

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI
KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

NOVÉ INHIBITORY TOPOISOMERASY II – STUDIE
ANTIPROLIFERAČNÍCH ÚČINKŮ A Vlivu NA
PROTINÁDOROVOU AKTIVITU ETOPOSIDU

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. PharmDr. Tomáš Šimůnek, PhD.
Konzultant: Mgr. Jan Kubeš

Hradec Králové, 2021

Lenka Ohnemichlová

Poděkování

Za vedení mé diplomové práce, cenné připomínky, čas a ochotu děkuji svému školiteli prof. PharmDr. Tomáši Šimůnkovi, PhD. Ráda bych také poděkovala i Mgr. Janu Kubešovi jako konzultantovi za skvělý přístup, vstřícnost a ochotu poskytovanou při vypracování mé diplomové práce. Rovněž bych chtěla poděkovat zaměstnancům a studentům z Katedry biochemických věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Dále bych chtěla poděkovat za finanční podporu Grantové agentury České republiky (grant GAČR reg. č.18-08169S) a Grantové agentury Univerzity Karlovy (GAUK reg. č. 246219). V neposlední řadě chci poděkovat své rodině a přátelům za vytvoření vhodných studijních podmínek a za poskytovanou podporu během celého studia.

Prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Hradec Králové, 2021

Lenka Ohnemichlová

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Lenka Ohnemichlová

Školitel: prof. PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D.

Název diplomové práce: Nové inhibitory topoisomerasy II – studie antiproliferačních účinků a vlivu na protinádorovou aktivitu etoposidu

Rakovina je závažným celospolečenským problémem, který se může týkat každého z nás, její výskyt se navíc výrazně zvyšuje s věkem. Antracyklinová antibiotika (ANT) představují mimořádně účinné léky, pomocí nichž se léčila a stále léčí celá řada rakovinných onemocnění. Mají multimodální mechanismus účinku, přičemž jedním z mechanismů je inhibice topoisomerasy 2 (TOP2), základního buněčného enzymu modulujícího topologii DNA. V současné době je užití ANT limitováno kvůli obavám plynoucím z výskytu kardiotoxicity.

Etoposid (ETO) je protinádorová látka působící jako topoisomerasový jed. Často je využíván v léčbě v kombinaci společně s ANT, není však na rozdíl od antracyklinů považovaný za významně kardiotoxický. Proti kardiotoxicitě ANT působí dexrazoxan (DEX), také známý jako ICRF-187, jako jediné dosud schválené kardioprotektivum. Nepůsobí však jako chelátor iontů železa, nýbrž prostřednictvím ovlivnění TOP2. Ačkoliv se DEX potvrdil jako velmi účinná kardioprotektivní látka, má i své nevýhody, především bývá spojován s výskytem sekundárních malignit.

Z tohoto důvodu je nutné prozkoumat i jiné látky. Cílem práce bylo zjistit, zda další inhibitory jako jsou BNS-22, XK-469, ICRF-193 mohou ovlivnit protinádorové působení ETO na buněčnou linii HL-60. U zkoumaných látek byla určena koncentrace odpovídající jejich IC_{50} a na základě této koncentrace byla hodnocena jejich antiproliferační účinnost jak samostatně, tak v kombinaci s ETO. Ke stanovení buněčné viability byl využit kolorimetrický test MTT. Výsledky ukazují, že žádná z testovaných látek významně nesnižuje protinádorový účinek ETO na buňkách HL-60. ICRF-187 a ICRF-193 naopak vykazují synergistický efekt v kombinaci s ETO. U BNS-22 a XK-469 lze pozorovat synergistický efekt v koncentraci okolo IC_{50} , ovšem mimo koncentraci IC_{50} působí spíše antagonisticky.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Lenka Ohnemichlová

Supervisor: prof. PharmDr. Tomáš Šimůnek, PhD.

Title of diploma thesis: New inhibitors of topoisomerase II – study of antiproliferative effects and influence on antitumor activity of etoposide

Cancer is a serious societal health problem, which can affect each of us, and its incidence increases rapidly with age. Anthracycline antibiotics (ANT) are extremely effective drugs that have been used to treat a number of cancers. They have a multimodal mechanism of action, one of them being the inhibition of topoisomerase 2 (TOP2), an essential cellular enzyme modulating DNA topology. Currently, use of ANTs is limited due to concerns about the occurrence of cardiotoxicity.

Etoposide (ETO) is an antitumor agent that acts as topoisomerase poison. ETO is often used in combination therapy with ANTs, but it is not considered significantly cardiotoxic. Dexrazoxane (DEX) is the only approved cardioprotectant against cardiotoxicity of ANTs. However, it does not act as chelating agent, as previously thought, but through inhibition of TOP2. Although DEX has been shown to be a very potent cardioprotectant, it also has its disadvantages. DEX has been associated with the occurrence of secondary malignancies.

The aim of the study was to determine whether other inhibitors of TOP2, namely (BNS-22, XK-469, ICRF-193) affect antiproliferative effect of ETO on the HL-60 leukemic cell line. For the tested agents, concentrations corresponding with their IC_{50} were determined and on the basis of this concentration their antiproliferative effects were evaluated both alone and in combination with ETO. For determination of cell viability, MTT assay was used. According to our results none of the tested substances significantly reduced the antitumor effect of ETO on HL-60 cells. On the contrary, ICRF-187 and ICRF-193 in combination with ETO showed a synergistic effect. BNS-22 and XK-469 also showed synergistic effect, but only in concentration around the IC_{50} , in other concentrations they seemed to be rather antagonistic.

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Současný stav řešené problematiky	9
2.1 Význam topoisomerasy.....	9
2.2 Využití topoisomerasy v protinádorové terapii.....	10
2.3 Klasifikace topoisomerasy	11
2.3.1 Topoisomerasa 2	11
2.4 Inhibitory topoisomerasy 2	14
2.4.1 Deriváty podofylotoxinu	16
2.4.2 Antracyklinová antibiotika.....	22
2.4.3 Katalytické inhibitory.....	24
3. Cíle práce	29
4. Metodika	30
4.1. Materiály a technické vybavení	30
4.1.1 Buněčná linie.....	30
4.1.2 Reagencie a chemikálie.....	30
4.1.3 Přístrojové vybavení.....	30
4.1.4 Laboratorní příslušenství.....	31
4.2 Pracovní postupy.....	31
4.2.1 Kultivace	31
4.2.2 Pasážování.....	31
4.2.3 Studie proliferačních účinků	32
4.2.4 Zpracování naměřených dat	34
5. Výsledky	35
5.1 Stanovení hodnot IC_{50} jednotlivých látek	35
5.1.1 Stanovení hodnoty IC_{50} ETO	35
5.1.2 Stanovení hodnoty IC_{50} DEX	36
5.1.3 Stanovení hodnoty IC_{50} BNS-22	37

5.1.4 Stanovení hodnoty IC_{50} XK-469	38
5.1.5 Stanovení hodnoty IC_{50} ICRF-193	39
5.2 Stanovení vlivu katalytických inhibitorů TOP2 na antiproliferační účinek ETO	40
5.2.1 Stanovení vlivu DEX na antiproliferační účinek ETO.....	40
5.2.2 Stanovení vlivu BNS-22 na koncentraci ETO	41
5.2.3 Stanovení vlivu XK-469 na koncentraci ETO	42
5.2.4 Stanovení vlivu ICRF-193 na koncentraci ETO	43
5.3 Stanovení hodnot kombinačních indexů	44
5.3.1 Stanovení CI kombinace ETO a DEX.....	44
5.3.2 Stanovení CI kombinace ETO a BNS-22.....	45
5.3.3 Stanovení CI kombinace ETO a XK-469.....	46
5.3.4 Stanovení CI kombinace ETO a ICRF-193.....	47
6. Diskuse.....	48
7. Závěr	53
8. Seznam zkratk	54
9. Literatura.....	56

1. Úvod

Vzhledem k celosvětově rapidně narůstající incidenci a mortalitě způsobené rakovinným onemocněním je nutné vyvíjet nové efektivní protinádorové látky a zkoumat nové přístupy k léčbě. K důležitým cílům působení protinádorových léčiv patří i topoisomerasy, enzymy katalyzující DNA procesy jako jsou replikace, proliferace, chromosomová segregace a kondenzace a topologické změny (Baldwin & Osheroff, 2005).

Katalytické inhibitory TOP2 by mohly potenciálně vést ke zkvalitnění terapie a možnému snížení či alespoň oddálení nežádoucích účinků na základě snížení podávané dávky protinádorových léčiv.

ETO je často využívanou látkou v kombinační terapii společně s ANT. Na rozdíl od nich však není v běžně podávaných klinických dávkách kardiotoxický.

DEX je zatím jediné prokázané kardioprotektivum proti kardiotoxicitě ANT. Panuje však obava poukazující na možné ovlivnění protinádorové aktivity skrze jeho katalytickou inhibici na TOP2 a potenciální kompetici na enzymu TOP2.

Tato práce je zaměřena na ovlivnění protinádorové aktivity modelového topoisomerasového jedu a jeho kombinaci se čtyřmi námi zvolenými katalytickými inhibitory. Zároveň je tato práce součástí širšího výzkumu zabývajícího se ovlivněním protinádorové aktivity léčiv a kardiotoxicitou ANT.

2. Současný stav řešené problematiky

2.1 Význam topoisomerasy

Během buněčného života musí být zachována integrita a organizovanost chromosomální DNA. Bohužel celá řada základních a nepostradatelných buněčných procesů může mít zcela opačný efekt. Replikace dvou komplementárních řetězců anebo rekombinace mezi duplexy DNA mohou být příčinou tvorby chromosomálních uzlů a katenanů. Pokud nedojde k vyřešení těchto problémů, může dojít k poruchám regulace genové exprese a chromosomálním zlomům, což má závažné důsledky pro buněčné přežití (Corbett & Berger, 2004).

DNA topoisomerasy (TOP) jsou esenciální buněčné enzymy měnící topologii nadobrátek v důsledku separací řetězce vzniklých během procesu replikace a transkripce, přičemž jejich hlavním cílem je udržovat dvoušroubovici DNA rozpletenou kvůli stále probíhajícím enzymatickým procesům. Díky jejich schopnosti měnit topologii nadobrátek je tedy předcházeno procesům vedoucím k poklesu buněčné viability.

Všechny TOP tvoří přechodné zlomy řetězců DNA skrz transesterifikační mechanismus a následně řetězce opětovně spojují. Účastní se důležitých metabolických procesů jak v jaderném, tak i mitochondriálním genomu (Nitiss, 2009; Wang, 2002; Pommier a kol., 2016). Jejich úkolem je zajištění genomové integrity, která je naprosto klíčová pro správnou funkci buněk a stejně tak i pro jejich viabilitu.

Studium TOP je zásadní v řadě terapeuticky významných oblastí jako jsou onkologie, imunologické poruchy, onemocnění nervové soustavy a dále ve vývoji vysoce efektivních antibakteriálních a protinádorových léčiv selektivně cílících právě na enzym TOP. TOP jsou z hlediska mechanismu účinku značně kontroverzní enzymy, jelikož současně zajišťují a zároveň ohrožují genomovou integritu (Pommier a kol., 2010).

2.2 Využití topoisomerasy v protinádorové terapii

TOP jsou významným cílem působení mnohých protinádorových léčiv používaných v onkologické praxi. Některé z nejsilnějších protinádorových léčiv dosahují klinického efektu právě skrze tvorbu poruch v řetězci DNA (Wang, 2002).

Manipulací s enzymatickou aktivitou za účelem dosažení terapeutického efektu bývá dosaženo několika rozdílnými způsoby. Prvním způsobem je potlačení enzymové aktivity katalytickým inhibitorem. Druhým je ovlivnění enzymové aktivity skrze její aktivaci a následné přesměrování směrem k substrátu surogátu. Třetím je přeměna tohoto esenciálního enzymu v silný buněčný toxin, přičemž tento způsob bývá také označován jako otrava topoisomerasy (Chen a kol., 2013; Delgado a kol., 2018).

Katalytická inhibice TOP využívající potlačení enzymové aktivity zatím nemá v klinické praxi velké zastoupení. Možnou příčinou je vysoké zastoupení TOP v proliferujících rakovinných buňkách, přičemž jejich hodnota je v tak vysoké koncentraci, že se katalytické inhibitory ve výsledku ukazují jako pouze málo působící. Naopak vyšší koncentrace TOP v proliferujících nádorových buňkách je výhodná pro působení topoisomerasových jedů, vysoká koncentrace TOP v rakovinných buňkách totiž zajišťuje jejich silnější působení (Kreuzer & Cozzarelli, 1979; Delgado a kol., 2018).

Katalytické inhibitory schopné inhibice více typů lidské TOP (hTOP) najednou mohou být vyvinuty jako potenciálně velmi silná protinádorová léčiva. Vývoj enzymaticky aktivních modulátorů je založen především na dostatečném pochopení katalytického mechanismu působícího na enzym a na jeho strukturním uspořádání (Chen a kol., 2013; Champoux, 2001).

2.3 Klasifikace topoisomerasy

TOP jsou přítomné u eukaryotických organismů, eubakterií a archaeobakterií. TOP dělíme do dvou pomyslných kategorií, a to na typ TOPI a typ TOPII, přičemž obě kategorie se dále dělí na jednotlivé subtypy.

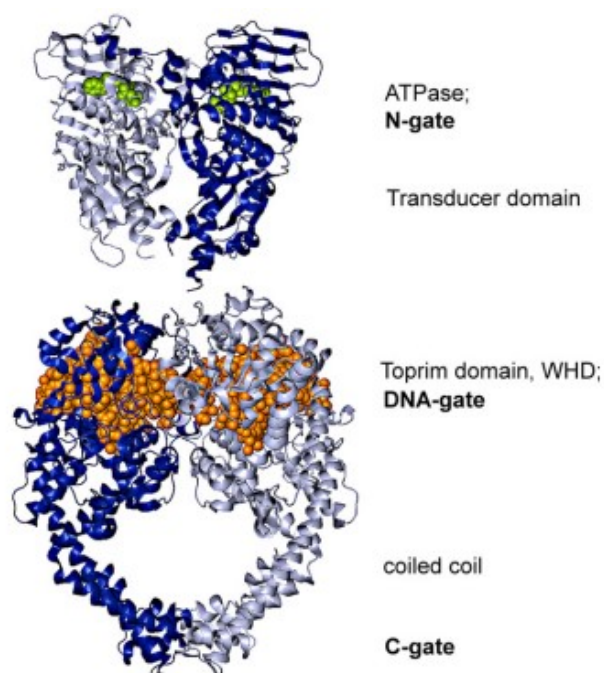
Typ TOPI řadíme mezi takzvaně monomerníky působící, katalyzující tvorbu jednořetězcových DNA zlomů. Typ TOPI se dělí na 3 další subtypy: subtyp IA, IB a IC. Pod subtyp IA patří bakteriální TOP a TOP III, pod subtyp IIB patří eukaryotická TOP, pod typ IC patří zatím jen TOPV nalezena v archaeální bakterii rodu *Methanopyrus*.

Oproti tomu typ TOPII naopak řadíme mezi multimericky působící, tvořící dvouřetězcové zlomy na molekule DNA. Pod typ TOPII patří topoisomerasa 2 (TOP2), DNA gyráza a TOP IV (Bailly, 2012; Chen a kol., 2013; Pommier, 2013; Pommier a kol., 2016; Austin a kol., 2018; Delgado a kol., 2018). Tato práce je zaměřena na působení TOP2.

2.3.1 Topoisomerasa 2

2.3.1.1 Strukturní uspořádání, funkce a exprese

TOP2 dále dělíme na dvě isoformy, isoformu TOP2 α a isoformu TOP2 β (Delgado a kol., 2018). Obě isoformy jsou homodimery a vykazují obdobné enzymatické vlastnosti (Pendleton a kol., 2015). Sdílí spolu značnou část sekvenční identity a mají podobné strukturní uspořádání. U všech TOP najdeme N-terminální ATP doménu, zlom spolu se znovunavázáním domény a C-terminální doménu (Austin a kol., 1995). Isoformy spolu sdílí přes 70 % sekvenční shody v pořadí aminokyselin. Nicméně procentuální rozdělení není shodné napříč celým enzymem, ale v jeho jednotlivých částech se liší.



Obr. 1 Struktura eukaryotické TOP2 (Vávrová & Šimůnek, 2012)

V N-terminální části, kde je ATP-vázací doména a příslušný zlom a jeho napojení, můžeme pozorovat shodnou sekvenční identitu zhruba ze 78 %, oproti tomu v C-terminální části sdílí pouze 34 % sekvenční identity.

Právě tyto sekvenční odlišnosti nacházející se v C-terminální doméně mohou hrát roli v odlišné aktivitě obou isoform *in vivo* a *in vitro*, a to jak v rámci exprese, tak v rámci buněčné funkce. Obě isoformy jsou kódovány geny na rozdílných chromosomech a mají i odlišnou molekulovou hmotnost (Drake a kol., 1987; Austin a kol., 2018).

