

Received: 2005.12.19
Accepted: 2006.04.07
Published: 2006.04.24

Rola reaktywnych form tlenu i azotu w zaburzeniach komórkowej homeostazy wapnia i żelaza w kardiotoksyczności antracyklinowej

The role of reactive oxygen and nitrogen species in calcium and iron homeostasis dysregulation in anthracycline cardiotoxicity

Jarosław Dudka

Katedra i Zakład Patomorfologii Klinicznej Akademii Medycznej im. prof. Feliksa Skubiszewskiego w Lublinie

Streszczenie

Antracykliny należą do chemioterapeutyków stosowanych w leczeniu nowotworów od niemal 40 lat. Skuteczność terapeutyczna tej grupy leków jest ściśle związana z wielkością dawki. Jednak czynnikiem limitującym zwiększenie dawki, w celu osiągnięcia lepszej skuteczności terapeutycznej jest pojawiająca się kardiotoksyczność. Skutkiem kardiotoksycznego działania antracyklin może być nieodwracalna, obecnie niemożliwa do wyleczenia, kardiomiopatia będąca przyczyną pogorszenia jakości życia oraz istotnego wzrostu ryzyka zgonu. Kardiomiopatia poantracyklinowa objawia się przede wszystkim obniżeniem frakcji wyrzutowej lewej komory prowadząc do zastoinowej niewydolności serca. Istnieje wiele hipotez próbujących wyjaśnić przyczyny kardiotoksyczności antracyklinowej. Przedstawiono wiele dowodów świadczących o tym, że uszkodzenie serca jest związane z działaniem wolnych rodników tlenowych, alkoholowych metabolitów antracyklin oraz zaburzeniami homeostazy wapnia. Badania ostatniej dekady dostarczyły wielu dowodów potwierdzających, że w kardiotoksyczności antracyklinowej istotną rolę mogą odgrywać również reaktywne formy azotu, a także zaburzenia komórkowej homeostazy żelaza. Ponadto coraz więcej faktów przemawia za wzajemnym powiązaniem poszczególnych mechanizmów biorących udział w uszkodzeniu serca wywołanym antracyklinami. Niektóre reaktywne formy tlenu i azotu mogą reagować ze sobą tworząc produkty o wyjątkowo silnej toksyczności. Przypuszcza się, że reaktywne formy tlenu i azotu mogą niekorzystnie wpływać na utrzymanie komórkowej równowagi wapnia i żelaza. W pracy przedstawiono możliwe powiązania reaktywnych form tlenu i azotu z zaburzeniami komórkowej homeostazy wapnia i żelaza w kardiotoksyczności antracyklinowej.

Słowa kluczowe:

antracykliny • kardiotoksyczność • stres oksydacyjny • homeostaza wapnia i żelaza

Summary

Anthracyclines are potent anticancer agents which have been used in therapy for 40 years. However, their activity is very limited due to their cumulative, dose-dependent, chronic cardiotoxicity. The cardiotoxic effect of anthracyclines may lead to irreversible and incurable cardiomyopathy, which impairs quality of life and increases the risk of death. The most prominent feature of this cardiac disease is diminished ejection fraction of the left ventricle, which leads to congestive heart failure. Reactive oxygen species, alcoholic metabolites of anthracycline, and cellular calcium homeostasis dysregulation cause chronic anthracycline cardiotoxicity. Recently, an important role

for reactive nitric species and iron homeostasis deregulation was suspected. Some reactive oxygen and nitric species might react with one another to produce new, highly toxic products. It is suggested that after anthracycline administration, reactive oxygen and nitric species affect cellular calcium and iron homeostasis deregulation. The possible connection between reactive oxygen and nitric species and calcium and iron deregulation is presented in the paper.

Key words: anthracycline • cardiotoxicity • oxidative stress • calcium and iron homeostasis

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_60/9085.pdf

Word count: 2467

Tables: –

Figures: 2

References: 75

Adres autora: dr n. farm. Jarosław Dudka, Katedra i Zakład Patomorfologii Klinicznej Akademii Medycznej im. prof. Feliksa Skubiszewskiego w Lublinie, ul. Jaczewskiego 8, 20-930 Lublin; e-mail: ave123@wp.pl

Wykaz skrótów: O_2^- – anionorodnik ponadtlenkowy; **DOX** – doksorubicyna; **eNOS** – śródbłonkowa syntaza tlenu azotu; **HO·** – rodnik hydroksylowy; H_2O_2 – nadtlenek wodoru; **iNOS** – indukowana syntaza tlenu azotu; **IRE** – fragment mRNA ferrytyny zdolny do wiązania z białkiem siarkowo-żelazową hamującą inicjację procesu translacji (iron-response element); **IRE-BP** – białko siarkowo-żelazowe hamujące inicjację procesu translacji ferrytyny; **MnSOD** – mitochondrialna dysmutaza ponadtlenkowa zależna od manganu; **nNOS** – neuronalna syntaza tlenu azotu; **NO** – tlenek azotu; **ONOO·** – nadtlenoazotyn; **RNS** – reaktywne formy azotu; **ROS** – reaktywne formy tlenu; **RyR2** – receptor rianodynowy kanału wapniowego siateczki śródplazmatycznej kardiomiocytu; **SR** – siateczka śródplazmatyczna.

