

UNIVERZITA KARLOVA

Lékařská fakulta v Hradci Králové

DISERTAČNÍ PRÁCE

Doktorský studijní program

Lékařská farmakologie

**NOVÉ MOŽNOSTI KARDIOPROTEKCE
U ANTRACYKLINOVÉ KARDIOTOXICITY**

New possibilities of cardioprotection in anthracycline cardiotoxicity

Mgr. Petra Kollárová

Školitel: doc. PharmDr. Martin Štěrba, Ph.D.

Hradec Králové, 2022

Prohlášení

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy, Praha.

Hradec Králové, 2022

Mgr. Petra Kollárová

Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat mému školiteli **doc. PharmDr. Martinu Štěrbovi, Ph.D.** za vstřícný a přátelský přístup, konzultace, cenné rady a připomínky, trpělivost, a především vedení v celém průběhu mého studia a při vzniku této disertační práce.

Dále bych chtěla poděkovat dalším členům našeho týmu, současným i minulým, a to hlavně **PharmDr. Olze Lenčové, Ph.D.**, **Mgr. Zuzaně Pokorné, Bc. Kláře Lindrové** a **PharmDr. Eduardu Jirkovskému, Ph.D.** za výbornou spolupráci a pomoc s *in vivo* experimenty i molekulárními analýzami. A spolu s nimi také děkuji všem ostatním **kolegům z Ústavu farmakologie Lékařské fakulty v Hradci Králové** za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Mé poděkování patří také **kolegům z Farmaceutické fakulty v Hradci Králové**, se kterými náš tým dlouhodobě spolupracuje na řešení různých grantových projektů – především se jedná o **skupiny doc. PharmDr. Jaroslava Roha, Ph.D.** (Katedra organické a bioorganické chemie), **prof. PharmDr. Tomáše Šimůnka, Ph.D.** (Katedra biochemických věd) a **doc. PharmDr. Petry Štěrbové, Ph.D.** (Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy).

A v neposlední řadě bych chtěla poděkovat **mé rodině a mému manželovi Honzovi** za jejich lásku, podporu, pomoc a trpělivost, které mi prokazovali v průběhu celého mého studia.

Tato disertační práce vznikla za finanční podpory následujících grantových agentur a institucí: GAČR 21-16195S, GAČR 18-08169S, GAUK 680216, PROGRES Q40/5, SVV 260 397 a projekt InoMed reg. č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/18_069/0010046: Předaplikační výzkum inovativních léčiv a medicínských technologií spolufinancovaný z ERDF.

OBSAH

1. ÚVOD	1
1.1. Antracykliny	1
1.1.1. Cesty podání a farmakokinetika	2
1.1.2. Současné indikace	3
1.1.3. Mechanismus protinádorového účinku	3
1.1.4. Nežádoucí účinky a toxicity	4
1.2. Kardiotoxicita antracyklinů	4
1.2.1. Mechanismy vzniku chronické antracyklinové kardiotoxicity	6
1.2.2. Možnosti omezení antracyklinové kardiotoxicity	10
1.3. Úvod do farmakologické kardioprotekce	11
1.3.1. Antioxidanty	12
1.3.2. Chelátory železa	12
1.3.3. Další zkoumaná kardioprotektiva.....	14
1.4. Dexrazoxan	14
1.4.1. Historie	14
1.4.2. Farmakokinetika a metabolismus.....	15
1.4.3. Důkazy o kardioprotektivní účinnosti v experimentu a klinických studiích..	16
1.4.4. Mechanismy účinku	17
1.4.5. Nežádoucí účinky a pochybnosti o snížení protinádorového účinku a navození sekundárních malignit	19
1.4.6. Současné užití v klinické praxi.....	20
1.5. Další bisdioxopiperazinové deriváty	20
1.5.1. Kardioprotektivní účinky <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i>	21
2. CÍLE PRÁCE	25
3. VÝSLEDKY – komentáře k publikovaným pracím s uvedením podílu studentky	26

3.1. Komentář k Publikaci č. 1.....	26
3.2. Komentář k Publikaci č. 2.....	29
3.3. Komentář k Publikaci č. 3.....	32
4. DISKUSE.....	35
5. ZÁVĚRY.....	45
6. SEZNAM CITACÍ POUŽITÉ LITERATURY	47
7. PŘÍLOHY.....	60

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACEi	inhibitor angiotenzin konvertujícího enzymu
ANT	antracyklin
c_{max}	maximální koncentrace
DAU	daunorubicin
DDR	molekulární signalizace odpovídající na poškození DNA (<i>DNA damage response</i>)
DEX	dexrazoxan, ICRF-187
DOX	doxorubicin
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EMA	Evropská léková agentura (<i>European Medicines Agency</i>)
GK-580	bisdioxopiperazinový derivát 4-(2-(3,5-dioxopiperazin-1-yl)ethyl)-3-methylpiperazin-2,6-dion
GK-5954	bisdioxopiperazinový derivát 4-(2-(3,5-dioxopiperazin-1-yl)ethyl)-3-ethylpiperazin-2,6-dion
GK-627	bisdioxopiperazinový derivát (\pm)-4,4'-(propan-1,2-diyl)bis(1-methylpiperazin-2,6-dion)
GK-635	bisdioxopiperazinový derivát 4,4'-(propan-1,2-diyl)bis(1-benzylpiperazin-2,6-dion)
GK-638	bisdioxopiperazinový derivát (\pm)-4,4'-(propan-1,2-diyl)bis(1-ethylpiperazin-2,6-dion)
GK-639	bisdioxopiperazinový derivát 4,4'-(propan-1,2-diyl)bis(1-izopropylpiperazin-2,6-dion)
GK-667	bisdioxopiperazinový derivát <i>meso</i> -(butan-2,3-diyl)bis(2,6-dioxopiperazin-4,1-diyl)bis(methylen)-bis(2-aminoacetát) hydrochlorid
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
HFrEF	srdeční selhání se sníženou ejekční frakcí (<i>heart failure with reduced ejection fraction</i>)
<i>i.p.</i>	intraperitoneální podání
<i>i.v.</i>	intravenózní podání
LK	levá komora
MDM2	E3 ubikvitin-protein ligáza Mdm2
NO	oxid dusnatý

NVCM	izolované neonatální potkaní komorové kardiomyocyty (<i>neonatal rat ventricular cardiomyocytes</i>)
•O ₂ ⁻	superoxidový aniont
•OH	hydroxylový radikál
<i>p.o.</i>	perorální podání
p21	cyklin-dependentní kinázový inhibitor 1A (gen <i>CDKN1A</i>)
p53	tumor supresorový gen/protein p53
ROS	reaktivní formy kyslíku (<i>reactive oxygen species</i>)
SOD	superoxiddismutáza
SPC	souhrn údajů o přípravku (<i>summary of product characteristics</i>)
TOP2	topoizomeráza II
TOP2A	topoizomeráza II, izoforma α
TOP2B	topoizomeráza II, izoforma β

SOUHRN

Tato disertační práce je komentovaným souborem 3 publikovaných původních prací zabývajících se experimentálním studiem protektivních účinků bisdioxopiperazinových derivátů, včetně klinicky užívaného léčiva dexrazoxanu (DEX), vůči chronické antracyklinové (ANT) kardiotoxicitě.

V první části byly studovány vybrané deriváty DEX s chemickou modifikací na dioxopiperazinových cyklech. *In vitro* experimenty naznačily ztrátu kardioprotektivního potenciálu i u derivátů s nejmenší obměnou této části chemické struktury DEX. Tento předpoklad byl následně potvrzen v přímém porovnání s DEX na *in vivo* modelu chronické ANT kardiotoxicity u králíka. Ztráta kardioprotektivního účinku nekorelovala se schopností metabolitů těchto derivátů chelátovat volné ionty železa, ale byla nalezena pravděpodobná spojitost se znemožněním interakce parentních látek s topoizomerázou II β (TOP2B). Tyto výsledky také potvrdily, že použitý *in vitro* model je vhodný k predikci kardioprotektivního potenciálu studovaných látek vůči chronické ANT kardiotoxicitě *in vivo*.

V další části byla pozornost věnována látce ICRF-193, která se od DEX liší metylací spojovacího řetězce. Tato látka v *in vitro* podmínkách vykazovala vyšší účinnost v inhibici TOP2B, i v protekci primárních kardiomyocytů před toxicitou ANT. Velmi nízká rozpustnost ve vodě ale znemožnila její další studium *in vivo*. Tento problém byl vyřešen přípravou nových proléčiv ICRF-193, u nichž bylo s využitím primárních kardiomyocytů popsáno uvolnění aktivního metabolitu *in vitro* a prokázán protektivní potenciál vůči ANT toxicitě. Následně bylo vybrané proléčivo ICRF-193 (látka GK-667) podáno intravenózně králíkům a byla studována farmakokinetika proléčiva, aktivního i neaktivního metabolitu. Plazmatické koncentrace aktivního ICRF-193 přitom ukázaly, že látka GK-667 je vhodným kandidátem pro studium kardioprotektivního účinku *in vivo*.

Poslední část experimentů ukázala, že proléčivo GK-667 navozuje na dávce závislý kardioprotektivní účinek vůči chronické ANT kardiotoxicitě u králíka s téměř kompletní protekcí ve většině studovaných parametrů s užitím vyšší studované dávky GK-667 (5 mg/kg). Na základě poměru dávek k ANT se tato látka zdá být dosud nejúčinnějším známým bisdioxopiperazinovým kardioprotektivem. Při studiu mechanismů účinku bylo zjištěno, že látka GK-667 působí kardioprotektivně prostřednictvím svého aktivního metabolitu ICRF-193, jež inhibuje TOP2B, a tím brání ANT navozenému poškození DNA a spuštění následné signalizace v myokardu. Podání látky GK-667 navíc neovlivňovalo

farmakokinetiku ANT *in vivo* a také nesnižovalo protinádorový účinek ANT *in vitro*, což z této látky činí zajímavé kandidátní léčivo k pokročilejšímu výzkumu a vývoji jako kardioprotektiva vůči chronické ANT kardiotoxicitě.

SUMMARY

This PhD thesis is a commented collection of 3 published original papers describing experimental research into protective effects of bisdioxopiperazine derivatives, including clinically used drug dexrazoxane (DEX), against chronic anthracycline (ANT) cardiotoxicity.

In the first part, selected derivatives of DEX with chemical structure modified on dioxopiperazine cycles were studied. *In vitro* experiments suggested a loss of cardioprotective potential in all derivatives tested including those with the smallest change in the ring structure. This assumption was later confirmed in head-to-head comparison with DEX *in vivo* on a chronic ANT cardiotoxicity model in rabbits. The loss of cardioprotective effect did not correlate with iron chelating properties of the derivatives' metabolites, but it showed good association with ability of parent compounds to interact with topoisomerase II β (TOP2B). These experiments also confirmed that the *in vitro* assays used in this study are suitable for prediction of cardioprotective effects of these substances against chronic ANT cardiotoxicity *in vivo*.

The other part focused on compound ICRF-193 which differs to DEX by a single methyl attached to the aliphatic linker. This compound showed higher potency in both TOP2B and cytoprotective assay against ANT toxicity in primary cardiomyocytes *in vitro*, but its poor water-solubility precluded *in vivo* study. This was overcome by design of water-soluble prodrugs of ICRF-193 in which the release of the active metabolite and cytoprotective potential were characterized *in vitro* in primary cardiomyocytes. A selected prodrug (compound GK-667) was then administered intravenously to rabbits and plasma pharmacokinetics of the parent prodrug, active and inactive metabolite were investigated. Plasma concentrations of active ICRF-193 suggested that GK-667 deserves examination for its cardioprotective effects against chronic ANT cardiotoxicity *in vivo*.

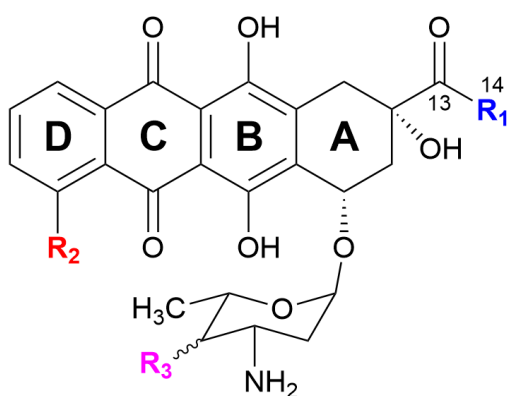
Finally, it was revealed that the prodrug GK-667 can provide dose-dependent cardioprotective effects against chronic ANT cardiotoxicity on the rabbit model with almost complete protection against most of cardiotoxicity parameters at higher studied dose (5 mg/kg). Thus, based on a dose ratio to ANT it seems to be the most potent bisdioxopiperazine cardioprotectant reported so far. It was revealed that it acts as cardioprotectant through its active metabolite ICRF-193 which inhibits TOP2B and thus prevent ANT-induced DNA damage and following signalling in the heart. The agent did not

affect either ANT pharmacokinetics *in vivo* or ANT anticancer effect *in vitro*, thus it seems to be an interesting drug candidate for further advanced study and development as cardioprotective agent against chronic ANT cardiotoxicity.

1. ÚVOD

1.1. Antracykliny

Antracykliny (ANT) jsou skupinou antibiotik přírodního původu s významnými protinádorovými účinky. První zástupci této skupiny – **daunorubicin (DAU)**, původním názvem daunomycin) a **doxorubicin (DOX)**, syn. adriamycin) – byli izolováni z aktinobakterie *Streptomyces peucetius* při systematickém hledání protinádorových léčiv v 60. letech minulého století. Krátce nato podstoupila obě léčiva klinické hodnocení a na počátku 70. let minulého století byla registrována pro užití v klinické praxi (Martins-Teixeira and Carvalho, 2020). Tato léčiva z tzv. **1. generace ANT** dodnes patří mezi nejúčinnější protinádorová chemoterapeutika užívaná v klinické praxi, a proto zůstávají pilířem řady různých protokolů k léčbě hematologických i solidních nádorů u dětí i dospělých (Bhatia, 2020; Kiss et al., 2022).



Antracyklin	R ₁	R ₂	R ₃
DOX	CH ₂ OH	OCH ₃	OH axiální
EPI	CH ₂ OH	OCH ₃	OH ekvatoriální
DAU	CH ₃	OCH ₃	OH axiální
IDA	CH ₃	H	OH axiální

Obr. 1 Molekula antracyklinu (ANT) se skládá z tetracyklického aglykonu (tricyklického antrachinonového skeletu B, C, D s přikondenzovaným kruhem A), postranního alifatického řetězce a glykosidicky vázaného cukru daunosaminu. Hydroxylovaný tricyklický chinonový skelet je chromoforem zodpovědným za červené až oranžové zbarvení ANT (viz „rubicin“ v názvu) (Martins-Teixeira and Carvalho, 2020). Zatímco planární aglykon umožňuje interkalaci léčiva do DNA, jeho antrachinonová část se může účastnit redoxní cyklizace (chinon/semichinon) a chelatace volných iontů železa. Cukerná část molekuly (daunosamin) se patrně podílí na interakci s topoizomerázou II a předpokládá se i její význam pro navození poškození chromatinu (van der Zanden et al., 2021). DOX – doxorubicin, EPI – epirubicin, DAU – daunorubicin, IDA – idarubicin.

Struktura DOX se liší od DAU pouze přítomností hydroxylové skupiny (OH) na postranním řetězci (pozice C14) (**Obr. 1**). Tato malá změna v molekule má však velký vliv na indikace/aktivitu těchto léčiv v onkologické praxi (Minotti et al., 2004). Při snaze vylepšit některé vlastnosti prvních ANT bylo izolováno či syntetizováno mnoho dalších analogů ANT. Vznikla tak tzv. **2. generace ANT**, z níž se v klinické praxi používá jen několik zástupců, a to zejména **epirubicin** (epimer DOX s OH skupinou v ekvatoriální pozici

daunosaminu) a **idarubicin** (derivát DAU bez methoxyskupiny). Výzkum nových derivátů ANT pak pokračoval tzv. **3. generací**, nicméně tyto další látky se do klinické praxe dostaly jen velmi omezeně (Martins-Teixeira and Carvalho, 2020), jako např. **aklarubicin** v některých asijských zemích (van der Zanden et al., 2021).

1.1.1. Cesty podání a farmakokinetika

ANT se typicky podávají **intravenózně (i.v.)** ve formě krátké infuze (SPC Daunorubicin; SPC Doxorubicin Teva; SPC Idarubicin Accord). Do buněk se ANT dle některých názorů dostávají spíše než prostou difúzí pomocí tzv. *flip-flop* mechanismu, a to na základě amfifilního charakteru molekuly ANT (Regev et al., 2005). Ta totiž obsahuje jak relativně hydrofobní aglykon, tak i hydrofilní cukernou část, jež při fyziologickém pH nese náboj na primárním aminu (Wojtkowiak et al., 2011). Buněčnou expozici ANT ovlivňuje i několik membránových **transportérů**, a to jak **influxních**, které usnadňují vstup látek do buněk, tak **effluxních** (např. P-glykoprotein), které naopak chrání buňku před xenobiotiky (Dadson et al., 2020). V nádorových buňkách může nadměrná exprese effluxních transportérů přispívat ke vzniku rezistence na ANT (Sallustio and Boddy, 2021). Genetický polymorfismus effluxních transportérů byl však také spojen s interindividuální variabilitou rizika kardiotoxicity (Bhatia, 2020).

Po *i.v.* podání jsou ANT obecně rychle a široce distribuovány do většiny tkání, kde se mohou vázat na intracelulární komponenty jako je DNA v jádře či kardiolipin v mitochondriích (Sallustio and Boddy, 2021). Také díky tomu mají ANT **velký distribuční objem** (např. u DOX přesahuje 500 l/m²) a relativně dlouhý terminální poločas eliminace (u DOX až 48 h) (Danesi et al., 2002). **Metabolismus** ANT probíhá převážně redukcí karbonylového uhlíku C13 za vzniku **sekundárních alkoholů** (např. doxorubicinol, daunorubicinol). Tato reakce je katalyzována enzymy ze skupiny **karbonylreduktáz** a **aldoketoreduktáz**, které jsou vysoce exprimovány především v játrech (Sallustio and Boddy, 2021), ale některé z nich také v myokardu (Menna et al., 2012; Olson et al., 1988). Genetický polymorfismus těchto enzymů však může vysvětlovat interindividuální variabilitu v tvorbě metabolitů ANT, jež byla dávana do souvislosti s vnímavostí k rozvoji kardiotoxicity (Piska et al., 2021). Vzniklé hydroxy metabolity mají totiž většinou nižší protinádorovou účinnost než parentní látky, ale podle některých zdrojů mohou významně přispívat k rozvoji kardiotoxicity (Menna et al., 2012; Olson et al., 1988). Eliminace ANT probíhá zejména kombinací jaterního metabolismu a biliární exkrece metabolitů

i nezměněné parentní látky, s menším přispěním ledvinné exkrece (Sallustio and Boddy, 2021).

1.1.2. Současné indikace

I přesto, že jsou v klinické praxi již půl století, jsou DAU a DOX stále řazeny Světovou zdravotnickou organizací do tzv. seznamu základních léčiv používaných jak u dospělých (WHO, 2021a), tak u dětských onkologických pacientů (WHO, 2021b). Jejich indikace se však liší. **DAU** je používán pouze pro léčbu **akutních leukémií** (zejména léčba akutní myeloidní leukémie včetně jejích podtypů jako např. promyelocytární leukémie, a dále u akutní lymfoblastické leukémie). Indikace **DOX** zahrnují **i lymfomy, mnohočetný myelom a solidní nádory** jako karcinom prsu, sarkomy kosti a měkkých tkání a řadu dalších metastatických solidních malignit (WHO, 2021a). ANT jsou tak široce využívány v léčebné, adjuvantní/neoadjuvantní i paliativní terapii nádorů, a to zejména v kombinačních schématech. V klinické praxi je nejčastěji používaným zástupcem DOX (Kiss et al., 2022), který se pacientům podává zpravidla **v intervalu 21 dní v kombinaci** s dalšími cytostatiky, kde je doporučena jednotlivá dávka DOX 30–60 mg/m² (v monoterapii je doporučena dávka DOX 60–75 mg/m²). Maximální **celková kumulativní dávka DOX** je pak **450–550 mg/m²** (SPC Doxorubicin Teva).

1.1.3. Mechanismus protinádorového účinku

Historicky byl protinádorový účinek ANT nejprve připisován jejich **schopnosti interkalace**, tj. vmezeření se mezi páry bazí DNA (Calendi et al., 1965; Quigley et al., 1980). Tento účinek je zprostředkován planární strukturou aglykonu ANT, a to konkrétně kruhy B a C, které mají schopnost vmezeřit se mezi sousední páry bazí G a C (Martins-Teixeira and Carvalho, 2020; Quigley et al., 1980). Důsledkem toho dochází k inhibici replikace a transkripce DNA. Nicméně interkalace patrně sama o sobě nestačí pro optimální cytotoxickou aktivitu ANT, může být však součástí dalších mechanismů účinku (Martins-Teixeira and Carvalho, 2020; van der Zanden et al., 2021).

V současnosti je za nejdůležitější mechanismus protinádorového účinku ANT považována **inhibice topoizomerázy II α (TOP2A)** v nádorových buňkách (Sallustio and Boddy, 2021; Vejpongsa and Yeh, 2014b). TOP2 jsou enzymy, které pomáhají řešit topologické problémy DNA, a to tím, že přeruší obě vlákna dvoušroubovice DNA, čímž uvolní nadměrné stočení DNA a zlom pak znovu zacelí (Chen et al., 2012; Nitiss, 2009). ANT působí na tento enzym jako tzv. **topoizomerázové jedy** – tzn. ireverzibilně inhibují

TOP2A ve fázi, kdy již došlo k přerušení DNA. Ve výsledku tedy dochází k inhibici opětovného spojení dvoušroubovice DNA se vznikem dvojitých zlomů DNA, aktivaci molekulární signalizace odpovídající na poškození DNA (tzv. *DNA damage response*, DDR), v níž hraje klíčovou roli tumor supresorový protein p53 (p53), zástavě buněčného cyklu a navození apoptotické buněčné smrti v rychle se dělících buňkách (van der Zanden et al., 2021).

Vedle výše zmíněných mechanismů pokračují diskuse o významu **tvorby reaktivních forem kyslíku (ROS)** a oxidačního stresu pro protinádorový účinek ANT. Tomuto mechanismu se však v současné době přisuzuje spíše malý klinický význam. V poslední době se také objevila teorie, že ANT mohou působit protinádorově skrz **poškození chromatinu** způsobené interkalací ANT do DNA a vypuzením histonů, čímž dojde ke kolapsu nukleozomu jako základní strukturní jednotky chromatinu (van der Zanden et al., 2021).

1.1.4. Nežádoucí účinky a toxicity

Velmi častými nežádoucími účinky spojenými s chemoterapií ANT jsou **nauzea, zvracení, alopecie** (vypadávání vlasů), **průjem**, či **mukozitida**. U velkého procenta pacientů se objevuje také **útlum kostní dřeně** s hematotoxicitou, která může být závažná, avšak bývá přechodného charakteru (SPC Doxorubicin Teva). Kromě těchto akutních a reverzibilních nežádoucích účinků je léčba ANT spojena i s **dlouhodobými** nežádoucími účinky, mezi které patří možný **vznik sekundárních malignit, neplodnost a kardiotoxicita** (SPC Doxorubicin Teva; van der Zanden et al., 2021). Tyto dlouhodobé nežádoucí účinky mají velký **vliv na kvalitu života** pacientů dlouhodobě přežívajících po úspěšné léčbě nádorového onemocnění (van der Zanden et al., 2021). Velmi řídkou ale obávanou komplikací léčby je také **extravazace** ANT při *i.v.* podání, která může vyústit až v silné poškození a nekrózu zasažené tkáně. ANT je proto nutné **podávat pouze přísně i.v.** (ideálně do zajištěného centrálního žilního vstupu) (Jordan et al., 2009; SPC Doxorubicin Teva).

