

UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta v Hradci Králové

**Nové možnosti kardioprotekce u antracyklinové
kardiotoxicity**

Petra Kollárová

Autoreferát disertační práce
Doktorský studijní program: Lékařská farmakologie

Hradec Králové
2022

Disertační práce byla vypracována v rámci *prezenčního* studia doktorského studijního programu **Lékařská farmakologie** na **Ústavu farmakologie Lékařské fakulty v Hradci Králové**.

Autor: **Mgr. Petra Kollárová**
Ústav farmakologie
Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Hradci Králové

Školitel: **doc. PharmDr. Martin Štěrbá, Ph.D.**
Ústav farmakologie
Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Hradci Králové

Oponenti: **prof. MUDr. Josef Fusek, DrSc. dr.h.c.**
Katedra ošetřovatelství
Univerzita Pardubice, Fakulta zdravotnických studií

prof. MUDr. Radomír Hrdina, CSc.
dlouholetý pracovník Katedry farmakologie a toxikologie
Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Obhajoba se bude konat před Komisí pro obhajoby OR Lékařská farmakologie dne **20. 9. 2022**
v od **10:00** hod.

Tato práce vznikla za podpory grantu GAČR 21-16195S, GAČR 18-08169S, GAUK 680216, PROGRES Q40/5, SVV 260 397 a projektu InoMed reg. č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/18_069/0010046 spolufinancovaného z ERDF.

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy, Šimkova 870, 500 03 Hradec Králové (tel. 495 816 134).

prof. MUDr. Stanislav Mičuda, Ph.D.
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací
v doktorském studijním programu Lékařská farmakologie
Garant studijního programu

OBSAH

1. ÚVOD	1
1.1. Antracykliny	1
1.2. Kardiotoxicita antracyklinů	1
1.3. Úvod do farmakologické kardioprotekce	4
1.4. Dexrazoxan	5
1.5. Další bisdioxopiperazinové deriváty	7
2. CÍLE PRÁCE.....	10
3. VÝSLEDKY – komentáře k publikovaným pracím s uvedením podílu studentky	11
3.1. Komentář k Publikaci č. 1	11
3.2. Komentář k Publikaci č. 2	13
3.3. Komentář k Publikaci č. 3	15
4. DISKUSE.....	17
5. ZÁVĚRY	22
6. SEZNAM CITACÍ POUŽITÉ LITERATURY	23
7. PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI STUDENTKY.....	28
7.1. Původní vědecké práce v impaktovaném časopise.....	28
7.2. Ostatní práce v impaktovaném časopise.....	29
7.3. Patentová činnost.....	29
7.4. Odborné přednášky a plakátová sdělení na odborných setkáních	29

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 chelatovat 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

Title: New possibilities of cardioprotection in anthracycline cardiotoxicity

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)** a **doxorubicin (DOX)** – byli izolováni ze *Streptomyces peucetius* v 60. letech minulého století (Martins-Teixeira et al., 2020). Tato léčiva dodnes patří mezi nejúčinnější protinádorová chemoterapeutika užívaná v klinické praxi, a proto zůstávají pilířem různých léčebných protokolů užívaných k léčbě hematologických i solidních nádorů u dětí i dospělých (Kiss et al., 2022).

1.1.1. *Mechanismus protinádorového účinku*

Protinádorový účinek ANT byl nejprve připisován jejich **schopnosti interkalace**, tj. vmezezení se mezi páry bazí DNA (Quigley et al., 1980), v současnosti je však za nejdůležitější mechanismus považována **inhibice topoizomerázy II α (TOP2A)** (Vejpgonsa et al., 2014b). ANT působí na tento enzym jako tzv. **topoizomerázové jedy** – tzn. ireverzibilně inhibují TOP2A ve fázi, kdy již došlo k přerušení DNA a zabraňují opětovnému spojení dvoušroubovice DNA se vznikem dvojitych zlomů DNA, což způsobuje aktivaci molekulární signalizace odpovídající na poškození DNA (tzv. *DNA damage response*, DDR) a navození apoptotické buněčné smrti. V poslední době se však také objevila teorie, že ANT mohou působit protinádorově skrz **poškození chromatinu** způsobené interkalací ANT do DNA a vypuzením histonů z nukleozomu (van der Zanden et al., 2021). **Tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS)** se na protinádorovém účinku ANT podílí spíše minoritně.

1.1.2. *Nežádoucí účinky a toxicity*

Velmi častými nežádoucími účinky spojenými s chemoterapií ANT jsou **nauzea, zvracení, alopecie, průjem, či mukozitida**. U velkého procenta pacientů se objevuje také **útlum kostní dřene** s přechodnou hematotoxicitou. Mezi dlouhodobé komplikace léčby patří možný vznik **sekundárních malignit, neplodnost a kardiotoxicita** (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., 1997; van der Zanden et al., 2021). 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 levé komory (LK) a mezikomorového septa (Van Vleet et al., 1980). Toxické poškození myokardu vedoucí k zániku kardiomyocytů je z velké části ireverzibilní. V ložiscích s výrazným **degenerativním poškozením kardiomyocytů** je většinou patrná náhradová fibróza (Billingham et al., 1978). Typickým znakem ANT kardiotoxicity je **systolická dysfunkce LK**, která 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).

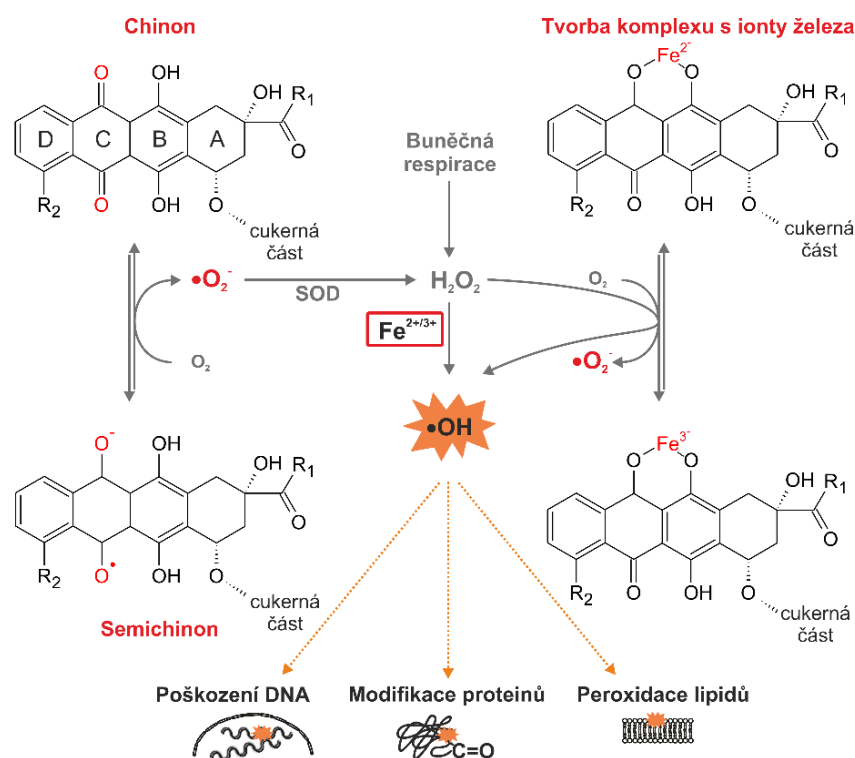
1.2.1. *Mechanismy vzniku chronické antracyklinové kardiotoxicity*