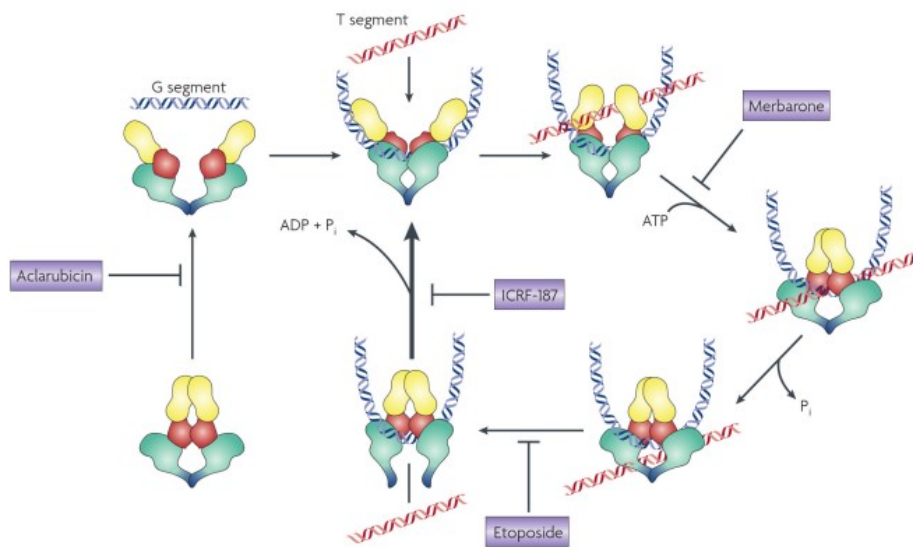
Všechna klinicky relevantní protinádorová léčiva cílící na TOP2 ovlivňují aktivitu obou isoform. Zatím nebylo identifikováno vazebné místo vedoucí ke specifickému účinku či jednoznačné preferenci vůči jedné isoformě (Deweese & Osheroff, 2009). Ačkoliv některá léčiva mohou vykazovat silnější efekt vůči jedné z isoform, v současné době neexistuje léčivo, které by plně cílilo pouze na jednu z isoform (Pendleton a kol., 2015).

TOP2 α se nachází ve vysokém množství především v proliferujících a nediferenciovaných buňkách, v již diferenciovaných buňkách prakticky není přítomna. Její výskyt je závislý na stádiu buněčného cyklu, přičemž dosahuje svého maxima v G₂/M fázi. Během proliferace buněk tedy můžeme nalézt zvýšené množství této isoformy. TOP α je úzce spojena s replikačním procesem, je velmi těsně navázána na

chromosom během mitózy. Právě tato isoforma je zapojena do procesu buněčného růstu, replikace anebo chromosomální kondenzace a segregace. U hTOP jsou tedy základní mitotické funkce vázány především na isoformu TOP2 α (Gonzalez a kol., 2011).

Oproti tomu TOP2 β se nachází v somatických buňkách v relativně ustálených hladinách během celého buněčného cyklu (Vejpongsa & Yeh, 2014; Dewese & Osheroff, 2009; Delgado a kol., 2018). Na rozdíl od předchozí isoformy ji lze nalézt i v buňkách kardiomyocytů, právě z tohoto důvodu je často spojována isoforma TOP2 β s výskytem kardiotoxicity (Yi a kol., 2007; Pendleton a kol., 2015). Vyskytuje se rovněž i v proliferujících nádorových buňkách, ale není zde tolik exprimována jako TOP2 α . Během mitózy se TOP2 β disociuje od chromosomů, tudíž zatímco TOP2 α hraje roli především v replikačních procesech, TOP2 β sehraává roli především v regulaci genové transkripce během diferenciace buněk. Během let se stále více potvrzuje význam TOP2 β v procesu buněčné transkripce a udržení integrity genomu, nicméně detailní molekulární mechanismus transkripční regulace tohoto enzymu stále není plně objasněný (Vejpongsa & Yeh, 2014; Dewese & Osheroff, 2009; Delgado a kol., 2018).

2.3.1.2 Katalytický cyklus TOP2



Obr. 2 Katalytický cyklus TOP2 (Nitiss, 2009)

Během katalytického cyklu prochází enzym řadou významných konformačních změn, jak můžeme pozorovat i na výše uvedeném obrázku. Katalytický cyklus TOP2 začíná vazbou enzymu na dva segmenty DNA, označené jako G-segment (gate segment, brána), v obrázku zaznačen modře, a T-segment (transfer segment, přechodový), v

obrázku zaznačen červeně. Během druhého kroku dochází k navázání dvou molekul ATP na ATP doménu nacházející se na N-terminální doméně, čímž dochází k dimerizaci obou domén a zachycení T-segmentu. Poté dochází v transesterifikační reakci za přítomnosti hořčnatých iontů k enzymovému štěpení jedné dvouřetězcové molekuly DNA (G-segment), přičemž v tomto kroku dochází ke kovalentní vazbě 5'-konců DNA na tyrosinové zbytky enzymu.

Druhá molekula DNA (T-segment) pak přechází skrz přechodný zlom (G-segment). Následně po transportu T-segmentu přes zlom dochází k hydrolyze jedné z molekul ATP a posléze dochází ke znovuspojení G-segmentu společně s hydrolyzou druhé molekuly ATP. Posledním krokem je indukované znovuotevření C-terminální domény, transportu T-segmentu skrz tuto doménu, a posléze uzavření této brány. Současně dochází k otevření N-terminální ATPasové domény, což umožňuje enzymu jeho odloučení od G-segmentu. Tento mechanismus bývá také označován jako dvoubránový mechanismus řetězcového průchodu (Larsen a kol., 2003; Delgado a kol., 2018; Pommier a kol., 2010; Pogorelnik a kol., 2013; Chen a kol., 2013).

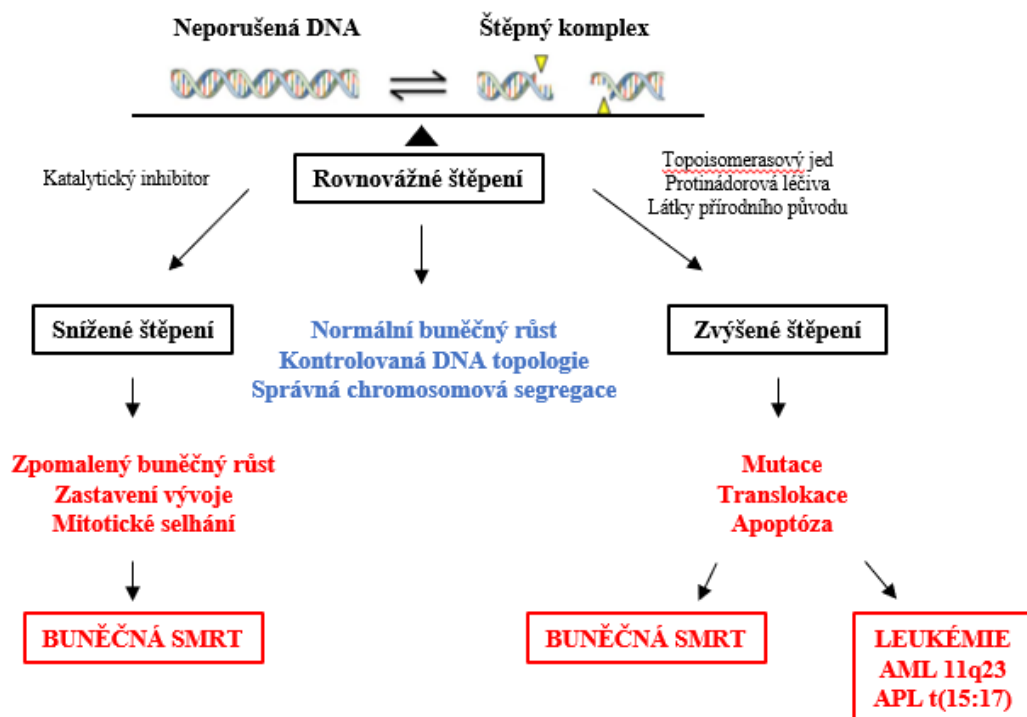
2.4 Inhibitory topoisomerasy 2

Léčiva cílicí na TOP2 můžeme rozdělit na dvě základní skupiny dle mechanismu účinku, a to na topoisomerasové jedy a katalytické inhibitory. Bohužel klasifikace inhibitorů TOP2 (iTOP2) není jednotná a zařazení jednotlivých látek často není totožné. Stejně tak se odlišují názory na samotnou definici topoisomerasových jedů a inhibitorů.

Topoisomerasové jedy přeměňují topoisomerasu jako esenciální enzym na silný buněčný toxin skrze zvýšení koncentrace štěpného komplexu tvořícího řetězcové zlomy DNA a následně se tvoří „léze“ v důsledku čehož dochází k usmrcení buňky. Vysoká hladina TOP2 často exprimovaná v rakovinných buňkách poskytuje částečné terapeutické okno pro topoisomerasové jedy. Čím je tedy vyšší koncentrace TOP2 v buňce, tím silněji působí i topoisomerasový jed. V klinické praxi se s topoisomerasovými jedy setkáme častěji než s iTOP2. Jako příklad topoisomerasových jedů lze uvést epipodofylotoxiny etoposid a teniposid, zástupce antracyklinových antibiotik doxorubicin (DOX), daunorubicin (DAU), anebo zástupce antracendionů mitoxantron (Baldwin & Osheroff, 2005; Pommier a kol., 2010; Nitiss, 2009).

Navzdory klinicky nepopiratelnému úspěchu iTOP2 v onkologické léčbě je nutné zmínit i stinnou stránku související s jejich užitím v terapii. S jejich aplikací se pojí dva závažné nežádoucí účinky, a to kardiotoxicita a tvorba sekundárních malignit (Pendleton a kol., 2015).

Druhou skupinu tvoří látky inhibující katalytickou aktivitu TOP2, které však nezvyšují hladinu kovalentních štěpných komplexů. Jejich mechanismus účinku je založen na eliminaci aktivity TOP2 jako esenciálního enzymu a jsou označovány jako katalytické inhibitory. Do budoucna se jeví jako látky, které se mohou výhledově stát významnou součástí terapeuticky přínosných léčiv (Baldwin & Osheroff, 2005; Pommier a kol., 2010; Nitiss, 2009).



Obr. 3 Důsledky působení inhibitorů TOP2 (upraveno dle Pendleton a kol., 2015)

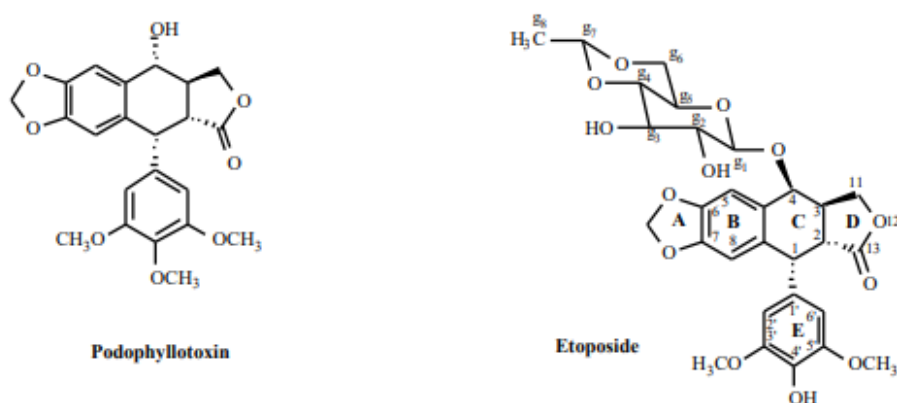
TOP2 je esenciálním enzymem, který však za jistých okolností může být také genotoxický. Je nezbytně nutné zachovat neustálé balancování mezi enzymovým štěpením DNA (které je nutné pro správný průběh fyziologických funkcí) a ligací řetězců pro zabránění buněčné smrti. Pokud dojde k výraznému snížení koncentrace TOP2-DNA štěpného komplexu, tak buňky již nejsou schopné rozmotat dceřiné chromosomy,

v důsledku čehož dochází k buněčné smrti následkem mitotického selhání. Naopak pokud je tato hladina příliš vysoká, jsou přechodné komplexy přeměněny v permanentní dvouřetězcové zlomy.

Tyto zlomy spolu s inhibicí základních DNA procesů vedou k zahájení rekombinačních cest a jsou generovány chromosomální translokace spolu s dalšími DNA aberacemi. Pokud již buňka není schopna regulace těchto procesů, dojde ke spuštění kaskády buněčných procesů vedoucích k buněčné smrti. Pokud nedojde ke smrti buňky v důsledku zvýšeného množství permanentních zlomů, lze počítat s výskytem mutací anebo chromosomálních aberací (Pendleton a kol., 2015).

2.4.1 Deriváty podofylotoxinu

Podofylotoxin je přirozeně se vyskytující látkou v rostlině zvané *Podophyllum peltatum*, v češtině označované jako Noholist štítnatý (Stähelin & von Wartburg, 1991). Podofylotoxin byl využíván v lidovém léčitelství v léčbě mnoha různých chorob po více než tisíc let (Hande, 1998). Tato sloučenina sama o sobě vykazuje silné antimitotické působení, což je zapříčiněno vazbou tubulinu a následné inhibici tubulinové polymerizace. Ačkoliv podofylotoxin sám o sobě vykazuje silné protinádorové působení, v klinické praxi nemůže být využit kvůli své vysoké toxicitě (Baldwin & Osheroff, 2005). Pro využití v klinické praxi byly vyvinuty jeho semisyntetické deriváty nazývané epipodofylotoxiny, do kterých patří mimo etoposidu také tenoposid (Joel, 1996).



Obr. 4 Strukturní vzorce podofylotoxinu, etoposidu (Baldwin & Osheroff, 2005)

2.4.1.1 Etoposid

Etoposid (ETO) je velmi často využíván k léčbě mnohých rakovinných onemocnění, včetně malobuněčného karcinomu, zárodečných malignit, sarkomů, leukemií a lymfomů. V léčbě malobuněčného karcinomu je dokonce považován za samostatně nejlépe působící látku. Má taky velmi dobré výsledky v léčbě testikulárního karcinomu, choriokarcinomu a neuroblastomu. V současné době je klinicky využíván téměř po dobu 40 let a patří mezi jedny z nejčastěji předepisovaných protinádorových léčiv (Baldwin & Osheroff, 2005; Nemade a kol., 2018).

2.4.1.1.1 Historický vývoj

V 50. letech firma Sandoz Pharmaceuticals zahájila výzkum týkající se podofylotoxinů a jejich syntetických derivátů ve snaze najít látku s podobnými antimitotickými účinky jakými disponoval podofylotoxin bez projevů toxicity, kterou vykazoval. Výsledkem tohoto výzkumu byl zhruba v polovině 60. let objev dvou semisyntetických sloučenin, a to etoposidu a teniposidu. Obě látky splňovaly podmínku zvýšené protinádorové účinnosti spolu se sníženými toxickými projevy. Po sérii preklinických hodnocení a klinického testování FDA schválila v roce 1983 použití ETO v terapii rakovinných onemocnění. Zajímavostí je, že během tohoto schválení nebyl objasněn jeho mechanismus účinku, ačkoliv byl již v této době studován. Na rozdíl od podofylotoxinu ETO nevykazoval žádnou schopnost v inhibici polymerizace tubulinu. ETO je schopen dosáhnout této inhibice, nicméně ne v koncentracích běžně užívaných *in vivo*. Až během poloviny 80. let bylo zjištěno, že primárním buněčným cílem působení ETO je TOP2 (Hande, 1998; Baldwin & Osheroff, 2005).

2.4.1.1.2 Mechanismus účinku

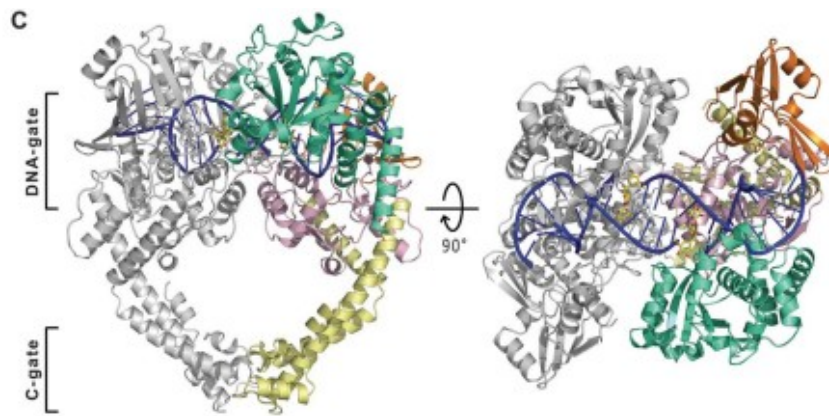
Při vysvětlení mechanismu účinku ETO je nutné vybavit si enzymatický mechanismus účinku TOP, jelikož se jedná o dva úzce propojené aspekty. Štěpná aktivita TOP na DNA je poněkud dvousečná. Zajišťuje sice správnou organizovanost a integritu chromosomální DNA, ale pokud nedojde k opětovnému spojení řetězců, nastává buněčná smrt (Arpa a kol., 1990). Z tohoto důvodu je nezbytně nutné udržovat koncentraci štěpných komplexů co nejvíce vyváženou.

ETO patří do skupiny topoisomerasových jedů, které působí zvýšením koncentrace kovalentních štěpných komplexů s molekulou DNA. Tyto jedy přeměňují TOP2 na silný buněčný toxin způsobující tvorbu dvojíých zlomů DNA v zasažených buňkách (Hande, 1998).