1.2. Kardiotoxicita antracyklinů

Kardiotoxicita je závažným a **dávku limitujícím nežádoucím účinkem** ANT, který má významný dopad na užití těchto léčiv v klinické praxi (Swain et al., 1997b; van der Zanden et al., 2021). Ačkoli se toxické účinky ANT na myokard mohou manifestovat v mnoha různých klinických formách, s různým odstupem od podání léčiva a zřejmě

i prostřednictvím různých patogenetických mechanismů, ne všechny formy ANT kardiotoxicity jsou reálným klinickým problémem.

Podle tradičního dělení rozpoznáváme akutní a chronické formy kardiotoxicity (s časným nebo pozdním nástupem) (Qin et al., 2021). **Akutní kardiotoxicita** se objevuje typicky v **řádu hodin až dnů** po podání ANT a projevuje se **přechodnými arytmiemi** či subklinickými změnami na elektrokardiogramu, které většinou nevyžadují léčbu. Velmi výjimečně se může vyskytnout akutní selhání levé komory (LK), perikarditida, či myokarditida (Qin et al., 2021; SPC Doxorubicin Teva). Tyto nežádoucí účinky nemají jasný vztah k chronické ANT kardiotoxicitě, vyskytují se zřídka, nebo jsou klinicky málo závažné, a proto jsou často v moderní literatuře upozadřovány či opomíjeny.

Podstatně klinicky významnější jsou **chronické formy ANT kardiotoxicity**, které se rozvíjí postupně **po opakovaném podání ANT**, **závisí na kumulativní dávce** a jsou prototypovým příkladem tzv. typu 1 kardiotoxicity a srdeční dysfunkce, při níž dochází k charakteristickým histopatologickým změnám v myokardu se vznikem dilatační (případně restriktivní) kardiomyopatie a srdečního selhání (Tunuguntla et al., 2021). Ložiskové toxické poškození je nejvýznamnější v myokardu LK a mezikomorového septa (Van Vleet and Ferrans, 1980). Typicky jsou popisovány **degenerativní změny kardiomyocytů** s dezorganizací a ztrátou myofibril, jakož i tzv. vakuolizace cytoplazmy, která má zřejmě původ v patologické distenzi sarkotubulárního systému (Billingham et al., 1978; Ferrans et al., 1997). Významně poškozené kardiomyocyty zanikají neprogramovanou i programovanou buněčnou smrtí (vedle apoptózy se předpokládá i účast autofagie) (Mistiaen, 2016). Toxické poškození myokardu vedoucí k zániku kardiomyocytů je z velké části ireverzibilní, protože kardiomyocyty jsou terminálně diferencované buňky s velmi omezenou regenerační kapacitou (Morelli et al., 2022). V ložiscích s výrazným degenerativním poškozením kardiomyocytů je většinou patrná náhradová fibróza (Billingham et al., 1978). Po vyčerpání funkční rezervy myokardu se rozvíjí srdeční dysfunkce (Ewer and Ewer, 2015). Mnoho pacientů je zpočátku asymptomatických, typickým znakem ANT kardiotoxicity je však **postupný rozvoj systolické dysfunkce LK**. Ta se nejčastěji rozvíjí do 1 roku po ukončení chemoterapie (časné formy), ale zejména u dětí byla popsána klinická manifestace až o mnoho let později (Zamorano et al., 2016). V odborné literatuře se však vyskytují i názory, že systolické dysfunkci může předcházet diastolická dysfunkce LK (Mincu et al., 2021).

1.2.1. Mechanismy vzniku chronické antracyklinové kardiotoxicity

Navzdory dlouhotrvajícímu výzkumu **nejso** dosud mechanismy ANT kardiotoxicity **plně objasněny** (Dadson et al., 2020; Qin et al., 2021; Štěrba et al., 2013). Stále také není zcela jasné, jestli se podstatně liší mechanismy vzniku časných a pozdních forem chronické ANT kardiotoxicity. Spíše dnes ale převažuje názor, že základní mechanismy jsou zřejmě podobné, jenom v případě pozdní manifestace myokard utrpěl poškození, které se klinicky projeví až za delší čas s přispěním dalších endogenních a exogenních faktorů (Dadson et al., 2020).

Historicky patří mezi nejstudovanější a nejcitovanější mechanismy ty, které souvisí se **zvýšením tvorby ROS a oxidačního stresu v myokardu** (Qin et al., 2021; Šimůnek et al., 2009). Ačkoliv oxidační stres evidentně hraje roli v komplexní patogenezi ANT kardiotoxicity, není zcela jasné, jestli se jedná o primární příčinu nebo následek toxického poškození či souvisejícího srdečního selhání (Vejpongsa and Yeh, 2014b; Zhang et al., 2012). Také stojí za zmínku, že řada experimentálních studií dokumentujících primární úlohu oxidačního stresu v patogenezi ANT kardiotoxicity pracovala s výrazně supratherapeutickými koncentracemi/dávkami ANT (Štěrba et al., 2013).

Novější teorie vzniku ANT kardiotoxicity předpokládá významnou úlohu interakce ANT s **topoizomerázou IIβ (TOP2B) v kardiomyocytech**, která vede k poškození DNA se spuštěním DDR (Zhang et al., 2012). Ta byla představena v roce 2012 a od té doby patří mezi nejlivnější hypotézy. Přestože je dle této teorie úloha oxidačního stresu v rozvoji ANT kardiotoxicity zřejmě sekundární, řada autorů přikládá oběma teoriím podobný význam a domnívá se, že se v komplexní patogenezi uplatňují oba mechanismy paralelně (Lipshultz et al., 2014a; Renu et al., 2018).

Existuje celá **řada dalších teorií**, které mohou vysvětlit vznik ANT toxicity. Ta byla například spojována s **toxickým účinkem hydroxylovaných metabolitů ANT na iontové pumpy kardiomyocytů** (Olson et al., 1988), nebo s ANT navozenou **poruchou exprese, struktury či funkce myofibrilárních proteinů** (Boucek et al., 1999) či **proteinů zajišťujících homeostázu vápníku** v kardiomyocytech (např. vápníkové ATPázy sarkoplazmatického retikula, ryanodinového receptoru 2, či sodno-vápenatého výměníku) (Boucek et al., 1999; Dadson et al., 2020). Další teorie připisovaly zásadní význam **poškození mitochondriálního genomu** s následnou poruchou exprese podjednotek dýchacího řetězce (Lebrecht et al., 2003). Jiní autoři připisují klíčovou roli poruše proteinové

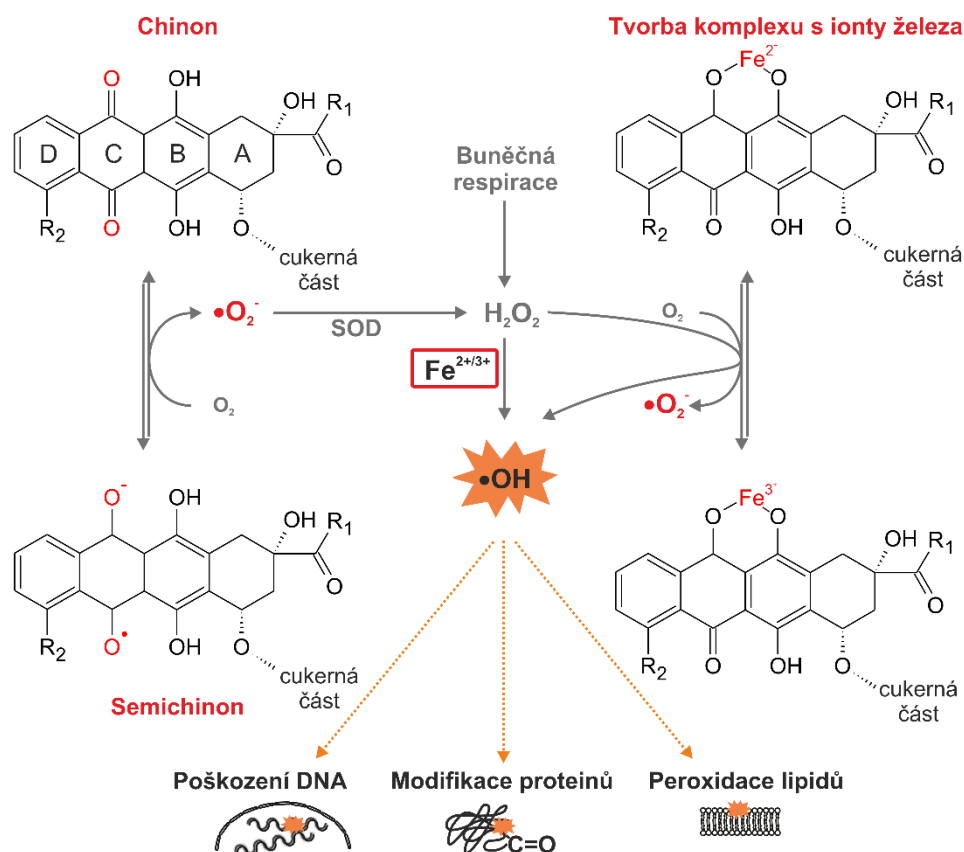
homeostázy prostřednictvím **ovlivnění funkce proteazomu** (Dimitrakis et al., 2012; Kumarapeli et al., 2005) či **aktivaci fosfatidylinositol-3-kinázy γ** vedoucí k inhibici autofagie (Li et al., 2018). Nicméně v řadě případů není zřejmé, zda k aktivaci uvedených mechanismů dochází v klinicky relevantních dávkách ANT a jestli se jedná o primární mechanismy, nebo jen jedny z mnoha následných patogenetických drah.

a) **Navození oxidačního stresu a oxidačního poškození myokardu**

ANT mohou přímo chemicky navodit **tvorbu ROS** prostřednictvím chinonové části aglykonu, a to jak **samotné**, tak i po utvoření **komplexu aglykonu ANT s volnými ionty železa (Obr. 2)** (Doroshov and Davies, 1986; Keizer et al., 1990). Samotná chinonová část aglykonu ANT může být enzymaticky redukována (mj. komplexem I dýchacího řetězce) za vzniku semichinonového radikálu, který po reakci s kyslíkem vytvoří superoxidový aniont ($\bullet\text{O}_2^-$) (Doroshov and Davies, 1986). Klíčovou roli v neutralizaci $\bullet\text{O}_2^-$ na méně toxický peroxid vodíku (H_2O_2) hraje superoxidodismutáza (SOD). V přítomnosti volných iontů železa mohou prostřednictvím tzv. Fentonovy reakce vznikat z H_2O_2 ještě mnohem reaktivnější a biologicky toxičtější hydroxylové radikály ($\bullet\text{OH}$). Volné ionty železa jsou však za normálních okolností dostupné v buňce pouze v omezené míře jako součást tzv. *labile iron pool* (Šimůnek et al., 2009). Nicméně dle některých teorií ANT také aktivně navozují **poruchu regulace buněčné homeostázy železa** (Xu et al., 2005), včetně specifické **akumulace iontů železa v mitochondriích** (Ichikawa et al., 2014).

Produkce ROS může probíhat cyklicky, takže velké množství ROS může přetížit antioxidační mechanismy kardiomyocytu a vést k oxidačnímu poškození lipidů, proteinů i DNA (Štěrba et al., 2013). Tzv. *ROS and iron* hypotéza vzniku ANT kardiotoxicity se stala velmi populární, a její postavení bylo upevněno po objevu kardioprotektivního účinku dexrazoxanu (DEX), protože bylo zjištěno, že toto léčivo je účinně metabolizováno na látku **ADR-925** chelatující železo (Hasinoff et al., 1998; Myers, 1988). Vzniklé ROS mohou navíc interagovat s oxidem dusnatým (NO) syntetizovaným inducibilní formou NO syntázy za tvorby reaktivních forem dusíku, jako je např. peroxynitrit (Fogli et al., 2004).

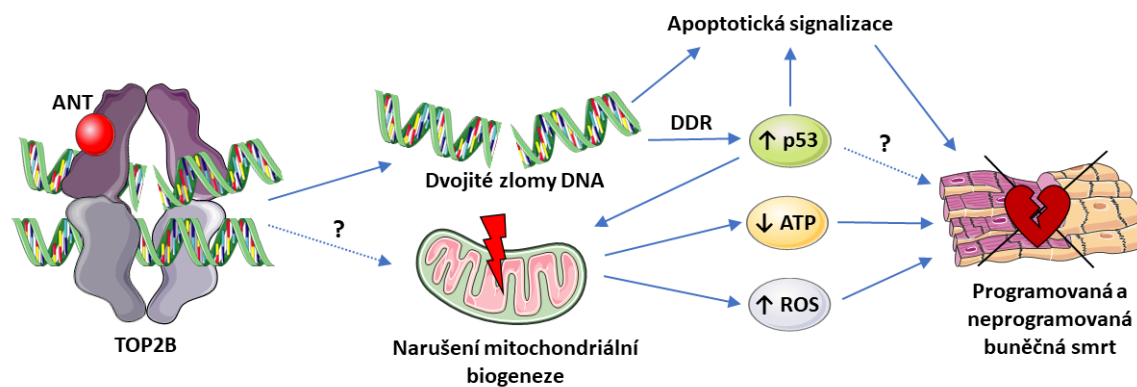
Kromě přímé tvorby ROS mohou ANT navodit oxidační stres zvýšením exprese NADPH oxidáz v myokardu (Yousefian et al., 2022). Tyto enzymy jsou známými účinnými katalyzátory vzniku $\bullet\text{O}_2^-$ či H_2O_2 v kardiovaskulárním systému. ANT také inhibují expresi některých antioxidačních enzymů jako je např. SOD2 (Li et al., 2000).



Obr. 2 Zjednodušené schématické znázornění hlavních cest vzniku oxidačního stresu navozeného antracykliny a katalyzovaného železem – převzato a upraveno z Šterba et al. (2013). •O₂⁻ – superoxidový aniont, SOD – superoxididismutáza, H₂O₂ – peroxid vodíku, •OH – hydroxylový radikál.

b) Interakce antracyklinů s topoizomerázou IIβ

V savcích buňkách existují **2 hlavní izoformy TOP2** (TOP2A a TOP2B), jež sdílí katalytický mechanismus a mají také vysokou míru strukturní homologie (cca 70 %). **TOP2A** je vysoce exprimována v **rychle se dělících normálních a nádorových buňkách**, kde je nezbytná pro replikaci DNA (Chen et al., 2012). Její exprese je také významně regulovaná v závislosti na buněčném cyklu (nejvyšší je v G₂/M fázi, kdy je potřebná pro separaci dceřiných vláken DNA prostřednictvím tzv. dekatenační reakce (Chen et al., 2012; Kozuki et al., 2017). Naproti tomu **TOP2B** je dominantní izoformou v **nedělících se terminálně diferencovaných buňkách** jako jsou **kardiomyocyty** či neurony (Austin et al., 2021; Chen et al., 2012). O biologickém významu TOP2B v těchto buňkách je k dispozici jen omezené množství informací, což souvisí s tím, že se tato izoforma dostala do popředí zájmu až v posledních dvou dekadách. Předpokládá se však, že TOP2B je v nedělících se buňkách nutná zejména pro umožnění či regulaci genové transkripce (Austin et al., 2018).



Obr. 3 Schématické znázornění mechanismu antracyklinové (ANT) kardiotoxicity zprostředkované skrz interakci s topoizomerázou II β (TOP2B). ANT jako topoizomerázový jed narušuje katalytický cyklus TOP2B, což vede ke vzniku dvojitých zlomů DNA, jež spouští molekulární signalizaci odpovídající na poškození DNA (DDR), aktivaci p53 a apoptotické signalizace. Dále dochází k narušení mitochondriální biogeneze, což vede k poškození mitochondrií, následně k zvýšené tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS) a snížení tvorby adenosintrifosfátu (ATP). Všechny uvedené děje ve výsledku mohou vést k degenerativním změnám kardiomyocytů a programované a neprogramované buněčné smrti. Volně upraveno podle Vejpongsa and Yeh (2014b) s využitím Servier Medical Art, poskytovaného společností Servier, licencovaného pod Creative Commons Attribution 3.0 Unported License.

ANT patří mezi tzv. **topoizomerázové jedy**, a to **na obou izoformách TOP2** (Marinello et al., 2018). TOP2 byla označena za možný molekulární cíl pro ANT v nádorových buňkách již v 80. letech minulého století (Tewey et al., 1984), kardiotoxicita ANT však byla s ovlivněním TOP2 a konkrétně její β izoformy (TOP2B) spojena až relativně nedávno (Lyu et al., 2007; Vejpongsa and Yeh, 2014a; Zhang et al., 2012). Pro **protinádorový účinek** ANT je konkrétně důležitá inhibice **TOP2A** (Vejpongsa and Yeh, 2014b). Ta však pro vznik ANT kardiotoxicity nemůže mít zásadní význam, protože tato izoforma **není v kardiomyocytech** a myokardu téměř exprimována (Lenčo et al., 2015; Vejpongsa and Yeh, 2014b). ANT kardiotoxicita byla jako první spojena s ovlivněním TOP2B v *in vitro* studii Lyu et al. (2007). Nicméně užití buněčného modelu H9c2 myoblastů v této a další studii (Deng et al., 2014) zkomplikovalo interpretaci výsledků. Tyto buňky jsou totiž nejen fenotypově odlišné od primárních kardiomyocytů, ale také aktivně proliferují a exprimují obě izoformy TOP2 (Lenčo et al., 2015). Zásadní význam měla proto práce skupiny prof. Yeha (Zhang et al., 2012), která ukázala, že podmíněný *knock out* TOP2B v kardiomyocytech dospělých myši předchází vzniku ANT kardiotoxicity *in vitro*, i *in vivo*. Na základě této práce byla tedy **TOP2B** navržena jako **primární cíl pro ANT v kardiomyocytech**. Dle této práce interakce ANT s TOP2B v kardiomyocytech vede k **poškození DNA (Obr. 3)** a **aktivaci DDR s klíčovou rolí p53** (Zhang et al., 2012), jež je

důležitým transkripčním regulátorem řady cílových genů (např. E3 ubikvitin-protein ligázy Mdm2 – MDM2, či cyklin-dependentního kinázového inhibitoru 1A – p21 apod.) (Feroz and Sheikh, 2020). Ve výsledku by tento děj měl vést k **apoptóze kardiomyocytů** a transkripčním změnám vedoucím k **narušení mitochondriální biogeneze** s následným poškozením mitochondrií a k **navození oxidačního stresu** (Zhang et al., 2012).

1.2.2. Možnosti omezení antracyklinové kardiotoxicity

Ke zmírnění toxicity ANT může přispět několik přístupů, mezi něž patří omezení kumulativní dávky ANT, změny schématu podávání, použití méně toxických analogů či forem ANT a monitorování pacientů podstupujících léčbu ANT (Chung and Youn, 2016; Lipshultz et al., 2014b). Problematika farmakologické kardioprotekce je diskutována zvláště v následující kapitole.

V roce 1979 Von Hoff et al. ukázali, že pravděpodobnost vzniku srdečního selhání způsobeného ANT je závislá na celkové kumulativní dávce ANT podané pacientovi. Na základě tohoto poznatku a dřívějšího pozorování autorů Lefrak et al. (1973) byla stanovena **maximální celková kumulativní dávka**, která by v případě **DOX** neměla překročit **450–550 mg/m²**, v případě DAU 500–600 mg/m², u dětí do 12 let pak v obou případech 300 mg/m² (SPC Daunorubicin; SPC Doxorubicin Teva). Jelikož však riziko srdečního selhání u dospělých pacientů léčených DOX významně roste již od kumulativní dávky 400 mg/m², je u něj doporučováno udržet maximální kumulativní dávku na hranici 400–450 mg/m² (Vejongsa and Yeh, 2014a). Tyto a vyšší kumulativní dávky ANT však dnes využívají jen některé vybrané chemoterapeutické režimy, jako např. léčba sarkomů měkkých tkání, či kosti (Benjamin and Minotti, 2021; Chow et al., 2022) a **většinou** se kumulativní dávky ANT pohybují níže (**do 300 mg/m²**) (Kiss et al., 2022). Omezením kumulativní dávky se podařilo dramaticky snížit výskyt klinických projevů časné kardiotoxicity (Lipshultz et al., 2010). Existuje však řada indicií, že i léčba nižšími kumulativními dávkami ANT představuje ireverzibilní subklinické poškození, které může mít vliv na kardiovaskulární morbiditu a mortalitu pacientů dlouhodobě přežívajících nádorové onemocnění (Leger et al., 2015; Lipshultz et al., 2013; Swain and Vici, 2004).

Snížení rizika kardiotoxicity bylo také spojováno s **podáním ANT kontinuální infuzí** (až 96 h) místo běžné krátké infuze či bolusového podání. Avšak delší infuzní podání ANT je nejen prakticky složitější, ale zvyšuje i výskyt a závažnost mukozitidy (Benjamin and Minotti, 2021) a jeho přínos nebyl prokázán u dětí (Lipshultz et al., 2014b).

Bezpečnost léčby ANT může být podstatně zvýšena důsledným **monitorováním pacienta** před léčbou, v průběhu léčby a po jejím ukončení. Monitoring pacienta by měl odhalit časně subklinické známky toxicity a umožnit potřebnou individualizaci léčby (Curigliano et al., 2020). V současné době je stále nejčastěji monitorována systolická funkce LK pomocí **echokardiografie** (Chung and Youn, 2016). Nicméně tento tradiční přístup detekuje již relativně pokročilé poškození myokardu. Do popředí se tak dostávají citlivější přístupy jako **vyšetření biomarkerů** toxického poškození nebo dysfunkce myokardu (zejména stanovení **srdečních troponinů T a I** v plazmě pomocí vysoce senzitivních kitů a stanovení **N-terminálního fragmentu prohormonu mozku natriuretického peptidu**). Přínosné se zdají být i pokročilé zobrazovací diagnostické přístupy jako tzv. *strain* echokardiografie či techniky magnetické rezonance (Curigliano et al., 2020).

Omezení ANT kardiotoxicity lze dosáhnout i použitím moderních lékových forem pro **cílenou distribuci ANT** (např. lipozomů). Tento způsob podání významně snižuje distribuci ANT do myokardu, což vede ke snížení rizika kardiotoxicity (Sawicki et al., 2021). Bohužel jsou u těchto lékových forem ANT pozorovány jiné toxicity jako např. palmo-plantární erytrodysestezie (tzv. *hand-foot* syndrom) či mukozitidy (Rivera, 2003; SPC Caelyx pegylated liposomal). Nevýhodou těchto lékových forem je také vysoká cena. V současnosti lipozomální ANT představují pouze cca 5 % ze všech předepsaných balení ANT v České republice (AISLP, 2022).

1.3. Úvod do farmakologické kardioprotekce

Farmakologická kardioprotekce, jež by zabránila toxickému poškození myokardu po podání ANT, se od počátku jevila jako velmi zajímavá a klinicky použitelná strategie, a proto jí bylo věnováno mnoho pozornosti zejména v experimentálním výzkumu. Velká část pozitivních výsledků byla ale získána na experimentálních modelech s jednorázovým podáním vysoké dávky ANT (Štěrba et al., 2013). Tyto potenciálně slibné výsledky se však většinou nepodařilo ověřit na klinicky relevantnějších experimentálních modelech chronické kardiotoxicity a v prospektivních klinických studiích (Šimůnek et al., 2009; Štěrba et al., 2013). V následující části budou diskutovány výsledky látek, u kterých jsou k dispozici data získaná na *in vivo* modelech chronické kardiotoxicity s opakovaným podáním klinicky relevantních dávek ANT v průběhu nejméně 4–6 týdnů.

