

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



RIGORÓZNÍ PRÁCE



2007

Mgr. Dalibor Černý

Významné poděkování patří PharmDr. Petru Nachtigalovi, PhD. za podporu a pomoc při zpracovávání této rigorózní práce.

**ENDOTELIÁLNÍ
DYSFUNKCE U
EXPERIMENTÁLNĚ
NAVOZENÉ
ANTRACYKLÍNOVÉ
TOXICITY**

OBSAH

ÚVOD	5
1 FYZIOLOGICKÁ FUNKCE ENDOTELU.....	6
1.1 ZÁKLADNÍ FUNKCE ENDOTELU.....	6
1.2 INTERAKCE MEZI KREVNÍMI ELEMENTY A CÉVNÍ STĚNOU	9
2 DYSFUNKCE ENDOTELU.....	11
3 ADHEZNÍ MOLEKULY.....	13
3.1 SELEKTINY	13
3.1.1 <i>Typ L</i>	14
3.1.2 <i>Typ E</i>	14
3.1.3 <i>Typ P</i>	15
3.2 INTEGRINY	15
3.2.1 $\beta 1$ tzv. <i>VLA (very late antigens) integriny</i>	16
3.2.2 $\beta 2$ <i>integriny, zvané též leukocytární integriny</i>	16
3.3 IMUNOGLOBULINOVÁ SKUPINA	16
3.3.1 <i>Struktura a funkce VCAM-1 a ICAM-1</i>	17
3.3.2 <i>Exprese VCAM-1 a ICAM-1</i>	18
3.3.3 <i>PECAM</i>	18
3.4 KADHERINY	19
3.4.1 <i>Epiteliální (E)-kadherin</i>	19
3.4.2 <i>Vaskulární-endoteliální (VE)-kadherin</i>	19
4 ANTRACYKLINOVÉ ANTINEOPLASTICKÉ LÁTKY	20
4.1 MECHANISMUS CYTOSTATICKÉHO ÚČINKU.....	21
4.1.1 <i>Interkalace</i>	21
4.1.2 <i>Inhibice topoisomerázy II</i>	22
4.1.3 <i>Tvorba volných kyslíkových radikálů</i>	22
4.2 ZPŮSOB PODÁNÍ A FARMAKOKINETIKA ANTRACYKLINŮ.....	23
4.3 INDIKACE A DÁVKOVÁNÍ ANTRACYKLINŮ	24
4.4 EXTRAKARDIÁLNÍ NEŽÁDOUCÍ A TOXICKÉ ÚČINKY ANTRACYKLINŮ.....	24
5 ANTRACYKLINOVÁ KARDIOTOXICITA.....	26
5.1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA ANTRACYKLINOVÉ KARDIOTOXICITY	27
5.2 TYPY ANTRACYKLINOVÉ KARDIOTOXICITY	28
5.2.1 <i>Akutní kardiotoxicita</i>	28
5.2.2 <i>Subakutní kardiotoxicita</i>	28
5.2.3 <i>Chronická toxicita</i>	28
5.2.4 <i>Pozdní kardiotoxicita</i>	29
5.3 RIZIKOVÉ FAKTORY ANTRACYKLINOVÉ KARDIOTOXICITY	30
5.4 DIAGNOSTIKA KARDIOTOXICITY ANTRACYKLINŮ.....	30
6 CÍL PRÁCE.....	34
7 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	35
7.1 ZVÍŘATA A PŘEDEPSANÁ DIETA.....	35
7.2 IMUNOHISTOCHEMIE	37
8 VÝSLEDKY.....	38
8.1 HODNOCENÍ KARDIOTOXICITY.....	38
8.2 IMUNOHISTOCHEMICKÉ BARVENÍ V OBLASTI AORTÁLNÍHO SINU.....	40
8.3 STEREOLOGICKÁ ANALÝZA EXPRESE.....	41
9 DISKUSE	42
10 ZÁVĚR.....	44
11 SEZNAM POUŽITÝCH CITACÍ.....	45

ÚVOD

Cytostatická terapie nádorového onemocnění není rozhodně nikterak populární záležitostí. Nejen, že se v případě této skupiny léčiv jedná téměř vždy o vážnou diagnózu, avšak je nutno říci, že jde i o velkou zátěž organismu z hlediska expozice převážně toxických xenobiotik. Vyskytuje se zde mnoho nežádoucích účinků, ať už méně závažného či závažnějšího charakteru. Skupina cytostatik je poměrně velice rozsáhlá a proto je z ní nutno vybírat právě ta léčiva, která jsou pro daný druh onemocnění nejvýhodnější a nejméně toxická. Za posledních dvacet let došlo k výraznému pokroku objevením nových cytostatik a také změnou strategie a jejich dávkování.

Toxicita cytostatik se obvykle rozděluje na hematologickou a nehematologickou. Zatímco hematologickou toxicitu lze dnes poměrně dobře léčebně zvládnout, problémem zůstává toxicita nehematologická. Ta se týká především jater, ledvin, plic, gastrointestinálního ústrojí a srdce. Nejzávažnější poškození srdce mohou způsobit antracykliny.

Již v roce 1964 popsal americký vědec David A. Karnofsky závislost mezi chronickým podáváním daunorubicinu a vznikem srdečního selhání. Toxický účinek na srdce se může projevit jako akutní, subakutní nebo chronický. Byla popsána i takzvaná pozdní kardiotoxicita, která se objevuje za 5 až 20 let po léčbě těmito cytostatiky. To se týká hlavně lidí, kteří byli v dětském věku léčeni na maligní onemocnění.

O kardiotoxicitě antracyklínů bylo již napsáno mnoho publikací, ale i přesto však stále zůstává řada nedořešených otázek, které bude nutno v budoucnu zodpovědět, např. přesná definice kardiotoxicity, mechanismus kardiotoxicity, optimální diagnostický a monitorovací přístup či možnosti ideální prevence.

Tématem mé práce bylo studium endoteliální dysfunkce. Mým výzkumným záměrem konkrétně bylo prozkoumat imunohistochemickými metodami expresi buněčných adhezních molekul na povrchu aortálního oblouku u experimentálního králičího modelu při expozici antracyklinovými cytostatiky.

1 FYZIOLOGICKÁ FUNKCE ENDOTELU

O endotelu se dlouho dobu myslelo, že je pouhou inertní vrstvou připomínající semipermeabilní celofán, která kryje povrch cévní stěny a zajišťuje její permeabilitu. Krátce poté, co William Harvey objevil krevní oběh v roce 1628, popsal Malphigi systém cévní sítě v těle jako oddělený systém od ostatních tkání. Později v 19. století von Reckingausen prohlásil, že cévy nejsou jen provrtané skulinky skrz tkáň, ale že to jsou samostatné celky utvořené z vlastních buněk. V roce 1896 přichází Starling s teorií kapilárního systému, kde endotel je selektivně propustná bariéra, která je po celý život konstantní ve své propustnosti, která je později roku 1891 doplněna Heidenhahnem, že na endotelových buňkách dochází též k aktivnímu transportu. Na významu přidaly Paladovy histologické studie cévní stěny s využitím elektronového mikroskopu v roce 1953, jakož i fyziologická pozorování Gowana v roce 1959, která jednoznačně prokázala interakce mezi endotelem a lymfocyty. To doslova vyprovokovalo vlnu nejrůznějších dalších studií, díky nimž je dnes endotel viděn jako složitý, dynamický a heterogenní systém umožňující vylučovací, syntetické, metabolické a imunologické funkce (Fishman, 1982).

1.1 Základní funkce endotelu

Jednou ze základních funkcí endotelu je zajištění řízené propustnosti mezi krví a okolními tkáněmi. Endotel kontroluje vstup jak pro buněčné elementy, tak pro nebuněčné krevní komponenty. Nebuněčné komponenty využívají pro svou cestu jak paracelulární, tak transcelulární transportní mechanismy. Vstup krevních elementů (především leukocytů) je realizován pomocí vazoadhezivních molekul, kterých endotel na svém povrchu exprimuje celou řadu. Migrace leukocytů začíná aktivací a interakcí selektinů, tyto interakce zprostředkovávají prvotní kontakt leukocytů (L-selektiny) s aktivovaným endotelem (E-selektiny, event. P-selektiny), a přechází do tzv. rolování leukocytů podél endoteliálních buněk. Následuje vazba mezi integriny na povrchu leukocytů (LFA-1, MAC-1) a příslušnými adhezivními molekulami na povrchu endoteliálních buněk (ICAM-1, VCAM-1). Tato vazba je silnější, dochází

k adhezi leukocytů. Třetí fáze - transmigrace leukocytů do subendoteliálních prostor - je zprostředkována dalšími adhezivními molekulami (PECAM-1) a cytokiny (MCP-1).

Druhou úlohou endotelu je kontrola optimálního průtoku krve cévou. (viz Tabulku 1.) Endotel syntetizuje celou řadu látek s vazodilatačním účinkem. Mezi nejdůležitější patří oxid dusnatý (NO). Jeho tvorba je zprostředkována NO-syntázou, která je specificky aktivována smykovým napětím krevního proudu (*shear stress*), hypoxií a celou řadou působků. NO má mohutný vazodilatační účinek, inhibuje expresi adhezivních molekul, adhezi a agregaci trombocytů a apoptózu endoteliálních buněk. Brzdí také migraci myocytů z medie, jejich proliferaci a transformaci v sekreční buňky. Mezi další vazodilatační faktory produkované endotelem se řadí prostacyklin. Prostacyklin působí aditivně k účinku NO, je uvolňován za obdobných situací, jejich účinek se také navzájem potencuje. Třetím vazodilatačně působícím faktorem je *Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor* (EDHF), jehož hlavní biologickou úlohou je pravděpodobně vazodilatace v koronárním řečišti. Tyto chemicky značně odlišné sloučeniny nejsou skladovány v intracelulárních granulích. Jejich biologické účinky jsou zprostředkované díky specifickým receptorům na hladkosvalových buňkách cévy, buď spuštěním rychlé biochemické kaskády nebo na úrovni genetické transkripce. Oxid dusný je tvořen nepřetržitě, ale jeho produkce je regulována velkým množstvím fyzikálně-chemických podnětů, zatímco ostatní zmíněné mediátory jsou tvořeny primárně v závislosti na změnách vnějšího prostředí.

K zachování rovnováhy vzniká v endotelu několik látek s vazokonstrikčním působením. Nejvýznamnější jsou endoteliny - v endotelu je produkován endotelin-1. Vedle podnětů, které vedou i k uvolnění NO (například bradykinin, angiotenzin II, *shear stress*), stimulují syntézu endotelinu-1 některé aterogenní proteiny (trombin) nebo lipoproteiny (oxidovaný LDL). V intaktních cévách působí endotelin-1 bimodálně - vazokonstrikční účinek je mírněn současnou stimulací produkce NO a prostacyklinu. Plná vazokonstrikce se objeví až při poškození endotelu. Endotelin-1 také stimuluje proliferaci myocytů v cévní stěně. Na povrchu endotelu je také vázán angiotenzin konvertující enzym a endotel může prostřednictvím změny jeho aktivity ovlivňovat hladiny angiotenzinu II a bradykininu.