Hned několik významných protinádorových léčiv využívá tohoto škodlivého principu TOP2 vůči buňkám a podporuje tvorbu cytotoxických lézí skrz zvýšené množství stabilizovaných štěpných komplexů (Wu a kol., 2011). Inhibice religace řetězců na základě tvorby ternárního komplexu spolu s enzymem a molekulou DNA je stěžejním mechanismem účinku etoposidu (Joel, 1996; Montecuccio a kol., 2015; Capranico a kol., 2017).

G-segment může zůstat ve stádiu štěpení inzercí molekuly léčiva do aktivního místa tohoto štěpení. Proces spojení řetězců je tudíž zastaven trvalým oddělením rozdělených řetězců vytvořeným zlomem (Chen a kol., 2013). Účinek takto působících léčiv je tedy z velké části ovlivněn jejich strukturním uspořádáním. ETO vázaný na TOP2 štěpný komplex ukazuje více otevřenou DNA bránu, ve které jsou hořčnaté ionty odděleny od fosfotyrosinové skupiny, což jednoznačně indikuje skutečnost, že religační reakce může být utlumena pomocí léčivem indukované strukturní změny v aktivním místě (Wu a kol., 2011; Chen a kol., 2013). Není znám přesný molekulární mechanismus vzniku a interakce ternárního komplexu stabilizujícího štěpný komplex (Capranico a kol., 2017).

Zdá se však, že ternární komplex je tvořen jednou ze tří odlišných cest: etoposid může vstupovat do komplexu skrz interakci s enzymem, skrz interakci s molekulou DNA, anebo skrz interakci s binárním komplexem TOP2-DNA (Burden & Osheroff, 1998; Froelich-Ammon & Osheroff, 1995). Původně se studie přikláněly především ke tvorbě ternárního komplexu skrz vstup ETO přes interakční působení s molekulou DNA anebo binárním komplexem. Dnes se studie přiklání spíše ke tvorbě ternárního komplexu na základě interakce s enzymem. To podporuje i fakt, že na rozdíl od jiných protinádorových léčiv ETO vykazuje pouze malou schopnost vázat volnou DNA a váže se na enzym i v nepřítomnosti DNA (Baldwin & Osheroff, 2005).



Obr. 5 Vyobrazení ternárního štěpného komplexu. DNA je vyobrazena modře, enzym šedě a červeně je zobrazen navázaný ETO (Wu a kol., 2011)

Zlomy DNA stabilizované vazbou ETO jsou poměrně nestabilní. Cytotoxické a mutagenní působení tudíž nemusí být nutně zahájeno. Potenciální smrtnost stabilizovaného štěpného kovalentního komplexu dramaticky narůstá během replikace a při působení helikasy. Pokud narazí replikační vidlice na ETO stabilizovaný komplex TOP2-DNA, je tento štěpný komplex narušen a probíhá konverze přechodného jednovláknového nebo dvouvláknového zlomu do permanentní dvouvláknové fraktury DNA. Pokud jsou tyto zlomy přítomné v nadprahové koncentraci, spouští sérii cytotoxických dějů vedoucích v důsledku k buněčné smrti (Hande, 1998; Montecucco a kol., 2015).

2.4.1.1.3 Nežádoucí účinky

S užitím ETO je navzdory jeho vynikajícímu protinádorovému působení v terapii spojen i výskyt nežádoucích účinků. Můžeme hovořit o běžných nežádoucích účincích zahrnujících neaseu a zvracení (až 43 % pacientů), alopecii (až 66 % pacientů) či mnohem závažnější leukopenii (až 91 % pacientů) (Gill & Zaidi, 2017).

Stabilizace štěpného komplexu hraje zásadní roli při vzniku chromosomální leukemické translokace. Za normálních okolností jsou štěpné komplexy běžně přítomné v nízkých hladinách v katalytickém cyklu TOP2 a buňka je schopna se s jejich přítomností vyrovnat. Problém nastává při výskytu zvýšeného množství těchto komplexů v organismu a následkem tohoto děje je vznik mnohých mutagenních příhod anebo iniciace procesů vedoucích ke smrti buňky (Baldwin & Osheroff, 2005).

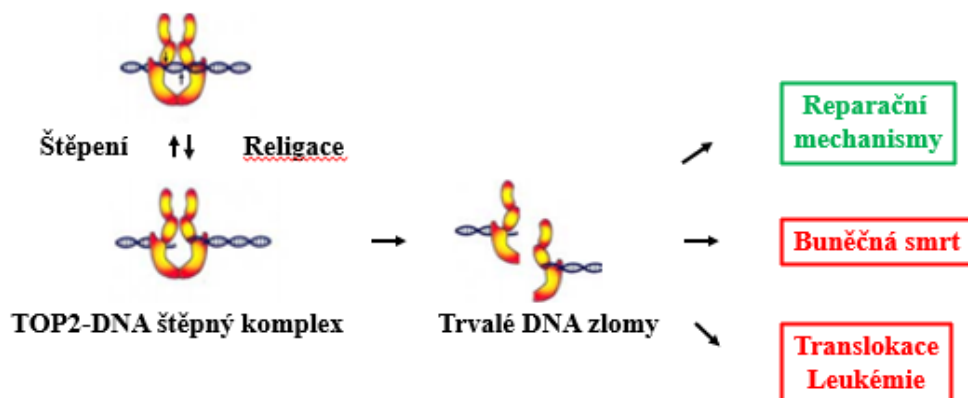
Ačkoliv je TOP2 důležitým molekulárním cílem působení protinádorových léčiv, pojí se s indukcí leukemicky specifických onemocnění. Tyto změny nejčastěji probíhají skrz přeskupení uspořádání na genu MLL (myeloidní/lymfoidní leukémie) nebo genu PML (promyelocytární leukémie) (Pendleton a kol., 2015).

Užití etoposidu v terapii je spojováno s rozvojem akutní myeloidní leukémie (AML) a rozvojem terapií indukovaného myelodysplastického syndromu (MDS), který často progreduje do AML (Pedersen-Bjergaard a kol., 2002). Tyto události jsou nejčastěji spojeny s chromosomální translokací v seskupení 11q23 nebo 21q22 (Ratain & Rowley, 1992).

ETO však není jedinou látkou v protinádorové léčbě, která bývá spojovaná s výskytem sekundárních malignit, ačkoliv je pravděpodobně látkou nejčastěji zmiňovanou. Mezi další protinádorové látky způsobující výskyt těchto malignit patří například DOX nebo mitoxantron (Ratain & Rowley, 1992). Režimy léčby, ve kterých působí ETO nebo DOX jsou spojovány s translokací chromosomů 11q23. Režimy zahrnující mitoxantron a epirubicin jsou spojovány s APL (akutní promyelocytární leukémií) zahrnující translokační přeskupení t(15;17) a translokačními změnami na genu PML (Azarova a kol., 2007; Pendleton, a kol., 2015).

Translokace jsou většinou pozorovány v oblasti klastru zlomových bodů (BCR) genu MLL. Gen MLL kóduje komplex multidoménových regulačních transkripčních proteinů, které se účastní epigenetické regulace hemopoetických a non-hemopoetických buněčných cílů (Pendleton a kol., 2015).

Asociace topoisomerasových jedů s 11q23 indukovaném rozvoji AML ukazuje, že leukemogenní chromosomální translokace jsou zahájeny TOP2 generovanými zlomy v BCR asi spíše, než selekcí pre-existujících translokací v kostní dřeni pacientů. To potvrzuje i fakt, že u pacientů s 11q23 přeskupením trpících AML nebyla tato přeskupení nalezena před zahájením léčby. Co víc, translokace spojené s 11q23, které mají původ v BRC, jsou pozorovány pouze u pacientů léčených jedy topoisomerasy a nejsou asociovány s oblastmi kde je vyloučené působení TOP2 cílících léčiv (Pendleton a kol., 2015).



Obr. 6 Účinek ternárního komplexu v buňkách (upraveno dle Baldwin & Osheroff, 2005)

Genotoxická cesta vzniku MDS a AML je teoreticky spojována se třemi možnými příčinami vzniku, a to alkylačními látkami, iTOP2 a spontánními endogenními rekombinacemi, jež nejsou spojené s vystavením exogenním mutagenům. Výskyt MDS a AML se pojí se značným počtem cytotoxických a genotoxických abnormalit. Přestože je již odhalená značná část chromosomálních aberací, lze předpokládat, že některé genetické změny stále unikají pozornosti a bude objevena nová genotoxická cesta (Pedersen-Bjergaard a kol., 2002).

Ačkoliv protinádorová léčba cílí na obě isoformy, DNA zlomy iniciující 11q23 asociovanou AML jsou spojovány především s TOP2 β . Mezi jedním z prvních důkazů, který potvrzoval tuto hypotézu, byl experiment provedený u myší s depletovanou TOP2 β , přičemž u těchto myší byl mnohem nižší výskyt ETO indukovaných potíží oproti myším se zachovalou aktivitou TOP2 β . Co víc, TOP2 β se ukazuje být zásadní pro ETO indukované DNA sekvenční přeskupení a tvorbu dvojíých zlomů na buněčných modelech. Genotoxický efekt ETO se ukazuje být přímo spojený s aktivitou isoformy TOP2 β (Yi a kol., 2007; Pendleton a kol., 2015).

2.4.2 Antracyklinová antibiotika

Antracyklinová antibiotika jsou v současnosti považovány za jedny z neúčinnějších protinádorových léčiv. Jsou užívány jak v léčbě solidních tumorů, tak hematologických malignit u dospělých pacientů i u dětí. Dobrým příkladem efektivity ANT jsou záznamy z dětské onkologie, kde 5letá míra přežití u dětí byla zvýšena ze zhruba 30 % v 60. letech na dnešních 70-80 % přeživších pacientů, přičemž více než 50 % těchto pacientů bylo léčeno právě ANT (Šimůnek a kol., 2009).

ANT byly objeveny během 60. let izolací z půdní bakterie *Streptomyces peucetius*. Zpočátku jim byla přisuzovaná slabá inhibiční aktivita na Gram-pozitivních mikroorganismech, nicméně poté byla objevena jejich významná protinádorová aktivita (Vejpongsa & Yeh, 2014). Během 60. let byly následně objeveny významné účinky DAU v léčbě hematologických malignit. O něco později byl objeven jeho derivát DOX, který se ukázal být ještě účinnějším protinádorovým léčivem s širším spektrem využití i v léčbě solidních tumorů, a nejen krevních malignit. I po uplynutí téměř půl století jsou ANT stále užívány v klinické praxi. Zejména DOX zůstává důležitým léčivem v terapii mnoha rakovinných onemocnění, včetně rakoviny prsu, sarkomů, dětských solidních tumorů, leukémie, hodgkinských i nehodgkinských lymfomech a mnohých dalších (Šimůnek a kol., 2009; Volkova & Russell, 2011).

Ačkoliv jsou ANT hojně používány v protinádorové léčbě, mechanismus jejich působení stále není plně objasněn a pravděpodobně se jedná o kombinaci několika odlišných mechanismů, přičemž tato skutečnost pravděpodobně stojí za vysokou efektivitou této skupiny protinádorových léčiv.

Po jejich objevení byl jejich efekt přičítán interkalačnímu působení mezi jednotlivými páry bazí na řetězcích DNA, které mělo zabránit rapidnímu nárůstu nově proliferujících buněk. V současné době však spíše panuje přesvědčení, že tento mechanismus účinku pravděpodobně nehraje hlavní roli v jejich protinádorovém působení. Panoval i názor, že za jejich protinádorovým působením stojí tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS) a peroxidace lipidů, nicméně tato hypotéza nebyla plně potvrzena, a některé studie ji naopak vyvracely (Šimůnek, a kol., 2009; Štěrba a kol., 2013; Kollárová- Brázdová a kol., 2020).

Za hlavní molekulární cíl působení je v dnešní době všeobecně uznáván enzym TOP2, přičemž ANT jsou považovány za takzvané topoisomerasové jedy (Štěrbá a kol., 2013).

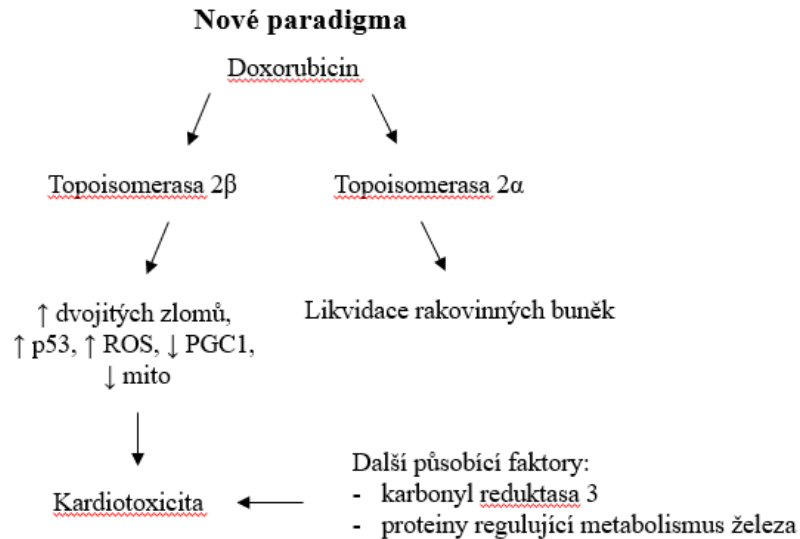
Během let bylo vyvinuto mnoho derivátů původní sloučeniny, v současnosti se v terapii používají především látky DOX, epirubicin, a idarubicin. Zajímavostí je, že v dnešní klinické praxi je snaha namísto vývoje nových a lépe cílících léčiv využívat kombinace s novými terapeutiky ve snaze maximalizovat terapeutický efekt léčby (Šimůnek a kol., 2009; Vejpongsa & Yeh, 2014).

Klinické užití ANT je však omezeno kvůli výskytu kardiotoxicity. Kardiotoxicita ANT se projevuje po měsících až letech od prodělání chemoterapie. Ve většině případů se jedná o chronické formy, příkladem může být dilatační kardiomyopatie anebo městnavé srdeční selhání. Rozvoj kardiotoxicity je spojován především s překročením kumulativní dávky podávaných ANT, přičemž riziko výskytu nežádoucích účinků se po překročení kumulativní dávky několikanásobně navyšuje (van Dalen a kol., 2011; Vejpongsa & Yeh, 2014).

Mechanismus kardiotoxického působení ANT stále nebyl plně vysvětlen, ačkoliv zde panují některé hypotézy, jako například tradiční ROS hypotéza nebo hypotéza vzniku komplexu ANT-železo (Vávrová a kol., 2013).

Nejpravděpodobnějším se však zdá indukce toxicity skrz interakci ANT-TOP2, přičemž častěji je v souvislosti s indukcí kardiotoxicity zmiňována isoforma TOP2 β . Důvodem je výskyt této isoformy na kardiomyocytech, přičemž TOP2 α se zde vůbec nevyskytuje (Yeh a kol., 2019).

Objev TOP2 β jako klíčového molekulárního cíle asociovaného s kardiotoxicitou má zcela zásadní vliv na další vývoj, protože tento nový přístup by mohl mít dopad na tvorbu klinických strategií zabývajících se prevencí kardiotoxicity (Vejpongsa & Yeh, 2014).



Obr. 7 Nové paradigma indukce ANT kardiotoxicity (upraveno dle Yeh a kol., 2019)

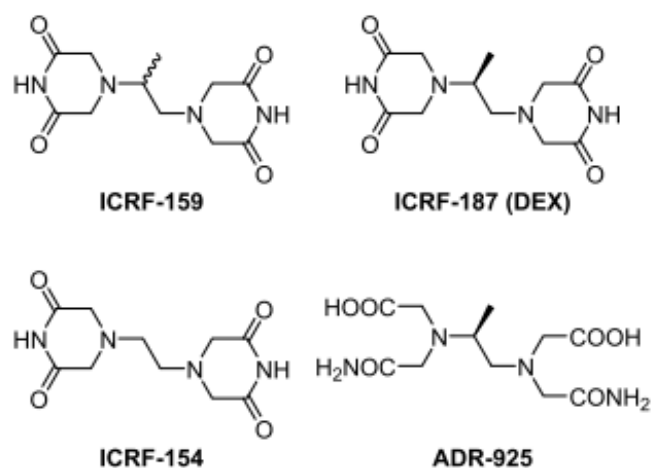
2.4.3 Katalytické inhibitory

Katalytické inhibitory jsou skupinou obsahující strukturně odlišné látky interferující s TOP2 během katalytického cyklu. Zatímco topoisomerasové jedy jsou využívány především pro jejich protinádorový účinek, katalytické inhibitory mají širší potenciální spektrum využití. Jsou využívány jako antineoplastické látky, kardioprotektory, anebo látky schopné modulovat účinek jiných protinádorových léčiv (Larsen a kol., 2003).