Navzdory dlouho trvajícimu výzkumu **nejsou** dosud mechanismy ANT kardiotoxicity **plně objasněny** (Dadson et al., 2020; Qin et al., 2021; Štěrba et al., 2013). 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). Novější teorie vzniku ANT kardiotoxicity předpokládá významnou úlohu interakce ANT s **topoizomerázou II β (TOP2B)** v **kardiomyocytech**, která vede k poškození DNA se spuštěním DDR (Zhang et al., 2012). Existuje však celá **řada dalších teorií**, které mohou vysvětlovat vznik ANT toxicity.

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 vytvoření **komplexu aglykonu ANT s volnými ionty železa (Obr. 1)**. Samotná chinonová část aglykonu ANT může být enzymaticky redukována za vzniku semichinonového radikálu, který po reakci s kyslíkem vytvoří superoxidový aniont ($\bullet\text{O}_2^-$) (Doroshov et al., 1986). Klíčovou roli v neutralizaci $\bullet\text{O}_2^-$ na méně toxický peroxid vodíku (H_2O_2) hraje superoxiddismutáza (SOD). V přítomnosti volných iontů železa mohou prostřednictvím tzv. Fentonovy reakce vznikat z H_2O_2 ještě mnohem reaktivnější a biologicky toxicitější 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). Uvedené děje mohou probíhat cyklicky, takže velké množství ROS může přetížit antioxidační mechanismy kardiomyocytu a vést k oxidačnímu poškození lipidů, proteinů i DNA (Štěrba et al., 2013).

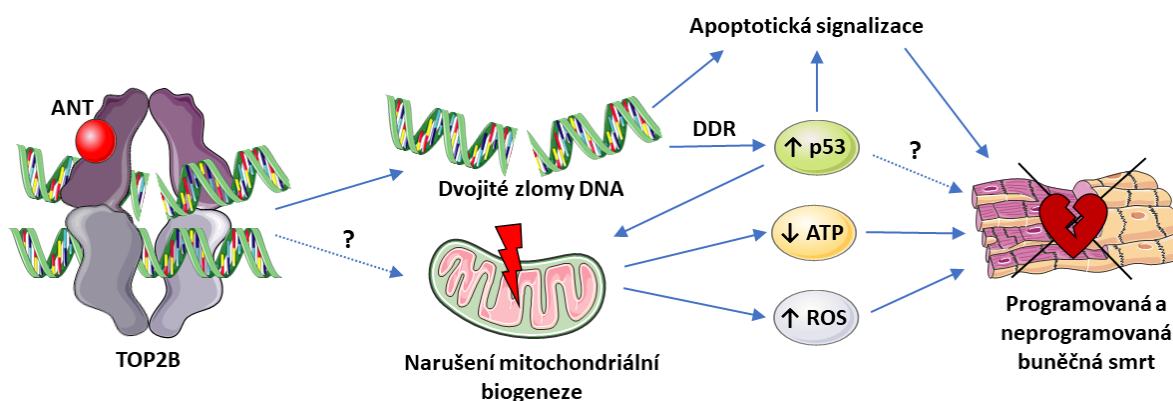


Obr. 1 Zjednodušené schématické znázornění hlavních cest vzniku oxidačního stresu navozeného antracykliny a katalyzovaného železem – převzato a upraveno z Štěrba et al. (2013). $\bullet\text{O}_2^-$ – superoxidový aniont, SOD – superoxiddismutáza, H_2O_2 – peroxid vodíku, $\bullet\text{OH}$ – hydroxylový radikál.

b) Interakce antracyklinů s topoizomerázou II β

V savčích 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 v kardiomyocytech je však zanedbatelná (Lenčo et al., 2015; Vejpongsa et al., 2014b), proto pro vznik kardiotoxicity nemůže mít zásadní význam. Naproti tomu **TOP2B** je dominantní izoformou v **nedělicích se terminálně diferencovaných buňkách** jako jsou kardiomyocyty či neurony (Chen et al., 2012). **ANT** patří mezi tzv. **topoizomerázové jedy**, a to **na obou izoformách TOP2** (Marinello et al., 2018). TOP2(A) 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 et al., 2014a; Zhang et al., 2012). Zásadní význam přitom měla 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 jejím základě byla **TOP2B navržena jako primární cíl pro ANT v kardiomyocytech**. Dle této práce interakce ANT s TOP2B v kardiomyocytech vede k **poškození DNA (Obr. 2)** a **aktivaci DDR s klíčovou rolí p53** (Zhang et al., 2012), jež je důležitým transkripčním regulátorem řady cílových genů (Feroz et al., 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).



Obr. 2 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 et al. (2014b) s využitím Servier Medical Art, poskytovaného společností Servier, licencovaného pod Creative Commons Attribution 3.0 Unported License.

1.2.2. Možnosti omezení antracyklinové kardiotoxicity mimo farmakologickou kardioprotekci

Ke zmírnění toxicity ANT může přispět několik přístupů, přičemž mezi klinicky nejdůležitější patří **omezení kumulativní dávky ANT** na 400–450 mg/m² (Vejpongsa et al., 2014a) a **důsledné monitorování pacienta** před léčbou, v průběhu léčby a po jejím ukončení. (Curigliano et al., 2020). Omezení ANT kardiotoxicity lze dosáhnout i **změnou schématu podávání** (kontinuální infuze místo bolusového podání), či použitím moderních lékových forem pro **cílenou distribuci ANT** (např. lipozomů) (Sawicki et al., 2021).

