

# „Diagnostické okno“ srdečního troponinu T na modelu antracyklinové kardiomyopatie

## 1. Úvod

Antracyklinová antibiotika (např. doxorubicin, daunorubicin nebo epirubicin) tvoří i v současné době základ protinádorové léčby u mnoha hematologických malignit a solidních nádorů. U antracyklinů je však známo také riziko chronické kardiotoxicity, která může mít za následek kardiomyopatii a srdeční selhání s časným nebo pozdním nástupem. Současná klinická doporučení se snaží toto riziko minimalizovat jednak omezením celkové kumulativní dávky antracyklinů, jednak prováděním neinvazivního monitorování srdeční funkce pomocí echokardiografie, které se však nezdá být dostatečně senzitivní (Aapro a spol., 2011; Menna a spol., 2012). V poslední době se hodně diskutuje o možnosti využití srdečních biomarkerů pro monitorování chemoterapií indukované kardiotoxicity zvláště v kontextu nově připravovaných guidelines. Navíc srdeční troponiny byly dokonce začleněny do klasifikace kardiotoxicity protinádorové terapie National Cancer Institute (NCI) (Common Terminology Criteria for Adverse Events, CTCAE).

Naše předcházející studie (Adamcová a spol. 1999; Jirkovský a spol., 2013) ukázaly, že antracykliny indukovaná kardiotoxicita je obvykle spojena s dlouhodobým a kontinuálním uvolňováním troponinů. Lze předpokládat, že zaprvé závisí na kumulativní dávce antracyklinů a zadruhé souvisí s difúzní degenerací kardiomyocy-

tů. Za hlavní patofyziologický mechanismus antracyklinové kardiotoxicity je dnes považována inhibice topoizomerázy-IIIB v kardiomyocytech.

Na rozdíl od akutního infarktu myokardu však „diagnostické okno“ srdečních troponinů po nádorové terapii nebylo doposud v literatuře popsáno. Cílem této studie bylo určit „diagnostické okno“ srdečního troponinu T na modelu chronické daunorubicinové kardiomyopatie u králíka a přispět tak k optimálnímu časování odběrů pro stanovení troponinů za účelem získání maximální prediktivní hodnoty v klinické praxi.

## 2. Materiál a metodika

Pokusy byly schváleny Odbornou komisí pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat na Lékařské fakultě v Hradci Králové.

Jako pokusná zvířata byli použiti králíci, samci kmene Novozélandský bílý. Látky byly aplikovány opakovaně jednou týdně (8 aplikací) a pokus byl ukončen v 10. týdnu. Schéma pokusu viz obr. 1.



Obr. 1: Schéma experimentu

- kontrolní skupina zvířat (fyziologický roztok 1 ml/kg i. v.), 1x týdně, 8 aplikací, n = 6
- daunorubicin (DAU 3 mg/kg i. v.,

Daunoblastina Pfizer, Itálie), 1x týdně, 8 aplikací, n = 9

Neinvazivní měření a další manipulace s pokusnými zvířaty byly prováděny v lehké anestézii (ketamin 30 mg/kg, i. m. + midazolam 2,5 mg/kg). Invazivní měření bylo prováděno v pentobarbitalové anestézii (pentobarbital 4% (w/w) i. v.).

Odběr krve pro stanovení cTnT byl proveden před zahájením experimentu a v čase 0, 2, 4, 16, 12, 24, 48, 72 a 168 hodin po 1., 5. a 8. podání daunorubicinu a dále za 336 hodin po posledním podání.

### Vyšetření funkčních kardiiovaskulárních parametrů

- *neinvazivní hodnocení srdeční funkce*  
Na konci pokusu byla systolická srdeční funkce hodnocena echokardiograficky pomocí frakčního zkrácení (FS, %) – Vivid 4 s10 MHz sondou (GE Healthcare, Chalfont St. Giles. Buckinghamshire, UK).
- *invazivní hodnocení srdeční funkce*  
Na konci pokusu byl Millarův katetr (2.3 F, Millar Instruments) zaveden do levé komory cestou a. carotis. Změny tlaků byly zaznamenávány pomocí systému Powerlab (AD Instruments, Rakousko). Hlavním hodnoceným parametrem byl index kontraktility  $dP/dt_{max}$ , tj. maximální vzestup tlaku v izovolumické fázi levé komory.