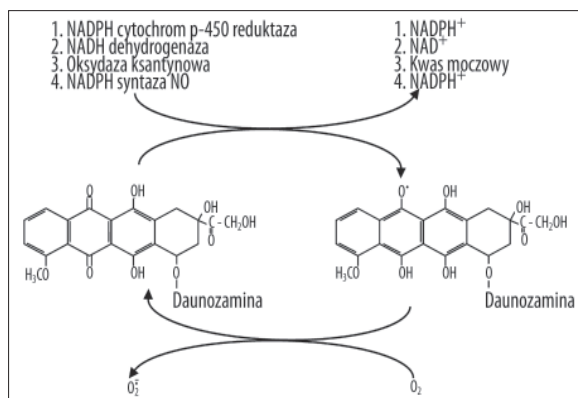
Powszechnie przyjmuje się, że mechanizm działania przeciwnowotworowego antracyklin różni się od mechanizmu odpowiedzialnego za kardiotoxyczność. W intensywnie proliferujących komórkach nowotworowych główną rolę odgrywa bezpośrednie oddziaływanie antracyklin na DNA i hamowanie topoiizomerazy II [43,52,61]. Mechanizm ten nie odgrywa jednak większej roli w komórkach mięśnia sercowego, które u ludzi od drugiego miesiąca życia nie ulegają podziałom mitotycznym [16]. Intensywne badania dostarczyły wielu dowodów na udział reaktywnych form tlenu [20,32,60], metabolitów mających grupę hydroksylową przy węglu 13 (C-13) [7,47], zaburzeń homeostazy wapnia, żelaza [43–46,51,58] i innych [52,59] w kardiomiopatii antracyklinowej. Mimo tak wielu proponowanych mechanizmów leżących u podstaw kardiotoxyczności antracyklin powszechnie uważa się, że największą rolę w tym procesie odgrywają reaktywne formy tlenu (ROS). Jednak ostatnio pojawiły się doniesienia o udziale reaktywnych form azotu (RNS), w kardiotoxyczności antracyklinowej [22]. Niektóre z reaktywnych form azotu wykazują szczególnie silną toksyczność, a ich powstawanie jest ściśle związane z reaktywnymi formami tlenu. Wykładnikiem kardiotoxyczności przewlekłej i późnej antracyklin jest postępujące rozszerzenie lewej komory i osłabienia kurczliwości mięśnia sercowego [24].

POWSTAWANIE REAKTYWNYCH FORM TLENU I AZOTU W WYNIKU DZIAŁANIA ANTRACYKLIN

Antracykliny jako związki o budowie chinonowej łatwo ulegają redukcji jednoelektronowej do formy semichinonowej. Otrzymany elektron jest przekazywany na tlen cząsteczko-

wy, w wyniku czego powstaje anionorodnik ponadtlenkowy (O_2^-). Jednocześnie związek antracyklinowy powraca do macierzystej formy chinonowej (ryc. 1).

Powstający anionorodnik ponadtlenkowy rozpoczyna kaskadę reakcji wolnorodnikowych, których produktami są m.in. silnie toksyczny nadtlenek wodoru (H_2O_2) i rodnik hydroksylowy ($HO·$). Badania przeprowadzone na frakcjach subkomórkowych serca wykazały, że decydującą rolę w reakcji redukcji jednoelektronowej antracyklin odgrywają: mikrosomalna reduktaza NADPH-cytochromu P-450 (EC 1.6.2.4), mitochondrialna NADH dehydrogenaza (EC 1.6.99.3) i w mniejszym stopniu cytoplazmatyczna oksydaza ksantynowa (EC 1.2.3.2) [21,36,48,52,54,67]. Sugeruje się również, że w reakcji tej mogą brać udział syntazy tlenu azotu (EC 1.14.13.39) [23]. Reakcja redukcji jednoelektronowej, katalizowana przez mikrosomalną reduktazę NADPH-cytochromu P-450 może przebiegać ze znacznie większą wydajnością, jeżeli antracyklina utworzy kompleks z żelazem (III) [44]. Generowanie wolnych rodników może przebiegać również nieenzymatycznie przez utworzone połączenie antracykliny z jonami żelaza (III). W utworzonym połączeniu dochodzi do przemieszczeń elektronów i redukcji żelaza do +2 stopnia utlenienia. Związek taki ma charakter wolnego rodnika i z łatwością przenosi elektron na tlen cząsteczkowy tworząc, podobnie jak w reakcjach enzymatycznych, anionorodnik ponadtlenkowy [15,75]. Żelazo, niezależnie od tworzenia połączeń z antracyklinami, odgrywa także bardzo ważną rolę jako katalizator w reakcji Fentona, w przebiegu których powstaje silnie toksyczny rodnik hydroksylowy:



Ryc. 1. Mechanizm powstawania anionorodnika nadadtlenkowego w następstwie redukcji jednoelektronowej dokсорubicyny

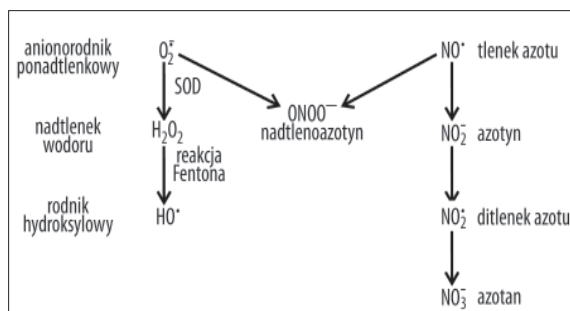


Utworzone w powyższych reakcjach reaktywne formy tlenu uszkadzają lipidy, białka i DNA [15], biorą także udział w przekazywaniu sygnałów komórkowych istotnych w procesach zapalnych, podziale i wzroście komórkowym oraz apoptozie, a także wchodzą w reakcje z drobnocząsteczkowymi związkami azotowymi, prowadząc do powstania nowych związków o wyjątkowo silnych właściwościach toksycznych.

W warunkach fizjologicznych tlenek azotu (NO) powstaje w wyniku katalitycznej aktywności konstytutywnych syntaz tlenu azotu: śródbłonkowej i neuronalnej (eNOS i nNOS). Stężenia NO utrzymujące się w wyniku reakcji katalizowanych przez eNOS i nNOS są jednak niewielkie, i nie dochodzi do reakcji z reaktywnymi formami tlenu. Jednak w obecności antrycyklina dochodzi do powstawania *de novo* indukowalnej formy syntazy tlenu azotu (iNOS), co prowadzi do znaczącego wzrostu stężenia NO. Jeżeli w komórce wzrasta jednocześnie stężenie anionorodnika nadadtlenkowego i tlenu azotu to dochodzi do reakcji chemicznej między obydwoma cząsteczkami. Jej następstwem jest powstanie szczególnie toksycznego nadtlenoazotynu (ONOO⁻). NO jest także źródłem innych reaktywnych form azotu, które zostały przedstawione na ryc. 2. Inną konsekwencją aktywności iNOS może być nasilenie reakcji redukcji jednoelektrodowej antrycyklina, a w konsekwencji dalszy wzrost stężenia O₂⁻, H₂O₂ i HO[·] [22].