1.3.1. *Antioxidanty*

Výzkum kardioprotektivních účinků antioxidantů přírodního, semi-syntetického i čistě syntetického původu byl zahájen v polovině 70. let minulého století (shrnutí v Šimůnek et al., 2009) a trvá do určité míry dodnes. Již na začátku 80. let minulého století bylo ovšem zjištěno, že klasické antioxidanty jako je **vitamin E** (α -tokoferol) či **N-acetylcystein**, vykazují velmi malé či žádné kardioprotektivní účinky na klinicky relevantních modelech chronické ANT kardiotoxicity (shrnutí v Štěrbá et al., 2013). Intenzivně studovanou skupinou antioxidantů byly a dodnes jsou **flavonoidy** přírodního a semisyntetického původu (Syahputra et al., 2022). Nicméně k těmto látkám je k dispozici relativně málo dat z experimentů užívajících ověřené a klinicky relevantní experimentální modely (Syahputra et al., 2022; Štěrbá et al., 2013). Jednou z výjimek jsou výsledky získané se **7-monohydroxyethyl-rutosidem** (van Acker et al., 1995). Následně bylo ale zjištěno, že kardioprotekce pomocí 7-monohydroxyethyl-rutosidu není stálá a její výsledky se zhoršují s dobou následného sledování (Bruynzeel et al., 2007b). Kardioprotektivní účinky vybraných antioxidačních látek byly také studovány v **malých prospektivních randomizovaných studiích** – jednalo se konkrétně o **N-acetylcystein** (Dresdale et al., 1982; Myers et al., 1983), **vitamin E** (Legha et al., 1982) a **7-monohydroxyethyl-rutosid** (Bruynzeel et al., 2007a). Žádná z těchto klinických studií však neprokázala významný kardioprotektivní účinek studovaných antioxidantů. Z dostupných důkazů tedy nelze antioxidanty považovat za perspektivní kardioprotektiva vůči klinicky relevantním formám ANT kardiotoxicity.

1.3.2. *Chelátory železa*

Neúčinnost klasických antioxidantů na modelech chronické ANT kardiotoxicity a v klinických studiích vedla část odborné veřejnosti k přehodnocení významu přímého oxidačního stresu navozeného produkcí klasických forem ROS, jako je $\bullet\text{O}_2^-$ či H_2O_2 . Do popředí se tak dostala role volných iontů železa, protože v jejich přítomnosti mohou vznikat vysoce toxické $\bullet\text{OH}$. Ty mají vysokou reaktivitu a velmi krátký poločas, proto bylo možné očekávat, že klasické antioxidanty nebudou schopny účinně ochránit myokard před jejich toxicitou (Šimůnek et al., 2009). Jako výhodnější se proto jevílo tvorbě ROS předcházet, a to právě chelatací železa. Tato myšlenka vycházela také z objevu kardioprotektivních účinků DEX, jež byly připisovány právě chelataci volného železa (Myers, 1988).

Studie kardioprotektivních účinků chelátorů železa vůči ANT kardiotoxicitě začaly na počátku 90. let minulého století s **deferoxaminem**, který se klinicky užívá v terapii přetížení organismu ionty železa. Toto léčivo vykazovalo významný kardioprotektivní účinek *in vitro* na izolovaných kardiomyocytech přetížených ionty železa a na modelech akutní toxicity *in vivo*, ale nebylo účinné na kardiomyocytech bez přetížení ionty železa (shrnutí v Šimůnek et al., 2009), ani na validovaném modelu chronické ANT kardiotoxicity u potkana (Herman et al., 1994). Absence významného kardioprotektivního účinku tohoto léčiva byla ale vysvětlována jeho nízkým prostupem plazmatickou membránou do kardiomyocytu, což bylo přičítáno jeho vysoké molekulové hmotnosti a hydrofilitě. Proto se výzkum zaměřil na menší a lipofilnější látky (Šimůnek et al., 2009).

Mezi lipofilní selektivní chelátory železa patří **aroylhydrazonové chelátory**. Tyto látky byly částečně účinné na *in vitro* modelu izolovaných neonatálních potkaních komorových kardiomyocytů (NVCM) a na *in vivo* modelu chronické ANT kardiotoxicity u králíka (Šimůnek et al., 2005; Štěrba et al., 2007; Štěrba et al., 2006). Nicméně míra kardioprotekce byla vždy nižší než u DEX a místo na dávce závislého zvýšení účinku u nich bylo pozorováno jeho kompletní vymizení ve vyšších dávkách (shrnutí v Štěrba et al., 2013), a to nezávisle na volbě konkrétního derivátu či cesty podání. Následně bylo zjištěno, že tyto látky jsou poměrně rychle eliminovány (Kovaříková et al., 2006; Kovaříková et al., 2005), což by mohla být nevýhoda v porovnání s dlouhým terminálním biologickým poločasem eliminace u ANT.

Dalším zkoumaným chelátorem železa byl **deferipron**, který byl úspěšně zaveden do klinické praxe pro perorální (*p.o.*) léčbu přetížení organismu ionty železa (Barnabé et al., 2002; SPC Ferriprox). Toto léčivo má delší biologický poločas než aroylhydrazony (SPC Ferriprox) a dobře penetruje do kardiomyocytů i jejich mitochondrií (Glickstein et al., 2006). Podobně jako u deferoxaminu či aroylhydrazonů není komplex deferipronu s ionty železa redoxně aktivní, a tak brání katalýze redoxních reakcí (Koppenol and Hider, 2019). Přestože se deferipron zdál být protektivní vůči toxicitě ANT *in vitro* (Barnabé et al., 2002), na modelu chronické ANT kardiotoxicity u králíka u něj nebyl zjištěn žádný protektivní účinek, i když by použité dávky měly zajistit dostatečnou expozici myokardu (Popelová et al., 2008). A ani další klinicky užívaný chelátor železa **deferasirox** nevykazoval kardioprotektivní účinky vůči ANT kardiotoxicitě (Hasinoff et al., 2003).

Selektivní a vysoce účinné intracelulární chelátory železa tedy nebyly schopny navodit přesvědčivý a na dávce závislý kardioprotektivní účinek na zavedených modelech

chronické ANT kardiotoxicity, což do určité míry zpochybnilo chelataci iontů železa jako perspektivní kardioprotektivní strategii (Šimůnek et al., 2009; Štěřba et al., 2013).

1.3.3. Další zkoumaná kardioprotektiva

Protože výzkum nových potenciálních kardioprotektivů vůči chronické ANT kardiotoxicitě nepřinesl do klinické praxe krom DEX žádné jiné léčivo, další výzkum se zaměřil na léčiva v klinické praxi již užívaná – a to zejména na **neurohormonální blokátory účinné u chronického srdečního selhání** se sníženou ejekční frakcí LK (typ HFrEF) (tj. inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu – **ACEi**, antagonisty AT1 receptoru pro angiotenzin II – tzv. **sartany**, **antagonisty aldosteronu** a **β-blokátory**) (Dadson et al., 2020; Payne and Nohria, 2017). Tato léčiva se běžně užívají pro léčbu srdeční dysfunkce/selhání navozeného ANT (Zamorano et al., 2016), a u ACEi existují i důkazy o protektivním účinku při užití v sekundární prevenci u rizikových pacientů s významně zvýšenými plazmatickými koncentracemi srdečních troponinů po podání ANT (Cardinale et al., 2006). Nicméně jejich úloha v primární prevenci, tj. při užití od první dávky ANT není jasná. S řadou léčiv těchto skupin byly provedeny experimentální i klinické studie, nicméně jejich výsledky jsou smíšené a zatížené řadou limitací (Brown et al., 2020). Metaanalýzy naznačily určitý statisticky významný přínos při podávání těchto léčiv v primární prevenci ANT kardiotoxicity, ale bez dalších důkazů nebylo možné k jejich přínosu formulovat jednoznačný závěr (Totzeck et al., 2019; Vaduganathan et al., 2019).

1.4. Dexrazoxan

DEX je prvním a stále **jediným léčivem schváleným** regulačními orgány (Evropská léková agentura – EMA, americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv) **pro protekci myokardu vůči chronické ANT toxicitě** v klinické praxi (Sawicki et al., 2021). Kardioprotektivní účinky DEX byly objeveny spíše shodou okolností v návaznosti na výzkum protinádorových účinků bisdioxopiperazinů (shrnutí v Herman et al., 2014) a mechanismus jeho kardioprotektivního účinku dosud není plně objasněn (Dadson et al., 2020). Klinické užití DEX je však díky obavám z možných nežádoucích účinků velmi omezené (Reichardt et al., 2018), což v praxi znamená, že většina pacientů léčených ANT absolvuje léčbu bez farmakologické ochrany myokardu (Benjamin and Minotti, 2021).

1.4.1. Historie

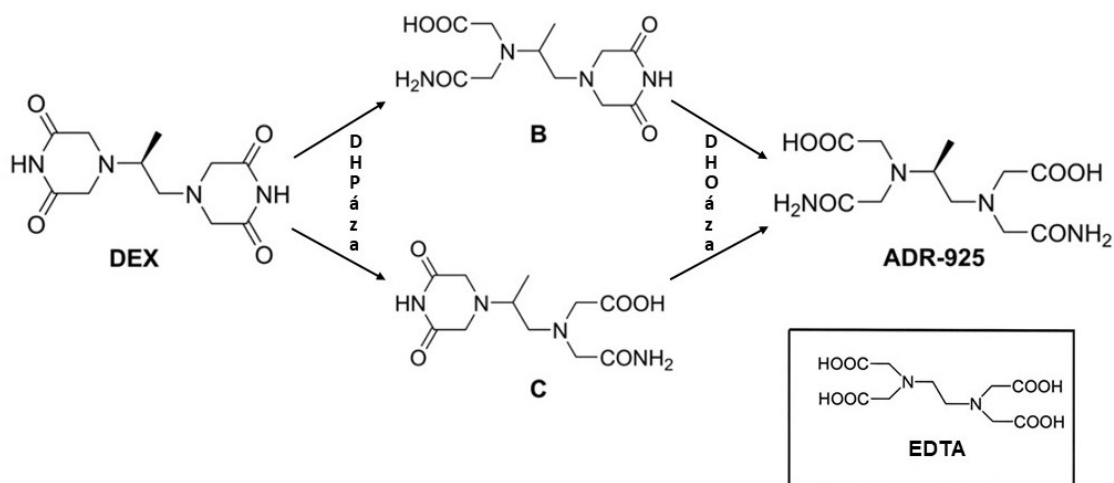
DEX (ICRF-187) chemicky patří do skupiny bisdioxopiperazinů, konkrétně se jedná o **(+)-(S)-enantiomer razoxanu (ICRF-159)** (Herman et al., 2014). Tyto látky byly

původně vyvíjeny jako protinádorová léčiva. V podstatě se mělo jednat o proléčiva, která díky své lipofilitě mohou snadno pronikat do nádorových buněk, kde by měly být hydrolyzovány na chelatačně aktivní látky strukturně podobné známému chelátoru kyselině ethylendiamintetraoctové (EDTA) (Creighton et al., 1969). Až později bylo zjištěno, že antiproliferační účinek těchto látek je dán zejména inhibicí TOP2(A) (Classen et al., 2003; Tanabe et al., 1991). Racemický razoxan prošel poměrně rozsáhlým preklinickým vývojem jako protinádorové léčivo a byl hodnocen i v několika menších klinických studiích, nicméně do klinické praxe se neprosadil (Hellmann and Rhomberg, 2010).

Později bylo na modelu **izolovaného perfundovaného srdce** psa zjištěno, že razoxan a EDTA mohou inhibovat statisticky významné zvýšení perfuzního tlaku koronárních arterií navozené vysokou koncentrací DAU a DOX (Herman et al., 1972). Na modelu **akutní toxicity** způsobené vysokou dávkou DAU (25 mg/kg) u křečků bylo dále zjištěno, že premedikace DEX snižuje celkovou mortalitu navozenou DAU a částečně brání toxickému poškození myokardu (Herman et al., 1979; Herman et al., 1983). Relevance těchto výsledků pro výzkum kardiotoxicity není z dnešního pohledu úplně jasná, nicméně tyto výsledky podnítily další výzkum těchto látek.

1.4.2. Farmakokinetika a metabolismus

Podstatně lepší rozpustnost DEX ve vodných roztocích vyřešila nízkou a variabilní *p.o.* biologickou dostupnost razoxanu pozorovanou v preklinických experimentech i klinických studiích a umožnila jeho *i.v.* podání (Repta et al., 1976). V klinické praxi je DEX podáván v **krátké (cca 15 min) infuzi** (SPC Cyrdanax) a jeho farmakokinetika je nejlépe popsána dvou kompartmentovým otevřeným modelem s eliminační kinetikou 1. řádu (Cvetkovic and Scott, 2005). **Klinicky používané dávky DEX** (typicky **500–1000 mg/m²**) poskytují maximální koncentrace (c_{max}) mezi 136–280 μM . Vazba na plazmatické proteiny je zanedbatelná a distribuce do tkání je relativně rychlá s distribučním objemem odpovídajícím celkové tělesné tekutině, což naznačuje významný prostup do intracelulárního kompartmentu (Štěrbá et al., 2013). Uvnitř buněk je DEX enzymaticky hydrolyzován dihydropyrimidinázou na **přechodné metabolity B a C** s jedním otevřeným dioxopiperazinovým cyklem (**Obr. 4**). Následuje hydrolýza druhého dioxopiperazinového cyklu enzymem dihydroorotázou na **finální otevřený metabolický produkt ADR-925** (Jirkovský et al., 2018). Zatímco dihydropyrimidináza je exprimována v játrech a ledvinách, ale ne v srdci, dihydroorotáza byla detekována v mnoha tkáních včetně srdce (Cvetkovic and Scott, 2005).



Obr. 4 Metabolismus dexrazoxanu (DEX) dihydropyrimidinázou (DHPáza) na meziprodukty B a C s jedním otevřeným cyklem a dihydroorotázou (DHOáza) na finální otevřený produkt ADR-925, jež se podobá kyselině ethylendiamintetraoctové (EDTA) – upraveno dle Jirkovský et al. (2021) a Minotti et al. (2004).

Plazmatické koncentrace DEX klesají u člověka ve 2 fázích s poločasem 15 a 140 min. Celková tělesná clearance je 0,29 l/h/kg s renální exkrecí jako hlavní cestou eliminace (42–48 % dávky DEX se objevuje v nezměněné podobě v moči). **DEX je tradičně považován za proléčivo**, proto jsou důležité také informace o farmakokinetice jeho aktivního metabolitu **ADR-925** (Štěrba et al., 2013). Schroeder et al. (2003) ukázali u pacientů měřitelné plazmatické koncentrace ADR-925 ($\approx 10 \mu\text{M}$) už na konci infuze DEX, c_{max} ADR-925 ($\approx 30 \mu\text{M}$) byla dosažena 15 min poté a po 4 h fázi plató následoval pomalý pokles jeho koncentrací v plazmě. Koncentrace přechodných metabolitů B a C dosáhly maxima také velmi brzy a rychle klesaly (patrně hlavně přeměnou na ADR-925).

1.4.3. Důkazy o kardioprotektivní účinnosti v experimentu a klinických studiích

Kardioprotektivní účinky DEX byly **na experimentálním modelu chronické ANT kardiotoxicity** poprvé zdokumentovány u králíka (Herman et al., 2014). V této první studii (Herman et al., 1981) byl DAU podáván dospělým samcům králíka v 3-týdenních intervalech s/bez podání DEX po dobu 15 týdnů (tj. 5 dávek DAU), přičemž podávání DEX před každou dávkou DAU vedlo k prevenci či výraznému snížení toxického poškození myokardu. V dalších experimentech pak Herman a Ferrans (1986) jasně ukázali, že účinek DEX není jen prostým oddálením klinických projevů kardiotoxicity, ale jedná se o **zabránění nástupu kardiotoxicity**, což vede k dlouhotrvajícímu prospěchu z léčby. Podání DEX také umožnilo **podání mnohem vyšších kumulativních dávek DOX** se snesitelným rizikem kardiotoxicity (Herman et al., 1988).

DEX v *in vivo* experimentech poskytoval **významnou kardioprotekci** při podání v poměru dávek **DEX:DOX 5:1 až 30:1** (Imondi, 1998; Imondi et al., 1996), přičemž poměry **10:1 až 20:1** byly vybrány jako nejvhodnější pro použití v **klinických studiích** (Swain et al., 1997b). Časový interval mezi podáním DEX a DOX byl systematicky hodnocen u myši, přičemž nejlepší výsledky vykazovalo podání 30 min před až 15 min po DOX (Imondi, 1998). Navíc podání DEX před každou dávkou DOX bylo *in vivo* významně účinnější než odložené podání DEX (Imondi, 1998; Jirkovský et al., 2013). V průběhu půl století jeho preklinického výzkumu bylo také jasně doloženo, že **kardioprotektivní účinky DEX** vůči chronické ANT kardiotoxicitě jsou významné **u všech použitých druhů pokusných zvířat** (králík, pes, myš, normotenzní a spontánně hypertenzní potkan, morče, prase) a **nezávislé na užitém ANT derivátu** (Herman et al., 2014; Imondi, 1998).

První randomizovaná klinická studie, která hodnotila účinnost DEX u žen s karcinomem prsu léčených kombinací 5-fluorouracil/DOX/cyklofosfamid, zjistila ve skupině s DEX významné **snížení incidence srdečního selhání**, menší pokles ejekční frakce LK a nižší výskyt histopatologického poškození myokardu sledovaného endomyokardiální biopsií. Podání DEX také umožnilo podat **vyšší kumulativní dávku ANT**, přičemž nevedlo ke snížení odpovědi na protinádorovou léčbu. Kromě mírného vzrůstu rizika myelosuprese DEX nezvýšil výskyt dalších nežádoucích účinků (Speyer et al., 1988). Následně bylo také zjištěno, že DEX působí **kardioprotektivně**, i když je podáván až **od kumulativní dávky 300 mg/m² DOX** (Swain et al., 1997a).

Účinnost DEX v klinické praxi byla potvrzena v mnoha dalších klinických studiích u dospělých i dětí s různými malignitami a také v jejich meta-analýzách (Reichardt et al., 2018; van Dalen et al., 2011).

1.4.4. Mechanismy účinku

Navzdory intenzivnímu výzkumu není mechanismus kardioprotektivních účinků DEX vůči ANT kardiotoxicitě plně objasněn (Benjamin and Minotti, 2021; Hasinoff et al., 2020b). Tradičně je kardioprotektivní účinek DEX připisován chelatační aktivitě metabolitu ADR-925 (Deng et al., 2014; Martins-Teixeira and Carvalho, 2020; Šimůnek et al., 2009) – tato informace se stále vyskytuje ve většině literárních pramenů a jako předpokládaný mechanismus účinku je uveden i v Souhrnu údajů o přípravku (SPC) s obsahem DEX (SPC Cyrdanax). Nicméně v literatuře není k dispozici žádný přímý důkaz pro tuto hypotézu, která má mj. i několik věcných nedostatků (viz dále).

a) Chelatace iontů železa

Jak již bylo uvedeno výše, metabolit DEX, **ADR-925**, se strukturně podobá známému chelátoru EDTA, a podobně jako EDTA má i ADR-925 významnou afinitu jak k železnatým (Fe^{2+}), tak k železitým (Fe^{3+}) iontům, což platí i pro hydrolytické produkty dalších bisdioxopiperazinů. Jelikož je ADR-925 **silnějším chelátorem železa než ANT**, tak kromě volného intracelulárního železa, kterého je v buňkách za normálních okolností jen omezené množství, může ADR-925 účinně odnímat i Fe^{3+} ionty vázané v komplexu s ANT (Štěrbá et al., 2013). Těmito mechanismy by měl ADR-925 zamezit katalytické účasti iontů železa na cyklické tvorbě ROS navozené ANT, a zvláště pak velmi toxických $\bullet\text{OH}$, což by mělo chránit myokard před přímým oxidačním poškozením. Nicméně opomíjeným faktem je, že i **komplex iontů železa s ADR-925 se může účastnit cyklických redoxních reakcí** a katalyzovat vznik $\bullet\text{OH}$ (podobně jako je to dobře známo o komplexu železa s EDTA) (Thomas et al., 1993). ADR-925 také (stejně jako EDTA) **není selektivní chelátor** iontů železa – váže nespecificky také měďnaté, manganaté, zinečnaté a vápenaté ionty – není tedy vyloučeno, že by to také mohlo souviset s kardioprotektivním účinkem DEX (Štěrbá et al., 2013).

b) Interakce s topoizomerázou II β

Jedna z novějších hypotéz dává do souvislosti kardioprotektivní účinky DEX s jeho schopností **katalyticky inhibovat aktivitu TOP2B** (Hasinoff and Herman, 2007; Lyu et al., 2007). Katalytické inhibitory TOP2 brání vzniku kovalentního komplexu ANT-TOP2-DNA skrz stabilizaci uzavřené (tzv. *closed-clamp*) konformace TOP2 (Lyu et al., 2007). DEX se váže na N-terminální doménu kvasinkové TOP2, která je vysoce homologní s lidskou TOP2B i TOP2A, přímo mezi dvě místa, která váží ATP (Classen et al., 2003), a tak přemostňuje dva monomery a uzavírá DNA v uzavřené konformaci TOP2 (Hasinoff and Herman, 2007). DEX blokuje katalytický cyklus TOP2 až po průchodu vlákna DNA, ale před hydrolyzou druhé molekuly ATP, **nenavozuje tedy zlomy DNA**, čímž se zásadně **liší od tzv. topoizomerázových jedů** jako jsou ANT. Naproti tomu TOP2 jedy působí skrz zvýšenou tvorbu nebo stabilizaci za normálních okolností přechodného TOP2-DNA kovalentního komplexu (tzv. *cleavable complex*) (Herman et al., 2014). DEX by tedy jako katalytický inhibitor mohl bránit účinku ANT jako TOP2 jedy, a tím zabránit poškození DNA kardiomyocytů a následné DDR. Kromě předcházení vzniku kovalentního komplexu DNA s TOP2B stabilizovaného ANT, by DEX mohl také navodit **cílenou degradaci TOP2B prostřednictvím ubikvitin proteazomového systému**. Oba mechanismy účinku

DEX by se tak mohly podílet na prevenci ANT navozeného a na TOP2B závislého poškození DNA v kardiomyocytech (Lyu et al., 2007). Doposud však nebyl prokázán příčinný vztah mezi schopností inhibovat/depletovat TOP2B v myokardu a kardioprotekcí vůči chronické ANT kardiotoxicitě. Navíc není jasné, zda by pro kardioprotekci byla nutná jak inhibice, tak i deplece TOP2B v myokardu. V neposlední řadě je třeba zdůraznit, že dostupné informace o možném významu TOP2B pro kardioprotekci navozenou DEX byly získány na metodicky problematickém modelu proliferaujících H9c2 myoblastů (Deng et al., 2014; Lyu et al., 2007). Tato často užívaná buněčná linie na rozdíl od kardiomyocytů exprimuje také TOP2A izoformu (Lenčo et al., 2015), která je DEX též ovlivněna (Deng et al., 2014). Někteří autoři také vztah kardioprotektivního účinku DEX k TOP2B popírají a navrhují **alternativní mechanismy účinku** (McCormack, 2018).

1.4.5. Nežádoucí účinky a pochybnosti o snížení protinádorového účinku a navození sekundárních malignit

DEX v kardioprotektivních dávkách používaných v klinických studiích u dospělých nezpůsobil vyšší výskyt nebo závažnost nežádoucích účinků spojených s ANT chemoterapií, s výjimkou leukopenie a/nebo trombocytopenie (Cvetkovic and Scott, 2005). **Myelotoxicita** může být až dávkou limitující nežádoucí účinek, který pravděpodobně souvisí s inhibicí TOP2A (Štěrbá et al., 2013).

Navzdory tomu, že DEX přesvědčivě chrání myokard, je jeho **použití v klinické praxi omezené** (Dadson et al., 2020; Simmons, 2019). Nejdříve to bylo kvůli obavám či nejistotám ze snížení protinádorového účinku ANT, později na to mělo větší vliv podezření na zvýšení rizika vzniku sekundárních malignit, které vedlo k dočasné kontraindikaci u dětí.