Další funkcí endotelu je zajištění integrity cévního řečiště. Intaktní endotel je dokonale nesmáčivým povrchem. Už při deskvamaci endoteliálních buněk dochází k absorpci von Willebrandova faktoru (vWF), který prostřednictvím destičkových - receptorů aktivuje adhezi trombocytů, jež se vážou na subendoteliálně lokalizovaná vlákna kolagenu. Poté dochází k jejich aktivaci a degranulaci, což vede k uvolnění řady dalších proagregačně a vazokonstrikčně působících látek. Prostřednictvím destičkových receptorů IIb/IIIa a fibrinogenu destičky agregují. Primární, destičková fáze hemokoagulace je doprovázena sekundární hemostázou, na jejímž konci je přeměna fibrinogenu trombinem v nerozpustný fibrin. I tato fáze je ovlivnitelná endotelem. Endotel váže na svém povrchu antitrombin III, který inaktivuje trombin, a vzniklý komplex je z cirkulace odstraněn. Endotel také produkuje trombomodulin. Komplex trombomodulin-trombin má už omezenou schopnost štěpit fibrinogen, navíc aktivuje protein C, který - v komplexu s proteinem S - inaktivuje faktory Va a VIIa, a tím inhibuje koagulaci. Endotel kontroluje navíc i fibrinolýzu. Klíčovým enzymem štěpícím molekuly fibrinu je plazmin. Ten vzniká z cirkulujícího plazminogenu působením tkáňového aktivátoru plazminogenu (t-PA). Ten naopak může být inhibován svým inhibitorem (PAI-1). Jak t-PA, tak PAI-1 jsou v endotelu syntetizovány a mohou být v různém poměru uvolňovány (Mizia-Stec et al 2003).

Endotel může zasahovat i do reparativních procesů a angiogeneze. Reparativní pochody v cévní stěně jsou kontrolovány řadou cytokinů. Mezi růstové faktory a cytokiny endoteliálního původu jsou řazeny například transformující růstový faktor beta, fibroblastový růstový faktor, destičkový růstový faktor, interleukin-1 a endotelin-1. Tyto mitogeny stimulují růst buněk hladké svaloviny, jejich migraci do subendoteliálního prostoru z medie s následnou hyperplazií intimy, a hypertrofii cévní stěny. Naopak velmi významným antimitogenem je NO, který inhibuje proliferaci buněk hladké svaloviny a zabraňuje hypertrofii cévní stěny (Miller & Cappuccio 2002).

Tabulka č.1 - Vasoregulační působky vytvářené endotelem

Působek	Typ sloučeniny	Její prekursor	Hlavní účinek	Ostatní účinky	Způsob sekrece
NO (oxid dusný)	volný radikál	L-arginin	vasodilatace	udržuje bazální cévní tonus; inhibuje adhezi leukocytů, inhibuje adhezi, aktivaci a agregaci destiček a zároveň podporuje jejich desagregaci; inhibuje proliferaci hladkosvalových buněk cévy	<i>parakrinní</i> , deponován v konstitutivní formě, indukován trombine,ADP, bradykininem, substancí P, muscarinovými agonisty, mechanickým napínáním, cytokiny
PGI ₂ (prostacyklin)	eikosanoid	kyselina arachidonová	vasodilatace	blokuje nános krevních destiček a jejich shlukování	<i>parakrinní</i> , indukován v místech cévní odchylky
PAF (trombocyty aktivující faktor)	fosfolipid	kyselina arachidonová	vasokonstrikce	napomáhá adhezi leukocytů na povrchu endotelu	<i>juxtakrinní</i> , indukovaný
ET-1 (endothelin-1)	peptid tvořen 21 AK	preproendothelin 1 (203 AK)	vasokonstrikce	podporuje proliferaci hladkosvalových buněk cévy, moduluje účinky ostatních působků	<i>parakrinní</i> , indukovaný hypoxií, mechanickým napínáním a ischemií

1.2 Interakce mezi krevními elementy a cévní stěnou

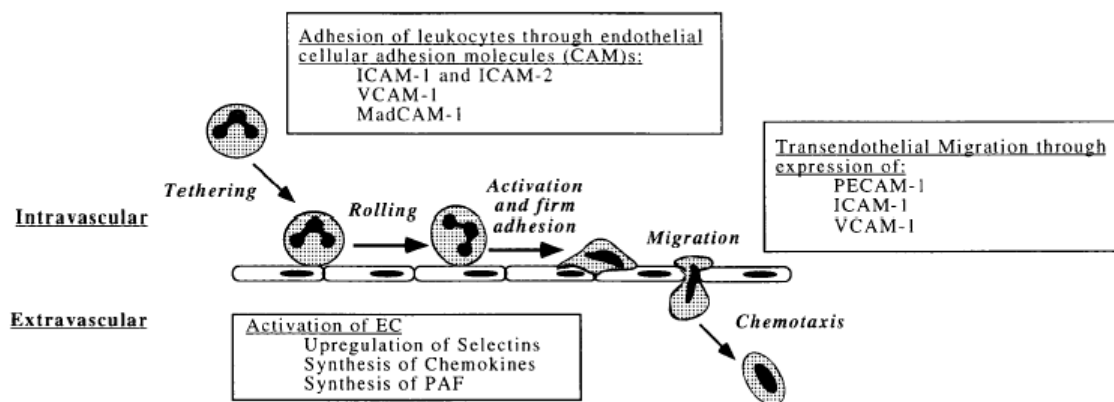
Endoteliální buňky, kromě toho, že se významně podílejí na mechanismu krevního srážení, obsahují také na svém povrchu makromolekuly, tzv. buněčné adhezivní molekuly (zkratka CAM cellular adhesion molecules), které napomáhají fyziologické migraci leukocytů skrz cévní stěnu do konkrétních tkání a orgánů. Tato migrace je pak umocněna a zacílena na popud nejrůznějších markerů zánětu např. interleukínů IL-6 či IL-8. V poslední době se ukázalo, že tyto „cévní průchody“ hrají též určitou roli při adhezi trombocytů a erytrocytů.

Volně plovoucí leukocyty a krevní destičky mohou přilnout ke specifickým oblastem endotelu nebo k odhaleným subendoteliálním součástem anebo k sobě navzájem při imunitním „dozoru“ či zánětlivém procesu. Tyto buněčné interakce jsou nezbytným předstupněm pro spuštění hemostatické kaskády či tzv. fyziologického zánětlivého procesu. Na druhou stranu nekontrolované ulpívání leukocytů a trombocytů na stěně cévní přispívá k rozvoji zánětlivého procesu či trombotizaci.

Průnik se realizuje pomocí buněčných adhezivních molekul (viz též kapitola 3). Proces probíhá převážně v postkapilárních venulách, kde jsou menší unášivé krevní proudy (shear stress). Oba typy krevních elementů, leukocyty i trombocyty interagují s cévní stěnou resp. buněčnými adhezivními molekulami a pronikají přes ní.

Tento vícekrokový proces zahrnuje:

- (1) výchozí vratné uskupení leukocyt-buněčná adhezivní molekula
- (2) aktivace endotelové buňky
- (3) vytvoření ireverzibilního komplexu a zakotvení v endotelu
- (4) rozprostření se na povrchu endotelu a postupná emigrace z cévy



Obrázek 1. - Fyziologická interakce leukocytů s endotelem. Leukocytární adheze a migrace skrz cévní stěnu vyskytující se během zánětu převážně v postkapilárních venulách, kde jsou nejslabší unášivé krevní proudy (Blankenberg et al 2003).

2 DYSFUNKCE ENDOTELU

Endoteliální dysfunkce je definována jako funkční poškození endotelu, charakterizované především zvýšenou propustností cévní stěny, nerovnováhou mezi vazoaktivními, hemokoagulačními a proliferaci inhibujícími, resp. stimulujícími působky. Kromě selektivního zvýšení permeability se projevuje sklonem k vazospasmu, resp. nedostatečnou vazomotorickou odpovědí na endotel-dependentní podnět (někdy dokonce paradoxní vazokonstrikcí), tendencí k trombóze a nedostatečnou inhibicí subendoteliální proliferace. Představuje časnou, morfologicky němou fázi aterosklerózy, ale podílí se i na vývoji morfologicky zřejmých aterosklerotických lézí a přispívá ke klinické manifestaci aterosklerózy. Hraje rovněž důležitou roli v patogenezi hypertenze, srdečního selhání, renálního selhání, komplikací diabetes mellitus, sepse a dalších chorob (Busse & Fleming 1996).

Existuje řada příčin endoteliální dysfunkce. Většina z nich jsou známé rizikové faktory aterosklerózy. Mezi hlavní příčiny patří arteriální hypertenze, hyperlipoproteinemie (zejména hypercholesterolemie a především zvýšená hladina LDL, přičemž nejnebezpečnější jsou oxidované či glykované LDL), hyperglykémie, hyperinzulinemie, hypoxie, hyperhomocysteinemie, kouření, ionizující záření, cytostatika, stárnutí, imunokomplexy a různé infekce. Je zřejmé, že například u diabetu působí navzájem několik rizikových faktorů, které vznik endoteliální dysfunkce akcelerují. K těmto systémovým faktorům se mohou přidat lokálně působící faktory, jako jsou turbulence krevního toku (bifurkace cévy, její menší fixace k okolí), vrozené nebo získané cévní anomálie či intravaskulární výkony (angioplastika) (Zoccali 2006).

Endoteliální dysfunkce se podílí na vývoji jak časných, tak i pozdních fází aterosklerózy. Sama její přítomnost i bez morfologicky prokazatelných aterosklerotických lézí je dnes akceptovaná jako iniciální fáze aterosklerotického procesu. Dysfunkční endotel umožňuje vyšší průnik aterogenních lipidů. Zvýšenou expresí adhezivních molekul a produkcí některých cytokinů usnadňuje také kumulaci monocytů v cévní stěně, jejich přeměnu v makrofágy a pěnové buňky. Nedostatečná produkce NO vede k uplatnění řady růstových faktorů, stimulujících buňky hladkého

svalstva k migraci do subendoteliálních prostor a k produkci extracelulární vazivové komponenty aterosklerotických lézí. Už v těchto fázích, kdy morfologické změny cévy nejsou přítomné, anebo jsou hemodynamicky nevýznamné, se může klinicky manifestovat přítomný sklon k vazospasmům, například formou mikrovaskulární anginy pectoris či tranzitorní mozkové ischemie (*amaurosis fugax*).

I v pozdějších fázích endoteliální dysfunkce akceleruje vývoj aterosklerózy. Podílí se na kumulaci makrofágů a pěnových buněk v aterosklerotickém plátu, a prostřednictvím metaloproteináz, které mohou rozrušovat fibrózní čepičku plátu, zvyšuje jeho vulnerabilitu. Nedostatečná produkce NO, prostacyklinu a dalších působků inhibujících adhezi a agregaci destiček, a naopak zvýšená exprese von Willebrandova a tkáňového faktoru navozují protrombogenní stav. Tak může ruptura i hemodynamicky nevýznamného plátu s nasedající trombózou vést k rychlému uzavření tepny zvláště, když endoteliální dysfunkci provází snížená fibrinolýza. K úplnému uzávěru tepny může také přispět už zmíněný zvýšený sklon k vazospasmům.

Předpokládá se, že detekce endoteliální dysfunkce by mohla přispět k identifikaci zatím asymptomatického jedince se zvýšeným rizikem manifestace aterosklerózy. To by umožnilo jeho časnou dispenzarizaci a eventuální zahájení preventivních opatření s cílem pozastavit nebo dokonce navodit regresi aterosklerotického procesu, a oddálit tak jeho klinickou manifestaci (Corrado et al 2005).