## Stanovení plazmatických koncentrací srdečního troponinu T

Koncentrace cTnT v heparinizované plazmě a v myokardu byla měřena pomocí vysoce senzitivních setů Elecsys® cardiac Troponin T high sensitive Roche s detekčním limitem 0,003 µg/l. Před stanovením cTnT v tkáni byly vzorky levé komory homogenizovány v RIPA pufru.

## Statistická analýza

Statistická analýza dat byla provedena pomocí softwaru SigmaStat (revision STAT 32 2.0, Jandel GmbH, Erkrath, Germany), NCSS program 2007 (verze 07.1.21, LLC., Kaysville, UT, USA) a GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

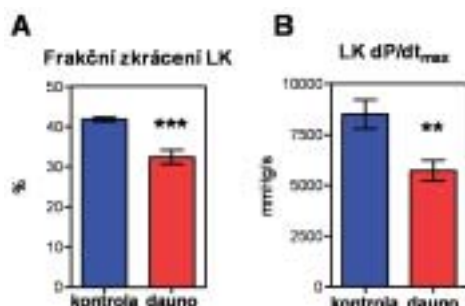
Plazmatické hladiny srdečního troponinu T jsou prezentovány po logaritmické transformaci jako geometrický průměr s 95% intervalem spolehlivosti. Pro analýzu dat byla použita jednofaktorová analýza rozptylu s opakováním a následným mnohonásobným porovnáváním LSD testem na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . Ostatní data jsou uvedena jako průměr a směrodatná odchylka průměru.

## Výsledky

Echokardiografické vyšetření na konci experimentu prokázalo u daunorubicinové skupiny signifikantní ( $p < 0,001$ ) pokles frakčního zkrácení LK o 22 % oproti kontrole ( $32,4 \pm 1,73$  vs.  $41,8 \pm 0,52$ ). Podobně při invazivním vyšetření bylo prokázáno statisticky významné snížení ( $p < 0,01$ ) indexu kontraktility ( $dP/dt_{max}$ ) o 23 % u daunorubicinové skupiny oproti kontrole ( $5720 \pm 511,8$  mmHg/s vs.  $8512 \pm 717,3$  mmHg/s), viz graf 1.

Ačkoliv se mírné zvýšení plazmatických hladin srdečního troponinu T objevuje již po 1. aplikaci, signifikantní zvýšení hs cTnT oproti kontrolní skupině bylo prokázáno až po 5. aplikaci daunorubicinu. Ke vzestupu cTnT dochází za 2 hod. po podání DAU, maxima je dosaženo mezi 4.–6. hod. a zvýšené hladiny přetrvávají do 24 hod. po podání. V následujících hodinách již dochází k rychlému poklesu cTnT. Před 8. aplikací byla hladina cTnT již signifikantně vyšší oproti kontrole, další podání DAU vedlo opět k rychlému vzestupu hladin cTnT s maximem okolo 4. hod., viz graf 2. S těmito nálezy koreponují i výsledky AUC. Statisticky vý-

znamné zvýšení AUC bylo prokázáno až v 5. a 8. týdnu po podání daunorubicinu, viz graf 3. Prolongované uvolňování troponinů do cirkulace bylo doprovázeno měřitelným úbytkem cTnT v myokardu, viz graf 4.