Významné, ačkoliv nepříliš dobře podložené, podezření na **potenciální interferenci DEX s protinádorovými účinky ANT** vzešlo z jedné studie 3. fáze klinického hodnocení (Swain et al., 1997b). Výsledky této randomizované dvojité zaslepené klinické studie u pacientů s pokročilým metastazujícím karcinomem prsu byly publikovány spolu s výsledky další studie s téměř totožným designem. Zatímco DEX potvrdil svou kardioprotektivní účinnost v obou studiích, jedna z těchto studií vnesla podezření, že by DEX mohl interferovat s protinádorovou aktivitou DOX, jelikož tzv. objektivní odpověď pacientů na léčbu v této studii byla v DEX skupině nižší než u placebové skupiny (46,8 % vs. 60,5 %, $p = 0,019$). Avšak druhá z těchto studií nezaznamenala žádný vliv DEX na tento parametr (53,7 % vs. 49,3 %, DEX vs. placebo, $p = 0,63$) (Swain et al., 1997b). Neobvykle

vysoká však byla zřejmě spíše odpověď pacientů na léčbu v placebo skupině v 1. studii. Navíc žádné další sledované onkologické parametry (včetně celkového přežití a času do progresu onemocnění) nebyly v těchto studiích ovlivněny. **Z předběžné opatrnosti** bylo ale **doporučeno užívat DEX jen po překročení kumulativní dávky 300 mg/m² DOX**, kdy se významně zvyšuje riziko kardiotoxicity (Swain and Vici, 2004). A přestože žádná další klinická studie u dospělých ani u dětí výše uvedené podezření nepotvrdila (shrnutí v Reichardt et al., 2018), předběžně zavedená omezení užití DEX zůstala beze změny.

Podezření na výskyt sekundárních malignit se mezi prvními objevilo ve studii od Tebbi et al. (2007). Zde bylo zjištěno, že přidání DEX k chemoterapeutickému režimu použitému při léčbě Hodgkinovy nemoci u pacientů do 21 let by mohlo zvyšovat riziko akutní myeloidní leukémie či myelodysplastického syndromu blížící se hranici statistické významnosti ($p = 0,06$). Ačkoliv sami autoři připustili nedostatky této studie spočívající v jejím návrhu a statistickém hodnocení, její výsledky vytvořily **základ pro rozhodnutí EMA o kontraindikaci DEX u dětských pacientů** (Shaikh et al., 2016). Toto rozhodnutí bylo vzhledem k předběžné opatrnosti platné **až do roku 2017** (Lipshultz, 2018), kdy byly k dispozici výsledky řady nových studií, které nepotvrdily tyto obavy (shrnutí v Reichardt et al., 2018). Změna rozhodnutí však byla pouze částečná, protože umožnila podat DEX **pouze u dětí s nejvyšším rizikem kardiotoxicity (s kumulativní dávkou DOX > 300 mg/m²)**.

1.4.6. Současné užití v klinické praxi

Dle SPC se DEX v současnosti v České republice používá především **k prevenci chronické kumulativní kardiotoxicity způsobené ANT**, a to u dospělých pacientů s pokročilým a/nebo metastazujícím nádorem prsu **po předchozí kumulativní dávce 300 mg/m² DOX** nebo předchozí kumulativní dávce **540 mg/m² epirubicinu**, pokud je vyžadovaná další léčba ANT (SPC Cyrdanax). Jedinou další klinickou indikací DEX je pak **léčba akutní extravazace ANT** (SPC Savene).

1.5. Další bisdioxopiperazinové deriváty

Jak již bylo zmíněno, látky patřící do skupiny bisdioxopiperazinů začaly být studovány v průběhu 60. let minulého století v laboratořích Imperial Cancer Research Fund (odtud zkratka ICRF v názvu látek) v Londýně jako protinádorová léčiva. Zde bylo zjištěno, že **protinádorová aktivita** je omezena pouze na látky velmi blízké **ICRF-154**. Konkrétně se vyskytuje pouze u látek se spojovacím řetězcem složeným ze 2 atomů uhlíku a zároveň bez substituce na dioxopiperazinových kruzích – např. **razoxan (ICRF-159)** a jeho oba

optické izomery (**DEX i levrazoxan**), či látku **ICRF-193** (Creighton et al., 1969). Otevření jednoho nebo obou dioxopiperazinových kruhů pak vedlo k úplné ztrátě protinádorové aktivity (Creighton et al., 1969; Hellmann, 1976). Pozdější práce (Ishida et al., 1991; Tanabe et al., 1991) ukázaly, že hlavním mechanismem jejich protinádorového účinku není chelatace biogenních iontů, ale **katalytická inhibice TOP2(A)**. Bisdioxopiperaziny jako katalytické inhibitory TOP2 navozují zástavu buněčného cyklu nádorových buněk zejména v G₂-M fázi (Ishida et al., 1991) díky aktivaci tzv. **dekatenačního checkpointu**, který monitoruje stav zřetězení chromozomů a zadrží buňku v G₂ fázi/oddálí vstup do mitózy do té doby, než budou sesterské chromatidy plně odděleny aktivitou TOP2A (Downes et al., 1994; Luo et al., 2009). Klasické TOP2A jedý jako je etoposid či **ANT**, jež navozují tvorbu dvojíých zlomů v DNA, aktivují zejména tzv. **DNA damage checkpoint** (Damelin and Bestor, 2007).

1.5.1. Kardioprotektivní účinky in vitro a in vivo

Na rozdíl od protinádorového účinku byly kardioprotektivní účinky bisdioxopiperazinových derivátů jiných než DEX zkoumány jen **v několika málo studiích** (Bureš et al., 2017; Herman et al., 1997; Jirkovská-Vávrová et al., 2015; Martin et al., 2009; Vávrová et al., 2013) a v drtivé většině vedla změna chemické struktury ke ztrátě kardioprotektivního potenciálu. Návrh a uspořádání těchto studií byly též zásadně ovlivněny nejasnostmi ohledně molekulárního mechanismu kardioprotektivního účinku, neboť donedávna byla hledána souvislost kardioprotektivního účinku téměř výhradně s chelatací iontů železa.

Protekcí před ANT kardiotoxicitou se věnovala studie Hermana et al. (1985), ve které byl studován účinek DEX a téměř 20 bisdioxopiperazinů na **snížení akutní celkové toxicity jednorázového podání vysoké dávky DAU** (25 mg/kg) u křečka. Kromě **DEX** a **ICRF-186 (levrazoxanu)** mortalitu navozenou ANT v této studii snížil pouze **bimolan** (derivát ICRF-154 s N-morfolinomethyl substituenty na obou dioxopiperazinových kruzích) (**Obr. 5**). U ICRF-193 žádná protektivní aktivita pozorována nebyla a látky ICRF-154 a ICRF-239 měly jen minimální protektivní aktivitu. Vztah těchto dat ke kardioprotektivním účinkům bisdioxopiperazinů ovšem zůstává nejasný, protože příčina mortality v této studii nebyla určena a použitá vysoká dávka ANT navozuje zejména významnou extrakardiální toxicitu. Parciální kardioprotektivní účinek byl u **ICRF-154** zaznamenán i na modelu u potkana **u krátkodobého opakovaného podávání DOX** (1× týdně po 30 dnů) (Květina et al., 1997). V jedné z dalších prací pak Ogose et al. (1996) pozorovali protektivní účinky

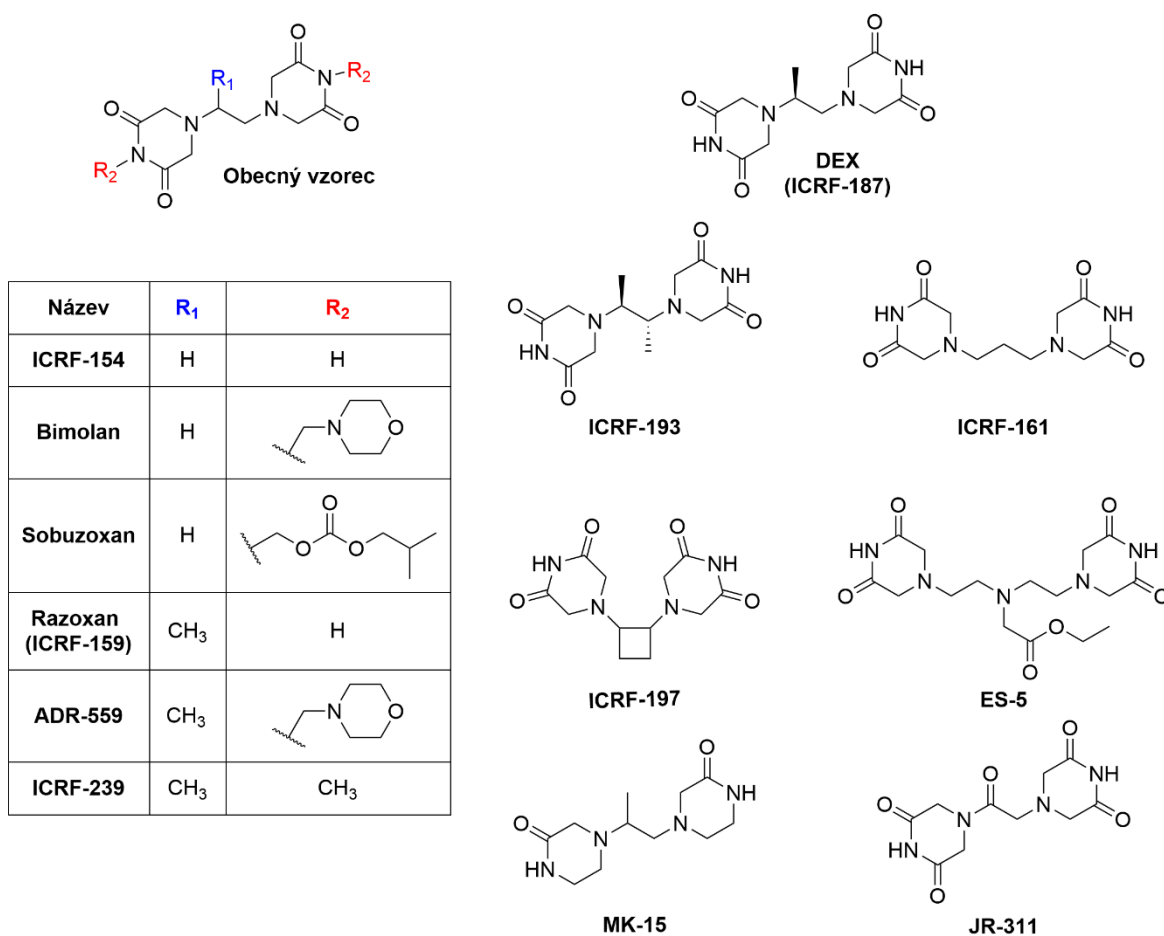
bisdioxopiperazinu **sobuzoxanu** (proléčiva ICRF-154, jež bylo schváleno v Japonsku pro *p.o.* léčbu T-buněčné leukémie a maligního lymfomu) vůči vakuolizaci kardiomyocytů a ztrátě myofibril na modelu u králíka (1 mg/kg DOX, 2× týdně, 5 týdnů).

První systematictější zkoumání kardioprotektivního účinku DEX a dalších bisdioxopiperazinů **na klinicky relevantním modelu ANT kardiotoxicity** bylo provedeno až později (Herman et al., 1997). V této práci byl vedle DEX hodnocen kardioprotektivní účinek 7 dalších bisdioxopiperazinových derivátů na validovaném modelu chronické ANT kardiotoxicity navozené DOX u spontánně hypertenzních potkanů (1 mg/kg, *i.v.*, 1× týdně, 12 týdnů). Z hodnocených látek snížily závažnost toxického poškození myokardu podobně jako DEX pouze deriváty **ICRF-154** a **ADR-559** (morfolinomethyl derivát, který hydrolyzou uvolňuje ICRF-159 – razoxan). Významná ale méně účinná protekce pak byla pozorována u derivátů **ICRF-197** a **ICRF-239**.

Martin et al. (2009) studovali kardioprotektivní účinky u derivátu DEX se spojovacím řetězcem prodlouženým o jeden uhlík (látka **ICRF-161**). Tato látka si díky svému metabolitu zachovala schopnost odnímat Fe^{3+} ionty z komplexu s DOX, ale ztratila schopnost inhibovat aktivitu TOP2. Ačkoliv látka ICRF-161 chránila NVCM *in vitro* před toxicitou DOX podobně jako DEX, při studiu *in vivo* na zavedeném modelu chronické ANT kardiotoxicity u spontánně hypertenzních potkanů nevykazovala významné kardioprotektivní účinky (na rozdíl od DEX). A to přesto, že farmakokinetický profil této látky u myši byl podobný jako u DEX. Tato studie tedy znejistila vztah kardioprotektivního účinku k chelataci iontů železa, a navíc poukázala na nezastupitelnou úlohu hodnocení kardioprotektivního účinku na *in vivo* modelu chronické ANT kardiotoxicity.

Kardioprotektivní účinky vybraných derivátů DEX byly také hodnoceny v několika studiích naší pracovní skupiny (Bureš et al., 2017; Jirkovská-Vávrová et al., 2015; Vávrová et al., 2013). První z nich (Vávrová et al., 2013) hodnotila protektivní účinky **DEX** a **sobuzoxanu** vůči kardiotoxicitě navozené DOX a DAU na NVCM. Zatímco DEX i sobuzoxan významně chránily NVCM vůči toxicitě navozené DOX i DAU, žádná z těchto látek nechránila kardiomyocyty před oxidačním poškozením navozeným H_2O_2 . Další studie (Jirkovská-Vávrová et al., 2015) se pak zaměřila na kardioprotektivní potenciál nových analogů DEX s prodlouženým spojovacím řetězcem (**ES-5**), či s odnětím oxo skupiny z dioxopiperazinových kruhů (**MK-15**) a také studovala lipofilnější deriváty metabolitu ADR-925 (**KH-TA4**, **JR-159**), které by mohly účinněji pronikat do buněk. Na rozdíl od DEX však žádný z těchto nových analogů DEX významně nechránil před toxicitou DAU na

NVCM *in vitro* a v myokardu králíka na chronickém *in vivo* modelu. Poslední z těchto studií (Bureš et al., 2017) studovala účinky nového derivátu DEX **JR-311** s pozměněným spojovacím řetězcem (nahrazení methylo oxo skupinou) *in vitro*. Ve standardním uspořádání látka JR-311 nevykázala významnou ochranu NVCM před toxicitou navozenou DAU. To však bylo dáno chemickou nestabilitou této látky v podmínkách *in vitro* pokusu vedoucí k nízké intracelulární expozici parentní látky. Opakované přidávání této látky do buněčného média v průběhu pokusu tedy zajistilo dostatečnou koncentraci JR-311 a ochranu NVCM před poškozením DAU. Chemická a metabolická nestabilita však látku JR-311 vyřadila z dalšího studia.



Obr. 5 Nejdůležitější deriváty dexrazoxanu (DEX) zmiňované v disertační práci.

Všechny výše uvedené studie s bisdioxopiperazinovými deriváty tedy nepřinesly látku, která by byla účinnější než klinicky užívaný DEX. Naopak většina studovaných obměn vedla ke snížení nebo úplné ztrátě kardioprotektivního potenciálu. V nedávno publikované práci naší pracovní skupiny (Jirkovská et al., 2021) byl však u jednoho ze studovaných bisdioxopiperazinů poprvé pozorován vyšší kardioprotektivní účinek vůči

toxicitě navozené DAU na NVCM *in vitro*, a zároveň účinnější katalytická inhibice TOP2B než u DEX. Tou látkou byl velmi blízký derivát DEX **ICRF-193** lišící se od DEX pouze jednou methylovou skupinou na spojovacím řetězci. Symetričnost molekuly ICRF-193 však s sebou přináší také velmi nízkou rozpustnost ve vodném prostředí, což prakticky znemožňuje podání této látky *in vivo* a hodnocení jejího kardioprotektivního potenciálu na klinicky relevantním modelu.

2. CÍLE PRÁCE

Tato disertační práce si kladla za cíl zkoumat kardioprotektivní účinky nových derivátů DEX vůči chronické ANT kardiotoxicitě na experimentálních modelech. Součástí této práce bylo studium vztahu struktura-účinek za účelem určení částí chemické struktury DEX nepostradatelných pro kardioprotektivní účinek, a naopak odhalení částí molekuly, jež by bylo možné pozměnit za vzniku potenciálně účinnějších derivátů. V neposlední řadě bylo cílem této práce také přispět k objasnění mechanismu kardioprotektivního účinku DEX jakožto klinicky užívaného léčiva.

1. Cílem disertační práce bylo studium kardioprotektivních účinků dvou sérií derivátů DEX vůči ANT toxicitě se zaměřením na:

- a) hodnocení jejich účinku *in vitro* a následně *in vivo* na modelu chronické ANT kardiotoxicity u králíka a ověření přenositelnosti výsledků mezi těmito modely,
- b) objasnění nových aspektů vztahů struktury a kardioprotektivního účinku DEX a jeho derivátů vůči chronické ANT kardiotoxicitě,
- c) studium plazmatické farmakokinetiky vybraných derivátů DEX a mechanismů jejich účinku.

2. Cílem disertační práce bylo hodnocení nových proléčiv ICRF-193 s lepší rozpustností ve vodném prostředí se zaměřením na:

- a) analýzu uvolňování aktivního metabolitu ICRF-193 a protektivní účinek vůči ANT toxicitě na NVCM v *in vitro* podmínkách,
- b) studium farmakokinetiky vybraného proléčiva GK-667 po jeho podání *in vivo* králíkovi,
- c) studium kardioprotektivních účinků proléčiva GK-667 vůči chronické ANT kardiotoxicitě na experimentálním modelu u králíka včetně dávkové závislosti,
- d) analýzu molekulárních mechanismů protekce, zejména s ohledem na ovlivnění DDR v myokardu navozené ANT,
- e) analýzu možného vlivu podání GK-667 na plazmatickou farmakokinetiku ANT *in vivo* u králíka a protinádorový účinek ANT *in vitro* na leukemické buněčné linii HL-60.

3. VÝSLEDKY – KOMENTÁŘE K PUBLIKOVANÝM PRACÍM S UVEDENÍM PODÍLU STUDENTKY

3.1. Komentář k Publikaci č. 1

Investigation of structure-activity relationships of dexrazoxane analogs reveals topoisomerase II β interaction as a prerequisite for effective protection against anthracycline cardiotoxicity

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-Kovaříková P., Roh J., Šimůnek T., Štěrba M.

Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2020, **373**(3):402–415;
<https://doi.org/10.1124/jpet.119.264580>

IF₂₀₂₀ = 4,030 (Q2); AIS₂₀₂₀ = 1,141 (Q1)

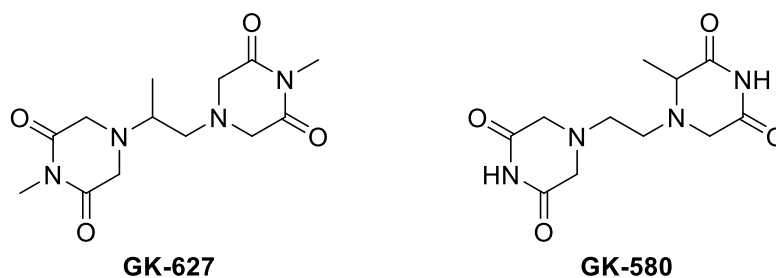
Cílem Publikace č. 1 bylo studium protektivního potenciálu dvou nových sérií derivátů DEX vůči ANT kardiotoxicitě, zhodnocení významu vybraných strukturních prvků molekuly DEX pro navození kardioprotektivního účinku a analýza účasti dvou nejčastěji zmiňovaných mechanismů (chelatace železa a inhibice TOP2B) na tomto účinku.

První skupina derivátů, jejichž protektivní účinky vůči ANT kardiotoxicitě byly hodnoceny v této studii, vznikla alkylací imidových dusíků dioxopiperazinových kruhů DEX. Tímto způsobem vznikl dimethyl (GK-627), diethyl (GK-638), diizopropyl (GK-639) a dibenzyl (GK-635) derivát DEX. Druhou skupinu derivátů pak tvořil izomethyl derivát DEX, u nějž byla methylová skupina ze spojovacího řetězce přemístěna do pozice 3 jednoho dioxopiperazinového kruhu (GK-580) a jeho ethyl analog (GK-5954). Obě skupiny látek přitom byly navrženy tak, aby byla zachována schopnost hydrolytického otevření dioxopiperazinových kruhů za vzniku chelatačních metabolitů.

Hodnocení protektivních účinků těchto derivátů *in vitro* na modelu NVCM vůči toxicitě navozené klinicky relevantní koncentrací DAU (1,2 μ M) však přineslo ve srovnání s DEX veskrze negativní výsledky. Ty naznačovaly, že by i pouhá metylace molekuly DEX na dioxopiperazinových kruzích mohla vést ke ztrátě kardioprotektivního potenciálu. Nicméně přinejmenším u jednoho z těchto derivátů, konkrétně látky GK-627 (označované také jako ICRF-239), byl v předchozí *in vivo* studii udáván určitý protektivní účinek vůči DOX navozenému poškození myokardu na modelu chronické ANT kardiotoxicity (Herman

et al., 1997), proto bylo nutné tyto výsledky ověřit a podrobněji analyzovat. Pro tento účel byly vybrány dva nejbližší deriváty DEX (GK-627 a GK-580, **Obr. 6**), jež byly podrobeny důkladnému hodnocení na zavedeném modelu chronické ANT kardiotoxicity u králíka.

Opakované podávání DAU (3 mg/kg, *i.v.*, 1× týdně po 10 týdnů) navodilo na tomto modelu předčasnou úhyn zvířat v důsledku srdečního selhání, způsobilo významný pokles systolické funkce LK a výskyt výpotků v dutině hrudní a břišní značící oběhové městnání. Dále bylo v této skupině pomocí histopatologického vyšetření, stanovení koncentrací srdečního troponinu T v plazmě, jakož i molekulárních markerů toxicity v myokardu LK (např. exprese atriálního natriuretického peptidu) zdokumentováno významné poškození myokardu. Podávání DEX (60 mg/kg) intraperitoneálně (*i.p.*), 30 min před každou dávkou DAU téměř kompletně ochránilo myokard zvířat před všemi těmito změnami. Avšak podání obou nejbližších derivátů DEX (GK-627 a GK-580) ve stejné dávce a stejnou cestou podání (60 mg/kg, *i.p.*, 30 min před každou dávkou DAU) nenavodilo významnou protekci vůči změnám žádného z uvedených parametrů. Studium plazmatické farmakokinetiky těchto derivátů DEX *in vivo* u králíka ukázalo, že absence kardioprotektivních účinků nemůže být u těchto látek vysvětlena jejich nižšími koncentracemi (a s tím související nedostatečnou expozicí myokardu), protože stanovené hodnoty byly podobné nebo dokonce ještě vyšší než u DEX. Také schopnost otevřených metabolitů látek GK-627 a GK-580 chelátovat železo a odnímat jej z komplexu s DAU se významně nelišila od metabolitu DEX (ADR-925). Uvedené deriváty se však zásadně lišily od DEX ve schopnosti navodit inhibici a depleci TOP2B *in vitro* a *in vivo* – na rozdíl od DEX zde byly všechny jeho deriváty zcela bez účinku. Výsledky této studie tedy ukazují na velmi těsný vztah struktury a kardioprotektivního účinku DEX a dalších bisdioxopiperazinů. Chemická modifikace dioxopiperazinových kruhů DEX se tedy v tomto kontextu zdá být pro zachování kardioprotektivní aktivity relativně problematická. Tato data také přispívají k hromadícím se důkazům, že interakce bisdioxopiperazinů s TOP2B je nezbytná pro účinnou kardioprotekci vůči toxicitě ANT a že chelatační vlastnosti jejich metabolitů nemusí hrát v tomto účinku významnou roli.



Obr. 6 Struktury látek **GK-627** a **GK-580**, derivátů DEX s nejmenšími obměnami struktury, jež byly použity v *in vivo* části experimentů v Publikaci č. 1.

