldenberg, 1997). Lidský organismus disponuje omezenými možnostmi eliminace přebytečného Fe, denně se vyloučí pouze 1-2 mg Fe deskvamací buněk střevní sliznice, kůže, buněk močových cest a potem. Ženy ztrácejí více Fe během menstruačního cyklu. Z důvodu malého vylučování Fe je organismus vybaven řadou specifických mechanismů, které regulují jeho příjem, transport a skladování, a zabezpečují tak jeho homeostázu (Dunn et al., 2007; Hentze et al., 2010).

2.1.2.1 Vstřebávání Fe

Fe je přijímáno potravou a vstřebáváno převážně v duodenu. Do těla prochází přes apikální část enterocytů a to buď jako Fe hemové nebo nehemové. Hemové Fe je přenášeno převážně endocytózou přenašeče pro hem (heme carrier protein 1; HCP1) (Raffin et al., 1974). V enterocytu je pak z něho uvolněno enzymem hemoxygenasou 1 (HO1) ve formě Fe^{2+} do tzv. rezervoáru volného Fe (labile iron pool; LIP). LIP slouží jako zdroj rychle použitelného Fe, kde je Fe nespecificky vázáno na nízkomolekulární látky (např. aminokyseliny, nukleotidy, karboxyláty a další) (Kakhlon and Cabantchik, 2002). Nehemové Fe existuje jak ve formě Fe^{2+} tak i v Fe^{3+} iontů. Fe^{3+} ionty jsou nejprve na apikální membráně enterocytů redukovány na Fe^{2+} pomocí duodenálního cytochromu B (duodenal cytochrome B; DCYTB) (McKie et al., 2001). Z dalších výzkumů vyplývá, že DCYTB není esenciální enzym pro redukcí Fe, ale že se zde nachází více feroreduktas (McKie, 2008). Předpokládá se i možnost neenzymatické redukce Fe endogenními nebo vylučovanými látkami (Pollack et al., 1963) jako je například askorbát (Lane and Lawen, 2008) nebo superoxid (Ghio et al., 2003). Fe^{2+} ionty jsou pak transportovány do enterocytu převážně pomocí přenašeče pro dvojmocné ionty (divalent metal transporter 1; DMT1) (Mims and Prchal, 2005). Vyskytují se zde ovšem i alternativní přenašeče jako je např. ZIP14 (Liuzzi et al., 2006).

Fe^{2+} ionty jsou v enterocytech buď uskladněny, nebo jsou exportovány přes bazolaterální membránu do mezibuněčného prostoru ferroportinem 1 (FPN1) (Donovan et al., 2005). Zde jsou Fe^{2+} ionty oxidovány hephaestinem nebo ceruloplasminem na ionty Fe^{3+} (Vulpe et al., 1999), které se reverzibilně avšak s vysokou afinitou vážou na transportní protein transferrin (Tf), který zajišťuje distribuci Fe v organismu (Dunn et al., 2007). Vstřebávání Fe je znázorněné na Obr. 1.

Ačkoliv je příjem Fe potravou nezbytný, pro organismus je mnohem významnější jeho recyklace ze starých erytrocytů fagocytovaných makrofágy ve slezině. Fe je v makrofágu uvolněno z hemové struktury, exportováno z buňky, oxidováno a navázáno na Tf podobně jako je tomu u enterocytů.



Obr. 1 Vstřebávání hemového a nehemového Fe enterocyty. Převzato a upraveno dle (Gulec et al., 2014; Mackenzie and Garrick, 2005).

2.1.2.2 Transport, distribuce a využití Fe

Fe je cirkulací přiváděno k cílovým buňkám pomocí plasmatického transportního proteinu Tf. Tento glykoprotein je schopný vázat dva Fe³⁺ ionty a optimálně je jimi saturován z 30 % (Hentze et al., 2010). Fe je do buněk přijímáno tzv. receptorem zprostředkovanou endocytózou, kdy se dvě molekuly Tf váží na transferrinový receptor 1 nebo 2 (TfR1, TfR2) a tento komplex je pak do buněk přijímán ve formě endozómu. V něm pak, v důsledku snížení pH vyvolaném ATP-dependentní protonovou pumpou, dochází k uvolnění Fe³⁺ iontů z Tf. Tf a TfR jsou recyklovány a endozómem transportovány k povrchu buňky, kde je Tf uvolněn a TfR je připraven pro navázání

dalších komplexů Tf-Fe³⁺. V endozómu jsou Fe³⁺ ionty redukovány na Fe²⁺ a následně jsou uvolněny do LIP pomocí DMT1 (Dautry-Varsat et al., 1983; Zhang et al., 2006).

Toto Fe je dále buď skladováno v skladovacích proteinech, jako je ferritin, který se skládá z lehkých a těžkých podjednotek, má ferroxidasovou aktivitu a je schopný vázat až 4,5 tisíce Fe³⁺ iontů (Lane and Richardson, 2014), nebo je Fe rovnou využito pro syntézu enzymů. Syntéza enzymů obsahujících Fe může probíhat přímo v cytoplasmě, ale většina je produkována mitochondriemi, neboť jsou centrem syntézy hemu a Fe-S klastrů. Fe je do mitochondrií transportováno prostřednictvím mitoferrinu (Shaw et al., 2006). Fe, které nebylo využito při syntéze Fe-proteinů, je ukládáno do mitochondriálního ferritinu, aby se zabránilo nadměrnému vzniku reaktivních forem kyslíku (ROS) (Richardson et al., 2010).

2.1.2.3 Regulace metabolismu Fe

Buněčná homeostáza Fe je řízena především posttranskripčními mechanismy, které kontrolují syntézu klíčových proteinů podílejících se na příjmu, skladování a uvolňování Fe v závislosti na množství nitrobuněčného Fe. Syntéza těchto proteinů je řízena proteiny regulujícími Fe (iron regulatory protein; IRP), které se váží na odpovídající vazebná místa na mRNA (iron responsive elements; IRE) (Muckenthaler et al., 2008). Existují dva typy IRP, které fungují odlišně. Při nízké hladině nitrobuněčného Fe dochází ke změně konformace IRP1 a k změně hladin IRP2 a tím ke zvýšené vaznosti k IRE. Navázáním IRP na mRNA pro lehké i těžké podjednotky ferritinu a na mRNA pro FPN1, které mají pouze jeden IRE na 5' nepřekládaném konci, dochází k zabránění nasednutí malé podjednotky ribozomu a tím k zablokování translace daných proteinů. mRNA pro TfR1 má na svém 3' nepřekládaném konci více IRE a navázání IRP chrání tuto mRNA před degradací a zvyšuje tak její translaci. Tyto kombinované mechanismy způsobují snížení skladovací kapacity (snížená syntéza ferritinu) a zvýšení příjmu Fe do buněk (zvýšená exprese TfR1). (Hentze and Kuhn, 1996; Zhang et al., 2014) Při zvýšené hladině nitrobuněčného Fe je výsledný efekt opačný. V případě IRP1 dochází ke vzniku reverzibilního komplexu s 4Fe-4S klastrem, čímž IRP1 ztrácí vazebnou schopnost a dále funguje jako enzym akonitasa v citrátovém cyklu (Rouault, 2006). IRP2 je pak degradován ubikvitin-proteazomovým systémem (Vashisht et al., 2009).

Hlavním proteinem podílejícím se na systémové regulaci metabolismu Fe je hepcidin. Tento protein je syntetizovaný v hepatocytech, má protizánětlivé vlastnosti a v plasmě je vázán na α_2 -makroglobulin (Peslova et al., 2009). Hecpidin se váže na FPN1, který se nachází převážně na bazolaterální membráně enterocytů a na makrofázích, vyvolává jeho internalizaci a degradaci v lysozomech (McKie et al., 2000). Takto se sníží příjem Fe ze střeva a zároveň i jeho vyloučení z makrofágů. Exprese hepcidinu je regulována hladinou Fe v krvi, zásobami Fe v játrech, erythropoetickou aktivitou, hypoxií a zánětlivými stavy (Fleming, 2008; Hentze et al., 2010).

2.1.3 Patofyziologie železa

Narušení homeostázy Fe, jeho nedostatek i nadbytek, vede k patologickým stavům, které jsou pro organismus velmi nebezpečné. Tyto stavy mohou být způsobeny jak genetickými poruchami, tak i vnějšími faktory.

2.1.3.1 Nedostatek Fe

Nedostatek Fe, označován také jako sideropenie, bývá nejčastěji způsoben jeho nedostatečným vstřebáváním enterocyty, chronickými ztrátami krve nebo nadměrnými nároky na Fe (např. v těhotenství). Pozdním příznakem nedostatku Fe pak bývá sideropenická anémie, při které dochází ke zpomalení vyzrání erythroblastů, snížení obsahu hemoglobinu a tím i tkáňové hypoxii (Pecka, 2006).

2.1.3.2 Nadbytek Fe

Systémové přetížení Fe

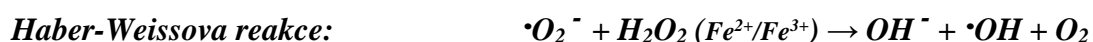
Zvýšené vstřebávání Fe z potravy bohaté na Fe soli nebo jeho nadměrný příjem při opakovaných transfuzích způsobuje postupný nárůst zásob Fe v organismu. To se pak ukládá v tkáních, a to zejména v játrech, srdečním svalu, kloubech a endokrinních žlázách. Toto Fe může katalyzovat chemické reakce, vedoucí k tvorbě ROS, které svojí toxicitou způsobují porušení buněčných membrán, nukleových kyselin a enzymatických systémů, následně poškození buňky a v konečném důsledku vedou k poruše postižených orgánů (Pecka, 2006; Powell et al., 1996). Choroby, které jsou nejčastěji příčinou

systemového přetížení organismu Fe, se nazývají hemochromatózy, nebo také hemosiderózy.

Rozlišujeme primární a sekundární hemochromatózy. Primární hemochromatóza je způsobena mutací genu *HFE* na 6. chromozomu. Produkt syntetizovaný tímto genem, tzv. HFE protein, se podílí na regulaci hladiny Fe v nízkomolekulární formě, zejména v časném erytrocytu. Soutěží s Tf o vazbu Fe, což vede k hromadění Fe v erytrocytu (Ganz, 2003). Sekundární hemochromatózy vznikají např. opakovaným podáváním transfuzí u anémií s neefektivní erythropoézou (např. u talasemií). Dochází k orgánovému přetížení Fe a následně k orgánovému poškození (Pecka, 2006).

Fe a oxidační stres

Vysoké hladiny volného Fe, třeba jen lokální bez systemového přetížení, mohou vést k oxidačnímu poškození různých citlivých tkání, jako jsou mozek, srdce a další (Galey, 2001; Valko et al., 2005). Poškození organismu volnými radikály v přítomnosti Fe je zprostředkováno Haber-Weissovou reakcí. Tato reakce se skládá ze dvou kroků. Jednak z Fentonovy reakce, kde je peroxid vodíku (H_2O_2) přeměněn v přítomnosti Fe^{2+} na hydroxylový anion a hydroxylový radikál, který je nejreaktivnější a velmi toxická forma ROS. Druhým krokem je pak regenerace Fe^{3+} superoxidovým aniontem na Fe^{2+} (Halliwell, 2007).



Pokud nejsou vznikající ROS dostatečně odstraňovány pomocí antioxidantů a antioxidačních enzymů, dochází k poškození biogenních makromolekul (DNA, proteiny a lipidy) a tím pádem k rozvoji některých onemocnění, jako je např. rakovina, ateroskleróza, neurodegenerativní onemocnění a další (Halliwell, 2007; Valko et al., 2006). Vzniklé ROS mohou dále narušovat buněčnou homeostázu Fe. Mohou zvýšit jeho uvolňování ze zásobních proteinů a způsobit nárůst cytosolického volného Fe, což podporuje produkci dalších ROS (Mladenka et al., 2006; Reif, 1992).

Fe a srdce

Volné Fe je u stavů s přetížením Fe přijímáno, kromě již zmiňovaného transportu pomocí TfR, také prostřednictvím vápenatých kanálů (L-tyt). Tento nadměrný příjem volného Fe do kardiomyocytů vede k destabilizaci lyzozomální, mitochondriální i sarkoplazmatické membrány, čímž dochází v myocytu k oxidačnímu stresu. Tyto změny způsobují buněčnou smrt myocytů, což může vést až k srdečnímu selhání (Berdoukas et al., 2015; Horwitz and Rosenthal, 1999; Chattipakorn et al., 2011).

2.2 REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU A DUSÍKU, OXIDAČNÍ A NITRAČNÍ STRES

Oxidační stres bývá nejčastěji definován jako porucha rovnováhy mezi produkcí ROS a RNS (reaktivní formy dusíku) a antioxidační kapacitou organismu (Sies, 1997). RONS (reaktivní formy kyslíku a dusíku) mají v živých organismech dvojí roli. Jednak slouží jako významné signální a regulační molekuly a svými toxickými účinky jsou schopné inaktivovat, zničit a nitrobuněčně usmrtit fagocytované mikroorganismy (McCord, 2000). Na druhou stranu, pokud jsou produkovány v nadměrném množství, jsou vysoce toxické a poškozují organismu vlastní makromolekuly (Poli et al., 2004). Mírný oxidační stres je organismus schopný tolerovat pomocí adaptačních mechanismů, např. syntézou proteinů teplotního šoku nebo zvýšenou tvorbou antioxidačních enzymů (Štípek, 2000). Při silném oxidačním stresu dochází k peroxidaci lipidů, poškození proteinů a nukleových kyselin (Poli et al., 2004) a k následné apoptóze či nekróze postižených buněk (Tab. 1)

Tab. 1 Poškození důležitých biomolekul (Štípek, 2000).

Cíl	Poškození	Následky
Nenasycené mastné kyseliny v lipidech	Ztráta dvojných vazeb Vznik reaktivních metabolitů (peroxydy, aldehydy)	Změněná fluidita lipidů Změny v propustnosti membrán Vliv na membránově vázané enzymy Tvorba chemoatraktantů pro makrofágy
Proteiny	Agregace a síťování Fragmentace a štěpení Modifikace thiolových skupin a benzenových jader aminokyselin Reakce s hemovým Fe	Změny v transportu iontů Vstup Ca ²⁺ do cytosolu Změny v aktivitě enzymů
DNA	Štěpení kruhu deoxyribózy Modifikace a poškození bází Zlomy řetězce Křížové vazby řetězců	Mutace Translační chyby Inhibice proteosyntézy

2.2.1 Reaktivní formy kyslíku a dusíku

RONS jsou molekuly nebo jejich části, které obsahují jeden nebo více nepárových elektronů. Kvůli nepárovému elektronu jsou velmi reaktivní, neboť se snaží přijmout či odevzdat elektron k dosažení stabilní elektronové konfigurace (Valko et al., 2006).

RONS mohou být produkovány jak z exogenních, tak častěji endogenních zdrojů. Důležitým zdrojem RONS jsou mitochondrie, peroxizomy, neutrofilny, eozinofily a makrofágy. Vznikají také při metabolismu cytochromů P450 a xantinoxidasy (Conner and Grisham, 1996; Inoue et al., 2003; Li and Jackson, 2002; Valko et al., 2006). Schéma jejich vzniku je znázorněno na Obr. 2.

Singletový kyslík $^1\text{O}_2$

Jedná se o molekulový kyslík s dvěma nespárovanými elektrony avšak se souhlasným spinem. Je excitovanou a reaktivnější formou O_2 (Halliwell, 2007). S biomolekulami reaguje přenesením excitované energie, čímž se sám vrací do základního stavu.

Superoxidový anion – radikál $\text{O}_2^{\cdot-}$

$\text{O}_2^{\cdot-}$ je významným zástupcem ROS, který vzniká buď neenzymatickou redukcí O_2 , nebo při reakcích xantinoxidasy, cytochromů P450 nebo dalších oxidas. Jeho nejvýznamnějším zdrojem jsou ovšem mitochondrie, kde vzniká během tvorby ATP v dýchacím řetězci (Valko et al., 2007). Vykazuje jak redukční tak i oxidační schopnosti. Ačkoliv je v porovnání s jinými ROS méně reaktivní, může navozovat poškození biomolekul nejčastěji reakcemi s jinými radikály a je také prekurzorem dalších ROS, jako je např. peroxynitrit nebo hydroxylový radikál (Štípek, 2000).

Hydroxylový radikál $\cdot\text{OH}$

Je to nejreaktivnější volný radikál a extrémně silné oxidační činidlo, které okamžitě reaguje s molekulami v místě svého vzniku nebo v bezprostřední blízkosti. V organismu je tvořen během Haber-Weissovy reakce (viz. kapitola 2.1.3.2.). Vzniká také homolytickým štěpením vazby O-O v H_2O_2 po ozáření UV světlem nebo ionizačním zářením (Štípek, 2000). Fyziologicky se v organismu uplatňuje v obranyschopnosti jako baktericidní nástroj neutrofilů (Halliwell, 2007).

Peroxid vodíku H₂O₂

H₂O₂ není radikálem v pravém smyslu slova, avšak je mezi ROS řazen, neboť se účastní jejich vzniku. Je to slabé oxidační činidlo, které je relativně málo reaktivní. Organismem je proto tvořen při enzymatickém odstraňování reaktivnějších radikálů (např. superoxiddismutasou (SOD)). Ačkoliv sám o sobě není příliš reaktivní, v přítomnosti přechodných kovů se rychle redukuje za vzniku vysoce toxického ·OH (viz. kapitola 2.1.3.2.) (Halliwell, 2007).

Peroxylové a alkoxylové radikály ROO· a RO·

Jsou to silná oxidační činidla, která se v organismu rychle přeměňují na jiné typy radikálů odnímáním H· z jiných biomolekul. Jejich vznik iniciuje ·OH, který reaguje s mastnými kyselinami fosfolipidů, čímž narušuje integritu buněčné membrány (lipidová peroxidace, lipoperoxidace) (Aruoma, 1994).

Kyselina chlorná HClO

HClO je tvořena neutrofily z H₂O₂ pomocí myeloperoxydasy (MPO) v přítomnosti halogenidových kofaktorů. Je to silný oxidant a vysoce účinná mikrobicidní látka, která může dále reagovat s O₂^{·-} za vzniku ·OH (Babior, 2000; Štípek, 2000).

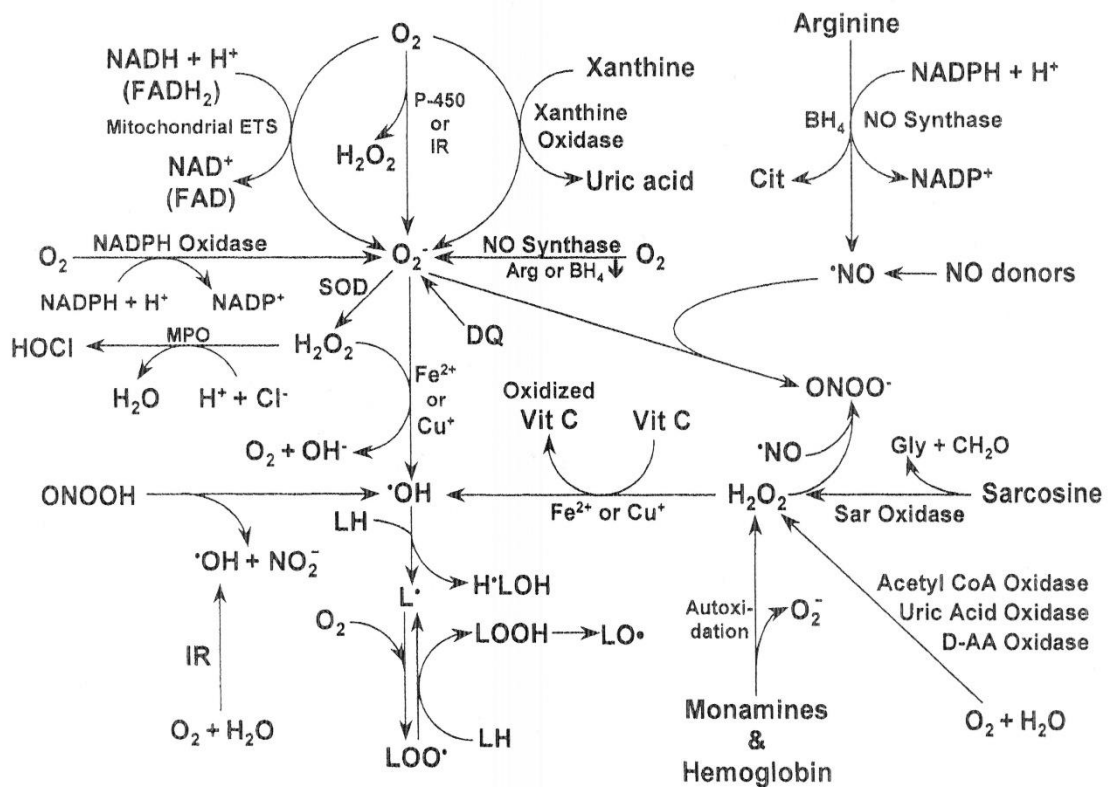
Oxid dusnatý NO·

Je to velmi důležitá molekula s mnoha fyziologickými funkcemi. Jeho tvorbu v organismu katalyzují NO syntasy (NOS). Na základě regulačních vlastností a lokalizace byly identifikovány tři isoformy (EC 1.14.13.39). Neuronální NOS (nNOS) se nachází v cytoplazmě neuronů a buněk plicního epitelu, endotelová (eNOS) pak v endoteliálních buňkách, některých neuronech a myocytech. Tyto isoformy jsou konstitutivně exprimovány v organismu a jsou stálým zdrojem malého množství NO, který funguje jako neurotransmitter, udržuje cévní homeostázu a tkáňovou perfuzi (Broholm et al., 2001; Govers and Rabelink, 2001). Reguluje cévní relaxaci, proliferaci buněk hladké svaloviny cév, agregaci trombocytů, hemodynamiku, angiogenezi (Ignarro et al., 1999) a může přímo reagovat s alkoxylovými a peroxylovými radikály, čímž může ukončovat řetězovou reakci lipidové peroxidace (Rubbo et al., 2000). Třetí isoformou je indukibilní NOS (iNOS), která se nachází v cytosolu nebo je vázaná na membrány fagocytů a je důležitým zdrojem NO v zánětlivých procesech (Stuehr et al., 1991). NO je jednou z

důležitých efektorových molekul imunitního systému v ochraně proti patogenům a nádorovým buňkám (Albina and Reichner, 1998; Yim et al., 1993).

Peroxynitrit ONOO^-

Peroxynitrit je silné oxidační činidlo, které vzniká reakcí $\text{NO}\cdot$ s $\text{O}_2^{\cdot-}$. Způsobuje poškození řady biomolekul a to nitrací a oxidací aminokyselin, lipidů a bázi DNA, čímž může docházet až ke zlomům v DNA a inaktivaci enzymů (Beckman and Koppenol, 1996; Štípek, 2000). Účastní se patogeneze mnoha nemocí jako např. ischemicko-reperfučního poškození (Radi et al., 2001). Byly prokázány i jeho baktericidní vlastnosti (Pacelli et al., 1995).



Obr. 2 Tvorba RONS a dalších reaktivních metabolitů (Fang et al., 2002).

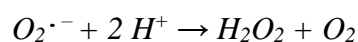
2.2.2 Antioxidační mechanismy

Jako ochranu před negativním působením RONS využívá organismus tři mechanismů. Nejbezpečnějším je zabránění jejich nadměrné tvorbě buď inhibicí enzymů

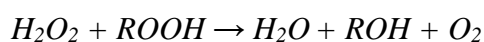
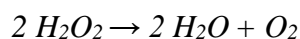
katalyzujících jejich vznik (např. iNOS) nebo vazbou iontů přechodných kovů (např. transferrin a ferritin). Další možností je vychytávání a odstraňování již vzniklých RONS. Jedná se o enzymatické či neenzymatické látky, díky kterým reakcí s RONS vznikají stálejší a tudíž i méně toxické produkty. Třetím mechanismem je pak oprava poškozených biomolekul nebo jejich eliminace (Halliwell, 2007; Štípek, 2000). Vztahy mezi jednotlivými antioxidanty jsou podrobněji znázorněny na Obr. 3.

2.2.2.1 Enzymové antioxidační systémy

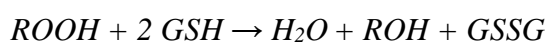
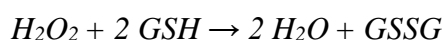
Superoxiddismutasy (EC 1.15.1.1; **SOD**) se nachází v každé buňce a jsou důležitými enzymy chránícími organismus před působením ROS, neboť katalyzují dismutaci reaktivního $O_2^{\cdot-}$ na méně reaktivní H_2O_2 a O_2 .



Katalasa (EC 1.11.1.6; **KAT**) je hemový enzym, který je důležitý pro inaktivaci H_2O_2 jeho dismutací. Také je schopna detoxikovat alkylperoxyd.



Podobné funkce má i **glutathionperoxidasa** (EC 1.11.1.9; **GPx**), která je také schopná detoxikovat H_2O_2 a některé typy intracelulárních hydroperoxidů za současné oxidace glutathionu (GSH) na jeho oxidovanou formu GSSG. Ta je pak zpětně redukována pomocí NADPH dependentní glutathionreduktasy (Fang et al., 2002; Štípek, 2000).



2.2.2.2 Neenzymové antioxidanty

Do skupiny vysokomolekulárních endogenních antioxidantů patří řada proteinů, které jsou schopné vázat přechodné prvky a bránit tak katalyzování radikálových reakcí. Jedná se o transportní a skladovací proteiny (transferrin, laktoferrin, ceruloplasmin, ferritin, hemosiderin, hemopexin a haptoglobin). Reaktivitu volných radikálů též

ovlivňují proteiny s vysokým obsahem thiolových skupin, jako jsou metalothioneiny a albumin (Attieh et al., 1999; Aust, 1995; Štípek, 2000).

Do skupiny nízkomolekulárních antioxidantů patří například kyselina askorbová, α -tokoferol, ubichinol, GSH, kyselina močová, bilirubin, melatonin, flavonoidy, karotenoidy a chelatační látky (Štípek, 2000).

Kyselina askorbová (askorbát, vitamín C)

Je to kofaktor enzymů syntézy kolagenu a metabolismu dopaminu. Redukuje Fe^{3+} na Fe^{2+} a umožňuje tak snadnější vstřebávání Fe ze střeva. Antioxidační účinek vitamínu C je dán jeho schopností redukovat anorganické i organické radikály. Vitamín C působí jako jeden z antioxidantů potřebných k regeneraci vitamínů E z α -tokoferylového radikálu. Na druhou stranu může ale vystupovat jako prooxidant a katalyzovat tak Fentonovu reakci a stimulovat tak oxidační poškození tkáně (Cutler, 1984; Štípek, 2000).

α -tokoferol (vitamín E)

Vitamín E je lipofilní antioxidant, který inhibuje lipoperoxidaci biomembrán a lipoproteinových částic v plazmě. Přeměňuje alkylperoxylové radikály na hydroperoxydy, které jsou dále odbourávány pomocí GPx (Di Mascio et al., 1990; Štípek, 2000).

Ubichinon (koenzym Q₁₀)

Je významným přenašečem elektronů v dýchacím řetězci. Vyskytuje se však ve všech membránách, kde tlumí radikálové reakce a brání tak ve spolupráci s α -tokoferolem membránové fosfolipidy před peroxidací. Účastní se také regenerace vitamínu E (Štípek, 2000).