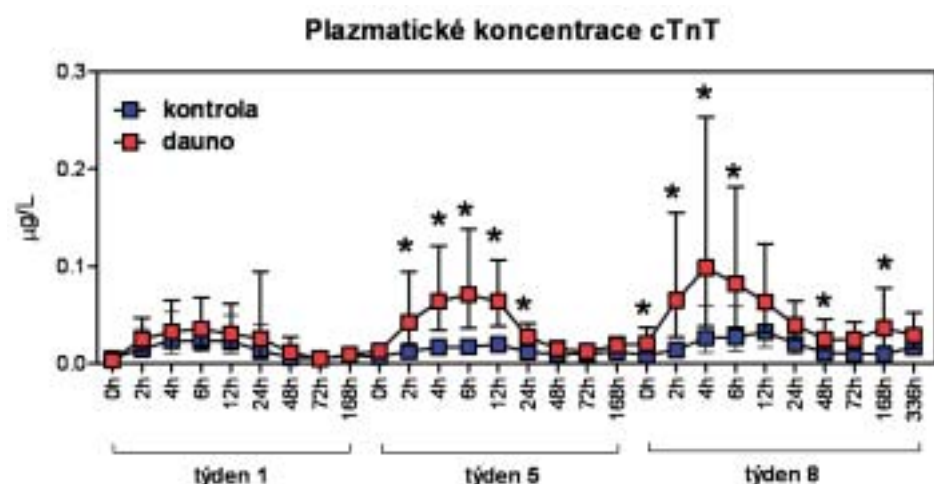


Graf 1: Hemodynamické parametry LK  
Statistická významnost oproti kontrolní skupině  
 $p < 0,01$ (\*\*),  $p < 0,001$ (\*\*\*)

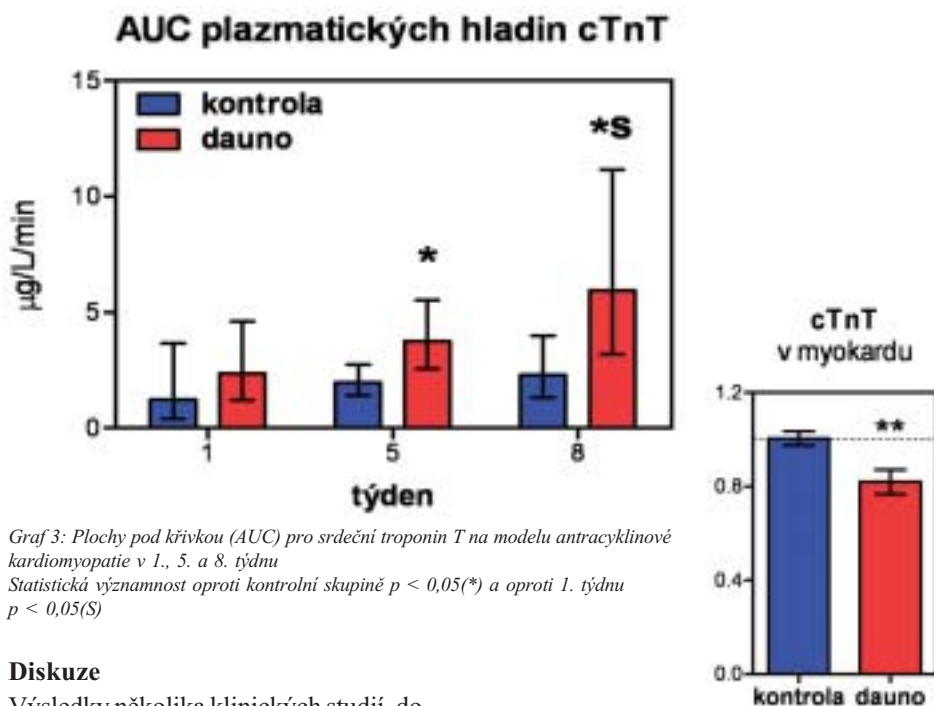
byla chemoterapie monitorována pomocí troponinu I (cTnI) nebo T (cTnT), jasné ukázaly, že u 30–34 % pacientů dochází ke zvýšení plazmatických koncentrací srdečních troponinů. Ačkoliv jsou naměřené hodnoty ovlivněny použitím různých setů na stanovení troponinů, je jasné, že u třetiny pacientů podstupujících potenciálně kardiotoxickou chemoterapii antracykliny dochází k prokazatelnému ireverzibilnímu poškození myokardu (Dolci a spol., 2008).

