

Doc. MUDr. Michaela Adamcová, Ph.D.<sup>a</sup>, Mgr. Martin Štěrba<sup>b</sup>, Mgr. Tomáš Šimůnek, Ph.D.<sup>d</sup>, Mgr. Anna Potáčková<sup>a</sup>, Mgr. Olga Popelová<sup>b</sup>, Doc. MUDr. Yvona Mazurová, CSc.<sup>c</sup>, Prof. MUDr. Vladimír Geršl, CSc.<sup>b</sup>  
<sup>a</sup>Ústav fyziologie, <sup>b</sup>Ústav farmakologie, <sup>c</sup>Ústav histology a embryologie, Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové, <sup>d</sup>Ústav biochemických věd, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

# Srdeční troponiny jako markery myokardiálního poškození

## *při hodnocení kardiotoxického a kardioprotektivního účinku léčiv*

### 1. Úvod

Kardiovaskulární systém je významným cílem nežádoucích a toxických účinků řady léčiv s velmi závažnými důsledky pro celý organismus. Nejčastějšími projevy nežádoucích (NÚL) a toxických účinků léčiv (TÚL) jsou abnormality tepové frekvence, poruchy rytmu a změny srdeční kontraktility. Léčiva mohou: 1. přímo interagovat s kardiomyocyty a působit strukturální nebo funkční změny myokardu nebo 2. vyvolávat změny nepřímo - sekundárně ovlivněním dalších tělesných orgánů, např. aktivací sympatického nervového systému. Mezi nejdůležitější mechanismy NÚL A TÚL na myokard patří vznik volných radikálů (oxidační stres), poruchy homeostázy vápníku, ischemicko-reperfuční poškození, vyčerpání makroergních fosfátů, inhibice proteosyntézy, uvolnění vazoaktivních látek, přímé poškození buněčné membrány nebo zásah do imunitních dějů.

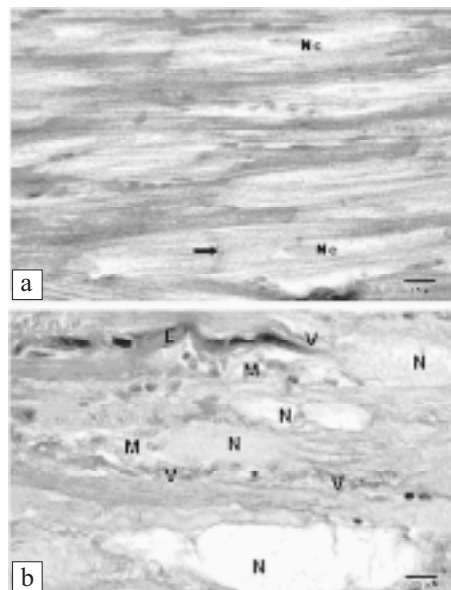
I když počet léčiv vyvolávajících přímé poškození tkáně myokardu (nekrózu a/ nebo apoptózu kardiomyocytů) je relativně omezen (přehled viz tabulka č. 1), klinická závažnost tohoto typu poškození, které může vyústit až v srdeční selhání, poukazuje na potřebu časné diagnostiky. Až doposud nebyly biochemické markery rutinně zahrnuty do farmakologických, ani

toxikologických studií nových léčiv. S vývojem vysoce specifických a senzitivních markerů jako jsou troponiny se stále důrazněji začaly objevovat názory, že budoucí studie by měly zahrnout i hodnocení kardiotoxicity právě pomocí troponinů. V roce 2001 byla ustanovena komise expertů při americké FDA (the Expert Working Group on Biomarkers of Drug induced Cardiac Toxicity of the Nonclinical Subcommittee of the Advisory Committee for Pharmaceutical Science), která ve své zprávě jasně definovala současný stav problematiky srdečních troponinů a myokardiálního poškození vyvolaného léčiv. Cílem tohoto přehledu je shrnout nejdůležitější poznatky z jednotlivých experimentálních i klinických studií spolu s vlastními zkušenostmi autorů a poskytnout tak ucelenější pohled na problematiku srdečních troponinů a jejich využití při hodnocení kardiotoxického a eventuálně kardioprotektivního účinku léčiv.