Glutathion (GSH/GSSG)

Tripeptid γ -glutamylcysteinylglycin je jedním z nejvýznamnějších antioxidantů v lidském organismu. Nachází se ve všech savčích buňkách v poměrně vysoké koncentraci (1-10 mM). Hraje velmi důležitou roli v odstraňování ROS, udržování sulfhydrylových skupin proteinů v redukované formě a v regeneraci askorbátu a α -tokoferolu (Štípek, 2000).

Kyselina močová (urát)

Kyselina močová je konečným produktem katabolismu purinů a je nejhojnějším antioxidantem plazmy. Je schopná vycytávat $\text{RO}\cdot$ a HClO a také chelatovat Fe a Cu a bránit tak radikálovým reakcím (Štípek, 2000).

Karotenoidy a vitamín A

Karotenoidy jsou izoprenové sloučeniny, které se uplatňují při odstraňování radikálů vázaných na uhlík a $\text{ROO}\cdot$ a také jsou schopné zhasět $^1\text{O}_2$. Významnými zástupci jsou lykopen, lutein, zeaxanthin a samozřejmě β -karoten, který je nezbytný pro syntézu retinálu a tím pádem i pro správnou funkci oka (Di Mascio et al., 1990; Štípek, 2000).

Bilirubin

Je to degradační metabolit hemu, který má kromě metabolického i antioxidantního význam. Jak volný, tak vázaný na albumin, je schopný inhibovat peroxidaci lipidů (Neuzil and Stocker, 1994) a také zhasět $^1\text{O}_2$ (Di Mascio et al., 1990).

Melatonin

Melatonin je hormon epifyzy, který řídí spánkový cyklus a jeho antioxidantní potenciál spočívá ve schopnosti vycytávat $\text{HO}\cdot$ (Reiter et al., 1997).

Kyselina α -lipoová

Tato kyselina je kofaktorem pyruvátdehydrogenasového komplexu. Je také univerzální antioxidant, který dokáže inaktivovat $\text{ROO}\cdot$, $\text{HO}\cdot$, $\text{NO}\cdot$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ a HClO a regenerovat askorbát a α -tokoferol (Maglione et al., 2015). Dále se ukazuje, že je nadějný i v léčbě diabetické neuropatie, díky svým antiglykačním účinkům (Cakici et al., 2016).

Flavonoidy

Flavonoidy jsou sekundární rostlinné metabolity, které jsou důležitou součástí lidské stravy. Podílí se na jednoelektronových redoxních reakcích za současného vzniku chinoidních struktur. Mohou být schopné vycytávat $\text{ROO}\cdot$, $\text{HO}\cdot$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 (Bors et al., 1997). K jejich antioxidantní aktivitě přispívá i fakt, že jsou schopné chelatovat Fe (Filipsky et al., 2013). Na druhou stranu ale mohou flavonoidy a/nebo jejich metabolity působit i prooxidačně (Prochazkova et al., 2011).

2.3 CHELATAČE ŽELEZA V MEDICÍNĚ

Chelátory Fe jsou různorodé látky, které tvoří koordinační (donor-akceptorovou) vazbu s ionty Fe a činí je tak méně reaktivní. Vzniklý komplex bývá rozpustný ve vodě, což mu umožňuje vstupovat do krevního řečiště, ze kterého může být neškodně vyloučen.

2.3.1 Využití chelátorů železa

Nemoci z přetížení organismu Fe

Nemoci s přetížením Fe byly první indikací chelátorů Fe. U těchto onemocnění dochází k nadměrnému ukládání Fe, které způsobuje oxidační poškození tkání, hlavně srdce, jater, pankreatu, nervové tkáně a je zde také zvýšené riziko vzniku rakoviny (Jomova and Valko, 2011). K těmto onemocněním patří hereditární hemochromatóza, při které dochází k patologicky vysokému příjmu Fe (Fleming and Sly, 2002), dále sekundární hemochromatózy, které jsou často spojeny s poruchou krvevotvorby. U těchto nemocí bývá přetížení Fe způsobeno opakovanými transfúzemi krve (Kalinowski and Richardson, 2005). Náleží sem také Friedrichova ataxie, které je způsobena sníženou expresí mitochondriálního proteinu frataxinu, který je nezbytným kofaktorem mnoha enzymů, podílí se na tvorbě Fe-S klastrů a váže Fe, čímž brání Fentonově reakci a následnému oxidačnímu poškození tkání (Hadzhieva et al., 2014).

Nádorová onemocnění

Chelátory Fe ovlivňují hned několik signalizačních drah nádorových buněk. Přímo inhibují ribonukleotidreduktasu, která katalyzuje přeměnu ribonukleotidů na deoxyribonukleotidy (Nyholm et al., 1993). Touto inhibicí dále dochází k aktivaci tumor supresorového proteinu p53, který také blokuje buněčné dělení. Chelátory Fe dále mohou navozovat snížení aktivity cyklinů a cyklin dependentních kinas a zvýšenou expresi HIF-1 α (hypoxia inducible factor), který pokud je v buňce kumulován, vyvolává zástavu buněčného cyklu. Jelikož je Fe nezbytné také pro tvorbu hemu a Fe-S proteinů, jeho nedostatek ovlivňuje metabolismus mitochondrií a jejich správnou funkci. Tyto zásahy do buněčného cyklu vedou k zástavě proliferace mezi fázemi G₁ a S a následné apoptóze (Buss et al., 2003; Saletta et al., 2010).

Další onemocnění

V posledních letech se také studuje využití chelátorů Fe při prevenci oxidačního poškození kardiovaskulárního systému, zábranou nadměrné tvorby ROS např. během ischemicko-reperfúzního poškození (Chan et al., 2012; Neckar et al., 2012; Wood, 2008). Podrobnější přehled potenciálních kardioprotektivních vlastností vybraných chelátorů Fe je zahrnut v následujících kapitolách.

Dalším nadějným uplatněním se zdá být ochrana kůže před UV zářením, které způsobuje mnoha mechanismy nadměrnou tvorbu RONS. Jedním z těchto mechanismů je aktivace HO1, čímž dochází k nadměrnému uvolňování Fe a k zvýšenému riziku Fentonovy reakce (Reelfs et al., 2010). Možným terapeutickým využitím se zdá být také terapie AIDS (van Asbeck et al., 2001) a neurodegenerativních onemocnění, jako je např. Alzheimerova, Parkinsonova choroba a roztroušená skleróza (Kwiatkowski et al., 2012; Salkovic-Petrisic et al., 2015; Ward et al., 2015).

2.3.2 Přehled chelátorů železa

Chelátory Fe jsou chemicky různorodé látky, které jsou schopné vázat Fe. Ideální chelátor by měl mít vysokou afinitu a selektivitu k iontům Fe a tvořit s nimi stabilní komplexy s nízkou redoxní aktivitou. Dále by měl vykazovat nízkou toxicitu, mít dobrou biologickou dostupnost, metabolismus a prostupnost biologickými membránami. Výhodou je i možnost perorálního podání u lipofilních látek (Galey, 2001; Jomova and Valko, 2011). Další charakteristikou chelátorů je počet vazných míst k atomu Fe. Atom Fe může poskytovat šest koordinačních vazeb, proto chelátory v šesti vazebnými místy nazýváme hexadentální, se třemi tridentální a dvěma vazebnými místy bidentální (Liu et al., 2002).

V klinické praxi se kromě nespecifického chelátoru ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA) používají tři chelátory Fe (desferrioxamin, deferipron a deferasirox). Podrobněji budou tyto chelátory probrány v následujícím přehledu.

2.3.2.1 Přírodní chelátory a jejich analogy

Siderofory jsou nízkomolekulární látky produkované mikroorganismy k příjmu Fe z okolí. Jedná se o chemicky pestrou skupinu látek. Dle struktury je lze dělit na

hydroxamáty, katecholáty, karboxyláty, heterocyklické a smíšené struktury (Neilands, 1995).

Desferrioxamin (deferoxamin; DFO)

DFO je siderofor izolovaný v roce 1958 ze *Streptomyces pilosus*, který byl po klinických studiích v roce 1968 schválen FDA (Food and Drug Administration) pro terapii nemocí s přetížením Fe. Tento hexadentální chelátor je stále používán v klinické praxi pro léčbu hemochromatóz a akutní otravy Fe. Jeho nevýhodou je ale krátký biologický poločas a nízká lipofilita, kvůli čemuž musí být podáván v opakovaných subkutánních infuzích, které nejsou pro pacienta pohodlné. Také díky vyšší molekulové hmotnosti neproniká do buněk a Fe váže pouze v krevním řečišti (Buss et al., 2003; Galey, 2001; Kwiatkowski, 2011). Odstraňováním nadbytečného Fe, chrání různé tkáně (včetně srdce) před oxidačním poškozením a navíc je sám schopen reagovat s některými ROS (Halliwell, 2007).

Desferri-exocheliny

Jedná se o skupinu sideroforů produkovaných bakterií *Mycobacterium tuberculosis*. Jsou to hexadentální a lipofilní chelátory Fe, které jsou netoxické, snadno vstupují do buněk a chrání je před oxidačním poškozením (Hodges et al., 2006; Horwitz et al., 1998).

Kurkumin

Kurkumin se získává z oddenků rostlin rodu kurkuma, zejména z kurkumy dlouhé (*Curcuma longa*). Je to polyfenolická látka, která se běžně používá v potravinářství jako koření a jako barvivo (kurkumová žluť; E100). Tato látka je schopná chelatovat ionty Fe a má antioxidační, protizánětlivé a protinádorové účinky. Ovlivňuje signální dráhy NF- κ B (nuclear factor κ B), iNOS a HIF-1 a je schopná aktivovat některé antioxidační systémy. V současné době probíhají klinické studie, které zkoumají chemoterapeutické a chemopreventivní vlastnosti kurkuminu (Badria et al., 2015; Balogun et al., 2003; Calabrese et al., 2008; Hatcher et al., 2008; Jiao et al., 2009).

Silybin

Silybin je flavolignan, který je hlavní účinnou složkou standardizovaného extraktu ze semen ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*). Bylo prokázáno, že je schopný tvořit komplexy s Fe³⁺ (Borsari et al., 2001) a může mít hepatoprotektivní vlastnosti jak

Deferasirox (ICL670A)

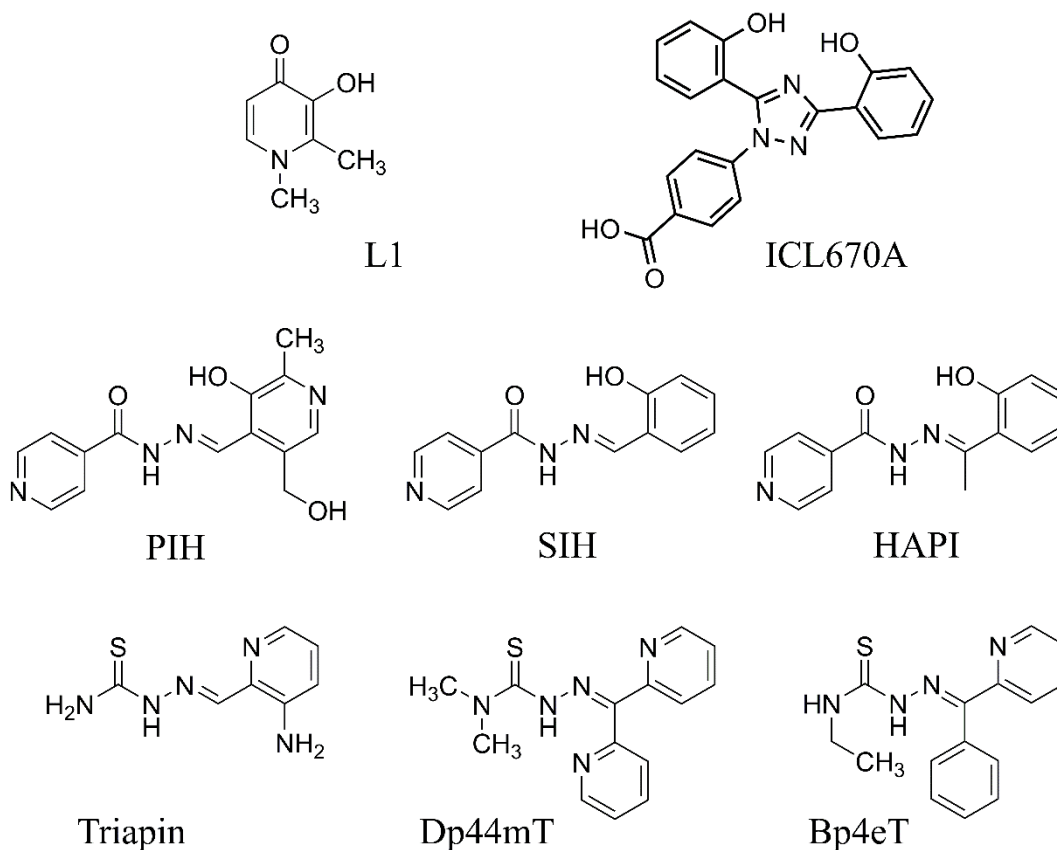
ICL670A je triazolový derivát, který je schopný vázat jak Fe^{2+} , tak i Fe^{3+} . Je lipofilní, tridentální a orálně dostupný. V klinické praxi se používá především k léčbě chronického přetížení Fe. Stejně jako L1, je díky svým vlastnostem schopný vázat Fe nejen v krvi, ale i v buňkách. Bylo prokázáno, že ICL670A je schopný snižovat zásoby Fe v játrech a sérovém ferritinu (Cappellini et al., 2006) a že stabilizuje hladiny Fe v srdeční tkáni (Wood et al., 2010). Nedávné studie ukázaly, že je schopný snižovat poškození srdečních buněk navozené oxidačním stresem (Al-Rousan et al., 2009; Hasinoff et al., 2003; Haskova et al., 2011) a že má i antiproliferační účinky (Lui et al., 2013). Avšak i při jeho užívání byly zaznamenány vedlejší účinky, jako je jaterní a ledvinové selhání, anebo krvácení do gastrointestinálního traktu (Hoffbrand et al., 2012). Opět bylo potvrzeno jeho výhodné podávání v kombinaci s DFO (Tanner et al., 2007).

Aroylhydrazony

Aroylhydrazony jsou lipofilní, tridentální chelátory Fe, které jsou odvozeny od pyridoxalisonikotinoylhydrazonu (**PIH**). Tento chelátor byl připravený již v roce 1954, nicméně jeho chelatační vlastnosti byly objeveny až o dvě desetiletí později v pražské laboratoři profesora Poňky (Ponka et al., 1979). Ač se jednalo o látku s dobrými chelatačními schopnostmi a možností perorálního podání, nebyl nikdy uveden do klinické praxe. Bylo však od něj odvozeno několik sérií derivátů (Richardson et al., 2009). Příkladem je 2-hydroxy-1-naftylaldehydisonikotinoylhydrazon, také známý jako **311**, který je součástí série 300 a vyznačuje se vysokou lipofilitou a antiproliferační aktivitou (Richardson et al., 1995). Významným zástupcem této skupiny je také salicylaldehydisonikotinoylhydrazon (**SIH**), u kterého byla prokázána nejenom antiproliferační, ale také antioxidační účinnost. Díky svým výhodným vlastnostem je schopný chránit kardiomyocyty morčat, izolované potkaní kardiomyocyty a H9c2 kardiomyoblasty proti oxidačnímu poškození způsobeném H_2O_2 (Horackova et al., 2000; Kurz et al., 2006; Lukinova et al., 2009), *tert*-bytylhydroperoxidem (Bendova et al., 2010) a katecholaminy (Hašková et al., 2011). SIH vykazuje také vlastnosti radioprotektivní (Berndt et al., 2010). Nevýhodou této látky je ovšem nízká stabilita hydrazonové vazby (Kovaríková et al., 2008). Substitucí aldiminového vodíku byla připravena řada analogů SIH se zvýšenou stabilitou (např. **HAPI**) (Hruskova et al., 2011). Touto problematikou se podrobněji zabývají další části této práce.

Thiosemikarbazony

Thiosemikarbazony jsou tridentální, lipofilní chelátory Fe i jiných kovů. Fe je zde vázáno přes síru a dva atomy dusíku. Tyto látky vykazují silné antiproliferační vlastnosti a některé z nich zároveň nízkou toxicitu k nenádorovým buňkám (Antholine et al., 1977; Kalinowski et al., 2007). Jejich protinádorový účinek je dán deplecí Fe, inhibicí ribonukleotidreduktasy a nebo tvorbou redoxně aktivních komplexů s Fe a následnou tvorbou ROS (Noulsri et al., 2009; Sartorelli et al., 1971). Nadějnou látkou této skupiny byl 3-aminopyridin-2-karboxyaldehydthiosemikarbazon (Triapine®), který byl díky svým výhodným vlastnostem a vysoké účinnosti na různé typy nádorových buněk přijat do první i druhé fáze klinického hodnocení (Richardson et al., 2009). Během druhé fáze hodnocení se však objevily nežádoucí účinky v podobě únavy, nevolnosti, neutropenie, hypoxie, hypotenze a methemoglobinemie (Knox et al., 2007). Dále bylo připraveno velké množství jiných nadějných thiosemikarbazonů, z nichž můžeme jmenovat např. di-2-pyridylketon-4,4-dimethyl-3-thiosemikarbazon (**Dp44mT**) ze série di-2-pyridylketonthiosemikarbazonů (DpT) (Noulsri et al., 2009) nebo 2-benzoylpyridin-4-ethyl-3-thiosemikarbazon (**Bp4eT**) ze série 2-benzoylpyridinthiosemikarbazonů (BpT) (Stariat et al., 2012).



Obr. 5 Chemické struktury vybraných syntetických chelátorů Fe.

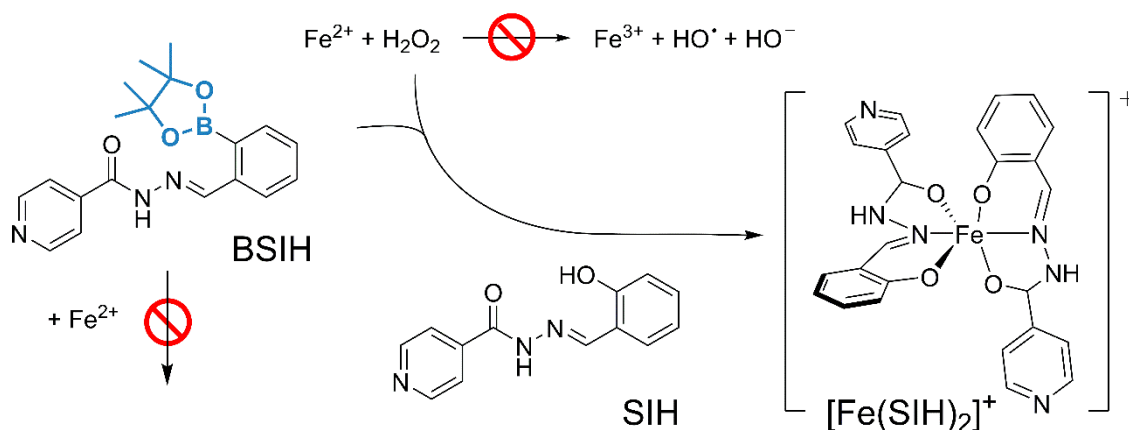
2.3.3 Prochelátory železa

Chelátory Fe byly vyvinuty k terapii stavů s přetížením Fe. Jejich podrobnějším zkoumáním se objevily i další možnosti jejich využití a to zejména léčba nádorových onemocnění, kdy odebíráním Fe nádorovým buňkám, brání různými mechanismy jejich další proliferaci. Další potenciální využití je léčba a/nebo prevence onemocnění souvisejících s oxidačním stresem. Při těchto stavech bývají hladiny Fe, pokud vůbec, zvýšeny jen lokálně, a proto může v důsledku dlouhodobého podávání chelátorů Fe docházet k depleci Fe a inaktivaci některých důležitých enzymů obsahujících Fe a následnému projevu nežádoucích účinků (Galey, 2001).

Z tohoto důvodu jsou studovány tzv. prochelátory Fe, které mají malou nebo žádnou afinitu k iontům kovů, dokud není chránící skupina odstraněna za podmínek oxidačního stresu, čímž vznikne aktivní chelátor Fe (Galey, 2001). Cílem této strategie je příprava

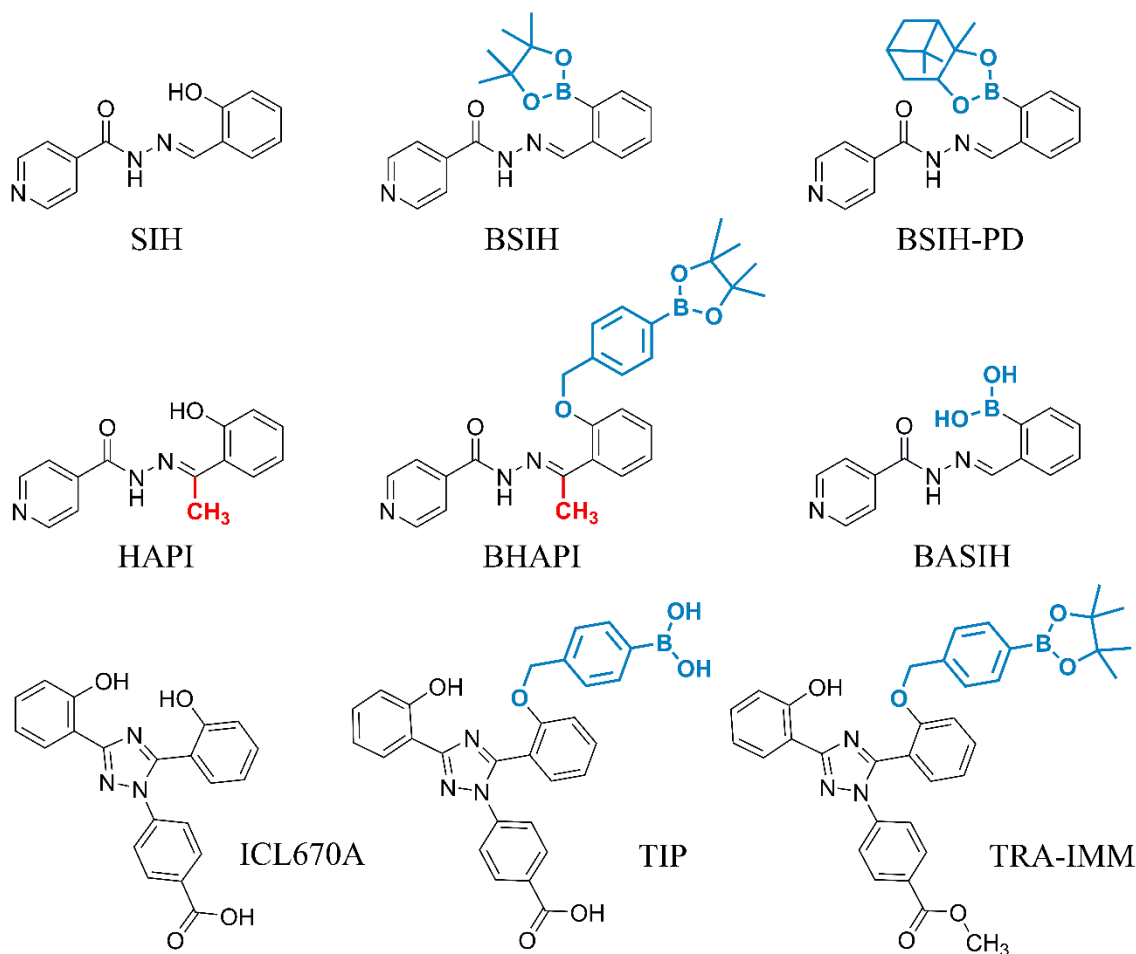
netoxických látek, které neovlivňují přirozenou homeostázu Fe, dokud nedojde k patologickým stavům se zvýšenou tvorbou ROS. Po aktivaci prochelátoru zvýšenou hladinou ROS vzniká účinný chelátor Fe, který tvoří inaktivní komplexy s jinak redoxně aktivním Fe (Charkoudian et al., 2006; Charkoudian et al., 2007).

Velká skupina prochelátorů Fe byla připravena v laboratoři prof. Katherine J. Franz, Ph.D. (Duke University). Jedním z prvních prochelátorů byl boronylester salicylaldehydisonikotinoylhydrazonu (**BSIH**). Zde je pro chelataci nezbytný fenolický kyslík maskován boronylovou skupinou, která je v přítomnosti ROS odstraněna a vzniká již zmiňovaný velmi účinný chelátor SIH, který inhibuje Fentonovu reakci a tudíž vznik velmi toxického $\cdot\text{OH}$. Schéma této aktivace je znázorněno na Obr. 6. Tyto nadějně protektivní vlastnosti, vůči toxickému působení H_2O_2 , byly poprvé ukázány na ARPE-19 buňkách (Charkoudian et al., 2008).



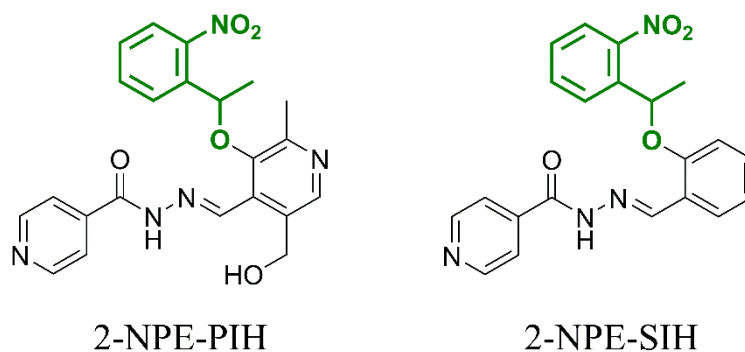
Obr. 6 Aktivace prochelátoru BSIH v prostředí H_2O_2 na SIH a jeho následná chelatační aktivita s ionty Fe (převzato a upraveno dle (Charkoudian et al., 2008)).

Od chelátoru SIH byla odvozena celá řada dalších prochelátorů (např. **BSIH-PD**, **BASIH** a další) (Charkoudian et al., 2007). Byly připraveny i prochelátory od klinicky užívaného chelátoru ICL670A (**TIP** a **TRA-IMM**) (Kielar et al., 2012b) a od experimentálního chelátoru HAPI (**BHAPI**) (Kielar et al., 2012a). Struktury těchto látek jsou ukázány na Obr. 7. Podrobnější studium vlastností těchto prochelátorů je předmětem této disertační práce.



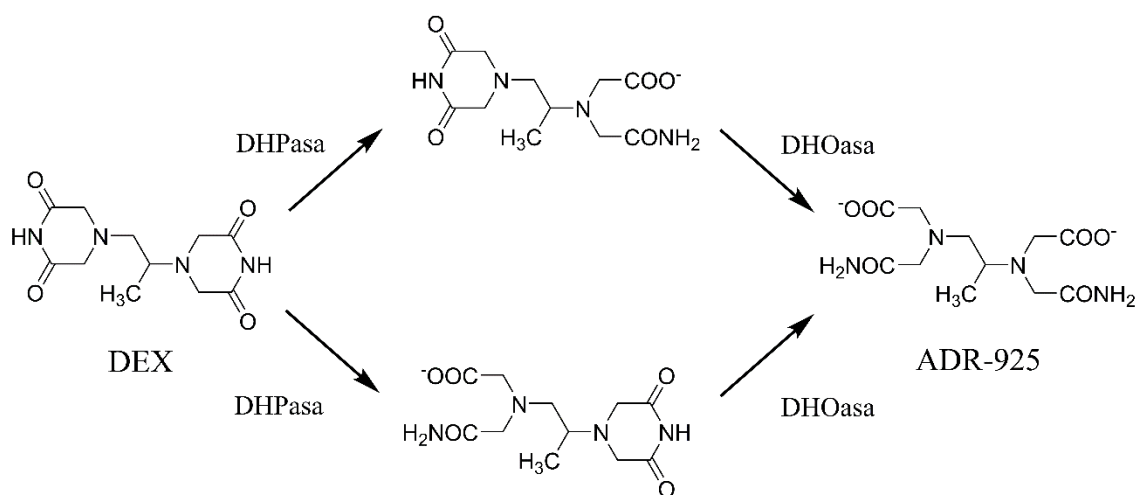
Obr. 7 Chemické struktury vybraných chelátorů a od nich odvozených prochelátorů Fe.