1.3. Úvod do farmakologické kardioprotekce

1.3.1. *Antioxidanty*

Výzkum kardioprotektivních účinků antioxidantů byl zahájen v polovině 70. let minulého století (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 (shrnuo v Štěřba et al., 2013). Intenzivně studovanou skupinou antioxidantů byly a dodnes jsou **flavonoidy**. Nicméně k těmto látkám je k dispozici relativně málo dat z experimentů užívajících ověřené a klinicky relevantní experimentální modely (Štěřba 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). Významný kardioprotektivní účinek nebyl u antioxidantů nalezen ani v **malých prospektivních randomizovaných studiích** (Bruynzeel et al., 2007a; Legha et al., 1982; Myers et al., 1983).

1.3.2. *Chelátory železa*

Neúčinnost klasických antioxidantů na modelech chronické ANT kardiotoxicity a v klinických studiích vedla ke zvýraznění role volných iontů železa, protože v jejich přítomnosti mohou vznikat vysoce toxické $\bullet\text{OH}$ (Šimůnek et al., 2009).

Deferoxamin, který se klinicky užívá v terapii přetížení organismu ionty železa, vykazoval významný kardioprotektivní účinek *in vitro* na izolovaných kardiomyocytech přetížených ionty železa a na modelech akutní toxicity *in vivo*, ale nebyl účinný na kardiomyocytech bez přetížení ionty železa (shrnuo v Šimůnek et al., 2009), ani na validovaném modelu chronické ANT kardiotoxicity u potkana (Herman et al., 1994). Jeho neúčinnost jako kardioprotektiva byla vysvětlována nízkým vstupem 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. Nicméně míra kardioprotekce byla vždy nižší než u dexrazoxanu (DEX) a místo na dávce závislého zvýšení účinku u nich bylo pozorováno jeho kompletní vymizení ve vyšších dávkách (shrnuo v Štěřba et al., 2013), a to nezávisle na volbě konkrétního derivátu či cesty podání. 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). Toto léčivo má delší biologický poločas než aroylhydrazony 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 et al., 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).

1.3.3. *Další zkoumaná kardioprotektiva*

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 (typ HFrEF) (tj. inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu – **ACEi**, antagonisty AT1

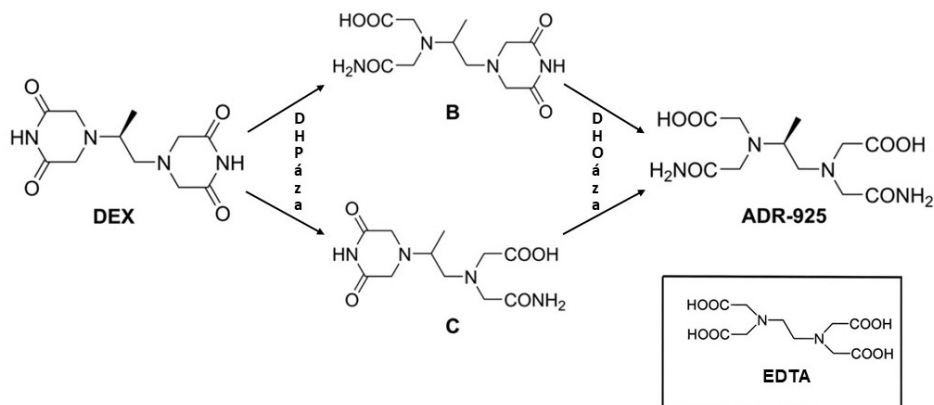
receptoru pro angiotenzin II – tzv. **sartany**, **antagonisty aldosteronu** a **β -blokátoři**) (Dadson et al., 2020; Payne et al., 2017). Tato léčiva se běžně užívají pro léčbu srdeční dysfunkce/selhání navozeného ANT (Zamorano et al., 2016), a u ACEi existují i důkazy o protektivním účinku při užití 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 (Vaduganathan et al., 2019).

1.4. Dexrazoxan

DEX (ICRF-187) 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). 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** (Creighton et al., 1969). Kardioprotektivní účinky DEX byly objeveny spíše shodou okolností při kombinaci s ANT (shrnutí v Herman et al., 2014).

1.4.1. *Farmakokinetika a metabolismus*

V klinické praxi je DEX podáván **v krátké (cca 15 min) infuzi v dávkách 500–1000 mg/m²**, jež poskytují maximální koncentrace (c_{max}) mezi 136–280 μ M (Štěrba et al., 2013). Uvnitř buněk je DEX enzymaticky hydrolyzován dihydropyrimidinázou na **přechodné metabolity B a C** s jedním otevřeným dioxopiperazinovým cyklem (**Obr. 3**). Následuje hydrolýza druhého dioxopiperazinového cyklu enzymem dihydroorotázou na **finální otevřený metabolický produkt ADR-925** (Jirkovský et al., 2018).



Obr. 3 Metabolismus dexrazoxanu (DEX) dihydropyrimidinázou (DHPáza) na meziproducty 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. DEX je však 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 ($\approx 10 \mu$ M) už na konci infuze DEX, c_{max} ADR-925 ($\approx 30 \mu$ M) byla dosažena 15 min poté a po 4 h fázi plató následoval

pomalý pokles jeho koncentrací v plazmě. Přechodné metabolity (B a C) byly díky rychlé přeměně na ADR-925 detekovány v plazmě jen krátce.

1.4.2. *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., 1981; Herman et al., 2014). 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), přičemž poměry **10:1 až 20:1** byly vybrány jako nejvhodnější pro použití v **klinických studiích** (Swain et al., 1997). 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 (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). Účinnost DEX v klinické praxi byla jasně potvrzena v mnoha klinických studiích u dospělých i dětí s různými malignitami a také v jejich meta-analýzách (Reichardt et al., 2018; van Dalen et al., 2011).

1.4.3. *Mechanismy účinku*

Navzdory intenzivnímu výzkumu není mechanismus kardioprotektivních účinků DEX vůči ANT kardiotoxicitě plně objasněn (Benjamin et al., 2021; Hasinoff et al., 2020b).

a) **Chelatace iontů železa**

Kardioprotektivní účinek DEX je nejčastěji připisován chelataci železa pomocí jeho metabolitu **ADR-925**. Tento metabolit 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, 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 další ionty (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 et al., 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, a tak přemostňuje dva monomery a uzavírá DNA

v uzavřené konformaci TOP2 (Hasinoff et al., 2007). Jako katalytický inhibitor TOP2 DEX **nenavozuje zlomy DNA**, čímž se zásadně **liší od tzv. topoizomerázových jedů**, mezi něž patří 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 mohl DEX také navodit **cílenou degradaci TOP2B prostřednictvím ubikvitin proteazomového systému** (Lyu et al., 2007). Doposud však nebyl prokázán příčinný vztah mezi schopností inhibovat/depletovat TOP2B v myokardu a kardioprotekcí vůči chronické ANT kardiotoxicitě. V neposlední řadě je třeba zdůraznit, že dostupné informace o možném významu TOP2B pro kardioprotekci navozenou DEX byly získány na metodicky problematickém modelu proliferujících H9c2 myoblastů (Deng et al., 2014; Lyu et al., 2007). Tato často užívaná buněčná linie na rozdíl od kardiomyocytů exprimuje také TOP2A (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).