### 2. Možnosti využití troponinů ve farmakologických studiích

#### 2.1. Antracykliny

Kardiotoxicity patří mezi velmi závažné nežádoucí účinky některých antineoplastických látek a mnohdy je dokonce limitujícím faktorem jejich klinického užití. Po podání antracyklinů byly popsány čtyři různě



Obr. 1.: Histologické vyšetření myokardu levé komory pokusných zvířat - a) kontrolní skupina (aplikován fyziologický roztok, 2 ml/kg, 1x týdně po 10 týdňů), b) daunorubicinová skupina (aplikován daunorubicin 3 mg/kg, 1x týdně po 10 týdňů).

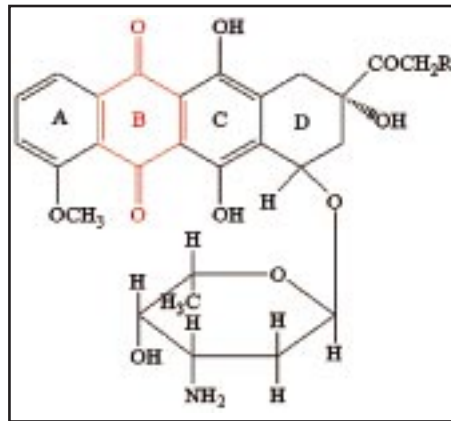
E - degenerující kardiomyocyty s výrazně eozinofilní cytoplazmou; N - nekrotické myocyty; M - makrofágy, odklízající zbytky buněk; V - vazivo = intersticiální reparativní fibróza.

né typy kardiotoxicity: akutní a subakutní poškození myokardu, dále chronicky se rozvíjející kardiomyopatie (klinicky patrně nejdůležitější) a tzv. opožděná kardiotoxicita (kardiomyopatie, která se objeví za dlouhou dobu po aplikaci léku). Patogeneze toxického účinku antracyklinů je zřejmě komplexní, klíčová role se nicméně přisuzuje toxickému vlivu volných radikálů.

První experimentální studie zabývající se možností využití srdečních troponinů po podání doxorubicinu u spontánně hypertenzních potkanů byla publikována Seino a spol. v roce 1993. Následně Herman a spol. potvrdili užitečnost stanovení cTnT k určení rozsahu doxorubicinem indukované kardiotoxicity. Byla nalezena závislost sérových hladin cTnT na celkové kumulativní dávce a na rozsahu srdečních lézí diagnostikovaných pomocí histologického a imunohistochemického vyšetření. V našem modelu daunorubicinem navozené kardiomyopatie u králíků *in vivo* došlo k statisticky významnému zvýšení cTnT oproti kontrolní skupině před 8. aplikací (při kumulativní dávce 400 mg/m<sup>2</sup>). Po 8. aplikaci byly hodnoty cTnT signifikantně vyšší u zvířat, u kterých došlo k předčasnému úmrtí ( $0,31 \pm 0,11 \mu\text{g/l}$ ) oproti zvířatům přežívajícím ( $0,04 \pm 0,03 \mu\text{g/l}$ ). Navíc byla nalezena úzká negativní lineární korelace ( $R = -0,976$ ;  $P < 0,001$ ) mezi plazmatickými hladinami cTnT a indexem kontraktility levé komory  $dP/dt_{\text{max}}$ .

Na rozdíl od experimentů na zvířatech, které přinesly poměrně konzistentní výsledky, klinické studie týkající se detekce myokardiálního poškození při antracyklinové terapii jsou značně rozporuplné. Na jedné straně byly publikovány studie popisující signifikantní zvýšení plazmatických nebo sérových hladin srdečních troponinů po antracyklinové léčbě a dobrou korelaci hladin troponinů s klinickými projevy toxicity, na druhé straně existují práce, které uvolnění troponinů nepopsaly. Zejména první práce nebyly schopny prokázat zvýšení hladin cTnT během prvních 72 hodin po zahájení iniciální i průběžné chemoterapie. Dokonce Kismet a spol., který ke stanovení cTnT použil třetí generaci imunoeseje dospěl k závěru, že echokardiografické vyšetření je spolehlivějším ukazatelem subklinické kardiotoxicity než stanovování hladin cTnT.

Na druhou stranu Lipshultz a spol. prokázal mírné zvýšení hladiny cTnT u dětí po začátku chemoterapie doxorubicinem, které měly vyšší riziko vzniku levokomorových abnormalit (dilatace a ztenčování srdeční stěny). Podobné výsledky byly také publikovány Aunereem a kol. Série měření sérových hladin cTnT odhalila opožděné subklinické poškození myokardu po minimální expozici antracykliny. Za rizikovou byla označena skupina pacien-



Obr. 2.: Chemická struktura antracyklinových cytostatik - ( $R = -\text{OH}$  doxorubicin,  $R = \text{H}$  daunorubicin)

tů, kterým byla naměřena hladina cTnT vyšší než  $0,3 \mu\text{g/l}$ .