2.4.3.1 Dexrazoxan (ICRF-187, DEX)

Bisdioxopiperazinové sloučeniny byly původně vyvíjeny ve snaze najít méně polární deriváty EDTA jako chelátoru kovů, které by snadněji procházely skrz buněčnou membránu, a tudíž mohli lépe rozvíjet svůj protinádorový účinek. Mateřskou sloučeninou se stala látka ICRF-154 a na základě její struktury vznikaly další deriváty, jako například její monomethylový derivát ICRF-159 (razoxan), který měl srovnatelnou protinádorovou účinnost v porovnání s mateřskou látkou. ICRF-187 (dexrazoxan) je pravotočivý enantiomer racemického razoxanu.

V terapii se využívá nejen jeho protinádorového účinku, ale především jeho kardioprotektivního působení proti ANT indukované kardiotoxicitě (Larsen a kol., 2003; Jirkovská a kol., 2021; Hasinoff & Herman, 2007).



Obr. 8 Strukturální vzorce vybraných bisdioxopiperazinových sloučenin

Jedna z dříve obecně přijímaných hypotéz vysvětluje kardioprotektivní působení DEX skrze jeho chelatační působení. DEX prochází hydrolyzací dioxopiperazinových kruhů, což vede ke vzniku meziproductu s pouze jedním otevřeným kruhem, který prochází další hydrolyzací a následně vzniká konečný metabolit ADR-925. Metabolit ADR-925 je strukturálně podobný diamidu EDTA (Hasinoff a kol., 1996; Hasinoff & Herman, 2007). ANT a jejich komplexy se železem jsou redoxně aktivní, a mohou tvořit ROS.

Dříve byl obecně přijímán fakt, že DEX chrání před oxidativním poškozením srdeční tkáně jako chelátor železa. Lipofilita DEX zajišťuje jeho penetraci do srdečních buněk, kde při hydrolytickém otevření jeho metabolit chelatuje ionty železa a vytěsňuje je ze společných komplexů utvořených s ANT. Nicméně některé studie ukázaly, že jiné efektivní chelátory železa nebyly schopné ochránit srdeční buňky před rozvojem ANT indukované kardiotoxicity. Z tohoto důvodu se lze domnívat, že kardioprotektivní účinek bude zajišťovat jiný mechanismus působení (Štěrbá a kol., 2013; Jones, 2014; Jirkovská-Vávrová a kol. 2015).

Nicméně stále víc teorií přisuzuje kardioprotektivní působení DEX jeho interferenčnímu působení na isoformě TOP2 β , která je dominantním typem isoformy v srdečních buňkách. Kardioprotektivní působení DEX bylo tedy původně přisuzováno jeho schopnosti chelatovat ionty železa, nicméně v dnešní době je tato hypotéza zpochybňována. Za kardioprotektivními účinky DEX je pravděpodobněji spíše jeho schopnost interferovat s TOP2 (Jirkovská a kol., 2021).

S jeho užitím bývají však spojovány i jisté obavy. Jedná se především o výskyt sekundárních malignit asociovaných s užitím DEX a dále snížení protinádorového účinku ANT při kombináční terapii u dospělých i u dětí. Ačkoliv ani jedna z těchto obav nebyla potvrzena a řada studií je naopak vyvrací, pověst DEX tím byla nenávratně poškozena a jeho užití je díky tomu v terapii značně omezeno. Na základě vypracovaných doporučení byly následně tyto postupy implementovány v rámci evropských terapeutických strategií, i přes to, že řada studií je v přímém rozporu s informacemi obsaženými v těchto doporučeních (Reichardt a kol., 2018; Simmons, 2019).

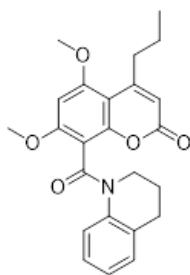
2.4.3.2 BNS-22

BNS-22 je novým syntetickým derivátem přírodního rostlinného produktu GUT-70 vykazujícím protinádorovou aktivitu proti lidským rakovinným buňkám. Jeho mechanismus účinku zatím není plně objasněn.

Na základě proteomického profilování bylo zjištěno, že BNS-22 patří ke stejnému klastru jako bisdioxopiperazinový derivát ICRF-193. Na základě tohoto profilování bylo BNS-22 blízko i antimitotické látky vinblastinu, přičemž následně byly provedeny experimenty na HeLa buňkách pro objasnění mechanismu účinku s cílem zjistit, zda je tedy spíše katalytickým inhibitorem nebo látkou s antimitotickým působením.

HeLa buňky byly vystaveny působení 3 a 10 $\mu\text{mol/l}$ BNS, 10 $\mu\text{mol/l}$ ICRF-193 a 300 nm/l vinblastinu po dobu 12 hodin a obarveny pomocí anti- β -tubulinu, anti- γ -tubulinu a barviva DAPI pro vizualizaci chromosomální morfologie. Jednotlivé látky se nelišily v mechanismu působení během interfáze, ale až během samotné mitózy, přičemž látka BNS-22 vykazovala během tohoto experimentu obdobný mechanismus jako katalytický inhibitor ICRF-193 (Kawatani a kol., 2011).

Bohužel BNS-22 vykazuje extrémně nízkou rozpustnost ve vodě, což omezuje jeho užití *in vivo* a následné klinické testování. V současnosti jsou však intenzivně studovány možnosti, kterými by se dala nastalá situace řešit. Jako jedno z možných řešení se jeví vývoj orálních nanosičů z oxidu křemíku, zlepšujících stabilitu látky skrze kyselé prostředí působením žaludečních šťáv. Tyto studie proběhly v rámci plánování nových přístupů v léčbu kolorektálního karcinomu (Kathiravan a kol., 2013; Vong a kol., 2017).



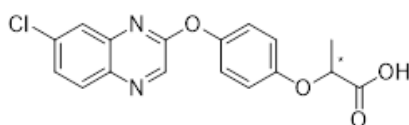
Obr. 9 Strukturní vzorec BNS-22

2.4.3.3 XK-469

Tato látka byla vyvinuta z chinoxalinového herbicidu nevykazujícího žádnou protinádorovou aktivitu. Ovšem přesunutím skupiny chloru z šesté pozice na sedmou tato aktivita vznikla a byla nalezena mateřská sloučenina XB947. Tato sloučenina však byla prakticky nerozpustná ve vodě a její podání skrz jiné cesty bylo velmi obtížné. Proto pokračoval výzkum ve snaze najít sloučeninu s lepšími vlastnostmi, přičemž toho bylo dosaženo s látkou XK-469, která je ve vodě rozpustnou solí původní mateřské sloučeniny (Lorusso a kol., 1999).

XK-469 je tedy ve vodě rozpustný chinoxalinový derivát kyseliny fenoxypropionové, jež vykazuje široké spektrum protinádorové aktivity jak u myších, tak u lidských tumorů. Pozoruhodná je aktivita XK-469 proti multirezistentním nádorům (Stock a kol., 2008).

Mechanismus působení zůstává neobjasněn. Srovnávací cytotoxická analýza provedena NCI institutem buněčných linií ukázala, že mechanismus působení látky XK-469 je naprosto jedinečný a nemá srovnání s žádnou v současnosti působící protinádorovou látkou. Byla ovšem zaznamenána inhibiční aktivita na TOP2. Z toho lze usuzovat, že působí selektivně, jelikož na typu TOPI nevykázala látka XK-469 žádný efekt (Stock a kol., 2008; Yao a kol., 2015).



Obr. 10 Strukturní vzorec XK-469

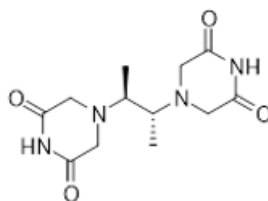
2.4.3.4. ICRF-193

ICRF-193 je dimethylovým derivátem sloučeniny ICRF-159 a patří k nejsilněji působícím bisdioxopiperazinovým derivátům vůči TOP2 (Larsen a kol., 2013). Často jsou vedeny diskuze o tom, zda působí spíše jako inhibitor, anebo spíše jako topoisomerasový jed.

ICRF-193 inhibuje TOP2 skrze stabilizační uspořádání enzymu obklopujícího DNA, přičemž jeho efekt je vázán na snížení ATPasové aktivity (Hu a kol., 2002). Jiné studie však naznačují, že ICRF-193 je klasickým induktorem štěpných komplexů, nicméně běžným způsobem pouze špatně detekovatelný (Huang a kol., 2001).

Nicméně není úplně jasné, proč by měla být detekce štěpného komplexu odlišná od detekce jiných topoisomerasových jedů, a proč by bylo za potřebí užití jiných metod standardně užívaných pro *in vitro* detekci. Navíc je známo, že po aplikaci látky ICRF-193 reagovaly buňky tvorbou dlouhých zapletených mitotických chromosomů, což je v souladu s působením TOP. Nicméně při aplikaci topoisomerasových jedů byly mitotické chromosomy extrémně roztříštěné. Z tohoto důvodu se autoři kloní spíše ke katalytické inhibici jako základnímu mechanismu působení ICRF-193 (Larsen a kol., 2003).

Co se týče kardioprotektivního působení, ICRF-193 se zdá být ještě silnějším kardioprotektivem než DEX, nicméně jeho užití *in vivo* je znemožněno kvůli jeho velmi nízké rozpustnosti ve vodě. Nicméně je snaha rozpustnost zlepšit tak, aby lék mohl být vstřebatelný organismem. Možným řešením se zdá tvorba proléčiva, které by zajišťovalo jednodušší administraci a lepší průnik skrz membránu buněk, přičemž se zatím velmi slibně jeví proléčivo GK-667, které je kruhově otevřeným metabolitem ICRF-193. Toto proléčivo se vyznačuje nízkou toxicitou, dobrou rozpustností a příznivou přeměnou na ICRF-193 v organismu (Bavlovič Piskáčková a kol., 2021).



Obr. 11 Strukturní vzorec ICRF-193

3. Cíle práce

Studium antiproliferačních účinků modelového jedu TOP2 a vybraných katalytických inhibitorů jako potenciálních kardioprotektiv.

- Stanovení antiproliferační účinnosti ETO, DEX, BNS-22, XK-469, ICRF-193 na suspenzní buněčné linii HL-60 stanovením hodnot IC_{50} .
- Stanovení vlivu inhibitoru na účinnost etoposidu při IC_{50} .
- Stanovení antiproliferační účinnosti u kombinací jednotlivých látek s ETO (v IC_{50}) prostřednictvím výpočtu hodnot kombinačních indexů dle metody Chou-Talalay.

4. Metodika

4.1. Materiály a technické vybavení

4.1.1 Buněčná linie

V experimentu byla použita suspenzní buněčná linie HL-60 dodávána americkou bankou buněčných linií (Americane Type Culture Collection; ATCC). Morfologicky je linie tvořena myeloblasty pocházejícími z periferní krve 36-leté ženy trpící akutní promyelocytární leukémií.

4.1.2 Reagencie a chemikálie

- reagencie a chemikálie připravené na farmaceutické fakultě
 - DEX
 - ICRF-193
- zakoupené reagencie a chemikálie
 - ETO (Sigma, Schnelldorf, Německo)
 - BNS-22 (Sigma, Schnelldorf, Německo)
 - XK-469 (Sigma, Schnelldorf, Německo)
 - médium RPMI-1640 (Sigma, Německo)
 - trypanová modř (Sigma, Německo)
 - dimethylsulfoxid (Sigma, Schnelldorf, Německo)
 - fosfátový pufr (PBS, Sigma, Německo)
 - fetální bovinní sérum, tepelně inaktivované (FBS, Lonza, Česká republika)
 - směs penicilin-streptomycin (Lonza, Česká republika)
 - Triton™ X-100 (Fluka)
 - isopropanol (Sigma, Schnelldorf, Německo)
 - Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (Sigma, Schnelldorf, Německo)
 - kyselina chlorovodíková (Penta, Praha, Česká republika)
 - ultradestilovaná voda (přístroj Milli-Q RG, Millipore, Česká republika)

4.1.3 Přístrojové vybavení

- buněčný inkubátor s termostatem a regulací koncentrace CO₂ Forma Scientific CO₂ incubator, model 311 (Forma Scientific, USA)
- box s laminárním prouděním (BioAir, Itálie) - viz příloha (model TOPSAFE 1.2, rok 2012)
- (invertovaný epifluorescenční) mikroskop Nikon Eclipse TS 100 s objektivem Nikon 10x/0,25 (Nikon, Japonsko)

- spektrofotometr Infinite M 200 (Tecan, Rakousko)
- analytické váhy ScalTec SBC 22
- vodní lázeň Memmert WB 14 LV (Memmert, Německo)
- desková třepačka Heidolph Titramax 100 (SRN)
- vortex (Thermo Fisher Scientific, Česká republika)
- Bürkerova komůrka (Brand, SRN)

4.1.4 Laboratorní příslušenství

- plastové sterilní kultivační nádoby T75 a 96jamkové kultivační destičky s plochým dnem (TPP, Švýcarsko)
- mikrozkušavky (Eppendorf, Německo)
- plastové sterilní zkumavky (TPP, Švýcarsko)
- sérologické sterilní pipety (TPP, Švýcarsko)
- automatické pipety Eppendorf research různého rozsahu (Eppendorf, Německo)
- pipety elektronické multikanálové e-PET BioHit (Biohit, Finsko)
- pipetovací nástavce Biohit Midi Plus (BioHit, Finsko)
- pipetovací špičky (Eppendorf, Německo)
- plastové vaničky
- běžné laboratorní sklo

4.2 Pracovní postupy

4.2.1 Kultivace

K výživě buněk sloužilo kultivační médium RPMI-1640 s obsahem 2mM L-glutaminu, 10mM HEPES pufru, 1mM pyruvátu sodného, 4500 mg/L glukózy a 1500 mg/L hydrogenuhličitanu sodného, pro naše účely obohaceno o 10 % fetální bovinní sérum a 1 % roztok penicilin-streptomycin. Pro kultivaci suspenzní buněčné linie byly použity plastové sterilní kultivační lahve o obsahu 75 cm². Buňky byly kultivovány v inkubátoru při teplotě 37 °C a koncentraci oxidu uhličitého 5 %, což jsou podmínky simulující prostředí lidského organismu. Manipulace probíhala za aseptických podmínek ve sterilním laminárním boxu z důvodu možné mikrobiální kontaminace. Pro minimalizaci rizika rozvoje tepelného šoku byly veškeré přidávané látky temperovány na teplotu 37 °C.

4.2.2 Pasážování

Pasáž buněk byla prováděna každý 3. až 4. den, pokud by byla prováděna v delším časovém intervalu, zvyšovalo by se riziko nadměrného množení buněk a úbytku živin, v důsledku čehož by docházelo k úhynu buněk. Buňky jsme nechávaly narůst přibližně

do koncentrace 1 milionu buněk/ml a následně ředili na 100-150 tisíc buněk/ml v závislosti na rychlosti buněčného růstu.

Prvním krokem pasáže bylo vyjmutí buněk z inkubátoru, přičemž byla nutná kontrola uzavěru větracího ventilu pro manipulaci mimo laminární box. Provedli jsme mikroskopickou kontrolu růstu buněk a následně kultivační lahev přenesli do laminárního boxu. Buňky bylo nutné promíchat kvůli homogenizaci a odebrat 50 μ l suspenze, která se smíchala s 50 μ l 0,4 % trypanové modři za účelem obarvení mrtvých buněk. Živé buňky jsou schopny trypanovou modř aktivně vylučovat, a tudíž k jejich obarvení nedojde. Po dvouminutové inkubaci suspenzních buněk s trypanovou modří jsme obarvenou suspenzi ještě jednou promíchali a odpipetovali 10 μ l do obou komor Bürkerovy komůrky, kde jsme určovali počet přeživších buněk v pěti z devíti čtverců. Sečtením spočítaných živých buněk v obou komorách a následným vynásobením jejich počtu dvěma tisíci jsme dostali počet buněk v jednom mililitru suspenze. Následovalo naředění kultivačním médiem na požadovanou koncentraci a přenos označené nové sterilní láhve do inkubátoru ke kultivaci. Zbylé množství suspenze bylo využito k experimentům.

4.2.3 Studie proliferačních účinků

Pro stanovení cytotoxicity jsme využívali 96 jamkovou destičku. První sloupeček na destičce ve všech fázích pokusu sloužil jako negativní kontrola pro průkaz nulové viability, bylo do něj nanášeno 100 μ l kultivačního média. Další čtyři sloupce, zpravidla dva krajové z obou stran destičky, sloužily jako pozitivní kontrola, bylo do nich nanášeno 50 μ l buněčné suspenze a 50 μ l kultivačního média, buněčný růst zde nebyl ovlivněn přidáním dalších látek. Buněčná suspenze byla naředěna pomocí kultivačního média na koncentraci 200 000 buněk na mililitr a nanášena pomocí multikanálové pipety do vybraných jamek destičky. Do prostředních sloupců byly přidávány testované látky v určených koncentracích a kombinacích za účelem sledování jejich vlivu na buněčnou proliferaci. Všechny testované látky mimo XK-469 (které bylo rozpouštěno v destilované vodě) byly rozpouštěny v 100% dimethylsulfoxidu, přičemž zásobní roztoky byly připravené 1000krát koncentrovanější pro zachování konečné koncentrace.