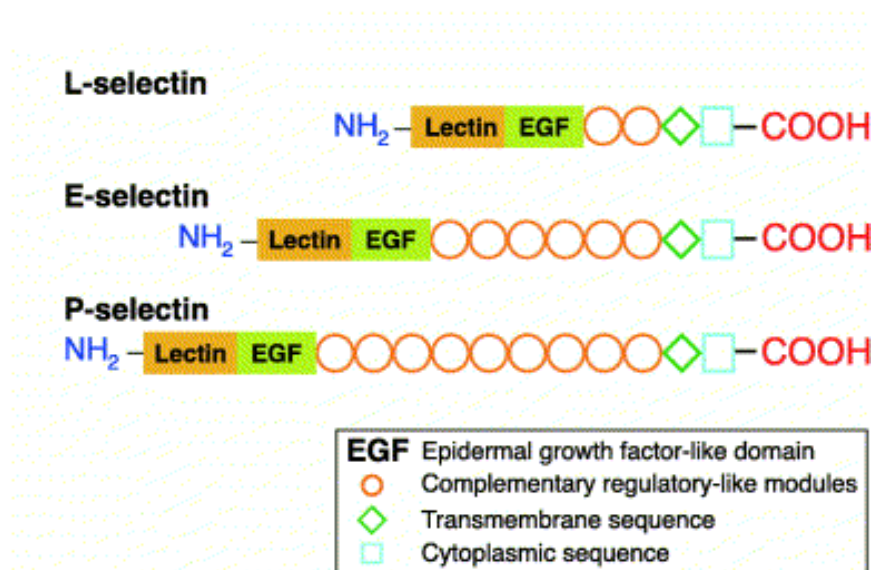
3 ADHEZNÍ MOLEKULY

Adhezní molekuly jsou látky proteinového charakteru, které jsou exprimované na povrchu všech tkání organismu. Nepůsobí pouze jako pasivní lepidlo, ale účastní se také přenosu signálů mezi buňkami a podílí se tak na interakci buněk s okolním prostředím. Adhezní molekuly se účastní řízení řady fyziologických dějů, jako jsou embryogeneze, buněčný růst a diferenciaci, hojení ran, či obnova tkání. Uplatňují se ale také při patologických procesech, kde se např. podílejí na interakcích mezi složkami imunitního systému (Joseph-Silverstein & Silverstein 1998).

Podle strukturních vlastností je můžeme rozdělit na 4 základních skupin. Jsou to **selektiny, integriny, imunoglobulinová skupina a kadheriny**.

3.1 *Selektiny*

Jsou známy 3 základní typy L (leukocytární), E (endoteliální), P (destičkové). Strukturou jsou to proteiny obsahující na svém N-konci lektínovou nebo lecitinovou doménu, která se účastní interakce s příslušnými ligandy (nejčastěji sacharidovými). Viz následující obrázek. Obecně mají význam při počátečních fázích zachycování leukocytů na endoteliích.



Obrázek 2. – Struktura selektinů – EGF je oblast epidermálního růstového faktoru, ○ komplementární regulační úsek, □ cytoplasmatická část, ◇ transmembránová část

3.1.1 Typ L

Má schopnost rozeznávat sacharidové struktury exprimované na endoteliálních buňkách v postkapilárních venulách lymfatických uzlin, má význam pro „homing“ (usídlování) lymfocytů do lymfatických uzlin. Zachytí se postupně na endoteliálních buňkách „high endothelial venules“ = HEV a protáhnou se mezi nimi do vlastní lymfoidní tkáně

3.1.2 Typ E

Je exprimován pouze na endotelu, který je aktivován zánětlivými cytokiny (TNF- α , INF- γ ...) tj. hlavně buňkami které pokrývají aterosklerotické léze (bohaté na

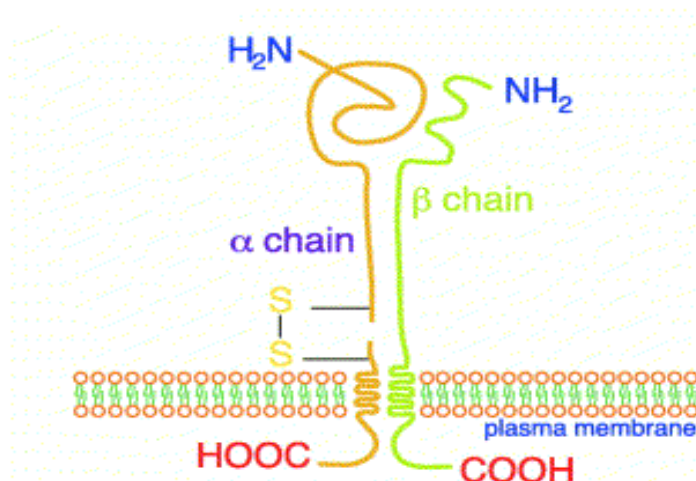
lipidy) u lidí. Dále rozeznává sacharidové struktury na povrchu granulocytů a trombocytů. U zvířecích modelů je exprese E-selektinu nižší než exprese P-selektinu.

3.1.3 Typ P

Nachází se v α_a denzních granulích destiček a Weibel-Paladeho tělíscích endoteliálních buněk, podílí se na adhezi (rolování) trombocytů a neutrofilů k aktivovanému endotelu a je exprimován pouze na něm ještě před akumulací makrofágů v intimě cév, tj. v časných stádiích aterosklerózy.

3.2 Integriny

Jejich strukturu tvoří transmembránové glykoproteiny se dvěma nekovalentně asociovanými podjednotkami α a β , obsahují N-konec, transmembránovou oblast a cytoplazmatický konec. Dodnes je popsáno nejméně 16 α podjednotek a 8 β podjednotek, které mohou vytvořit až 20 heterodimerních kombinací. Exprimují se na leukocytech, trombocytech i endotelu (Albelda 1993).



Obrázek 3. – Struktura integrinů – na alfa řetězci je jeden disulfidický můstek, na beta řetězci chybí, oba N-konce jsou situovány vně buňky

Jejich funkce spočívá v tom, že váží složky mezibuněčné hmoty, kolagen, fibronektin a laminin. Z hlediska vztahu k ateroskleróze jsou méně významné.

3.2.1 β 1 tzv. VLA (very late antigens) integriny

α 4 β 1 (VLA-4, CD49d/CD29) – vytváří vazbu s VCAM-1

3.2.2 β 2 integriny, zvané též leukocytární integriny

α L β 2 (LFA-1, CD11a/CD18) – vytváří vazbu s ICAM-1

Integriny jsou zásadní pro vytvoření pevné a stabilní vazby leukocytů k endotelu v místě zánětlivé reakce a jsou exprimovány konstitučně, ale ve dvou konformačních stavech, které se významně liší afinitou ke svým ligandům.

3.3 *Imunoglobulinová skupina*

Tato skupina adhezivních molekul je rozsáhlá rodina povrchových buněčných molekul, která představuje 50% všech povrchových molekul leukocytů. Jde o látky glykoproteinového charakteru tvořené opakujícími se Ig doménami z beta řetězců. Zprostředkovávají jak homofilní (vazba adhezivní molekuly v jedné buňce na stejnou molekulu ve druhé), tak heterofilní interakce (vazba adhezivní molekuly v jedné buňce na neidentickou molekulu ve druhé buňce (Mareckova et al 1999). Patří sem celá řada adhezivních molekul jako antigenně specifické receptory T a B lymfocytů TCR, BCR, koreceptory T lymfocytů CD4 a CD8, které jsou důležité pro jejich správnou funkci při imunitních reakcích.

Z hlediska vztahu k ateroskleróze jsou nejvýznamnějšími zástupci vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) a platelet cell adhesion molecule-1 (PECAM-1).

3.3.1 Struktura a funkce VCAM-1 a ICAM-1

Strukturně jsou obě adhezivní molekuly transmembránovými glykoproteiny obsahující N-konec, sérii Ig domén s disulfidickými můstky, transmembránovou oblast a cytoplazmatický konec (obrázek níže).



Obrázek 4. – Struktura VCAM-1 – hlavní část s IG doménami a disulfidickými můstky je situována vně buňky

VCAM-1 má 7 extracelulárních domén, přičemž domény 1 a 4 jsou specifická vazebná místa pro vazbu $\alpha_4\beta_1$ integrinu (VLA-4) a někdy pro vazbu $\alpha_4\beta_7$ integrinu (Springer, 1994). ICAM-1 má 5 extracelulárních domén, přičemž domény 1 a 3 jsou specifická vazebná místa pro vazbu $\alpha_L\beta_2$ integrinu (LFA-1), respektive pro vazbu $\alpha_M\beta_2$ integrinu (Mac-1), které jsou exprimovány na leukocytech (Diamond, Springer, 1993) ICAM-1 může interagovat s řadou dalších molekul jako jsou C3b, fibrinogen a bakteriální lipopolysacharid. Jak VCAM-1 tak ICAM-1 se podílí na stabilizaci vazby leukocytů k endotelu a podílí se tedy na jejich diapedezi. VCAM-1 zřejmě navíc selektivně vycytává mononukleární leukocyty protože ty na rozdíl od neutrofilů exprimují α_4 integriny (Cybulsky, 1999).

3.3.2 Exprese VCAM-1 a ICAM-1

VCAM-1 i ICAM-1 jsou exprimovány endoteliálními buňkami, makrofágy a hladkosvalovými buňkami (Ann Jang, 1994). Studie na králících a myších prokázaly, že VCAM-1 je endoteliálními buňkami exprimován ještě před akumulací makrofágů a T lymfocytů to v oblastech které jsou predispoziční ke vzniku lézí, přičemž lokalizace těchto míst je často ovlivněna hemodynamickými vlastnostmi především shear stresem. ICAM-1 je exprimován ve stejných oblastech jako VCAM-1, ale exprese ICAM-1 je pozorována i v oblastech s nízkou pravděpodobností výskytu aterosklerotických lézí (Iiyama, 1999). U malých aterosklerotických lézí je VCAM-1 i ICAM-1 exprimován především endoteliálními buňkami, přičemž VCAM-1 je exprimován i hladkosvalovými buňkami, které přiléhají k aterosklerotické lézi. U pokročilejších aterosklerotických lézí je VCAM-1 i ICAM-1 exprimován většinou buněk, které se nacházejí v intimě cév. Přesto se ukazuje, že VCAM-1 je exprimován především v oblastech výskytu lézí, zatímco ICAM-1 je exprimován endoteliálními buňkami i mimo aterosklerotickou lézi.

Exprese těchto adhezivních molekul je ovlivňována řadou faktorů, které se uplatňují i v patogenezi aterosklerózy. Hypercholesterolemie a oxidované LDL (Khan, 1995) a diabetes (Vlassara, 1995) zvyšují expresi jak ICAM-1, tak VCAM-1. Také kouření (Powell, 1998), hyperhomocysteinemie (Loscalzo, 1996), hemodynamický stres (nízký shear stress) zvyšují expresi VCAM-1 a ICAM-1 (Wapola, 1995). Exprese obou těchto molekul je také indukována zánětlivými cytokiny jako TNF- α nebo IL-1 (Marui, 1993).

3.3.3 PECAM

Exprimován konstitučně na klidovém cévním endotelu, leukocytech, trombocytech, podílí se na angiogenezi a na transmigraci leukocytů do subendoteliálních prostorů.

3.4 Kadheriny

Představují hlavní strukturální glykoproteiny, které tvoří adherentní mezibuněčné spoje zvané zonula adhaerens (adherens junctions). Jsou tvořeny pěti extracelulárními doménami, jejichž vazba je stabilizována vápenatými ionty, transmembránovou oblastí a cytoplazmatickou doménou.

Obecně se podílí na diferenciaci, proliferaci a migraci buněk, na angiogenezi a na reparaci poškozené tkáně. Ve vztahu k ateroskleróze mají největší význam epiteliální (E)-kadherin a vaskulární-endoteliální (VE)-kadherin.

3.4.1 Epiteliální (E)-kadherin

Má zásadní vliv na normální embryogenezi a morfogenezi. V onkologii se poukazuje na vztah mezi sníženou expresí, porušením funkce E-kadherin-kateninových komplexů a zvýšenou invazivností nádorů a rizikem vzniku metastáz. Ve vztahu k aterogennímu procesu bylo zjištěna exprese E-kadherinu v lidských aterosklerotických lézích u buněk, které se transformovaly na pěnové buňky, což má za následek agregaci těchto pěnových buněk a formování lipidového jádra.