ZABURZENIA HOMEOSTAZY Ca²⁺

Od dawna przypuszczano, że po podaniu antrycyklina dochodzi do zaburzeń homeostazy jonów wapnia w komórkach mięśnia sercowego. We wczesnych pracach dotyczących tego zagadnienia sugerowano, że przyczyną kardiomiopatii wywołanej przez antrycykliny może być nagromadzenie Ca²⁺ w komórkach mięśnia komór serca [50,58]. Badania Rabkina i wsp. [56] dowiodły jednak, że kardiotoxyczność antrycyklina może się nasilać po wywołaniu deficytu jonów Ca²⁺ w kardiomiocyty. Potwierdziły to badania Jensena [31], z których wynika, że zaburzenia czynności serca indukowane przez lek z grupy antrycyklina – dokсорubicynę (doxorubicin – DOX) jest związana ze spadkiem Ca²⁺ w aparacie kurczliwym. Jednak badania kurczliwości mięśnia sercowego po jednokrotnym podaniu DOX przy-



Ryc. 2. Hipotetyczne przemiany reaktywnych form tlenu i azotu w kardiomiocyty, w wyniku działania antrycyklina

niosły sprzeczne rezultaty. Niektórzy autorzy opisywali inotropowe dodatnie [34,66,68], inni natomiast inotropowe ujemne działanie DOX [17,30]. Podobnie w badaniach z przewlekłym stosowaniem DOX, występują rozbieżności w ocenie działania inotropowego leku [8,18,31] spowodowane prawdopodobnie różnymi schematami dawkowania i czasem obserwacji po ostatniej dawce DOX.

W utrzymywaniu komórkowej homeostazy jonów wapnia bierze udział błona cytoplazmatyczna (ATP-aza zależna od wapnia, kanał wapniowy, wymiennicz sodowo-wapniowy), siateczka śródplazmatyczna (ATP-aza zależna od wapnia, kanał rianodynowy, białka wiążące wapń, np. kalsekwestryna), mitochondria (selektywny nośnik wapniowy, wymiennicze zależne od H⁺ lub Na⁺), jądro komórkowe (ATP-aza, kanał wapniowy) oraz cytoplazma (np. kalmodulina, troponina C). Stężenie Ca²⁺ w siateczce śródplazmatycznej (sarcoplasmic reticulum; SR) komórek mięśnia serca jest wypadkową aktywności ATP-azy wapniowo zależnej SR (SERCA-2), wychytującej Ca²⁺ do SR oraz sprawnością uwalniania tego jonu do cytoplazmy przez kanały Ca²⁺. Zorzato i wsp. [74] przeprowadzili jedne z pierwszych badań, w których wykazali wpływ DOX na uwalnianie Ca²⁺ ze zbiorników SR mięśni szkieletowych królika. Kim i wsp. [35] potwierdzili te spostrzeżenia i zasugerowali, że jony wapnia są uwalniane przez te same kanały, na które działa kofeina. Przedłużające się otwarcie kanałów wapniowych SR wywoływane inkubacją kardiomiocytów z DOX może osłabiać zdolność SR do gromadzenia Ca²⁺ [26]. Natomiast w doświadczeniu z przewlekłym podawaniem DOX przeprowadzonym na królikach, gęstość kanałów Ca²⁺ w SR komórek mięśnia sercowego była istotnie obniżona [19]. Obniżenie gęstości kanałów wapniowych było skorelowane z zaawansowaniem kardiomiopatii. W związku z tym można przypuszczać, że w wyniku nasilenia uwalniania Ca²⁺ z SR przez antrycykliny dochodzi do uruchamiania mechanizmu adaptacyjnego przeciwdziałającego osłabieniu zdolności SR do gromadzenia Ca²⁺.

Wykazano również, że DOX hamuje ekspresję genów kardiomiocytu odpowiedzialnych za powstawanie mRNA białek SR biorących udział w regulacji stężenia Ca²⁺, takich jak: ATP-azy zależnej od wapnia, receptora rianodynowego (RyR2) kanału wapniowego, kalsekwestryny. Nie stwierdzono natomiast istotnego wpływu DOX na ekspresję mRNA białek błony cytoplazmatycznej: ATP-azy zależnej od wapnia i wymiennicza jonów Na⁺/Ca²⁺. Selektowne hamowanie ekspresji mRNA białek SR zaangażowanych w transport wapniowy może odpowiadać za zaburzenie regulacji Ca²⁺

i w konsekwencji za osłabienie czynności serca obserwowane w kardiomiopatii antracyklinowej [2].

Pierwsze prace sugerujące związek ROS z równowagą Ca^{2+} pojawiły się na początku lat 80. ub.w. [1,28,49]. Wykazano w nich, że wolne rodniki były odpowiedzialne za hamowanie wychwytu Ca^{2+} w wyizolowanych zbiornikach SR [49] i homogenatach serc psów [28]. Zgodnie z badaniami przeprowadzonymi przez Kukreja i Hess [38] oraz Opie [53], wolne rodniki tlenowe oddziałują na SR i inicjują uwalnianie Ca^{2+} do cytosolu, co prowadzi do zmian czynnościowych oraz uszkodzeń kardiomiocytów. Jak wykazały badania Kawakami i Okabe [33], anionorodnik ponadtlenkowy powoduje intensywne uwalnianie Ca^{2+} ze zbiorników SR komórek, przez oddziaływanie na receptor rianodynowy kanału wapniowego, za pośrednictwem kalmoduliny. Działanie takie może być wynikiem reakcji anionorodnika ponadtlenkowego z grupami $-\text{SH}$ białka receptora RyR2 [72]. Teza ta została poparta badaniami, w których wykazano, że otwarcie kanałów Ca^{2+} przez czynniki utleniające grupy $-\text{SH}$, może zostać odwrócone za pomocą związków redukujących te grupy, np. cysteiną [29]. Ostatnie badania Meissnera [40,41] oraz Pessaha i wsp. [55] sugerują również zależność aktywacji receptora RyR2 kanału wapniowego od stężenia wolnych rodników. Dotychczasowe badania nie wykazały natomiast wpływu O_2^- na ATP-azę zależną do wapnia SR komórek mięśnia sercowego [33].