Další nadějnou skupinou prochelátorů, jsou látky aktivované UV světlem. Jelikož UVA záření způsobuje nárůst volného Fe, zvyšuje tím i náchylnost kožních buněk k oxidačnímu poškození, ztrátě integrity buněčných membrán a k jejich následné nekróze (Pourzand et al., 1999; Reelfs et al., 2004). Chelátory Fe dokáží bránit zvýšenému uvolňování Fe a poškození buněk UVA světlem, ale jak bylo zmíněno výše, jejich dlouhodobější podávání u stavů bez systémového přetížení Fe vede k rozvoji nežádoucích účinků kvůli narušení přirozené homeostázy Fe. Z tohoto důvodu byly navrženy prochelátory aktivované UV světlem s fotolabilní chráničící skupinou. Jako příklad můžeme uvést prochelátory odvozené od již zmiňovaných lipofilních chelátorů Fe SIH a PIH, kde byl jako chráničící skupina použit 1-(2-nitrofenyl)ethyl (2-NPE). Bylo prokázáno, že oba prochelátory (Obr. 8) signifikantně chrání FEK4 buňky (lidské fibroblasty) před oxidačním poškozením navozeném UVA zářením (Yiakouvaki et al., 2006).



Obr. 8 Chemické struktury vybraných prochelátorů Fe, které se aktivují UV zářením.

Do skupiny prochelátorů Fe by se dal zařadit i dexrazoxan (DEX; ICRF-187). Patří do skupiny bis-dioxopiperazinů a je to pravotočivý enantiomer racemického razoxanu, který byl původně vyvinut k léčbě nádorových onemocnění (Fattman et al., 1996). DEX prostupuje snadno do buněk, kde je hydrolyticky metabolizován na ADR-925 (Obr. 9). Dochází k postupnému enzymatickému otevření obou cyklů dihydropyrimidinasou (DHPasa) a dihydroorotasou (DHOasa) (Hasinoff and Herman, 2007). Vzniklý metabolit ADR-925 váže ionty Fe, ale je schopný vázat i jiné ionty (např. Cu, Ca, Mg a Mn) (Huang et al., 1982). Ukázalo se, že DEX účinně brání kardiotoxicitě navozené antracyklinovými antibiotiky. Podrobněji však bude tato problematika probrána v kapitole 2.4.3.



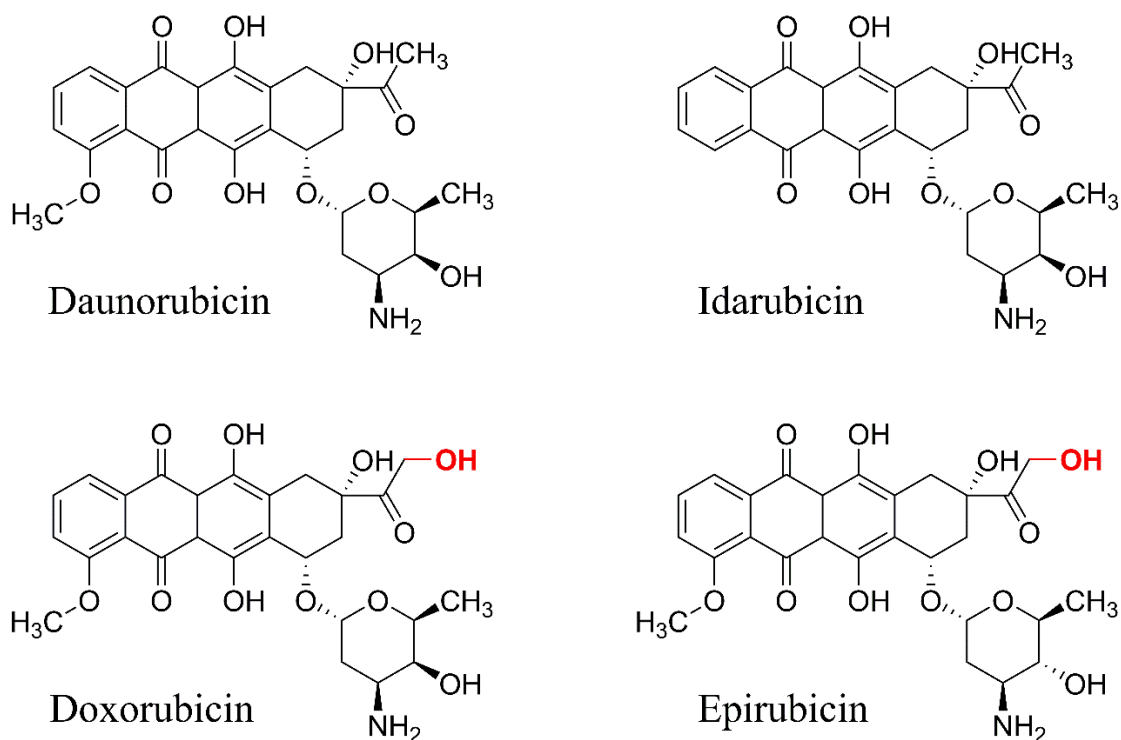
Obr. 9 Aktivace DEX na chelatačně účinný metabolit ADR-925 (Hasinoff and Herman, 2007).

2.4 ANTRACYKLINOVÁ ANTIBIOTIKA

Antracyklinová antibiotika (ANT) byla objevena a zavedena do klinické praxe k léčbě nádorových onemocnění již v šedesátých letech dvacátého století (Tan et al., 1967). Prvním zástupcem této skupiny látek byl **daunorubicin (DAU; daunomycin)**, který byl poprvé izolován v roce 1963 z bakterie *Streptomyces peucetius* (Grein, 1987). Používá se v léčbě akutní lymfoblastické a myeloblastické leukémie (Gong et al., 2015; Tan et al., 1967). Po něm záhy následoval **doxorubicin (DOX; adriamycin)**, který byl v roce 1969 izolovaný ze *Streptomyces peucetius var. Caesius*. Ač se od DAU liší pouze přítomností hydroxylové skupiny na C-14, jeho spektrum účinku je mnohem širší. Užívá se při terapii jak krevních malignit, tak i k léčbě široké škály solidních tumorů (Arcamone et al., 2000).

V dalších letech pak bylo připraveno mnoho jejich analogů ve snaze zlepšit terapeutický index, avšak jen málo z nich bylo zavedeno do klinické praxe. Příkladem takové látky je **epirubicin**, epimer DOX, který má podobné spektrum jako DOX, ale je rychleji eliminován (Bonfante et al., 1980; Minotti et al., 2000). Další klinicky užívanou látkou je demethoxylovaný derivát DAU, **idarubicin**, který má podobné spektrum účinku jako DAU (Bonfante et al., 1983) a v kombinaci s cytarabinem je dokonce první volbou v léčbě akutní myeloidní leukémie (Ohtake et al., 2011).

Zavedení ANT do klinické praxe byl jeden z největších úspěchů v moderní onkologii. Ač jsou v klinické praxi více jak půl století, stále mají nezastupitelnou roli v léčbě mnohých nádorových onemocnění. Bývají často používány i v kombinaci s jinými chemoterapeutiky k dosažení ještě větší terapeutické účinnosti (Marty et al., 2006; Petrelli et al., 2011).



Obr. 10 Chemické struktury významných ANT.

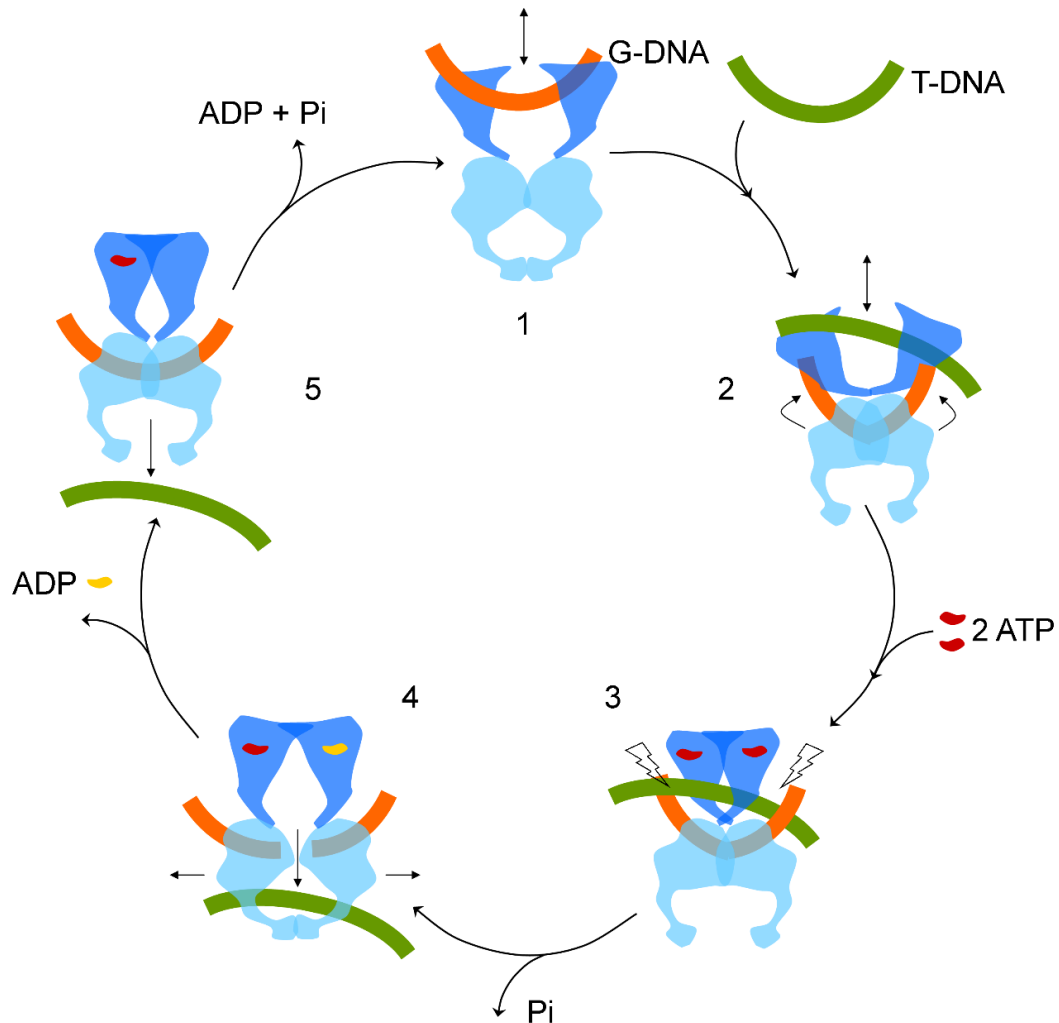
2.4.1 Mechanismy protinádorového účinku

Od zavedení ANT do klinické praxe byla publikována řada možných mechanismů jejich protinádorového účinku. Prvním předpokládaným mechanismem byla jejich interkalace mezi báze v molekule DNA, čímž dochází k zástavě replikace a transkripce DNA a tím pádem i růstu nádorových buněk (Minotti et al., 2004).

Dalším možným mechanismem účinku se zdála být tvorba ROS s následným poškozením okolních biomolekul. Tato teorie ovšem byla zpochybněna některými studiemi, které neprokázali vliv antioxidantních enzymů na antiproliferační působení ANT (DeGraff et al., 1994; Lenehan et al., 1995).

V současné době se považuje za hlavní mechanismus jejich účinku inhibice topoisomerasy II (TOP II) (Capranico and Zunino, 1992). ANT patří do skupiny tzv. topoisomerasových jedů, které způsobují stabilizaci přechodně vzniklého štěpného komplexu, ve kterém je rozštěpená DNA kovalentně vázána oběma konci k tyrozinovým zbytkům TOP II (Obr. 11). Tato stabilizace má za následek nemožnost opětovného

spojení DNA, což vede k zástavě replikace a transkripce a aktivaci proteolytických mechanismů. Ty způsobují degradaci TOP II, vznik dvojíých zlomů v molekule DNA a následnou apoptózu nádorových buněk (Deweese and Osheroff, 2009).



Obr. 11 Katalytický cyklus topoisomerasy II (Vavrova and Simunek, 2012).

1 – Navázání G-segmentu dvoušroubovice DNA. 2 – Navázání T-segmentu DNA. 3 – Navázání dvou molekul ATP. G-segment je rozštěpen a 5' konce jsou reverzibilně vázány na tyrosinové zbytky TOP II. 4 – Hydrolyzou 1 molekuly ATP vzniká energie, díky které dochází ke změně konformace TOP II a T-segment je protažen zlomem v G-segmentu. Poté následuje opětovné spojení G-segmentu. 5 – Dochází k uvolnění T-segmentu. Hydrolyzou druhé molekuly ATP se TOP II vrací do původní konformace a G-segment je odloučen (Larsen et al., 2003).

2.4.2 Antracyklinová kardiotoxicita

Léčba ANT je spojena s řadou nežádoucích účinků typických pro cytostatika, jako jsou nevolnost, alopecie, anémie, leukopenie, únava, neutropenie a další, avšak většina z nich vymizí po ukončení léčby nebo je lze omezit podpůrnou farmakoterapií (Marty et al., 2006). Závažným nežádoucím účinkem limitujícím jejich užívání je však jejich kardiotoxicita, která je považována za jeden z vůbec nejzávažnějších toxických účinků léčiv. U ANT je nejnebezpečnější chronická forma toxicity, kdy dochází k ireverzibilním změnám v morfologii především myocytů levé komory a septa a jejich následné smrti. Klinicky se tyto změny mohou projevit až jako dilatační kardiomyopatie s progresí do srdečního selhání (Bird and Swain, 2008; Hrdina et al., 2000; Jones et al., 2006). Tento typ srdeční dysfunkce bývá označován jako typ I kardiotoxicity protinádorových léčiv a značně se liší od reverzibilního typu II, který bývá navozen např. trastuzumabem nebo inhibitory tyrosinkinás (Ewer and Lippman, 2005).

Během desetiletí důkladného výzkumu ANT kardiotoxicity bylo navrženo mnoho možných teorií vzniku tohoto poškození. Avšak žádná z doposud publikovaných hypotéz nebyla jednoznačně potvrzena ani vyvrácena. Jednotlivé teorie se vzájemně nevylučují a je proto možné, že patogeneze ANT kardiotoxicity má více příčin (Sterba et al., 2013). Hlavní předpokládané mechanismy jsou naznačeny na Obr. 12.

Tradiční teorií patogeneze ANT kardiotoxicity je zvýšená tvorba ROS různými mechanismy. Jedním z nich je tzv. redoxní cyklení, při kterém dochází jedoelektronovou redukcí k tvorbě semichinonových struktur. Tyto radikály jsou donorem volného elektronu a v přítomnosti O_2 vytváří $O_2^{\cdot-}$. Semichinonové struktury jsou poté regenerovány pomocí flavoproteinů a redukčních ekvivalentů (NADH nebo NADPH). $O_2^{\cdot-}$ je buď antioxidačními enzymy dismutován na méně nebezpečné formy ROS, anebo se účastní Haber-Weissovy reakce katalyzované redox-aktivním Fe za vzniku vysoce reaktivního a toxického $\cdot OH$ (Halliwell, 2007; Simunek et al., 2009).

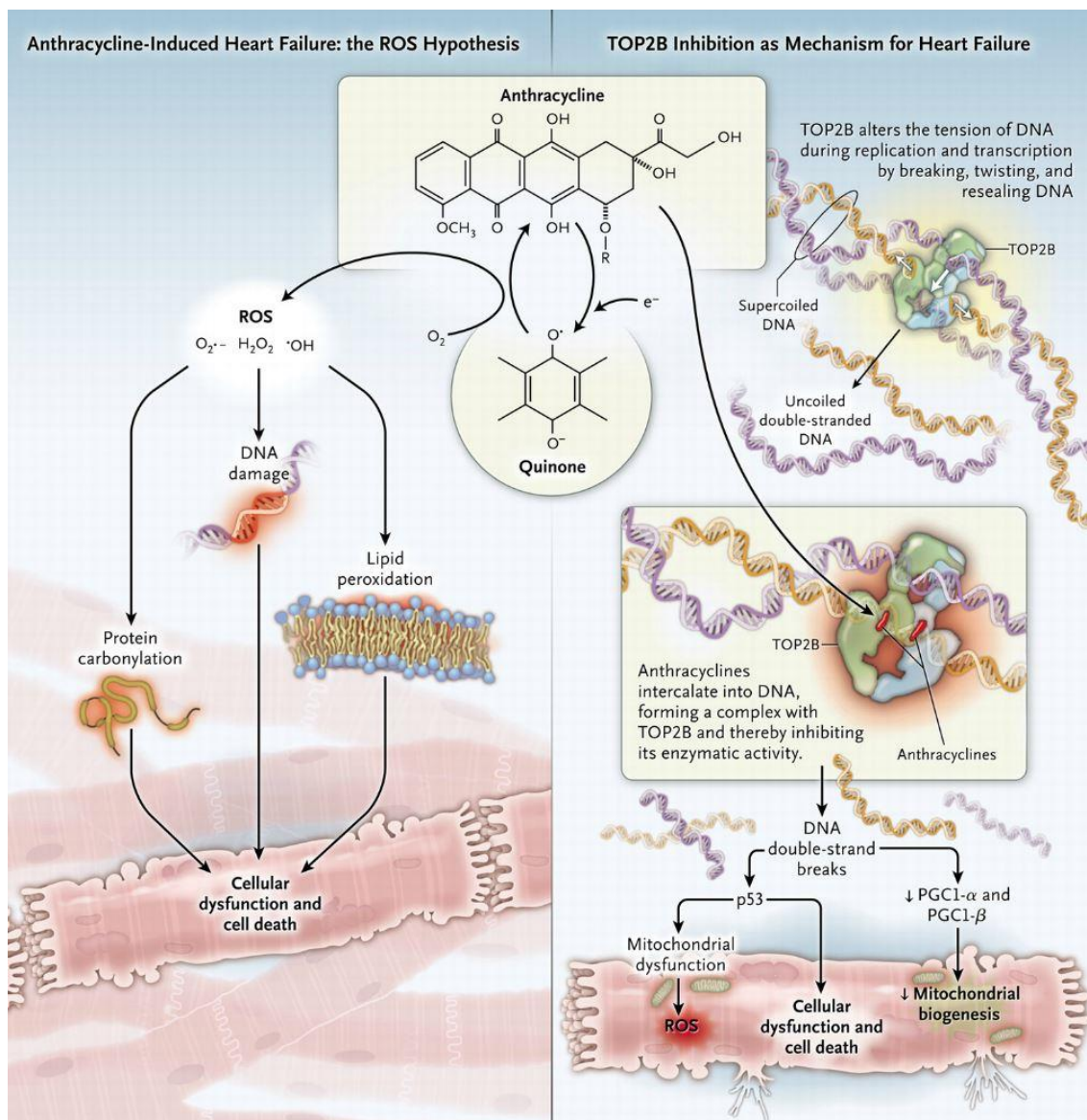
Dalším možným mechanismem je tvorba komplexu ANT – Fe^{3+} . Díky ANT struktuře může vznikat s Fe redoxně aktivní soustava, ve které dochází v přítomnosti redukčních ekvivalentů (NADH, GSH a dalších) k redukcí Fe^{3+} na Fe^{2+} . Komplex s Fe^{2+} může přímo reagovat s H_2O_2 za vzniku $\cdot OH$, nebo tvoří v přítomnosti kyslíku $O_2^{\cdot-}$ (Hrdina et al., 2000; Keizer et al., 1990; Simunek et al., 2009).

Dalším mechanismem, nebo alespoň přispívajícím faktorem, je poškození mitochondrií. Bylo prokázáno, že ANT mají vysokou afinitu ke kardiolipinu, fosfolipidu vnitřní mitochondriální membrány, a jsou proto koncentrovány v mitochondriálním kompartmentu (Goormaghtigh et al., 1990). Narušují správnou funkci dýchacího řetězce, čímž rozvrací energetiku buňky. Mohou vznikat semichinonové struktury a redoxním cyklením nadměrné množství ROS, což má za následek poškození mitochondriální DNA (Berthiaume and Wallace, 2007; Lebrecht and Walker, 2007; Wallace, 2003).

ANT také ovlivňují metabolismus vápníku (Ca). Snižují expresi ryanodinového receptoru a ovlivňují vápníkové kanály na povrchu kardiomyocytů (Boucek et al., 1999). Způsobují přetížení Ca, které vede k aktivaci proteolytického enzymu kalpainu, štěpícího kontraktilní vlákna a jiné proteiny (Solem et al., 1994).

Dále byly prokázány změny v expresi některých důležitých srdečních proteinů (Boucek et al., 1999) a v degradaci proteinů ubiquitin-proteazomovým systémem (Sishi et al., 2012).

Nejnovější teorie předpokládají vliv inhibice TOP II β (Lyu et al., 2007). Na rozdíl od TOP II α , která se nachází převážně u rychle proliferujících (nádorových) buněk (Wang, 2002), TOP II β se vyskytuje ve všech buňkách, i postmitotických (Austin and Marsh, 1998). Podrobněji bude tato problematika probrána v kapitole 2.4.3.4.



Obr. 12 Navržené hlavní možné mechanismy ANT kardiotoxicity (Sawyer, 2013).

2.4.3 Možnosti kardioprotekce

ANT jsou nepostradatelná léčiva v terapii mnoha nádorových onemocnění, avšak jejich kardiotoxicita je velmi závažným nežádoucím účinkem, který limituje jejich užívání v klinické praxi. Jelikož není stále přesně známa příčina ANT kardiotoxicity a její léčba je obtížná, hlavním cílem je tedy omezení či úplné zamezení jejího rozvoje.

Velmi jednoduchým a účinným přístupem je snížení kumulativní dávky ANT, což může ovšem vést k omezení jejich terapeutického potenciálu (Wouters et al., 2005).

Dalším preventivním přístupem byla syntéza nových analogů ANT. Do klinické praxe se ale dostaly pouze již zmiňovaný epirubicin a idarubicin, avšak ani u nich nebyla (při vztažení k protinádorové účinnosti) prokázána nižší kardiotoxicita (Berman et al., 1991; O'Brien et al., 2002). FDA registrovala ještě valrubicin pro léčbu rakoviny močového měchýře. Kvůli své toxicitě ale nemůže být podáván systémově a je proto aplikován přímo do močového měchýře (van der Heijden and Witjes, 2003).

Důležitou strategií prevence je modifikace jejich podávání. Několik studií naznačilo zachování protinádorové aktivity se snížením kardiotoxicity při aplikaci ANT ve formě infuze s bolusovým podáním (Zalupski et al., 1991).

Široce zkoumanou oblastí je i pasivní cílení ANT přímo do nádorových buněk. Toho je dosaženo například enkapsulací DAU (DaunoXome™) nebo DOX (Myocet™, Caelyx™ a Doxil™) do lipozomu stabilizovaného vrstvou polyethylenglykolu (Leonard et al., 2009). Tento přístup využívá rozdílných vlastností cév nádorové a normální tkáně, kdy cévy nádorové tkáně vykazují vyšší penetraci a propouští proto i velké lipozomální částice (Matsumura and Maeda, 1986). Takto formulované ANT se liší v distribučním objemu, prodloužení biologického poločasu, stabilitě, ale i nežádoucích účincích, mezi které patří zejména alergické reakce, palmoplantární dysestezie (tzv. hand-foot syndrom) a další (Waterhouse et al., 2001). Několik studií potvrdilo snížené riziko kardiotoxicity se současným zvýšením jejich účinnosti jak u dospělých, tak i dětských pacientů a také možnost jejich podání u rezistentních nádorů (Batist et al., 2001; Fulbright et al., 2010; Sieswerda et al., 2011).

Další možností je pak farmakologická kardioprotekce, která se odvíjí od možných mechanismů kardiotoxického působení ANT.

Antioxidanty

Jak již bylo zmíněno výše, jedním z možných mechanismů ANT kardiotoxicity je tvorba RONS. Proto byl zkoumán kardioprotektivní potenciál celé řady antioxidantů, a to např. vitamínů A (Tesoriere et al., 1994), C (Fujita et al., 1982) a E (Wang et al., 1980), N-acetylcysteinu (Fulbright et al., 2015), amifostinu (Jahnukainen et al., 2001), některých flavonoidů (Sadzuka et al., 1997) a různých dalších látek s antioxidačními vlastnostmi (Kalay et al., 2006).

Během let bylo publikováno mnoho *in vitro* i *in vivo* studií, které potvrzují protektivní vlastnosti antioxidantů. V těchto studiích se ale často jednalo pouze o akutní ANT kardiotoxitu a/nebo byly ANT použity v supratherapeutických koncentracích. Naopak u chronických modelů vykazovaly antioxidanty někdy i opačný efekt (Berthiaume et al., 2005; Bruynzeel et al., 2007a; Bruynzeel et al., 2007b; Dresdale et al., 1982).

Chelátory Fe

Dalším mechanismem ANT kardiotoxicity se zdála být tvorba ROS katalyzovaná ionty Fe. Z tohoto důvodu se též mnoho let zkouší bránit rozvoji ANT kardiotoxicity pomocí chelátorů Fe. Podrobněji byly tyto látky probrány v kapitole 2.3.2., zde bude zmíněno pouze jejich působení vůči toxicitě ANT.

První zkoumanou látkou byl DFO, u kterého byly pozorovány protektivní účinky jak *in vitro* tak i *ex vivo* na modelu izolovaných myších předsíní (Hershko et al., 1993; Voest et al., 1994), avšak v chronickém modelu spontánně hypertenzních potkanů, neprokázal při podání 12 dávek DOX protektivní vlastnosti (Herman et al., 1994). Tato neúčinnost byla vysvětlována hydrofilitou a nedostatečným průchodem DFO do buněk, proto se další výzkum soustředil na nízkomolekulární a lipofilní chelátory Fe.

Dalším zkoumaným chelátorem byl tudíž L1, který vykazoval *in vitro* účinnost proti ANT kardiotoxicitě jak v podmínkách se zvýšeným, tak i normálním obsahem Fe (Barnabe et al., 2002; Link et al., 1996). Slibné výsledky byly pozorovány i v *in vivo* experimentu akutní kardiotoxicity u potkanů (Ammar el et al., 2011). Avšak také nebyl schopný zmírnit oxidační stres ani poškození levé komory u chronického modelu ANT kardiotoxicity králíků (Popelova et al., 2008).

ICL670A, jak již bylo zmíněno dříve, je velmi účinný chelátor Fe, který je schopný vázat volné Fe v srdci a chránit tak H9c2 kardiomyoblasty proti toxicitě *tert*-butylhydroperoxidu (Bendova et al., 2010), ale protektivní účinky vůči ANT toxicitě u něj zaznamenány nebyly (Hasinoff et al., 2003).

