

5. SOUHRN

Antracyklinová antibiotika patří mezi nejefektivnější a široce využívaná protinádorová léčiva a dodnes zůstávají významnou složkou mnoha chemoterapeutických protokolů. Jejich podání je bohužel limitováno rizikem rozvoje závažné kardiální toxicity, jejíž incidence výrazně stoupá při překročení kumulativních dávek antracyklinů (550 mg/m² pro daunorubicin a doxorubicin). Všeobecně se má za to, že mechanismus antracyklinové kardiotoxicity je odlišný od mechanismu jejich protinádorového působení. Antracykliny zasahují do buněčné replikace

DNA, pravděpodobně prostřednictvím interakce s topoisomerasou II a interkalací planární části jejích molekuly mezi baze dvoušroubovice. Proces replikace DNA je naprosto zásadní zejména pro růst rychle proliferujících nádorových buněk. Naproti tomu, vznik antracyklinové kardiotoxicity je spojován zejména s tvorbou reaktivních forem kyslíku, které se tvoří v průběhu tzv. redoxního cyklu, a dále s tvorbou C13-dihydroprometabolitů antracyklinů. Byla navržena celá řada dalších hypotéz, otázkou ovšem zůstává, jak odlišit příčiny od následků působení antracyklinů na srdeční buňku.

Byly studovány různé přístupy ke snížení antracyklinové kardiotoxicity. V současnosti lze za nejdůležitější skupiny potenciálních kardioprotektiv považovat chelátory železa a flavonoidy.

Cílem předkládané práce bylo přispět k objasnění mechanismů, kterými tato kardioprotektiva snižují antracyklinovou toxicitu. Důraz byl kladen na vztahy mezi metabolismem antracyklinů a biochemickými vlastnostmi chelátorů železa a flavonoidů. Data byla získána z *in vitro* experimentů provedených jak na buněčné úrovni (primární kultury hepatocytů, kardiomyocytů, buněčné linie A549 a H9c2), tak na úrovni subcelulárních frakcí z králíků i lidských jater.

V dřívějších experimentech byl zjištěn kardioprotektivní potenciál chelátorů železa ze skupiny aroylhydrozaronů (PIH, SIH, o-108) na modelu daunorubicinem navozené chronické kardiomyopatie u králíka. Nezbytnou součástí preklinického hodnocení nových léčiv před jejich uvedením do klinických studií je zjištění jejich případných interakcí s klíčovými biotransformačními enzymy. Zabývali jsme se proto účinky aroylhydrozaronů PIH a SIH na vybrané enzymy, které se účastní metabolismu antracyklinů - cytochromy P450 a cytosolické reduktasy. V izolovaných hepatocytech nebyla nalezena významná interference mezi chelátory. Samotné

antracykliny snížily aktivitu všech sledovaných isoformem cytochromu P450 (1A1, 1A2, 3A, 2B), zatímco oba chelátory PIH a SIH tomto poklesu efektivně zabránily. Oba chelátory zároveň vykazovaly na hepatocytech nízkou cytotoxicitu.

Kardioprotektivní účinky chelátorů železa jsou tradičně přisuzovány prevenci tvorby hydroxylových radikálů. V našich pokusech jsme ovšem pozorovali výrazné rozdíly v působení různých chelátorů proti oxidačnímu stresu navozenému doxorubicinem a peroxidem vodíku s železnatými ionty (Fentonovo činidlo). Dextrazoxan a monoHER byly na buněčné lince A549 účinné proti oxidačnímu poškození buněk doxorubicinem a neúčinné proti peroxidové toxicitě, zatímco u SIH a deferoxaminu tomu bylo právě naopak. PIH se ukázal být neúčinným v obou případech. Tyto výsledky naznačují, že oxidační toxicita antracyklinů je pravděpodobně primárně vyvolána jiným typem radikálů než hydroxylovými (např. superoxidovými) a chelatace redox-aktivního železa není jediným předpokladem účinné kardioprotektivní látky.

Při vývoji nových kardioprotektiv musí být zodpovězena otázka, zda tyto látky nesnižují protinádorový účinek antracyklinů. V buněčné lince A549 jsme nezaznamenali snížení antiproliferčních účinků doxorubicinu vlivem PIH, SIH ani deferoxaminu. Pouze mírné snížení bylo pozorováno u dextrazoxanu a monoHER, výraznější interference byla pozorována na úrovni aktivace apoptózy.

Je známo, že C13-dihydroantracykliny působí více kardiotoxiicky než parentní antracykliny. Jejich tvorbu (katalyzovanou cytosolickými reduktasami) je nutné považovat za potenciální rizikový faktor rozvoje kardiotoxicity. V našich experimentech s cytosolickou frakcí z králíků jater byla jako hlavní C13-reduktáza daunorubicinu identifikována

karbonylreduktasa (EC. 1.1.1.184), příspěvek aldo-keto reduktas je poměrně menší (1:5 při fyziologickém pH).

Karbonylreduktasy jsou citlivé k flavonoidním inhibitorům typu quercetinu či rutinu. Studovali jsme inhibiční vlastnosti série původních syntetických a tří komerčně dostupných flavonoidů. Všechny látky byly schopny inhibovat vznik doxorubicinolu v cytosolu z lidských jater, i když v různém rozsahu. Quercetin a quercitrin byli nejlepšími inhibitory ($IC_{50} < 20 \mu M$), zatímco většína typů substitucí (s výjimkou hydroxylace na C3) snižovala inhibiční efekt. Pouze dva z deseti sledovaných flavonoidů ochránily izolované srdeční buňky proti doxorubicinové toxicitě po celou dobu experimentu (72 h) – monoHER (jehož kardioprotektivní účinky jsou již dobře známy) a 7-trimetylamoniumpyloxyderivát quercetinu. Bohužel, nebyl nalezen jednoznačný vztah mezi kardioprotektivním působením a jedinou fyzikálně-chemickou nebo biochemickou vlastností flavonoidů. Role inhibice karbonylreduktasy (tj. tvorby doxorubicinolu) se nicméně jeví jako nevýznamná, jelikož obě výrazně protektivní látky patří mezi slabé inhibitory.