Umiejscowienie izoform NOS jest ograniczone do pewnych struktur subkomórkowych, w których powstający NO może wykazywać charakterystyczne działanie, swoiste jedynie dla danej mikrodomeny komórkowej. Lokalizacja eNOS w pobliżu receptora β -adrenergicznego i kanału Ca^{2+} typu L błony cytoplazmatycznej, pozwala na modulowanie inotropizmu sercowego przez NO, za pośrednictwem regulacji β -adrenergicznej. Natomiast izoforma nNOS umiejscowiona w SR może za pośrednictwem NO wpływać na receptor RyR2 [14]. Z kolei zwiększona aktywność iNOS została stwierdzona w komórkach wsierdca, śródbłonku naczyń mięśni gładkich oraz fibroblastach [5,70].

Wzrost stężenia NO powyżej 1 μM , umożliwi reakcję tej cząsteczki z O_2 i O_2^- , w wyniku czego, dochodzi do powstania kolejnych RNS – odpowiednio N_2O_3 oraz silnie toksycznego nadtlenuazotynu – ONOO^- (ryc. 2). Utworzone RNS są odpowiedzialne za reakcje utleniania, nitrozowania oraz nitrowania amin, grup tiolowych i hydroksyarymatycznych oraz związków zawierających tyrozynę. Na przykład aktywacja receptora rianodynowego przebiega dzięki odwracalnemu nitrozylowaniu dwunastu spośród 84 cystein w cząsteczce białka tego receptora [71]. Ponadto duże stężenie endogennego NO w komórkach kardiomiocytów osłabia wrażliwość miofilamentów na Ca^{2+} , czemu towarzyszy osłabienie podstawowej kurczliwości w izolowanych sercach po reperfuzji u myszy [22].

Doksorubicyna i jej 7-hydroksy aglikonowy metabolit zmienia mitochondrialną równowagę wapnia zarówno *in vitro* [58,62], jak *in vivo* [63,64]. Zaburzenia równowagi wapnia w mitochondriach są wynikiem selektywnej aktywacji kanału wapniowego (wrażliwego na cyklosporynę A), uwalniającego wapń z mitochondriów [62,65]. Inhibitor wychwytu jonów wapnia przez mitochondria – czerwień

rutenu oraz cyklosporyna A, zapobiegały nieodwracalnym uszkodzeniom kardiomiocytów wywołanych przez DOX [13,63]. Wskazuje to na bezpośredni związek między zaburzeniami mitochondrialnej równowagi wapnia a kardiotoxycznością DOX [73].

Nadtlenoazotyn może w sposób istotny hamować aktywność mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej (MnSOD; EC 1.15.1.1) w wyniku nitrowania tyrozyny 34 odgrywającej kluczową rolę w aktywności tego enzymu [57]. Zahamowanie przemiany O_2^- do H_2O_2 , w następstwie obniżenia sprawności katalitycznej MnSOD, prowadzi do wzrostu stężenia O_2^- do poziomu, przy którym jest możliwa reakcja z NO, a której produktem jest ONOO^- . Ta cykliczna kaskada przemian w czasie długotrwałego podawania DOX może w konsekwencji prowadzić do załamania mitochondrialnego metabolizmu energetycznego przez hamowanie glikolizy i obniżenie puli ATP. Wskutek tego dochodzi do otwarcia porów mitochondrialnych, uwalniania cytochromu c, aktywacji kaspazy i w konsekwencji do apoptozy [10,73].

Najnowsze badania potwierdzają udział ROS w zaburzeniach kurczliwości kardiomiocyty, sugerując związek między stresem oksydacyjnym, a szlakiem sygnałowym zależnym od p38 kinazy MAP (mitogen activated protein kinase) [69].

ZABURZENIA HOMEOSTAZY ŻELAZA

Funkcja żelaza w organizmie jest niemal wyłącznie związana z procesami oddychania komórkowego. Żelazo jest gromadzone w komórce w trzech frakcjach. Prawie 70% całkowitej zawartości żelaza w organizmie występuje we frakcji stabilnej, w której pierwiastek ten jest połączony trwałymi wiązaniami z układem porfiryńowym (mioglobina, cytochromy, katalaza i inne). Ponad 15% żelaza występuje we frakcji labilnej połączonej słabymi wiązaniami, z takimi białkami jak: ferrytyna, hemosyderyna, żelazo-flawoproteiny (dehydrogenaza, zredukowany NAD, dehydrogenaza bursztynianowa), białka siarkowo-żelazowe łańcucha oddechowego oraz cytoplazmatyczne. Jest to pula, z której żelazo jest uwalniane do frakcji wolnej. Mimo że żelazo frakcji wolnej stanowi niewielką część całkowitej puli żelaza komórkowego, jego stężenie musi być ściśle kontrolowane. Wzrost stężenia wolnego żelaza w komórce inicjuje reakcje Fentona, których produktami są wolne rodniki tlenowe uszkadzające proteiny, lipidy i kwasy nukleinowe [25]. Istotną rolę w regulacji komórkowej homeostazy żelaza odgrywa drugorzędowa struktura mRNA ferrytyny i receptora transferynowego. Transferyna jest białkiem osoczkowym (β -globuliną) pełniącym funkcje transportowe i połączonym nietrwałymi wiązaniami z żelazem. Po połączeniu ze swoistym receptorem, transferyna uwalnia żelazo do komórki, gdzie zostaje ono zdeponowane w białku magazynowym – ferrytynie. Jedna cząsteczka ferrytyny jest zdolna do związania 2400 atomów żelaza. Podwyższenie stężenia żelaza w osoczu, powoduje nasilenie syntezy ferrytyny, co z kolei prowadzi do zwiększenia wewnątrzkomórkowych depozytów żelaza. Regulacja tego procesu odbywa się na poziomie potranskrypcyjnym. mRNA ferrytyny, w swojej drugorzędowej strukturze, ma fragment IRE (iron-response element), zdolny do wiązania z proteiną siarkowo-żelazową IRE-BP (iron-response ele-