Z klinických studií je zřejmé, že:

- (1) Troponiny jsou schopné predikovat nejméně 3 týdny dopředu klinicky významnou dysfunkci levé komory.
- (2) Časně zvýšení koncentrace troponinů v cirkulaci je schopné predikovat stu-



Graf 2: Plazmatické koncentrace srdečního troponinu T na modelu antracyklinové kardiomyopatie  
Statistická významnost oproti kontrolní skupině  $p < 0,05$ (\*)



Graf 3: Plochy pod křivkou (AUC) pro srdeční troponin T na modelu antracyklinové kardiomyopatie v 1., 5. a 8. týdnu  
Statistická významnost oproti kontrolní skupině  $p < 0,05$ (\*) a oproti 1. týdnu  $p < 0,05$ (S)

## Diskuze

Výsledky několika klinických studií, do kterých bylo zahrnuto více než 1 500 pacientů s nádorovým onemocněním, u nichž

Graf 4: Stanovení srdečního troponinu v myokardu  
Statistická významnost oproti kontrolní skupině  
 $p < 0,01$ (\*\*)



peň a závažnost budoucího poškození levé komory.

- (3) U pacientů, kde zvýšená hladina troponinů přetrvává 1 měsíc po poslední dávce chemoterapie, je 85% pravděpodobnost závažných srdečních komplikací v průběhu 1 roku.
- (4) U pacientů s minimálním rizikem vedlejších kardiotoxických účinků, kteří pravděpodobně nebudou (minimálně v průběhu 1 roku po ukončení chemoterapie) ohroženi rizikem kardiovaskulárních komplikací, nejsou s negativní 99% prediktivní hodnotou hladiny troponinů zvýšené.
- 5) Je možné jednoznačně vyloučit, že zvýšení koncentrace cTnT v cirkulaci je způsobeno ischemickou etiologií myokardiálního poškození (Dolci a spol., 2008).

Z těchto vědeckých poznatků je možné vyvodit praktické výhody využití troponinů jako markeru myokardiálního poškození pro hodnocení kardiotoxicity antracyklinů. Troponiny detekují přítomnost kardiotoxicity velmi časně v době, kdy poškození funkce srdce nemůže být odhaleno některými z dalších metodických pří-

stupů využívaných v současnosti v klinické praxi. Navíc bezprostředně po ukončení chemoterapie je na základě měření troponinů možné vytipovat pacienty s vysokým rizikem poškození myokardu, kteří vyžadují další monitorování funkce srdce pomocí zobrazovacích technik, jako je echokardiografie a radionuklidová angiografie. Tento krok může mít i značný ekonomický benefit, protože umožňuje vyloučit pacienty s nízkými hladinami troponinů z dalšího finančně náročného sledování. Možnost detekce subklinických projevů kardiotoxicity navíc umožňuje nasazení kardioprotektiv (především dexrazoxanu), která mohou vývoj dysfunkce levé komory zpomalit nebo zastavit. Efekt kardioprotektivní strategie může být rovněž monitorován pomocí měření plazmatických hladin troponinů (Adamcová a spol., 2005; Dolci a spol., 2008).

Využití troponinů v klinické praxi však limituje celá řada nevyřešených problémů. Především v literatuře nebyl doposud jednoznačně popsán mechanismus uvolnění troponinů po antracyklinové chemoterapii. Kromě použití různých setů s rozdílnými „cut-off“ komplikuje situaci i užívání nejednotných časových intervalů pro od-

běry vzorků a různé protokoly chemoterapie. Jednotná definice „troponin-pozitivních“ pacientů by byla jistě velkým přínosem pro klinickou praxi. Navíc doposud nebyl přesně určen interval, kdy negativní prediktivní hodnota troponinů dosahuje 100 % a vylučuje další uvolňování troponinů z kardiomyocytů.