Jednotlivé látky a jejich kombinace s ETO byly inkubovány po dobu 72 hodin a následně byla vyhodnocována jejich hodnota IC_{50} a pro srovnání interakcí bylo využito

analýzy dle metody Chou-Talalay (Chou & Talalay, 1983; Chou & Talalay, 1984). Jelikož interakce léčivo-léčivo může být ovlivněna změnou koncentrace, prozkoumali jsme tedy v souladu s metodou kombinací ETO a inhibitorů v jednotlivých násobcích a podílech (1/8; 1/4; 1/2; 1; 2; 4) jejich hodnot IC_{50} .

MTT test je kolorimetrický test používaný ke stanovení buněčné viability, proliferace a cytotoxicity na základě určení koncentrace metabolitu MTT – formazanu. Při testu je využívána schopnost mitochondriálních dehydrogenáz živých buněk metabolizovat žlutě zbarvené solubilní tetrazoliové soli MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-difenyl-tetrazolium bromidu) na modrý metabolit formazan ve formě nerozpustných fialových krystalků redukcí tetrazolinového kruhu MTT. Následně se spektrofotometricky měří koncentrace formazanu po jeho rozpuštění a tím je tedy indikován počet metabolicky aktivních buněk.

Po uplynutí inkubační fáze trvající 72 hodin bylo do každé jamky nanášeno 25 μ l předem připraveného roztoku MTT (3mg/ml) v PBS a destičku jsme nechali inkubovat další 2 hodiny. Po uplynutí inkubačního intervalu jsme do každé jamky přidali 100 μ l lyzačního roztoku (isopropanol, 0.1 M HCl, 10 % Triton X 100). Destička byla ihned po napipetování lyzačního roztoku umístěna na třepačku nastavenou na 700 otáček za minutu po dobu asi 30 minut, poté jsme pipetou resuspendovali větší nerozpuštěné shluky formazanu a třepali znovu 30 minut do jeho úplného rozpuštění.

Následně byla měřena absorbance na spektrofotometru TECAN Infinite při vlnových délkách 570 a 690 nm. Po odečtení blanku jakožto negativní kontroly (jamky bez buněk obsahující pouze kultivační médium) byla srovnávána viabilita buněk obsahující testované látky vůči kontrolní skupině s předpokládanou 100% buněčnou viabilitou (pozitivní kontrolou).

4.2.4 Zpracování naměřených dat

Naměřené hodnoty buněčné proliferace získané ze spektrofotometrického měření byly zpracovány v programu Microsoft Excel 2016 a následně byla data statisticky a graficky zpracována v programu GraphPad Prism 9.0.2 for Windows metodou One Way ANOVA s post hoc testem Holm-Šidák, přičemž statistická významnost byla minimálně 0,05 (tedy 95 % pravděpodobnost). Výsledky byly vyjádřeny jako aritmetické průměry se směrodatnou odchylkou.

K výpočtu hodnot IC_{50} , tj. koncentrací studovaných látek způsobujících 50% inhibici buněčné proliferace, a kombinačních indexů jakožto kvantitativních hodnot určujících stupeň interakce dvou a více látek byl využit program CalcuSyn (Biosoft 1996).

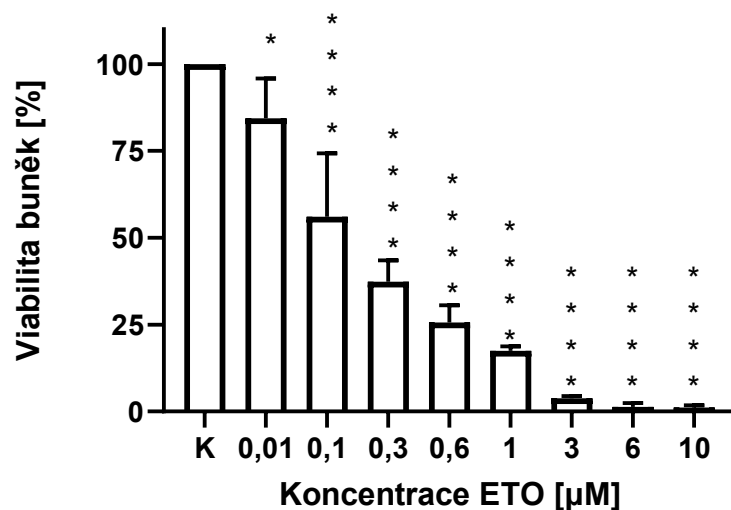
Pro stanovení kombinačního indexu bylo využito metody Chou-Talalay. V této metodě se využívá koncentrace dvou inhibitorů v jejich IC_{50} , při jejich jak samostatném, tak společném působení. Na základě těchto hodnot je utvořen graf a spočítán kombinační index dle příslušného vzorce pro určení vztahu těchto dvou inhibitorů. Pokud hodnota kombinačního indexu vyjde vyšší než 1, jedná se o vztah antagonistický. V případě, že se kombinační index blíží 1, vztah považujeme za aditivní. Pokud je hodnota kombinačního indexu nižší než 1, jedná se o vztah synergistický (Chou & Talalay, 1983; Chou & Talalay, 1984).

5. Výsledky

5.1 Stanovení hodnot IC_{50} jednotlivých látek

5.1.1 Stanovení hodnoty IC_{50} ETO

Buněčná kultura byla inkubována společně s ETO ve vzrůstající koncentraci po dobu 72 hodin. Dávkově závislé a statisticky významné snížení buněčné proliferace oproti kontrole představující 100 % buněčné viability bylo pozorováno již od nejnižší použité koncentrace 0,01 $\mu\text{mol/l}$. Hodnota IC_{50} , tedy koncentrace ETO navozující 50% inhibici buněčné proliferace ve srovnání s kontrolou, byla 0,25 $\mu\text{mol/l}$. Pokus byl vyhodnocen pomocí MTT testu.



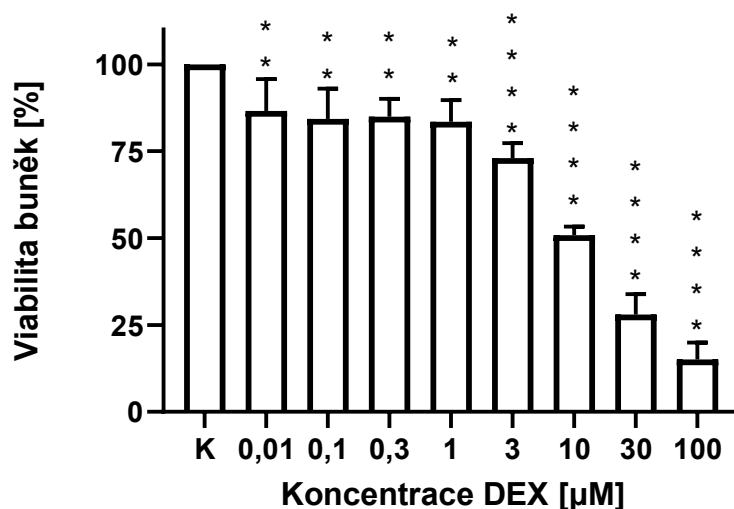
Obr. 5.1.1 Snížení proliferace buněk HL-60 po 72hodinové inkubaci s ETO ve vzrůstající koncentraci (vyhodnoceno MTT testem)

Data byla získána ze čtyř nezávislých experimentů.

V grafu jsou znázorněny průměrné hodnoty měření se standardní odchylkou. Statisticky významná změna oproti kontrolní skupině je v grafu značena symbolem * - $P \leq 0,05$, ** - $P \leq 0,01$, *** - $P \leq 0,001$, **** - $P \leq 0,0001$.

5.1.2 Stanovení hodnoty IC₅₀ DEX

Buněčná kultura byla inkubována společně s DEX ve vzrůstající koncentraci po dobu 72 hodin. Dávkově závislé a statisticky významné snížení buněčné proliferace oproti kontrole představující 100 % buněčné viability bylo pozorováno od koncentrace 0,01 $\mu\text{mol/l}$. Hodnota IC₅₀, tedy koncentrace DEX navozující 50% inhibici buněčné proliferace ve srovnání s kontrolou, byla 12,2 $\mu\text{mol/l}$. Pokus byl vyhodnocen pomocí MTT testu.



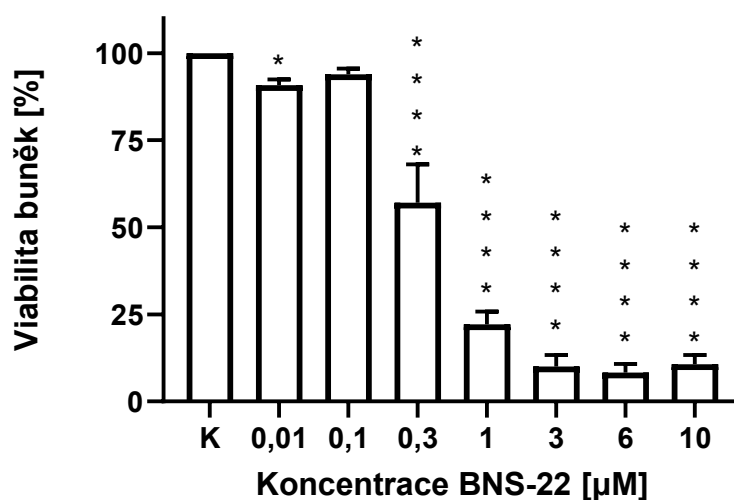
Obr. 5.1.2 Snížení proliferace buněk HL-60 po 72hodinové inkubaci s DEX ve vzrůstající koncentraci (vyhodnoceno MTT testem)

Data byla získána ze tří až čtyř nezávislých experimentů.

V grafu jsou znázorněny průměrné hodnoty měření se standardní odchylkou. Statisticky významná změna oproti kontrolní skupině je v grafu značena symbolem * - $P \leq 0,05$, ** - $P \leq 0,01$, *** - $P \leq 0,001$, **** - $P \leq 0,0001$.

5.1.3 Stanovení hodnoty IC₅₀ BNS-22

Buněčná kultura byla inkubována společně s BNS-22 ve vzrůstající koncentraci po dobu 72 hodin. Dávkově závislé a statisticky významné snížení buněčné proliferace oproti kontrole představující 100 % buněčné viability bylo pozorováno od koncentrace 0,3 μmol/l. Hodnota IC₅₀, tedy koncentrace BNS-22 navozující 50% inhibici buněčné proliferace ve srovnání s kontrolou, byla 0,33 μmol/l. Pokus byl vyhodnocen pomocí MTT testu.



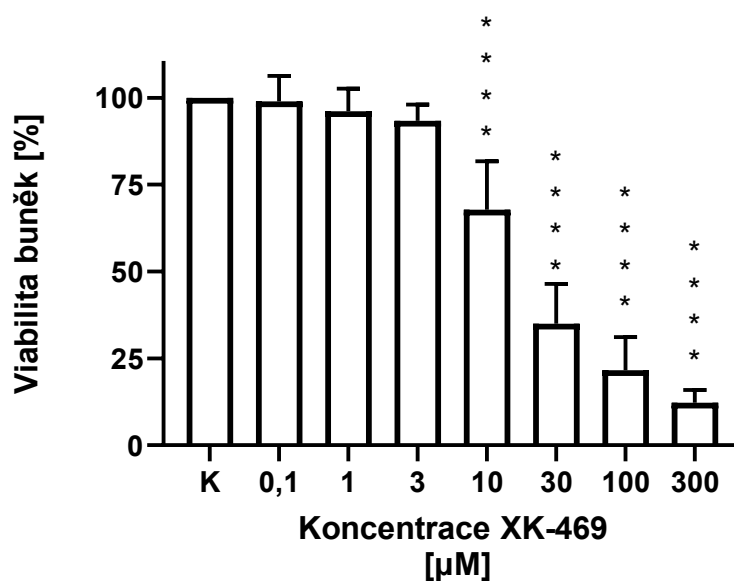
Obr. 5.1.3 Snížení proliferace buněk HL-60 po 72hodinové inkubaci s BNS-22 ve vzrůstající koncentraci (vyhodnoceno MTT testem)

Data byla získána ze tří až čtyř nezávislých experimentů.

V grafu jsou znázorněny průměrné hodnoty měření se standardní odchylkou. Statisticky významná změna oproti kontrolní skupině je v grafu značena symbolem * - $P \leq 0,05$, ** - $P \leq 0,01$, *** - $P \leq 0,001$, **** - $P \leq 0,0001$.

5.1.4 Stanovení hodnoty IC₅₀ XK-469

Buněčná kultura byla inkubována společně s XK-469 ve vzrůstající koncentraci po dobu 72 hodin. Dávkově závislé a statisticky významné snížení buněčné proliferace oproti kontrole představující 100 % buněčné viability bylo pozorováno od koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$. Hodnota IC₅₀, tedy koncentrace XK-469 navozující 50% inhibici buněčné proliferace ve srovnání s kontrolou, byla 20,5 $\mu\text{mol/l}$. Pokus byl vyhodnocen pomocí MTT testu.



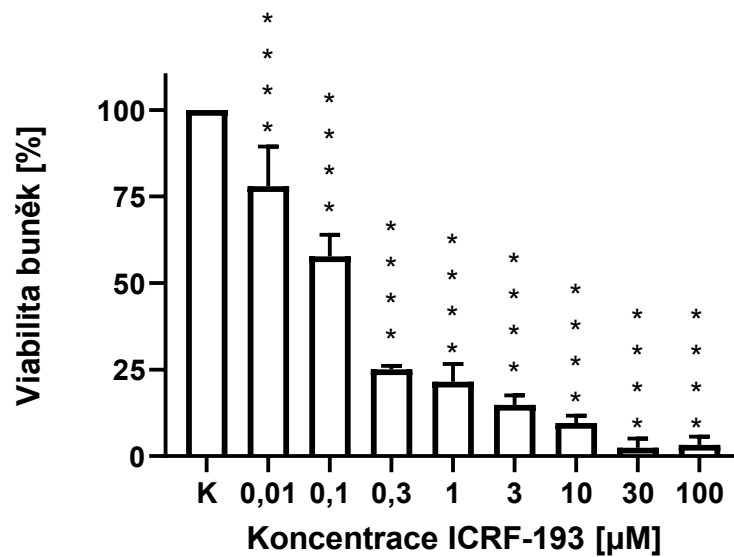
Obr. 5.1.4 Snížení proliferace buněk HL-60 po 72hodinové inkubaci s XK-469 ve vzrůstající koncentraci (vyhodnoceno MTT testem)

Data byla získána z pěti nezávislých experimentů.

V grafu jsou znázorněny průměrné hodnoty měření se standardní odchylkou. Statisticky významná změna oproti kontrolní skupině je v grafu značena symbolem * - $P \leq 0,05$, ** - $P \leq 0,01$, *** - $P \leq 0,001$, **** - $P \leq 0,0001$.

5.1.5 Stanovení hodnoty IC₅₀ ICRF-193

Buněčná kultura byla inkubována společně s ICRF-193 ve vzrůstající koncentraci po dobu 72 hodin. Dávkově závislé a statisticky významné snížení buněčné proliferace oproti kontrole představující 100 % buněčné viability bylo pozorováno od koncentrace 0,01 $\mu\text{mol/l}$. Hodnota IC₅₀, tedy koncentrace ICRF-193 navozující 50% inhibici buněčné proliferace ve srovnání s kontrolou, byla 0,15 $\mu\text{mol/l}$. Pokus byl vyhodnocen pomocí MTT testu.



Obr. 5.1.5 Snížení proliferace buněk HL-60 po 72hodinové inkubaci s ICRF-193 ve vzrůstající koncentraci (vyhodnoceno MTT testem)

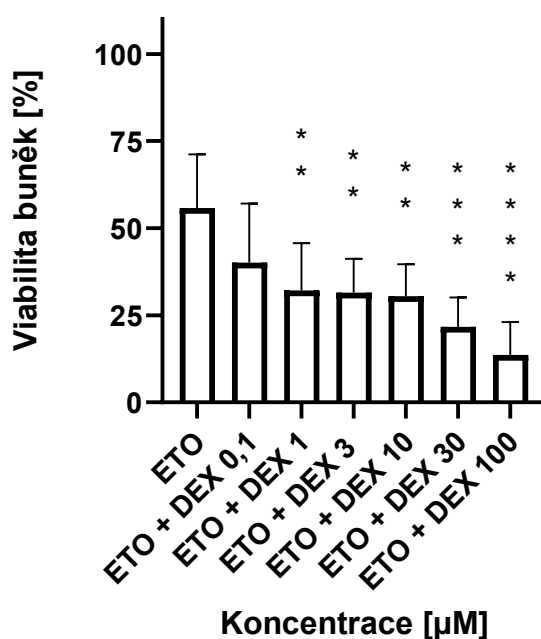
Data byla získána ze čtyř nezávislých experimentů.

V grafu jsou znázorněny průměrné hodnoty měření se standardní odchylkou. Statisticky významná změna oproti kontrolní skupině je v grafu značena symbolem * - $P \leq 0,05$, ** - $P \leq 0,01$, *** - $P \leq 0,001$, **** - $P \leq 0,0001$.

5.2 Stanovení vlivu katalytických inhibitorů TOP2 na antiproliferační účinek ETO

5.2.1 Stanovení vlivu DEX na antiproliferační účinek ETO

Buněčná kultura byla inkubována společně s DEX ve vzrůstající koncentraci a ETO v koncentraci odpovídající jeho IC_{50} po dobu 72 hodin. Bylo zaznamenáno dávkově závislé a statisticky významné snížení proliferace buněk od koncentrace DEX 1 $\mu\text{mol/l}$. Pokus byl vyhodnocen pomocí MTT testu.