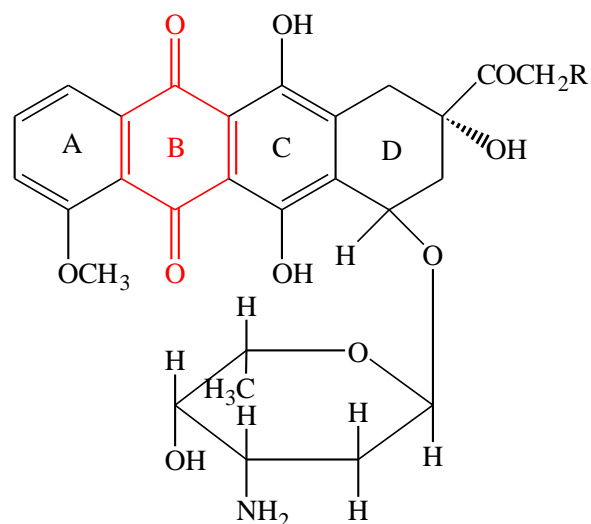
3.4.2 Vaskulární-endoteliální (VE)-kadherin

VE je exprimován cévním endotelem téměř u všech typů cév. Je nutný pro normální angiogenezi. Je zásadní pro udržování normální permeability cévního endotelu. Důležitým zjištěním bylo, že trombin, histamin, TNF- α , interferon- γ či hemodynamický stres destabilizují kadherin-kateninové komplexy a způsobují zvýšení permeability endotelu, čímž přispívají ke vzniku endoteliální dysfunkce (Bobryshev et al 1999).

4 ANTRACYKLINOVÉ ANTINEOPLASTICKÉ LÁTKY

Onkologická léčba je často provázena řadou vedlejších nežádoucích účinků, které mohou zkomplikovat a někdy i zmařit její výsledný efekt. Závažnou komplikací je poškození srdce neboli kardiotoxicita. I když se nevyskytuje tak často jako např. hematologická toxicita, hepatotoxicita nebo nefrotoxicita, nelze ji vzhledem k možným fatálním komplikacím podceňovat. Nejčastějšími projevy kardiovaskulární toxicity jsou arytmie, změny krevního tlaku, srdeční selhání, ischemie myokardu a perikarditida. Většina těchto komplikací probíhá akutně, tj. objevují se v průběhu léčby nebo bezprostředně po jejím ukončení. Výjimečné postavení mezi cytostatiky zaujímají antracykliny se svojí chronickou a pozdní kardiotoxicitou, která se může projevit až s časovým odstupem po ukončení léčby.

Antracyklinová antibiotika jsou jedny z nejužívanějších cytostatik. V šedesátých letech byl z hub *Streptomyces peucetilis* a *Streptomyces ceruleorubidus* izolován daunorubicin (též zvaný daunomycin, rubidomycin) a vzápětí na to i dosud nejvýznamnější antracyklinový derivát – doxorubicin (adriamycin). Jedná se o látky tvořené z tetracyklického aglykonu a glykosidicky vázaného aminocukru daunosaminu. Oba deriváty se liší pouze jednou hydroxylovou skupinou na C14 (obr. níže), nicméně je mezi nimi značný rozdíl v indikačním spektru. Chinonová část aglykonu (kruh B) má zásadní význam pro tvorbu volných kyslíkových radikálů redoxní cyklizací (Gewirtz 1999).



Obrázek 5. - Chemická struktura antracyklinu ($R = -OH$ doxorubicin, $R = H$ daunorubicin).

4.1 Mechanismus cytostatického účinku

Navzdory tomu, že antracyklinová antineoplastika jsou v medicíně používána téměř třicet pět let, stále není plně vyjasněn jejich mechanismus účinku. Protinádorový účinek těchto léčiv je patrně výsledkem poměrně složitých dějů odehrávajících se v maligně transformované buňce. Porozumění mechanismu cytostatického účinku je důležité nejen s ohledem na co nejefektivnější užití těchto látek, ale též pro vývoj protektivně působících látek. Mechanismus protektivního působení by neměl interferovat s mechanismem protinádorového účinku.

4.1.1 Interkalace

Jeden z mechanismů cytostatického působení antracyklinových cytostatik je interkalace, resp. „vmezeření“ léčiva do DNA. Tento jev je založen na nekovalentní vazbě cytostatika (vodíkové můstky, van der Waalsovy síly, elektrostatické a hydrofobní interakce) k DNA. U antracyklinů dochází k vmezeření specificky mezi páry C-G bazí. Vzniklý komplex DNA-antracyklin následně potlačuje transkripci a replikaci DNA. V současné době je role interkalace v klinickém účinku

antracyklinových cytostatik do určité míry zpochybňována. Ukazuje se, že k tomuto ději dochází významnou měrou až při vysokých - klinicky irelevantních - koncentracích cytostatika (Dunkern 2003).

4.1.2 Inhibice topoisomerázy II

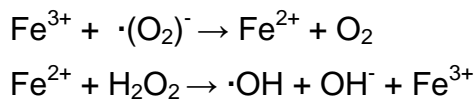
Topoisomerázy jsou jaderné enzymy, které se podílejí téměř na všech biologických dějích kde figuruje dvojšroubovice DNA (replikace, transkripce, rekombinace a chromosom utvářející děje). Topoisomeráza I se naváže na jeden řetězec DNA, který dočasně rozpojí, dojde k uvolnění nadměrné torze a opět ke spojení. Dočasné rozpojení umožní replikační proces. Topoisomeráza II se váže na oba řetězce DNA, způsobí jejich přerušení i spojení a umožní separaci chromozomů při mitóze (Elbl, 2002). Topoisomeráza II je pak jako jediná z celé této rodiny enzymů naprosto nezbytná pro život. Antracykliny pravděpodobně vytvářejí stabilní ternární komplex topoisomeráza II – DNA a tak inhibují zpětné spojení obou vláken DNA. Důsledkem je kumulace zlomů na dvojšroubovici DNA s následnou indukcí programované buněčné smrti - apoptózy (Dunkern 2003, Lothstein 2001). Expresí antiapoptotických proteinů může být jedním z faktorů určujících rezistenci nádoru vůči chemoterapii antracyklinovými antineoplastiky.

4.1.3 Tvorba volných kyslíkových radikálů

Existují dva základní mechanismy vzniku kyslíkových radikálů: 1) redoxní cyklizací a 2) tvorbou komplexu s ionty železa (Keizer 1990).

- 1) Redukcí chinonového kruhu NADPH dependentní oxidoreduktázou vzniká semichinonový kruh, který v podobě radikálu reakcí s kyslíkem dává vznik superoxidu $\cdot(O_2^-)$ popřípadě s peroxidem vodíku vznik hydroxylovým radikálům $\cdot OH$ za katalýzy železem.
- 2) Vazbou na ADP a železo vzniká perferylový komplex, který se rozpadá za uvolnění peroxidu vodíku .

Ionty železa mají klíčovou úlohu v tvorbě toxických kyslíkových radikálů, protože mají schopnost jak přijímat, tak uvolňovat elektrony dle rovnic (Elbl, 2002):



Do jaké míry však fakticky přispívá produkce volných kyslíkových radikálů (ROS) k protinádorovému působení, není zcela jasné. Z dostupných informací se zdá, že ROS se účastní na protinádorovém efektu antracyklinů spíše minoritně, na rozdíl od kardiotoxicity, kde patrně hrají velmi významnou úlohu (Keizer 1990, Gewirtz 1999). Podrobně jsou tedy zmíněné mechanismy diskutovány v oddílu věnujícímu se kardiotoxicitě.

4.2 Způsob podání a farmakokinetika antracyklinů

Antracykliny se podávají intravenózně. Ostatní způsoby podání (např. intraperitoneální) jsou užívány pouze experimentálně, nebo ve zvláštních případech (terapie nádorů peritonea) (Rossi 2003). Výjimkou je novější derivát idarubicin, u něhož je také možná perorální aplikace. Po intravenózním podání se antracyklinová antibiotika rychle distribuují do celého těla, zvláště pak do ledvin, sleziny, jater, plic a srdce. Tato léčiva se podstatnou měrou váží na intracelulární komponenty (včetně DNA). Distribuční objem doxorubicinu je vyšší než 25 l/kg. Antracykliny patrně nepronikají skrz hematoencefalickou bariéru, ale pronikají placentární bariérou do plodu a také do mateřského mléka.

K biotransformaci antracyklinů dochází z velké části v játrech za účasti cytoplazmatických enzymů aldo-keto reductáz. Vznikají alkoholické metabolity (doxorubicinol, daunorubicinol atd.) s mnohem nižší cytostatickou aktivitou, ovšem se značným toxickým potenciálem. Uvedený typ biotransformace se uplatňuje i v jiných tkáních (např. myokard); alkoholické metabolity se zde mohou aktivně podílet na orgánové toxicitě. Dále dochází k hydrolýze glykosidické vazby prostřednictvím NADP-reduktázy, konjugaci s kyselinou glukuronovou a sulfátem.

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

4.3 Indikace a dávkování antracyklinů

Malý rozdíl ve struktuře mezi daunorubicinem a doxorubicinem se ukázal být zásadní pro jejich klinické uplatnění. Podstata toho jevu ovšem zatím nebyla vysvětlena. Daunorubicin je téměř výhradně užíván v kombinační terapii akutní myeloblastické či lymfoblastické leukémie, v dávce 45-60 mg/m².den. Naproti tomu doxorubicin má spektrum indikací podstatně širší. Užívá se i v léčbě mnohočetného myelomu, Hodgkinových i nehodkinových lymfomů, jakož i u celé řady solidních tumorů (karcinom prsu, vaječníků, malobuněčný karcinom plic a sarkom měkkých tkání). Doxorubicin se většinou podává v kombinačním chemoterapeutickém režimu. Bývá aplikován jedenkrát za 3 týdny v dávce cca 60-75 mg/m², formou pomalého bolusu či krátkodobé (popř. kontinuální) infúze. Všechny antracykliny je nutné podávat přísně intravenózně, neboť paravenózní aplikace způsobuje obávanou nekrózu a zánět v okolní tkáni (Klener 1996, Jensen 2003).

4.4 Extrakardiální nežádoucí a toxické účinky antracyklinů

Antracykliny, podobně jako všechna ostatní cytostatika, vykazují pouze relativní selektivitu svého cytostatického účinku. Následkem toho provází cytostatickou terapii řada nežádoucích účinků. Pro antracykliny je charakteristická významná myelosuprese, jež může výrazně ovlivňuje dávku podaného léčiva. Úbytek leukocytů je nejmarkantnější druhý týden po aplikaci s úpravou ve čtvrtém týdnu terapie. Trombocytopenie a anémie se vyvíjejí obdobně, ale jsou většinou méně výrazné. Bylo pozorováno, že pokles leukocytů po podání doxorubicinu má významný vztah k AUC léčiva a podobně byla nalezena korelace mezi AUC doxorubicinolu a poklesem neutrofilů a trombocytů (Danesi 2002). Jako u dalších cytostatik se přechodně vyskytuje nauzea, zvracení, mukositida a alopecie. V místě podání bývá občas pozorováno zarudnutí, které je v podstatě lokální benigní alergickou reakcí a nemělo by být zaměňováno za náhodné paravenózní podání. Zřídka se vyskytuje „flash“ v obličeji, horečka, konjunktivitida, kožní a nehtové pigmentace (Klener 1996). Mutagenní a karcinogenní potenciál byl prokázán na laboratorních modelech (Goodman 2001). U hlodavců a králíků používaných v preklinických experimentech byla zaznamenána poměrně výrazná nefrotoxicita antracyklinů. Ačkoliv podstata

tohoto jevu nebyla dosud vysvětlena, některé práce dokumentují podíl ROS na tomto druhu toxicity. Změny v ledvinách bývají charakterizovány jako degenerace epithelií proximálního a distálního tubulu se známkami nekrózy i apoptózy a s přítomností proteinového materiálu v lumen tubulů. Nefrotoxicita ovšem nebývá závažnější komplikací terapie antracykliny v humánní medicíně (Herman 1988).