1.4.4. Nežádoucí účinky

DEX v kardioprotektivních dávkách používaných v klinických studiích nezpůsobil vyšší výskyt nebo závažnost nežádoucích účinků spojených s ANT chemoterapií, s výjimkou leukopenie a/nebo trombocytopenie (Cvetkovic et al., 2005). 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** (Swain et al., 1997), později na to mělo větší vliv **podezření na zvýšení rizika vzniku sekundárních malignit** (Tebbi et al., 2007), které vedlo k dočasné kontraindikaci u dětí. Ačkoliv novější studie a jejich **meta-analýzy nepotvrzují** významný vliv DEX na protinádorový účinek ani zvýšené riziko sekundárních malignit (shrnuto v Reichardt et al., 2018), předběžně zavedená omezení užití DEX byla změněna jen částečně (kontraindikace u dětí byla zrušena). Omezení **užití DEX jen při vyšších kumulativních dávkách ANT ($\geq 300 \text{ mg/m}^2$) u dětí i dospělých** však zůstává v platnosti.

1.5. Další bisdioxopiperazinové deriváty

Bisdioxopiperaziny byly studovány v průběhu 60. let minulého století v laboratořích Imperial Cancer Research Fund (ICRF) v Londýně jako protinádorová léčiva. Zde bylo zjištěno, že **protinádorová aktivita** je omezena pouze na látky velmi blízké **ICRF-154** – např. **razoxan (ICRF-159)** a jeho oba optické izomery (**DEX i levrazoxan**), či látku **ICRF-193** (Creighton et al., 1969). 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 (Luo et al., 2009). Klasické TOP2A jedy jako je etoposid či ANT, jež navozují tvorbu dvojíých zlomů v DNA, aktivují zejména tzv. **DNA damage checkpoint** (Damelin et al., 2007).

1.5.1. Kardioprotektivní účinky *in vitro* a *in vivo*

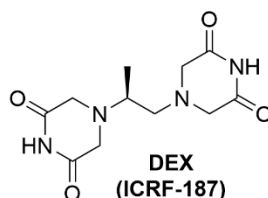
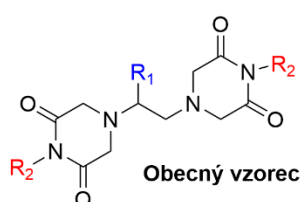
Na rozdíl od protinádorového účinku byly kardioprotektivní účinky bisdioxopiperazinových derivátů jiných než DEX zkoumány jen **v několika málo studiích** (Bureš et al., 2017; Herman et al., 1997; Jirkovská-Vávrová et al., 2015; Martin et al., 2009;

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.

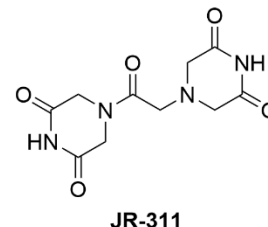
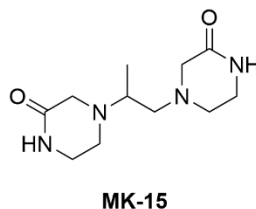
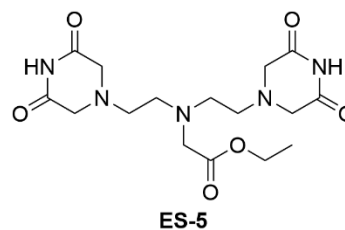
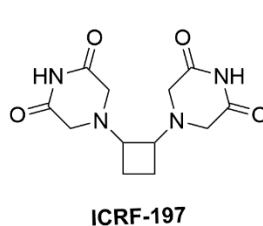
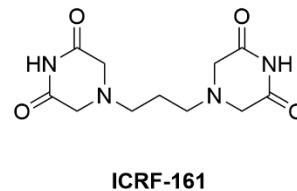
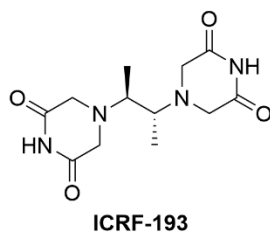
Protekcí před ANT kardiotoxicitou se věnovala studie Herman et al. (1985), ve které byl studován účinek DEX a téměř 20 bisdioxopiperazinů na **snížení akutní celkové toxicity jednorázového podání vysoké dávky DAU (25 mg/kg)** u křečka. Vztah těchto dat ke kardioprotektivním účinkům bisdioxopiperazinů ovšem zůstává nejasný, protože příčina mortality v této studii nebyla určena a použitá vysoká dávka ANT navozuje zejména významnou extrakardiální toxicitu. 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 hydrolýzou uvolňuje ICRF-159 – razoxan) (**Obr. 4**). Významná ale méně účinná protekce pak byla pozorována u derivátů **ICRF-197** a **ICRF-239**. Parciální kardioprotektivní účinek byl u **ICRF-154** zaznamenán na modelu u potkana i u **krátkodobého opakovaného podávání DOX (1× týdně po 30 dnů)** (Květina et al., 1997).

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. A 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 proléčiva **ICRF-154 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 methylu 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.



Název	R ₁	R ₂
ICRF-154	H	H
Bimolan	H	
Sobuzoxan	H	
Razoxan (ICRF-159)	CH ₃	H
ADR-559	CH ₃	
ICRF-239	CH ₃	CH ₃



Obr. 4 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)

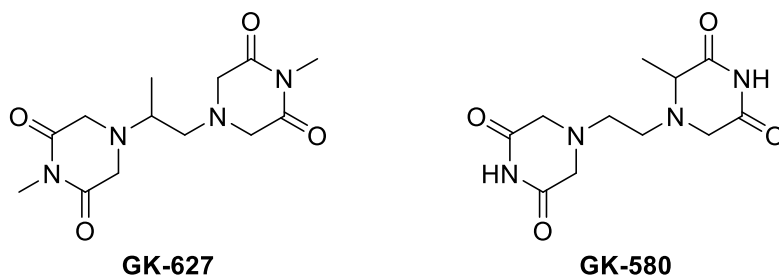
Cílem Publikace č. 1 bylo studium protektivního potenciálu dvou nových sérií derivátů DEX vůči ANT kardiotoxicitě, zhodnocení významu vybraných strukturních prvků molekuly DEX pro navození kardioprotektivního účinku a analýza účasti dvou nejčastěji zmiňovaných mechanismů (chelatace železa a inhibice 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. 5**), jež byly podrobeny důkladnému hodnocení na zavedeném modelu chronické ANT kardiotoxicity u králíka.