Cardinale a spol. poukazují na užitečnost sledování koncentrací cTnI během chemoterapie nádorového bujení; u cTnI pozitivních pacientů signifikantní pokles levokomorové ejekční frakce přetrvával 6 měsíců po ukončení chemoterapie. Za dělicí hranici mezi skupinou TnI pozitivních a cTnI negativních pacientů byla v jejich studii považována koncentrace  $0,5 \mu\text{g/l}$ .

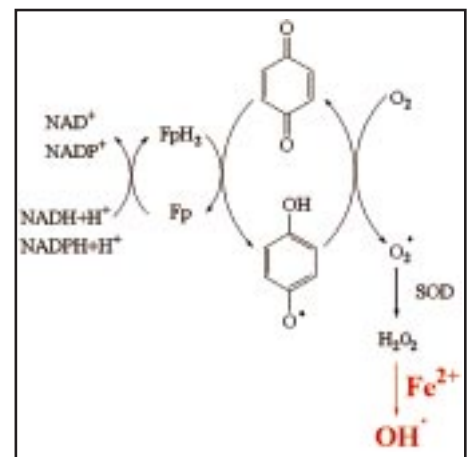
Velmi zajímavá data uvedl tým Lipshultze a spol., který našel zvýšení hladin cTnT u přibližně 10% dětí s nově diagnostikovanou akutní lymfoblastickou leukémií. Tato skutečnost pravděpodobně odráží poškození myokardu ještě před zahájením antineoplastické terapie, které je způsobeno leukemickými infiltráty myokardu, šokem, anemií, acidózou apod. Tito pacienti mají zvýšené riziko vývoje antracyklinové kardiomyopatie, a proto by měli přednostně dostávat kardioprotektivní látky.

Sporné výsledky jednotlivých klinických studií mohou být zapříčiněny heterogenitou ve výběru pacientů, rozdílným schématem chemoterapie, odlišnou kumulativní dávkou antracyklinů a nejednotným metodickým přístupem, zejména různými diagnostickými limity (cut-off), používanými jednotlivými autory. Zatímco někteří autoři použili hodnotu  $0,2 \mu\text{g/l}$ , jiní považovali již hodnoty vyšší než  $0,03 \mu\text{g/l}$  za indikátor myokardiálního poškození. Navíc od počátku 90. let byly používány různé generace imunoesejí, což dále komplikuje interpretaci výsledků z jednotlivých studií. Navíc je zřejmé, že způsob degradace myofibrilů a s tím související kinetika troponinů jednoznačně závisí na typu poškození. Po jednorázové aplikaci antra-

cyklinů většina autorů nezaznamenala zvýšené hodnoty srdečních troponinů, avšak na chronickém experimentálním modelu byly zvýšené hodnoty cTnI naměřeny ještě 6 týdnů po ukončení chemoterapie. U pacientů podrobených chemoterapii přetrvávaly zvýšené hladiny cTnT v průběhu každého cyklu po dobu 3,5 dne.

## 2.2. Kardioprotektivní látky

S cílem zamezit či alespoň zpomalit vývoj antracyklinové kardiomyopatie je studována modifikace dávkování, užití nových lékových forem, podávání novějších ana-



Obr. 3.: Schematické znázornění vzniku hydroxylových radikálů prostřednictvím „redoxního cyklu“ antracyklinů

logů antracyklinů a v neposlední řadě současná aplikace kardioprotektivních látek. Zatím nejpříznivější výsledky byly dosaženy s dexrazoxanem (ICRF - 187) - bisdioxopiperazinovým derivátem EDTA. Mechanismus kardioprotektivní aktivity dexrazoxanu spočívá v intracelulární chelataci iontů, především iontů železa, což ve výsledku blokuje antracykliny - navozený vznik volných kyslíkových radikálů.