Podíl studenta na Publikaci č. 1:

Student je prvním autorem komentovaného manuskriptu a měl hlavní autorský podíl na následujících činnostech vedoucích k jeho vzniku:

- 1) plánování a příprava návrhu studie (ve spolupráci se školitelem),
- 2) realizace *in vivo* části experimentu, včetně aplikace studovaných látek pokusným zvířatům, odběru vzorků, invazivního hodnocení srdeční funkce pomocí katetru a molekulárních analýz myokardu,
- 3) analýza a interpretace získaných dat včetně jejich statistického hodnocení,
- 4) příprava manuskriptu (ve spolupráci se školitelem) včetně obrázků a jeho úprava dle připomínek oponentů.

3.2. Komentář k Publikaci č. 2

Development of water-soluble prodrugs of the bisdioxopiperazine topoisomerase II β inhibitor ICRF-193 as potential cardioprotective agents against anthracycline cardiotoxicity

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., Štěrba M., Štěrbová-Kovaříková P.

Scientific Reports, 2021, **11**(1): 4456; <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83688-x>

IF₂₀₂₀ = 4,380 (Q1); AIS₂₀₂₀ = 1,285 (Q2)

Cílem této studie bylo připravit nová proléčiva ICRF-193, jež budou dobře rozpustná ve vodném prostředí, což umožní jejich podání *in vivo*, charakterizovat jejich bioaktivaci na ICRF-193 *in vitro*, analyzovat kardioprotektivní potenciál vůči toxicitě ANT *in vitro* a u vybraného proléčiva popsat farmakokinetiku *in vivo* u králíka.

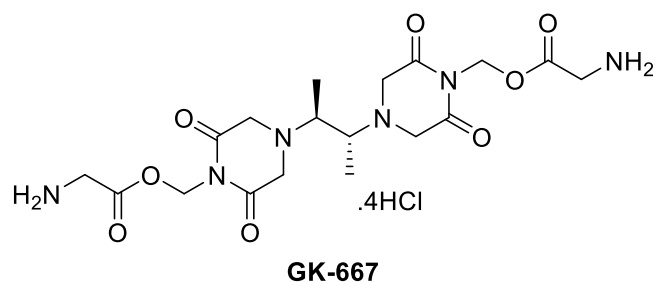
Po vzoru bisdioxopiperazinu ICRF-154 a jeho proléčiva sobuzoxanu byla v této studii připravena 3 ve vodě rozpustná proléčiva ICRF-193 ve formě esterů karboxylových kyselin 2-aminooctové (GK-667), 2-aminopropionové (GK-678) a 2-amino-3-fenylpropionové (GK-691), jejichž rozpustnost ve vodě byla o několik řádů lepší než u ICRF-193 (10–20 mg/ml vs. $\leq 0,005$ mg/ml u ICRF-193).

S užitím UHPLC-MS/MS bylo u všech proléčiv v průběhu inkubace v buněčném médiu zaznamenáno rychlé uvolnění ICRF-193 s následnou přeměnou na jeho neaktivní metabolit s plně otevřenými dioxopiperazinovými kruhy (ICRF-193_{met}). Hodnocení těchto proléčiv na standardním *in vitro* modelu ANT kardiotoxicity (1,2 μ M DAU na NVCM) následně ukázalo, že významné cytoprotektivní účinky jsou u GK-667 dosažitelné již od koncentrace 0,3 μ M, což prakticky odpovídalo pokusům se samotnou aktivní látkou ICRF-193. U ostatních proléčiv byla protekce statisticky významná až u vyšších koncentrací (3 μ M). Tyto výsledky jsou patrně dány nejrychlejším uvolněním ICRF-193 z GK-667 v buněčném médiu a zároveň nejpomalejším metabolismem této aktivní látky na neaktivní metabolit ICRF-193_{met}. Ačkoliv intracelulární koncentrace ICRF-193 v NVCM po podání GK-667 byly nižší než ty, jež byly v minulosti stanoveny u DEX (Jirkovský et al., 2018), protektivní účinnost dosažená *in vitro* byla vyšší, než jsme pozorovali u DEX (Jirkovská et al., 2021).

Na základě těchto výsledků a zároveň nízké cytotoxicity, bylo pro léčivo GK-667 (**Obr. 7**) vybráno pro další studium, kde byla bioaktivace GK-667 (10 a 100 μM) hodnocena nejprve v králičí plazmě *in vitro*. Zde uvolnění ICRF-193 probíhalo ještě rychleji než v buněčném médiu a relevantním pufru, což naznačuje, že složky plazmy (např. esterázy, či ionty) patrně urychlují tyto procesy.

Na základě předcházejících experimentů bylo provedeno pilotní studium farmakokinetiky GK-667 po jednorázovém *i.v.* podání králíkovi. Pro tento experiment byla zvolena dávka 5 mg/kg GK-667 ve formě soli (obsahující 3,78 mg/kg volné baze GK-667 a 2,34 mg/kg aktivního ICRF-193). Tato dávka byla snadno rozpustná ve fyziologickém roztoku a králíkům ($n = 6$) byla podána jako pomalý *i.v.* bolus. Nejvyšší koncentrace GK-667 v plazmě byly zjištěny v prvním odebraném intervalu (5 min; $\approx 2,7 \mu\text{M}$). Následný pokles GK-667 v plazmě byl velmi rychlý, protože již ve 20. min byly koncentrace téměř u všech zvířat pod spodním limitem kvantifikace metody (0,1 μM). Kvůli rychlému rozkladu GK-667 v plazmě bylo po odběru nutné provést okamžitou úpravu vzorku plazmy za současného chlazení a analytická metoda byla pro tento účel také validována. Nejvyšší koncentrace ICRF-193 v plazmě ($\approx 11 \mu\text{M}$) stanovená taktéž již v 5. min byla více než 30 \times vyšší než nejnižší koncentrace poskytující významnou ochranu vůči ANT toxicitě *in vitro* (0,3 μM). Navíc 30 min po podání GK-667, tzn. těsně před podáním ANT *in vivo* (dle časového rozestupu doporučeného u DEX) byla koncentrace ICRF-193 přibližně 2 μM . Koncentrace ICRF-193 v plazmě pak zůstávaly v rozmezí koncentrací cytoprotektivně účinných *in vitro* přibližně 3 h, což také koresponduje s délkou preinkubační periody s proléčivem dle standardního protokolu *in vitro* pokusu.

V této práci byly poprvé stanoveny základní farmakokinetické parametry ICRF-193 a jeho neaktivního metabolitu (ICRF-193_{met}) *in vivo*, a to jak pomocí non-kompartmentové analýzy, tak i populační farmakokinetické analýzy. V porovnání s DEX byl u ICRF-193 zjištěn kratší poločas eliminace (0,8 vs 2,0 h) a vyšší celková clearance, což odpovídalo rychlejšímu poklesu plazmatických koncentrací ICRF-193 u jednotlivých zvířat. Plazmatické koncentrace ICRF-193 a celková expozice myokardu byly shledány dostatečné pro pokročilejší hodnocení protektivního účinku vůči chronické ANT kardiotoxicitě *in vivo* na modelu u králíka.



Obr. 7 Struktura látky **GK-667**, ve vodě rozpustného proléčiva bisdioxopiperazinu ICRF-193 vybraného pro další podrobnější studium *in vivo*.

Podíl studenta na Publikaci č. 2:

Student je spoluautorem komentovaného manuskriptu a měl hlavní autorský podíl na následujících činnostech vedoucích k jeho vzniku:

- 1) plánování a realizace *in vivo* části experimentů, včetně aplikací studované látky pokusným zvířatům a odběru vzorků, spolupráce na validaci pre-analytické části metody,
- 2) interpretace *in vivo* výsledků a spoluúčast na přípravě manuskriptu.

3.3. Komentář k Publikaci č. 3

Prodrug of ICRF-193 provides promising protective effects against chronic anthracycline cardiotoxicity in a rabbit model *in vivo*

Kollárová-Brázdová P., Lenčová-Popelová O., Karabanovich G., Kocúrová-Lengvarská J., Kubeš J., Váňová N., Mazurová Y., Adamcová M., Jirkovská A., Holečková M., Šimůnek T., Štěrbová-Kovaříková P., Roh J., Štěrba M.

Clinical Science, 2021, **135**(15), 1897–1914; <https://doi.org/10.1042/CS20210311>

IF₂₀₂₀ = 6,124 (Q1); AIS₂₀₂₀ = 1,568 (Q1)

Hlavním cílem této studie bylo určit, zda vybrané proléčivo ICRF-193, tj. látka GK-667, dokáže poskytnout účinnou a na dávce závislou ochranu vůči chronické ANT kardiotoxicitě *in vivo* na modelu u králíka, a přitom se zaměřit na potenciální molekulární aspekty kardioprotektivního účinku, zejména pak na ovlivnění DDR v myokardu. Dalším cílem této studie bylo ověřit, jestli podání GK-667 neovlivňuje farmakokinetiku ANT *in vivo* a zda tato látka významně nesnižuje protinádorový účinek ANT *in vitro*.

S využitím modelu chronické ANT kardiotoxicity navozené DAU u králíka (3 mg/kg, *i.v.*, 1 × týdně, 10 týdnů) jsme v této studii ukázali, že látka GK-667 v dávce 1 a 5 mg/kg podaná *i.v.* 30 min před DAU účinně a kompletně předchází DAU navozeným předčasným úhynům pokusných zvířat, známkám městnání krve a dysfunkci LK hodnocené echokardiograficky i katetrizačně. Analýza biomarkerů srdečního poškození (koncentrace srdečního troponinu T v plazmě) a dysfunkce LK (např. exprese atriálního natriuretického peptidu), stejně jako histologické vyšetření myokardu LK pak ukázaly na dávkovou závislost účinků GK-667. Zatímco v kombinační skupině s nižší dávkou GK-667 (1 mg/kg) jsme zaznamenali subklinické, avšak statisticky významné poškození struktury a funkce myokardu, ve skupině s vyšší dávkou GK-667 (5 mg/kg) byla ochrana myokardu téměř kompletní. Látka samotná i v kombinaci s DAU byla přitom zvířaty velmi dobře tolerována.

Chronické podávání DAU také navodilo v myokardu králíka významné zvýšení p53 jakožto klíčové molekuly řídící DDR. Zároveň byla v myokardu zjištěna významná transkripční aktivace jeho cílových genů (např. p21 a MDM2) a zvýšení aktivity klíčové apoptotické kaspázy 3/7. V kombinačních skupinách s GK-667 byla patrná na dávce závislá inhibice této signalizace v myokardu. V dalších experimentech bylo prokázáno, že podání GK-667 dokáže zabránit výraznému zvýšení p53 v myokardu (a jím zprostředkované DDR) i 6 h po podání jedné dávky DAU. Vztah těchto mechanismů ke kardioprotektivnímu účinku

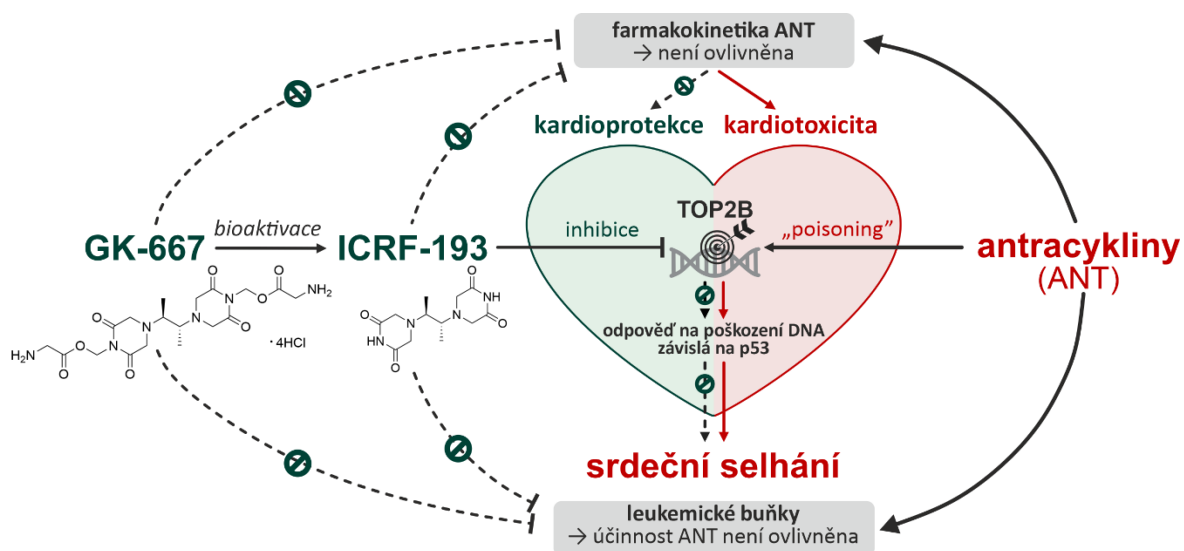
byl studován pomocí podání blízkého derivátu DEX (GK-627), o kterém jsme z předchozí studie (Publikace č. 1) věděli, že nechrání myokard vůči chronické ANT kardiotoxicitě. Podání látky GK-627 stejným způsobem jako v chronické studii (60 mg/kg, *i.p.*) nemělo žádný vliv na DDR navozenou ANT v myokardu, přičemž exprese p53 a jeho cílových genů se prakticky nelišily od skupiny, které byl podán samotný DAU.

Výsledky dekatenačního testu studujícího účinek GK-667 a ICRF-193 na aktivitu TOP2B *in vitro* ukázaly, že zatímco ICRF-193 účinně a na dávce závisle inhibuje aktivitu TOP2B již od nejnižší použité koncentrace (1 μM), inhibice aktivity TOP2B u jeho proléčiva GK-667 byla pozorována až u vysokých koncentrací (1000 μM), jež nemohly být v našich *in vivo* pokusech dosaženy. Derivát GK-627 z Publikace č. 1 přitom neměl na aktivitu TOP2B žádný významný vliv.

Tyto výsledky naznačují, že mechanismus velmi účinné kardioprotekce navozené podáním látky GK-667 je možné dát do přímé souvislosti s prevencí ANT navozené a p53 zprostředkované DDR v myokardu. Tento účinek je zřejmě dán katalytickou inhibicí TOP2B pomocí ICRF-193 uvolněného z proléčiva GK-667, jež brání účinku ANT jako topoizomerázového jedu a předchází tak poškození DNA (**Obr. 8**).

Dále jsme v této práci zjistili, že kardioprotekce navozená GK-667 není spojena se změnou plazmatické farmakokinetiky DAU a jeho hlavního metabolitu daunorubicinolu u králíka *in vivo*. V pilotním *in vitro* experimentu navíc látka GK-667 neměla významný negativní vliv na protinádorovou aktivitu DAU vůči leukemické buněčné linii HL-60.

Lze tedy shrnout, že z výše uvedených důvodů si látka GK-667 zasluhuje další pozornost jako perspektivní kardioprotektivum vůči chronické ANT kardiotoxicitě.



Obr. 8 Grafický abstrakt zobrazující hlavní zjištění Publikace č.3, konkrétně mechanismus kardioprotektivních účinků bisdioxopiperazinu GK-667 vůči chronické antracyklinové (ANT) kardiotoxicitě (převzato a upraveno z Publikace č. 3). TOP2B – topoizomeráza II β , „poisoning“ – účinek ANT jako topoizomerázového jedu, tj. stabilizace komplexu TOP2B-DNA, jež následně vede ke vzniku dvojitého zlomu DNA.

Podíl studenta na Publikaci č. 3:

Student je prvním autorem komentovaného manuskriptu a měl hlavní autorský podíl na následujících činnostech vedoucích k jeho vzniku:

- 1) plánování a příprava návrhu studie (ve spolupráci se školitelem),
- 2) realizace *in vivo* části experimentu, včetně aplikace studovaných látek pokusným zvířatům, odběru vzorků, invazivního hodnocení srdeční funkce pomocí katetru a molekulárních analýz myokardu,
- 3) analýza a interpretace získaných dat včetně jejich statistického hodnocení,
- 4) příprava manuskriptu (ve spolupráci se školitelem) včetně obrázků a jeho úprava dle připomínek oponentů.

4. DISKUSE

Kardiotoxicita patří mezi nejzávažnější komplikace provázející chemoterapii ANT (Ewer and Ewer, 2015). Ačkoliv je podávání ANT pečlivě plánováno a probíhá v nemocničním prostředí, což představuje ideální podmínky pro případnou kardioprotektivní intervenci, dodnes většina pacientů absolvuje celou plánovanou chemoterapii obsahující ANT bez aktivní ochrany myokardu (Benjamin and Minotti, 2021). Navzdory půl století trvajícím experimentálnímu výzkumu a vývoji se do klinické praxe dostalo pouze jediné léčivo (DEX), jehož použití je navíc v současnosti velmi omezené (Curigliano et al., 2020; Reichardt et al., 2018; Simmons, 2019). Největším problémem ve výzkumu a vývoji účinných kardioprotektiv vůči ANT kardiotoxicitě bylo (a do určité míry stále je) nedostatečné pochopení klíčových mechanismů vzniku toxického poškození myokardu (Dadson et al., 2020), což znemožnilo určení a řádnou validaci molekulárních cílů pro farmakologickou intervenci (tzv. *druggable targets*) s následným systematickým hledáním optimálního léčiva, jež by je ovlivnilo. Další překážkou ve vývoji klinicky použitelného kardioprotektiva je také značná různorodost používaných experimentálních modelů ANT kardiotoxicity, z nichž ne všechny dobře odráží klíčové aspekty kardiotoxicity pozorované v klinické praxi. Výsledkem toho je, že v literatuře je prezentováno velké množství nadějných experimentálních výsledků, které se ovšem nedaří přenést do klinických podmínek (shrnuje Štěrba et al., 2013).

Bisdioxopiperazinové deriváty byly systematicky studovány jako protinádorová léčiva od konce 60. let 20. století (Creighton et al., 1969), přičemž vztah struktury a protinádorového účinku byl u nich poměrně dobře definován (Hellmann, 1976). Ačkoliv původním záměrem bylo připravit proléčiva, která by prostřednictvím svých metabolitů v nádorových buňkách chelatovala biogenní ionty (Creighton et al., 1969), poměrně brzy bylo zjištěno, že jejich protinádorový účinek je založen na inhibici TOP2(A) (Tanabe et al., 1991). Avšak na rozdíl od tzv. topoizomerázových jedů, mezi které patří i ANT, se bisdioxopiperaziny řadí do skupiny tzv. katalytických inhibitorů TOP2, které primárně nenavozují vznik dvojitého zlomu DNA (Styczynski et al., 2002).

Kardioprotektivní účinek razoxanu/DEX byl objeven až později při studiu kombinace těchto léčiv s ANT (Herman et al., 2014; Herman et al., 1972) a nakonec se ukázal perspektivnější pro klinické využití než původně studovaný protinádorový účinek. U DEX byly opakovaně popsány významné kardioprotektivní účinky *in vivo* i v klinických

studiích a zároveň bylo zjištěno, že je poměrně rychle metabolizován na metabolit ADR-925, který se strukturou podobá známému chelátoru EDTA a je schopen odnímat volné ionty železa z komplexu s ANT (Hasinoff et al., 1998). Ačkoliv kauzální vztah mezi chelatační aktivitou metabolitu DEX (ADR-925) a kardioprotekcí před ANT kardiotoxicitou nebyl nikdy prokázán, tato teorie se stala velmi populární a dodnes ji lze nalézt jak v SPC léčivých přípravků obsahujících DEX (SPC Cyrdanax), tak i v odborné literatuře – např. Benjamin and Minotti (2021); Hutchins et al. (2017). Objev DEX ovšem nebyl výsledkem systematického studia kardioprotektivních účinků bisdioxopiperazinových derivátů, tak jak je tomu u většiny jiných klinicky užívaných léčiv, což vysvětluje relativně omezené informace o vztahu struktury a jeho kardioprotektivního účinku (na rozdíl od protinádorového účinku, kde je informací poměrně hodně). Nebylo tedy vyloučeno, že by v této skupině bylo možné najít účinnější a bezpečnější kardioprotektivní léčivo.

V naší první práci (Publikace č. 1) bylo v *in vitro* části studie s užitím NVCM zjištěno, že i jednoduchá substituce methylem na imidových dusících či přesun methyly z alifatického spojovacího řetězce do polohy 3 na jednom dioxopiperazinovém kruhu DEX vede ke kompletní ztrátě protektivního účinku vůči toxicitě ANT. Tento náález byl ale v rozporu se závěrem předchozí studie (Herman et al., 1997), ve které se *N,N'*-dimethyl derivát DEX (látka ICRF-239/GK-627) jevil jako účinný ve snížení poškození myokardu na modelu chronické ANT kardiotoxicity u spontánně hypertenzních potkanů. Náš předběžný závěr ovšem vycházel pouze z pokusu *in vitro*, což jsme nepovažovali za dostatečně průkazné. Modelování komplexního chronického děje, jakým je ANT kardiotoxicita, v relativně krátkém pokusu *in vitro* s primárními kardiomyocyty je totiž obtížné a predikce kardioprotektivního účinku může být nejistá. To ukázaly dřívější studie zaměřené na kardioprotektivní účinek chelátoru železa deferipronu (Popelová et al., 2008) a také jednoho z blízkých derivátů DEX (Martin et al., 2009). Proto jsme se rozhodli účinnost 2 derivátů DEX s nejmenší změnou v molekule (GK-627 a GK-580) ověřit na zavedeném modelu chronické ANT kardiotoxicity u králíka. Zde jsme zjistili, že ačkoliv podání těchto látek ve stejném schématu jako DEX vede k dosažení podobných nebo ještě vyšších plazmatických koncentrací (a expozic myokardu) než v případě DEX, na rozdíl od tohoto klinicky užívaného kardioprotektiva ani jeden z těchto derivátů nenavodil významnou kardioprotekci vůči chronické ANT kardiotoxicitě. Absence jakýchkoliv známek protektivního účinku byla jasně patrná na všech studovaných parametrech kardiotoxicity, což kontrastovalo s přesvědčivým účinkem DEX.

Chemická obměna struktury těchto derivátů DEX byla ale navržena záměrně tak, aby dioxopiperazinové kruhy mohly být metabolicky otevřeny podobně jako u DEX. Tento předpoklad byl potvrzen v naší farmakokinetické studii, kde byly u metabolitu derivátu GK-627 zjištěny dokonce vyšší plazmatické koncentrace než v případě ADR-925 po podání DEX. Navíc bylo prokázáno, že tyto metabolity derivátů DEX chelatují volné ionty železa a odnímají je z komplexu s ANT podobně jako ADR-925. Přesto ani jedna z těchto látek nevykázala ani částečný kardioprotektivní účinek. Tyto nálezy nás vedly k podrobné analýze pozitivních výsledků prezentovaných k této látce v předchozí studii (Herman et al., 1997). Ačkoliv histopatologické skóre myokardiálního poškození bylo na modelu chronické ANT kardiotoxicity v dotčené kombinační skupině opravdu nižší, zjistili jsme, že důvodem nemusela být kardioprotektivní účinnost studovaného derivátu, ale spíše nižší průměrná kumulativní dávka ANT, kterou zvířata v této skupině dostala v důsledku předčasných úhynů (příčina úhynů nebyla z prezentovaných dat jasná). V naší studii většina zvířat v kombinační skupině s touto látkou dokončila experiment a neshledali jsme u nich žádné známky zmírnění ANT kardiotoxicity. Navíc všechny úhyny zvířat v této skupině byly v našem experimentu prokazatelně spojeny s rozvojem těžkých forem ANT kardiotoxicity a chronického srdečního selhání. Naše závěry tedy poměrně přesvědčivě ukazují, že *N,N'*-dimethyl derivát (GK-627/ICRF-239) nelze považovat za kardioprotektivně aktivní.