Opakované podávání DAU (3 mg/kg, *i.v.*, 1 \times týdně po 10 týdňů) navodilo na tomto modelu předčasné úhyny 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 chelatovat 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. 5 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., Šterba M., Šterbová-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 popsát 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-aminoocetové (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).

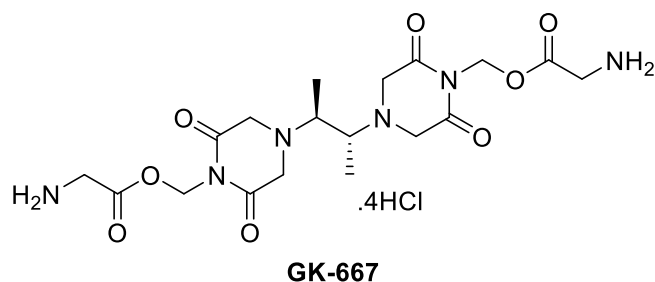
S užitím UHPLC-MS/MS bylo u všech proléčiv v průběhu inkubace v buněčném médiu zaznamenáno rychlé uvolnění ICRF-193 s následnou přeměnou na jeho neaktivní metabolit s plně otevřenými dioxopiperazinovými kruhy (ICRF-193_{met}). Hodnocení těchto proléčiv na standardním *in vitro* modelu ANT kardiotoxicity (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 proléčivo GK-667 (**Obr. 6**) vybráno pro další studium, kde byla bioaktivace GK-667 (10 a 100 μ M) hodnocena nejprve v králíčí plazmě *in vitro*. Zde uvolnění ICRF-193 probíhalo ještě rychleji než v buněčném médiu a relevantním puftru, 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; $\approx 2,7$ μ 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 μ M). 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 (≈ 11 μ 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 μ M). 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. 6 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 spoluúčasť 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., Štěřba 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 měštnání 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.

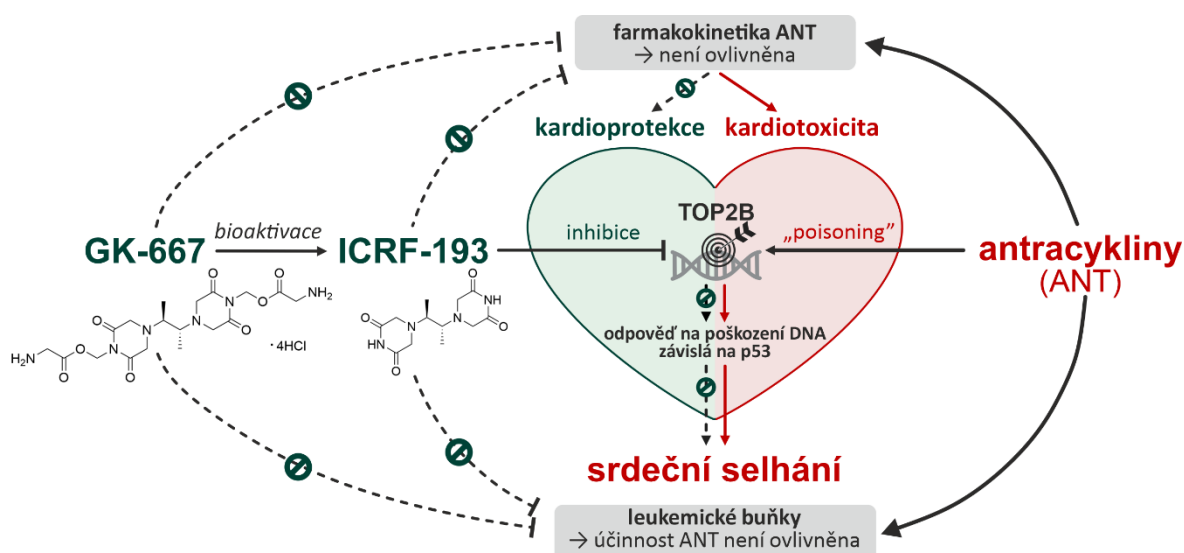
Výsledky dekatenačního testu studujícího účinek GK-667 a ICRF-193 na aktivitu TOP2B *in vitro* ukázaly, že zatímco ICRF-193 účinně a na dávce závisle inhibuje aktivitu TOP2B již od nejnižší použité koncentrace (1 μ M), inhibice aktivity TOP2B u jeho proléčiva GK-667 byla pozorována až u vysokých koncentrací (1000 μ M), 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. 7**).

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. 7 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 dvojitych zlomů 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

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 methylu z alifatického spojovacího řetězce do polohy 3 na jednom dioxopiperazinovém kruhu DEX vede ke kompletní ztrátě protektivního účinku vůči toxicitě ANT. Tento nálezn 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 expozičních 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). Zde bylo zjištěno, že důvodem nižšího skóre myokardiálního poškození v této skupině mohla být spíše nižší průměrná kumulativní dávka ANT, kterou zvířata v této skupině dostala v důsledku předčasných úhynů (příčina úhynů nebyla z prezentovaných dat jasná). 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 et al., 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. 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 et al., 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 izoformy tohoto enzymu (TOP2A) (Patel et al., 2000). DEX je ale také inhibitorem β izoformy 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, 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 et al., 2014b). Interpretace těchto publikovaných výsledků směrem ke kardioprotekci tedy byla velmi obtížná. Další teorie pak přímo vylučovaly vztah kardioprotekce DEX k TOP2B a navrhovaly alternativní mechanismy (McCormack, 2018).

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 náález 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 náález 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 $0,3 \mu\text{M}$, 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 předloženého proléčiva sobuzoxanu, který je stále rozpustný jen omezeně, a proto je nutné jej podávat *p.o.* ve formě suspenze. 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. $0,3 \text{ l/h/kg}$) (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 $3,78 \text{ mg/kg}$ volné baze proléčiva obsahující jen $0,47$ a $2,34 \text{ mg/kg}$ 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., 1997). Tato porovnání naznačují, že GK-667 je zřejmě v současnosti neúčinnějším 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. U DEX také nebyl popsán žádný vliv na farmakokinetiku ANT u zvířat v *in vivo* experimentech (Baldwin et al., 1992), ani u pacientů v klinické studii (Hochster et al., 1992).