Proti chronické ANT kardiotoxicitě králíků bylo zkoumáno několik zástupců skupiny aroylhydrazonů, a to PIH, *o*-108 (*ortho*-chlorbenzoylisonikotinoylhydrazon) a SIH. PIH zlepšoval přežívání zvířat, ale významně nelepšil srdeční parametry (Simunek et al., 2005b). Chelátory SIH a *o*-108 byly v nižší použité dávce schopné bránit předčasnému

úhynu zvířat a na rozdíl od PIH, zlepšovaly srdeční parametry (kontraktilita myokardu, histopatologické změny a nadměrné uvolňování troponinů z kardiomyocytů) (Sterba et al., 2007; Sterba et al., 2006). Určité protektivní účinky SIH byly prokázány i v *in vitro* studii na izolovaných potkaních kardiomyocytech (Simunek et al., 2009).

Ze skupiny thiosemikarbazonů byl proti ANT kardiotoxicitě dosud zkoumán pouze účinek Dp44mT. Ač se jedná o silný chelátor, nebyla u něj sledována žádná protektivní účinnost ani *in vitro* (Hasinoff and Patel, 2009) ani *in vivo* (Rao et al., 2011).

Dexrazoxan

Dexrazoxan je nejúčinnějším a dosud jediným registrovaným protektivem ANT kariotoxicity. Dlouhou dobu se předpokládalo, že za tuto protekci je zodpovědný vznikající metabolit ADR-925 (Obr. 9), který uvolňuje Fe z redox-aktivních komplexů s ANT a předchází tak oxidačnímu poškození srdeční tkáně (Hasinoff, 2002; Swain et al., 1997). Novější studie se ovšem od tohoto mechanismu kardioprotekce odklánějí a domnívají se, že ochranný efekt může být způsoben inhibicí TOP II β přímo samotným DEX (Lyu et al., 2007).

DEX je katalytický inhibitor TOP II, což znamená, že inhibice nastává v jiném místě katalytického cyklu než v místě působení topoisomerasových jedů. DEX se váže v blízkosti vazebných míst pro ATP, čímž inhibuje vnitřní ATPasovou aktivitu a TOP II tak drží v tzv. „closed clamp“ konfiguraci. Působí zástavu buněčného cyklu v G₂/M fázi a na rozdíl od topoisomerasových jedů, nezpůsobuje poškození DNA dvojitými zlomy (Classen et al., 2003; Tanabe et al., 1991). Navázáním DEX k TOP II β tak může docházet k omezení interakce tohoto enzymu s ANT a tudíž i poškození DNA kardiomyocytů (Sawyer, 2013).

Původně byl DEX připraven jako potenciální protinádorové léčivo (Creighton and Birnie, 1969) a během let výzkumu byly objeveny jeho antimetastatické a radiosenzitizační účinky, díky kterým je využíván převážně v kombinační léčbě některých nádorových onemocnění (Rhombert and Hellmann, 2011). Jelikož mechanismem jeho protinádorového účinku je inhibice TOP II α , stejně jako je tomu u ANT, vyskytly se obavy z negativního ovlivnění jejich antineoplastického působení. Studie probíhající na proliferující, avšak nenádorové linii křeččích ovariálních (CHO) buněk naznačila antagonistický účinek v závislosti na časovém schématu podávání ANT

a DEX (Hasinoff et al., 1996). Avšak v dalších preklinických ani klinických studiích se antagonismus neprokázal (Marty et al., 2006; Rhomberg and Hellmann, 2011; Seymour et al., 1999).

Podrobnější studium kardioprotektivních a dalších vlastností DEX a jeho analogů je předmětem této disertační práce.

Anorganické dusičnany / dusitany a molsidomin

V minulosti se předpokládalo, že anorganické dusičnany a dusitany jsou pouze inertní produkty metabolismu oxidu dusnatého (NO). Až v posledních dvou desetiletích bylo zjištěno, že mohou sloužit jako rezervoár a alternativní zdroj NO (Omar and Webb, 2014). Anorganický perorálně podaný dusičnan je střevní mikroflórou redukován na dusitan, který následně přechází do krevního oběhu. Dusitan pak může být v různých tkáních redukován na NO a to zejména při hypoxii a acidóze (Calvert and Lefer, 2009; Omar and Webb, 2014). Molsidomin je přímým donorem NO. K jeho uvolňování dochází rozkladem molekuly molsidominu, nejprve na aktivní metabolit 3-morfolinosydonimin (SIN-1) a následně na další rozkladné produkty a NO (Rosenkranz et al., 1996).

Několik předchozích studií potvrdilo kardioprotektivní potenciál dusičnanů a dusitanů u ischemicko-reperfúzního poškození (Duranski et al., 2005; Ingram et al., 2013; Jones et al., 2015; Webb et al., 2004), avšak přesný mechanismus protektivního působení není stále znám. Předpokládá se, že možným mechanismem by mohla být regulace významných (především mitochondriálních) proteinů S-nitrosylací (Calvert and Lefer, 2009; Murphy et al., 2014). Na kardioprotekci by se mohla podílet i aktivace dráhy NO/cGMP/PKG, která brání depolarizaci mitochondrií, zvýšené produkci ROS a apoptóze buněk (Calvert and Lefer, 2009; Omar and Webb, 2014). Při normoxických podmínkách byla také prokázána protektivní účinnost dusitanu prostřednictvím aktivace proteinkinasy A (Kamga Pride et al., 2014). Nedávná studie dokonce poukázala na protektivní efekt u akutní ANT kardiotoxicity myši navozené jednorázovou dávkou DOX (Zhu et al., 2011). Podobné nadějně výsledky v prevenci akutní ANT kardiotoxicity a reoxygenačního poškození byly pozorovány i u molsidominu (Disli et al., 2013; Siegfried et al., 1992). Další studium jejich kardioprotektivních mechanismů a účinků proti chronické ANT toxicitě je součástí této práce.

3 CÍLE PRÁCE

- Stanovení chelatačních účinností, toxicit a potenciálních kardioprotektivních vlastností vybraných chelátorů Fe proti modelovému oxidačnímu poškození srdečních buněk vyvolaném H_2O_2 případně dalšími prooxidanty, např. katecholaminy a jejich oxidačními produkty.
- Studium nových prochelátorů Fe, které se aktivují pomocí ROS na chelatačně účinné látky. Určení jejich schopnosti vázat ionty Fe před a po aktivaci a porovnání jejich toxicit a kardioprotektivních účinků s mateřskými chelátory Fe.
- Studium stabilit vybraných látek a účinnosti aktivace prochelátorů.
- Stanovení degradačních produktů chelátoru SIH a prochelátoru BSIH a určení jejich biologických vlastností.
- Studium možností farmakologické protekce u ANT kardiotoxicity pomocí katalytických inhibitorů TOP II a určení jejich vlivu na antiproliferační aktivitu ANT.
- Studium nově syntetizovaných analogů DEX a jeho metabolitu ADR-925 a stanovení jejich biologických vlastností včetně intracelulární chelatace Fe.
- Studium protektivních vlastností látek poskytujících NO (dusičnan a dusitan sodný, molsidomin) u ANT kardiotoxicity a stanovení jejich vlivu na antiproliferační vlastnosti ANT.
- Přispění k objasnění mechanismů kardiotoxického působení ANT a kardioprotektivního účinku DEX.

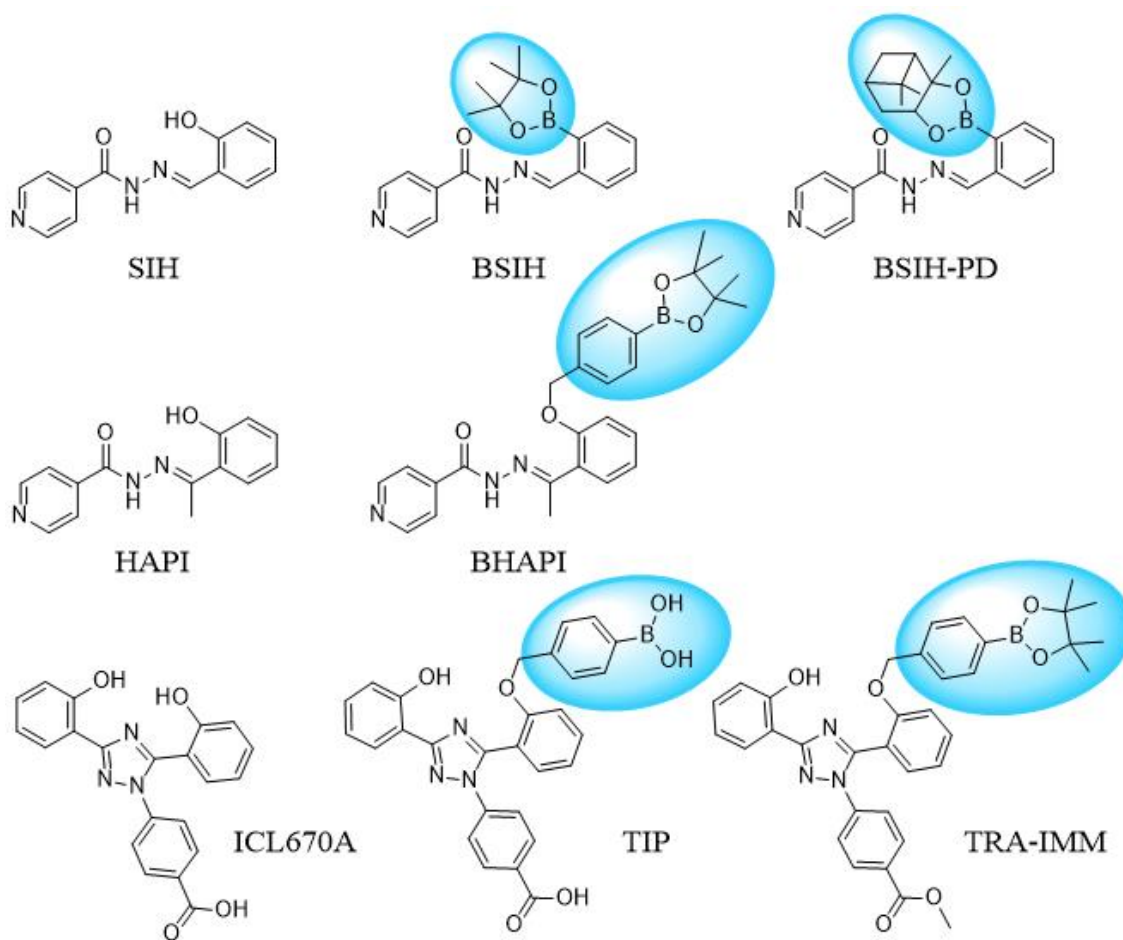
4 KOMENTÁŘE K PRACÍM

Tato disertační práce je předkládána jako komentovaný soubor osmi prací. Šest prací bylo publikováno v impaktovaných časopisech a dvě práce jsou předloženy ve formě rukopisů. Všechny publikace jsou původní experimentální práce zaměřené na možnosti využití chelátorů Fe v prevenci či léčbě patologických stavů spojených s oxidačním stresem a také na výzkum potenciálních látek bránících rozvoji antracyklinové kardiotoxicity.

4.1 POROVNÁNÍ PROTEKTIVNÍCH VLASTNOSTÍ VYBRANÝCH CHELÁTORŮ A OD NICH ODVOZENÝCH PROCHELÁTORŮ ŽELEZA U MODELOVÉHO OXIDAČNÍHO POŠKOZENÍ KARDIOMYOCYTŮ

Jansová H, Macháček M, Wang Q, Hašková P, Jirkovská A, Potůčková E, Kielar F, Franz KJ, Šimůnek T. Comparison of various iron chelators and prochelators as protective agents against cardiomyocyte oxidative injury. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014;74:210-221.

Některé studie z naší, ale i jiných výzkumných skupin, ukázaly slibné protektivní vlastnosti převážně malých lipofilních chelátorů Fe, jako je ICL670A, L1, SIH a HAPI (Bendova et al., 2010; Haskova et al., 2011; Simunek et al., 2005a; Sterba et al., 2007). Jejich užívání ve stavech bez přetížení Fe je ovšem spojeno s rizikem toxicity v důsledku odnámání Fe z důležitých metaloproteinů. Z tohoto důvodu byla připravena řada prochelátorů, které nemají téměř žádnou afinitu k iontům Fe, dokud není chránící boronylová skupina odstraněna působením ROS. Cílem této studie bylo porovnat vlastnosti tří chelátorů (SIH, HAPI a ICL670A) a pěti od nich odvozených prochelátorů Fe (BSIH, BSIH-PD, BHAPI, TRA-IMM a TIP; Obr. 13). Byla zkoumána jejich afinita k iontům Fe před a po aktivaci peroxidem vodíku, jejich permeabilita a schopnost intracelulární chelatace Fe, jejich toxicita a protektivní účinnost u modelového oxidačního poškození navozeného H₂O₂.



Obr. 13 Chemické struktury zkoumaných chelátorů a prochelátorů Fe.

Nejprve jsme stanovili chelatační účinnost studovaných látek v roztoku i v H9c2 buňkách. Všechny tři chelátory snadno vážali ionty Fe jak v roztoku, tak i v buňkách. Také jsme potvrdili již dříve zmíněnou teorii, že prochelátory Fe nemají téměř žádnou afinitu k iontům Fe, dokud není maskovací skupina odstraněna působením, v našem případě, H_2O_2 . Jedinou výjimkou byl prochelátor TRA-IMM, který nebyl schopný vázat Fe ani po jeho inkubaci s H_2O_2 .

V souladu s těmito výsledky se jevila i protektivní účinnost látek proti oxidačnímu poškození vyvolaném H_2O_2 . Všechny chelátory a prochelátory chelatující Fe signifikantně chránili buněčnou viabilitu H9c2 buněk. Pouze prochelátory odvozené od ICL670A (TRA-IMM a TIP) nebyly schopné téměř vůbec bránit oxidačnímu poškození. Tato skutečnost může souviset také s jejich poměrně vysokou vlastní toxicitou. Na druhou stranu prochelátory odvozené od SIH, BSIH-PD a hlavně BSIH nevykazovaly

téměř žádnou toxicitu. V tabulce (Tab. 2) jsou shrnuty hodnoty EC₅₀ (koncentrace, která snižovala toxicitu H₂O₂ a způsobila tak přežívání 50 % buněk ve srovnání s kontrolou) a TC₅₀ (koncentrace, která způsobila 50% pokles viability buněk).

Tab. 2 Srovnání vlastních toxicit a protektivních vlastností chelátorů a prochelátorů Fe.

(Pro)chelátor	EC₅₀ (μM; 24h)	TC₅₀ (μM; 24h)	TC₅₀ (μM; 72h)
SIH	8,0 ± 0,4	> 600	53,7 ± 4,4
BSIH	83,9 ± 5,9	> 600	> 600
BSIH-PD	101,6 ± 6,1	> 600	389,6 ± 42,8
HAPI	28,4 ± 5,3	> 600	15,9 ± 0,3
BHAPI	∅	363,9 ± 36,2	37,1 ± 7,7
ICL670A	52,9 ± 1,7	316,7 ± 32,5	2,6 ± 0,3
TRA-IMM	∅	80,0 ± 18,8	6,3 ± 0,4
TIP	∅	27,4 ± 3,7	16,8 ± 2,5

Tyto výsledky byly potvrzeny i dalšími metodami, jako je stanovení potenciálu vnitřní mitochondriální membrány, integrity lyzozomů a aktivity kaspas. Z provedených experimentů vyplývalo, že nejnadějnějšími prochelátory jsou ty odvozené od chelátoru SIH. Proto byl do dalších pokusů vybrán už jen SIH a BSIH. Jejich protektivní účinnost byla zkoumána na jiných buněčných liniích a také proti jiným zdrojům ROS, jako je *tert*-butylhydroperoxid, isoprenalin, redoxně aktivní herbicid paraquat a DOX.

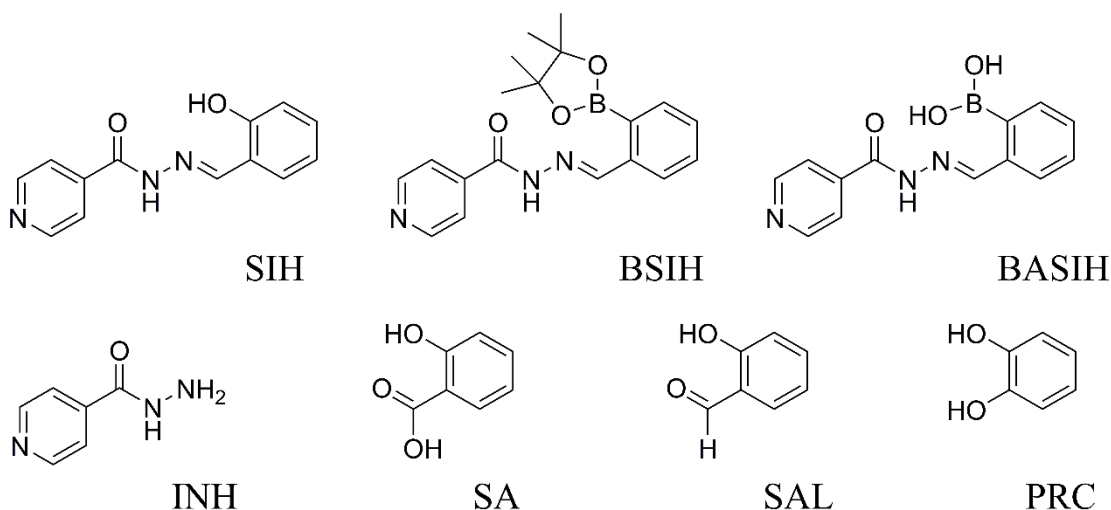
4.2 STUDIUM KARDIOPROTEKTIVNÍCH VLASTNOSTÍ A TOXICIT CHELÁTORU A PROCHELÁTORU ŽELEZA SIH A BSIH A JEJICH ROZKLADNÝCH PRODUKTŮ

Jansová H, Bureš J, Macháček M, Hašková P, Jirkovská A, Roh J, Wang Q, Franz KJ, Kovaříková P, Šimůnek T. Characterization of cytoprotective and toxic properties of iron chelator SIH, prochelator BSIH and their degradation products. *Toxicology*. 2016;350:15-24.

Bureš J, Jansová H, Stariat J, Filipický T, Mladěnka P, Šimůnek T, Kučera R, Klimeš J, Wang Q, Franz KJ, Kovaříková P. LC-UV/MS methods for the analysis of prochelator – Boronyl salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (BSIH) and its active chelator salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2015;105:55-63.

Salicylaldehydisonikotinoylhydrazon (SIH) je silný intracelulární chelátor Fe, u kterého byla již dříve popsána jeho protektivní účinnost proti oxidačnímu poškození jak v *in vitro* tak i v *in vivo* studiích (Bendova et al., 2010; Hašková et al., 2011; Horackova et al., 2000; Simunek et al., 2005a; Sterba et al., 2007). Jeho nevýhodou je ovšem riziko rozvratu přirozené homeostázy Fe a také jeho krátký biologický poločas kvůli velmi nestabilní hydrazonové vazbě. Z tohoto důvodu byl připraven prochelátor boronylsalicylaldehydisonikotinoylhydrazon (BSIH), který není díky chránící skupině schopný vázat ionty Fe, dokud není působením ROS, v našem případě H₂O₂, aktivován na chelatačně účinný SIH (Charkoudian et al., 2006) (Obr. 6).

Cílem této studie bylo tudíž stanovit stability a rozkladné produkty BSIH a SIH nově vyvinutou a zvalidovanou metodou a určit jejich biologické vlastnosti jako je chelatační účinnost, vlastní toxicita a protektivní účinnost u poškození H9c2 buněk vyvolaném H₂O₂. Chemické struktury studovaných látek jsou znázorněny na Obr. 14.



Obr. 14 Chemické struktury chelátoru Fe SIH, prochelátoru BSIH a jejich rozkladných produktů.

Pomocí nové HPLC-UV analýzy, vhodné pro *in vitro* bioaktivační experimenty, jsme zjistili, že pinakolesterová skupina BSIH se ve vodném prostředí okamžitě hydrolyzuje a vzniká BASIH, tedy forma BSIH s volnou arylboritou kyselinou. Dále jsme stanovili, že hlavním rozkladným produktem BSIH a SIH je vedle isoniazidu (INH) salicylaldehyd (SAL), který vzniká ve velkém množství, ale ne ekvimolárně. Z tohoto důvodu jsme zkoumali další potenciální rozkladné produkty, jako je kyselina salicylová (SA) a pyrokatechol (PRC). Avšak byla nalezena pouze SA a to jen ve velmi malém množství. Další teorií pak bylo, že SAL sice vzniká ekvimolárně, ale díky jeho těkavosti nejsme schopni toto množství přesně stanovit, neboť jsou tyto experimenty prováděny na Petriho miskách. Zopakovali jsme proto tyto pokusy i v uzavřených zkumavkách a zjistili jsme, že jeho úbytek je opravdu způsoben převážně jeho těkavostí. Dále jsme potvrdili, že BSIH je významně stabilnější než chelátor SIH v DMEM buněčném médiu s H9c2 buňkami i bez nich. Novou validovanou metodou HPLC-MS se nám také podařilo stanovit základní farmakokinetické parametry BSIH u potkanů.

Stanovením chelatační účinnosti studovaných látek jsme zjistili, že BSIH není schopný vázat ionty Fe, dokud není aktivován působením H₂O₂. Po rozkladu BSIH, dosahovala jeho nitrobuněčná chelatační účinnost až 70 % aktivity SIH. Významné chelatační účinky vykazoval i SAL (cca 50 % aktivity SIH). S těmito výsledky korelují i výsledky protektivní účinnosti, kde chelatačně neaktivní látky nebyly schopné chránit H9c2 kardiomyoblasty před poškozením navozeném H₂O₂, zatímco SIH, BSIH a SAL

signifikantně tomuto poškození bránili. SIH a SAL vykazovaly malou, ale významnou vlastní toxicitu, u ostatních látek (BSIH, SA, INH) pak téměř žádná toxicita zjištěna nebyla. Výsledky toxicitních experimentů byly také potvrzeny stanovením aktivity mitochondrií určením potenciálu vnitřní mitochondriální membrány JC1 sondou.

4.3 STUDIUM AKTIVACE PROCHELÁTORU ŽELEZA BHAPI NA CHELATAČNĚ ÚČINNÝ HAPI A JEJICH PROTEKTIVNÍCH VLASTNOSTÍ U MODELU KATECHOLAMINOVÉ KARDIOTOXICITY *IN VITRO*

Hašková P, Jansová H, Bureš J, Macháček M, Jirkovská A, Franz KJ, Kovaříková P, Šimůnek T. Cardioprotective effects of iron chelator HAPI and ROS-activated boronate prochelator BHAPI against catecholamine-induced oxidative cellular injury. (manuskript)

Katecholaminy jsou stresové hormony dřeně nadledvin a také neurotransmitery sympatického vegetativního a centrálního nervového systému. Jsou nezbytné pro kontrolu srdeční funkce, avšak jejich nadměrné uvolňování může způsobovat srdeční poškození (Cohn et al., 1984; Dhalla et al., 2010). Ačkoli je katecholaminová kardiotoxicita známá již dlouhou dobu, její patofyziologie není stále zcela objasněna. Předpokládá se vliv nadměrné stimulace β -adrenoreceptorů, přetížení srdečních buněk vápníkem a v poslední době se také určitá role připisuje nadměrné produkci ROS (Costa et al., 2011; Dhalla et al., 2010). Katecholaminy podléhají spontánní oxidaci, při které dochází ke vzniku nestabilních *o*-chinonů a aminochromů, které mohou být dále oxidovány. Tyto oxidované produkty pomáhají rozvoji Haber-Weissovy reakce a tak i vzniku ROS, převážně velmi reaktivního a toxického $\cdot\text{OH}$ (Bindoli et al., 1992).

Již dřívější studie naší pracovní skupiny poukázala na nadějně protektivní vlastnosti chelátoru SIH (Hašková et al., 2011). Nevýhodou SIH je ale jeho krátký biologický poločas převážně díky nestabilní hydrazonové vazbě. Z tohoto důvodu byl připraven jeho methylovaný derivát HAPI se zvýšenou stabilitou vůči hydrolýze (Hruskova et al., 2011) a také od něj odvozený prochelátor BHAPI (Kielar et al., 2012a). BHAPI navíc není schopný vázat ionty Fe, dokud není boronylová chránící skupina odstraněna působením ROS. Neovlivňuje tak přirozenou homeostázu Fe, dokud není aktivován v patologických podmínkách spojených s nadměrnou produkcí ROS, na chelatačně účinný HAPI.

Cílem této studie bylo stanovit stabilitu HAPI a BHAPI a také určit schopnost katecholaminů a jejich oxidačních produktů aktivovat BHAPI na účinný chelátor HAPI.

Dále pak stanovit jejich chelatační aktivitu a protektivní účinnost u oxidačního poškození způsobeném katecholaminy, adrenalinem a isoprenalinem a jejich oxidačními produkty.

Pomocí HPLC jsme potvrdili, že obě zkoumané látky, jak HAPI tak především BHAPI, jsou stabilní. Chelátor Fe HAPI je stabilní i v přítomnosti čerstvě připraveného nebo 24 h preoxidovaného adrenalinu, zatímco prochelátor BHAPI je inkubací s adrenalinem aktivován na HAPI. Tento proces probíhá nejrychleji v buněčném médiu bez buněk. V souladu s těmito výsledky jsou i data získaná měřením intracelulární chelatace v H9c2 buňkách, kterými jsme potvrdili, že BHAPI není schopný vázat ionty Fe. Až po aktivaci působením katecholaminů dosahuje téměř stejné chelatační účinnosti jako samotný HAPI. Našimi výsledky jsme dále potvrdili významný kardioprotektivní účinek HAPI vůči oxidačnímu poškození navozenému především preoxidovanými katecholaminy. Tomuto poškození byl schopný bránit ve všech testovaných koncentracích. Velmi podobné protektivní účinky vykazoval i prochelátor BHAPI, který také signifikantně bránil katecholaminové kardiotoxicitě. Tento významný protektivní účinek nebyl pozorován pouze u pokusů, kdy byl použit v nejvyšší dosažitelné koncentraci (600 μM), což je pravděpodobně způsobeno jeho vlastní toxicitou. Zjistili jsme, že jeho akutní toxicita (24 h) je vyšší než u parentního chelátoru HAPI, avšak v dlouhodobých experimentech (72 h) tomu bylo naopak.

4.4 KATALYTICKÉ INHIBITORY TOPOISOMERASY II MODULUJÍ ROZDÍLNĚ TOXICITU ANTRACYKLINŮ V SRDEČNÍCH A NÁDOROVÝCH BUŇKÁCH

Vávrová A, Jansová H, Macková E, Macháček M, Hašková P, Tichotová L, Štěrba M, Šimůnek T. Catalytic inhibitors of Topoisomerase II differently modulate the toxicity of anthracyclines in cardiac and cancer cells. PLoS One. 2013;8(10):e76676.