Studie Hermana a spol. jasně prokázala snížení sérových hladin cTnT spolu s redukcí morfologických známek myokardiálního poškození u SHR potkanů, kterým byl doxorubicin podáván zároveň s kardioprotektivem dexrazoxanem. Rovněž na našem modelu daunorubicinem navozené kardiomyopatie u králíka *in vivo* byl prokázán významný kardioprotektivní účinek dexrazoxanu. U králíků, kterým byl podáván dexrazoxan 30 minut před aplikací daunorubicinu, došlo k signifikantnímu snížení hladin cTnT oproti skupině, kde byl daunorubicin podáván ve stejné dávce samostatně (poslední změřená hodnota cTnT  $0,038 \pm 0,019 \mu\text{g/l}$  vs.  $0,354 \pm 0,089 \mu\text{g/l}$ ). Pro významný kardioprotektivní účinek

svědčily i další sledované funkční a morfologické parametry.

Po experimentálních studiích na laboratorních zvířatech byl kardioprotektivní účinek dexrazoxanu hodnocen i v klinické praxi. V randomizované klinické studii bylo jasně prokázáno, že u pacientů po kombinované aplikaci doxorubicinu s dexrazoxanem došlo k významnému poklesu sérových hladin cTnT zhruba na polovinu ve srovnání s pacienty, kteří byli léčeni pouze doxorubicinem, navíc zvýšené hladiny cTnT rychleji klesaly.

Vzhledem k tomu, že podávání dexrazoxanu s sebou přináší celou řadu nevýhod (zejména riziko myelotoxicity a vysoké finanční nároky, což umožňuje podávat dexrazoxan pouze vybraným rizikovým skupinám pacientů) probíhá intenzivní studium dalších látek s potenciálně kardioprotektivním účinkem. V této souvislosti se srdeční troponiny zdají být opět vhodnými biochemickými markery pro hodnocení kardioprotektivního účinku nových látek. Doposud proběhlé experimentální studie sledovaly například protektivní efekt pyridoxal isonicotinoyl hydrazonu (PIH) a jeho derivátů. Jedná se o lipofilní chelatační látky, prostupující intracelulárně, vykazující vysokou železo-chelatační aktivitu v pokusech *in vitro* a *in vivo*, relativně netoxické, účinné též po p.o. aplikaci, které by mohly být v budoucnosti využity při léčbě celé řady patologických stavů, spojených s „overloadem železa“ event. s tvorbou volných kyslíkových radikálů. Felezsko a kol. se zabýval studiem lovastatinu, léčiva klinicky obecně užívaného ke snížení hypercholesterolemie, který zároveň potencuje účinek některých cytostatik a má i potenciálně kardioprotektivní efekt.

### 2.3. Další antineoplastické látky

Ačkoliv antracykliny jsou bezesporu látky s nejzávažnějšími kardiotoxickými účinky v klinické praxi, i některé další antineoplastické látky jako mitoxantron, 5-fluorouracil nebo cyklofosfamid mohou vést k poškození myokardu. Je nutno uvést, že většinou je podávána kombinace různých cytostatik, což ztěžuje odlišení kardiotoxického účinku jednotlivých látek. Při současném podávání antracyklinů s cyklofosfamidem se zvýšené hladiny troponinů objevovaly časněji a dosahovaly vyšších hodnot. Studie, zabývající se možností

využití troponinů k časně a pozdní predikci klinických a subklinických známek myokardiálního poškození při současném podání antracyklinů s trastuzumabem, probíhají v současné době.

Srdeční troponiny se ukázaly být rovněž vhodnými biochemickými markery pro hodnocení potenciálního kardiotoxického účinku nově vyvíjených antineoplastických látek jako např. oracinu nebo dime-thoxybenfluoronu, které byly podávány v experimentálních studiích. cTnT byl využit i k detekci nízkého kardiotoxického potenciálu PNU-159548 odvozeného od idarubicinu.

### 2.4. β-sympatomimetika

Za jeden z klíčových momentů ve vývoji nekróz po podání vysokých dávek β-sympatomimetik je v poslední době pokládáno porušení intracelulární homeostázy vápníku. V experimentálních studiích Bleuel

a kol. detekoval významný nárůst cTnT po podání 4 mg/kg isoprenalinu během prvních šesti hodin a toto zvýšení přetrvávalo ještě 48 hod po aplikaci. Podobně Bertsch a kol. popisuje vzestup cTnT (7,8 krát) a cTnI (13,2 krát) za 6 hodin po podání orciprenalinu (5 mg/kg) ve srovnání s kontrolní skupinou. Srdeční troponiny zůstaly zvýšené i po 24 hodinách - cTnT (7,2 krát) a cTnI (6,0 krát).