ment-binding protein), hamującą inicjację procesu translacji. Jeżeli stężenie wolnego żelaza wzrasta, IRE-BP wiąże się z żelazem tworząc w swej strukturze klastr 4Fe-4S, przez co traci zdolność do łączenia się z fragmentem IRE. W ten sposób dochodzi do zainicjowania procesu translacji, a w następstwie wzrostu syntezy ferrytyny i wiązania nadmiaru żelaza.

mRNA receptora transferynowego ma kilka fragmentów IRE wiążących się z IRE-BP. Przy wzroście stężenia wolnego żelaza w komórce, IRE-BP jest odłączany od mRNA, co inicjuje proces degradacji mRNA receptora transferynowego. A zatem wzrost stężenia żelaza w komórce prowadzi w konsekwencji do zmniejszenia syntezy białka receptora transferynowego, co stanowi obronę przed toksycznymi skutkami wzrostu stężenia żelaza. Badania ujawniły, że IRE-BP jest w rzeczywistości postacią enzymu cytosolowego, znanym dotychczas jako akonitaza mająca w centrum aktywnym klastry siarkowo-żelazowe [6]. Warto podkreślić, że akonitaza (IRE-BP) oprócz wpływu na syntezę ferrytyny i receptora transferynowego, może regulować ekspresję mRNA innych enzymów ściśle związanych z gospodarką żelaza [11].

Badania wpływu antracyklin na mechanizmy odpowiedzialne za homeostazę żelaza komórkowego ujawniły, że wzrost stężenia H_2O_2 i O_2^- spowodowany przez DOX prowadzi do uwolnieniem atomu żelaza z klastru [4Fe-4S] centrum aktywnego akonitazy, w wyniku czego powstaje białko z konformacją [3Fe-4S], będąca *de facto* IRE-BP [9]. Podobne, ale znacznie silniejsze działanie w porównaniu z H_2O_2 i O_2^- wykazuje alkoholowy metabolit antracyklin (z grupą hydroksylową przy węglu 13).

Konsekwencje przemiany [4Fe-4S] w [3Fe-4S] są bardziej złożone, niż by to wynikało z samego zahamowania aktywności akonitazy, enzymu katalizującego reakcje izomerizacji cytrynianu do izocytrynianu. Obecność konformacji [3Fe-4S] osłabia aktywność transkrypcyjną ferrytyny oraz stabilizuje mRNA receptora transferynowego. Minotti i wsp. [43–46] wykazali, że DOX zmniejsza syntezę ferrytyny przy jednoczesnym wzroście syntezy receptora transferynowego. Mechanizm ten może odpowiadać za wzrost poziomu niezwiązanej frakcji żelaza komórkowego i nasilenie kardiotoksycznych efektów DOX. Potwierdzają to badania Kotamraju i wsp. [37], którzy wykazali, że chelatory mające zdolność przechodzenia przez błonę komórkową oraz przeciwciała skierowane przeciwko receptorowi transferynowemu zapobiegały apoptozie indukowanej przez DOX.

Opisany mechanizm może mieć znaczenie w kardiotoksyczności antracyklinowej w przypadku przedłużonego działa-

nia DOX, ponieważ skutki niedoboru ferrytyny i zwiększonego wytwarzania receptora transferynowego ujawniają się w dłuższym czasie. Jednak apoptoza kardiomiocytu pod wpływem DOX zachodzi stosunkowo szybko [3]. Dlatego wydaje się, że mechanizm związany z regulacją mRNA ferrytyny i receptora transferynowego nie może być najważniejszym mechanizmem we wczesnej toksyczności DOX. W związku z tym należy podejrzewać inne zjawiska zachodzące w krótkim czasie od zastosowania DOX, które prowadziły do zmian we frakcji wolnego żelaza. Badania *in vitro* sugerują, że powstawanie semichinonowej formy DOX oraz O_2^- , zachodzi z jednoczesnym uwalnianiem żelaza z ferrytyny [42,43]. W innych badaniach przeprowadzonych na kardiomiocytach po inkubacji z transferyną zaobserwowano wbudowywanie bardzo dużej ilości żelaza pochodzącego z transferyny do ferrytyny. Następnie w ciągu kilku godzin żelazo związane z ferrytyną było z niej uwalniane [39]. Prawdopodobnie proces ten jest uwarunkowany obecnością naturalnych związków redukujących, takich jak witamina C, czy cysteina. Jednak, gdy kardiomiocyty były ekspozowane na transferynę w obecności DOX, to pomimo nasilenia wbudowywania żelaza do ferrytyny w pierwszej fazie doświadczenia, DOX hamowała uwalnianie żelaza z tego białka zachodzące w kolejnym etapie. Wyniki powyższych doświadczeń nie wyjaśniają jednak w sposób definitywny podłoża ostrej kardiotoksyczności antracyklinowej.