Studie „diagnostického okna“ troponinů při chemoterapii byla provedena na validovaném a klinicky relevantním modelu antracyklinové kardiomyopatie u králíka (Geršl a spol., 1999; Popelová a spol., 2009; Šimůnek a spol., 2004). Výsledky naší experimentální práce jednoznačně prokázaly, že po 1. aplikaci daunorubicinu v dávce 50 mg/m<sup>2</sup> daunorubicinu nelze signifikantní zvýšení troponinů prokázat ani pomocí vysoce senzitivních setů Elecsys® cardiac Troponin T high sensitive testu Roche s detekčním limitem 0,003 µg/l (Saenger et al., 2011). Lehké zvýšení cTnT po 1. aplikaci u obou skupin zvířat je pravděpodobně dáno anestezií, opakovanými odběry vzorků krve, manipulací se zvířaty a především vysokou senzitivitou cTnT testu použitého v naší studii. Po 5. a 8. aplikaci, odpovídající kumulativní dávce 250 mg/m<sup>2</sup>, resp. 400 mg/m<sup>2</sup>,



se objevilo signifikantní zvýšení cTnT již za 2 hodiny, kdy pravděpodobně došlo k uvolnění „časného neboli slabě vázaného poolu“, který tvoří asi 5 % cTnT v kardiomyocytech. Maxima bylo dosaženo v 6. hodině po 5. aplikaci a ve 4. hodině po 8. aplikaci. V dalších sledovaných časových intervalech, tj. za 12, 24, 48, 72 a 168 hodin (tj. 7 dní), byl již zřetelný pokles, což zřejmě souvisí s relativně krátkým biologickým poločasem troponinů (cTnT – 120 minut). S rostoucí kumulativní dávkou je zřejmá agravace kardiotoxického účinku antracyklinů.

K signifikantnímu zvýšení plazmatických hladin cTnT ( $p < 0,05$ ) v čase 0 (tj. 7 dní po aplikaci předcházející dávky a bezprostředně před další aplikací) došlo až v 8. týdnu, avšak při hodnocení AUC byl statisticky významný rozdíl mezi kontrolní a daunorubicinovou skupinou prokázán již po 5. aplikaci. Průběh křivek jednoznačně dokumentuje nutnost opakovaného stanovení troponinů v klinické praxi.

Stanovení troponinu T v tkáni prokázalo statisticky významný úbytek troponinu T v myokardu.

Lze předpokládat, že v uvolňování troponinu hrají významnou úlohu patogenetické mechanismy uplatňující se u různých druhů poškození kardiomyocytů a že „diagnostické okno“ troponinů může být odlišné u kardiotoxického poškození oproti poškození při ACS. Při ACS se hladiny troponinů obvykle normalizují do 10–14 dnů po akutní příhodě. Po podání  $\beta_2$  sympatomimetik byly zvýšené hladiny popsané 6 hod. po aplikaci a zvýšené hladiny přetrvávaly ještě 48 hod. (Bleuel a spol., 1995; Bertsch a spol., 1997). Podobný průběh byl zaznamenán i v našem experimentu. Výsledky svědčí pro prodlouženou degradaci kardiomyocytů, která přetrvává i po ukončení podávání protinadorové léčby. Naše předešlá studie prokázala, že hladiny troponinu T jsou signifikantně vyšší oproti kontrole ještě v následujících 7 týdnech po ukončení

chemoterapie (Jirkovský a spol., 2013).

Závěrem je možné říci, že námi zjištěná data zpřesňují současnou představu o tom, že každý cyklus chemoterapie vede ke klinicky němému ireverzibilnímu poškození myokardu, které narůstá se stoupající kumulativní dávkou antracyklinů a klinicky se manifestuje až po překročení funkčních rezerv a kompenzačních mechanismů srdce (Aapro a spol., 2011; Ewer a Ewer, 2010; Menna a spol., 2012).

*Podpořeno programem PRVOUK P37/5.*

*Výsledky byly publikovány v plném rozsahu v: Adamcová, M., Lečová-Popelová, O., Jirkovský, E., Mazurová, Y., Palička, V., Šimko, F., Geršl, V., Štěrba, M.: Experimental determination of diagnostic window of cardiac troponins in the development of chronic anthracycline cardiotoxicity and estimation of its predictive value. Int J Cardiol 201; 358–367, 2015.*