Jedinou registrovanou látkou užívanou pro farmakologickou prevenci ANT kardiotoxicity je DEX, který kromě metabolizace a/nebo rozkladu na chelatačně aktivní látku ADR-925, působí jako katalytický inhibitor TOP II. Jelikož DEX působí na stejný enzym jako samotné ANT, objevily se obavy ze snížení jejich antiproliferačního účinku. Tato studie se proto zabývala sledováním kardioprotektivních vlastností tří komerčně dostupných katalytických inhibitorů TOP II, DEX, jeho analogu sobuzoxanu a merbaronu vůči ANT toxicitě na primární linii potkaních neonatálních ventrikulárních kardiomyocytů (NVCM). Dále byla studována antiproliferační aktivita těchto látek a jejich kombinace s DOX a DAU na buněčné linii HL-60, lidské promyelocytární leukémie.

Naše *in vitro* pokusy potvrdily schopnost DEX významně chránit NVCM buňky před toxicitou navozenou inkubací s DAU nebo DOX v klinicky relevantních koncentracích. Protektivní vlastnosti byly pozorovány i u sobuzoxanu a merbaronu. Tyto výsledky byly potvrzeny i měřením aktivity kaspas, které se podílí na aktivaci apoptózy. Dalším důkazem podporujícím mechanismus kardioprotekce prostřednictvím inhibice TOP II, je fakt, že ani jedna ze studovaných látek nebyla schopna chránit NVCM buňky před poškozením navozeném H₂O₂. Tuto teorii potvrzují i výsledky chelatační účinnosti měřené kalceinovou metodou v H9c2 buňkách. Sobuzoxan ani merbaron nebyl schopný vázat Fe z LIP, pouze DEX vykazoval mírnou chelatační aktivitu, asi 25 % aktivity referenčního chelátoru Fe SIH. Ve shodě s těmito výsledky je i měření obsahu GSH a GSSG po inkubaci s DAU, ve kterých nebyla zaznamenána žádná signifikantní změna v obsahu obou forem GSH ani po preinkubaci s DEX.

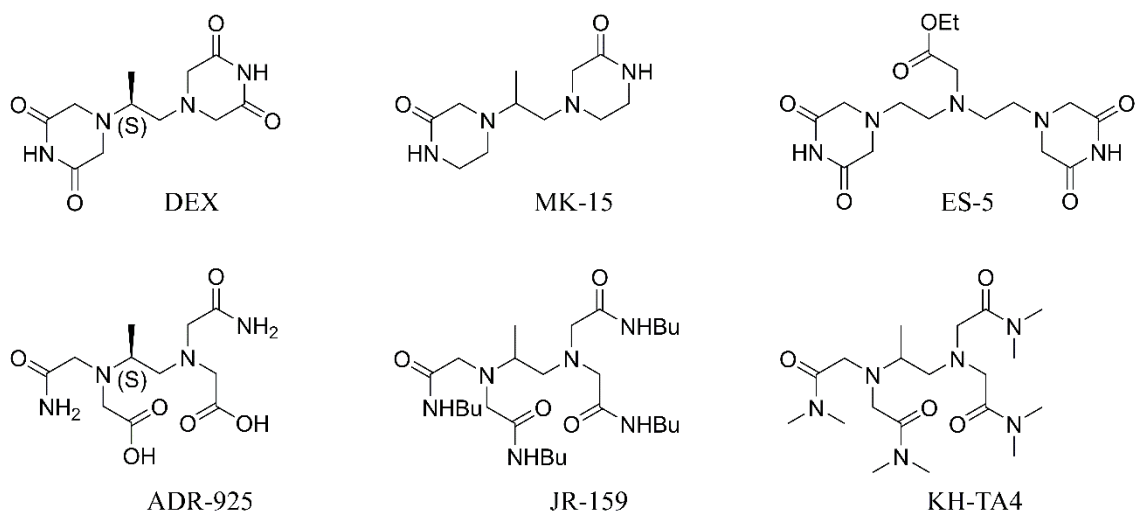
Pro hodnocení ovlivnění antiproliferační aktivity DAU a DOX katalytickými inhibitory TOP II jsme použili metodu dle Chou-Talalay (Chou and Talalay, 1983) s vyhodnocením MTT testem. Našimi výsledky jsme nepotvrdili obavy ze snížení ANT účinnosti. Zjistili jsme, že ani jeden ze studovaných katalytických inhibitorů nesnižuje ANT toxicitu, naopak působí spíše synergicky. Silný synergismus byl pozorován zejména v nižších koncentracích. Tyto výsledky byly potvrzeny i stanovením aktivity kaspas, kdy při kombinaci látek docházelo k jejich vyšší aktivaci než při použití jednotlivých látek samostatně.

4.5 OVLIVNĚNÍ ANTRACYKLINOVÉ KARDIOTOXICITY NOVĚ SYNTETIZOVANÝMI ANALOGY DEXRAZOXANU

Jirkovská-Vávrová A, Roh J, Lenčová-Popelová O, Jirkovský E, Hrušková K, Potůčková-Macková E, Jansová H, Hašková P, Martínková P, Eisner T, Kratochvíl J, Šus J, Macháček M, Vostatková-Tichotová L, Geršl V, Kalinowski DS, Muller MT, Richardson DR, Vávrová K, Štěrba M and Šimůnek T. Synthesis and analysis of novel analogues of dexrazoxane and its open-ring hydrolysis product for protection against anthracycline cardiotoxicity *in vitro* and *in vivo*. *Toxicology Research*. 2015;4:1098-1114.

DEX je látka ze skupiny bis-dioxopiperazinů, jejíž protektivní vlastnosti u ANT kardiotoxicity byly objeveny spíše náhodou, a i proto přesný mechanismus tohoto účinku není stále zcela objasněn. Cílem této studie byla tudíž syntéza nových analogů DEX a jeho Fe-chelatujícího metabolitu ADR-925 se zaměřením na vztah struktury a kardioprotektivního účinku a snahu přispět k objasnění mechanismu kardioprotektivního působení.

Byly připraveny dva analogy DEX, a to MK-15 a ES-5. MK-15 je strukturně velmi podobný DEX, pouze terminální amid byl nahrazen imidem k omezení hydrolyzy a vzniku metabolitu chelatujícího Fe. U ES-5 byl modifikován spojovací řetězec. Modifikací ADR-925 byly navrženy dva analogy KH-TA4 a JR-159. Díky alkylamidovým substituentům mají tyto látky vyšší lipofilitu a měly by proto snadněji prostupovat biologickými membránami. Struktury studovaných látek jsou znázorněny na Obr. 15.



Obr. 15 Chemické struktury analogů DEX a ADR-925.

In vitro pokusy na NVCM buňkách jsme zjistili, že na rozdíl od DEX nejsou nové analogy schopné významně chránit tyto buňky před toxicitou DAU. Tyto výsledky byly potvrzeny i na modelu chronické ANT kardiotoxicity u králíků. Na buněčné linii lidské promyelocytární leukémie, HL-60, jsme stanovili, že ani jeden analog DEX nesnižuje protinádorový účinek ANT a že DEX a KH-TA4 působí sami o sobě antiproliferačně.

Pro objasnění molekulárních mechanismů rozdílné protektivní účinnosti DEX a jeho analogů byla nejprve zkoumána schopnost těchto látek chelátovat Fe v H9c2 buňkách, vyvazovat Fe z komplexu s DAU a zvyšovat mobilizaci Fe z buněk pomocí transferrinu značeného radioaktivním ^{59}Fe . Pouze analogy odvozené od ADR-925 vykazovaly určitou schopnost interagovat s ionty Fe. JR-159 byl schopný částečně vyvazovat Fe z komplexu s DAU, avšak tento proces byl velmi pomalý ve srovnání s referenčním chelátorem SIH. Kalceinovou metodou jsme stanovili, že kromě DEX, byl schopný vázat nitrobuněčné Fe pouze KH-TA4. Avšak opět byl tento efekt velmi slabý v porovnání se SIH. Žádná ze studovaných látek, ani DEX, pak nebyla schopná mobilizace Fe z H9c2 buněk.

Dalším předpokládaným mechanismem kardiotoxického působení ANT je inhibice TOP II β . Proto jsme se v dalších pokusech zaměřili na studium interakce DEX a jeho analogů s TOP II β v NVCM buňkách. U DEX jsme pozorovali časově závislou depleci TOP II β , avšak žádný jeho analog inhibici tohoto enzymu nenavozoval.

4.6 PROTEKTIVNÍ ÚČINEK ANORGANICKÝCH DUSIČNANŮ A DUSITANŮ PROTI ANTRACYKLINOVÉ KARDIOTOXICITĚ

Lenčová-Popelová O, Jirkovský E, Jansová H, Jirkovská-Vávrová A, Vostatková-Tichotová L, Mazurová Y, Adamcová M, Chládek J, Hroch M, Pokorná Z, Geršl V, Šimůnek T, Štěřba M. Cardioprotective effects of inorganic nitrate/nitrite in chronic antracycline cardiotoxicity: Comparison with dexrazoxane. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2016;91:92-103.

Několik předchozích studií poukázalo na nadějně kardioprotektivní účinky anorganických dusičnanů a dusitanů u ischemicko-reperfúzního poškození (Duranski et al., 2005; Ingram et al., 2013; Jones et al., 2015; Webb et al., 2004). Studie z roku 2011 dokonce prokázala protektivní efekt u akutní ANT kardiotoxicity u myši navozené jednorázovou dávkou DOX (Zhu et al., 2011). Jelikož přesný mechanismus tohoto působení není zcela objasněn a nebyla zkoumána ani jejich účinnost při chronickém poškození kardiomyocytů navozeném ANT, bylo cílem této práce určit jejich vliv na chronické projevy ANT kardiotoxicity, přispět k objasnění mechanismů jejich protektivního působení a získané výsledky porovnat s vlastnostmi DEX.

Dusičnan sodný nebyl na modelu chronické ANT kardiotoxicity králíků schopný zlepšovat žádný ze studovaných parametrů, na druhou stranu dusitan sodný použitý ve vyšší koncentraci (5 mg/kg) bránil předčasnému úhynu zvířat a zlepšoval dílčí parametry některých drah podílejících se na ANT kardiotoxicitě. Pozitivní vliv měl především na mitochondriální parametry, což bylo potvrzeno i v *in vitro* pokusech stanovením potenciálu vnitřní mitochondriální membrány. Pozitivní výsledky byly zaznamenány také u narušení exprese genů důležitých proteinů přenášejících vápník. I přes tyto nadějně výsledky nebyl schopný bránit významnému snížení srdeční funkce, uvolňování troponinu T, lipoperoxidaci myokardu a také jeho remodelaci. V *in vitro* pokusech nedokázal zabránit úbytku viability H9c2 ani NVCM buněk.

Z našich výsledků vyplývá, že dusitany mohou částečně modulovat některé parametry ANT kardiotoxicity, převážně ty mitochondriální, avšak celková kardioprotekce je na rozdíl od DEX nedostatečná. DEX, katalytický inhibitor TOP II, zlepšoval téměř všechny námi stanovované parametry a bránil tak funkčním,

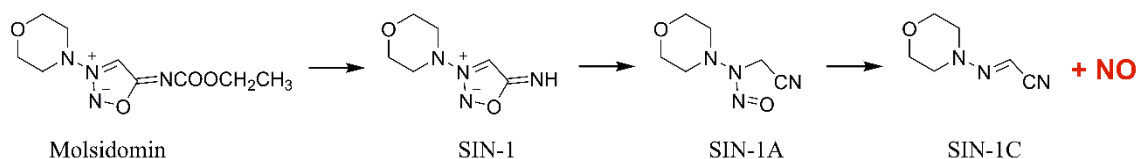
morfologickým a biochemickým projevům chronické ANT kardiotoxicity. Na druhou stranu však DEX vykazoval pouze omezené kardioprotektivní účinky u ischemicko-reperfúzního poškození *in vitro* i *in vivo* (Neckar et al., 2012). Vzhledem k těmto rozdílným výsledkům jsme se zaměřili na mechanismus jeho účinku.

V poslední době se přikládá největší význam TOP II β , jako hlavnímu cíli ANT kardiotoxicity, kdy interakcí ANT s tímto enzymem dochází ke vzniku dvojitého zlomu a tudíž i poškození DNA kardiomyocytů (Sawyer, 2013). Sledovali jsme proto vliv DEX a dusitanu na množství tohoto enzymu v H9c2 a NVCM buňkách a také v myokardu levé komory králíků. Ani v jednom z těchto modelů nebyl dusitan schopný ovlivňovat množství TOP II β . Oproti tomu DEX navodil depleci tohoto enzymu ve všech vzorcích, čímž brání interakci TOP II β s ANT a tudíž i poškození srdečních buněk.

4.7 STUDIUM VLIVU MOLSIDOMINU NA KARDIOTOXICKÉ A ANTIPROLIFERAČNÍ ÚČINKY ANTRACYKLINŮ

Lenčová-Popelová O, Jansová H, Jirkovský E, Bureš J, Jirkovská-Vávrová A, Mazurová Y, Vostatková L, Adamcová M, Hroch M, Pokorná Z, Kovaříková P, Šimůnek T, Štěrba M. Are cardioprotective effects of NO-releasing drug molsidomine translatable to chronic anthracycline cardiotoxicity settings? (manuskript)

V této studii jsme se zaměřili na klinicky užívaný donor NO, molsidomin. Ten je velmi rychle metabolizován jaterními enzymy na aktivní metabolit 3-morfolinosydnonimin (SIN-1), který podléhá spontánní degradaci a uvolňuje NO (Obr. 16) (Rosenkranz et al., 1996). Cílem této práce bylo stanovit protektivní potenciál molsidominu, respektive jeho aktivního metabolitu SIN-1, v *in vitro* i *in vivo* modelech ANT kardiotoxicity. Dále jsme zjišťovali, zda SIN-1 negativně neovlivňuje protinádorovou účinnost ANT či nevyvolává nitrační stres.



Obr. 16 Zjednodušené schéma aktivace molsidominu na látky poskytující NO (Rosenkranz et al., 1996).

V *in vitro* pokusech, na H9c2 myoblastech a izolovaných neonatálních kardiomyocytech (NVCM), jsme používali přímo aktivní metabolit molsidominu, SIN-1. Zjistili jsme, že SIN-1 je schopný významně chránit obě buněčné linie proti DAU toxicitě, avšak až v poměrně vysokých koncentracích. U buněčné linie H9c2 byl protektivní účinek pozorován v koncentracích 10 – 100 μ M a u NVCM v rozmezí 1 – 2 mM. Ve vyšších koncentracích pak protektivní účinek vymizel, pravděpodobně díky vlastní toxicitě SIN-1. Na buněčné linii lidské promyelocytární leukémie (HL-60) jsme určovali vliv SIN-1 na antiproliferační účinnost DAU a zjistili jsme, že v nízkých (1 – 10 nM), klinicky relevantních, koncentracích má SIN-1 určitou antiproliferační aktivitu. Avšak ve

vyšších koncentracích, u kterých byl pozorován kardioprotektivní účinek, SIN-1 protinádorový efekt DAU snižoval. Tyto výsledky nás vedly k domněnce, že dochází k určité interakci mezi DAU a SIN-1. Pomocí HPLC-MS jsme ukázali, že SIN-1 a/nebo jeho rozkladné produkty působí rychlý chemický rozklad DAU.

V *in vivo* pokusech byl molsidomin králíkům podáván ve dvou různých koncentracích (0,025 a 0,5 mg/kg, *i.v.*), avšak výsledky neprokázaly žádnou protektivní účinnost.

5 SOUHRNNÁ DISKUSE

Kardiovaskulární choroby jsou (spolu s nádorovými onemocněními) nejčastější příčinou úmrtí obyvatel vyspělých států. Ačkoliv se většinou jedná o multifaktoriální onemocnění, důležitou roli v jejich rozvoji hraje dle mnoha dostupných studií oxidační stres (Griendling and FitzGerald, 2003). V současné době je prevence těchto onemocnění založená převážně na režimových opatřeních a dietě. Mnoho studií sledovalo např. vliv antioxidantů na oxidační poškození srdečních buněk, avšak většina z nich došla k negativním výsledkům (Hennekens et al., 1996; Lee et al., 2012). Spíše než následné vychytávání již vzniklých ROS, se zdá být nadějnějším přístupem přímo prevence jejich vzniku. Toho může být dosaženo chelátory Fe, které vazbou volného Fe tvoří redoxně neaktivní komplexy a brání tak rozvoji Haber-Weissovy reakce, při které vzniká nadměrné množství ROS, převážně velmi reaktivního a toxického $\cdot\text{OH}$ (Franz, 2013; Galey, 2001). Nadměrná tvorba ROS vede k poškození biomolekul a následně i souvisejících orgánů.

Chelátory Fe jsou chemicky variabilní skupinou látek, jež jsou v klinické praxi používány k léčbě nadměrné zátěže Fe, která může být způsobena např. častými krevními transfuzemi u β -talasemie či jiných typů anemií (Andrews and Schmidt, 2007). Mnoho studií také poukazuje na jejich nadějně využití v léčbě nádorových onemocnění (Richardson et al., 2009). Některé z nich jsou již zařazeny do klinického hodnocení (Hatcher et al., 2008; Yu et al., 2006). V této práci jsme se ale zaměřili na jejich kardioprotektivní potenciál u patologických stavů souvisejících s oxidačním stresem.

Již dřívější výsledky různých výzkumných skupin popsaly nadějně kardioprotektivní účinky převážně malých, lipofilních chelátorů Fe, jako je např. L1 a ICL670A nebo SIH (Bendova et al., 2010; Haskova et al., 2011; Hašková et al., 2011; Horackova et al., 2000; Kontoghiorghe et al., 2014; Simunek et al., 2005a; Wongjaikam et al., 2015). V této práci jsme se zaměřili zejména na vlastnosti klinicky užívaného triazolového chelátoru Fe ICL670A (deferasirox), experimentálního chelátoru SIH ze skupiny aroylhydrazonů a od něj odvozeného HAPI. Chelátor HAPI byl navržen tak, aby se zvýšila stabilita hydrazonové vazby v molekule SIH (Hruskova et al., 2011), což bylo potvrzeno i výsledky této práce.

U všech tří chelátorů jsme stanovili vysokou schopnost chelatovat ionty Fe jak v roztoku tak i v H9c2 buňkách. S těmito výsledky koreluje skutečnost, že všechny látky významně chránily H9c2 buňky před oxidačním poškozením vyvolaném H₂O₂. Tento protektivní efekt ovšem ve vysokých koncentracích klesal, což bylo nejvíce patrné v případě chelátoru ICL670A. Bylo to pravděpodobně způsobeno vlastní toxicitou látek, která byla také u ICL670A nejvyšší. Toxicita SIH a HAPI byla po 24 hodinách podobná, ale v dlouhodobém experimentu byl chelátor HAPI výrazně toxičtější. Domníváme se, že to bylo způsobeno vyšší stabilitou nově připraveného chelátoru HAPI. Našimi pokusy jsme také prokázali, že toxicita zkoumaných chelátorů Fe je způsobena deplecí Fe, neboť jeho přidáním došlo ke snížení či úplnému vymizení jejich toxicity. V naší práci ukázal SIH nejlepší poměr cytoprotektivní účinnosti a vlastní toxicity, avšak nevýhodou je jeho rychlý rozklad. Proto jsme se rozhodli zaměřit také na vlastnosti jeho rozkladných produktů, což ukázalo, že hlavním rozkladným produktem je, vedle isoniazidu (INH), salicylaldehyd (SAL). INH je netoxická látka bez schopnosti chelatovat Fe a chránit H9c2 buňky před působením H₂O₂. Na druhou stranu SAL významně vázal intracelulární ionty Fe a signifikantně bránil H₂O₂ toxicitě. Z těchto dat vyplývá, že i když je SIH velmi nestabilní látkou, rozkládá se převážně na degradační produkt SAL, který si zachovává výhodné chelatační a kardioprotektivní vlastnosti.

Toxicita chelátorů Fe, způsobená deplecí Fe a jeho odnímáním z důležitých proteinů, je závažnou nevýhodou těchto látek. Z tohoto důvodu byly připraveny prochelátory Fe, které se aktivují pouze v patologických podmínkách oxidačního stresu. Jedná se o prochelátory, kde je fenolický hydroxyl nezbytný pro chelataci maskován boronylovou chránící skupinou. Struktury těchto látek jsou odvozené od námi studovaných chelátorů Fe (Obr. 13). V této práci jsme se zabývali pěti prochelátory Fe: BSIH a BSIH-PD (odvozené od SIH), BHAPI (odvozen od HAPI) a prochelátory odvozenými od ICL670A (TRA-IMM a TIP). Poslední zmíněné látky, odvozené od ICL670A, byly poměrně hodně toxické a nevykazovaly téměř žádnou protektivní účinnost, proto jsme se s nimi již v dalších experimentech nezabývali.

U prochelátoru BHAPI byla již dříve popsána protektivní účinnost vůči poškození vyvolaném H₂O₂ a redoxně aktivním herbicidem paraquatem na ARPE-19 buňkách (Kielar et al., 2012a). Námi vyvinutou metodou HPLC-UV jsme potvrdili schopnost BHAPI se aktivovat na chelatačně účinný HAPI prostřednictvím ROS a také dobrou

stabilitu obou látek. V našich experimentech byla také sledována aktivace pomocí katecholaminů (adrenalin). Detekovali jsme úplný rozklad BHAPI za současného vzniku téměř ekvimolárního množství chelátoru HAPI. S těmito daty souvisí i výsledky potvrzující výbornou chelatační účinnost jak HAPI tak i prochelátoru BHAPI po inkubaci s preoxidovanými katecholaminy; bez této preinkubace nebyl BHAPI vůbec schopný ionty Fe vázat. U obou látek byla potvrzena i statisticky významná protektivní účinnost vůči katecholaminové kardiotoxicitě na H9c2 buňkách. Velmi podobné výsledky byly pozorovány i u poškození vyvolaném H₂O₂.

Dalšími zkoumanými prochelátory byly ty odvozené od chelátoru SIH. BSIH a BSIH-PD po aktivaci H₂O₂ dosahovaly velmi vysoké chelatační účinnosti, v roztoku téměř srovnatelné s jejich mateřskou látkou SIH. Jejich schopnost vázat intracelulární Fe byla významně nižší. Domníváme se ovšem, že to bylo způsobeno částečnou detoxikací H₂O₂ antioxidantními mechanismy buněk, čímž nemohlo docházet k úplné přeměně na aktivní chelátor SIH. Tato domněnka byla potvrzena také výsledky HPLC analýzy rozkladných produktů BSIH, kde byl jeho rozpad mnohem menší v buněčném médiu s buňkami než bez nich. Protektivní potenciál BSIH vůči H₂O₂ byl popsán již dříve na ARPE-19 buňkách (Charkoudian et al., 2008). V našich pokusech oba prochelátory významně chránily H9c2 buňky před toxicitou vyvolanou H₂O₂. Největší výhodou prochelátoru BSIH však byla jeho velmi nízká toxicita, která byla zachována i v dlouhodobých experimentech. Prochelátor Fe BSIH je proto nadějnou látkou vhodnou pro další hodnocení. Zajímavé by bylo především sledování jeho účinnosti v komplexnějším *in vivo* modelu kardiovaskulárního či jiného onemocnění spojeného s oxidačním stresem.

Dlouhou dobu se předpokládalo, že chelatace Fe je i mechanismem kardioprotektivního působení klinicky užívaného DEX u ANT kardiotoxicity (Hasinoff et al., 1998). ANT jsou velmi účinná a často používaná protinádorová léčiva, jejichž užívání v klinické praxi je limitováno jejich kardiotoxicitou. Jedná se o velmi závažný nežádoucí účinek, který může vést až ke kardiomyopatii a srdečnímu selhání (Hrdina et al., 2000). Přesný mechanismus tohoto účinku není stále zcela objasněn, avšak podle tradiční hypotézy se předpokládalo, že významnou roli hraje produkce ROS v myokardu katalyzovaná Fe. Proto bylo provedeno několik studií zabývajících se využitím chelátorů Fe v prevenci ANT kardiotoxicity (Ammar et al., 2011; Herman et al., 1994; Hershko

et al., 1993; Link et al., 1996; Simunek et al., 2005b; Sterba et al., 2007; Sterba et al., 2006; Voest et al., 1994). Jako příklad za všechny lze uvést výsledky námi studovaného chelátoru Fe SIH (Simunek et al., 2008; Sterba et al., 2007). V těchto studiích bylo prokázáno, že SIH je schopný částečně ale signifikantně zlepšovat ANT navozenou kardiotoxicitu jak *in vitro*, tak i *in vivo*. Zajímavý závěr těchto studií spočívá ve zjištění, že SIH neměl téměř žádný vliv na lipoperoxidaci navozenou ANT, z čehož lze usuzovat, že jeho kardioprotekce je způsobena jiným mechanismem než je inhibice produkce ROS. Na druhou stranu bylo ale potvrzeno, že protektivní efekt je závislý na Fe, neboť jeho přidáváním byl protektivní efekt snižován. Dále bylo zjištěno, že v koncentracích ve kterých SIH snižoval ANT kardiotoxicitu, byl navíc schopný zvyšovat antiproliferační účinnost ANT. Jelikož chelatací Fe nedocházelo ke snížení protinádorové účinnosti ANT, usuzuje se, že vznik ROS katalyzovaný Fe není hlavním mechanismem účinnosti ANT. Žádný ze studovaných chelátorů Fe ovšem nedosahoval účinnosti katalytického inhibitoru topoisomerasy II (TOP II), DEX, ačkoli se jedná o mnohem silnější a selektivnější chelátory Fe než je hydrolytický, chelatačně aktivní metabolit DEX, ADR-925 (Popelova et al., 2009). Z tohoto důvodu se od této teorie spíše ustupuje a stále větší váha je přisuzována katalytické inhibici TOP II β v kardiomyocytech (Vejjongsa and Yeh, 2014).

My jsme se v našich dalších studiích zaměřili nejen na katalytické inhibitory TOP II, ale také na možnost využití látek poskytujících oxid dusnatý (NO), u kterých byla již dříve prokázána kardioprotektivní účinnost např. u ischemicko-reperfučního poškození (Duranski et al., 2005; Ingram et al., 2013; Jones et al., 2015; Schluter et al., 1996) i u akutní ANT kardiotoxicity (Disli et al., 2013; Zhu et al., 2011).

V *in vivo* studii dusičnan sodný nebyl schopný zlepšovat žádný ze sledovaných parametrů, pouze vyšší dávka dusitanu sodného zvyšovala přežívání zvířat a zlepšovala některé dílčí parametry, převážně ty mitochondriální. Tato skutečnost byla potvrzena i v *in vitro* pokusech na H9c2 a NVCM buňkách, kde kardioprotekce nebyla dostačující, avšak dusitan zvyšoval mitochondriální aktivitu. Podobnou studii jsme provedli také s molsidominem. Tato látka je v klinické praxi používána k dlouhodobé léčbě anginy pectoris a je přímým donorem NO. Opět jsme se zaměřili na jeho potenciál chránit srdeční buňky před chronickými změnami způsobenými ANT a zjistili jsme, že v *in vivo* experimentech nevykazoval žádnou schopnost snižovat mortalitu zvířat, rozvoj srdečního

selhání ani morfologické změny vyvolané DAU. V *in vitro* pokusech byl ve vyšších koncentracích pozorován velmi významný protektivní účinek. Zjistili jsme ovšem, že v těchto koncentracích také dochází k velmi významnému snížení antiproliferační aktivity ANT. HPLC-MS analýzou bylo dokázáno, že aktivní metabolit molsidominu, SIN-1, působí velmi rychlý rozklad DAU na zatím blíže nespecifikované rozkladné produkty. Tato významná interakce způsobila jednak téměř úplnou ztrátu protinádorové účinnosti a byla také příčinou zdánlivého kardioprotektivního účinku. Velmi zajímavé se ovšem zdá být použití kombinace DAU s nízkými koncentracemi SIN-1, kdy na druhou stranu antiproliferační účinek ANT zesiloval. Ačkoli použití anorganického dusitanu částečně zlepšovalo dílčí parametry ANT kardiotoxicity, nedosahovalo vynikající aktivity DEX. Proto jsme se v dalších studiích zaměřili na objasnění jeho kardioprotektivního účinku a také na studium jeho nových analogů.