Cílem naší studie bylo sledovat vliv tokolytické léčby β-sympatomimetiky (fenoterol) v kombinaci s kalciovými blokátory (verapamil) k zástavě předčasného porodu na myokard těhotných žen a novorozence. U donošených zdravých novorozenců z fyziologických těhotenství se cTnT v pupečnickové krvi získané během porodu pohybuje ve fyziologické normě. Po akutní tokolytické terapii β-sympatomimetiky bylo u novorozenců prokázáno významné zvýšení hladin cTnT v pu-

| Skupina léčiv                              | Látky                   | Relativní frekvence toxicity | Typ kardiotoxicity   |
|--|-------------------------|------------------------------|--|
| Antracykliny                               | doxorubicin             | (typ 3, 4)<br>+++            | 1. Akutní -arytmie<br>2. Subakutní - myokarditida/perikarditida<br>3. Chronická - srdeční selhání<br>4. Opožděná - srdeční selhání |
|  | daunorubicin            | +++                          |  |
|  | epirubicin              | ++                           |  |
| Antrachinony                               | mitoxantron             | ++                           | Myokarditida, srdeční selhání  |
|  | pixantron               | ?                            |  |
| Monoklonální protilátky                    | trastuzumab (anti-HER)  | ++                           | Srdeční selhání  |
|  | bevacizumab (anti-VEGF) | ?                            | Srdeční selhání?   |
|  | rituximab (anti-CD20)   | ?                            | Ischemie   |
|  |                         |                              |  |
| Alkylační látky                            | cyklofosfamid           | ++                           | Myokarditida, srdeční selhání  |
|  | ifosfamid               | ++                           | Myokarditida, srdeční selhání  |
|  | cisplatina              | ++                           | Ischemie, srdeční selhání  |
| Antimetaboly                               | 5-fluorouracil          | ++                           | Ischemie   |
|  | cepecitabin             | +                            | Srdeční selhání  |
|  | cytarabin               | +                            | Ischemie   |
| Antimikrotubulární látky                   | paclitaxel              | +                            | Srdeční selhání  |
|  | vinca alkaloidy         | +(+)                         |  |
| β-mimetika (bronchodilatancia, tokolytika) | fenoterol               |                              | Ischemie   |
|  | salbitamol              | ++                           |  |
|  | terbutalin              |                              |  |
| Jiné                                       | pentostatin             | ++                           | Ischemie, srdeční selhání  |
|  | imatinib                | ++(+)                        | Srdeční selhání  |
|  | kokain                  |                              | Ischemie, srdeční selhání  |

Relativní frekvence toxicity: + vzácně, ++ běžně, +++ velmi často

Tab. č. 1: Skupiny léčiv s největším rizikem poškození srdce

pečníkové krvi ( $0,24 \pm 0,05 \mu\text{g/l}$ ) oproti kontrolní skupině. Maximální koncentrace cTnT byly zachyceny až 2. - 3. den po zahájení infúzní tokolýzy ( $0,39 \pm 0,11 \mu\text{g/l}$ ). Ve skupině těhotných žen, u kterých byla užitá infúzní tokolytická terapie, se hodnoty cTnT začaly mírně zvyšovat již během 1. dne po zahájení akutní tokolýzy, avšak k signifikantnímu zvýšení došlo až během 3. dne po zahájení terapie ( $0,35 \pm 0,14 \mu\text{g/l}$ ). Korelace mezi hladinami cTnT v krvi matky a plodu nebyla prokázána.

Další práce hodnotící kardiotoxický efekt  $\beta$ -sympatomimetik pomocí srdečních troponinů jsou zatím ojedinělé. Chiang a kol. naměřili u 3 z 29 pacientů trpících těžkým astmatem mírné zvyšování hladin

cTnI při i.v. léčbě terbutalinem. Ve studii Pedersona kol. byly zaznamenány zvýšené hladiny cTnI a změny na EKG u sympatomimetické léčby bupropionem a pseudofedrinem.

### 3. Závěr

V současné době jsou srdeční troponiny považovány za nevhodnější biochemické markery pro monitorování kardiotoxického účinku léčiv a to jak v preklinických, tak i klinických studiích. Zatím největší diagnostický přínos lze od troponinů očekávat u pacientů léčených  $\beta$ -sympatomimetiky a cytostatiky, zejména pak antracykliny. Přesto je nutné zdůraznit potřebu hle-

dání nových biomarkerů, které by detekovaly i jiné typy kardiotoxicity než je strukturální poškození kardiomyocytů.