Stwierdzono również, że antracykliny zmieniają równowagę żelaza poprzez działanie $HO\cdot$ i $ONOO^-$. Badania *in vitro* przeprowadzone przez Cairo i wsp. [12] wykazały, że $ONOO^-$ usuwa żelazo z klastru katalitycznego 4Fe-4S akonitazy, przeobrażając enzym w wolny od klastru IRE-BP ze wszystkimi tego konsekwencjami. Ponadto $ONOO^-$ prawdopodobnie uczestniczy w przeladowaniu komórki żelazem wywołanym przez antracykliny, zwiększając wybuch tlenowy. Wywołana przez DOX synteza ROS zwiększa ekspresję receptora transferynowego, co w konsekwencji prowadzi do nasilenia wychwytu żelaza i indukcji apoptozy w komórkach śródbłonna naczyń [37]. $ONOO^-$ może także hamować akonitazę mitochondrialną, co znacznie upośledza oddychanie zachodzące w tych organellach [27].

Na gruncie hipotezy wolnorodnikowej można wyjaśnić wiele zagadnień związanych z kardiotoksycznością wczesną, jednak rola reaktywnych form tlenu w kardiotoksyczności przewlekłej pozostaje sprawą otwartą. Pewne światło na ten problem rzuciły badania Zhou i wsp. [73], którzy wykazali, że DOX indukuje stres oksydacyjny w kardiomiocycie nawet do 5 tygodni od ostatniego podania leku. Sugeruje to możliwy udział ROS w kumulacyjnej i nieodwracalnej kardiotoksyczności obserwowanej u ludzi po podaniu DOX.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Abramson J.J., Salama G.: Sulfhydryl oxidation and Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biochem.*, 1988; 82: 81–84
- [2] Arai M., Tomaru K., Takizawa T., Sekiguchi K., Yokoyama T., Suzuki T., Nagai R.: Sarcoplasmic reticulum genes are selectively down-regulated in cardiomyopathy produced by doxorubicin in rabbits. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1998; 30: 243–254
- [3] Arola O.J., Saraste A., Pulkki K., Kallajoki M., Parvinen M., Voipio-Pulkki L.M.: Acute doxorubicin cardiotoxicity involves cardiomyocyte apoptosis. *Cancer. Res.*, 2000; 60: 1789–1792
- [4] Bachur N.R., Gordon S.L., Gee M.V., Kon H.: NADPH cytochrome P-450 reductase activation of quinone anticancer agents to free radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979; 76: 954–957