I když je DEX velmi účinným kardioprotektivem, jeho užívání v klinické praxi je limitováno jeho nežádoucími účinky, jako je např. hematotoxicita (Minotti et al., 2004), vysokou cenou a jelikož je katalytickým inhibitorem TOP II a působí tak na stejný enzym jako ANT, i obavami ze snížení protinádorového účinku ANT. V naší studii jsme proto studovali nové analogy DEX. Podařilo se připravit dva deriváty DEX (MK-15 a ES-5) a dva „otevřené“ analogy chelatačně účinného metabolitu DEX, ADR-925 (KH-TA4 a JK-159). Výsledky naší studie ukazují, že některé z nově připravených analogů byly schopné částečně snižovat toxicitu navozenou H₂O₂ a u některých byla pozorována i velmi malá schopnost vázat ionty Fe, avšak žádný z nich nebyl schopný významně bránit ANT kardiotoxicitě *in vivo* ani *in vitro*. DEX naopak téměř úplně chránil kardiomyocyty před rozvojem ANT kardiotoxicity, avšak nevykazoval žádný protektivní efekt u poškození způsobeném H₂O₂. Analýzou pomocí western blotu jsme zjistili, že pouze DEX je schopný působit depleci TOP II β a pravděpodobně tak i bránit navázání ANT na zmiňovaný enzym, tvorbě dvojitých zlomů a následnému poškození kardiomyocytů. Pro ověření této teorie jsme další studií zjišťovali protektivní vlastnosti dalších dvou komerčně dostupných katalytických inhibitorů TOP II.

V naší studii jsme se zabývali katalytickým inhibitorem sobuzoxanem a merbaronem. U obou látek bylo zjištěno, že nejsou schopné vázat ionty Fe a že nedokáží, stejně jako DEX, bránit poškození navozeném H₂O₂, což umožňují látky chelataující Fe, jak již bylo prokázáno našimi experimenty zmíněnými výše. Na druhou stranu, obě látky

poskytovaly podobnou protekci jako DEX u ANT kardiotoxicity. Dále jsme nepotvrdili obavy ze snížení antiproliferační aktivity ANT při současném užívání katalytických inhibitorů TOP II. Naopak jsme zjistili, že většina kombinací měla spíše synergický efekt, což bylo velmi výrazné hlavně v nižších koncentracích. Tento jev je pravděpodobně způsoben různou distribucí a regulací jednotlivých isoform TOP II v různých tkáních. Srdeční tkáň obsahuje více TOP II β , na kterou cílí katalytické inhibitory, a u nádorových buněk zas převládá isoforma α , která je hlavním cílem antiproliferačního působení ANT (Vejongsa et al. 2014). Ze získaných výsledků vyplývá, že naši další pozornost si zaslouží studium farmakokinetiky a metabolismu DEX a příprava jeho nových analogů nejlépe se schopností selektivní inhibice TOP II β .

6 ZÁVĚRY

- Chelátory Fe jsou účinné protektivní látky, které brání průběhu Haber-Weissovy reakce, nadměrnému vzniku ROS a následnému oxidačnímu poškození kardiomyocytů. Byla u nich ale také stanovena dávkově závislá toxicita způsobená rozvratem přirozené homeostázy Fe. Z námi studovaných látek vykázal nejvýhodnější poměr protektivního účinku a vlastní toxicity chelátor SIH.
- Prochelátory Fe jsou nadějnou strategií omezující problém klasických chelátorů spojený s deplecí Fe, neboť nemají afinitu k těmto iontům, dokud nejsou aktivovány v patologických podmínkách oxidačního stresu. Výhodné vlastnosti vykázaly prochelátory BSIH, BSIH-PD a BHAPI. U všech byly stanoveny chelatační účinky až po aktivaci způsobenou ROS a významná kardioprotekce u modelového oxidačního poškození vyvolaném H₂O₂. Prochelátor BHAPI byl studován také v podmínkách katecholaminové kardiotoxicity a opět byl prokázán signifikantní ochranný efekt.
- Velmi zajímavé vlastnosti vykázal zejména prochelátor BSIH, který významně bránil oxidačnímu poškození způsobeném nejen H₂O₂, ale i dalšími prooxidanty. Navíc u něj nebyla zjištěna téměř žádná vlastní buněčná toxicita a to ani v dlouhodobých experimentech. Také jsme zjistili, že ačkoliv se aktivuje na sice velmi účinný, avšak nestabilní chelátor SIH, zachovává si velmi výhodné vlastnosti, neboť hlavním rozkladným produktem je salicylaldehyd, který také vykazuje významné chelatační a tím i protektivní vlastnosti.
- *In vitro* pokusy jsme zjistili, že dusitan sodný byl schopný částečně zlepšovat mitochondriální parametry ANT kardiotoxicity bez ovlivnění jejich antiproliferační aktivity, avšak nebránil ztrátě viability H9c2 ani NVCM buněk. Tato dílčí, avšak nedostatečná, protekce byla potvrzena i na chronickém modelu ANT kardiotoxicity králíků.

- Aktivní metabolit molsidominu, SIN-1, působil ve vysokých koncentracích rozklad ANT a tak i ztrátu jejich kardiotoxického ovšem i protinádorového účinku *in vitro*. Na druhou stranu v nízkých, klinicky relevantních, koncentracích sám do určité míry snižoval proliferaci HL-60 buněk; v kombinaci s ANT byl výsledný efekt aditivní. V *in vivo* pokusech nebyla stanovena žádná kardioprotektivní účinnost.
- Bylo zjištěno, že kromě DEX i další katalytické inhibitory TOP II (sobuzoxan, merbaron) jsou schopné významně bránit rozvoji ANT kardiotoxicity, což je v souladu s recentní teorií, že kardioprotekce DEX je navozena inhibicí TOP II β v myocytech, spíše než tradičně uváděnou chelatací Fe.
- Současné podávání katalytických inhibitorů TOP II s ANT mělo konzistentně synergický antiproliferační účinek na leukemické buňky HL-60.

7 PODÍL PŘEDKLADATELKY NA PUBLIKACÍCH ZAHRNUTÝCH V DISERTAČNÍ PRÁCI

- I.** Jansová H, Macháček M, Wang Q, Hašková P, Jirkovská A, Potůčková E, Kielar F, Franz KJ, Šimůnek T. Comparison of various iron chelators and prochelators as protective agents against cardiomyocyte oxidative injury. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014;74:210-221.
- Kultivace buněčných linií H9c2, 3T3, HaCaT a HepG2
 - Stanovení toxicit a protektivních účinků studovaných látek
 - Měření impedance pro sledování proliferace buněk v čase
 - Fotodokumentace buněčné morfologie, stanovení potenciálu vnitřní mitochondriální membrány a neporušenosti lysozomů H9c2 buněk
 - Stanovení chelatační účinnosti studovaných látek v roztoku a v H9c2 buňkách
 - Stanovení enzymové aktivity kaspas
 - Hlavní podíl na analýze dat a textu publikace
- II.** Jansová H, Bureš J, Macháček M, Hašková P, Jirkovská A, Roh J, Wang Q, Franz KJ, Kovaříková P, Šimůnek T. Characterization of cytoprotective and toxic properties of iron chelator SIH, prochelator BSIH and their degradation products. *Toxicology*. 2016;350:15-24.
- Kultivace buněčné linie H9c2
 - Stanovení toxicit a protektivních účinků studovaných látek
 - Stanovení potenciálu vnitřní mitochondriální membrány
 - Stanovení chelatační účinnosti studovaných látek v buňkách
 - Příprava vzorků pro HPLC analýzu
 - Hlavní podíl na analýze dat a textu publikace

- III.** Hašková P, Jansová H, Bureš J, Macháček M, Jirkovská A, Franz KJ, Kovaříková P, Šimůnek T. Cardioprotective effects of iron chelator HAPI and ROS-activated boronate prochelator BHAPI against catecholamine-induced oxidative cellular injury. (manuskript)
- Kultivace buněčné linie H9c2
 - Stanovení toxicit studovaných látek
 - Podíl na analýze dat a textu publikace
- IV.** Bureš J, Jansová H, Stariat J, Filipský T, Mladěnka P, Šimůnek T, Kučera R, Klimeš J, Wang Q, Franz KJ, Kovaříková P. LC-UV/MS methods for the analysis of prochelator – Boronyl salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (BSIH) and its active chelator salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2015;105:55-63.
- Příprava vzorků pro LC analýzu
 - Podíl na textu publikace
- V.** Vávrová A, Jansová H, Macková E, Macháček M, Hašková P, Tichotová L, Štěrba M, Šimůnek T. Catalytic inhibitors of Topoisomerase II differently modulate the toxicity of anthracyclines in cardiac and cancer cells. *PLoS One*. 2013;8(10):e76676.
- Kultivace buněčných linií H9c2 a HL-60
 - Studium antiproliferační aktivity zkoumaných látek a výpočet kombinačních indexů
 - Stanovení chelatační účinnosti studovaných látek v buňkách
 - Podíl na analýze dat a textu publikace
- VI.** Jirkovská-Vávrová A, Roh J, Lenčová-Popelová O, Jirkovský E, Hrušková K, Potůčková-Macková E, Jansová H, Hašková P, Martinková P, Eisner T, Kratochvíl J, Šus J, Macháček M, Vostatková-Tichotová L, Geršl V, Kalinowski DS, Muller MT, Richardson DR, Vávrová K, Štěrba M and Šimůnek T. Synthesis and analysis of novel analogues of dexrazoxane and its

open-ring hydrolysis product for protection against anthracycline cardiotoxicity *in vitro* and *in vivo*. Toxicology Research. 2015;4:1098-1114.

- Kultivace buněčné linie H9c2
- Stanovení chelatační účinnosti studovaných látek
- Podíl na analýze dat

VII. Lenčová-Popelová O, Jirkovský E, Jansová H, Jirkovská-Vávrová A, Vostatková-Tichotová L, Mazurová Y, Adamcová M, Chládek J, Hroch M, Pokorná Z, Geršl V, Šimůnek T, Štěrbá M. Cardioprotective effects of inorganic nitrate/nitrite in chronic anthracycline cardiotoxicity: Comparison with dexrazoxane. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 2016;91:92-103.

- Kultivace buněčné linie H9c2
- Stanovení toxicit a protektivních účinků studovaných látek (H9c2 buňky)
- Stanovení potenciálu vnitřní mitochondriální membrány
- Stanovení enzymové aktivity kaspas
- Podíl na analýze dat a textu publikace

VIII. Lenčová-Popelová O, Jansová H, Jirkovský E, Bureš J, Jirkovská-Vávrová A, Mazurová Y, Vostatková L, Adamcová M, Hroch M, Pokorná Z, Kovaříková P, Šimůnek T, Štěrbá M. Are cardioprotective effects of NO-releasing drug molsidomine translatable to chronic anthracycline cardiotoxicity settings? (manuskript)

- Kultivace buněčných linií H9c2 a HL-60
- Stanovení toxicit a protektivních účinků studovaných látek
- Stanovení potenciálu vnitřní mitochondriální membrány
- Stanovení produkce ROS fluoresceinovou metodou
- Studium antiproliferační aktivity zkoumaných látek
- Příprava vzorků pro HPLC analýzu
- Podíl na analýze dat a textu publikace

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Al-Anati L, Essid E, Reinehr R and Petzinger E (2009) Silibinin protects OTA-mediated TNF-alpha release from perfused rat livers and isolated rat Kupffer cells. *Molecular nutrition & food research* **53**:460-466.
- Al-Rousan RM, Paturi S, Laurino JP, Kakarla SK, Gutta AK, Walker EM and Blough ER (2009) Deferasirox removes cardiac iron and attenuates oxidative stress in the iron-overloaded gerbil. *Am J Hematol* **84**:565-570.
- Albina JE and Reichner JS (1998) Role of nitric oxide in mediation of macrophage cytotoxicity and apoptosis. *Cancer Metastasis Rev* **17**:39-53.
- Ammar el SM, Said SA, Suddek GM and El-Damarawy SL (2011) Amelioration of doxorubicin-induced cardiotoxicity by deferiprone in rats. *Canadian journal of physiology and pharmacology* **89**:269-276.
- Andrews NC and Schmidt PJ (2007) Iron homeostasis. *Annu Rev Physiol* **69**:69-85.
- Antholine W, Knight J, Whelan H and Petering DH (1977) Studies of the reaction of 2-formylpyridine thiosemicarbazone and its iron and copper complexes with biological systems. *Mol Pharmacol* **13**:89-98.
- Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G, Grein A, Orezzi P, Pol C and Spalla C (2000) Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. Reprinted from *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XI, Issue 6, Pages 1101-1110 (1969). *Biotechnol Bioeng* **67**:704-713.
- Aruoma OI (1994) Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **32**:671-683.
- Attieh ZK, Mukhopadhyay CK, Seshadri V, Tripoulas NA and Fox PL (1999) Ceruloplasmin ferroxidase activity stimulates cellular iron uptake by a trivalent cation-specific transport mechanism. *J Biol Chem* **274**:1116-1123.
- Aust SD (1995) Ferritin as a source of iron and protection from iron-induced toxicities. *Toxicology letters* **82-83**:941-944.
- Austin CA and Marsh KL (1998) Eukaryotic DNA topoisomerase II beta. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **20**:215-226.
- Babior BM (2000) Phagocytes and oxidative stress. *The American journal of medicine* **109**:33-44.
- Badria FA, Ibrahim AS, Badria AF and Elmarakby AA (2015) Curcumin Attenuates Iron Accumulation and Oxidative Stress in the Liver and Spleen of Chronic Iron-Overloaded Rats. *PLoS One* **10**:e0134156.
- Balogun E, Hoque M, Gong P, Killeen E, Green CJ, Foresti R, Alam J and Motterlini R (2003) Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem J* **371**:887-895.
- Barnabe N, Zastre JA, Venkataram S and Hasinoff BB (2002) Deferiprone protects against doxorubicin-induced myocyte cytotoxicity. *Free Radic Biol Med* **33**:266-275.

- Batist G, Ramakrishnan G, Rao CS, Chandrasekharan A, Gutheil J, Guthrie T, Shah P, Khojasteh A, Nair MK, Hoelzer K, Tkaczuk K, Park YC and Lee LW (2001) Reduced cardiotoxicity and preserved antitumor efficacy of liposome-encapsulated doxorubicin and cyclophosphamide compared with conventional doxorubicin and cyclophosphamide in a randomized, multicenter trial of metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* **19**:1444-1454.
- Beckman JS and Koppenol WH (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* **271**:C1424-1437.
- Beinert H, Holm RH and Münck E (1997) Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science* **277**:653-659.
- Bendova P, Mackova E, Haskova P, Vavrova A, Jirkovsky E, Sterba M, Popelova O, Kalinowski DS, Kovarikova P, Vavrova K, Richardson DR and Simunek T (2010) Comparison of clinically used and experimental iron chelators for protection against oxidative stress-induced cellular injury. *Chem Res Toxicol* **23**:1105-1114.
- Berdoukas V, Coates TD and Cabantchik ZI (2015) Iron and oxidative stress in cardiomyopathy in thalassemia. *Free Radic Biol Med* **88**:3-9.
- Berman E, Heller G, Santorsa J, McKenzie S, Gee T, Kempin S, Gulati S, Andreeff M, Kolitz J, Gabrilove J and et al. (1991) Results of a randomized trial comparing idarubicin and cytosine arabinoside with daunorubicin and cytosine arabinoside in adult patients with newly diagnosed acute myelogenous leukemia. *Blood* **77**:1666-1674.
- Berndt C, Kurz T, Selenius M, Fernandes AP, Edgren MR and Brunk UT (2010) Chelation of lysosomal iron protects against ionizing radiation. *Biochem J* **432**:295-301.
- 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.
- Berthiaume JM and Wallace KB (2007) Adriamycin-induced oxidative mitochondrial cardiotoxicity. *Cell biology and toxicology* **23**:15-25.
- Bindoli A, Rigobello MP and Deebble DJ (1992) Biochemical and toxicological properties of the oxidation products of catecholamines. *Free Radic Biol Med* **13**:391-405.
- Bird BR and Swain SM (2008) Cardiac toxicity in breast cancer survivors: review of potential cardiac problems. *Clin Cancer Res* **14**:14-24.
- Bonfante V, Bonadonna G, Villani F and Martini A (1980) Preliminary clinical experience with 4-epidoxorubicin in advanced human neoplasia. *Recent results in cancer research Fortschritte der Krebsforschung Progres dans les recherches sur le cancer* **74**:192-199.
- Bonfante V, Ferrari L, Villani F and Bonadonna G (1983) Phase I study of 4-demethoxydaunorubicin. *Invest New Drugs* **1**:161-168.
- Bors W, Michel C and Stettmaier K (1997) Antioxidant effects of flavonoids. *BioFactors (Oxford, England)* **6**:399-402.
- Borsari M, Gabbi C, Ghelfi F, Grandi R, Saladini M, Severi S and Borella F (2001) Silybin, a new iron-chelating agent. *J Inorg Biochem* **85**:123-129.

- Boucek RJ, Jr., Miracle A, Anderson M, Engelman R, Atkinson J and Dodd DA (1999) Persistent effects of doxorubicin on cardiac gene expression. *J Mol Cell Cardiol* **31**:1435-1446.
- Broholm H, Braendstrup O and Lauritzen M (2001) Nitric oxide synthase expression of oligodendrogliomas. *Clinical neuropathology* **20**:233-238.
- Bruynzeel AM, Niessen HW, Bronzwaer JG, van der Hoeven JJ, Berkhof J, Bast A, van der Vijgh WJ and van Groenigen CJ (2007a) The effect of monohydroxyethylrutoside on doxorubicin-induced cardiotoxicity in patients treated for metastatic cancer in a phase II study. *Br J Cancer* **97**:1084-1089.
- Bruynzeel AM, Vormer-Bonne S, Bast A, Niessen HW and van der Vijgh WJ (2007b) Long-term effects of 7-monohydroxyethylrutoside (monoHER) on DOX-induced cardiotoxicity in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* **60**:509-514.
- Buss JL, Torti FM and Torti SV (2003) The role of iron chelation in cancer therapy. *Curr Med Chem* **10**:1021-1034.
- Cakici N, Fakkkel TM, van Neck JW, Verhagen AP and Coert JH (2016) Systematic review of treatments for diabetic peripheral neuropathy. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*.
- Calabrese V, Bates TE, Mancuso C, Cornelius C, Ventimiglia B, Cambria MT, Di Renzo L, De Lorenzo A and Dinkova-Kostova AT (2008) Curcumin and the cellular stress response in free radical-related diseases. *Molecular nutrition & food research* **52**:1062-1073.
- Calvert JW and Lefter DJ (2009) Myocardial protection by nitrite. *Cardiovasc Res* **83**:195-203.
- Cappellini MD, Cohen A, Piga A, Bejaoui M, Perrotta S, Agaoglu L, Aydinok Y, Kattamis A, Kilinc Y, Porter J, Capra M, Galanello R, Fattoum S, Drelichman G, Magnano C, Verissimo M, Athanassiou-Metaxa M, Giardina P, Kourakli-Symeonidis A, Janka-Schaub G, Coates T, Vermynen C, Olivieri N, Thuret I, Opitz H, Ressayre-Djaffer C, Marks P and Alberti D (2006) A phase 3 study of deferasirox (ICL670), a once-daily oral iron chelator, in patients with beta-thalassemia. *Blood* **107**:3455-3462.
- Capranico G and Zunino F (1992) DNA topoisomerase-trapping antitumour drugs. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* **28a**:2055-2060.
- Caro AA, Commissariat A, Dunn C, Kim H, Garcia SL, Smith A, Strang H, Stuppy J, Desrochers LP and Goodwin TE (2015) Prooxidant and antioxidant properties of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone iron chelators in HepG2 cells. *Biochim Biophys Acta* **1850**:2256-2264.
- Classen S, Olland S and Berger JM (2003) Structure of the topoisomerase II ATPase region and its mechanism of inhibition by the chemotherapeutic agent ICRF-187. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:10629-10634.
- Cohen AR, Galanello R, Piga A, De Sanctis V and Tricta F (2003) Safety and effectiveness of long-term therapy with the oral iron chelator deferiprone. *Blood* **102**:1583-1587.

- Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, Garberg V, Lura D, Francis GS, Simon AB and Rector T (1984) Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med* **311**:819-823.
- Conner EM and Grisham MB (1996) Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)* **12**:274-277.
- Costa VM, Carvalho F, Bastos ML, Carvalho RA, Carvalho M and Remiao F (2011) Contribution of catecholamine reactive intermediates and oxidative stress to the pathologic features of heart diseases. *Curr Med Chem* **18**:2272-2314.
- Crack JC, Green J, Thomson AJ and Le Brun NE (2012) Iron–sulfur cluster sensor-regulators. *Current Opinion in Chemical Biology* **16**:35-44.
- Crack JC, Green J, Thomson AJ and Le Brun NE (2014) Iron-sulfur clusters as biological sensors: the chemistry of reactions with molecular oxygen and nitric oxide. *Accounts of chemical research* **47**:3196-3205.
- Creighton AM and Birnie GD (1969) The effect of bisdioxopiperazines on the synthesis of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and protein in growing mouse-embryo fibroblasts. *Biochem J* **114**:58p.
- Crichton R, Boelaert JR, Braun V, Hantke K, Marx JJM, Santos M and Ward R (2001) *Inorganic Biochemistry of Iron Metabolism*, John Wiley & Sons.
- Cutler RG (1984) Urate and ascorbate: their possible roles as antioxidants in determining longevity of mammalian species. *Archives of gerontology and geriatrics* **3**:321-348.
- Dautry-Varsat A, Ciechanover A and Lodish HF (1983) pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**:2258-2262.
- DeGraff W, Hahn SM, Mitchell JB and Krishna MC (1994) Free radical modes of cytotoxicity of adriamycin and streptonigrin. *Biochem Pharmacol* **48**:1427-1435.
- Deweese JE and Osheroff N (2009) Coordinating the two protomer active sites of human topoisomerase II α : nicks as topoisomerase II poisons. *Biochemistry* **48**:1439-1441.
- Dhalla NS, Adameova A and Kaur M (2010) Role of catecholamine oxidation in sudden cardiac death. *Fundamental & clinical pharmacology* **24**:539-546.
- Di Mascio P, Devasagayam TP, Kaiser S and Sies H (1990) Carotenoids, tocopherols and thiols as biological singlet molecular oxygen quenchers. *Biochem Soc Trans* **18**:1054-1056.
- Disli OM, Sarihan E, Colak MC, Vardi N, Polat A, Yagmur J, Tamtekin B and Parlakpinar H (2013) Effects of molsidomine against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *European surgical research Europäische chirurgische Forschung Recherches chirurgicales europeennes* **51**:79-90.
- Donovan A, Lima CA, Pinkus JL, Pinkus GS, Zon LI, Robine S and Andrews NC (2005) The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell metabolism* **1**:191-200.

- Dresdale AR, Barr LH, Bonow RO, Mathisen DJ, Myers CE, Schwartz DE, d'Angelo T and Rosenberg SA (1982) Prospective randomized study of the role of N-acetyl cysteine in reversing doxorubicin-induced cardiomyopathy. *American journal of clinical oncology* **5**:657-663.
- Dunn LL, Suryo Rahmanto Y and Richardson DR (2007) Iron uptake and metabolism in the new millennium. *Trends in cell biology* **17**:93-100.
- Duranski MR, Greer JJ, Dejam A, Jaganmohan S, Hogg N, Langston W, Patel RP, Yet SF, Wang X, Kevil CG, Gladwin MT and Lefer DJ (2005) Cytoprotective effects of nitrite during in vivo ischemia-reperfusion of the heart and liver. *The Journal of clinical investigation* **115**:1232-1240.
- Epsztejn S, Glickstein H, Picard V, Slotki IN, Breuer W, Beaumont C and Cabantchik ZI (1999) H-ferritin subunit overexpression in erythroid cells reduces the oxidative stress response and induces multidrug resistance properties. *Blood* **94**:3593-3603.
- Ewer MS and Lippman SM (2005) Type II chemotherapy-related cardiac dysfunction: time to recognize a new entity. *J Clin Oncol* **23**:2900-2902.
- Fang YZ, Yang S and Wu G (2002) Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)* **18**:872-879.
- Fattman CL, Allan WP, Hasinoff BB and Yalowich JC (1996) Collateral sensitivity to the bisdioxopiperazine dexrazoxane (ICRF-187) in etoposide (VP-16)-resistant human leukemia K562 cells. *Biochem Pharmacol* **52**:635-642.
- Filipsky T, Riha M, Hrdina R, Vavrova K and Mladenka P (2013) Mathematical calculations of iron complex stoichiometry by direct UV-Vis spectrophotometry. *Bioorganic chemistry* **49**:1-8.
- Fleming MD (2008) The regulation of hepcidin and its effects on systemic and cellular iron metabolism. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program*:151-158.
- Fleming RE and Sly WS (2002) Mechanisms of iron accumulation in hereditary hemochromatosis. *Annu Rev Physiol* **64**:663-680.
- Fontecave M (2006) Iron-sulfur clusters: ever-expanding roles. *Nat Chem Biol* **2**:171-174.
- Franz KJ (2013) Clawing back: broadening the notion of metal chelators in medicine. *Curr Opin Chem Biol* **17**:143-149.
- Fujita K, Shinpo K, Yamada K, Sato T, Niimi H, Shamoto M, Nagatsu T, Takeuchi T and Umezawa H (1982) Reduction of adriamycin toxicity by ascorbate in mice and guinea pigs. *Cancer Res* **42**:309-316.
- Fulbright JM, Egas-Bejar DE, Huh WW and Chandra J (2015) Analysis of redox and apoptotic effects of anthracyclines to delineate a cardioprotective strategy. *Cancer Chemother Pharmacol* **76**:1297-1307.
- Fulbright JM, Huh W, Anderson P and Chandra J (2010) Can anthracycline therapy for pediatric malignancies be less cardiotoxic? *Current oncology reports* **12**:411-419.
- Galey JB (2001) Recent advances in the design of iron chelators against oxidative damage. *Mini Rev Med Chem* **1**:233-242.