Jelikož ANT i bisdioxopiperaziny (včetně DEX a ICRF-193) ovlivňují nesespecificky 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., 1997), jež bylo později rozporováno samotnými autory této studie (Swain et al., 2004), poměrně jednoznačně dokazují, že podání DEX nemá na protinádorový účinek ANT žádný významný vliv (shrnuto v Reichardt et al., 2018). Podobně nebyl v *in vitro* experimentech s DEX (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 et al., 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.

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 et al., 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. 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*. 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). V druhé části této disertační práce se podařilo překonat velmi nízkou rozpustnost této látky přípravou proléčiv, 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

- Baldwin JR, Phillips BA, Overmyer SK, et al. (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, et al. (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.
- Billingham ME, Mason JW, Bristow MR, et al. (1978) Anthracycline cardiomyopathy monitored by morphologic changes. *Cancer Treat Rep* **62**:865-872.
- Brown SA, Okwuosa TM, Barac A, et al. (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, et al. (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, et al. (2007b) Long-term effects of 7-mono-hydroxyethylrutoside (monoHER) on DOX-induced cardiotoxicity in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* **60**:509-514.
- Bureš J, Jirkovská A, Šesták V, et al. (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.
- Cardinale D, Colombo A, Sandri MT, et al. (2006) Prevention of high-dose chemotherapy-induced cardiotoxicity in high-risk patients by angiotensin-converting enzyme inhibition. *Circulation* **114**:2474-2481.
- 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, et al. (2020) Management of cardiac disease in cancer patients throughout oncological treatment: ESMO consensus recommendations. *Ann Oncol* **31**:171-190.
- 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, et al. (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.
- Deng S, Yan T, Jendry C, et al. (2014) Dexrazoxane may prevent doxorubicin-induced DNA damage via depleting both Topoisomerase II isoforms. *BMC Cancer* **14**:842.
- 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.
- Feroz W and Sheikh AMA (2020) Exploring the multiple roles of guardian of the genome: P53. *Egypt J Med Human Genet* **21**:49.
- Glickstein H, El RB, Link G, et al. (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, et al. (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 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, et al. (2021) Prevention of Cardiac Dysfunction During Adjuvant Breast Cancer Therapy (PRADA): Extended Follow-Up of a 2 \times 2 Factorial, Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Clinical Trial of Candesartan and Metoprolol. *Circulation* **143**:2431-2440.
- Herman EH, el-Hage AN, Creighton AM, et al. (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 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, et al. (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, et al. (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, et al. (2014) A review of the preclinical development of dexrazoxane. *Prog Pediatr Cardiol* **36**:33-38.
- 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, et al. (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, et al. (1992) Pharmacokinetics of the cardioprotector ADR-529 (ICRF-187) in escalating doses combined with fixed-dose doxorubicin. *J Natl Cancer Inst* **84**:1725-1730.
- 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, et al. (2022) Late health outcomes after dexrazoxane treatment: A report from the Children's Oncology Group. *Cancer* **128**:788-796.
- Imondi AR (1998) Preclinical models of cardiac protection and testing for effects of dexrazoxane on doxorubicin antitumor effects. *Semin Oncol* **25**:22-30.
- Ishida R, Miki T, Narita T, et al. (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, et al. (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, et al. (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, et al. (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, et al. (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, et al. (2013) Early and delayed cardioprotective intervention with dexrazoxane each show different potential for prevention of chronic anthracycline cardiotoxicity in rabbits. *Toxicology* **311**:191-204.
- Kiss I, Adámková Krákorová D, Andrašina T, et al. (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.
- Květina J, Grossmann V, Svoboda Z, et al. (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, et al. (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.
- Lee JH and Berger JM (2019) Cell Cycle-Dependent Control and Roles of DNA Topoisomerase II. *Genes* **10**:859.
- Legha SS, Wang YM, Mackay B, et al. (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, et al. (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.
- Luo K, Yuan J, Chen J, et al. (2009) Topoisomerase II α controls the decatenation checkpoint. *Nat Cell Biol* **11**:204-210.
- Lyu YL, Kerrigan JE, Lin CP, et al. (2007) Topoisomerase IIbeta 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, et al. (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.
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, et al. (2004) Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* **56**:185-229.

- Myers C, Bonow R, Palmeri S, et al. (1983) A randomized controlled trial assessing the prevention of doxorubicin cardiomyopathy by N-acetylcysteine. *Semin Oncol* **10**:53-55.
- Patel S, Jazrawi E, Creighton AM, et al. (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., Štěřba M., Šimůnek T., Štěřbová 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.
- Pokorná Z, Kollárová-Brázdová P, Lenčová-Popelová O, et al. (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, Štěřba M, Šimůnek T, et al. (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 léčivy. Roh J., Štěřba M., Šimůnek T., Štěřbová 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, et al. (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, et al. (1980) Molecular structure of an anticancer drug-DNA complex: daunomycin plus d(CpGpTpApCpG). *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**:7204-7208.
- Reichardt P, Tabone M-D, Mora J, et al. (2018) Risk-benefit of dexrazoxane for preventing anthracycline-related cardiotoxicity: re-evaluating the European labeling. *Future Oncol* **14**:2663-2676.
- Sawicki KT, Sala V, Prever L, et al. (2021) Preventing and Treating Anthracycline Cardiotoxicity: New Insights. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **61**:309-332.
- Schroeder PE, Jensen PB, Sehested M, et al. (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.
- Sobczuk P, Czerwińska M, Kleibert M, et al. (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, et al. (1999) Increased p53 protein expression in human failing myocardium. *J Heart Lung Transplant* **18**:744-749.
- 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>.
- Styczynski J, Wysocki M, Balwierz W, et al. (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, et al. (1997) Cardioprotection with dexrazoxane for doxorubicin-containing therapy in advanced breast cancer. *J Clin Oncol* **15**:1318-1332.
- Šimůnek T, Štěřba M, Popelová O, et al. (2009) Anthracycline-induced cardiotoxicity: Overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Rep* **61**:154-171.
- Štěřba M, Popelova O, Vávrová A, et al. (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, et al. (1991) Inhibition of topoisomerase II by antitumor agents bis(2,6-dioxopiperazine) derivatives. *Cancer Res* **51**:4903-4908.
- Tebbi CK, London WB, Friedman D, et al. (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, et al. (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.
- 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, et al. (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, et al. (1995) Monohydroxyethylrutoside as protector against chronic doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Br J Pharmacol* **115**:1260-1264.
- van Dalen EC, Caron HN, Dickinson HO, et al. (2011) Cardioprotective interventions for cancer patients receiving anthracyclines. *Cochrane Database Syst Rev*:CD003917.
- van der Zanden SY, Qiao X and Neeffjes 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, et al. (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.
- 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, et al. (2015) p53-Induced inflammation exacerbates cardiac dysfunction during pressure overload. *J Mol Cell Cardiol* **85**:183-198.
- Zamorano JL, Lancellotti P, Rodriguez Muñoz D, et al. (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, et al. (2012) Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med* **18**:1639-1642.

7. PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI STUDENTKY

7.1. Původní vědecké práce v impaktovaném časopise

7.1.1. *Prvoautorské publikace s IF*

- **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., Štěřba M. Prodrug of ICRF-193 provides promising protective effects against chronic anthracycline cardiotoxicity in a rabbit model *in vivo*. *Clinical Science*, 2021, **135**(15):1897-1914. <https://doi.org/10.1042/CS20210311> (IF₂₀₂₀ = **6,124, Q1**; AIS₂₀₂₀ = **1,568, Q1**).
- **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., Štěřba M. Investigation of structure-activity relationships of dexrazoxane analogs reveals topoisomerase II β interaction as a prerequisite for effective protection against anthracycline cardiotoxicity. *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**).

7.1.2. *Spoluautorské publikace s IF*

- Pokorná Z., **Kollárová-Brázdová P.**, Lenčová-Popelová O., Jirkovský E., Kubeš J., Mazurová Y., Adamcová M., Holečková M., Palička V., Šimůnek T., Štěřba M. Primary prevention of chronic anthracycline cardiotoxicity with ACE inhibitor is temporarily effective in rabbits, but benefits wane in post-treatment follow-up. *Clinical Science*, 2022, **136**(1):139-161. <https://doi.org/10.1042/CS20210836> (IF₂₀₂₀ = **6,124, Q1**; AIS₂₀₂₀ = **1,568, Q1**).
- 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 A. R., Roh J., Šimůnek T., Štěrbová-Kovaříková P., Štěřba M. Clinically translatable prevention of anthracycline cardiotoxicity by dexrazoxane is mediated by topoisomerase II beta and not metal chelation. *Circulation-Heart Failure*, 2021, **14**(11):e008209. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.120.008209> (IF₂₀₂₀ = **8,846, D1**; AIS₂₀₂₀ = **3,335, D1**).
- Bavlovič Piskáčková H., Jansová H., Kubeš J., Karabanovich G., Váňová N., **Kollárová-Brázdová P.**, Melnikova I., Jirkovská A., Lenčová-Popelová O., Chládek J., Roh J., Šimůnek T., Štěřba M., Štěrbová-Kovaříková P. Development of water-soluble prodrugs of the bisdioxopiperazine topoisomerase II β inhibitor ICRF-193 as potential cardioprotective agents against anthracycline cardiotoxicity. *Scientific Reports*, 2021, **11**(1):4456. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83688-x> (IF₂₀₂₀ = **4,380, Q1**; AIS₂₀₂₀ = **1,285, Q2**).
- Pokorná Z., Jirkovský E., Hlaváčková M., Jansová H., Jirkovská A., Lenčová-Popelová O., **Brázdová P.**, Kubeš J., Sotáková-Kašparová D., Mazurová Y., Adamcová M., Vostatková L., Holzerová K., Kolář F., Šimůnek T., Štěřba M. *In vitro* and *in vivo* investigation of cardiotoxicity associated with anticancer proteasome inhibitors and their combination with anthracycline. *Clinical Science*, 2019,

133(16):1827-1844. <https://doi.org/10.1042/CS20190139> (IF₂₀₁₉ = 5,223, Q1; AIS₂₀₁₉ = 1,327, Q1).

- Jirkovský E., Jirkovská A., Bureš J., Chládek J., Lenčová O., Stariat J., Pokorná Z., Karabanovich G., Roh J., **Brázdová P.**, Šimůnek T., Kovaříková P., Štěrbá M. Pharmacokinetics of the cardioprotective drug dexrazoxane and its active metabolite ADR-925 with focus on cardiomyocytes and the heart. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2018, 364(3):433-446. <https://doi.org/10.1124/jpet.117.244848> (IF₂₀₁₈ = 3,615, Q1; AIS₂₀₁₈ = 1,128, Q1).

7.2. Ostatní práce v impaktovaném časopise

- Bavlovič Piskáčková H., **Kollárová-Brázdová P.**, Kučera R., Macháček M., Pedersen-Bjergaard S., Štěrbová-Kovaříková P. The electromembrane extraction of pharmaceutical compounds from animal tissues. *Analytica Chimica Acta*, 2021, 1177:338742. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338742> (IF₂₀₂₀ = 6,558, Q1; AIS₂₀₂₀ = 1,069, Q1).

7.3. Patentová činnost

- **Národní patentová přihláška PV 2020-26: Přihlašovatel:** Univerzita Karlova v Praze. Použití derivátů sloučeniny ICRF-193 a farmaceutický přípravek k prevenci chronické kumulativní kardiotoxicity způsobené terapií antracyklinovými protinádorovými léčivými. **Původci:** Roh J., Štěrbá M., Šimůnek T., Štěrbová P., Karabanovich G., Jirkovská A., Jirkovský E., Bavlovič Piskáčková H., Kubeš J., Jansová H., **Kollárová P.** **CZ 309069 B6. Datum přihlášení:** 16. 1. 2020. **Datum oznámení o udělení ve věstníku:** 12. 1. 2022. Dostupné z: <https://isdv.upv.cz/doc/FullFiles/Patents/FullDocuments/309/309069.pdf>
- **Mezinárodní patentová přihláška PCT/IB2021/050285: Přihlašovatel:** 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. **Původci:** Roh J., Štěrbá M., Šimůnek T., Štěrbová P., Karabanovich G., Jirkovská A., Jirkovský E., Bavlovič Piskáčková H., Kubeš J., Jansová H., **Kollárová P.** **WO 2021/144746 A1. Datum přihlášení:** 15. 1. 2021. **Datum mezinárodního publikování:** 22. 7. 2021. Dostupné z: <https://patentimages.storage.googleapis.com/fb/54/c4/70e8e19f679a33/WO2021144746A1.pdf>