- [5] Balligand J.L., Cannon P.J.: Nitric oxide synthases and cardiac muscle. Autocrine and paracrine influences. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1997; 17: 1846–1858
- [6] Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L.: *The Control of Gen Expression*. W: *Biochemistry*, red.: N.D. Clarke. W.H. Freeman and Company New York, 2002, 888–889
- [7] Bernardini N., Giannesi F., Bianchi F., Dolfi A., Lupetti M., Zaccaro L., Malvaldi G., Del Tacca M.: Comparative activity of doxorubicin and its major metabolite, doxorubicinol, on V79/AP4 fibroblasts: a morphofunctional study. *Exp. Mol. Pathol.*, 1991; 55: 238–250
- [8] Boucek R.J. Jr., Dodd D.A., Atkinson J.B., Oquist N., Olson R.D.: Contractile failure in chronic doxorubicin-induced cardiomyopathy. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1997; 29: 2631–2640
- [9] Brazzolotto X., Gaillard J., Pantopoulos K., Hentze M.W., Moulis J.M.: Human cytoplasmic aconitase (Iron regulatory protein 1) is converted into its [3Fe-4S] form by hydrogen peroxide *in vitro* but is not activated for iron-responsive element binding. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 21625–21630
- [10] Brown G.C., Borutaite V.: Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free. Radic. Biol. Med.*, 2002; 33: 1440–1450
- [11] Cairo G., Pietrangelo A.: Iron regulatory proteins in pathobiology. *Biochem. J.*, 2000; 352: 241–250
- [12] Cairo G., Ronchi R., Recalcati S., Campanella A., Minotti G.: Nitric oxide and peroxynitrite activate the iron regulatory protein-1 of J774A.1 macrophages by direct disassembly of the Fe-S cluster of cytoplasmic aconitase. *Biochemistry*, 2002; 41: 7435–7442
- [13] Chacon E., Acosta D.: Mitochondrial regulation of superoxide by Ca²⁺: an alternate mechanism for the cardiotoxicity of doxorubicin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1991; 107: 117–128
- [14] Champion H.C., Skaf M.W., Hare J.M.: Role of nitric oxide in the pathophysiology of heart failure. *Heart Fail. Rev.*, 2003; 8: 35–46
- [15] Cheeseman K.H., Slater T.F.: An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.*, 1993; 49: 481–493
- [16] De Beer E.L., Bottone A.E., Voest E.E.: Doxorubicin and mechanical performance of cardiac trabeculae after acute and chronic treatment: a review. *Eur. J. Pharmacol.*, 2001; 415: 1–11
- [17] de Jong J., Schoofs P.R., Onderwater R.C., van der Vijgh W.J., Pinedo H.M., Bast A.: Isolated mouse atrium as a model to study anthracycline cardiotoxicity: the role of the beta-adrenoceptor system and reactive oxygen species. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 1990; 68: 275–289
- [18] de Wildt D.J., de Jong Y., Hillen F.C., Steerenberg P.A., van Hoeseel Q.G.: Cardiovascular effects of doxorubicin-induced toxicity in the intact Lou/M Wsl rat and in isolated heart preparations. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1985; 235: 234–240
- [19] Dodd D.A., Atkinson J.B., Olson R.D., Buck S., Cusack B.J., Fleischer S., Boucek R.J. Jr.: Doxorubicin cardiomyopathy is associated with a decrease in calcium release channel of the sarcoplasmic reticulum in a chronic rabbit model. *J. Clin. Invest.*, 1993; 91: 1697–1705
- [20] Doroshov J.H.: Anthracycline antibiotic-stimulated superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical production by NADH dehydrogenase. *Cancer. Res.*, 1983; 43: 4543–4551
- [21] Doroshov J.H.: Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. *Cancer Res.*, 1983; 43: 460–472
- [22] Fogli S., Nieri P., Breschi M.C.: The role of nitric oxide in anthracycline toxicity and prospects for pharmacologic prevention of cardiac damage. *FASEB J.*, 2004; 18: 664–675
- [23] Garner A.P., Paine M.J., Rodriguez-Crespo I., Chinje E.C., Ortiz De Montellano P., Stratford I.J., Tew D.G., Wolf C.R.: Nitric oxide synthases catalyze the activation of redox cycling and bioreductive anticancer agents. *Cancer Res.*, 1999; 59: 1929–1934
- [24] Grenier M.A., Lipshultz S.E.: Epidemiology of anthracycline cardiotoxicity in children and adults. *Semin. Oncol.*, 1998; 25(4 Suppl.10): 72–85
- [25] Guyton A.M., Hall J.E.: *Red Blood Cells, Anemia, and Polycythemia*. W: *Medical Physiology*, red. P. Faber. W.B. Saunders Company. An Imprint of Elsevier Science, Philadelphia Londyn New York ST. Luis Sydney Toronto, 2000, 387, 388
- [26] Halili-Rutman I., Hershko C., Link G., Rutman A.J., Shainberg A.: Inhibition of calcium accumulation by the sarcoplasmic reticulum: a putative mechanism for the cardiotoxicity of adriamycin. *Biochem. Pharmacol.*, 1997; 54: 211–214
- [27] Hausladen A., Fridovich I.: Superoxide and peroxynitrite inactivate aconitases, but nitric oxide does not. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 29405–29408
- [28] Hess M.L., Okabe E., Ash P., Kontos H.A.: Free radical mediation of the effects of acidosis on calcium transport by cardiac sarcoplasmic reticulum in whole heart homogenates. *Cardiovasc. Res.*, 1984; 18: 149–157
- [29] Hilker R., Zaidi N., Shome K., Nigam M., Lagenaur C., Salama G.: Properties of immunoaffinity purified 106-kDa Ca²⁺ release channels from the skeletal sarcoplasmic reticulum. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1992; 292: 1–15
- [30] Hofling B., Bolte H.D.: Acute negative inotropic effect of adriamycin (doxorubicin). *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 1981; 317: 252–256
- [31] Jensen R.A.: Doxorubicin cardiotoxicity: contractile changes after long-term treatment in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1986; 236: 197–203
- [32] Kalyanaram B., Perez-Reyes E., Mason R.P.: Spin-trapping and direct electron spin resonance investigations of the redox metabolism of quinone anticancer drugs. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1980; 630: 119–130
- [33] Kawakami M., Okabe E.: Superoxide anion radical-triggered Ca²⁺ release from cardiac sarcoplasmic reticulum through ryanodine receptor Ca²⁺ channel. *Mol. Pharmacol.*, 1998; 53: 497–503
- [34] Kim D.H., Akera T., Brody T.M.: Inotropic actions of doxorubicin in isolated guinea-pig atria: evidence for lack of involvement of Na⁺, K⁺-adenosine triphosphatase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1980; 214: 368–374
- [35] Kim D.H., Landry A.B. III, Lee Y.S., Katz A.M.: Doxorubicin-induced calcium release from cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1989; 21: 433–436
- [36] Komiyama T., Kikuchi T., Sugiura Y.: Interactions of anticancer quinone drugs, aclacinomycin A, adriamycin, carbazilquinone, and mitomycin C, with NADPH-cytochrome P-450 reductase, xanthine oxidase and oxygen. *J. Pharmacobiodyn.*, 1986; 9: 651–664
- [37] Kotamraju S., Chitambar C.R., Kalivendi S.V., Joseph J., Kalyanaram B.: Transferrin receptor-dependent iron uptake is responsible for doxorubicin-mediated apoptosis in endothelial cells: role of oxidant-induced iron signaling in apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 17179–17187
- [38] Kukreja R.C., Hess M.L.: The oxygen free radical system: from equations through membrane-protein interactions to cardiovascular injury and protection. *Cardiovasc. Res.*, 1992; 26: 641–655
- [39] Kwok J.C., Richardson D.R.: Anthracyclines induce accumulation of iron in ferritin in myocardial and neoplastic cells: inhibition of the ferritin iron mobilization pathway. *Mol. Pharmacol.*, 2003; 63: 849–861
- [40] Meissner G.: NADH, a new player in the cardiac ryanodine receptor? *Circ. Res.*, 2004; 94: 478–486
- [41] Meissner G.: Regulation of mammalian ryanodine receptors. *Front. Biosci.*, 2002; 7: d2072–d2080
- [42] Minotti G.: Sources and role of iron in lipid peroxidation. *Chem. Res. Toxicol.*, 1993; 6: 134–146
- [43] Minotti G., Cairo G., Monti E.: Role of iron in anthracycline cardiotoxicity: new tunes for an old song? *FASEB J.*, 1999; 13: 199–212
- [44] Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., Gianni L.: Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.*, 2004; 56: 185–229
- [45] Minotti G., Recalcati S., Mordente A., Liberi G., Calafiore A.M., Mancuso C., Preziosi P., Cairo G.: The secondary alcohol metabolite of doxorubicin irreversibly inactivates aconitase/iron regulatory protein-1 in cytosolic fractions from human myocardium. *FASEB J.*, 1998; 12: 541–552
- [46] Minotti G., Ronchi R., Salvatorelli E., Menna P., Cairo G.: Doxorubicin irreversibly inactivates iron regulatory proteins 1 and 2 in cardiomyocytes: evidence for distinct metabolic pathways and implications for iron-mediated cardiotoxicity of antitumor therapy. *Cancer Res.*, 2001; 61: 8422–8428
- [47] Mordente A., Minotti G., Martorana G.E., Silvestrini A., Giardina B., Meucci E.: Anthracycline secondary alcohol metabolite formation in human or rabbit heart: biochemical aspects and pharmacologic implications. *Biochem. Pharmacol.*, 2003; 66: 989–998
- [48] Nohl H., Gille L., Staniek K.: The exogenous NADH dehydrogenase of heart mitochondria is the key enzyme responsible for selective cardiotoxicity of anthracyclines. *Z. Naturforsch [C]*, 1998; 53: 279–285
- [49] Okabe E., Hess M.L., Oyama M., Ito H.: Characterization of free radical-mediated damage of canine cardiac sarcoplasmic reticulum. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1983; 225: 164–177
- [50] Olson H.M., Young D.M., Prieur D.J., LeRoy A.F., Reagan R.L.: Electrolyte and morphologic alterations of myocardium in adriamycin-treated rabbits. *Am. J. Pathol.*, 1974; 77: 439–454