5 ANTRACYKLINOVÁ KARDIOTOXICITA

První zmínky o kardiotoxickém působení antracyklinů se objevily již krátce po jejich zavedení do klinické praxe (Lefrak 1973). Kardiotoxické působení antracyklinových cytostatik se do značné míry vymyká nežádoucím účinkům běžně sledovaných u jiných cytostatik. Nespecifita cytotoxického působení se nejčastěji projeví na rychle proliferujících tkáních (např. kostní dřeň, sliznice aj.). Kardiotoxicitu, ačkoliv většinou méně závažnou, však pozorujeme i u některých jiných cytostatik (např. mitoxantron, bleomycin, cyklofosfamid, cisplatina, busulfan). V poslední době poutají odbornou pozornost informace o významném kardiotoxickém působení trastuzumabu - nového cytostatika užívaného v léčbě nádorů prsu. Protože antracykliny jsou většinou podávány v kombinaci s dalšími protinádorovými léčivy, je nutné věnovat potenciálnímu negativnímu vlivu dalších farmak na srdeční funkci značnou pozornost (Perez 2004). Kardiotoxicita antracyklinů se ukázala být významným omezením jejich klinického užití, a proto je možnost redukce tohoto závažného nežádoucího účinku intenzivně studována.

Existuje mezinárodní zdravotnickou organizací sestavená obecná klasifikace kardiotoxicity, která je schematicky znázorněna v tabulce č. 2.

Tabulka č.2 – Klasifikace kardiotoxicity dle WHO

Projevy	Stupeň 0	Stupeň 1	Stupeň 2	Stupeň 3	Stupeň 4
Srdeční arytmie	žádné	Tranzientní asymptomatické, bez nutnosti léčby	Rekurentní nebo perzistující, bez nutnosti léčby	Vyžadující léčbu	Vyžadující monitoraci, ve spojení s hypotenzí nebo komorovou tachykardií
Srdeční funkce	Bez poruchy	Asymptomatická dysfunkce (pokles EF o méně než 20%)	Asymptomatická dysfunkce (pokles EF více než 20% bazální hodnoty)	Symptomatická dysfunkce (selhávání) zvládnutelná terapií	Těžké srdeční selhávání nezvládnutelné terapií
Srdeční ischemie	žádná	Nespecifické změny vlny T	Asymptomatické změny vlny T a úseku ST (s podezřením na ischemii)	Angina pectoris bez evidence infarktu myokardu	Akutní infarkt myokardu
Perikardiální změny	žádné	Asymptomatický výpotek	Symptomatický výpotek reagující na diuretika	Symptomatický výpotek vyžadující drenáž	Symptomatický výpotek vyžadující chirurgický zákrok

5.1 Obecná charakteristika antracyklinové kardiotoxicity

Pro tuto toxicitu je jsou společnými rysy vysoká orgánová specifita, kumulativní charakter, existence rizikových a podpůrných faktorů. Histopatologické ložiskové nálezy. Co se týče kontraktilní dysfunkce, dochází z počátku k reverzibilnímu poškození, po delší expozici už následuje poškození ireverzibilní. V každém případě je možnost prevence poškození kardioprotektivním dexrazoxanem.

Na úrovni kardiomyocytu dochází k různým dějům vedoucím k jeho poškození. Ať už je to expozice volným kyslíkovým radikálům, zvýšená hladina intracelulárního vápníku či inhibice syntézy proteinů. Další faktorem je snížená hladina ATP a uvolnění vazoaktivních látek. V neposlední řadě tu dochází k přímému poškození buněčných struktur a zásahům do přirozených imunitních dějů alkoholovými metabolity – hl. doxorubicinolem (Elbl, 2002).

5.2 Typy antracyklinové kardiotoxicity

Vzhledem k nástupu a charakteru klinických projevů lze rozdělit antracyklinovou kardiotoxicitu na akutní, subakutní, chronickou a pozdní. Nicméně existují různé názory na vhodnost tohoto dělení (Elbl 2002).

5.2.1 Akutní kardiotoxicita

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

5.2.2 Subakutní kardiotoxicita.

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

5.2.3 Chronická toxicita

Chronická kardiotoxicita patří mezi nejobávanější nežádoucí účinky antracyklinových antineoplastik a významně omezuje jejich klinické užití. Je

charakterizována vývojem globální dysfunkce levé srdeční komory se známkami městnání v závislosti na kumulativní dávce léčiva (Shan 1996, Danesi 2002). Z posledních informací se zdá, že systolické dysfunkci předchází dysfunkce diastolická (tj. srdeční selhání s normální ejekční frakcí) (Bu'Lock 1999, Tjeerdsma 1999). Zobrazovací metody často odhalí vznik ireverzibilní dilatační kardiomyopatie; u dětí byl vzácně popsán vznik restriktivního typu kardiomyopatie. Histopatologický nálezn u pacientů s antracyklinovou kardiomyopatií je v principu shodný se změnami indukovanými chronickým podáváním antracyklinů u experimentálních zvířat. Změny jsou fokálního charakteru a postihují především levou komoru a mezikomorové septum. Tato lokalizace pravděpodobně souvisí se zátěží a metabolickou aktivitou těchto částí myokardu. Časně změny jsou pozorovány především jako vakuolární degenerace představovaná distenzí sarkotubulárního systému. Dále je popisována ztráta myofibril, nejdříve částečná, posléze úplná. V pokročilých stádiích dochází značnou měrou k nekróze myocytů s progresí intersticiální fibrózy (Kantrowitz, 1984). Z aktuálních informací vyplývá, že vedle nekrózy se na vzniku antracyklinové kardiomyopatie patrně podílí také programovaná buněčná smrt – apoptóza (Nakamura, 2000).

5.2.4 Pozdní kardiotoxicita

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

5.3 Rizikové faktory antracyklinové kardiotoxicity

I v léčbě takto toxickými sloučeninami se ještě mohou vyskytovat rizikové faktory, které se ještě navíc výrazně liší mezi podáním dospělým jedincům a podání dětem.

Dosažená kumulativní dávka je prvním a významným rizikovým faktorem. Nižší dávky antracyklinů nebo jejich dlouhodobé infúzní podání mají nižší riziko akutního poškození myokardu. Riziko dále roste s věkem pacienta, výrazně se zvyšuje hlavně u pacientů nad 65 let věku. S tím souvisí i poškození srdce jiným onemocněním, například hypertenze, diabetes mellitus, ischemická choroba srdeční či chlopenní vady. Výrazně riziková a to v jakémkoliv věku je současná radioterapie mediastina. Toxicitu zvyšuje také interakce s některými dalšími cytotoxickými léčivy – cyklofosfamid, bleomycin, mitoxantron, vinkristin či amsakrin.

Dětský myokard je velmi citlivý na toxické působení antracyklinů. Zvláště vysoké riziko je u dětí pod 3 roky věku. Jinak zde platí i všechny faktory zmíněné doposud. Co je zde ale navíc je to, že na vznik kardiotoxicity má vliv i pohlaví dítěte. Důvod, proč je častější výskyt kardiotoxicity u dívek, není doposud plně objasněno. Jednou z možností je vyšší procento tukové tkáně u dívek oproti stejně starým chlapcům a protože se antracykliny špatně deponují v tukové tkáni, zvyšuje se tak u dívek jeho nabídka tkáním ostatním, tj. mimo jiné i pro srdce. Déle jsou zde i intersexuální rozdíly ve farmakokinetice (Elbl 2002).

5.4 Diagnostika kardiotoxicity antracyklinů

Pro včasný záchyt rozvoje srdečního poškození má zásadní význam dostupnost přesných a citlivých diagnostických metod. Před započítím chemoterapie je třeba mít nástroj k rozpoznání vlivu rizikových faktorů. V průběhu léčby je třeba individualizovat terapii dle monitorování. Zvláštní pozornost vyžadují pacienti léčení vyššími dávkami antracyklinů, nebo s přítomností rizikových faktorů. Monitorování srdeční funkce by nemělo končit s ukončením chemoterapie, protože včasná diagnóza je velmi důležitá pro volbu účinné a bezpečné terapie (Elbl 2002). Důležitým faktorem je též invazivnost, spolehlivost a technická a ekonomická

náročnost metody. Přehled metod pro diagnostiku a monitorování srdeční funkce (užívaných ať už klinicky nebo experimentálně) je uveden v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3 - Přehled metod pro diagnózu, monitorování a predikci vzniku antracyklinové kardiomyopatie

INVAZIVNÍ METODY		
METODA		PARAMETR
Endokardiální biopsie (EMB)		Stupeň poškození dle škály Billinghamové
Intraventrikulární měření tlaku		dP/dt_{max} , dP/dt_{min} ,
NEINVAZIVNÍ METODY – funkční vyšetření		
Echokardiografie (popř. s užitím echoktrastu)	M-mode, 2D	SYSTOLICKÉ PARAMETRY Ejekční frakce levé komory (LVEF %) Frakční zkrácení levé komory (FS %)
	Doppler Trasmitrální průtok	DIASTOLICKÉ PARAMETRY E/A, E, A, „acceleration time“, „deceleration time“
Radionuklidová ventrikulografie (RNV)		LVEF %
Nukleární magnetická rezonance (NMR)		LVEF %
Polykardiografie		PEP/LVET (poměr preejekční periody k vypuzovací době levé komory)
Elektrokardiografie (EKG)		QT_c interval, QRS voltáž
NEINVAZIVNÍ METODY – biochemické vyšetření		
Stanovení plazmatické koncentrace troponinu - Troponin T - Troponin I		c TnT (normální rozmezí 0,01- 0,03 $\mu\text{mol/l}$) c TnI (normálně do 0,05 $\mu\text{mol/l}$)
Stanovení plazmatické koncentrace natriuretických peptidů - NT-proANP - NT-proBNP		c NT-proANP (normálně do 1,13 nmol/l) c NT-proBNP (normální rozmezí 1.0 - 13.3 pmol/l)

Endokardiální biopsie je zlatým standardem v diagnostice antracyklinové kardiomyopatie s obecně dobrou selektivitou a senzitivitou. Nicméně z charakteru této metody vyplývá i její hlavní nevýhoda – invazivní charakter. U onkologických pacientů, kteří jsou leckdy v celkově neuspokojivém stavu, je výkon endokardiální biopsie také často těžko proveditelný. Především však nelze tuto metodu užívat opakovaně, což je jedním ze základních požadavků pro predikci a včasný záchyt a

kardiotoxicity. Problémy též mohou vzniknout nesprávnou volbou míst odběru biotických vzorků (Benvenuto 2003, Elbl 2002).

Invazivně lze stanovit i parametry srdeční funkce. Lze měřit nitrokomorový tlak k určení parametrů dP/dt_{max} (parametr kontraktility levé komory) a dP/dt_{min} (parametr schopnosti relaxace a poddajnosti levé komory). Tyto přístupy jsou dnes užívány v experimentálních studiích.

Obecně se dnes dává přednost neinvazivním metodám umožňujícím snadnou kontrolu v libovolných časových intervalech. Jedním z nejčastěji hodnocených parametrů funkčního stavu levé komory je ejekční frakce levé komory (LVEF %) hodnocená buď echokardiograficky nebo pomocí radioventrikulografie.

Echokardiografické vyšetření funkce srdce je velmi šetrné k pacientovi a kladem je i jeho relativně nízká cena. Na druhou stranu ne všichni pacienti jsou dobře vyšetřitelní (např. kvůli obezitě). Při určení LVEF má radioventrikulografie ve srovnání s echokardiografií poněkud nižší selektivitu i senzitivitu. Tato metoda pacienta zatěžuje radiací a je také nákladnější. Při měření ejekční frakce je třeba mít na zřeteli, že LVEF je ovlivněna srdeční frekvencí, preloadem a afterloadem. V současné době je echografické hodnocení LVEF běžně užívanou metodou jak v klinické praxi tak v preklinických experimentech. Nicméně některé studie naznačují, že tento parametr nemusí být příliš citlivý v diagnóze časného srdečního selhání (Benvenuto 2003, Elbl 2002).