7.4. Odborné přednášky a plakátová sdělení na odborných setkáních

- celkem 32×, z toho 14× jako prezentující autor

7.4.1. Odborné přednášky

- celkem 13×, z toho 7× jako prezentující autor
- **Kollárová P.**, Lenčová O., Karabanovich G., Kocúrová J., Kubeš J., Váňová N., Mazurová Y., Adamcová M., Jirkovská A., Holečková M., Šimůnek T., Štěrbová P., Roh J., Štěrbá M. GK-667 – A new promising cardioprotective agent against chronic anthracycline cardiotoxicity, *18th International Medical Postgraduate Conference*, 2021, Hradec Králové.
- **Kollárová P.**, Lenčová O., Karabanovich G., Kocúrová J., Kubeš J., Váňová N., Mazurová Y., Adamcová M., Jirkovská A., Holečková M., Šimůnek T., Štěrbová P., Roh J., Štěrbá M. GK-667 – A new promising cardioprotective agent against chronic

anthracycline cardiotoxicity, *17th Postgraduate Medical Students Conference*, 2021, Hradec Králové.

- **Kollárová P.**, Lenčová O., Karabanovich G., Bavlovič Piskáčková H., Jirkovská A., Adamcová M., Kocúrová J., Kubeš J., Váňová N., Mazurová Y., Šimůnek T., Štěrbová P., Roh J., Štěrba M. GK-667 – nové nadějně kardioprotektivum vůči chronické antracyklinové kardiotoxicitě, *48. pracovní konference Komise experimentální kardiologie*, 2021, Kroměříž.
- **Kollárová P.** GK-667 jako kardioprotektivum vůči chronické antracyklinové kardiotoxicitě u králíka, *Výjezdní zasedání GAČR*, 2020, Kuks.
- **Kollárová P.**, Karabanovich G., Bavlovič Piskáčková H., Pokorná Z., Adamcová M., Štěrbová P., Roh J., Štěrba M. Proléčivo nového derivátu dexrazoxanu poskytuje velmi účinnou protekci vůči chronické antracyklinové kardiotoxicitě u králíka, *47. pracovní konference Komise experimentální kardiologie*, 2019, Senec, Slovensko.
- **Brázdová P.**, Pokorná Z., Jirkovský E., Jirkovská A., Karabanovich G., Roh J., Piskáčková H., Reimerová P., Mazurová Y., Adamcová M., Šimůnek T., Kovaříková P., Štěrba M. Studium kardioprotektivních účinků derivátů dexrazoxanu na modelu chronické antracyklinové kardiotoxicity u králíka, *45. Pracovní konference Komise experimentální kardiologie*, 2017, Kutná Hora.
- **Brázdová P.**, Pokorná Z., Jirkovský E., Jirkovská A., Roh J., Karabanovich G., Piskáčková H., Reimerová P., Mazurová Y., Adamcová M., Kovaříková P., Šimůnek T., Štěrba M. *In vivo* studium kardioprotektivních účinků 2 blízkých derivátů dexrazoxanu (GK627 a GK580) na modelu chronické antracyklinové kardiotoxicity u králíka, *11. Diskusní seminář Univerzitního výzkumného centra pro výzkum toxických a protektivních účinků léčiv na kardiovaskulární systém*, 2017, Hradec Králové.

7.4.2. Plakátová sdělení

- celkem 19×, z toho 7× jako prezentující autor
- **Kollárová P.**, Lenčová O., Karabanovich G., Kubeš J., Mazurová Y., Adamcová M., Jirkovská A., Šimůnek T., Roh J., Štěrba M. A new bisdioxopiperazine analogue provides promising protective effects against chronic anthracycline cardiotoxicity *in vivo* in rabbits, *14th Meeting "New Frontiers in Basic Cardiovascular Research: France – New EU members"*, 2022, Bratislava, Slovensko.
- **Kollárová-Brázdová P.**, Karabanovich G., Bavlovič Piskáčková H., Pokorná Z., Štěrbová P., Roh J., Štěrba M. Proléčivo nového derivátu dexrazoxanu poskytuje velmi účinnou protekci vůči chronické antracyklinové kardiotoxicitě u králíka, *69. Česko-Slovenské farmakologické dny*, 2019, Praha.
- **Brázdová P.**, Pokorná Z., Jirkovský E., Karabanovich G., Roh J., Piskáčková H., Adamcová M., Šimůnek T., Štěrbová-Kovaříková P., Štěrba M. Investigation of novel derivatives of dexrazoxane reveals topoisomerase II beta interaction as a pre-requisite for effective protection against anthracycline cardiotoxicity, *Heart Failure Congress*, 2018, Vídeň, Rakousko.
- **Brázdová P.**, Pokorná Z., Jirkovský E., Karabanovich G., Roh J., Piskáčková H., Adamcová M., Šimůnek T., Štěrbová-Kovaříková P., Štěrba M. Investigation of novel derivatives of dexrazoxane reveals topoisomerase II beta interaction as a pre-requisite for effective protection against anthracycline cardiotoxicity, *HFA Winter Meeting on Translational Heart Failure Research*, 2018, Les Diablerets, Švýcarsko.

- **Brázdová P.**, Jirkovský E., Pokorná Z., Jirkovská A., Mazurová Y., Karabanovich G., Roh J., Piskáčková H., Reimerová P., Adamcová M., Šimůnek T., Kovaříková P., Štěrbá M. New dexrazoxane derivatives – investigation of their protective effects on a model of chronic anthracycline cardiotoxicity, *Global Cardio-Oncology Summit*, 2017, Londýn, Spojené království.
- **Brázdová P.**, Pokorná Z., Jirkovský E., Jirkovská A., Karabanovich G., Roh J., Piskáčková H., Reimerová P., Mazurová Y., Adamcová M., Šimůnek T., Kovaříková P., Štěrbá M. Close derivatives of dexrazoxane and their cardioprotective effects on a model of chronic anthracycline cardiotoxicity in rabbits, *67. Česko-Slovenské Farmakologické dni*, 2017, Stará Lesná, Slovensko.
- **Brázdová P.**, Jirkovský E., Pokorná Z., Jirkovská A., Adamcová M., Karabanovich G., Roh J., Šimůnek T., Štěrbá M. Studium kardioprotektivních účinků nově syntetizovaných derivátů dexrazoxanu na modelu chronické antracyklinové kardiotoxicity, *44. konferencie Komisie experimentálnej kardiológie*, 2016, Stará Lesná, Slovensko.