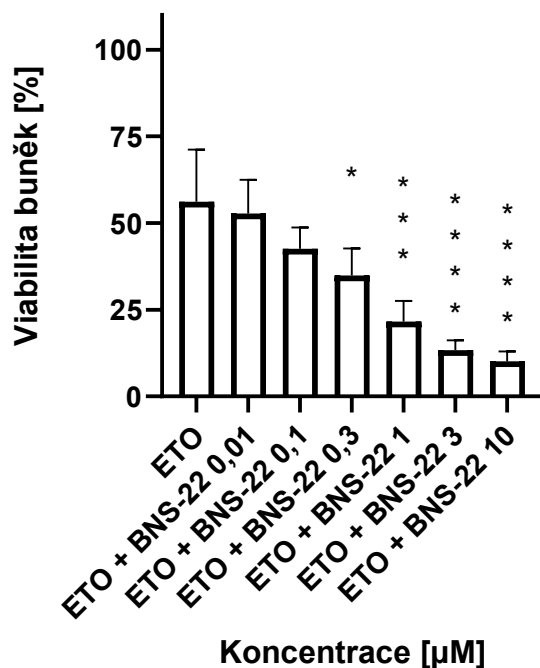
Obr. 5.2.1 Snížení proliferace buněk HL-60 po 72hodinové inkubaci s DEX ve vzrůstající koncentraci a ETO při IC_{50} (vyhodnoceno MTT testem)

Data byla získána ze čtyř nezávislých experimentů.

V grafu jsou znázorněny průměrné hodnoty měření se standardní odchylkou. Statisticky významná změna oproti ETO je v grafu značena symbolem * - $P \leq 0,05$, ** - $P \leq 0,01$, *** - $P \leq 0,001$, **** - $P \leq 0,0001$.

5.2.2 Stanovení vlivu BNS-22 na koncentraci ETO

Buněčná kultura byla inkubována společně s BNS-22 ve vzrůstající koncentraci a ETO v koncentraci odpovídající jeho IC_{50} po dobu 72 hodin. Bylo zaznamenáno dávkově závislé a statisticky významné snížení proliferace buněk od koncentrace BNS-22 0,3 $\mu\text{mol/l}$. Pokus byl vyhodnocen pomocí MTT testu.



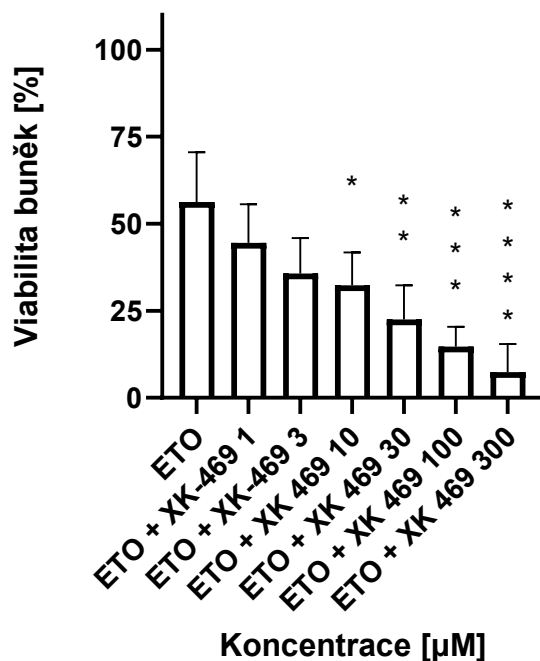
Obr. 5.2.2 Snížení proliferace buněk HL-60 po 72hodinové inkubaci s BNS-22 ve vzrůstající koncentraci a ETO při IC_{50} (vyhodnoceno MTT testem)

Data byla získána ze čtyř nezávislých experimentů.

V grafu jsou znázorněny průměrné hodnoty měření se standardní odchylkou. Statisticky významná změna oproti ETO je v grafu značena symbolem * - $P \leq 0,05$, ** - $P \leq 0,01$, *** - $P \leq 0,001$, **** - $P \leq 0,0001$.

5.2.3 Stanovení vlivu XK-469 na koncentraci ETO

Buněčná kultura byla inkubována společně s XK-469 ve vzrůstající koncentraci a ETO v koncentraci odpovídající jeho IC₅₀ po dobu 72 hodin. Bylo zaznamenáno dávkově závislé a statisticky významné snížení proliferace buněk od koncentrace XK-469 10 μmol/l. Pokus byl vyhodnocen pomocí MTT testu.



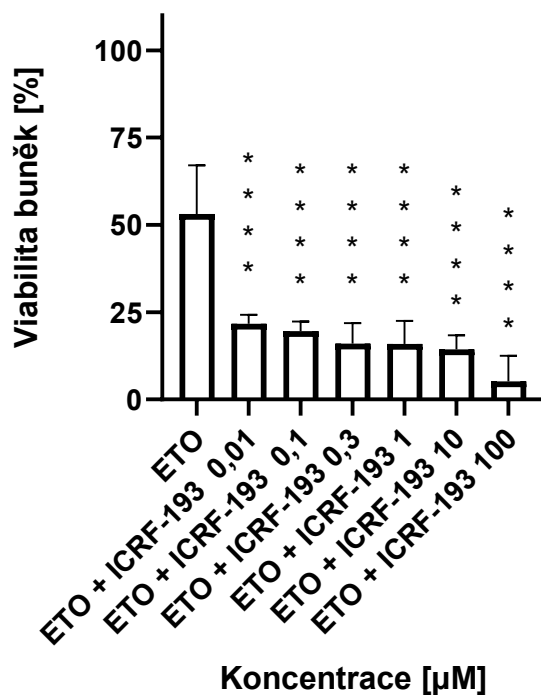
Obr. 5.2.3 Snížení proliferace buněk HL-60 po 72hodinové inkubaci s XK-469 ve vzrůstající koncentraci a ETO při IC₅₀ (vyhodnoceno MTT testem)

Data byla získána ze čtyř nezávislých experimentů.

V grafu jsou znázorněny průměrné hodnoty měření se standardní odchylkou. Statisticky významná změna oproti ETO je v grafu značena symbolem * - $P \leq 0,05$, ** - $P \leq 0,01$, *** - $P \leq 0,001$, **** - $P \leq 0,0001$.

5.2.4 Stanovení vlivu ICRF-193 na koncentraci ETO

Buněčná kultura byla inkubována společně s ICRF-193 ve vzrůstající koncentraci a ETO v koncentraci odpovídající jeho IC₅₀ po dobu 72 hodin. Bylo zaznamenáno dávkově závislé a statisticky významné snížení proliferace buněk od koncentrace ICRF-193 0,01 μmol/l. Pokus byl vyhodnocen pomocí MTT testu.



Obr. 5.2.4 Snížení proliferace buněk HL-60 po 72hodinové inkubaci s ICRF-193 ve vzrůstající koncentraci a ETO při IC₅₀ (vyhodnoceno MTT testem)

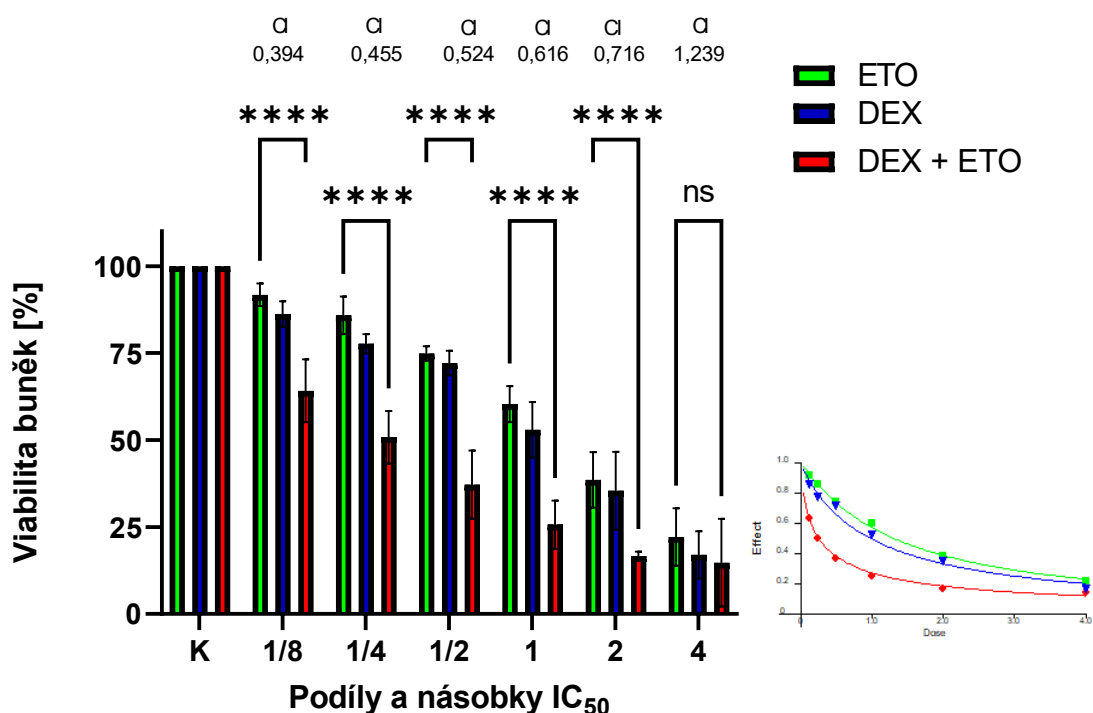
Data byla získána ze čtyř nezávislých experimentů.

V grafu jsou znázorněny průměrné hodnoty měření se standardní odchylkou. Statisticky významná změna oproti ETO je v grafu značena symbolem * - $P \leq 0,05$, ** - $P \leq 0,01$, *** - $P \leq 0,001$, **** - $P \leq 0,0001$.

5.3 Stanovení hodnot kombinačních indexů

5.3.1 Stanovení CI kombinace ETO a DEX

Buněčná kultura byla inkubována společně s ETO, DEX a jejich kombinacím v koncentracích odpovídajících hodnotě IC_{50} a jejím podílům či násobkům po dobu 72 hodin. V programu CalcuSyn jsme vypočítali hodnoty kombinačních indexů (uvedeny v grafu). Můžeme pozorovat výrazný synergistický efekt, který je významný v nižších koncentracích a koncentracích okolo IC_{50} . Oproti tomu ve vyšších koncentracích můžeme vidět náznak antagonismu, který však není statisticky významný. Pokus byl vyhodnocen pomocí MTT testu.



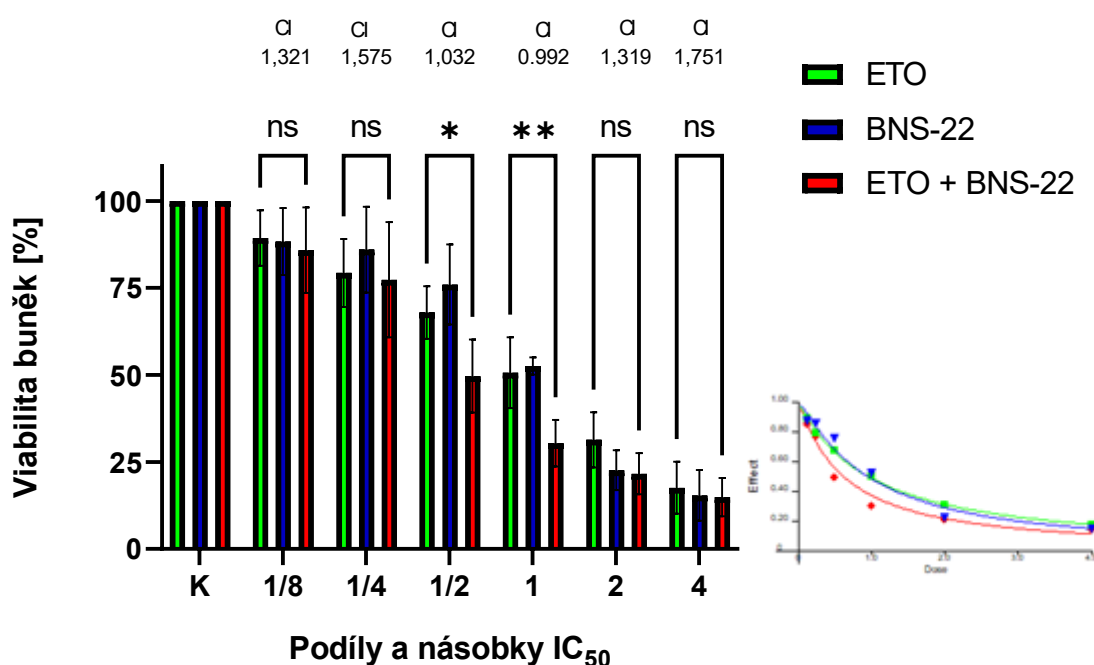
Obr. 5.3.1 Kombinační pokus antiproliferačních účinků ETO, DEX a kombinace obou látek (vyhodnoceno MTT testem)

Data byla získána ze čtyř nezávislých experimentů.

V grafu jsou uvedeny průměrné hodnoty se standardní odchylkou a jednotlivé hodnoty kombinačních indexů pro danou koncentraci.

5.3.2 Stanovení CI kombinace ETO a BNS-22

Buněčná kultura byla inkubována společně s ETO, BNS-22 a jejich kombinacím v koncentracích odpovídajících hodnotě IC_{50} a jejím podílům či násobkům po dobu 72 hodin. V programu CalcuSyn jsme vypočítali hodnoty kombinačních indexů (uvedeny v grafu). Převážně lze pozorovat mírný antagonistický efekt, který však není statisticky významný. Okolo koncentrace IC_{50} je vykazován spíše efekt aditivní, který lze považovat za statisticky významný. Pokus byl vyhodnocen pomocí MTT testu.



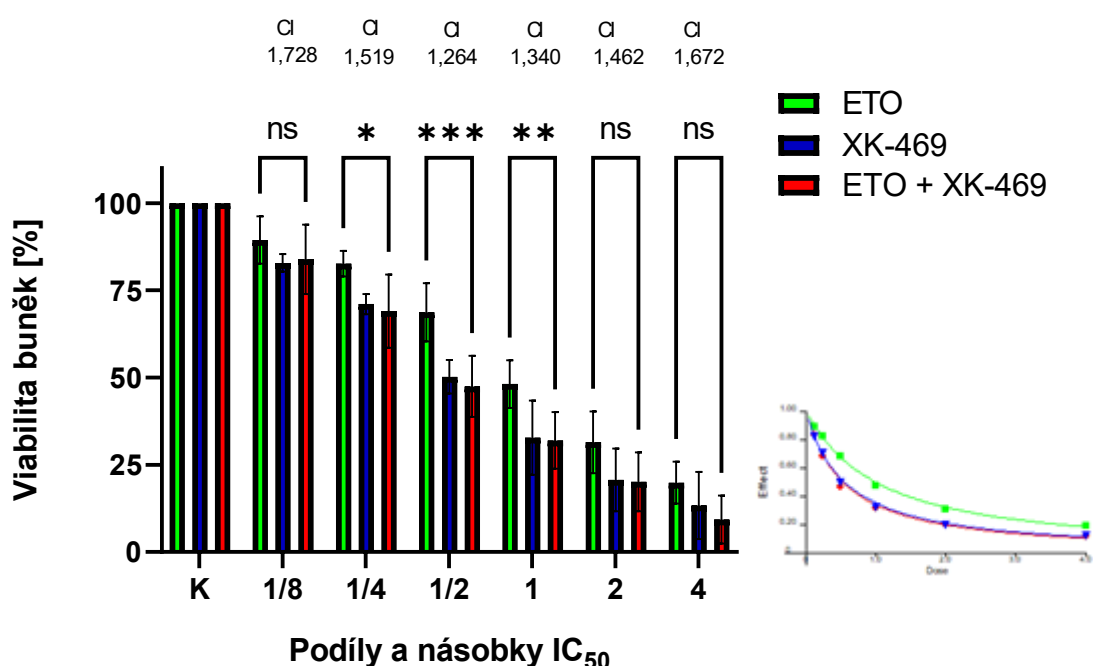
Obr. 5.3.2 Kombinační pokus antiproliferačních účinků ETO, BNS-22 a kombinace obou látek (vyhodnoceno MTT testem)

Data byla získána ze čtyř nezávislých experimentů.

V grafu jsou uvedeny průměrné hodnoty se standardní odchylkou a jednotlivé hodnoty kombinačních indexů pro danou koncentraci.

5.3.3 Stanovení CI kombinace ETO a XK-469

Buněčná kultura byla inkubována společně s ETO, XK-469 a jejich kombinacím v koncentracích odpovídajících hodnotě IC_{50} a jejím podílům či násobkům po dobu 72 hodin. V programu CalcuSyn jsme vypočítali hodnoty kombinačních indexů (uvedeny v grafu). Okolo koncentrace IC_{50} je vykazován statisticky významný aditivní efekt. V nižších a vyšších koncentracích lze pozorovat antagonistický efekt, který však není statisticky významný. Pokus byl vyhodnocen pomocí MTT testu.