- Ganz T (2003) Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood* **102**:783-788.
- Ghio AJ, Nozik-Grayck E, Turi J, Jaspers I, Mercatante DR, Kole R and Piantadosi CA (2003) Superoxide-dependent iron uptake: a new role for anion exchange protein 2. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **29**:653-660.
- Goldenberg HA (1997) Regulation of mammalian iron metabolism: current state and need for further knowledge. *Critical reviews in clinical laboratory sciences* **34**:529-572.
- Gong Q, Zhou L, Xu S, Li X, Zou Y and Chen J (2015) High Doses of Daunorubicin during Induction Therapy of Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Clinical Trials. *PLoS One* **10**:e0125612.
- Goormaghtigh E, Huart P, Praet M, Brasseur R and Ruyschaert JM (1990) Structure of the adriamycin-cardiolipin complex. Role in mitochondrial toxicity. *Biophysical chemistry* **35**:247-257.
- Govers R and Rabelink TJ (2001) Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *American journal of physiology Renal physiology* **280**:F193-206.
- Grein A (1987) Antitumor anthracyclines produced by *Streptomyces peucetius*. *Advances in applied microbiology* **32**:203-214.
- Griendling KK and FitzGerald GA (2003) Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* **108**:1912-1916.
- Gulec S, Anderson GJ and Collins JF (2014) Mechanistic and regulatory aspects of intestinal iron absorption. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* **307**:G397-409.
- Hadzhieva M, Kirches E and Mawrin C (2014) Review: iron metabolism and the role of iron in neurodegenerative disorders. *Neuropathology and applied neurobiology* **40**:240-257.
- Halliwell B (2007) Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* **35**:1147-1150.
- Hasinoff BB (2002) Dexrazoxane (ICRF-187) protects cardiac myocytes against hypoxia-reoxygenation damage. *Cardiovasc Toxicol* **2**:111-118.
- Hasinoff BB, Hellmann K, Herman EH and Ferrans VJ (1998) Chemical, biological and clinical aspects of dexrazoxane and other bisdioxopiperazines. *Curr Med Chem* **5**:1-28.
- Hasinoff BB and Herman EH (2007) Dexrazoxane: how it works in cardiac and tumor cells. Is it a prodrug or is it a drug? *Cardiovasc Toxicol* **7**:140-144.
- Hasinoff BB and Patel D (2009) The iron chelator Dp44mT does not protect myocytes against doxorubicin. *J Inorg Biochem* **103**:1093-1101.
- 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.

- Hasinoff BB, Yalowich JC, Ling Y and Buss JL (1996) The effect of dexrazoxane (ICRF-187) on doxorubicin- and daunorubicin-mediated growth inhibition of Chinese hamster ovary cells. *Anticancer Drugs* **7**:558-567.
- Haskova P, Koubkova L, Vavrova A, Mackova E, Hruskova K, Kovarikova P, Vavrova K and Simunek T (2011) Comparison of various iron chelators used in clinical practice as protecting agents against catecholamine-induced oxidative injury and cardiotoxicity. *Toxicology* **289**:122-131.
- Hašková P, Kovaříková P, Koubková L, Vávrová A, Macková E and Simůnek T (2011) Iron chelation with salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone protects against catecholamine autoxidation and cardiotoxicity. *Free Radic Biol Med* **50**:537-549.
- Hatcher H, Planalp R, Cho J, Torti FM and Torti SV (2008) Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **65**:1631-1652.
- Hennekens CH, Buring JE, Manson JE, Stampfer M, Rosner B, Cook NR, Belanger C, LaMotte F, Gaziano JM, Ridker PM, Willett W and Peto R (1996) Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *N Engl J Med* **334**:1145-1149.
- Hentze MW and Kuhn LC (1996) Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:8175-8182.
- Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B and Camaschella C (2010) Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell* **142**:24-38.
- 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.
- Hershko C, Link G, Tzahor M, Kaltwasser JP, Athias P, Grynberg A and Pinson A (1993) Anthracycline toxicity is potentiated by iron and inhibited by deferoxamine: studies in rat heart cells in culture. *The Journal of laboratory and clinical medicine* **122**:245-251.
- Hodges YK, Weinberger HD, Stephens J, Horwitz MA and Horwitz LD (2006) Desferri-Exochelin, a lipid-soluble, hexadentate iron chelator, effectively removes tissue iron. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* **148**:63-71.
- Hoffbrand AV, Cohen A and Hershko C (2003) Role of deferiprone in chelation therapy for transfusional iron overload. *Blood* **102**:17-24.
- Hoffbrand AV, Taher A and Cappellini MD (2012) How I treat transfusional iron overload. *Blood* **120**:3657-3669.
- Hogan FS, Krishnegowda NK, Mikhailova M and Kahlenberg MS (2007) Flavonoid, silibinin, inhibits proliferation and promotes cell-cycle arrest of human colon cancer. *J Surg Res* **143**:58-65.
- Horackova M, Ponka P and Byczko Z (2000) The antioxidant effects of a novel iron chelator salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone in the prevention of H(2)O(2) injury in adult cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* **47**:529-536.

- Horwitz LD and Rosenthal EA (1999) Iron-mediated cardiovascular injury. *Vasc Med* **4**:93-99.
- Horwitz LD, Sherman NA, Kong Y, Pike AW, Gobin J, Fennessey PV and Horwitz MA (1998) Lipophilic siderophores of Mycobacterium tuberculosis prevent cardiac reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:5263-5268.
- Hrdina R, Gersl V, Klíntová I, Šimunek T, Macháková J and Adamcová M (2000) Anthracycline-induced cardiotoxicity. *Acta Medica (Hradec Kralove)* **43**:75-82.
- Hrusková K, Kovariková P, Bendová P, Hásková P, Macková E, Štárlat J, Vavřová A, Vavřová K and Šimunek T (2011) Synthesis and initial in vitro evaluations of novel antioxidant aroylhydrazone iron chelators with increased stability against plasma hydrolysis. *Chem Res Toxicol* **24**:290-302.
- Huang ZX, May PM, Quinlan KM, Williams DR and Creighton AM (1982) Metal binding by pharmaceuticals. Part 2. Interactions of Ca(II), Cu(II), Fe(II), Mg(II), Mn(II) and Zn(II) with the intracellular hydrolysis products of the antitumour agent ICRF 159 and its inactive homologue ICRF 192. *Agents Actions* **12**:536-542.
- Chan W, Taylor AJ, Ellims AH, Lefkovits L, Wong C, Kingwell BA, Natoli A, Croft KD, Mori T, Kaye DM, Dart AM and Duffy SJ (2012) Effect of iron chelation on myocardial infarct size and oxidative stress in ST-elevation-myocardial infarction. *Circ Cardiovasc Interv* **5**:270-278.
- Charkoudian LK, Dentchev T, Lukinova N, Wolkow N, Dunaief JL and Franz KJ (2008) Iron pro-chelator BSIH protects retinal pigment epithelial cells against cell death induced by hydrogen peroxide. *J Inorg Biochem* **102**:2130-2135.
- Charkoudian LK, Pham DM and Franz KJ (2006) A pro-chelator triggered by hydrogen peroxide inhibits iron-promoted hydroxyl radical formation. *J Am Chem Soc* **128**:12424-12425.
- Charkoudian LK, Pham DM, Kwon AM, Vangeloff AD and Franz KJ (2007) Modifications of boronic ester pro-chelators triggered by hydrogen peroxide tune reactivity to inhibit metal-promoted oxidative stress. *Dalton Trans*:5031-5042.
- Chattipakorn N, Kumfu S, Fucharoen S and Chattipakorn S (2011) Calcium channels and iron uptake into the heart. *World journal of cardiology* **3**:215-218.
- Chou TC and Talalay P (1983) ANALYSIS OF COMBINED DRUG EFFECTS - A NEW LOOK AT A VERY OLD PROBLEM. *Trends in Pharmacological Sciences* **4**:450-454.
- Ignarro LJ, Cirino G, Casini A and Napoli C (1999) Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *Journal of cardiovascular pharmacology* **34**:879-886.
- Ingram TE, Fraser AG, Bleasdale RA, Ellins EA, Margulescu AD, Halcox JP and James PE (2013) Low-dose sodium nitrite attenuates myocardial ischemia and vascular ischemia-reperfusion injury in human models. *Journal of the American College of Cardiology* **61**:2534-2541.

- Inoue M, Sato EF, Nishikawa M, Park AM, Kira Y, Imada I and Utsumi K (2003) Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr Med Chem* **10**:2495-2505.
- Jahnukainen K, Jahnukainen T, Salmi TT, Svechnikov K, Eksborg S and Soder O (2001) Amifostine protects against early but not late toxic effects of doxorubicin in infant rats. *Cancer Res* **61**:6423-6427.
- Jayaraj R, Deb U, Bhaskar AS, Prasad GB and Rao PV (2007) Hepatoprotective efficacy of certain flavonoids against microcystin induced toxicity in mice. *Environmental toxicology* **22**:472-479.
- Jiao Y, Wilkinson Jt, Di X, Wang W, Hatcher H, Kock ND, D'Agostino R, Jr., Knovich MA, Torti FM and Torti SV (2009) Curcumin, a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent, is a biologically active iron chelator. *Blood* **113**:462-469.
- Jomova K and Valko M (2011) Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* **283**:65-87.
- Jones DA, Pellaton C, Velmurugan S, Rathod KS, Andiapen M, Antoniou S, van Eijl S, Webb AJ, Westwood MA, Parmar MK, Mathur A and Ahluwalia A (2015) Randomized phase 2 trial of intracoronary nitrite during acute myocardial infarction. *Circ Res* **116**:437-447.
- Jones RL, Swanton C and Ewer MS (2006) Anthracycline cardiotoxicity. *Expert opinion on drug safety* **5**:791-809.
- Kakhlon O and Cabantchik ZI (2002) The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes(1). *Free Radic Biol Med* **33**:1037-1046.
- Kalay N, Basar E, Ozdogru I, Er O, Cetinkaya Y, Dogan A, Inanc T, Oguzhan A, Eryol NK, Topsakal R and Ergin A (2006) Protective effects of carvedilol against anthracycline-induced cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* **48**:2258-2262.
- 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.
- Kalinowski DS, Sharpe PC, Bernhardt PV and Richardson DR (2007) Design, synthesis, and characterization of new iron chelators with anti-proliferative activity: structure-activity relationships of novel thiohydrazone analogues. *J Med Chem* **50**:6212-6225.
- Kamga Pride C, Mo L, Quesnelle K, Dagda RK, Murillo D, Geary L, Corey C, Portella R, Zharikov S, St Croix C, Maniar S, Chu CT, Khoo NK and Shiva S (2014) Nitrite activates protein kinase A in normoxia to mediate mitochondrial fusion and tolerance to ischaemia/reperfusion. *Cardiovasc Res* **101**:57-68.
- Kattamis A, Kassou C, Berdousi H, Ladis V, Papassotiriou I and Kattamis C (2003) Combined therapy with desferrioxamine and deferiprone in thalassemic patients: effect on urinary iron excretion. *Haematologica* **88**:1423-1425.
- Keizer HG, Pinedo HM, Schuurhuis GJ and Joenje H (1990) Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmacol Ther* **47**:219-231.

- Kielar F, Helsel ME, Wang Q and Franz KJ (2012a) Prochelator BHAPI protects cells against paraquat-induced damage by ROS-triggered iron chelation. *Metallomics* **4**:899-909.
- Kielar F, Wang Q, Boyle PD and Franz KJ (2012b) A boronate prochelator built on a triazole framework for peroxide-triggered tridentate metal binding. *Inorganica Chim Acta* **393**:294-303.
- Knox JJ, Hotte SJ, Kollmannsberger C, Winquist E, Fisher B and Eisenhauer EA (2007) Phase II study of Triapine in patients with metastatic renal cell carcinoma: a trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (NCIC IND.161). *Invest New Drugs* **25**:471-477.
- Kontoghiorghes CN, Kolnagou A and Kontoghiorghes GJ (2014) Antioxidant targeting by deferiprone in diseases related to oxidative damage. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* **19**:862-885.
- Kontoghiorghes GJ, Pattichis K, Neocleous K and Kolnagou A (2004) The design and development of deferiprone (L1) and other iron chelators for clinical use: targeting methods and application prospects. *Curr Med Chem* **11**:2161-2183.
- Kovaríková P, Mrkvicková Z and Klimes J (2008) Investigation of the stability of aromatic hydrazones in plasma and related biological material. *J Pharm Biomed Anal* **47**:360-370.
- Kurz T, Gustafsson B and Brunk UT (2006) Intralysosomal iron chelation protects against oxidative stress-induced cellular damage. *FEBS J* **273**:3106-3117.
- Kwiatkowski A, Ryckewaert G, Jissendi Tchofo P, Moreau C, Vuillaume I, Chinnery PF, Destee A, Defebvre L and Devos D (2012) Long-term improvement under deferiprone in a case of neurodegeneration with brain iron accumulation. *Parkinsonism & related disorders* **18**:110-112.
- Kwiatkowski JL (2011) Real-world use of iron chelators. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program* **2011**:451-458.
- Lane DJ and Lawen A (2008) Non-transferrin iron reduction and uptake are regulated by transmembrane ascorbate cycling in K562 cells. *J Biol Chem* **283**:12701-12708.
- Lane DJ and Richardson DR (2014) The active role of vitamin C in mammalian iron metabolism: much more than just enhanced iron absorption! *Free Radic Biol Med* **75**:69-83.
- Larsen AK, Escargueil AE and Skladanowski A (2003) Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. *Pharmacol Ther* **99**:167-181.
- Lebrecht D and Walker UA (2007) Role of mtDNA lesions in anthracycline cardiotoxicity. *Cardiovasc Toxicol* **7**:108-113.
- Lee R, Margaritis M, Channon KM and Antoniadis C (2012) Evaluating oxidative stress in human cardiovascular disease: methodological aspects and considerations. *Curr Med Chem* **19**:2504-2520.
- Lenahan PF, Gutierrez PL, Wagner JL, Milak N, Fisher GR and Ross DD (1995) Resistance to oxidants associated with elevated catalase activity in HL-60 leukemia cells that overexpress multidrug-resistance protein does not contribute

- to the resistance to daunorubicin manifested by these cells. *Cancer Chemother Pharmacol* **35**:377-386.
- Leonard RC, Williams S, Tulpule A, Levine AM and Oliveros S (2009) Improving the therapeutic index of anthracycline chemotherapy: focus on liposomal doxorubicin (Myocet). *Breast (Edinburgh, Scotland)* **18**:218-224.
- Li C and Jackson RM (2002) Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *American journal of physiology Cell physiology* **282**:C227-241.
- Link G, Tirosh R, Pinson A and Hershko C (1996) Role of iron in the potentiation of anthracycline cardiotoxicity: identification of heart cell mitochondria as a major site of iron-anthracycline interaction. *The Journal of laboratory and clinical medicine* **127**:272-278.
- Liu ZD, Liu DY and Hider RC (2002) Iron chelator chemistry. *Adv Exp Med Biol* **509**:141-166.
- Liuzzi JP, Aydemir F, Nam H, Knutson MD and Cousins RJ (2006) Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:13612-13617.
- Lui GY, Obeidy P, Ford SJ, Tselepis C, Sharp DM, Jansson PJ, Kalinowski DS, Kovacevic Z, Lovejoy DB and Richardson DR (2013) The iron chelator, deferasirox, as a novel strategy for cancer treatment: oral activity against human lung tumor xenografts and molecular mechanism of action. *Mol Pharmacol* **83**:179-190.
- Lukinova N, Iacovelli J, Dentchev T, Wolkow N, Hunter A, Amado D, Ying GS, Sparrow JR and Dunaief JL (2009) Iron chelation protects the retinal pigment epithelial cell line ARPE-19 against cell death triggered by diverse stimuli. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**:1440-1447.
- Lyu YL, Kerrigan JE, Lin CP, Azarova AM, Tsai YC, Ban Y and Liu LF (2007) Topoisomerase IIbeta mediated DNA double-strand breaks: implications in doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dexrazoxane. *Cancer Res* **67**:8839-8846.
- Mackenzie B and Garrick MD (2005) Iron Imports. II. Iron uptake at the apical membrane in the intestine. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* **289**:G981-986.
- Maglione E, Marrese C, Migliaro E, Marcuccio F, Panico C, Salvati C, Citro G, Quercio M, Roncagliolo F, Torello C and Brufani M (2015) Increasing bioavailability of (R)-alpha-lipoic acid to boost antioxidant activity in the treatment of neuropathic pain. *Acta bio-medica : Atenei Parmensis* **86**:226-233.
- Marty M, Espie M, Llombart A, Monnier A, Rapoport BL and Stahalova V (2006) Multicenter randomized phase III study of the cardioprotective effect of dexrazoxane (Cardioxane) in advanced/metastatic breast cancer patients treated with anthracycline-based chemotherapy. *Ann Oncol* **17**:614-622.
- Matsumura Y and Maeda H (1986) A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res* **46**:6387-6392.

- McCord JM (2000) The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American journal of medicine* **108**:652-659.
- McKie AT (2008) The role of Dcytb in iron metabolism: an update. *Biochem Soc Trans* **36**:1239-1241.
- McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, Rolfs A, Sager G, Mudaly E, Mudaly M, Richardson C, Barlow D, Bomford A, Peters TJ, Raja KB, Shirali S, Hediger MA, Farzaneh F and Simpson RJ (2001) An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science* **291**:1755-1759.
- McKie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, Miret S, Bomford A, Peters TJ, Farzaneh F, Hediger MA, Hentze MW and Simpson RJ (2000) A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Molecular cell* **5**:299-309.
- Mims MP and Prchal JT (2005) Divalent metal transporter 1. *Hematology (Amsterdam, Netherlands)* **10**:339-345.
- Minotti G, Licata S, Saponiero A, Menna P, Calafiore AM, Di Giammarco G, Liberi G, Animati F, Cipollone A, Manzini S and Maggi CA (2000) Anthracycline metabolism and toxicity in human myocardium: comparisons between doxorubicin, epirubicin, and a novel disaccharide analogue with a reduced level of formation and [4Fe-4S] reactivity of its secondary alcohol metabolite. *Chem Res Toxicol* **13**:1336-1341.
- 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.
- Mladenka P, Simůnek T, Hübl M and Hrdina R (2006) The role of reactive oxygen and nitrogen species in cellular iron metabolism. *Free Radic Res* **40**:263-272.
- Mokhtari MJ, Motamed N and Shokrgozar MA (2008) Evaluation of silibinin on the viability, migration and adhesion of the human prostate adenocarcinoma (PC-3) cell line. *Cell biology international* **32**:888-892.
- Muckenthaler MU, Galy B and Hentze MW (2008) Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. *Annual review of nutrition* **28**:197-213.
- Murphy E, Kohr M, Menazza S, Nguyen T, Evangelista A, Sun J and Steenbergen C (2014) Signaling by S-nitrosylation in the heart. *J Mol Cell Cardiol* **73**:18-25.
- Neckar J, Boudikova A, Mandikova P, Sterba M, Popelova O, Miksik I, Dabrowska L, Mraz J, Gersl V and Kolar F (2012) Protective effects of dexrazoxane against acute ischaemia/reperfusion injury of rat hearts. *Canadian journal of physiology and pharmacology* **90**:1303-1310.
- Neilands JB (1995) Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol Chem* **270**:26723-26726.
- Neuzil J and Stocker R (1994) Free and albumin-bound bilirubin are efficient co-antioxidants for alpha-tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation. *J Biol Chem* **269**:16712-16719.

- Noulsri E, Richardson DR, Lerdwana S, Fucharoen S, Yamagishi T, Kalinowski DS and Pattanapanyasat K (2009) Antitumor activity and mechanism of action of the iron chelator, Dp44mT, against leukemic cells. *Am J Hematol* **84**:170-176.
- Nyholm S, Mann GJ, Johansson AG, Bergeron RJ, Graslund A and Thelander L (1993) Role of ribonucleotide reductase in inhibition of mammalian cell growth by potent iron chelators. *J Biol Chem* **268**:26200-26205.
- O'Brien TA, Russell SJ, Vowels MR, Oswald CM, Tiedemann K, Shaw PJ, Lockwood L, Teague L, Rice M and Marshall GM (2002) Results of consecutive trials for children newly diagnosed with acute myeloid leukemia from the Australian and New Zealand Children's Cancer Study Group. *Blood* **100**:2708-2716.
- Ohtake S, Miyawaki S, Fujita H, Kiyoi H, Shinagawa K, Usui N, Okumura H, Miyamura K, Nakaseko C, Miyazaki Y, Fujieda A, Nagai T, Yamane T, Taniwaki M, Takahashi M, Yagasaki F, Kimura Y, Asou N, Sakamaki H, Handa H, Honda S, Ohnishi K, Naoe T and Ohno R (2011) Randomized study of induction therapy comparing standard-dose idarubicin with high-dose daunorubicin in adult patients with previously untreated acute myeloid leukemia: the JALSG AML201 Study. *Blood* **117**:2358-2365.
- Omar SA and Webb AJ (2014) Nitrite reduction and cardiovascular protection. *J Mol Cell Cardiol* **73**:57-69.
- Pacelli R, Wink DA, Cook JA, Krishna MC, DeGraff W, Friedman N, Tsokos M, Samuni A and Mitchell JB (1995) Nitric oxide potentiates hydrogen peroxide-induced killing of *Escherichia coli*. *The Journal of experimental medicine* **182**:1469-1479.
- Pecka M (2006) *Laboratorní hematologie v přehledu. Fyziologie a patofyziologie krevní buňky*, A. L. Instruments s.r.o., Český Těšín.
- Peslova G, Petrak J, Kuzelova K, Hrdy I, Halada P, Kuchel PW, Soe-Lin S, Ponka P, Sutak R, Becker E, Huang ML, Suryo Rahmanto Y, Richardson DR and Vyoral D (2009) Hepcidin, the hormone of iron metabolism, is bound specifically to alpha-2-macroglobulin in blood. *Blood* **113**:6225-6236.
- Petrelli F, Borgonovo K, Cabiddu M, Ghilardi M and Barni S (2011) Neoadjuvant chemotherapy and concomitant trastuzumab in breast cancer: a pooled analysis of two randomized trials. *Anticancer Drugs* **22**:128-135.
- Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F and Chiarotto E (2004) Oxidative stress and cell signalling. *Curr Med Chem* **11**:1163-1182.
- Pollack S, Kaufman R, Crosby WH and Butkiewicz JE (1963) REDUCING AGENTS AND ABSORPTION OF IRON. *Nature* **199**:384.
- 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.
- Popelova O, Sterba M, Haskova P, Simunek T, Hroch M, Guncova I, Nachtigal P, Adamcova M, Gersl V and Mazurova Y (2009) Dexrazoxane-afforded protection against chronic anthracycline cardiotoxicity in vivo: effective rescue of cardiomyocytes from apoptotic cell death. *Br J Cancer* **101**:792-802.

- Popelova O, Sterba M, Simunek T, Mazurova Y, Guncova I, Hroch M, Adamcova M and Gersl V (2008) Deferiprone does not protect against chronic anthracycline cardiotoxicity in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* **326**:259-269.
- Pourzand C, Watkin RD, Brown JE and Tyrrell RM (1999) Ultraviolet A radiation induces immediate release of iron in human primary skin fibroblasts: the role of ferritin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:6751-6756.
- Powell LW, Burt MJ, Halliday JW and Jazwinska EC (1996) Hemochromatosis: genetics and pathogenesis. *Seminars in liver disease* **16**:55-63.
- Prochazkova D, Bousova I and Wilhelmova N (2011) Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* **82**:513-523.
- Radi R, Peluffo G, Alvarez MN, Naviliat M and Cayota A (2001) Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic Biol Med* **30**:463-488.
- Raffin SB, Woo CH, Roost KT, Price DC and Schmid R (1974) Intestinal absorption of hemoglobin iron-heme cleavage by mucosal heme oxygenase. *The Journal of clinical investigation* **54**:1344-1352.
- Rao VA, Zhang J, Klein SR, Espandiari P, Knapton A, Dickey JS, Herman E and Shacter EB (2011) The iron chelator Dp44mT inhibits the proliferation of cancer cells but fails to protect from doxorubicin-induced cardiotoxicity in spontaneously hypertensive rats. *Cancer Chemother Pharmacol* **68**:1125-1134.
- Reelfs O, Eggleston IM and Pourzand C (2010) Skin protection against UVA-induced iron damage by multi-antioxidants and iron chelating drugs/prodrugs. *Current drug metabolism* **11**:242-249.
- Reelfs O, Tyrrell RM and Pourzand C (2004) Ultraviolet a radiation-induced immediate iron release is a key modulator of the activation of NF-kappaB in human skin fibroblasts. *J Invest Dermatol* **122**:1440-1447.
- Reif DW (1992) Ferritin as a source of iron for oxidative damage. *Free Radic Biol Med* **12**:417-427.
- Reiter RJ, Carneiro RC and Oh CS (1997) Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* **29**:363-372.
- Rhomberg W and Hellmann K (2011) *Razoxane and Dexrazoxane - Two Multifunctional Agents*, Springer Science.
- Richardson DR, Kalinowski DS, Lau S, Jansson PJ and Lovejoy DB (2009) Cancer cell iron metabolism and the development of potent iron chelators as anti-tumour agents. *Biochim Biophys Acta* **1790**:702-717.
- Richardson DR, Lane DJ, Becker EM, Huang ML, Whitnall M, Suryo Rahmanto Y, Sheftel AD and Ponka P (2010) Mitochondrial iron trafficking and the integration of iron metabolism between the mitochondrion and cytosol. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:10775-10782.
- 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.

- Rosenkranz B, Winkelmann BR and Parnham MJ (1996) Clinical pharmacokinetics of molsidomine. *Clinical pharmacokinetics* **30**:372-384.
- Rouault TA (2006) The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat Chem Biol* **2**:406-414.
- Rubbo H, Radi R, Anselmi D, Kirk M, Barnes S, Butler J, Eiserich JP and Freeman BA (2000) Nitric oxide reaction with lipid peroxy radicals spares alpha-tocopherol during lipid peroxidation. Greater oxidant protection from the pair nitric oxide/alpha-tocopherol than alpha-tocopherol/ascorbate. *J Biol Chem* **275**:10812-10818.
- Sadzuka Y, Sugiyama T, Shimoi K, Kinae N and Hirota S (1997) Protective effect of flavonoids on doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicology letters* **92**:1-7.
- Saletta F, Suryo Rahmanto Y, Noulisri E and Richardson DR (2010) Iron chelator-mediated alterations in gene expression: identification of novel iron-regulated molecules that are molecular targets of hypoxia-inducible factor-1 alpha and p53. *Mol Pharmacol* **77**:443-458.
- Salkovic-Petrisic M, Knezovic A, Osmanovic-Barilar J, Smailovic U, Trkulja V, Riederer P, Amit T, Mandel S and Youdim MB (2015) Multi-target iron-chelators improve memory loss in a rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Life sciences* **136**:108-119.
- Sartorelli AC, Agrawal KC and Moore EC (1971) Mechanism of inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by a-(N)-heterocyclic aldehyde thiosemicarbazones. *Biochem Pharmacol* **20**:3119-3123.
- Sawyer DB (2013) Anthracyclines and heart failure. *N Engl J Med* **368**:1154-1156.
- Seymour L, Bramwell V and Moran LA (1999) Use of dexrazoxane as a cardioprotectant in patients receiving doxorubicin or epirubicin chemotherapy for the treatment of cancer. The Provincial Systemic Treatment Disease Site Group. *Cancer Prev Control* **3**:145-159.
- Sharma G, Singh RP, Chan DC and Agarwal R (2003) Silibinin induces growth inhibition and apoptotic cell death in human lung carcinoma cells. *Anticancer research* **23**:2649-2655.
- Shaw GC, Cope JJ, Li L, Corson K, Hersey C, Ackermann GE, Gwynn B, Lambert AJ, Wingert RA, Traver D, Trede NS, Barut BA, Zhou Y, Minet E, Donovan A, Brownlie A, Balzan R, Weiss MJ, Peters LL, Kaplan J, Zon LI and Paw BH (2006) Mitoferrin is essential for erythroid iron assimilation. *Nature* **440**:96-100.
- Schluter KD, Jakob G, Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado D and Piper HM (1996) Protection of reoxygenated cardiomyocytes against osmotic fragility by nitric oxide donors. *Am J Physiol* **271**:H428-434.
- Siegfried MR, Erhardt J, Rider T, Ma XL and Lefer AM (1992) Cardioprotection and attenuation of endothelial dysfunction by organic nitric oxide donors in myocardial ischemia-reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther* **260**:668-675.
- Sies H (1997) Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental physiology* **82**:291-295.