Z našich výsledků také plyne, že chelatační vlastnosti metabolitů DEX derivátů nekorelují s kardioprotektivní aktivitou těchto látek. K podobnému výsledku došel náš kolektiv v předchozí experimentální práci zaměřené na jiné deriváty DEX (Jirkovská-Vávrová et al., 2015) a obdobný závěr vyplynul i ze studia látky ICRF-161 a dalších derivátů DEX jinými autory (Herman et al., 1997; Martin et al., 2009). Naše skupina v minulosti také zkoumala lipofilnější deriváty domnělého aktivního metabolitu DEX (ADR-925) jako potenciální kardioprotektiva a opět se zcela negativním výsledkem (Jirkovská-Vávrová et al., 2015). Proti chelatačnímu mechanismu kardioprotektivního účinku DEX hovoří i poznatek, že komplex ADR-925 s ionty železa je stále redoxně aktivní (Thomas et al., 1993). Ze stejného důvodu se chelátory odvozené od EDTA nepoužívají při ochraně tkání před toxicitou navozenou přetížením ionty železa (Jansová and Šimůnek, 2019). Indikovány zde mohou být pouze chelátory, které tvoří redoxně neaktivní komplexy s ionty železa (např. deferoxamin či deferipron), ovšem ty na klinicky relevantních modelech chronické ANT kardiotoxicity nenavodily žádný kardioprotektivní účinek (Herman et al., 1994; Popelová et al., 2008).

Celkově tedy výsledky této práce v kontextu publikovaných dat hovoří významně proti dominantní teorii vysvětlující kardioprotekci DEX pomocí chelatace volných iontů železa a jejich odnímání z komplexu s ANT. Na druhou stranu jsme stále neměli k dispozici přímý přesvědčivý důkaz svědčící proti platnosti této teorie. Tento důkaz přinesla teprve nedávno publikovaná práce naší skupiny (Jirkovský et al., 2021), na které jsem se též částečně podílela. V této práci byl domnělý aktivní metabolit DEX ADR-925 podáván exogenně do média NVCM *in vitro* a *i.v.* infuzí králíkům *in vivo*. Exogenní podání ADR-925 v tomto pokusu zajistilo stejné nebo vyšší koncentrace ADR-925 v kardiomyocytech i myokardu králíka než při podání DEX (v dávkovacím schématu, kdy je DEX *in vitro* i *in vivo* kardioprotektivně účinný). Nicméně navzdory vyšší expozici toto exogenní podání ADR-925 nemělo na rozvoj chronické ANT kardiotoxicity žádný vliv, což kontrastovalo s robustní účinností parentního DEX. Tyto důkazy tedy popírají tradiční hypotézu, že za kardioprotektivní účinek DEX je zodpovědný jeho chelatačně aktivní metabolit ADR-925. Podobně nepravděpodobná se též ukázala být úloha přechodných metabolitů s jedním otevřeným dioxopiperazinovým kruhem (B a C). V souhrnu všechny tyto výsledky také vysvětlují, proč dlouhodobé výzkumné úsilí směřované k ochraně myokardu před ANT kardiotoxicitou pomocí chelatace iontů železa nepřineslo pozitivní výsledky přenositelné do klinické praxe.

ANT kardiotoxicita začala být v posledním desetiletí spojována s interakcí ANT s TOP2B (Vejpongsa and Yeh, 2014b; Zhang et al., 2012). V tomto kontextu je třeba připomenout, že DEX a další bisdioxopiperaziny jsou známými katalytickými inhibitory TOP2 (Lyu et al., 2007; Tanabe et al., 1991), jenom u nich byla dosud věnována pozornost téměř výhradně antiproliferačnímu účinku v nádorových buňkách, který je spojený s ovlivněním α izofomy tohoto enzymu (TOP2A) (Patel et al., 2000). DEX je ale také inhibitorem β izofomy tohoto enzymu (TOP2B), jak je tomu ukázáno i v Publikaci č.1 v tzv. dekatenačním testu. Kardioprotektivní účinky DEX vůči ANT kardiotoxicitě byly již dříve spojovány s inhibicí TOP2B, ale k dispozici byla pouze data získaná s užitím buněčné linie H9c2 (Deng et al., 2014; Lyu et al., 2007). Tato buněčná linie sice byla odvozena z embryonálního myokardu potkana (Kimes and Brandt, 1976), ale fenotypem se zásadně liší od primárních kardiomyocytů (Lenčo et al., 2015). Navíc tato buněčná linie v podmínkách užitých v tomto pokusu aktivně proliferuje a exprimuje TOP2A i TOP2B, což je další podstatný rozdíl oproti terminálně diferencovaným kardiomyocytům (včetně NVCM) a myokardu dospělých pokusných zvířat, kde TOP2A téměř není exprimována

a dominantní izoformou je TOP2B (Lenčo et al., 2015; Vejpongsa and Yeh, 2014b). Interpretace těchto publikovaných výsledků směrem ke kardioprotekci tedy byla velmi obtížná. Je ale třeba uvést, že existují i další teorie vysvětlující kardioprotektivní účinek DEX. Např. McCormack (2018) rozporuje význam interakce DEX s TOP2B pro kardioprotektivní účinek a místo toho navrhuje jako alternativní hypotézu jeho interakci s poly(ADP-ribózou). Jiní autoři přikládají význam přímému antioxidantnímu účinku parentní molekuly DEX (Junjing et al., 2010).

V Publikaci č. 1 jsme ale pozorovali, že ztráta kardioprotektivního účinku studovaných derivátů DEX *in vitro* a *in vivo* byla spojena s téměř kompletní ztrátou inhibičního účinku na rekombinantní TOP2B *in vitro*. Tyto výsledky naznačovaly, že místo chelatace iontů železa by pro kardioprotektivní účinky DEX a jeho derivátů mohla být důležitá právě katalytická inhibice TOP2B. K podobnému výsledku došli také autoři Martin et al. (2009) studující derivát DEX ICRF-161. A také v předchozí studii naší výzkumné skupiny (Jirkovská-Vávrová et al., 2015) byla pozorována koincidence ztráty kardioprotektivního účinku derivátů DEX se ztrátou schopnosti depletovat TOP2B v kardiomyocytech, přičemž deplece tohoto enzymu je zřejmě podmíněna a následuje právě po její katalytické inhibici. V novější práci našeho kolektivu (Jirkovský et al., 2021) byly studovány diastereoizomery nového ethylmethyl derivátu DEX, které se podstatně lišily v protektivní účinnosti vůči ANT kardiotoxicitě *in vitro* na NVCM, přestože jejich metabolity odnímalý ionty železa z komplexu s ANT téměř identicky. Kardioprotektivní potenciál diastereoizomerů této látky opět velmi dobře koreloval právě s inhibicí TOP2B.

Kolektivně tedy výsledky komentované v této disertační práci poměrně dobře zapadají do literárních dat a ukazují na těsný vztah struktury a kardioprotektivního účinku derivátů DEX, stejně jako na pravděpodobnou zásadní roli inhibice TOP2B v tomto účinku. Tento nález byl dále podpořen další novější studií naší pracovní skupiny (Jirkovská et al., 2021), kde bylo potvrzeno, že i další obměny molekuly DEX na dioxopiperazinových kruzích vedou ke ztrátě inhibiční aktivity těchto látek vůči TOP2B a zároveň i ke ztrátě protektivního účinku vůči ANT toxicitě na NVCM. Jako perspektivnější k chemické modifikaci se však ukázal alifatický spojovací řetězec bisdioxopiperazinů, i když i zde byly nalezeny podstatné rozdíly. Kupříkladu bylo zjištěno, že objemnější substituenty, nebo přidání dalšího methylu na již metylovaný uhlík spojovacího řetězce vedly ke ztrátě inhibice TOP2B i cytoprotektivního účinku vůči ANT toxicitě *in vitro*. Nicméně přidání methylu na sousední nesubstituovaný uhlík vedlo u látky ICRF-193 ke zcela opačnému účinku

(tj. významnému zvýšení účinnosti v obou těchto testech). V této práci bylo též provedeno tzv. dokování a dynamické molekulární modelování vztahu struktury studovaných DEX derivátů a vazného místa TOP2, které potvrdilo, že substituce na spojovacím řetězci a jejich konfigurace hrají zásadní roli v umožnění žádoucích interakcí molekuly s vazebným místem na TOP2.

Ve výše zmíněné práci (Jirkovská et al., 2021) a souvisejících patentových přihláškách naší skupiny PV 2020-26 a PCT/IB2021/050285 byl tedy poprvé identifikován bisdioxopiperazinový derivát s vyšší účinností než DEX (látka ICRF-193), a to jak v inhibici TOP2B, tak i v protekci vůči ANT toxicitě na NVCM *in vitro*. Tento nálezn byl následně potvrzen v práci dalších autorů (Hasinoff et al., 2020a). Ačkoliv obě tyto studie ukazují, že ICRF-193 vykazuje nejvyšší kardioprotektivní potenciál ze všech dosud zkoumaných bisdioxopiperazinů, tato symetrická molekula je velmi těžko rozpustná ve vodném prostředí ($\leq 0,005$ mg/ml). To je vlastnost z farmaceutického hlediska nevhodná, protože znemožňuje podání této látky *in vivo* s dosažením přiměřené biologické dostupnosti. Proto jsme ve spolupráci s farmaceutickými chemiky a analytiky v další práci (Publikace č. 2) studovali možnost překonání této nevýhody prostřednictvím přípravy proléčiv s podstatně lepší rozpustností ve vodných roztocích. Vzorem pro úspěšný design takových proléčiv byl sobuzoxan (proléčivo ICRF-154, tedy blízkého derivátu DEX). Ze 3 proléčiv studovaných v Publikaci č. 2 bylo vybráno proléčivo GK-667, které nejlépe uvolňovalo aktivní látku ICRF-193 v podmínkách *in vitro* experimentu a chránilo NVCM před toxicitou ANT v nejnižších koncentracích (již od 0,3 μ M, podobně jako samotné ICRF-193).

Protože uvolňování aktivního ICRF-193 z proléčiva v králičí plazmě *in vitro* bylo také poměrně rychlé, přistoupili jsme k pilotnímu farmakokinetickému experimentu s podáním proléčiva GK-667 králíkovi. Díky vynikající rozpustnosti ve fyziologickém roztoku (cca 4000 \times vyšší než u ICRF-193) bylo možné tuto látku snadno podat *i.v.* Rozpustnost GK-667 je navíc podstatně lepší než u předlohového proléčiva sobuzoxanu, který je stále rozpustný jen omezeně, a proto je nutné jej podávat *p.o.* ve formě suspenze (SPC Perazoline). Podání GK-667 v relativně nízké dávce (5 mg/kg) u králíka navodilo koncentrace ICRF-193, které se jevíly slibné pro možné navození kardioprotektivního účinku *in vivo* – jak s ohledem na c_{\max} ICRF-193, tak i na dobu, po kterou byly jeho koncentrace v rozmezí cytoprotektivně působících koncentrací v *in vitro* experimentu. Farmakokinetická analýza u králíka zjistila rychlejší eliminaci ICRF-193 než jsme v minulosti pozorovali na stejném modelu u DEX (eliminační poločas 0,8 vs. 2,0; clearance

1,9 vs. 0,3 l/h/kg) (Jirkovský et al., 2018). Nicméně tyto dílčí rozdíly v porovnání s DEX jsme nepovažovali za zásadní překážku pro navození kardioprotektivního účinku.

V Publikaci č. 3 jsme pak zjistili, že látka GK-667 dokáže poskytnout velmi účinnou a na dávce závislou kardioprotekci vůči chronické ANT kardiotoxicitě *in vivo* u králíka a zároveň je velmi dobře tolerována po opakovaném podání jak samotná, tak i v kombinaci s ANT. Tyto slibné výsledky naznačovaly vysokou kardioprotektivní účinnost GK-667, protože tento účinek byl pozorován při podání pouze 1 a 5 mg/kg GK-667 ve formě tetrahydrochloridové soli, což odpovídá 0,76 a 3,78 mg/kg volné baze proléčiva obsahující jen 0,47 a 2,34 mg/kg aktivního ICRF-193. Při vyjádření poměru účinné dávky kardioprotektiva k dávce ANT byl kardioprotektivní účinek GK-667 jako volné baze zaznamenán v rozmezí 0,25–1,25:1. Kardioprotektivní účinek DEX byl naproti tomu u pokusných zvířat popisován až od poměru 5:1, přičemž významnější a konzistentnější protekce byla dosažena až při poměru dávek 10–20:1 (Imondi, 1998), které byly následně zvoleny pro klinické studie (Swain et al., 1997b). Tato porovnání naznačují, že GK-667 je zřejmě v současnosti nejúčinnějším kardioprotektivem vůči chronické ANT kardiotoxicitě *in vivo* z celé této skupiny látek. U řady citlivých biomarkerů kardiotoxicity jsme také byli schopni rozpoznat dávkovou závislost účinku (částečná protekce v nižší dávce a téměř kompletní ochrana ve všech parametrech u vyšší dávky).

Co se týče mechanismů pozorovaného kardioprotektivního účinku, tak podání GK-667 na dávce závisle zabránilo aktivaci na p53 závislé DDR navozené DAU v myokardu zvířat v chronickém experimentu. Nicméně zvýšené hladiny p53 v myokardu a aktivace jeho signálních drah byly také popsány při chronickém srdečním selhání u člověka i pokusných zvířat bez ohledu na jeho příčinu (Song et al., 1999; Yoshida et al., 2015). Nebylo tudíž jisté, jestli se na našem modelu jednalo o příčinu nebo spíše o následek experimentálně navozeného chronického srdečního selhání. Tato otázka byla vyjasněna sérií dalších experimentů, kde jsme zjistili, že podání GK-667 chrání i před výraznou aktivací DDR v myokardu králíka po jednorázovém podání ANT. Toto pozorování naznačilo možnou příčinnou souvislost mezi prevencí ANT navozené DDR v myokardu a navozením kardioprotektivního účinku. Abychom tuto spojitost potvrdili nebo vyvrátili, porovnali jsme tyto výsledky s podáním blízkého derivátu DEX (GK-627), o kterém jsme z předchozí práce (Publikace č. 1) věděli, že neinhibuje rekombinantní TOP2B, nechrání myokard králíka vůči chronické ANT kardiotoxicitě, a to navzdory vyšším koncentracím v plazmě králíka než po podání DEX. Zjištění, že tato látka zároveň vůbec neovlivňuje ANT navozenou DDR

v myokardu podpořilo výše uvedenou hypotézu. V naší další nedávno publikované práci (Pokorná et al., 2022) jsme pak ukázali, že ochrana před aktivací DDR v myokardu je vlastní i klinicky užívanému DEX. Protože však látka GK-667 na rozdíl od látky ICRF-193 neměla v Publikaci č. 3 žádný vliv na aktivitu rekombinantní TOP2B, potvrdili jsme, že GK-667 je skutečně proléčivem, jež působí na TOP2B až prostřednictvím svého aktivního metabolitu ICRF-193. Všechny tyto výsledky pak vedou k závěru, že kardioprotektivní účinek GK-667 souvisí s katalytickou inhibicí TOP2B v myokardu, jež zabrání ANT v navození poškození DNA a spuštění DDR v myokardu. Tato hypotéza se poměrně dobře shoduje s výsledky předešlých prací, které ukázaly, že genetický *knock out* TOP2B v kardiomyocytech brání poškození DNA a rozvoji kardiotoxicity *in vitro* a *in vivo* (Zhang et al., 2012). Jestli má však ANT navozené zvýšení DDR v myokardu nějaký konkrétní kauzální význam ve vztahu k rozvoji ANT kardiotoxicity zatím není známo a v současnosti je to předmětem studia naší výzkumné skupiny. Podání GK-667 také na dávce závisle inhibovalo vznik dalších molekulárních změn v myokardu navozených opakovaným podáváním ANT – např. předešlo negativním změnám exprese proteinů regulujících homeostázu vápníku nebo ROS. Tyto pozorované účinky ale budou zřejmě sekundární a podmíněné interakcí ICRF-193 s TOP2B, jak bylo ukázáno pomocí genetického zásahu Zhangem et al. (2012).

Farmakokinetické experimenty provedené v Publikaci č. 3 také vyloučily, že by kardioprotekce mohla být spojena se sníženou expozicí zvířat ANT. Podání látky GK-667 totiž významně neovlivnilo plazmatické koncentrace DAU, a také plocha pod křivkou plazmatických koncentrací DAU i jeho hlavního metabolitu daunorubicinolu zůstaly beze změny. To je důležitým předpokladem pro případný další vývoj této látky jako potenciálního kardioprotektiva. Jakákoli změna farmakokinetiky ANT by totiž mohla být problematická. To se potvrdilo např. v případě probukolu (El-Demerdash et al., 2003), jež byl svého času prezentován jako nadějný kardioprotektivum vůči ANT kardiotoxicitě (Siveski-Iliskovic et al., 1994). U DEX však žádný vliv na farmakokinetiku ANT nebyl popsán u zvířat v *in vivo* experimentech (Baldwin et al., 1992; Cusack et al., 2003), ani u pacientů v klinické studii (Hochster et al., 1992).

Jelikož ANT i bisdioxopiperaziny (včetně DEX a ICRF-193) ovlivňují nespecificky obě izoformy TOP2 (tj. jak TOP2B v myokardu, tak i TOP2A v nádorových buňkách), je na místě zvažovat i možný vliv DEX a GK-667 na protinádorový účinek ANT. Katalytická inhibice TOP2A by totiž případně mohla chránit nádorové buňky před toxicitou ANT. V případě DEX jsou k dispozici poměrně rozsáhlá data z klinických studií, která navzdory

prvotnímu podezření (Swain et al., 1997b), jež bylo později rozporováno samotnými autory této studie (Swain and Vici, 2004), poměrně jednoznačně dokazují, že podání DEX nemá na protinádorový účinek ANT žádný významný vliv (shrnutí v Reichardt et al., 2018). Podobně nebyl v *in vitro* experimentech s DEX (Pearlman et al., 2003; Styczynski et al., 2002; Vávrová et al., 2013) ani s GK-667 (Publikace č. 3) pozorován žádný negativní vliv na protinádorovou aktivitu ANT vůči různým leukemickým buněčným liniím. Jasně mechanistické vysvětlení těchto dat však není k dispozici a vyžádá si zřejmě další studium. Nicméně je možné, že se účinky bisdioxopiperazinových inhibitorů a ANT na TOP2A v nádorových buňkách neliší jenom v mechanismu inhibice (katalytická inhibice vs. účinek topoizomerázového jedu), ale i v dalších podstatných detailech potenciálně specifických pro nádorové buňky. Na rozdíl od ANT někteří autoři u bisdioxopiperazinových inhibitorů TOP2A zdůrazňují význam aktivace tzv. *dekatenáčního checkpointu* se zástavou buněčného cyklu v G₂/M fázi (Lee and Berger, 2019). Další autoři pak v nedávno publikované práci navrhli, že pro protinádorovou aktivitu ANT je zásadní spíše poškození struktury chromatinu (van der Zanden et al., 2021), s čímž by účinek bisdioxopiperazinů neinterferoval. Další možností, jak se vyhnout případné nejistotě týkající se ovlivnění protinádorového účinku ANT u kardioprotektiv ovlivňujících neselektivně obě izoformy TOP2, je zaměření výzkumu na selektivní inhibitory TOP2B. Protože selektivity k TOP2B zřejmě nebude možné dosáhnout dalším studiem bisdioxopiperazinů, naše skupina v současnosti zkoumá strukturálně odlišné látky s tímto potenciálem jako možná kardioprotektiva.

Jak je diskutováno výše, účinek bisdioxopiperazinových kardioprotektiv jako je GK-667/ICRF-193 či DEX je zřejmě založen na prevenci poškození DNA způsobeného ANT. Z experimentu (Herman and Ferrans, 1986; Jirkovský et al., 2013; Lebrecht et al., 2007) i z klinických studií (Chow et al., 2022; Reichardt et al., 2018) vyplývá, že kardioprotekce navozená DEX je nejen účinná, ale i trvalá při posuzování s odstupem od chemoterapie, což může souviset právě se schopností DEX účinně předcházet výše uvedenému primárnímu toxickému poškození. Nabízí se však otázka, jak je tomu u dalších látek se zcela odlišným primárním mechanismem účinku, které jsou v poslední době zvažovány jako nadějná kardioprotektiva vůči ANT kardiotoxicitě. Takovou skupinou léčiv jsou mj. ACEi (popř. sartany) (Sobczuk et al., 2022; Vaduganathan et al., 2019). Z dostupných dat se zdá, že by tato léčiva mohla být účinná u rizikových pacientů i v sekundární prevenci po chemoterapii obsahující ANT (Cardinale et al., 2006). Z toho vyplynula hypotéza, že ACEi by mohly být účinné i v primární prevenci chronické ANT

kardiotoxicity. Tyto účinky jsme studovali na experimentálním modelu u králíka v další práci (Pokorná et al., 2022), na které jsem se aktivně podílela. V této studii jsme zjistili, že ACEi mohou navodit překvapivě výrazné kardioprotektivní účinky v průběhu postupného rozvoje chronické ANT kardiotoxicity u králíka s pozitivním vlivem téměř na všechny studované parametry (včetně rozvoje degenerativního poškození kardiomyocytů). Tento benefit se však významně snižuje při dlouhodobém následném sledování pokusných zvířat po ukončení chemoterapie, a to až k rozvoji terminálních forem chronického srdečního selhání spojeného s předčasnými úhyny. DEX přitom na stejném modelu u králíka navodil účinek, který při totožné době následného sledování po chemoterapii zůstal zcela nezměněn (Jirkovský et al., 2013). Možným vysvětlením rozdílných účinků těchto kardioprotektivních intervencí by mohl být námi zdokumentovaný fakt, že na rozdíl od DEX ACEi perindopril (ani jeho aktivní metabolit) nemá žádný vliv na aktivitu TOP2B, ANT navozené poškození DNA a DDR v myokardu králíka. Tato data tedy naznačují, že schopnost ovlivnit počáteční poškození DNA závislé na TOP2B a následnou DDR může být klíčová pro účinnou a dlouhodobou kardioprotekci (Pokorná et al., 2022). O tom, že tato zjištění by mohla mít potenciálně i klinicky významné dopady svědčí i pokračování studie PRADA, kde byl původně zjištěn malý, ale statisticky významný kardioprotektivní účinek plynoucí z primární prevence pomocí kandesartanu (Gulati et al., 2016). Tento účinek však zcela vymizel při následném dlouhodobém sledování těchto pacientů (Heck et al., 2021).

5. ZÁVĚRY

Výsledky této disertační práce odhalily nečekaně těsný vztah struktury a kardioprotektivního účinku bisdioxopiperazinových derivátů DEX vůči chronické ANT kardiotoxicitě.

První část této práce ukázala, že dokonce i jednoduchá metylace imidových dusíků dioxopiperazinových cyklů DEX či pouhý přesun methyly ze spojovacího řetězce do pozice 3 jednoho ze dvou dioxopiperazinových cyklů vede ke kompletní ztrátě kardioprotektivních účinků jak *in vitro*, tak *in vivo*. Ačkoliv bylo dříve publikováno, že dimethyl derivát DEX (ICRF-239/GK-627) si zachovává určitý kardioprotektivní potenciál, naše výsledky poměrně přesvědčivě ukazují, že tomu tak není. Ztráta kardioprotektivních účinků přitom není dána změnami ve farmakokinetice těchto látek ve srovnání s DEX, ani nedostatkem chelatačních účinků jejich metabolitů. Pravděpodobným důvodem je ale ztráta schopnosti interakce těchto derivátů s enzymem TOP2B. Ve shodě s dalšími výsledky naší skupiny tato data zpochybňují důležitost chelatace iontů železa pro navození kardioprotektivního účinku bisdioxopiperazinových derivátů, a naopak podporují význam interakce s TOP2B jako klíčového cíle pro účinnou kardioprotekci vůči chronické ANT kardiotoxicitě. Ve shodě s dalšími výsledky se zdá, že dioxopiperazinové cykly je nutné v molekule DEX zachovat nezměněné, protože jsou zřejmě nepostradatelné pro interakci s TOP2B a účinnou kardioprotekci. Perspektivnější se tedy jeví substituce na dvouuhlíkatém spojovacím řetězci bisdioxopiperazinů. Zároveň v těchto pokusech byla potvrzena dobrá schopnost použitého *in vitro* modelu predikovat kardioprotektivní účinek vůči chronické ANT kardiotoxicitě *in vivo*.