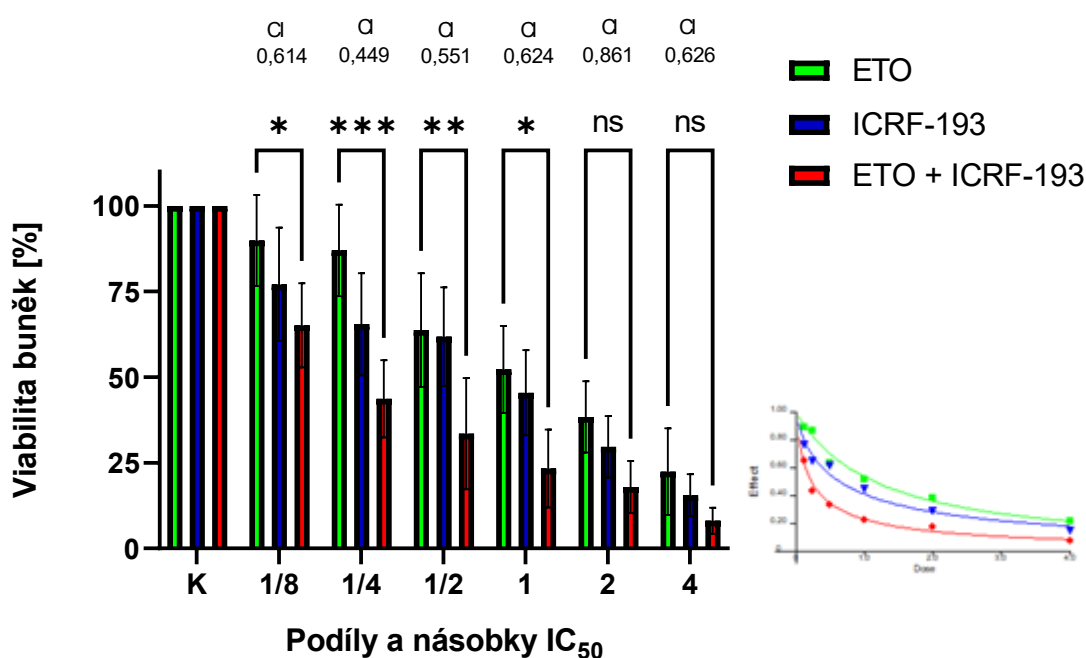
Obr. 5.3.3 Kombinační pokus antiproliferačních účinků ETO, XK-469 a kombinace obou látek (vyhodnoceno MTT testem)

Data byla získána ze čtyř nezávislých experimentů.

V grafu jsou uvedeny průměrné hodnoty se standardní odchylkou a jednotlivé hodnoty kombinačních indexů pro danou koncentraci.

5.3.4 Stanovení CI kombinace ETO a ICRF-193

Buněčná kultura byla inkubována společně s ETO, ICRF-193 a jejich kombinacím v koncentracích odpovídajících hodnotě IC_{50} a jejím podílům či násobkům po dobu 72 hodin. V programu CalcuSyn jsme vypočítali hodnoty kombinačních indexů (uvedeny v grafu). U nižších koncentrací a koncentrací okolo IC_{50} pozorujeme statisticky významný synergistický efekt. Oproti tomu ve vyšších koncentracích převažuje antagonistický efekt, který však není statisticky významný. Pokus byl vyhodnocen pomocí MTT testu.



Obr. 5.3.4 Kombinační pokus antiproliferačních účinků ETO, ICRF-193 a kombinace obou látek (vyhodnoceno MTT testem)

Data byla získána ze tří až čtyř nezávislých experimentů.

V grafu jsou uvedeny průměrné hodnoty se standardní odchylkou a jednotlivé hodnoty kombinačních indexů pro danou koncentraci.

6. Diskuse

ETO je často užíván v kombinační terapii právě s ANT, z tohoto důvodu je nutné prozkoumat působení katalytických inhibitorů nejenom na účinnost ANT, nýbrž i na účinnost ETO. Interference jednotlivých katalytických inhibitorů může ovlivnit i protinádorové působení ETO, z tohoto důvodu bylo nutné tuto možnost blíže prozkoumat (Kuroi a kol., 1997).

Použití DEX jako jediného uznaného kardioprotektiva proti srdeční toxicitě ANT v klinické praxi je díky podezření na snížení protinádorového efektu limitováno. Pokud vezmeme v úvahu společné sdílení TOP2 jako molekulárního cíle pro protinádorové a potenciálně i pro kardioprotektivní působení, je nutno brát tuto možnou interferenci v potaz (Vávrová a kol., 2013). Díky potenciální kompetici na enzymu vyvstává tedy otázka, zda DEX jako katalytický inhibitor TOP skutečně neovlivňuje protinádorovou aktivitu při současném podání protinádorových léčiv. Během prvních preklinických testů nebyl prokázán žádný efekt na protinádorovou aktivitu, později na studii s leukemickými buňkami byl prokázán signifikantní synergistický efekt při současném podávání DEX a ANT, zatímco jiná studie prováděná na nekancerózních křeččích ovariálních buňkách zaznamenala možný antagonismus (Budman a kol., 2001; Hasinoff a kol., 1996).

V průběhu některých dalších studií bylo DEX přisuzováno snížení protinádorové aktivity a užití DEX bylo omezeno na základě doporučení některých onkologických společností. Nebylo doporučováno použití DEX jako adjuvantní terapie pro snížení kardiotoxických účinků ANT. DEX byl používán pouze při překročení kumulativní dávky ANT (Simmons, 2019; Hensley a kol., 2009). Dané výsledky byly opakovaně přezkoumávány, ale nebyl nalezen žádný signifikantní parametr dokazující snížení protinádorové aktivity při současném podávání DEX (Swain & Vici, 2004). Přesto byla pověst DEX zásadně poškozena, ačkoliv ovlivnění protinádorové aktivity při současném podávání DEX nebylo definitivně prokázáno ani vyvráceno (van Dalen a kol., 2011).

Některé studie však ukazují, že DEX je navzdory současným strategiím efektivním kardioprotektivem i u dětských pacientů. Nezvyšuje riziko sekundárních primárních malignit, ačkoliv může být asociován se specifickými reverzibilními toxicitami včetně myelosuprese. Asociace spojená se zvýšenou mortalitou se neukazuje jako opodstatněná, stejně jako obavy z ovlivnění protinádorové aktivity ANT (Reichardt

a kol., 2018). Doporučené postupy v současné době tuto skutečnost však dostatečně nereflektují a užití DEX v terapii tedy zůstává i nadále limitováno (Štěrba a kol., 2013).

Na základě screeningů literatury byly v rámci této práce vybrány a následně testovány další katalytické inhibitory, u kterých bylo možné předpokládat potenciální ovlivnění protinádorového účinku díky kompetici na enzymu TOP2. Klíčové pro zahájení dalších experimentů bylo určení koncentrace IC_{50} . Až po zjištění této přesné koncentrace jsme mohli přejít do další fáze, kde jsme zjišťovali vliv koncentrace inhibitoru na účinnost námi vybraného modelového topoisomerasového jedu (ETO) při jeho IC_{50} a následně probíhala i kombinační studie inhibitorů.

V první fázi našeho pokusu po 72hodinové inkubaci testovaných látek ve vzestupných koncentracích spolu se suspenzí buněčnou linií jsme určovali koncentraci IC_{50} pomocí MTT testu a následně vypočítali přesnou koncentraci pomocí softwaru CalcuSyn. Testované látky vykazovaly významný antiproliferační efekt vůči buněčné linii HL-60, přičemž tento efekt byl jednoznačně dávkově závislý. U všech testovaných látek byly zjištěny statisticky významné antiproliferační účinky, u ETO, ICRF-187 a ICRF-193 již dokonce v nejnižší použité koncentraci. Koncentrace byly vybrány s ohledem na zachování klinicky relevantních hodnot a v co nejširším rozmezí, při kterých bylo testování ještě možno provést.

Po určení koncentrací IC_{50} jsme přešli ke společné inkubaci topoisomerasového jedu spolu s katalytickým inhibitorem opět po dobu 72 hodin, přičemž výsledky byly zpracovány obdobným způsobem jako v první fázi pokusu. Správně nastavená koncentrace IC_{50} topoisomerasového jedu byla zásadní pro správné vyhodnocení výsledků a samotné provedení dalších fází pokusu. Pozorovali jsme působení ETO jak samostatně, tak v kombinaci s katalytickými inhibitory ve vzestupné koncentraci, přičemž žádný z testovaných inhibitorů nevykazoval snížení účinku ETO. Naopak se zdá, že všechny námi testované katalytické inhibitory zvyšují antiproliferační účinnost ETO jako TOP2 jedu v hodnotě své IC_{50} . Naše výsledky lze porovnat i s výsledky z jiné studie (Vávrova a kol., 2013), kde zkoumané katalytické inhibitory (mimo jiné i DEX) příznivě modulovaly toxicitu ANT na srdeční buňky a leukemické rakovinné buňky. Možným vysvětlením tohoto děje je již zmíněné cílení na rozdílné isoformy TOP2 v těchto buňkách. Pro účely naší práce zde není kardioprotektivní působení katalytických

inhibitorů tak významné, jako samotná senzitivizace rakovinných buněk vůči protinádorovým léčivům.

Obdobných výsledků bylo dosaženo i ve studii zaměřené na účinky nových katalytických inhibitorů TOP2 *in vitro*, přičemž však testovanou protinádorovou látkou nebyl ETO, nýbrž DAU. Podobných výsledků bylo dosaženo u látek BNS-22 a XK-469. I zde je potvrzená zvýšená antiproliferační účinnost při kombinaci zmíněných katalytických inhibitorů spolu s protinádorovým léčivem oproti samostatně působícímu léčivu (Trnka, 2020).

Výsledky uvedených studií se ukazují být relevantním srovnáním v rámci porovnání účinku ANT a katalytických inhibitorů vůči námi zkoumanému ETO a katalytických inhibitorů. V obou případech se snížení antiproliferační účinnosti při současném působení katalytických inhibitorů neukazuje jako relevantní. Naopak všechny námi testované katalytické inhibitory vykazují možnou senzitivizaci rakovinných buněk vůči protinádorové léčbě oproti samostatně působícímu ETO. To by hypoteticky mohlo vést ke snížení podávaných dávek protinádorových léčiv a následně tedy i ke sníženému či oddálenému projevu nežádoucích účinků, které jsou jak v případě ANT, tak ETO dávkově závislé.

Pro přesnější stanovení antiproliferační účinnosti ETO při současném působení katalytických inhibitorů TOP2 byly stanoveny kombinační indexy s využitím programu CalcuSyn, určující stupeň interference a společné interakce dvou a více látek. Během stanovení kombinačních indexů se využívá podílů a násobků IC_{50} testovaných látek, přesněji tedy 1/8; 1/4; 1/2; 1; 2; 4 koncentrace IC_{50} , přičemž výsledné kombinační indexy mohou být rovny 1 (účinek aditivní), menší než 1 (účinek synergistický), anebo větší než 1 (účinek antagonistický) dle metody Chou-Talalay (Chou & Talalay, 1983; Chou & Talalay, 1984).

Na základě zjištěných hodnot lze lépe pozorovat měnící se vztah látek v jednotlivých násobcích a podílech. U látek BNS-22 a XK-469 nejsou výsledky jednoznačné, lze pozorovat aditivní účinky při koncentracích odpovídajícím 1/2 IC_{50} a 1 IC_{50} , u všech zbývajících násobků a podílů odpovídají hodnoty kombinačních indexů spíše antagonistickému účinku, ten se však neukázal být statisticky významným.

U látek ICRF-187 a ICRF-193 lze pozorovat synergistické účinky, které jsou v souladu s předchozími daty a potvrzují tedy zvýšenou protinádorovou účinnost ETO při současné inkubaci spolu s těmito katalytickými inhibitory.

Bisdioxopiperazinový inhibitor TOP2 ICRF-193, který je strukturně odvozeným analogem DEX (ICRF-183) vykazuje synergistické působení. Některé výzkumy poukazují na silnější působení ICRF-193 oproti DEX, a to včetně silnější inhibice TOP2 a silnější kardioprotektivnímu působení vůči ANT (Bavlovič Piskáčková a kol., 2021; Jirkovská a kol., 2021). Náš výzkum potvrzuje silné synergistické působení ICRF-193 v kombinaci s ETO, které je srovnatelné s působením DEX (ICRF-183).

Tyto zjištěné poznatky jsou v souladu i s dalšími nově vydanými studiemi, kde již zkoumají kardioprotektivní působení ICRF-193 v kombinaci s all *trans* retinoic acid (ATRA).

ATRA se zdají být terapeuticky přínosné v léčbě akutní promyelotické leukémie (APL) jako subtypu akutní myeloidní leukémie (AML). Katalytický inhibitor ICRF-187 je často používán jako kardioprotektant u pediatrických pacientů trpících AML léčených ANT a s jeho užitím je spojený pokles mortality u těchto pacientů. V rámci této studie zkoumají přínos katalytických inhibitorů TOP2 v kombinaci s ATRA u pediatrických pacientů trpících AML, nově je zkoušena i kombinace s ICRF-193, který v této studii nahrazuje standardně užívaný ICRF-187 (Norris a kol., 2021).

Zajímavé je také zhodnocení přístupu vůči topoisomerasovým jedům v širším časovém měřítku a postupné zkoušení nových experimentálních kombinací. U ETO bylo zaznamenáno synergistické působení v kombinaci s některými dalšími cytotoxickými léčivými. Největší pozornost byla dlouhou dobu věnována jeho kombinačnímu působení s cisplatinou. Kombinace byla studována *in vitro* a na některých zvířecích modelech, kde bylo prokázáno zvláště významné synergistické působení.

Následně byla vysoká pozornost věnována i inhibitorům typu TOPI, jmenovitě například kombinace ETO s topotekanem. Dále se zkoumalo jeho působení i s některými dalšími látkami, včetně cytokinů a retinoové kyseliny, kdy se obě kombinace prokázaly jako zvyšující účinek ETO. Proběhl i experiment, ve kterém bylo použito jak inhibitorů typu TOPI v kombinaci s ETO, tak inhibitorů typu TOP2 v kombinaci s ETO, nicméně výsledné působení bylo zhodnoceno jako antagonistické (Joel, 1996).

Ačkoliv je tato studie již staršího data, je zajímavé dát ji do kontextu s novými experimenty, ve kterých se studuje kombinace katalytických inhibitorů spolu s ATRA, které byly ve starších experimentech dávány do kombinace právě s ETO a jejich působení bylo vyhodnoceno jako synergistické.

Katalytické inhibitory se dostávají do popředí zájmu, přičemž se zdá, že jim dříve přisuzovaná obava ze snížení protinádorového účinku, která byla opakovaně prokazovaná především u starších studií, není opodstatněná. Ba naopak, katalytické inhibitory se jeví jako látky potenciálně zvyšující antiproliferační aktivitu protinádorových léčiv. Pro vyvození závěrů je nutné provést další studie, nicméně zatím působí jako látky s vysokým potenciálem, které by měly být dále zkoumány a studovány.

7. Závěr

Obavy ze sníženého protinádorového účinku ETO při současném podávání inhibitorů se ukázaly v rámci této práce jako neopodstatněné. Naopak je zřejmé, že všechny námi studované inhibitory mohou protinádorovou účinnost ETO podporovat, a nikoliv ji snižovat. Dokonce se zdá, že podávané dávky ETO by mohly být potenciálně v kombinaci s inhibitorem sníženy. Při snížení podávané dávky by mohlo dojít k omezení nežádoucích účinků či minimálně jejich oddálení. Důvodem je skutečnost, že nežádoucí účinky související s užitím ETO jsou obvykle dávkově závislé.

Další výzkum a studie katalytických inhibitorů by mohl být významným milníkem pro léčbu onkologických pacientů, přičemž přínosný není pouze jejich kombinační protinádorový účinek, nýbrž i možné kardioprotektivní působení. Blokace či degradace TOP2 β by měly být studovány v rámci nových postupů v klinické praxi u strategií zabývajících se primární prevencí kardiotoxicity indukované ANT. Naše studie by tedy mohla sloužit jako cenný základ pro následné kardioprotekční studie a snad i pro následné zvážení nových přístupů v rámci terapie.

Katalytické inhibitory se stávají významnou oblastí studia kombinační protinádorové léčby a do budoucna se jeví jako látky s vysokým potenciálem pro užití v klinické praxi v rámci onkologické péče.