## Literatura:

- 1) Aapro, M., Bernard-Marty, C., Brain, E.G., Batist, G., Erdkamp, F., Krzemieniecki, K., Leonard, R., Lluch, A., Monfardini, S., Ryberg, M., Soubeyran, P., Wedding, U. Anthracycline cardiotoxicity in the elderly cancer patient: a SIOG expert position paper. *Ann. Oncol.* 22: 257–267, 2011.
- 2) Adamcová, M., Geršl, V., Hrdina, R., Mělka, M., Mazurová, Y., Vávrová, J., Palička, V., Kokštejn, Z. Cardiac troponin T as a marker of myocardial damage caused by antineoplastic drugs in rabbits. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 125 (5): 268–274, 1999.
- 3) Adamcová, M., Štěrba, M., Šimůnek, T., Potáčková, A., Popelová, O., Mazurová, Y., Geršl, V. Troponin as a marker of myocardial damage in drug-induced cardiotoxicity. *Expert Opin. Drug Saf.* 4: 457–472, 2005.
- 4) Bleuel, H., Deschl, U., Bertsch, T., Boltz, G., Rebel, W. Diagnostic efficiency of troponin T measurements in rats with experimental myocardial cell damage. *Exp. Toxicol. Pathol.* 47: 121–127, 1995.
- 5) Bertsch, T., Bleuel H., Aufenanger, J., Rebel, W. Comparison of cardiac troponin T and cardiac troponin I concentrations in peripheral blood during oriprenaline induced tachycardia in rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 49: 467–468, 1997.
- 6) Dolci, A., Dominici, R., Cardinale, D., Sandri, M.T., Panteghini, M. Biochemical Markers for Prediction of Chemotherapy-Induced Cardiotoxicity. *Systematic Review of the Literature and Recommendations for Use. Am J Clin Pathol* 130: 688–695, 2008.
- 7) Ewer, M.S., Ewer, S.M. Cardiotoxicity of anticancer treatments: what the cardiologist needs to know. *Nat. Rev. Cardiol.* 7: 564–575, 2010.
- 8) Geršl, V., German, J., Šuba, P., Mazurová, Y., Hrdina, R., Macháčeková, J. IGF-I in experimental daunorubicin-induced cardiomyopathy in rabbits. *Hum. Exp. Toxicol.* 18: 154–161, 1999.
- 9) Hasinoff, B.B. Dexrazoxane (ICRF-187) protects cardiac myocytes against hypoxia-reoxygenation damage. *Cardiovasc. Toxicol.* 2: 111–118, 2002.
- 10) Jirkovský, E., Lečová-Popelová, O., Hroch, M., Adamcová, M., Mazurová, Y., Vávrová, J., Mičuda, S., Šimůnek, T., Geršl, V., Štěrba, M. Early and delayed cardioprotective intervention with dexrazoxane each show different potential for prevention of chronic anthracycline cardiotoxicity in rabbits. *Toxicology* 311: 191–204, 2013.
- 11) Menna, P., Paz, O.G., Chello, M., Covino, E., Salvatorelli, E., Minotti, G. Anthracycline cardiotoxicity. *Expert Opin. Drug Saf.* 11 (Suppl 1): 21–36, 2012.
- 12) Popelová, O., Štěrba, M., Hašková, P., Šimůnek, T., Hroch, M., Gunčova, I., Nachtigal, P., Adamcová, M., Geršl, V., Mazurová, Y. Dexrazoxane-afforded protection against chronic anthracycline cardiotoxicity in vivo: effective rescue of cardiomyocytes from apoptotic cell death. *Br. J. Cancer* 101: 792–802, 2009.
- 13) Saenger, A.K., Beyrau, R., Braun, S., Cooray, R., Dolci, A., Freidank, H., Giannitsis, E., Gustafson, S., Handy, B., Katus, H., Melanson, S.E., Panteghini, M., Venge, P., Zorn, M., Jarolim, P., Bruton, D., Jarausch, J., Jaffe, A.S. Multicenter analytical evaluation of a high-sensitivity troponin T assay. *Clinica Chimica Acta* 412: 748–754, 2011.
- 14) Šimůnek, T., Klíntová, I., Kaplanová, J., Mazurová, Y., Adamcová, M., Štěrba, M., Hrdina, R., Geršl, V. Rabbit model for in vivo study of anthracycline induced heart failure and for the evaluation of protective agents. *Eur. J. Heart Fail.* 6: 377–387, 2004.