Jednou z nadějných modifikací na spojovacím řetězci se ukázala být prostá substituce methylem na zatím nesubstituovaném uhlíku v molekule DEX (látka ICRF-193). Tato látka je účinnějším inhibitorem TOP2B i protektivem vůči ANT toxicitě na NVCM *in vitro* než DEX, ale díky nízké rozpustnosti ve vodě ji není možné podat *in vivo* s dostatečnou biologickou dostupností. V druhé části této disertační práce se však podařilo překonat tuto nevýhodu přípravou proléčiv ICRF-193, která snadno uvolňují aktivní ICRF-193 v podmínkách *in vitro*. Ze studovaných proléčiv se ukázala jako nejvhodnější látka GK-667, která také již v submikromolárních koncentracích chránila primární kardiomyocyty *in vitro* před toxicitou ANT. Tuto látku je možné snadno podat *i.v.* pokusným zvířatům, což u králíka umožňuje dosáhnout plazmatické koncentrace aktivního ICRF-193, které lze z hlediska

možnosti navození kardioprotektivního účinku považovat za perspektivní. Ze všech těchto důvodů byla látka GK-667 považována za farmaceuticky akceptovatelné proléčivo ICRF-193 vhodné pro navazující výzkum kardioprotektivních účinků vůči chronické ANT kardiotoxicitě *in vivo*.

V poslední části disertace bylo provedeno důkladné studium kardioprotektivních účinků látky GK-667 *in vivo* na modelu u králíka. Výsledky této práce jasně prokázaly, že podání GK-667 velmi účinně a na dávce závisle chrání myokard králíka vůči chronické ANT kardiotoxicitě. Při dávce 5 mg/kg lze dosáhnout již téměř kompletní ochrany myokardu ve všech hodnocených parametrech. Opakované podání této látky je přitom pokusnými zvířaty dobře tolerováno, a to jak samotné, tak i v kombinaci s ANT. Kardioprotektivní účinky tato látka vykazuje již v mnohem nižších poměrech dávek k ANT, než je tomu u DEX, a dle dostupných informací se jeví jako dosud nejúčinnější kardioprotektivum z celé skupiny bisdioxopiperazinů. Farmakokinetická studie vyloučila významný vliv GK-667 na plazmatickou farmakokinetiku ANT *in vivo*, a *in vitro* studie naznačila, že tato látka nemá významný negativní vliv na protinádorový účinek ANT, což jsou jedny ze základních předpokladů pro perspektivní kardioprotektivní léčivo. Výsledky této studie společně s předchozími daty naznačují, že mechanismus kardioprotektivních účinků GK-667 je možné připisovat uvolnění aktivního metabolitu ICRF-193 a jeho inhibičnímu účinku na TOP2B, což vede k prevenci ANT navozeného poškození DNA a aktivaci DDR v myokardu. GK-667 je proto zajímavým kandidátním léčivem pro pokročilý výzkum a vývoj, jehož kardioprotektivní účinek byl úspěšně patentově ochráněn na národní i mezinárodní úrovni (patentová přihláška PV 2020-26 a PCT/IB2021/050285).

6. SEZNAM CITACÍ POUŽITÉ LITERATURY

- AISLP (2022) Automatizovaný informační systém léčivých přípravků, Spotřeba 2021.
- Austin CA, Cowell IG, Khazeem MM, Lok D and Ng HT (2021) TOP2B's contributions to transcription. *Biochem Soc Trans* **49**:2483-2493.
- Austin CA, Lee KC, Swan RL, Khazeem MM, Manville CM, Cridland P, Treumann A, Porter A, Morris NJ and Cowell IG (2018) TOP2B: The First Thirty Years. *Int J Mol Sci* **19**:2765.
- Baldwin JR, Phillips BA, Overmyer SK, Hatfield NZ and Narang PK (1992) Influence of the cardioprotective agent dexrazoxane on doxorubicin pharmacokinetics in the dog. *Cancer Chemother Pharmacol* **30**:433-438.
- Barnabé N, Zastre JA, Venkataram S and Hasinoff BB (2002) Deferiprone protects against doxorubicin-induced myocyte cytotoxicity. *Free Radic Biol Med* **33**:266-275.
- Benjamin RS and Minotti G (2021) Doxorubicin-Dexrazoxane from Day 1 for Soft-tissue Sarcomas: The Road to Cardioprotection. *Clin Cancer Res* **27**:3809-3811.
- Bhatia S (2020) Genetics of Anthracycline Cardiomyopathy in Cancer Survivors: JACC: CardioOncology State-of-the-Art Review. *JACC CardioOncol* **2**:539-552.
- Billingham ME, Mason JW, Bristow MR and Daniels JR (1978) Anthracycline cardiomyopathy monitored by morphologic changes. *Cancer Treat Rep* **62**:865-872.
- Boucek RJ, Jr., Miracle A, Anderson M, Engelman R, Atkinson J and Dodd DA (1999) Persistent effects of doxorubicin on cardiac gene expression. *J Mol Cell Cardiol* **31**:1435-1446.
- Brown SA, Okwuosa TM, Barac A and Volgman AS (2020) The Role of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors and β -Blockers in Primary Prevention of Cardiac Dysfunction in Breast Cancer Patients. *J Am Heart Assoc* **9**:e015327.
- Bruynzeel AM, Niessen HW, Bronzwaer JG, van der Hoeven JJ, Berkhof J, Bast A, van der Vijgh WJ and van Groenigen CJ (2007a) The effect of monohydroxyethylrutoside on doxorubicin-induced cardiotoxicity in patients treated for metastatic cancer in a phase II study. *Br J Cancer* **97**:1084-1089.
- Bruynzeel AM, Vormer-Bonne S, Bast A, Niessen HW and van der Vijgh WJ (2007b) Long-term effects of 7-monohydroxyethylrutoside (monoHER) on DOX-induced cardiotoxicity in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* **60**:509-514.
- Bureš J, Jirkovská A, Šesták V, Jansová H, Karabanovich G, Roh J, Štěrba M, Šimůnek T and Kovaříková P (2017) Investigation of novel dexrazoxane analogue JR-311 shows significant cardioprotective effects through topoisomerase IIbeta but not its iron chelating metabolite. *Toxicology* **392**:1-10.
- Calendi E, Di Marco A, Reggiani M, Scarpinato B and Valentini L (1965) On physico-chemical interactions between daunomycin and nucleic acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis* **103**:25-49.
- Cardinale D, Colombo A, Sandri MT, Lamantia G, Colombo N, Civelli M, Martinelli G, Veglia F, Fiorentini C and Cipolla CM (2006) Prevention of high-dose chemotherapy-induced cardiotoxicity in high-risk patients by angiotensin-converting enzyme inhibition. *Circulation* **114**:2474-2481.

- Classen S, Olland S and Berger JM (2003) Structure of the topoisomerase II ATPase region and its mechanism of inhibition by the chemotherapeutic agent ICRF-187. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:10629-10634.
- Creighton AM, Hellmann K and Whitecross S (1969) Antitumour activity in a series of bisdiketopiperazines. *Nature* **222**:384-385.
- Curigliano G, Lenihan D, Fradley M, Ganatra S, Barac A, Blaes A, Herrmann J, Porter C, Lyon AR, Lancellotti P, Patel A, DeCara J, Mitchell J, Harrison E, Moslehi J, Witteles R, Calabro MG, Orecchia R, de Azambuja E, Zamorano JL, Krone R, Iakobishvili Z, Carver J, Armenian S, Ky B, Cardinale D, Cipolla CM, Dent S and Jordan K (2020) Management of cardiac disease in cancer patients throughout oncological treatment: ESMO consensus recommendations. *Ann Oncol* **31**:171-190.
- Cusack BJ, Musser B, Gambliel H, Hadjokas NE and Olson RD (2003) Effect of dexrazoxane on doxorubicin pharmacokinetics in young and old rats. *Cancer Chemother Pharmacol* **51**:139-146.
- Cvetkovic RS and Scott LJ (2005) Dexrazoxane : a review of its use for cardioprotection during anthracycline chemotherapy. *Drugs* **65**:1005-1024.
- Dadson K, Calvillo-Argüelles O, Thavendiranathan P and Billia F (2020) Anthracycline-induced cardiomyopathy: cellular and molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)* **134**:1859-1885.
- Damelin M and Bestor TH (2007) The decatenation checkpoint. *Br J Cancer* **96**:201-205.
- Danesi R, Fogli S, Gennari A, Conte P and Del Tacca M (2002) Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of the anthracycline anticancer drugs. *Clin Pharmacokinet* **41**:431-444.
- Deng S, Yan T, Jendry C, Nemecek A, Vincetic M, Gödtel-Armbrust U and Wojnowski L (2014) Dexrazoxane may prevent doxorubicin-induced DNA damage via depleting both Topoisomerase II isoforms. *BMC Cancer* **14**:842.
- Dimitrakis P, Romay-Ogando MI, Timolati F, Suter TM and Zuppinger C (2012) Effects of doxorubicin cancer therapy on autophagy and the ubiquitin-proteasome system in long-term cultured adult rat cardiomyocytes. *Cell Tissue Res* **350**:361-372.
- Doroshov JH and Davies KJ (1986) Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. II. Formation of superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical. *J Biol Chem* **261**:3068-3074.
- Downes CS, Clarke DJ, Mullinger AM, Giménez-Abián JF, Creighton AM and Johnson RT (1994) A topoisomerase II-dependent G2 cycle checkpoint in mammalian cells. *Nature* **372**:467-470.
- Dresdale AR, Barr LH, Bonow RO, Mathisen DJ, Myers CE, Schwartz DE, d'Angelo T and Rosenberg SA (1982) Prospective randomized study of the role of N-acetyl cysteine in reversing doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Am J Clin Oncol* **5**:657-663.
- El-Demerdash E, Ali AA, Sayed-Ahmed MM and Osman AM (2003) New aspects in probucol cardioprotection against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol* **52**:411-416.
- Ewer MS and Ewer SM (2015) Cardiotoxicity of anticancer treatments. *Nat Rev Cardiol* **12**:547-558.

- Feroz W and Sheikh AMA (2020) Exploring the multiple roles of guardian of the genome: P53. *Egypt J Med Human Genet* **21**:49.
- Ferrans VJ, Clark JR, Zhang J, Yu ZX and Herman EH (1997) Pathogenesis and prevention of doxorubicin cardiomyopathy. *Tsitologija* **39**:928-937.
- Fogli S, Nieri P and Breschi MC (2004) The role of nitric oxide in anthracycline toxicity and prospects for pharmacologic prevention of cardiac damage. *FASEB J* **18**:664-675.
- Glickstein H, El RB, Link G, Breuer W, Konijn AM, Hershko C, Nick H and Cabantchik ZI (2006) Action of chelators in iron-loaded cardiac cells: Accessibility to intracellular labile iron and functional consequences. *Blood* **108**:3195-3203.
- Gulati G, Heck SL, Ree AH, Hoffmann P, Schulz-Menger J, Fagerland MW, Gravdehaug B, von Knobelsdorff-Brenkenhoff F, Bratland Å, Storås TH, Hagve TA, Røsjø H, Steine K, Geisler J and Omland T (2016) Prevention of cardiac dysfunction during adjuvant breast cancer therapy (PRADA): a 2 × 2 factorial, randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial of candesartan and metoprolol. *Eur Heart J* **37**:1671-1680.
- Hasinoff BB, Hellmann K, Herman EH and Ferrans VJ (1998) Chemical, biological and clinical aspects of dexrazoxane and other bisdioxopiperazines. *Curr Med Chem* **5**:1-28.
- Hasinoff BB and Herman EH (2007) Dexrazoxane: how it works in cardiac and tumor cells. Is it a prodrug or is it a drug? *Cardiovasc Toxicol* **7**:140-144.
- Hasinoff BB, Patel D and Wu X (2003) The oral iron chelator ICL670A (deferasirox) does not protect myocytes against doxorubicin. *Free Radic Biol Med* **35**:1469-1479.
- Hasinoff BB, Patel D and Wu X (2020a) A QSAR study that compares the ability of bisdioxopiperazine analogs of the doxorubicin cardioprotective agent dexrazoxane (ICRF-187) to protect myocytes with DNA topoisomerase II inhibition. *Toxicol Appl Pharmacol* **399**:115038.
- Hasinoff BB, Patel D and Wu X (2020b) The Role of Topoisomerase II β in the Mechanisms of Action of the Doxorubicin Cardioprotective Agent Dexrazoxane. *Cardiovasc Toxicol* **20**:312-320.
- Heck SL, Mecinaj A, Ree AH, Hoffmann P, Schulz-Menger J, Fagerland MW, Gravdehaug B, Røsjø H, Steine K, Geisler J, Gulati G and Omland T (2021) Prevention of Cardiac Dysfunction During Adjuvant Breast Cancer Therapy (PRADA): Extended Follow-Up of a 2×2 Factorial, Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Clinical Trial of Candesartan and Metoprolol. *Circulation* **143**:2431-2440.
- Hellmann K (1976) ICRF 159 and Other Bisdioxopiperazines, in *Chemotherapy: Cancer Chemotherapy I* (Hellmann K and Connors TA eds), Boston, MA: Springer. s. 183-186. ISBN: 978-1-4613-4349-3.
- Hellmann K and Rhomberg W (2010) Razoxane and dexrazoxane-two multifunctional agents, Experimental and clinical results, 1. vydání, Springer Dordrecht. ISBN: 978-90-481-9167-3.
- Herman E, Ardalán B, Bier C, Waravdekar V and Krop S (1979) Reduction of daunorubicin lethality and myocardial cellular alterations by pretreatment with ICRF-187 in Syrian golden hamsters. *Cancer Treat Rep* **63**:89-92.

- Herman EH, el-Hage AN, Creighton AM, Witiak DT and Ferrans VJ (1985) Comparison of the protective effect of ICRF-187 and structurally related analogues against acute daunorubicin toxicity in Syrian golden hamsters. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **48**:39-55.
- Herman EH, El-Hage AN, Ferrans VJ and Witiak DT (1983) Reduction by ICRF-187 of acute daunorubicin toxicity in Syrian golden hamsters. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **40**:217-231.
- Herman EH and Ferrans VJ (1986) Pretreatment with ICRF-187 provides long-lasting protection against chronic daunorubicin cardiotoxicity in rabbits. *Cancer Chemother Pharmacol* **16**:102-106.
- Herman EH, Ferrans VJ, Jordan W and Ardalan B (1981) Reduction of chronic daunorubicin cardiotoxicity by ICRF-187 in rabbits. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **31**:85-97.
- Herman EH, Ferrans VJ, Young RS and Hamlin RL (1988) Effect of pretreatment with ICRF-187 on the total cumulative dose of doxorubicin tolerated by beagle dogs. *Cancer Res* **48**:6918-6925.
- Herman EH, Hasinoff BB, Steiner R and Lipshultz SE (2014) A review of the preclinical development of dexrazoxane. *Prog Pediatr Cardiol* **36**:33-38.
- Herman EH, Mhatre RM, Lee IP and Waravdekar VS (1972) Prevention of the cardiotoxic effects of adriamycin and daunomycin in the isolated dog heart. *Proc Soc Exp Biol Med* **140**:234-239.
- Herman EH, Zhang J and Ferrans VJ (1994) Comparison of the protective effects of desferrioxamine and ICRF-187 against doxorubicin-induced toxicity in spontaneously hypertensive rats. *Cancer Chemother Pharmacol* **35**:93-100.
- Herman EH, Zhang J, Hasinoff BB, Chadwick DP, Clark JR, Jr. and Ferrans VJ (1997) Comparison of the protective effects against chronic doxorubicin cardiotoxicity and the rates of iron (III) displacement reactions of ICRF-187 and other bisdiketopiperazines. *Cancer Chemother Pharmacol* **40**:400-408.
- Hochster H, Liebes L, Wadler S, Oratz R, Wernz JC, Meyers M, Green M, Blum RH and Speyer JL (1992) Pharmacokinetics of the cardioprotector ADR-529 (ICRF-187) in escalating doses combined with fixed-dose doxorubicin. *J Natl Cancer Inst* **84**:1725-1730.
- Hutchins KK, Siddeek H, Franco VI and Lipshultz SE (2017) Prevention of cardiotoxicity among survivors of childhood cancer. *Br J Clin Pharmacol* **83**:455-465.
- Chen W, Qiu J and Shen YM (2012) Topoisomerase II α , rather than II β , is a promising target in development of anti-cancer drugs. *Drug Discov Ther* **6**:230-237.
- Chow EJ, Aplenc R, Vrooman LM, Doody DR, Huang YV, Aggarwal S, Armenian SH, Baker KS, Bhatia S, Constine LS, Freyer DR, Kopp LM, Leisenring WM, Asselin BL, Schwartz CL and Lipshultz SE (2022) Late health outcomes after dexrazoxane treatment: A report from the Children's Oncology Group. *Cancer* **128**:788-796.
- Chung WB and Youn HJ (2016) Pathophysiology and preventive strategies of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Korean J Intern Med* **31**:625-633.

- Ichikawa Y, Ghanefar M, Bayeva M, Wu R, Khechaduri A, Prasad SVN, Mutharasan RK, Naik TJ and Ardehali H (2014) Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation. *J Clin Invest* **124**:617-630.
- Imondi AR (1998) Preclinical models of cardiac protection and testing for effects of dexrazoxane on doxorubicin antitumor effects. *Semin Oncol* **25**:22-30.
- Imondi AR, Della Torre P, Mazué G, Sullivan TM, Robbins TL, Hagerman LM, Podestà A and Pinciroli G (1996) Dose-response relationship of dexrazoxane for prevention of doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice, rats, and dogs. *Cancer Res* **56**:4200-4204.
- Ishida R, Miki T, Narita T, Yui R, Sato M, Utsumi KR, Tanabe K and Andoh T (1991) Inhibition of Intracellular Topoisomerase II by Antitumor Bis(2,6-dioxopiperazine) Derivatives: Mode of Cell Growth Inhibition Distinct from that of Cleavable Complex-forming Type Inhibitors1. *Cancer Res* **51**:4909-4916.
- Jansová H and Šimůnek T (2019) Cardioprotective Potential of Iron Chelators and Prochelators. *Curr Med Chem* **26**:288-301.
- Jirkovská-Vávrová A, Roh J, Lenčová-Popelová O, Jirkovský E, Hrušková K, Potůčková-Macková E, Jansová H, Hašková P, Martinková P and Eisner 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. *Toxicol Res* **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 CA, Šimůnek T and 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. *J Med Chem* **64**:3997-4019.
- Jirkovský E, Jirkovská A, Bavlovič-Piskáčková H, Skalická V, Pokorná Z, Karabanovich G, Kollárová-Brázdová P, Kubeš J, Lenčová-Popelová O, Mazurová Y, Adamcová M, Lyon AR, Roh J, Šimůnek T, Štěrbová-Kovaříková P and Štěrba M (2021) Clinically Translatable Prevention of Anthracycline Cardiotoxicity by Dexrazoxane Is Mediated by Topoisomerase II Beta and Not Metal Chelation. *Circ Heart Fail* **14**:e008209.
- Jirkovský E, Jirkovská A, Bureš J, Chládek J, Lenčová O, Stariat J, Pokorná Z, Karabanovich G, Roh J and Brázdová P (2018) Pharmacokinetics of the Cardioprotective Drug Dexrazoxane and Its Active Metabolite ADR-925 with Focus on Cardiomyocytes and the Heart. *J Pharmacol Exp Ther* **364**:433-446.
- Jirkovský E, Lenčová-Popelová O, Hroch M, Adamcová M, Mazurová Y, Vávrová J, Mičuda S, Šimůnek T, Geršl V and Štěrba M (2013) Early and delayed cardioprotective intervention with dexrazoxane each show different potential for prevention of chronic anthracycline cardiotoxicity in rabbits. *Toxicology* **311**:191-204.
- Jordan K, Behlendorf T, Mueller F and Schmoll HJ (2009) Anthracycline extravasation injuries: management with dexrazoxane. *Ther Clin Risk Manag* **5**:361-366.
- Junjing Z, Yan Z and Baolu Z (2010) Scavenging effects of dexrazoxane on free radicals. *J Clin Biochem Nutr* **47**:238-245.

- Keizer H, Pinedo H, Schuurhuis G and Joenje H (1990) Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmacol Ther* **47**:219-231.
- Kimes BW and Brandt BL (1976) Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Exp Cell Res* **98**:367-381.
- Kiss I, Adámková Krákorová D, Andrašina T, Arenberger P, Babjuk M, Belada D, Bencsiková B, Bílek O, Bořilová S, Čoupková H, Dušek L, Fabian P, Grell P, Hajdúch M, Halámková J, Holánek M, Jurečková A, Kleinová J, Kocáková I, Krásenská M, Křístek J, Lakomý R, Matoušková M, Mechl Z, Navrátil J, Němeček R, Novotný J, Obermannová R, Palácová M, Petráková K, Pokrivčák T, Poprach A, Ryška A, Sedláčková E, Skříčková J, Sláma O, Svoboda M, Tesařová P, Trněný M, Urbánek P, Vorlíček J, Vyzula R, Zemanová M and Zvaríková M (2022) Modrá kniha České onkologické společnosti, 28. aktualizace, Brno, Masarykův onkologický ústav. ISBN: 978-80-86793-53-5.
- Koppenol WH and Hider RH (2019) Iron and redox cycling. Do's and don'ts. *Free Radic Biol Med* **133**:3-10.
- Kovaříková P, Klimeš J, Štěrba M, Popelová O, Geršl V and Poňka P (2006) HPLC determination of a novel aroylhydrazone iron chelator (o-108) in rabbit plasma and its application to a pilot pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **838**:107-112.
- Kovaříková P, Klimeš J, Štěrba M, Popelová O, Mokřý M, Geršl V and Poňka P (2005) Development of high-performance liquid chromatographic determination of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone in rabbit plasma and application of this method to an in vivo study. *J Sep Sci* **28**:1300-1306.
- Kozuki T, Chikamori K, Surleac MD, Micluta MA, Petrescu AJ, Norris EJ, Elson P, Hoeltge GA, Grabowski DR, Porter ACG, Ganapathi RN and Ganapathi MK (2017) Roles of the C-terminal domains of topoisomerase II α and topoisomerase II β in regulation of the decatenation checkpoint. *Nucleic Acids Res* **45**:5995-6010.
- Kumarapeli AR, Horak KM, Glasford JW, Li J, Chen Q, Liu J, Zheng H and Wang X (2005) A novel transgenic mouse model reveals deregulation of the ubiquitin-proteasome system in the heart by doxorubicin. *Faseb j* **19**:2051-2053.
- Květina J, Grossmann V, Svoboda Z and Šafářová M (1997) Preclinical comparison of bis-diketopiperazine-propane (dexrazoxane) and bis-diketopiperazine-ethane (antimet) on the adriamycin-cardiotoxic effect. *Neoplasma* **44**:97-99.
- Lebrecht D, Geist A, Ketelsen UP, Haberstroh J, Setzer B and Walker UA (2007) Dexrazoxane prevents doxorubicin-induced long-term cardiotoxicity and protects myocardial mitochondria from genetic and functional lesions in rats. *Br J Pharmacol* **151**:771-778.
- Lebrecht D, Setzer B, Ketelsen U-P, Haberstroh Jr and Walker UA (2003) Time-dependent and tissue-specific accumulation of mtDNA and respiratory chain defects in chronic doxorubicin cardiomyopathy. *Circulation* **108**:2423-2429.
- Lee JH and Berger JM (2019) Cell Cycle-Dependent Control and Roles of DNA Topoisomerase II. *Genes* **10**:859.
- Lefrak EA, Piřha J, Rosenheim S and Gottlieb JA (1973) A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. *Cancer* **32**:302-314.