Dopplerovská echokardiografie umožňuje sledovat i změny diastolické srdeční funkce. Opakovaně byly u pacientů léčených antracykliny pozorovány časné změny transmitrálního toku krve, aniž by byla snížena LVEF. Tato pozorování odpovídají koncepci tzv. diastolické dysfunkce s normální ejekční frakcí. Parametry transmitrálního toku tedy pravděpodobně mohou sloužit k časné predikci kardiotoxicity antracyklinů. Ke zvýšení citlivosti echokardiografie se někdy též užívá její zátěžové varianty (cvičení, dobutamin) (Elbl 2002, Bountiukos 2003).

Především v minulosti bylo ke klinickému hodnocení systolické funkce levé komory užíváno též polykardiografické měření (fonokardiografie, elektrokardiografie, karotická sfygmografie). Mezi sledované parametry patřil index PEP/LVET - poměr preejekční periody k vypuzovací době levé komory (Al-Ismael 1978, Al-Ismael 1979). Dnes může tato metoda pro svou finanční a technickou nenáročnost najít místo v preklinickém výzkumu (Klimtová 2002, Šimůnek 2003). Uplatnění může najít i 24h

měření EKG, kde bylo pozorováno např. prodloužení intervalu QTc. Hodnocení QTc má ovšem velmi nízkou citlivost i specifitu.

Značná pozornost je v poslední době věnována biochemickým markerům srdečního poškození – troponinům a natriuretickým peptidům. Troponin T a I jsou součástí kardiomyocytálního tropomyosinu a jsou uvolňovány do krevního oběhu při poškození myocytu z různých příčin (infarkt myokardu, myokarditis, nežádoucí účinky léčiv aj.). Na experimentálních modelech bylo ověřeno, že stanovení obou troponinů může být cenným ukazatelem srdečního poškození způsobeného antracykliny (Herman 1998, Herman 2001, Šimůnek 2003). Praktický význam opakovaného stanovení hladiny troponinu pro časný záchyt a predikci antracyklinové kardiotoxicity vyplývá z několika klinických studií (Auner 2003, Lipshultz 1997). Dalšími možnými markery jsou natriuretické peptidy: atriální natriuretický peptid (ANP) a mozkový natriuretický peptid (BNP). Tyto peptidy jsou secernovány srdeční tkání síní a komor v závislosti na tlakovém či objemovém přetížení. V praxi se stanovují jejich N-terminální formy (NT-proANP, NT-proBNP). Je známo, že zvýšené hladiny těchto biomarkerů často souvisí s rozvojem diastolické dysfunkce při normální ejekční frakci (Eibl 2002). Klinických studií zatím nebylo provedeno mnoho, ale z dostupných informací se zdá, že se jedná o citlivý marker, který může reflektovat již subklinicky probíhající změny srdeční funkce (Okumura 2000, Snowden 2000, Nousiainen 2001).

6 CÍL PRÁCE

Cílem této rigorózní práce bylo detekovat změny endoteliální exprese VCAM-1 a ICAM-1 ve stěně aortálního oblouku králíků, kterým bylo podáváno antracyklínové cytostatikum. Pro zobrazení exprese těchto adhezních molekul byly využity imunohistochemické metody.

7 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7.1 ZVÍŘATA A PŘEDEPSANÁ DIETA

Pokusná zvířata: králíci, samci

Podmínky: zvířata byla umístěna ve viváriu LF HK UK a krmena standardní laboratorní dietou. Zacházení se zvířaty se řídilo dle "Guide for the care and use of laboratory animals" (1996). Užití laboratorních zvířat pro účely tohoto pokusu bylo schváleno Odbornou komisí pro ochranu zvířat proti týrání Lékařské fakulty v Hradci Králové.

Použitá léčiva a chemikálie: pro účely pokusu byly užity tyto látky: ketamin (Narketan inj., Vétoquinol, Švýcarsko), pentobarbital (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo), fyziologický roztok (Natrium chloratum sol. isotonica, Biotika, Slovenská republika), daunorubicin (Daunoblastina, Pharmacia, Itálie), dexrazoxan (Cardioxane, Chiron B.V., Nizozemsko).

Schéma pokusu: pokusná zvířata byla randomizována do 2 skupin:

kontrolní skupina (n=8, fyziologický roztok, 1 ml/kg, i.v.);

daunorubicinová skupina (n=11, daunorubicin, 3 mg/kg, i.v.);

Látky byly aplikovány jednou týdně, po dobu 10 týdnů. Studované parametry odvozené z echokardiografického byly měřeny před prvním podáním (počáteční hodnota) a dále v 8., 9., 10. týdnu a na konci experimentu. Studie byla ukončena 5.-7. den po poslední aplikaci, kdy byly studovány případné hemodynamické změny pomocí invazivních měření. Po ukončení pokusu byla pokusná zvíře utracena předávkováním pentobarbitalem a následně byly odebrány jednotlivé tkáně pro histologické vyšetření.

Hodnocené parametry srdeční funkce:

- **Parametry získané neinvazivně**

- $LVEF$ = ejekční frakce levé komory (echokardiograficky, parasternální zobrazení levé komory v dlouhé ose), vypočteno ze vztahu:

$LVEF = 100 \times (EDV - ESV) / EDV$, kde EDV je enddiastolický objem LK a ESV endsystolický objem

- FS = fractional shortening (frakční zkrácení) vyjadřuje poměr mezi enddiastolickým rozměrem levé komory (D_d) a endsystolickým rozměrem levé komory (D_s) dle vztahu **$FS = 100 \times (D_d - D_s) / D_d$ [%]**

- **Parametry získané invazivně – intraventrikulární měření tlaku**

- index dP/dt_{max} , tj. maximální vzestup tlaku v levé komoře v isovolumické fázi systoly a index dP/dt_{min} , tj. maximální pokles tlaku v levé komoře v isovolumické fázi diastoly. Měření bylo provedeno po katetrizaci levé komory cestou a. carotis pomocí Mikro-Tip Pressure Catheter (tzv. Millarův katetr), ADI Powerlab/8SP, software Chart.

- **Histologické hodnocení:** srdce (transverzální řez L a P komorou srdeční)

- po fixaci tkání ve 4% formalinu a přípravě parafinových řezů (6 μ m) bylo provedeno barvení pomocí hematoxylin-eosinu a Massonovy modře. Pro hodnocení endoteliální exprese adhezních molekul byly odebrány vzorky aortálního oblouku. Tyto segmenty se ponořily do OCT media (Leica, Praha, Česká republika), následně byly zmrazeny v tekutém dusíku a uskladněny při -80°C . Vlastní vyšetření bylo provedeno pomocí světelné mikroskopie.

Hmotnost zvířat a celková mortalita

- zvířata byla vážena jednou týdně před aplikací látek, hmotnostní přírůstek byl hodnocen pro určení celkového stavu pokusných zvířat.

7.2 **IMUNOHISTOCHEMIE**

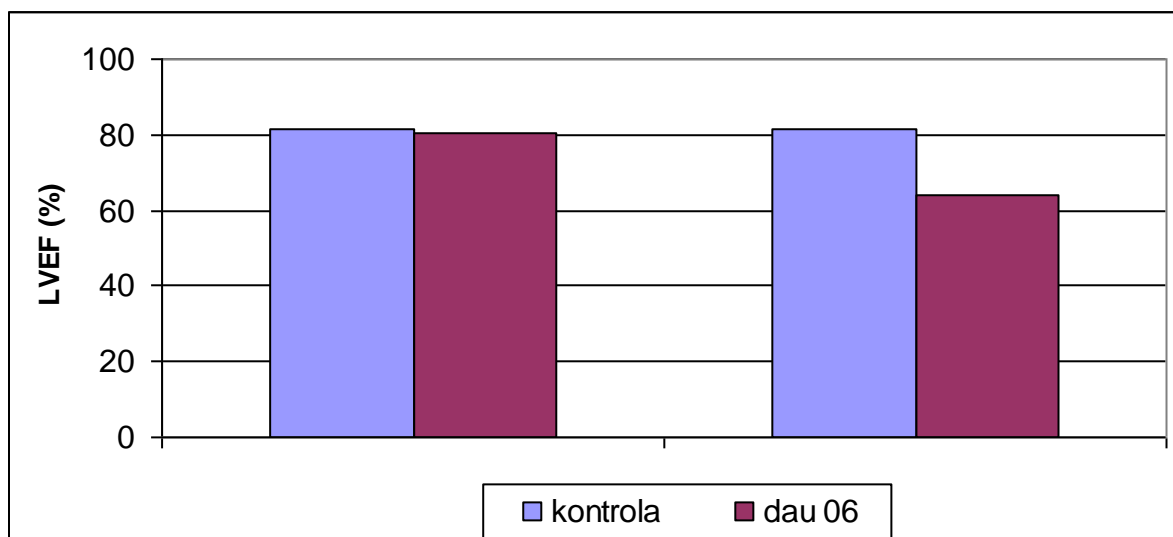
Imunohistochemická a stereologická analýza byla provedena v 1 cm dlouhých segmentech arteria karotis communis ministra. Vzorky se ponořily do OCT směsi, následně byly zamrazeny v kapalném dusíku a uloženy v ledničce při –80 stupních Celsia. Na zmrazovacím mikrotomu byly poté nakrájeny série příčných řezů o tloušťce 7µm a ty byly přeneseny na sklíčka předem upravené v roztoku želatiny. Řezy se nechaly oschnout a pak se na 20 minut vložily do roztoku acetonu uchovávaného v –20 stupních Celsia. Tímto procesem došlo k fixaci řezů a jejich lepší adhezi na podložní sklíčko. Poté se řezy vložily do 0,3% roztoku peroxidu vodíku v PBS (15 minut), čímž se zablokovala endogenní peroxidázová aktivita. Před inkubací řezů s primární protilátkou bylo nutné ještě zablokovat nespecifická vazebná místa, proto se řezy na 30 minut ponořily do roztoku 10% goat séra v PBS (sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Německo). 1 hodinu se pak inkubovaly s primární protilátkou při pokojové teplotě. Po oplachu v PBS se řezy inkubovaly se sekundární protilátkou- goat anti-mouse IgG (DAKO En Vision+(tm), Carpinteria, USA). K tomu, aby navázané protilátky mohly být zobrazeny, se použil diaminobenzidin (DAB substrát-chromogen roztok, DAKO, Carpinteria, USA). Pro kontrolní sklíčka byl zvolen stejný postup, ale místo primární protilátky se použil roztok BSA.