8. Seznam zkratek

AML	akutní myeloidní leukémie
APL	akutní promyelocytární leukémie
ANT	antracyklin
ATP	adenosintrifosfát
ATRA	all <i>trans</i> retinoic acid
CI	kombinační index
DAU	daunorubicin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DEX	dexrazoxan
DOX	doxorubicin
EDTA	ethylendiamidtetraoctová kyselina
ETO	etoposid
FBS	fetální bovinní sérum
IC ₅₀	koncentrace způsobující 50% inhibici buněčné proliferace
MDS	myelodysplastický syndrom
MLL	myeloidní/lymfoidní leukémie
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
PML	promyelocytární leukémie
ROS	reaktivní formy kyslíku
TOP	topoisomerasa
TOP 2	topoisomerasa 2
iTOP	inhibitor topoisomerasy
hTOP	lidská topoisomerasa

typ TOPI	topoisomerasa I. typu
typ TOPII	topoisomerasa II. typu

9. Literatura

- Arpa, P., Beardmore, C. a Liu, L. (1990) „Involvement of Nucleic Acid Synthesis in Cell Killing Mechanisms of Topoisomerase Poisons" *Cancer Research*, 50, 6919-6924.
- Austin, C. A., Marsh, K. L., Wasserman, R. A., Willmore, E., Sayer, P. J., Wang, J. C., Fisher, L. M. (1995) „Expression, domain structure, and enzymatic properties of an active recombinant human DNA topoisomerase II β " *Journal of Biological Chemistry*, 270, 15739-15746.
- Austin, C. A., Lee, K. C., Swan, R. L., Khazeem, M. M., Manville, C. M., Cridland, P., Treumann, A., Porter, A., Morris, N. J., Cowell, I. G. (2018) „TOP2B: The first thirty years", *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 2765.
- Azarova, A. M., Lyu, Y. L., Lin, C. P., Tsai, Y. C., Lau, J. Y. N., Wang, J. C. & Liu, L. F. (2007) „Roles of DNA topoisomerase II isozymes in chemotherapy and secondary malignancies", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 11014-11019.
- Bailly, C. (2012) „Contemporary challenges in the design of topoisomerase II inhibitors for cancer chemotherapy" *Chemical Reviews*, 112, 3611-3640.
- Baldwin, E. L. a Osheroff, N. (2005) „Etoposide, topoisomerase II and cancer" *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 5, 363-372.
- Bavlovič Piskáčková, H., Jansová, H., Kubeš, J., Karabanovich, G., Váňová, N., Kollárová-Brázdová, P., Melnikova, I., Jirkovská, A., Lenčová-Popelová, O., Chládek, J., Roh, J., Šimůnek, T., Štěřba, M. & Štěřbová-Kolaříková, P. (2021) „Development of water-soluble prodrugs of the bisdioxopiperazine topoisomerase II β inhibitor ICRF-193 as potential cardioprotective agents against anthracycline cardiotoxicity", *Scientific Reports*, 11, 4456.

- Kollárová-Brázdová, P., Jirkovská, A., Karabanovich, G., Pokorná, Z., Bavlovič Piskáčková, H., Jirkovský, E., Kubeš, J., Lenčová-Popelová, O., Mazurová, Y., Adamcová, M, Skalická, V., Štěrbová-Kolaříková, P., Roh, J., Šimůnek, T., Štěrba, M. (2020), „Investigation of structure- activity relationship of dexrazoxane analogues reveals topoisomerase II β interaction as a prerequisite for effective protection against anthracycline cardiotoxicity." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 373, 402-415.
- Budman, D. R., Calabro, A. & Kreis, W. (2001) „In vitro effects of dexrazoxane (Zinecard) and classical acute leukemia therapy: Time to consider expanded clinical trials?" *Leukemia*, 15, 1517-1520.
- Burden, D. A. & Osheroff, N. (1998) „Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme" *Biochimica et Biophysica Acta*, 1400, 139-154.
- Capranico, G., Marinello, J. & Chillemi, G. (2017) „Type I DNA Topoisomerases", *Journal of Medicinal Chemistry*, 60, 2169-2192.
- Champoux, J. J. (2001) „DNA Topoisomerases: Structure, Function, and Mechanism", *Annual Review of Biochemistry*, 70, 369-413.
- Chen, S. H., Chan, N. L. & Hsieh, T. S. (2013) „New mechanistic and functional insights into DNA topoisomerases" *Annual Review of Biochemistry*, 82, 139-170.
- Chou, T. C., & Talalay, P. (1983) „Analysis of combined drug effects – a new look at a very old problem" *Trends in Pharmacological Sciences*, 4, 450-454.
- Chou, T. C., & Talalay, P. (1984) „Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors" *Advances in Enzyme Regulation*, 22, 27-55.
- Corbett, K. D. & Berger, J. M. (2004) „Structure, molecular mechanisms, and evolutionary relationships in DNA topoisomerases" *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 33, 95-118.

- van Dalen, E. C., Caron, H. N., Dickinson, H. O., Kremer, L. C. M. (2011) „Cardioprotective interventions for cancer patients receiving anthracyclines" *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 6, CD003917.
- Delgado, J. L., Hsieh, C., Chan, N., Hiasa, H. (2018) „Topoisomerases as anticancer targets" *Biochemical Journal*, 475, 373-398.
- Deweese, J. E. & Osheroff, N. (2009) „The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: Wolf in sheep's clothing" *Nucleic Acids Research*, 37, 738-748.
- Drake, F. H., Zimmerman, J. P., McCabe, F. L., Bartus, H. F., Per, S. R., Sullivan, D. M., Ross, W. E., Mattern, M. R., Johnson, R. K., Crooke, S. T. (1987) „Purification of topoisomerase II from amsacrine-resistant P388 leukemia cells. Evidence for two forms of the enzyme" *Journal of Biological Chemistry*, 262, 16739-16747.
- Froelich-Ammon, S. J. & Osheroff, N. (1995) „Topoisomerase poisons: Harnessing the dark side of enzyme mechanism" *Journal of Biological Chemistry*, 270, 21429-21432.
- Gill, D. & Zaidi, S. (2017) „Rare cause of cardiotoxicity" *Global Drugs and Therapeutics*, 2, 1-2.
- Gonzalez, R. E., Lim, C. U., Cole, K., Bianchini, C. H., Schools, G. P., Davis, B. E., Wada, I., Roninson, I. B., Broude, E. V. (2011) „Effects of conditional depletion of topoisomerase II on cell cycle progression in mammalian cells" *Cell Cycle*, 10, 3505-3514.
- Hande, K. R. (1998) „Clinical Oncology Update Etoposide: Four Decades of Development of a Topoisomerase II Inhibitor", *European Journal of Cancer*, 34, 1514-1521.
- Hasinoff, B. B., Yalowich, J. C., Ling Y., Buss, J. L. (1996) „The effect of dexrazoxane (ICRF-187) on doxorubicin- and daunorubicin-mediated growth inhibition of Chinese hamster ovary cells" *Anticancer Drugs*, 7, 558-567.

- Hasinoff, B. B. & Herman, E. H. (2007) „Dexrazoxane: How it works in cardiac and tumor cells. Is it a prodrug or is it a drug?" *Cardiovascular Toxicology*, 7, 140-144.
- Hensley, M. L., Hagerty, K. L., Kewalramani, T., Green, D. M., Meropol, N. J., Wasserman, T. H., Cohen, G. I., Emami, B., Gradishar, W. J., Mitchell, R. B., Thigpen, J. T., Trotti, A., van Hoff, D., Schuchter, L. M. (2009) „American society of clinical oncology 2008 clinical practice guideline update: Use of chemotherapy and radiation therapy protectants" *Journal of Clinical Oncology*, 27, 127-145.
- Hu, T., Sage, H. & Hsieh, T. (2002) „ATPase Domain of Eukaryotic DNA Topoisomerase II" *Journal of Biological Chemistry*, 277, 5944-5951.
- Huang, K., Gao, H., Yamasaki, E. F., Grabowski, D. R., Liu, S., Shen, L. L., Chan, K. K., Ganapathi, R., Snapka, R. M. (2001) „Topoisomerase II Poisoning by ICRF-193 *" *Journal of Biological Chemistry*, 276, 44488-44494.
- Jirkovská-Vávrová, A., Roh, J., Lenčová-Popelová, O., Jirkovský, E., Hrušková, K., Potůčková-Macková E., Jansová, H., Hašková, P., Martinková, P., Eisner, T., Šůs, J., Macháček, M., Vostatková-Tichotová, L., Geršl, V., Kalinowski, D. S., Muller, M. T., Richardson, D. R., Vávrová, K., Štěrba, M., Šimůnek, T. (2015) „Synthesis and analysis of novel analogues of dexrazoxane and its open-ring hydrolysis product for protection against anthracycline cardiotoxicity in vitro and in vivo" *Toxicology Research*, 4, 1098-1114.
- Jirkovská, A., Karabanovich, G., Kubeš, J., Skalická, V., Melnikova, I., Korábečný, J., Kučera, T., Jirkovský, E., Nováková, L., Bavlovič Piskáčková, H., Škoda, J., Štěrba, M., Austin, C. A., Šimůnek, T., Roh, J. (2021) „Structure–Activity Relationship Study of Dexrazoxane Analogues Reveals ICRF-193 as the Most Potent Bisdioxopiperazine against Anthracycline Toxicity to Cardiomyocytes Due to Its Strong Topoisomerase II β Interactions" *Journal of Medicinal Chemistry*, 64, 3997-4019.
- Joel, S. (1996) „The clinical pharmacology of etoposide: an update" *Cancer Treatment Reviews*, 22, 179-221.

- Nitiss, J. L. (2009) „Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy" *Nature Reviews Cancer*, 9, 338-350.
- Jones, R. L. (2014) „Utility of dexrazoxane for the reduction of anthracycline-induced cardiotoxicity" *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 6, 1311-1317.
- Kathiravan, M. K., Khilare, M. M., Nikoomanesh, K., Chothe A. S. & Jain, K. S. (2013) „Topoisomerase as target for antibacterial and anticancer drug discovery" *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 28, 419-435.
- Kawatani, M., Takayama, H., Muroi, M., Kimura, S., Maekawa, T., Osada, H. (2011) „Article Identification of a Small-Molecule Inhibitor of DNA Topoisomerase II by Proteomic Profiling" *Chemistry & Biology*, 18, 743-751.
- Kreuzer, K. N. & Cozzarelli, N. R. (1979) „Escherichia coli mutants thermosensitive for deoxyribonucleic acid gyrase subunit A: Effects on deoxyribonucleic acid replication, transcription, and bacteriophage growth" *Journal of Bacteriology*, 140, 424-435.
- Kuroi, K., Osaki, A., Kawami, H., Murakami, S. & Toge, T. (1997) „A combination therapy with mitomycin C, etoposide, doxifluridine and medroxyprogesterone acetate as second line therapy for advanced breast cancer refractory to combination chemotherapy of cyclophosphamide, doxorubicin and 5-fluorouracil" *Breast Cancer*, 4, 115-119.
- Larsen, A. K., Escargueil, A. E. & Skladanowski, A. (2003) „Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy" *Pharmacology & Therapeutics*, 99, 167-181.
- Lorusso, P. M., Parchment, R., Demehik, L., Knight, J., Polin, L., Dzubow, J., Behrens, C., Harrison, B., Trainor, G., Corbett, T. H. (1999) „Preclinical antitumor activity of XK469 (NSC 656889)" *Investigational New Drugs*, 16, 287-296.
- Montecucco, A., Zanetta, F. & Biamonti, G. (2015) „Molecular mechanisms of etoposide" *Experimental and Clinical Sciences Journal*, 14, 95-108.

- Nemade, H., Chaudhari, U., Acharya, A., Hescheler, J., Hengstler, J. G., Papadopoulos, S. & Sachinidis, A. (2018) „Cell death mechanisms of the anti-cancer drug etoposide on human cardiomyocytes isolated from pluripotent stem cells" *Archives of Toxicology*, 92, 1507-1524.
- Norris, E. J., Patel, Y. C., Klotz, K. E., Steuerwald, N., Jones, W. D., Maciejewski, J. P., Ganapathi, R. N. & Ganapathi, M. K. (2021) „Dexrazoxane enhances efficacy of all-trans retinoic acid in acute myeloid leukemia patient blast cells and cell lines" *Leukemia & Lymphoma*, 62, 473-477.
- Pedersen-Bjergaard, J., Andersen, M. K., Christiansen, D. H., Nerlov, C. (2002) „Genetic pathways in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia" *Blood: Journal of American Society of Hematology*, 99, 1909-1912.
- Pendleton, M., Lindsey Jr, R. H., Felix C. A., Grimwade, D., Osheroff, N. (2015) „Topoisomerase II and leukemia" *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1310, 98-110.
- Pogorelnik, B., Perdih, A. & Solmajer, T. (2013) „Recent Developments of DNA Poisons - Human DNA Topoisomerase II α Inhibitors - as Anticancer Agents" *Current Pharmaceutical Design*, 19, 2474-2488.
- Pommier, Y., Leo, E., Zhang, H. L., Marchand, C. (2010) „DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs" *Chemistry & Biology*, 17, 421-433.
- Pommier, Y. (2013) „Drugging Topoisomerases: Lessons and Challenges" *American Chemical Society Chemical Biology*, 8, 82-95.
- Pommier, Y., Sun, Y., Huang, S. N. & Nitiss, J. L. (2016) „Roles of eukaryotic topoisomerases in transcription, replication and genomic stability" *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17, 703-721.
- Ratain, M. J. & Rowley, J. (1992) „Review Therapy-related acute myeloid leukemia secondary to inhibitors of topoisomerase II: From the bedside to the target genes" *Annals of Oncology*, 3, 107-111.

- Reichardt, P., Tabone, M., Mora, J., Morland, B., Jones, R. L. (2018) „Risk-benefit of dexrazoxane for preventing anthracycline-related cardiotoxicity: re-evaluating the European labeling" *Future Oncology*, 14, 2663-2676.
- Simmons, C. E. (2019) „Overcoming Inertia to Tame the Red Devil" *Journal of the American College of Cardiology: CardioOncology*, 1, 80-83.
- Stähelin, H. F. & von Wartburg, A. (1991) „The Chemical and Biological Route from Podophyllotoxin Glucoside to Etoposide: Ninth Cain Memorial Award Lecture" *Cancer Research*, 51, 5-15.
- Stock, W., Undevia, S. D., Bivins, C., Ravandi, F. (2008) „A phase I and pharmacokinetic study of XK469R (NSC 698215), a quinoxaline phenoxypropionic acid derivative, in patients with refractory acute leukemia" *Invest New Drugs*, 26, 331-338.
- Šimůnek, T., Štěřba, M., Popelová, O., Adamcová, M., Hrdina, R., Geršl, V. (2009) „Anthracycline-induced cardiotoxicity: Overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron" *Pharmacological Reports*, 61, 154-171.
- Štěřba, M., Popelová, O., Vávrová, A., Jirkovský, E., Kovaříková, P., Geršl, V., Šimůnek, T. (2013) „Oxidative stress, redox signaling, and metal chelation in anthracycline cardiotoxicity and pharmacological cardioprotection" *Antioxidants & Redox Signaling*, 18, 899-929.
- Swain, S. M. & Vici, P. (2004) „The current and future role of dexrazoxane as a cardioprotectant in anthracycline treatment: expert panel review" *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 130, 1-7.
- Trnka, T., (2020) „In vitro studie nových katalytických inhibitorů topoisomerasy II", diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.
- Vávrová, A. & Šimůnek, T. (2012) „DNA topoisomerase II β : A player in regulation of gene expression and cell differentiation" *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44, 834-837.

- Vávrová, A., Jansová, H., Macková, E., Macháček, M., Hašková, P., Tichotová, L., Štěrbá, M., Šimůnek, T. (2013) „Catalytic Inhibitors of Topoisomerase II Differently Modulate the Toxicity of Anthracyclines in Cardiac and Cancer Cells" *PLoS ONE*, 8, e76676.
- Vejpongsa, P. & Yeh, E. T. H. (2014) „Topoisomerase 2 β : A promising molecular target for primary prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity" *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 95, 45-52.
- Volkova, M. & Russell, R. (2011) „Anthracycline Cardiotoxicity: Prevalence, Pathogenesis and Treatment" *Current Cardiology Reviews*, 7, 214-220.
- Vong, L. B., Kimura, S. & Nagasaki, Y. (2017) „Newly Designed Silica-Containing Redox Nanoparticles for Oral Delivery of Novel TOP2 Catalytic Inhibitor for Treating Colon Cancer" *Advanced Healthcare Materials*, 6.
- Wang, J. C. (2002) „Cellular roles of DNA topoisomerases: A molecular perspective" *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3, 430-440.
- Wu, C. C., Li, T. K., Farh, L., Lin, L. J., Lin, T. S., Yu, Y. J., Yen, T. J., Chiang, C. W., Chan, N. L. (2011) „Structural basis of type II topoisomerase inhibition by the anticancer drug etoposide" *Science*, 333, 459-462.
- Yao, B.L., Mai, Y.W., Chen, S. B., Xie, H. T., Yao, P. F., Ou, T. M., Tan, J. H., Wang, H. G., Li, D. Huang, S. L., Gu, L. Q., Huang, Z. S., (2015) „Design, synthesis, and biological evaluation of novel 7-alkylamino substituted benzo[a]phenazin derivatives as dual topoisomerase I/II inhibitors" *European Journal of Medicinal Chemistry*, 92, 540-553.
- Yeh, E. T. H., Swer, M .S., Moslehi, J., Dlugosz-Danecka, M., Banchs, J., Chang, H. M., Minotti, G. (2019) „Mechanisms and clinical course of cardiovascular toxicity of cancer treatment I . Oncology", *Seminars in Oncology*, 46, 397-402.

- Yi, L. L., Kerrigan, J. E., Lin, C. P., Azarova, A. M., Tsai, Y. C., Ban, Y., Liu, L. F. (2007) „Topoisomerase II β -mediated DNA double-strand breaks: Implications in doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dexrazoxane" *Cancer Research*, 67, 8839-8846.