- Leger K, Slone T, Lemler M, Leonard D, Cochran C, Bowman WP, Bashore L and Winick N (2015) Subclinical cardiotoxicity in childhood cancer survivors exposed to very low dose anthracycline therapy. *Pediatr Blood Cancer* **62**:123-127.
- Legha SS, Wang YM, Mackay B, Ewer M, Hortobagyi GN, Benjamin RS and Ali MK (1982) Clinical and pharmacologic investigation of the effects of alpha-tocopherol on adriamycin cardiotoxicity. *Ann N Y Acad Sci* **393**:411-418.
- Lenčo J, Lenčová-Popelová O, Link M, Jirkovská A, Tambor V, Potůčková E, Stulík J, Šimůnek T and Štěrba M (2015) Proteomic investigation of embryonic rat heart-derived H9c2 cell line sheds new light on the molecular phenotype of the popular cell model. *Exp Cell Res* **339**:174-186.
- Li M, Sala V, De Santis MC, Cimino J, Cappello P, Pianca N, Di Bona A, Margaria JP, Martini M, Lazzarini E, Pirozzi F, Rossi L, Franco I, Bornbaum J, Heger J, Rohrbach S, Perino A, Tocchetti CG, Lima BHF, Teixeira MM, Porporato PE, Schulz R, Angelini A, Sandri M, Ameri P, Sciarretta S, Lima-Júnior RCP, Mongillo M, Zaglia T, Morello F, Novelli F, Hirsch E and Ghigo A (2018) Phosphoinositide 3-Kinase Gamma Inhibition Protects From Anthracycline Cardiotoxicity and Reduces Tumor Growth. *Circulation* **138**:696-711.
- Li T, Danelisen I, Bello-Klein A and Singal PK (2000) Effects of probucol on changes of antioxidant enzymes in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Cardiovasc Res* **46**:523-530.
- Lipshultz SE (2018) Letter by Lipshultz Regarding Article, "Anthracycline Cardiotoxicity: Worrisome Enough to Have You Quaking?". *Circ Res* **122**:e62-e63.
- Lipshultz SE, Cochran TR, Franco VI and Miller TL (2013) Treatment-related cardiotoxicity in survivors of childhood cancer. *Nat Rev Clin Oncol* **10**:697-710.
- Lipshultz SE, Franco VI, Sallan SE, Adamson PC, K. Steiner R, Swain SM, Gligorov J and Minotti G (2014a) Dexrazoxane for reducing anthracycline-related cardiotoxicity in children with cancer: An update of the evidence. *Prog Pediatr Cardiol* **36**:39-49.
- Lipshultz SE, Sambatakos P, Maguire M, Karnik R, Ross SW, Franco VI and Miller TL (2014b) Cardiotoxicity and cardioprotection in childhood cancer. *Acta Haematol* **132**:391-399.
- Lipshultz SE, Scully RE, Lipsitz SR, Sallan SE, Silverman LB, Miller TL, Barry EV, Asselin BL, Athale U, Clavell LA, Larsen E, Moghrabi A, Samson Y, Michon B, Schorin MA, Cohen HJ, Neuberg DS, Orav EJ and Colan SD (2010) Assessment of dexrazoxane as a cardioprotectant in doxorubicin-treated children with high-risk acute lymphoblastic leukaemia: long-term follow-up of a prospective, randomised, multicentre trial. *Lancet Oncol* **11**:950-961.
- Luo K, Yuan J, Chen J and Lou Z (2009) Topoisomerase II α controls the decatenation checkpoint. *Nat Cell Biol* **11**:204-210.
- Lyu YL, Kerrigan JE, Lin CP, Azarova AM, Tsai YC, Ban Y and Liu LF (2007) Topoisomerase II β mediated DNA double-strand breaks: implications in doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dexrazoxane. *Cancer Res* **67**:8839-8846.
- Marinello J, Delcuratolo M and Capranico G (2018) Anthracyclines as Topoisomerase II Poisons: From Early Studies to New Perspectives. *Int J Mol Sci* **19**.

- Martin E, Thougard AV, Grauslund M, Jensen PB, Bjorkling F, Hasinoff BB, Tjørnelund J, Sehested M and Jensen LH (2009) Evaluation of the topoisomerase II-inactive bisdioxopiperazine ICRF-161 as a protectant against doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Toxicology* **255**:72-79.
- Martins-Teixeira MB and Carvalho I (2020) Antitumour Anthracyclines: Progress and Perspectives. *ChemMedChem* **15**:933-948.
- McCormack K (2018) The cardioprotective effect of dexrazoxane (Cardioxane) is consistent with sequestration of poly (ADP-ribose) by self-assembly and not depletion of topoisomerase 2B. *eCancerMedicalScience* **12**:889.
- Menna P, Paz OG, Chello M, Covino E, Salvatorelli E and Minotti G (2012) Anthracycline cardiotoxicity. *Expert Opin Drug Saf* **11 Suppl 1**:S21-36.
- Mincu RI, Lampe LF, Mahabadi AA, Kimmig R, Rassaf T and Totzeck M (2021) Left Ventricular Diastolic Function Following Anthracycline-Based Chemotherapy in Patients with Breast Cancer without Previous Cardiac Disease-A Meta-Analysis. *J Clin Med* **10**.
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G and Gianni L (2004) Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* **56**:185-229.
- Mistiaen W (2016) Effect of doxorubicin on cardiac myocytes: update of the role of apoptosis, autophagy and other proteolytic pathways. *Gavin J Oncol Res Ther* **2016**:14-23.
- Morelli MB, Bongiovanni C, Da Pra S, Miano C, Sacchi F, Lauriola M and D'Uva G (2022) Cardiotoxicity of Anticancer Drugs: Molecular Mechanisms and Strategies for Cardioprotection. *Front Cardiovasc Med* **9**:847012.
- Myers C, Bonow R, Palmeri S, Jenkins J, Corden B, Locker G, Doroshov J and Epstein S (1983) A randomized controlled trial assessing the prevention of doxorubicin cardiomyopathy by N-acetylcysteine. *Semin Oncol* **10**:53-55.
- Myers CE (1988) Role of Iron in Anthracycline Action in *Organ Directed Toxicities of Anticancer Drugs* (Hacker MP, Lazo JS and Tritton TR eds), Boston, MA: Springer. s 17-30. ISBN: 978-1-4613-2023-4.
- Nitiss JL (2009) DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nat Rev Cancer* **9**:327-337.
- Ogose N, Narita T, Tadano N, Ono H, Yui R and Sakato M (1996) Protective effect of sobuzoxane (MST-16) against adriamycin-induced cardiotoxicity in the rabbit. *J Toxicol Pathol* **9**:305-313.
- Olson RD, Mushlin PS, Brenner DE, Fleischer S, Cusack BJ, Chang BK and Boucek RJ, Jr. (1988) Doxorubicin cardiotoxicity may be caused by its metabolite, doxorubicinol. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:3585-3589.
- Patel S, Jazrawi E, Creighton AM, Austin CA and Fisher LM (2000) Probing the interaction of the cytotoxic bisdioxopiperazine ICRF-193 with the closed enzyme clamp of human topoisomerase IIalpha. *Mol Pharmacol* **58**:560-568.
- Payne DL and Nohria A (2017) Prevention of Chemotherapy Induced Cardiomyopathy. *Curr Heart Fail Rep* **14**:398-403.

- PCT/IB2021/050285 (2021) Univerzita Karlova v Praze. Use of ICRF-193 derivatives and pharmaceutical preparations containing thereof for the prevention of chronic cumulative cardiotoxicity caused by therapy with anthracycline anticancer drugs. Roh J., Štěrba M., Šimůnek T., Štěrbová P., Karabanovich G., Jirkovská A., Jirkovský E., Bavlovič Piskáčková H., Kubeš J., Jansová H., Kollárová P. **WO2021/144746 A1** (PCT/IB2021/050285). Filing date: 15. 1. 2021, Publication date: 22. 7. 2021.
- Pearlman M, Jendiroba D, Pagliaro L, Keyhani A, Liu B and Freireich EJ (2003) Dexrazoxane in combination with anthracyclines lead to a synergistic cytotoxic response in acute myelogenous leukemia cell lines. *Leuk Res* **27**:617-626.
- Piska K, Jamrozik M, Koczurkiewicz-Adamczyk P, Bucki A, Żmudzki P, Kołaczkowski M and Pękala E (2021) Carbonyl reduction pathway in hepatic in vitro metabolism of anthracyclines: Impact of structure on biotransformation rate. *Toxicol Lett* **342**:50-57.
- Pokorná Z, Kollárová-Brázdová P, Lenčová-Popelová O, Jirkovský E, Kubeš J, Mazurová Y, Adamcová M, Holečková M, Palička V, Šimůnek T and Štěrba M (2022) Primary prevention of chronic anthracycline cardiotoxicity with ACE inhibitor is temporarily effective in rabbits, but benefits wane in post-treatment follow-up. *Clin Sci (Lond)* **136**:139-161.
- Popelová O, Štěrba M, Šimůnek T, Mazurová Y, Gunčová I, Hroch M, Adamcová M and Geršl V (2008) Deferiprone does not protect against chronic anthracycline cardiotoxicity in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* **326**:259-269.
- PV 2020-26 (2020) Univerzita Karlova V Praze. Použití derivátů sloučeniny ICRF-193 a farmaceutický přípravek k prevenci chronické kumulativní kardiotoxicity způsobené terapií antracyklinovými protinádorovými léčivými. Roh J., Štěrba M., Šimůnek T., Štěrbová P., Karabanovich G., Jirkovská A., Jirkovský E., Bavlovič Piskáčková H., Kubeš J., Jansová H., Kollárová P. Česká republika. PV 2020-26. Datum přihlášení: 16. 1. 2020, Datum udělení patentu: 12. 1. 2022.
- Qin Y, Guo T, Wang Z and Zhao Y (2021) The role of iron in doxorubicin-induced cardiotoxicity: recent advances and implication for drug delivery. *J Mat Chem B* **9**:4793-4803.
- Quigley GJ, Wang AH, Ughetto G, van der Marel G, van Boom JH and Rich A (1980) Molecular structure of an anticancer drug-DNA complex: daunomycin plus d(CpGpTpApCpG). *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**:7204-7208.
- Regev R, Yeheskely-Hayon D, Katzir H and Eytan GD (2005) Transport of anthracyclines and mitoxantrone across membranes by a flip-flop mechanism. *Biochem Pharmacol* **70**:161-169.
- Reichardt P, Tabone M-D, Mora J, Morland B and Jones RL (2018) Risk–benefit of dexrazoxane for preventing anthracycline-related cardiotoxicity: re-evaluating the European labeling. *Future Oncol* **14**:2663-2676.
- Renu K, V GA, P BT and Arunachalam S (2018) Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy - An update. *Eur J Pharmacol* **818**:241-253.
- Repta AJ, Baltezor MJ and Bansal PC (1976) Utilization of an enantiomer as a solution to a pharmaceutical problem: application to solubilization of 1,2-di(4-piperazine-2,6-dione)propane. *J Pharm Sci* **65**:238-242.

- Rivera E (2003) Liposomal anthracyclines in metastatic breast cancer: clinical update. *Oncologist* **8 Suppl 2**:3-9.
- Sallustio BC and Boddy AV (2021) Is there scope for better individualisation of anthracycline cancer chemotherapy? *Br J Clin Pharmacol* **87**:295-305.
- Sawicki KT, Sala V, Prever L, Hirsch E, Ardehali H and Ghigo A (2021) Preventing and Treating Anthracycline Cardiotoxicity: New Insights. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **61**:309-332.
- Shaikh F, Dupuis LL, Alexander S, Gupta A, Mertens L and Nathan PC (2016) Cardioprotection and Second Malignant Neoplasms Associated With Dexrazoxane in Children Receiving Anthracycline Chemotherapy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Natl Cancer Inst* **108**.
- Schroeder PE, Jensen PB, Sehested M, Hofland KF, Langer SW and Hasinoff BB (2003) Metabolism of dexrazoxane (ICRF-187) used as a rescue agent in cancer patients treated with high-dose etoposide. *Cancer Chemother Pharmacol* **52**:167-174.
- Simmons CE (2019) Overcoming Inertia to Tame the Red Devil*. *JACC: CardioOncology* **1**:80-83.
- Siveski-Iliskovic N, Kaul N and Singal PK (1994) Probucol promotes endogenous antioxidants and provides protection against adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Circulation* **89**:2829-2835.
- Sobczuk P, Czerwińska M, Kleibert M and Cudnoch-Jędrzejewska A (2022) Anthracycline-induced cardiotoxicity and renin-angiotensin-aldosterone system-from molecular mechanisms to therapeutic applications. *Heart Fail Rev* **27**:295-319.
- Song H, Conte JV, Jr., Foster AH, McLaughlin JS and Wei C (1999) Increased p53 protein expression in human failing myocardium. *J Heart Lung Transplant* **18**:744-749.
- SPC Caelyx pegylated liposomal Souhrn údajů o přípravku Caelyx pegylated liposomal 2 mg/ml koncentrát pro infuzní roztok. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/caelyx-pegylated-liposomal-epar-product-information_cs.pdf.
- SPC Cyrdanax Souhrn údajů o přípravku Cyrdanax 20 mg/ml prášek pro infuzní roztok. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/modules/medication/search.php>.
- SPC Daunorubicin Summary of product characteristics Daunorubicin 20mg Powder for I.V. Injection. Dostupné z: <https://www.medicines.org.uk/emc/product/4004/smpc#gref>.
- SPC Doxorubicin Teva Souhrn údajů o přípravku Doxorubicin Teva 2 mg/ml koncentrát pro infuzní roztok. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/modules/medication/search.php>.
- SPC Ferriprox Souhrn údajů o přípravku Ferriprox 500 mg potahované tablety. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/ferriprox-epar-product-information_cs.pdf.
- SPC Idarubicin Accord Souhrn údajů o přípravku Idarubicin Accord 5 mg/5 ml injekční roztok. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/modules/medication/search.php>.
- SPC Perazoline Perazoline Fine Granules 800mg. Dostupné z: <https://medical.nikkeibp.co.jp/inc/all/drugdic/prd/42/4291004C2036.html>.
- SPC Savene Souhrn údajů o přípravku Savene, 20 mg/ml, prášek a rozpouštědlo pro koncentrát pro infuzní roztok. Dostupné z:

https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/savene-epar-product-information_cs.pdf.

- Speyer JL, Green MD, Kramer E, Rey M, Sanger J, Ward C, Dubin N, Ferrans V, Stecy P, Zeleniuch-Jacquotte A and et al. (1988) Protective effect of the bispiperazinedione ICRF-187 against doxorubicin-induced cardiac toxicity in women with advanced breast cancer. *N Engl J Med* **319**:745-752.
- Styczynski J, Wysocki M, Balwierz W and Kowalczyk JR (2002) Dexrazoxane has no impact on sensitivity of childhood leukemic blasts to daunorubicin. *Leukemia* **16**:820-825.
- Swain SM and Vici P (2004) The current and future role of dexrazoxane as a cardioprotectant in anthracycline treatment: expert panel review. *J Cancer Res Clin Oncol* **130**:1-7.
- Swain SM, Whaley FS, Gerber MC, Ewer MS, Bianchine JR and Gams RA (1997a) Delayed administration of dexrazoxane provides cardioprotection for patients with advanced breast cancer treated with doxorubicin-containing therapy. *J Clin Oncol* **15**:1333-1340.
- Swain SM, Whaley FS, Gerber MC, Weisberg S, York M, Spicer D, Jones SE, Wadler S, Desai A, Vogel C, Speyer J, Mittelman A, Reddy S, Pendergrass K, Velez-Garcia E, Ewer MS, Bianchine JR and Gams RA (1997b) Cardioprotection with dexrazoxane for doxorubicin-containing therapy in advanced breast cancer. *J Clin Oncol* **15**:1318-1332.
- Syahputra RA, Harahap U, Dalimunthe A, Nasution MP and Satria D (2022) The Role of Flavonoids as a Cardioprotective Strategy against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: A Review. *Molecules* **27**:1320.
- Šimůnek T, Klimtová I, Kaplanová J, Štěřba M, Mazurová Y, Adamcová M, Hrdina R, Geršl V and Poňka P (2005) Study of daunorubicin cardiotoxicity prevention with pyridoxal isonicotinoyl hydrazone in rabbits. *Pharmacol Res* **51**:223-231.
- Šimůnek T, Štěřba M, Popelová O, Adamcová M, Hrdina R and Geršl V (2009) Anthracycline-induced cardiotoxicity: Overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Rep* **61**:154-171.
- Štěřba M, Popelová O, Šimůnek T, Mazurová Y, Potáčová A, Adamcová M, Gunčová I, Kaiserová H, Palička V, Poňka P and Geršl V (2007) Iron chelation-afforded cardioprotection against chronic anthracycline cardiotoxicity: a study of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH). *Toxicology* **235**:150-166.
- Štěřba M, Popelová O, Šimůnek T, Mazurová Y, Potáčová A, Adamcová M, Kaiserová H, Poňka P and Geršl V (2006) Cardioprotective effects of a novel iron chelator, pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone, in the rabbit model of daunorubicin-induced cardiotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* **319**:1336-1347.
- Štěřba M, Popelova O, Vávrová A, Jirkovský E, Kovaříková P, Geršl V and Šimůnek T (2013) Oxidative stress, redox signaling, and metal chelation in anthracycline cardiotoxicity and pharmacological cardioprotection. *Antioxid Redox Signal* **18**:899-929.
- Tanabe K, Ikegami Y, Ishida R and Andoh T (1991) Inhibition of topoisomerase II by antitumor agents bis(2,6-dioxopiperazine) derivatives. *Cancer Res* **51**:4903-4908.

- Tebbi CK, London WB, Friedman D, Villaluna D, De Alarcon PA, Constine LS, Mendenhall NP, Sposto R, Chauvenet A and Schwartz CL (2007) Dexrazoxane-associated risk for acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome and other secondary malignancies in pediatric Hodgkin's disease. *J Clin Oncol* **25**:493-500.
- Tewey KM, Rowe TC, Yang L, Halligan BD and Liu LF (1984) Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science* **226**:466-468.
- Thomas C, Vile GF and Winterbourn CC (1993) The hydrolysis product of ICRF-187 promotes iron-catalysed hydroxyl radical production via the Fenton reaction. *Biochem Pharmacol* **45**:1967-1972.
- Totzeck M, Mincu RI, Heusch G and Rassaf T (2019) Heart failure from cancer therapy: can we prevent it? *ESC Heart Fail* **6**:856-862.
- Tunuguntla HP, Puri K and Denfield SW (2021) Management of Advanced Heart Failure in Children with Cancer Therapy-Related Cardiac Dysfunction. *Children (Basel)* **8**:872.
- Vaduganathan M, Hirji SA, Qamar A, Bajaj N, Gupta A, Zaha V, Chandra A, Haykowsky M, Ky B, Moslehi J, Nohria A, Butler J and Pandey A (2019) Efficacy of Neurohormonal Therapies in Preventing Cardiotoxicity in Patients with Cancer Undergoing Chemotherapy. *JACC CardioOncol* **1**:54-65.
- van Acker SA, Kramer K, Grimbergen JA, van den Berg DJ, van der Vijgh WJ and Bast A (1995) Monohydroxyethylrutoside as protector against chronic doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Br J Pharmacol* **115**:1260-1264.
- van Dalen EC, Caron HN, Dickinson HO and Kremer LCM (2011) Cardioprotective interventions for cancer patients receiving anthracyclines. *Cochrane Database Syst Rev*:CD003917.
- van der Zanden SY, Qiao X and Neefjes J (2021) New insights into the activities and toxicities of the old anticancer drug doxorubicin. *Febs j* **288**:6095-6111.
- Van Vleet JF and Ferrans VJ (1980) Clinical and pathologic features of chronic adriamycin toxicosis in rabbits. *Am J Vet Res* **41**:1462-1469.
- Vávrová A, Jansová H, Mackova E, Macháček M, Hašková P, Tichotová L, Štěrba M and 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 and Yeh ET (2014a) Prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity: challenges and opportunities. *J Am Coll Cardiol* **64**:938-945.
- Vejpongsa P and Yeh ETH (2014b) Topoisomerase 2 β : A Promising Molecular Target for Primary Prevention of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity. *Clin Pharmacol Ther* **95**:45-52.
- Von Hoff DD, Layard MW, Basa P, Davis HL, Jr., Von Hoff AL, Rozenzweig M and Muggia FM (1979) Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. *Ann Intern Med* **91**:710-717.
- WHO (2021a) WHO model list of essential medicines - 22nd list. Dostupné z: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-MHP-HPS-EML-2021.02>.
- WHO (2021b) WHO Model List of Essential Medicines for Children - 8th list. Dostupné z: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-MHP-HPS-EML-2021.03>.

- Wojtkowiak JW, Verduzco D, Schramm KJ and Gillies RJ (2011) Drug resistance and cellular adaptation to tumor acidic pH microenvironment. *Mol Pharm* **8**:2032-2038.
- Xu X, Persson HL and Richardson DR (2005) Molecular pharmacology of the interaction of anthracyclines with iron. *Mol Pharmacol* **68**:261-271.
- Yoshida Y, Shimizu I, Katsuomi G, Jiao S, Suda M, Hayashi Y and Minamino T (2015) p53-Induced inflammation exacerbates cardiac dysfunction during pressure overload. *J Mol Cell Cardiol* **85**:183-198.
- Yousefian M, Hosseinzadeh H, Hayes AW, Hadizadeh F and Karimi G (2022) The Protective Effect of Natural Compounds on Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity via Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase Inhibition. *J Pharm Pharmacol* **74**:351-359.
- Zamorano JL, Lancellotti P, Rodriguez Muñoz D, Aboyans V, Asteggiano R, Galderisi M, Habib G, Lenihan DJ, Lip GYH, Lyon AR, Lopez Fernandez T, Mohty D, Piepoli MF, Tamargo J, Torbicki A, Suter TM and Group ESD (2016) 2016 ESC Position Paper on cancer treatments and cardiovascular toxicity developed under the auspices of the ESC Committee for Practice Guidelines: The Task Force for cancer treatments and cardiovascular toxicity of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* **37**:2768-2801.
- Zhang S, Liu X, Bawa-Khalfe T, Lu LS, Lyu YL, Liu LF and Yeh ET (2012) Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med* **18**:1639-1642.

7. PŘÍLOHY

KOMENTOVANÉ PUBLIKACE

7.1. Příloha – Publikace č. 1

Investigation of structure-activity relationships of dexrazoxane analogs reveals topoisomerase II β interaction as a prerequisite for effective protection against anthracycline cardiotoxicity

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-Kovaříková P., Roh J., Šimůnek T., Štěrba M.

Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2020, **373**(3):402–415;
<https://doi.org/10.1124/jpet.119.264580>

IF₂₀₂₀ = 4,030 (Q2); AIS₂₀₂₀ = 1,141 (Q1)

7.2. Příloha – Publikace č. 2

Development of water-soluble prodrugs of the bisdioxopiperazine topoisomerase II β inhibitor ICRF-193 as potential cardioprotective agents against anthracycline cardiotoxicity

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., Štěrba M., Štěrbová-Kovaříková P.

Scientific Reports, 2021, 11(1): 4456; <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83688-x>

IF₂₀₂₀ = 4,380 (Q1); AIS₂₀₂₀ = 1,285 (Q2)

7.3. Příloha – Publikace č. 3

Prodrug of ICRF-193 provides promising protective effects against chronic anthracycline cardiotoxicity in a rabbit model *in vivo*

Kollárová-Brázdová P., Lenčová-Popelová O., Karabanovich G., Kocúrová-Lengvarská J., Kubeš J., Váňová N., Mazurová Y., Adamcová M., Jirkovská A., Holečková M., Šimůnek T., Štěrbová-Kovaříková P., Roh J., Štěrbá M.

Clinical Science, 2021, **135**(15), 1897–1914; <https://doi.org/10.1042/CS20210311>

IF₂₀₂₀ = 6,124 (Q1); AIS₂₀₂₀ = 1,568 (Q1)