Byly použity následující primární protilátky:

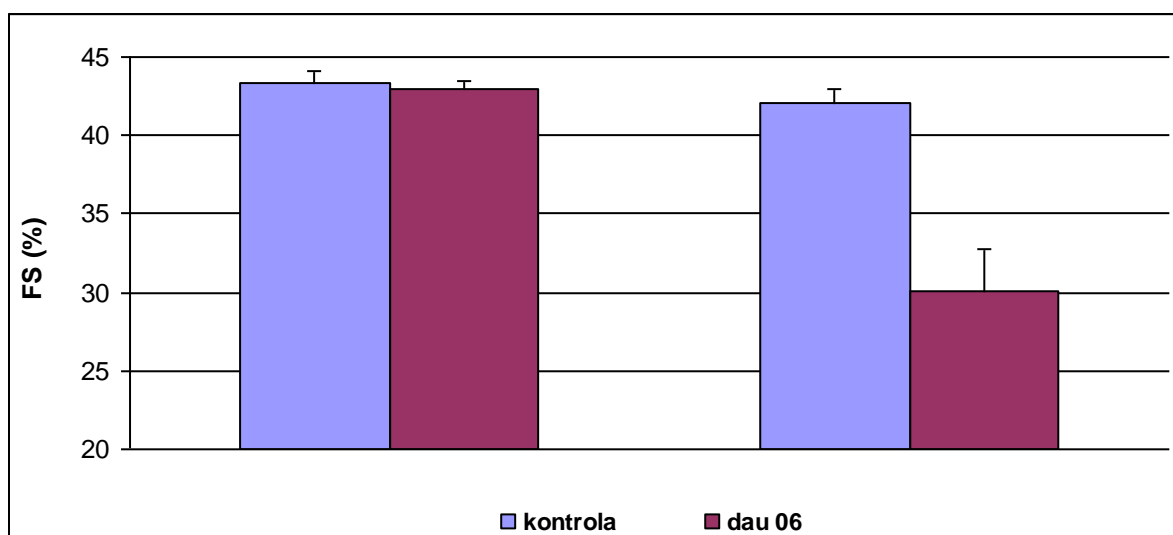
- Mouse anti-human PECAM-1 (ready to use) Dakocytomation, Denmark
- Mouse anti-rabbit VCAM-1 (Rb1/9) (ředění 1/20) (laskavě poskytnuto Dr. M.I.Cybulsky)
- Mouse anti-rabbit ICAM-1 (Rb2/3) (ředění 1/10) (laskavě poskytnuto Dr. M.I.Cybulsky)

8 VÝSLEDKY

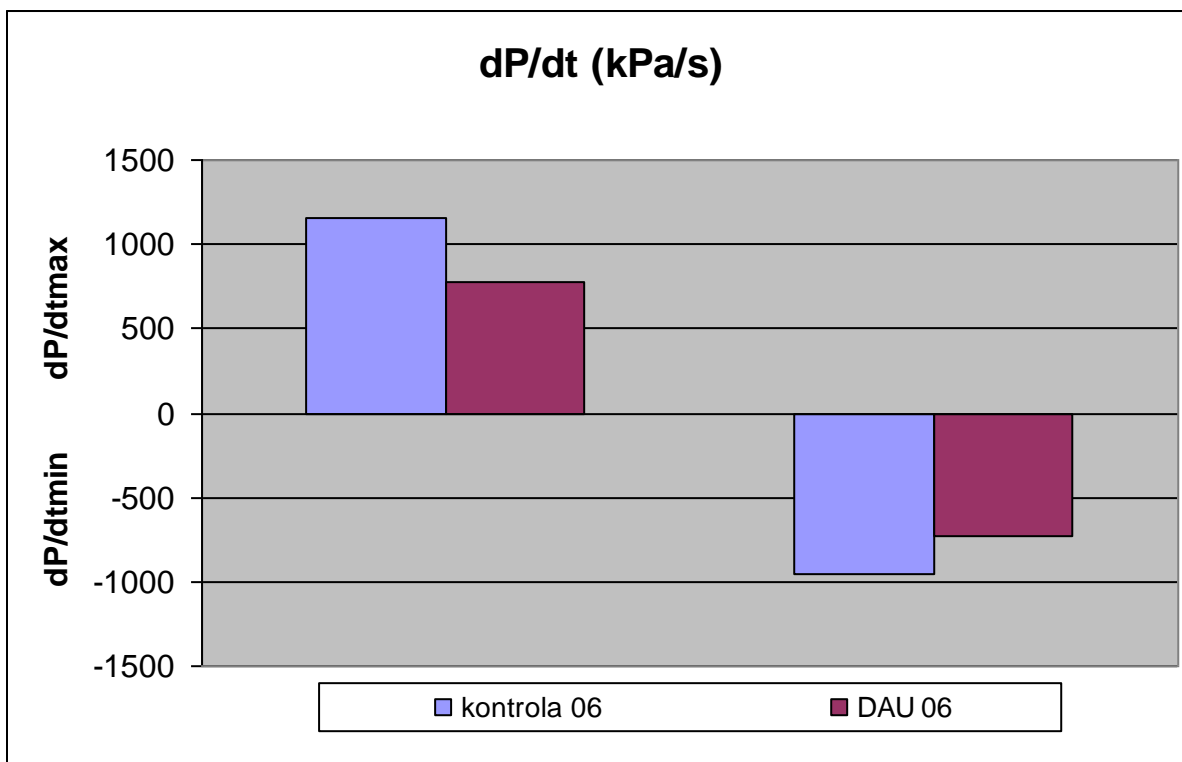
8.1 Hodnocení kardiotoxicity



Obrázek 6. - LVEF ejekční frakce levé komory, M-mód záznam byl pořízen kolmo na mezikomorou přepážku pod úrovní cípů mitrální chlopně pomocí GE Vingmed CFM 800A vybaveného standardní 7,5 MHz pediatrickou sondou; vyhodnocení bylo provedeno pomocí software Osiris.



Obrázek 7. - Frakční zkrácení (FS) v průběhu pokusu. Statistická významnost (párový t-test $P \leq 0,001$) ve srovnání s: k - kontrolní; dau 06 – daunorubicinovou skupinou před 1. aplikací.



Obrázek 8. - dP/dtmax – parametr kontraktivity levé komory dP/dtmin – parametr schopnosti relaxace a poddajnosti levé komory. Statistická významnost (ANOVA, $P \leq 0,001$) kontrola ve srovnání s daunorubicinovou skupinou.

Tabulky dat ke grafům:

LVEF (%)	
kontrola	dau 06
81,7	81,33636
80,4875	64,00909

FS (%)	
kontrola	dau 06
43,35	42,1125
42,94545455	30,07273

Skupina	dP/dtmax	dP/dtmin
Millar (kPa/s)		
kontrola 06	1158,331	-949,315
DAU 06	773,6288	-731,726

8.2 Imunohistochemické barvení v oblasti aortálního sinu

Stěna cévy nevykazovala žádné známky patologie. Imunohistochemické barvení prokázalo pouze velmi slabou expresi obou adhezních molekul. Z každé skupiny bylo hodnoceno 8 zvířat a z každého zvířete 5 řezů aortálním obloukem tedy celkově 40 řezů v kontrolní a daunorubicinové skupině. Expresie VCAM-1 nebyla nalezena u žádného zvířete z kontrolní ani daunorubicinové skupiny. Expresie ICAM-1 byla u 3 zvířat z kontrolní skupiny (viz obr. 9). Expresie ICAM-1 byla také nalezena u 4 zvířat v daunorubicinové skupině. Barvení bylo velmi podobné u obou skupin. Jednalo se pouze o slabou expresi endoteliálními buňkami (viz obr. 10).



Obrázek 9. - Endoteliální exprese ICAM-1 u kontrolní skupiny zvířat. Šipky ukazují na hnědou barvu, která je důkazem detekce ICAM-1 exprese. Zvětšení 100x.



Obrázek 10. - Endoteliální exprese ICAM-1 u daunorubicinové skupiny zvířat. Šipky ukazují na detekce ICAM-1 exprese. Zvětšení 100x.

8.3 Stereologická analýza exprese

Stereologická analýza exprese nebyla prováděna vzhledem ke statisticky nevýznamné expresi obou bioadhezních molekul VCAM i ICAM.

9 DISKUSE

Onkologická léčba je často provázena řadou vedlejších nežádoucích účinků, které mohou zkomplikovat a někdy i zmařit její výsledný efekt. Závažnou komplikací je poškození srdce neboli kardiotoxicita. I když se nevyskytuje tak často jako např. hematologická toxicita, hepatotoxicita nebo nefrotoxicita, nelze ji vzhledem k možným fatálním komplikacím podceňovat. Nejčastějšími projevy kardiovaskulární toxicity jsou arytmie, změny krevního tlaku, srdeční selhání, ischemie myokardu a perikarditida. Většina těchto komplikací probíhá akutně, tj. objevují se v průběhu léčby nebo bezprostředně po jejím ukončení. Výjimečné postavení mezi cytostatiky zaujímají antracykliny se svojí chronickou a pozdní kardiotoxicitou, která se může projevit až s časovým odstupem po ukončení léčby.

Antracyklinová antibiotika jsou jedny z nejužívanějších cytostatik. Antracykliny, podobně jako všechna ostatní cytostatika, vykazují pouze relativní selektivitu svého cytostatického účinku. Následkem toho provází cytostatickou terapii řada nežádoucích účinků. Pro antracykliny je charakteristická významná myelosuprese, jež může výrazně ovlivňuje dávku podaného léčiva. U hlodavců a králíků používaných v preklinických experimentech byla zaznamenána poměrně výrazná nefrotoxicita antracyklinů.

První zmínky o kardiotoxickém působení antracyklinů se objevily již krátce po jejich zavedení do klinické praxe (Lefrak 1973). Kardiotoxické působení antracyklinových cytostatik se do značné míry vymyká nežádoucím účinkům běžně sledovaných u jiných cytostatik. Kardiotoxicita antracyklinů se ukázala být významným omezením jejich klinického užití, a proto je možnost redukce tohoto závažného nežádoucího účinku intenzivně studována. Jedním z mechanismů, který je intenzivně studován ve vztahu k rozvoji kardiotoxicity je tvorba volných kyslíkových radikálů. Není zcela jasné, jestli produkce volných kyslíkových radikálů (ROS) k protinádorovému působení, Z dostupných informací se zdá, že ROS se účastní na protinádorovém efektu antracyklinů spíše minoritně, na rozdíl od kardiotoxicity, kde patrně hrají velmi významnou úlohu (Keizer 1990, Gewirtz 1999).

Adhezní molekuly VCAM-1 i ICAM-1 hrají důležitou roli v rozvoji zánětlivé reakce a uplatňují se také v patogenezi různých patologických stavů. Jsou

exprimovány endoteliálními buňkami, makrofágy a hladkosvalovými buňkami (Ann Jang Y. 1994).

Expresse těchto adhezivních molekul je ovlivňována řadou faktorů, které se uplatňují v patogenezi aterosklerózy, diabetu mellitu ale i dalších onemocnění. Bylo prokázáno, že hypercholesterolemie, oxidační stres, kouření (Powell JT 1998), hyperhomocysteinemie (Loscalzo J. 1996), hemodynamický stres (nízký shear stress) zvyšují expresi VCAM-1 a ICAM-1 (Wapola PL 1995). Expresse obou těchto molekul je také indukována zánětlivými cytokiny jako TNF- α nebo IL-1 (Vlassara H. 1995).

Cílem této rigorózní práce bylo zjistit, zda dlouhodobé podávání daunorubicinu vede kromě signifikantních změn na srdci také k rozvoji endoteliální exprese, kterou je možné na morfologické úrovni sledovat díky expresi adhezních molekul VCAM-1 a ICAM-1.

Výsledky prokázaly jasnou indukci kardiotoxických změn, které byly potvrzeny jak funkčními tak morfologickými metodami. Došlo ke snížení ejekční frakce levé komory, a ke snížení kontraktility levé komory na konci pokusu (dP/dtmax).

Studium imunohistochemického barvení adhezních molekul však neprokázala indukci jejich exprese v aortálním oblouku. Expresse VCAM-1 nebyla pozorována ani u kontrolní a ani u daunorubicinové skupiny. Naproti tomu slabá exprese ICAM-1 byla pozorována u kontrolní skupiny. Nicméně téměř stejná intenzita exprese byla nalezena také po dlouhodobém podávání daunorubicinu. Výsledky této pilotní studie tedy naznačují, že dlouhodobé podávání daunorubicinu sice vede k rozvoji patologických změn v myokardu, nicméně nevede ke zvýšené expresi adhezních molekul VCAM-1, ICAM-1, které jsou považovány za standardní morfologické markery rozvoje endoteliální dysfunkce.

10 ZÁVĚR

Tato rigorózní práce představuje pilotní studii, která se zaměřila na studium možné indukce endoteliální dysfunkce po dlouhodobém podávání cytostatiku daunorubicinu u králičího modelu pro studium chronické kardiotoxicity.