- Sieswerda E, Kremer LC, Caron HN and van Dalen EC (2011) The use of liposomal anthracycline analogues for childhood malignancies: A systematic review. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* **47**:2000-2008.
- Simonart T, Boelaert JR, Mosselmans R, Andrei G, Noel JC, De Clercq E and Snoeck R (2002) Antiproliferative and apoptotic effects of iron chelators on human cervical carcinoma cells. *Gynecologic oncology* **85**:95-102.
- Simunek T, Boer C, Bouwman RA, Vlasblom R, Versteilen AM, Sterba M, Gersl V, Hrdina R, Ponka P, de Lange JJ, Paulus WJ and Musters RJ (2005a) SIH--a novel lipophilic iron chelator--protects H9c2 cardiomyoblasts from oxidative stress-induced mitochondrial injury and cell death. *J Mol Cell Cardiol* **39**:345-354.
- 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. *Pharmacological research* **51**:223-231.
- Simunek T, Sterba M, Popelova O, Adamcova M, Hrdina R and Gersl V (2009) Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Rep* **61**:154-171.
- Simunek T, Sterba M, Popelova O, Kaiserova H, Adamcova M, Hroch M, Haskova P, Ponka P and Gersl V (2008) Anthracycline toxicity to cardiomyocytes or cancer cells is differently affected by iron chelation with salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone. *Br J Pharmacol* **155**:138-148.
- Sishi BJ, Bester DJ, Wergeland A, Loos B, Jonassen AK, van Rooyen J and Engelbrecht AM (2012) Daunorubicin therapy is associated with upregulation of E3 ubiquitin ligases in the heart. *Experimental biology and medicine (Maywood, NJ)* **237**:219-226.
- Solem LE, Henry TR and Wallace KB (1994) Disruption of mitochondrial calcium homeostasis following chronic doxorubicin administration. *Toxicology and applied pharmacology* **129**:214-222.
- Stariat J, Sestak V, Vavrova K, Nobilis M, Kollarova Z, Klimes J, Kalinowski DS, Richardson DR and Kovarikova P (2012) LC-MS/MS identification of the principal in vitro and in vivo phase I metabolites of the novel thiosemicarbazone anti-cancer drug, Bp4eT. *Analytical and bioanalytical chemistry* **403**:309-321.
- Sterba M, Popelová O, Simunek T, Mazurová Y, Potáčová A, Adamcová M, Guncová I, Kaiserová H, Palická V, Ponka P and Gersl V (2007) Iron chelation-afforded cardioprotection against chronic anthracycline cardiotoxicity: a study of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH). *Toxicology* **235**:150-166.
- Sterba M, Popelova O, Simunek T, Mazurova Y, Potacova A, Adamcova M, Kaiserova H, Ponka P and Gersl V (2006) Cardioprotective effects of a novel iron chelator, pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone, in the rabbit model of daunorubicin-induced cardiotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* **319**:1336-1347.
- Sterba M, Popelova O, Vavrova A, Jirkovsky E, Kovarikova P, Gersl V and Simunek T (2013) Oxidative stress, redox signaling, and metal chelation in anthracycline cardiotoxicity and pharmacological cardioprotection. *Antioxid Redox Signal* **18**:899-929.

- Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF and Nathan CF (1991) Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:7773-7777.
- 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 and Gams RA (1997) Cardioprotection with dexrazoxane for doxorubicin-containing therapy in advanced breast cancer. *J Clin Oncol* **15**:1318-1332.
- Štípek S (2000) *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci* Grada.
- Tan C, Tasaka H, Yu KP, Murphy ML and Karnofsky DA (1967) Daunomycin, an antitumor antibiotic, in the treatment of neoplastic disease. Clinical evaluation with special reference to childhood leukemia. *Cancer* **20**:333-353.
- Tanabe K, Ikegami Y, Ishida R and Andoh T (1991) Inhibition of topoisomerase II by antitumor agents bis(2,6-dioxopiperazine) derivatives. *Cancer Res* **51**:4903-4908.
- Tanner MA, Galanello R, Dessi C, Smith GC, Westwood MA, Agus A, Roughton M, Assomull R, Nair SV, Walker JM and Pennell DJ (2007) A randomized, placebo-controlled, double-blind trial of the effect of combined therapy with deferoxamine and deferiprone on myocardial iron in thalassemia major using cardiovascular magnetic resonance. *Circulation* **115**:1876-1884.
- Tesoriere L, Ciaccio M, Valenza M, Bongiorno A, Maresi E, Albiero R and Livrea MA (1994) Effect of vitamin A administration on resistance of rat heart against doxorubicin-induced cardiotoxicity and lethality. *J Pharmacol Exp Ther* **269**:430-436.
- Tota S, Kamat PK, Shukla R and Nath C (2011) Improvement of brain energy metabolism and cholinergic functions contributes to the beneficial effects of silibinin against streptozotocin induced memory impairment. *Behavioural brain research* **221**:207-215.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M and Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* **39**:44-84.
- Valko M, Morris H and Cronin MT (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* **12**:1161-1208.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M and Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions* **160**:1-40.
- van Asbeck BS, Georgiou NA, van der Bruggen T, Oudshoorn M, Nottet HS and Marx JJ (2001) Anti-HIV effect of iron chelators: different mechanisms involved. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **20**:141-147.
- van der Heijden AG and Witjes JA (2003) Future strategies in the diagnosis, staging and treatment of bladder cancer. *Current opinion in urology* **13**:389-395.
- Vashisht AA, Zumbrennen KB, Huang X, Powers DN, Durazo A, Sun D, Bhaskaran N, Persson A, Uhlen M, Sangfelt O, Spruck C, Leibold EA and Wohlschlegel JA

- (2009) Control of iron homeostasis by an iron-regulated ubiquitin ligase. *Science* **326**:718-721.
- Vavrova A and Simunek T (2012) DNA topoisomerase IIbeta: a player in regulation of gene expression and cell differentiation. *The international journal of biochemistry & cell biology* **44**:834-837.
- Vejpongsa P and Yeh ET (2014) Prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity: challenges and opportunities. *Journal of the American College of Cardiology* **64**:938-945.
- Voest EE, van Acker SA, van der Vijgh WJ, van Asbeck BS and Bast A (1994) Comparison of different iron chelators as protective agents against acute doxorubicin-induced cardiotoxicity. *J Mol Cell Cardiol* **26**:1179-1185.
- Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL, Cowley L, Askwith C, Libina N, Gitschier J and Anderson GJ (1999) Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nature genetics* **21**:195-199.
- Wallace KB (2003) Doxorubicin-induced cardiac mitochondrionopathy. *Pharmacology & toxicology* **93**:105-115.
- Wang JC (2002) Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nature reviews Molecular cell biology* **3**:430-440.
- Wang YM, Madanat FF, Kimball JC, Gleiser CA, Ali MK, Kaufman MW and van Eys J (1980) Effect of vitamin E against adriamycin-induced toxicity in rabbits. *Cancer Res* **40**:1022-1027.
- Ward RJ, Dexter DT and Crichton RR (2015) Neurodegenerative diseases and therapeutic strategies using iron chelators. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)* **31**:267-273.
- Waterhouse DN, Tardi PG, Mayer LD and Bally MB (2001) A comparison of liposomal formulations of doxorubicin with drug administered in free form: changing toxicity profiles. *Drug safety* **24**:903-920.
- Webb A, Bond R, McLean P, Uppal R, Benjamin N and Ahluwalia A (2004) Reduction of nitrite to nitric oxide during ischemia protects against myocardial ischemia-reperfusion damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:13683-13688.
- Wongjaikam S, Kumfu S, Chattipakorn SC, Fucharoen S and Chattipakorn N (2015) Current and future treatment strategies for iron overload cardiomyopathy. *European journal of pharmacology* **765**:86-93.
- Wood JC (2008) Cardiac iron across different transfusion-dependent diseases. *Blood reviews* **22 Suppl 2**:S14-21.
- Wood JC, Kang BP, Thompson A, Giardina P, Harmatz P, Glynos T, Paley C and Coates TD (2010) The effect of deferasirox on cardiac iron in thalassemia major: impact of total body iron stores. *Blood* **116**:537-543.
- Wouters KA, Kremer LC, Miller TL, Herman EH and Lipshultz SE (2005) Protecting against anthracycline-induced myocardial damage: a review of the most promising strategies. *Br J Haematol* **131**:561-578.

- Yiakouvaki A, Savovic J, Al-Qenaie A, Dowden J and Pourzand C (2006) Caged-iron chelators a novel approach towards protecting skin cells against UVA-induced necrotic cell death. *J Invest Dermatol* **126**:2287-2295.
- Yim CY, Bastian NR, Smith JC, Hibbs JB, Jr. and Samlowski WE (1993) Macrophage nitric oxide synthesis delays progression of ultraviolet light-induced murine skin cancers. *Cancer Res* **53**:5507-5511.
- Yu Y, Wong J, Lovejoy DB, Kalinowski DS and Richardson DR (2006) Chelators at the cancer coalface: desferrioxamine to Triapine and beyond. *Clin Cancer Res* **12**:6876-6883.
- Zalupski M, Metch B, Balcerzak S, Fletcher WS, Chapman R, Bonnet JD, Weiss GR, Ryan J, Benjamin RS and Baker LH (1991) Phase III comparison of doxorubicin and dacarbazine given by bolus versus infusion in patients with soft-tissue sarcomas: a Southwest Oncology Group study. *Journal of the National Cancer Institute* **83**:926-932.
- Zhang AS, Sheftel AD and Ponka P (2006) The anemia of "haemoglobin-deficit" (hbd/hbd) mice is caused by a defect in transferrin cycling. *Experimental hematology* **34**:593-598.
- Zhang DL, Ghosh MC and Rouault TA (2014) The physiological functions of iron regulatory proteins in iron homeostasis - an update. *Frontiers in pharmacology* **5**:124.
- Zhu SG, Kukreja RC, Das A, Chen Q, Lesnefsky EJ and Xi L (2011) Dietary nitrate supplementation protects against Doxorubicin-induced cardiomyopathy by improving mitochondrial function. *Journal of the American College of Cardiology* **57**:2181-2189.

9 SEZNAM ZKRATEK

311	2-hydroxy-1-naftylaldehydisonikotinoylhydrazon
4-HNE	4-hydroxynonenal
ADR-925	Otevřený analog dexrazoxanu
ANT	Antracyklinová antibiotika
Arg	Arginin
ATP	Adenosintrifosfát
BASIH	Boronylsalicylaldehydisonikotinoylhydrazon – forma volné kyseliny
BH ₄	(6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin
BHAPI	(<i>E</i>)- <i>N'</i> -[1-(2-((4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,2,3-dioxaborolan-2-yl)benzyl)oxy)phenyl)ethylidene]isonicotinohydrazide
Bp4eT	2-benzoylpyridin-4-ethyl-3-thiosemikarbazon
BpT	2-benzoylpyridinthiosemikarbazon
BSIH	Boronylsalicylaldehydisonikotinoylhydrazon - ester
BSIH-PD	(<i>E</i>)- <i>N'</i> -[2-(3a,5,5-trimethylhexahydro-4,6-methanobenzo[d][1,2,3]dioxaborolan-2-yl)benzylidene]isonicotinohydrazide
cGMP	Cyklický guanosinmonofosfát
Cit	L-citrulin
DAU	Daunorubicin
DCYPB	Duodenální cytochrom B
DEX	Dexrazoxan (ICRF-187)
DFO	Desferrioxamin
DHA	Dehydroaskorbát
DHOasa	dihydroorotasa

DHPasa	dihydropyrimidinasa
DMT1	Přenašeč dvojmocných iontů (divalent metal transporter 1)
DOX	Doxorubicin
Dp44mT	di-2-pyridylketon-4,4-dimethyl-3-thiosemikarbazon
DpT	di-2-pyridylketonthiosemikarbazon
DQ	Diquat
EC ₅₀	Koncentrace, která snižovala toxicitu H ₂ O ₂ a způsobila tak přežívání 50 % buněk ve srovnání kontrolou
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FAD	Flavinadenindinukleotid
FADH ₂	Flavinadenindinukleotid – redukovaná forma
FDA	Americká agentura pro schvalování léčiv ke klinickému použití (Food and Drug Administration)
Fe	Železo
FPN1	Ferroportin 1
GRed	Glutathionreduktasa
GSH	Glutathion
GS-HNE	Konjugát 4-hydroxynonenalu s glutathionem
GSSG	Oxidovaná forma glutathionu
GST	Glutathion-S-transferasa
H ₂ O ₂	Peroxid vodíku
HAPI	(<i>E</i>)- <i>N'</i> -(1-(2-hydroxyfenyl)ethyliden)isonikotinohydrazid
HCP1	Protein přenášející hem (heme carrier protein 1)
HIF	Faktor indukovaný hypoxií (hypoxia inducible factor)
HO1	Hemoxygenasa 1

HPLC-MS	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie spojená s hmotnostním spektrometrem
HPLC-UV	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detekcí
i.v.	Intravenózní podání
ICL670A	Deferasirox
INH	Isoniazid
IRE	Vazné místo pro IRP na mRNA (iron responsive element)
IRP	Protein regulující železo (iron regulatory protein)
L1	Deferipron (CP20)
LH	Označení pro lipid
LIP	Rezervoár volného železa (labile iron pool)
MPO	Myeloperoxidasa
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid - redukováná forma
NF- κ B	Nukleární faktor κ B
NMK	Nenasycené mastné kyseliny
NO	Oxid dusnatý
NOS	NO syntasa
NVCM	Potkaní neonatální ventrikulární kardiomyocyty
<i>o</i> -108	<i>ortho</i> -chlorbenzoylisonikotinoylhydrazon
PIH	Pyridoxalisonikotinoylhydrazon
PKG	Proteinkinasa G
PRC	Pyrokatechol
RNS	Reaktivní formy dusíku (reactive nitrogen species)

RONS	Reaktivní formy kyslíku a dusíku (reactive oxygen and nitrogen species)
ROS	Reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
SAL	Salicylaldehyd
SIH	Salicylaldehydisonikotinoylhydrazon
SIN-1	3-morfolinosydnonimin
SOD	Superoxiddismutasa
TC ₅₀	Koncentrace, která způsobila 50% pokles viability buněk
Tf	Transferrin
TfR	Transferrinový receptor
TIP	4-[5-(2-((4-boronobenzyl)oxy)phenyl)-3-(2-hydroxy-phenyl)-1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-1-yl]benzoicacid
TOP II	Topoisomerasa II
TRA-IMM	methyl-4-[3-(2-hydroxy-phenyl)-5-(2-((4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,2,3-dioxoborolan-2-yl)benzyl)oxy)-phenyl)-1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-1-yl]benzoate
Vit C	Vitamín C
ZIP14	Přenašeč zinku (SLC39A14)

10 PŘEHLED PUBLIKACÍ ZAHRNUTÝCH V DISERTAČNÍ PRÁCI

- I. Jansová H, Macháček M, Wang Q, Hašková P, Jirkovská A, Potůčková E, Kielar F, Franz KJ, Šimůnek T. Comparison of various iron chelators and prochelators as protective agents against cardiomyocyte oxidative injury. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014;74:210-221. (IF₂₀₁₃ = 5,710)
- II. Jansová H, Bureš J, Macháček M, Hašková P, Jirkovská A, Roh J, Wang Q, Franz KJ, Kovaříková P, Šimůnek T. Characterization of cytoprotective and toxic properties of iron chelator SIH, prochelator BSIH and their degradation products. *Toxicology*. 2016;350:15-24. (IF₂₀₁₄ = 3,621)
- III. Hašková P, Jansová H, Bureš J, Macháček M, Jirkovská A, Franz KJ, Kovaříková P, Šimůnek T. Cardioprotective effects of iron chelator HAPI and ROS-activated boronate prochelator BHAPI against catecholamine-induced oxidative cellular injury. (manuskript)
- IV. Bureš J, Jansová H, Stariat J, Filipický T, Mladěnka P, Šimůnek T, Kučera R, Klimeš J, Wang Q, Franz KJ, Kovaříková P. LC-UV/MS methods for the analysis of prochelator – Boronyl salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (BSIH) and its active chelator salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2015;105:55-63. (IF₂₀₁₄ = 2,979)
- V. Vávrová A, Jansová H, Macková E, Macháček M, Hašková P, Tichotová L, Štěrba M, Šimůnek T. Catalytic inhibitors of Topoisomerase II differently modulate the toxicity of anthracyclines in cardiac and cancer cells. *PLoS One*. 2013;8(10):e76676. (IF₂₀₁₂ = 3,730)

- VI.** Jirkovská-Vávrová A, Roh J, Lenčová-Popelová O, Jirkovský E, Hrušková K, Potůčková-Macková E, Jansová H, Hašková P, Martinková P, Eisner T, Kratochvíl J, Šus J, Macháček M, Vostatková-Tichotová L, Geršl V, Kalinowski DS, Muller MT, Richardson DR, Vávrová K, Štěrbá M and Šimůnek T. Synthesis and analysis of novel analogues of dexrazoxane and its open-ring hydrolysis product for protection against anthracycline cardiotoxicity *in vitro* and *in vivo*. Toxicology Research. 2015;4:1098-1114. (IF₂₀₁₄ = 3,983)
- VII.** Lenčová-Popelová O, Jirkovský E, Jansová H, Jirkovská-Vávrová A, Vostatková-Tichotová L, Mazurová Y, Adamcová M, Chládek J, Hroch M, Pokorná Z, Geršl V, Šimůnek T, Štěrbá M. Cardioprotective effects of inorganic nitrate/nitrite in chronic anthracycline cardiotoxicity: Comparison with dexrazoxane. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2016;91:92-103. (IF₂₀₁₄ = 4,655)
- VIII.** Lenčová-Popelová O, Jansová H, Jirkovský E, Bureš J, Jirkovská-Vávrová A, Mazurová Y, Vostatková L, Adamcová M, Hroch M, Pokorná Z, Kovaříková P, Šimůnek T, Štěrbá M. Are cardioprotective effects of NO-releasing drug molsidomine translatable to chronic anthracycline cardiotoxicity settings? (manuskript)

11 PŘEHLED DALŠÍCH PUBLIKACÍ

- I. Šesták V, Stariat J, Cermanová J, Potůčková E, Chládek J, Roh J, Bureš J, Jansová H, Průša P, Štěrbá M, Mičuda S, Šimůnek T, Kalinowski DS, Richardson DR, Kovaříková P. Novel and potent anti-tumor and anti-metastatic di-2-pyridylketone thiosemicarbazones demonstrate marked differences in pharmacology between the first and second generation lead agents. *Oncotarget*. 2015;6:42411-42428 (IF₂₀₁₄ = 6,359)
- II. Potůčková E, Roh J, Macháček M, Sahni S, Stariat J, Šesták V, Jansová H, Hašková P, Jirkovská A, Vávrová K, Kovaříková P, Kalinowski DS, Richardson DR, Šimůnek T. *In Vitro* Characterization of the Pharmacological Properties of the Anti-Cancer Chelator, Bp4eT, and its Phase I Metabolites. *PLoS One*. 2015;10(10):e0139929. (IF₂₀₁₄ = 3,534)
- III. Potůčková E, Hrušková K, Bureš J, Kovaříková P, Špirková IA, Pravidíková K, Kolbabová L, Hergeselová T, Hašková P, Jansová H, Macháček M, Jirkovská A, Richardson V, Lane DJR, Kalinowski DS, Richardson DR, Vávrová K, Šimůnek T. Structure-activity relationships of novel salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH) analogs: iron chelation, anti-oxidant and cytotoxic properties. *PLoS One*. 2014;9(11):e112059. (IF₂₀₁₄ = 3,534)
- IV. Potůčková E, Jansová H, Macháček M, Vávrová A, Hašková P, Tichotová L, Richardson V, Kalinowski DS, Richardson DR, Šimůnek T. Quantitative analysis of the anti-proliferative activity of combinations of selected iron-chelating agents and clinically used anti-neoplastic drugs. *PLoS One*. 2014;9(2):e88754. (IF₂₀₁₂ = 3,730)
- V. Macková E, Hrušková K, Bendová P, Vávrová A, Jansová H, Hašková P, Kovaříková P, Vávrová K, Šimůnek T. Methyl and ethyl ketone analogs of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone: novel iron chelators with selective antiproliferative action. *Chemico-biological interactions*. 2012;197(2-3):69-79. (IF₂₀₁₂ = 2,967)

12 PREZENTACE NA KONFERENCÍCH

- I. Jansová H, Lenčová O, Jirkovský E, Vostatková L, Jirkovská A, Pokorná Z, Šimůnek T, Štěřba M. *In vitro* and *in vivo* assessment of protective effects of nitrate and nitrite against antracycline-induced damage. *65. česko-slovenské farmakologické dny*; 16. – 18. 9. 2015, Praha, Česká republika.
- II. Jansová H, Bureš J, Kovaříková P, Šimůnek T. Biologic characterization of iron chelator SIH, oxidative stress-activated prochelator BSIH and their metabolites. *6th Meeting of the International BioIron Society*; 6. – 10. 9. 2015, Hangzhou, Čína.
- III. Jansová H, Lenčová O, Jirkovský E, Jirkovská A, Vostatková L, Pokorná Z, Šimůnek T, Štěřba M. Potential protective effect of inorganic nitrate/nitrite against anthracycline-induced cardiotoxicity *in vitro* and *in vivo*. *33rd meeting of the European Section of ISHR*; 1. – 4. 7. 2015, Bordeaux, Francie.
- IV. Jansová H, Vostatková L, Šimůnek T. Potential protective effect of nitrites and 3-morpholinostydonimine against antracycline-induced cardiotoxicity *in vitro*. *5. Postgraduální & 3. postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK*; 3. – 4. 2. 2015, Hradec Králové, Česká republika.
- V. Jansová H, Hašková P, Bureš J, Macháček M, Kovaříková P, Šimůnek T. Comparison of cytoprotective potential and toxicity of iron chelator SIH and oxidative stress-activated prochelator BSIH. *European Iron Club Meeting 2014 Verona*; 11. – 14. 9. 2014, Verona, Itálie.
- VI. Jansová H, Hašková P, Bureš J, Potůčková E, Kovaříková P, Šimůnek T. Cytoprotective iron chelator SIH and oxidative stress-activated prochelator BSIH: Comparison of their properties. *4. Postgraduální & 2. postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK*; 28. – 29. 1. 2014, Hradec Králové, Česká republika.

- VII.** Jansová H, Hašková P, Bureš J, Macková E, Kovaříková P, Šimůnek T. Comparison of iron chelator SIH and oxidative stress-activated prochelator BSIH against oxidative stress-induced cardiomyocyte damage. *10th International ISSX Meeting*; 29. 9. – 3. 10. 2013, Toronto, Kanada.
- VIII.** Jansová H, Macháček M, Hašková P, Macková E, Šimůnek T. Novel prochelators of iron and their role in protection against oxidative stress-induced cardiomyocyte damage. *Fifth Congress of the International BioIron Society*; 14. – 18. 4. 2013, Londýn, Velká Británie.
- IX.** Jansová H, Macháček M, Hašková P, Šimůnek T. Protective properties of new prochelators of iron against H₂O₂-induced damage of H9c2 cells. 3. *Postgraduální & 1. postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK*; 29. - 30. 1. 2013, Hradec Králové, Česká republika.
- X.** Jansová H, Macháček M, Hašková P, Macková E, Šimůnek T. Comparison of novel prochelators of iron as protective agents against oxidative stress-induced damage of H9c2 cells. *Trace Elements in Biology & Medicine (FASEB)*; 10. – 15. 6. 2012, Steamboat Springs, Kolorado, USA.
- XI.** Jansová H, Bendová P, Macháček M, Hašková P, Macková E, Šimůnek T. Iron chelation with novel analogs of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone for protection against oxidative stress-induced mitochondrial injury and cell death. *Mitochondria, Apoptosis and Cancer Conference*; 27. – 29. 10. 2011, Singapur.
- XII.** Jansová H, Vávrová A, Hašková P, Macková E, Šimůnek T. The influence of topoisomerase II catalytic inhibitors on the cardiotoxic and antineoplastic action of anthracycline antibiotics. *9th New Frontiers in Basic Cardiovascular Research Meeting*; 14. – 17. 10. 2010, Toulouse, Francie.

13 PŘÍLOHY

13.1 PUBLIKACE I

Jansová H, Macháček M, Wang Q, Hašková P, Jirkovská A, Potůčková E, Kielar F, Franz KJ, Šimůnek T. Comparison of various iron chelators and prochelators as protective agents against cardiomyocyte oxidative injury. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014;74:210-221.

13.2 PUBLIKACE II

Jansová H, Bureš J, Macháček M, Hašková P, Jirkovská A, Roh J, Wang Q, Franz KJ, Kovaříková P, Šimůnek T. Characterization of cytoprotective and toxic properties of iron chelator SIH, prochelator BSIH and their degradation products. *Toxicology*. 2016;350:15-24.

13.3 PUBLIKACE III

Hašková P, Jansová H, Bureš J, Macháček M, Jirkovská A, Franz KJ, Kovaříková P, Šimůnek T. Cardioprotective effects of iron chelator HAPI and ROS-activated boronate prochelator BHAPI against catecholamine-induced oxidative cellular injury. (manuskript)

13.4 PUBLIKACE IV

Bureš J, Jansová H, Stariat J, Filipický T, Mladěnka P, Šimůnek T, Kučera R, Klimeš J, Wang Q, Franz KJ, Kovaříková P. LC-UV/MS methods for the analysis of prochelator – Boronyl salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (BSIH) and its active chelator salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2015;105:55-63.

13.5 PUBLIKACE V

Vávrová A, Jansová H, Macková E, Macháček M, Hašková P, Tichotová L, Štěrba M, Šimůnek T. Catalytic inhibitors of Topoisomerase II differently modulate the toxicity of anthracyclines in cardiac and cancer cells. PLoS One. 2013;8(10):e76676.

13.6 PUBLIKACE VI

Jirkovská-Vávrová A, Roh J, Lenčová-Popelová O, Jirkovský E, Hrušková K, Potůčková-Macková E, Jansová H, Hašková P, Martinková P, Eisner T, Kratochvíl J, Šus J, Macháček M, Vostatková-Tichotová L, Geršl V, Kalinowski DS, Muller MT, Richardson DR, Vávrová K, Štěrbá M and Šimůnek T. Synthesis and analysis of novel analogues of dexrazoxane and its open-ring hydrolysis product for protection against anthracycline cardiotoxicity *in vitro* and *in vivo*. Toxicology Research. 2015;4:1098-1114.

13.7 PUBLIKACE VII

Lenčová-Popelová O, Jirkovský E, Jansová H, Jirkovská-Vávrová A, Vostatková-Tichotová L, Mazurová Y, Adamcová M, Chládek J, Hroch M, Pokorná Z, Geršl V, Šimůnek T, Štěrbá M. Cardioprotective effects of inorganic nitrate/nitrite in chronic anthracycline cardiotoxicity: Comparison with dexrazoxane. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2016;91:92-103.

13.8 PUBLIKACE VIII

Lenčová-Popelová O, Jansová H, Jirkovský E, Bureš J, Jirkovská-Vávrová A, Mazurová Y, Vostatková L, Adamcová M, Hroch M, Pokorná Z, Kovaříková P, Šimůnek T, Štěřba M. Are cardioprotective effects of NO-releasing drug molsidomine translatable to chronic anthracycline cardiotoxicity settings? (manuskript)