*Experimentální práce autorského kolektivu je v současné době podporována výzkumným záměrem MŠMT 0021620820*

### Literatura:

ADAMCOVÁ M, ŠTĚRBA M, ŠIMŮNEK T, POTÁČOVÁ A, POPELOVÁ O, MAZUROVÁ Y, VLADIMÍR GERŠL V.: „Troponin as a marker of myocardial damage in drug-induced cardiotoxicity.“ *Expert Opin. Drug Saf.* 4(3):457-472, 2005.

## ROCHE - mezinárodní události a komentáře

■ *Anita Greil, Basel (Dow Jones), 20. června 2005: Roche ve druhé polovině roku 2006 požádá o registraci pro 2 nové diagnostické testy*

Roche plánuje v druhé polovině roku 2006 požádat o registraci pro test AmpliChip Leukemia. Test analyzuje geny a detekuje, kterým druhem leukémie pacient trpí. To umožní lékařům rozhodnout o nejlepší možné léčbě.

Dalším testem, který chce Roche ne-

chat schválit v závěru roku 2006 je AmpliChip P53. Tento test identifikuje mutace v genu P53, jež jsou přítomny u několika typů rakovinového bujení. Detekce těchto mutací pomůže určit pacientovu prognózu a odezvu na léčbu.

Již v počátku příštího roku uvede Roche na trh nový PCR test na sepsi. Test rozpozná jak bakteriální, tak mykózní infekci přímo z krve pacienta.

■ *Roche získal GlycArt Biotechnology 25. července 2005 ukončila společnost Roche akvizici 100% společnosti GlycArt Biotechnology AG, soukromé švýcarské firmy orientované na biotechnologie. Unikátní technologie GlycArt na zlepšení efektu protilátek umožní Roche intenzivněji a s větším know-how se věnovat výzkumu a vývoji protilátek. GlycArt má v preklinických studiích také 3 nové biotechnologické preparáty na léčbu rakoviny.*

## Ze zahraničního tisku

■ *New York, 22. července (Reuters): Roche má test, který je nadějí v boji se smrtelně nebezpečnou sepsí*

Roche Holding AG v pátek oznámili, že jeden z jejich experimentálních diagnostik má potenciál zachránit každý rok desetitisíce životů a urychlením léčby vážných infekcí krevního oběhu zvýšit roční prodej až o 200 milionů dolarů.

Hlavní představitelé švýcarského výrobce sdělili Reuters, že příští rok očekávají pro test SeptiFast schválení amerických úřadů. SeptiFast je indikován u sepse, syndromu, při němž životně důležité orgány selhávají v důsledku nepřiměřené reakce imunitního systému na infekci, při níž se v těle vytvoří zánět obrovského rozsahu. Cena testu se bude pohybovat okolo 100 USD na pacienta.

Sepse se projeví ročně u 750 000 Američanů, převážně v nemocnicích, více než 200 000 jich na následky sepse zemře. Testy, které jsou momentálně k dispozici, určí typ bakterií nebo plísni v krevním řečišti zhruba za týden. Test od Roche vydá spolehlivější výsledek za 6 až 8 hodin.

„Dnes pacient zemře dřív, než se podaří zjistit, co jeho organizmus napadlo“, říká Franz Humer, výkonný ředitel Roche. „Náš test umožní, že pacient dostane správné antibiotikum nebo antimykotikum v řádu několika hodin, nikoliv až za týden.“

Humer dodal, že v dnešní době se při léčbě sepse standardně podává širokospektré antibiotikum a trpělivě se čeká na výsledek s pravým původcem in-

fekce. Poté se teprve podají jiné léky v závislosti na tom, zda je patogenem gram-pozitivní bakterie, gram-negativní bakterie nebo některý druh plísně.

Prvotní léčba antibiotiky je často neadekvátní, protože vysoké procento infekcí vedoucích k sepsi je způsobeno plísněmi, nikoliv bakteriemi.

„Věřím, že náš test pomůže zachránit až 10 procent pacientů, protože čím rychleji zjistíme původce, tím větší je naděje jej adekvátně zlikvidovat“, tvrdí Heino von Prondzynski, ředitel Roche Diagnostics.

Podle Society of Critical Care Medicine je sepsa jednou z nejmávnějších příčin úmrtí ve Spojených Státech, roční náklady na její léčbu se odhadují na 17 miliard dolarů.