- [51] Olson R.D., Li X., Palade P., Shadle S.E., Mushlin P.S., Gambliel H.A., Fill M., Boucek R.J. Jr, Cusack B.J.: Sarcoplasmic reticulum calcium release is stimulated and inhibited by daunorubicin and daunorubicinol. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2000; 169: 168–176
- [52] Olson R.D., Mushlin P.S.: Doxorubicin cardiotoxicity: analysis of prevailing hypotheses. *FASEB J.*, 1990; 4: 3076–3086
- [53] Opie L.H.: Cardiac metabolism – emergence, decline, and resurgence. Part II. *Cardiovasc. Res.*, 1992; 26: 817–830
- [54] Pawlowska J., Tarasiuk J., Wolf C.R., Paine M.J., Borowski E.: Differential ability of cytostatics from anthraquinone group to generate free radicals in three enzymatic systems: NADH dehydrogenase, NADPH cytochrome P450 reductase, and xanthine oxidase. *Oncol. Res.*, 2003; 13: 245–252
- [55] Pessah I.N., Kim K.H., Feng W.: Redox sensing properties of the ryanodine receptor complex. *Front. Biosci.*, 2002; 7: a72–a79
- [56] Rabkin S.W., Otten M., Polimeni P.L.: Increased mortality with cardiotoxic doses of Adriamycin after verapamil pretreatment despite prevention of myocardial calcium accumulation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1983; 61: 1050–1056
- [57] Radi R., Cassina A., Hodara R., Quijano C., Castro L.: Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.*, 2002; 33: 1451–1464
- [58] Revis N.W., Marusic N.: Effects of doxorubicin and its aglycone metabolite on calcium sequestration by rabbit heart, liver, and kidney mitochondria. *Life Sci.*, 1979; 25: 1055–1063
- [59] Robison T.W., Giri S.N.: Effects of chronic administration of doxorubicin on plasma levels of prostaglandins, thromboxane B2, and fatty acids in rats. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1987; 19: 213–220
- [60] Singal P.K., Deally C.M., Weinberg L.E.: Subcellular effects of adriamycin in the heart: a concise review. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1987; 19: 817–828
- [61] Singal P.K., Iliskovic N., Li T., Kumar D.: Adriamycin cardiomyopathy: pathophysiology and prevention. *FASEB J.*, 1997; 11: 931–936
- [62] Sokolove P.M., Shinaberry R.G.: Na⁺-independent release of Ca²⁺ from rat heart mitochondria. Induction by adriamycin aglycone. *Biochem. Pharmacol.*, 1988; 37: 803–812
- [63] Solem L.E., Heller L.J., Wallace K.B.: Dose-dependent increase in sensitivity to calcium-induced mitochondrial dysfunction and cardiomyocyte cell injury by doxorubicin. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1996; 28: 1023–1032
- [64] Solem L.E., Henry T.R., Wallace K.B.: Disruption of mitochondrial calcium homeostasis following chronic doxorubicin administration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1994; 129: 214–222
- [65] Solem L.E., Wallace K.B.: Selective activation of the sodium-independent, cyclosporin A-sensitive calcium pore of cardiac mitochondria by doxorubicin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1993; 121: 50–57
- [66] Temma K., Akera T., Chugun A., Ohashi M., Yabuki M., Kondo H.: Doxorubicin: an antagonist of muscarinic receptors in guinea pig heart. *Eur. J. Pharmacol.*, 1992; 220: 63–69
- [67] Thornalley P.J., Dodd N.J.: Free radical production from normal and adriamycin-treated rat cardiac sarcosomes. *Biochem. Pharmacol.*, 1985; 34: 669–674
- [68] van Boxtel C.J., Olson R.D., Boerth R.C., Oates J.A.: Doxorubicin: inotropic effects and inhibitory action on ouabain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1978; 207: 277–283
- [69] Wold L.E., Aberle N.S. II, Ren J.: Doxorubicin induces cardiomyocyte dysfunction via a p38 MAP kinase-dependent oxidative stress mechanism. *Cancer Detect. Prev.*, 2005; 29: 294–299
- [70] Xu K.Y., Huso D.L., Dawson T.M., Bredt D.S., Becker L.C.: Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999; 96: 657–662
- [71] Xu L., Eu J.P., Meissner G., Stamlor J.S.: Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science*, 1998; 279: 234–237
- [72] Zaidi N.F., Lagenaur C.F., Abramson J.J., Pessah I., Salama G.: Reactive disulfides trigger Ca²⁺ release from sarcoplasmic reticulum via an oxidation reaction. *J. Biol. Chem.*, 1989; 264: 21725–21736
- [73] Zhou S., Starkov A., Froberg M.K., Leino R.L., Wallace K.B.: Cumulative and irreversible cardiac mitochondrial dysfunction induced by doxorubicin. *Cancer Res.*, 2001; 61: 771–777
- [74] Zorzato F., Salviati G., Facchinetti T., Volpe P.: Doxorubicin induces calcium release from terminal cisternae of skeletal muscle. A study on isolated sarcoplasmic reticulum and chemically skinned fibers. *J. Biol. Chem.*, 1985; 260: 7349–7355
- [75] Zweier J.L., Gianni L., Muindi J., Myers C.E.: Differences in O₂ reduction by the iron complexes of adriamycin and daunomycin: the importance of the sidechain hydroxyl group. *Biochim. Biophys. Acta*, 1986; 884: 326–336