Byla prokázána jasná indukce patologických změn na srdci po podávání daunorubicinu, které byly doprovázeny snížením ejekční frakce levé komory a snížením kontraktility levé komory.

Imunohistochemická analýza neprokázala indukci endoteliální exprese VCAM-1 ani u kontrolní a ani u daunorubicinové skupiny.

Imunohistochemická analýza prokázala slabou endoteliální expresi ICAM-1 u obou skupin zvířat.

Bohužel nebyl zaznamenán téměř žádný rozdíl v intenzitě barvení ICAM-1 mezi kontrolní a daunorubicinovou skupinou.

Výsledky této rigorózní práce neprokázaly rozvoj endoteliální dysfunkce po chronickém podávání daunorubicinu u králíka.

11 SEZNAM POUŽITÝCH CITACÍ

- Albelda, S. M. (1993) The role of cell adhesion molecules in asthma--an overview. *Agents Actions Suppl* 43: 141-50
- Al-Ismail S, Whittaker JA. Systolic time interval as index of schedule--dependent doxorubicin cardiotoxicity in patients with acute myelogenous leukaemia. *Br Med J*. 1979 May 26;1(6175):1392-5.
- Al-Ismail SA, Whittaker JA. Systolic time interval to predict doxorubicin cardiotoxicity. *Lancet*. 1978 Jun 17;1(8077):1315.
- Allen A. The cardiotoxicity of chemotherapeutic drugs. *Semin Oncol*. 1992 Oct;19(5):529-42.
- Ann Jang Y, Lincoff M, Plow EF, Topol EJ. Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Cardiol*. 1994;24:1591–1601
- Arai M, Tomaru K, Takizawa T, Sekiguchi K, Yokoyama T, Suzuki T, Nagai R.
- Auner HW, Tinchon C, Linkesch W, Tiran A, Quehenberger F, Link H, Sill H. Prolonged monitoring of troponin T for the detection of anthracycline cardiotoxicity in adults with hematological malignancies. *Ann Hematol*. 2003 Apr;82(4):218-22. Epub 2003 Mar 25.
- Benvenuto GM, Ometto R, Fontanelli A, Fortunato A, Ruffini PA, Fosser V, Morandi P. Chemotherapy-related cardiotoxicity: new diagnostic and preventive strategies. *Ital Heart J*. 2003 Oct;4(10):655-67.
- Blankenberg, S., Barboux, S., Tiret, L. (2003) Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 170: 191-203
- Bountiokos M, Doorduijn JK, Roelandt JR, Vourvouri EC, Bax JJ, Schinkel AF, Kertai MD, Sonneveld P, Poldermans D. Repetitive dobutamine stress echocardiography for the prediction of anthracycline cardiotoxicity. *Eur J Echocardiogr*. 2003 Dec;4(4):300-5.
- Bu'Lock FA, Gabriel HM, Oakhill A, Mott MG, Martin RP. Cardioprotection by ICRF187 against high dose anthracycline toxicity in children with malignant disease. *Br Heart J*. 1993 Aug;70(2):185-8.
- Busse, R., Fleming, I. (1996) Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *J Vasc Res* 33: 181-94
- Corrado, E., Muratori, I., Tantillo, R., Contorno, F., Coppola, G., Strano, A., Novo, S. (2005) Relationship between endothelial dysfunction, intima media thickness and cardiovascular risk factors in asymptomatic subjects. *Int Angiol* 24: 52-8
- Cybulsky MI, Lichtman AH, Hajra L, Iiyama K. Leukocyte adhesion molecules in atherogenesis. *Clinica Chimica Acta*. 1999;286:207–218
- Danesi R, Fogli S, Gennari A, Conte P, Del Tacca M. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of the anthracycline anticancer drugs. *Clin Pharmacokinet*. 2002; 41(6): 431-44.
- Diamond MS, Springer TA. A subpopulation of Mac-1 (CD11b/CD18) molecules mediates neutrophil adhesion to ICAM-1 and fibrinogen. *J Cell Biol*. 1993;120:545-556

- Dunkern TR, Wedemeyer I, Baumgartner M, Fritz G, Kaina B. Resistance of p53 knockout cells to doxorubicin is related to reduced formation of DNA strand breaks rather than impaired apoptotic signaling. *DNA Repair (Amst)*. 2003 Jan 2; 2(1): 49-60.
- Elbl L et al., Poškození srdce protinádorovou léčbou, Grada, Praha, 2002a, 19-38.
- Elbl L et al., Poškození srdce protinádorovou léčbou, Grada, Praha, 2002b, 62-70.
- Elbl L et al., Poškození srdce protinádorovou léčbou, Grada Praha 2002c; 22-23
- Fishman, A. P. (1982) Endothelium: a distributed organ of diverse capabilities. *Ann N Y Acad Sci* 401: 1-8
- Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol*. 1999 Apr 1;57(7):727-41
- Gharib MI, Burnett AK. Chemotherapy-induced cardiotoxicity: current practice and prospects of prophylaxis. *Eur J Heart Fail*. 2002 Jun; 4(3): 235-42.
- Goodman Gilman A, Hardman JG, Limbard LE and et al. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th edition, McGraw- Hill publishing, 2001, 1427-1428.
- Herman EH, el-Hage A, Ferrans VJ. Protective effect of ICRF-187 on doxorubicin-induced cardiac and renal toxicity in spontaneously hypertensive (SHR) and normotensive (WKY) rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1988 Jan;92(1):42-53.
- Herman EH, Lipshultz SE, Rifai N, Zhang J, Papoian T, Yu ZX, Takeda K, Ferrans VJ. Use of cardiac troponin T levels as an indicator of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Cancer Res*. 1998 Jan 15;58(2):195-7.
- Herman EH, Zhang J, Rifai N, Lipshultz SE, Hasinoff BB, Chadwick DP, Knapton A, Chai J, Ferrans VJ. The use of serum levels of cardiac troponin T to compare the protective activity of dexrazoxane against doxorubicin- and mitoxantrone-induced cardiotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2001 Oct;48(4):297-304.
- Iiyama K, Hajra L, Iiyama M, Li H, DiChiara M, Medoff BD, Cybulsky MI. Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ Res*. 1999;85:199-207
- Jensen JN, Lock-Andersen J, Langer SW, Mejer J. Dexrazoxane-a promising antidote in the treatment of accidental extravasation of anthracyclines. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 2003; 37(3): 174-5.
- Joseph-Silverstein, J., Silverstein, R. L. (1998) Cell adhesion molecules: an overview. *Cancer Invest* 16: 176-82
- Kantrowitz NE, Bristow MR. Cardiotoxicity of antitumor agents. *Prog Cardiovasc Dis*. 1984 Nov-Dec;27(3):195-200.
- Keizer HG, Pinedo HM, Schuurhuis GJ, Joenje H. Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmacol Ther*. 1990;47(2):2.
- Khan BV, Parthasarathy SS, Alexander RW, Medford RM. Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine - activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest*. 1995;95:1262– 1270
- Klener P. Protinádorová chemoterapie. Galen, Praha 1996, 328-333.
- Klimtová I, Šimůnek T, Mazurová Y, Hrdina R, Gersl V, Adamcová M. Comparative study of chronic toxic effects of daunorubicin and doxorubicin in rabbits. *Hum Exp Toxicol*. 2002 Dec;21(12):649-57.

- Lefrak EA, Pitha J, Rosenheim S, Gottlieb JA. A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. *Cancer*. 1973 Aug;32(2):302-14.
- Lipshultz SE, Rifai N, Sallan SE, Lipsitz SR, Dalton V, Sacks DB, Ottlinger ME. Predictive value of cardiac troponin T in pediatric patients at risk for myocardial injury. *Circulation*. 1997 Oct 21;96(8):2641-8.
- Loscalzo J. The oxidant stress of hyperhomocysteinemia. *J Clin Invest*. 1996;98:5-7
- Lothstein L, Israel M, Sweatman TW. Anthracycline drug targeting: cytoplasmic versus nuclear--a fork in the road. *Drug Resist Updat*. 2001 Jun; 4(3): 169-77.
- Mareckova, Z., Heller, S., Horoky, K. (1999) [Cell adhesion molecules and their role in pathophysiologic processes]. *Vnitr Lek* 45: 46-50
- Marui N, Offermann MK, Swerlick R, et al. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest*. 1993;92:1866-1874
- Miller, M. A., Cappuccio, F. P. (2002) Reducing cholesterol and atherosclerosis: the importance of cellular adhesion molecules? *Qjm* 95: 707-8
- Mizia-Stec, K., Zahorska-Markiewicz, B., Goliszek, L. (2003) [Adhesion molecules: atherosclerosis and coronary artery disease]. *Przegl Lek* 60: 147-50
- Nakamura T, Ueda Y, Juan Y, Katsuda S, Takahashi H, Koh E. Fas-mediated apoptosis in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats: In vivo study. *Circulation*. 2000 Aug 1;102(5):572-8.
- Nousiainen T, Vanninen E, Jantunen E, Remes J, Ritanen E, Vuolteenaho O, Hartikainen J. Neuroendocrine changes during the evolution of doxorubicin-induced left ventricular dysfunction in adult lymphoma patients. *Clin Sci (Lond)*. 2001 Dec;101(6):601-7.
- Okumura H, Iuchi K, Yoshida T, Nakamura S, Takeshima M, Takamatsu H, Ikeno A, Usuda K, Ishikawa T, Ohtake S, Matsuda T. Brain natriuretic peptide is a predictor of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Acta Haematol*. 2000;104(4):158-63.
- Perez EA, Rodeheffer R. Clinical cardiac tolerability of trastuzumab. *J Clin Oncol*. 2004 Jan 15;22(2):322-9.
- Powell JT. Vascular damage from smoking: disease mechanisms at the arterial wall. *Vasc Med*. 1998;3:21-28
- Rossi CR, Mocellin S, Pilati P, Foletto M, Quintieri L, Palatini P, Lise M. Pharmacokinetics of intraperitoneal cisplatin and doxorubicin. *Surg Oncol Clin N Am*. 2003 Jul; 12(3): 781-94.
- Sarcoplasmic reticulum genes are selectively down-regulated in cardiomyopathy produced by doxorubicin in rabbits. *J Mol Cell Cardiol*. 1998 Feb;30(2):243-54.
- Shan K, Lincoff AM, Young JB. Anthracycline-induced cardiotoxicity. *Ann Intern Med*. 1996 Jul 1;125(1):47-58.
- Snowden JA, Hill GR, Hunt P, Carnoutsos S, Spearing RL, Espiner E, Hart DN. Assessment of cardiotoxicity during haemopoietic stem cell transplantation with plasma brain natriuretic peptide. *Bone Marrow Transplant*. 2000 Aug;26(3):309-13.
- Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. 1994;76:301-314
- Šimůnek T. Využití látek chelatujících železo při prevenci poškození myokardu oxidativním stresem. Disertační práce FaF UK (farmakologie/toxikologie), 2003.

- Tjeerdsma G, Meinardi MT, van Der Graaf WT, van Den Berg MP, Mulder NH, Crijns HJ, de Vries EG, van Veldhuisen DJ. Early detection of anthracycline induced cardiotoxicity in asymptomatic patients with normal left ventricular systolic function: autonomic versus echocardiographic variables. *Heart*. 1999 Apr;81(4):419-23.
- Vlassara H, Fuh H, Donnelly T, Cybulsky M. Advanced glycation endproducts promote adhesion molecule (VCAM-1, ICAM-1) expression and atheroma formation in normal rabbits. *Mol Med*. 1995;1:447– 456.
- Wapola PL, Gotlieb AI, Cybulsky MI, Langille BL. Expression of ICAM-1 and VCAM-1 and monocyte adherence in arteries exposed to altered shear stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:2–10
- Zoccali, C. (2006) Endothelial dysfunction and the kidney: emerging risk factors for renal insufficiency and cardiovascular outcomes in essential hypertension. *J Am Soc Nephrol* 17: S61-3