

UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta v Hradci Králové

**Antracyklinová kardiotoxicita a studium nových farmakologických
kardioprotektiv**

Zuzana Pokorná

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. Zuzana Pokorná, Ústav farmakologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové.

Školitel: doc. PharmDr. Martin Štěrba, PhD., Ústav farmakologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové.

Oponenti:

Prof. MUDr. Luděk Červenka, CSc., MBA, Centrum experimentální medicíny, Institut klinické a experimentální medicíny, Praha.

Prof. MUDr. Milan Štengl, PhD., Ústav fyziologie a Biomedicínské centrum, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova.

Obhajoba se bude konat před Komisí pro obhajoby OR Lékařská farmakologie dne
v od hod.

(bude doplněno po vyhlášení termínu, místa a času)

Tato práce vznikla za podpory grantů: GAČR 18-08169S, GAČR 21-16195S, GAUK 680216, INOMED CZ.02.1.01/0.0/0.0/18 069/0010046 a PROGRES Q40/5.

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, PhD.

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	Antracyklinová kardiotoxicita	1
1.2.1	Mechanismy vzniku chronické antracyklinové kardiotoxicity	2
1.2.1.1	Oxidační poškození myokardu	2
1.2.1.2	TOP2B-dependentní poškození myokardu	3
1.2.1.3	Dysregulace proteazomu	4
1.2.2	Kombinace antracyklinů s dalšími potenciálně kardiotoxickými léčivy	5
1.2.2.1	Kombinace s proteazomovými inhibitory	5
1.3	Opatření využívaná k omezení antracyklinové kardiotoxicity	6
1.3.1	Farmakologická kardioprotekce vůči antracyklinové kardiotoxicitě	7
1.3.1.1	Antioxidanty a chelátory železa	7
1.3.1.2	Dexrazoxan (DEX, ICRF-187)	7
1.3.1.3	Léčiva používaná k neurohormonální blokádě u CHSS	8
2	Cíle disertační práce	10
3	Výsledky	11
3.1	Komentáře k publikovaným pracím	11
4	Diskuse	14
5	Závěry	19
6	Použitá literatura	20
7	Přehled publikační činnosti	25
7.1	Původní vědecké práce v časopisech s IF se vztahem k disertační práci	25
7.2	Přednášky a posterová sdělení na odborných setkáních	26

Souhrn

Tato disertační práce je komentovaným souborem 3 původních prací publikovaných v mezinárodních odborných časopisech. V první části se zabývá experimentálním studiem kardiotoxicity proteazomových inhibitorů (PI) bortezomibu a karfilzomibu, což jsou biologicky cílená léčiva pro léčbu hematologických malignit spojovaná s potenciálním rizikem kardiotoxicity a srdečního selhání. Jelikož se PI také nověji užívají v kombinaci s antracykliny (ANT), u kterých je riziko toxického poškození myokardu dobře popsáno, jedním z hlavních cílů bylo prozkoumat kardiiovaskulární bezpečnost této kombinace. K této problematice byla v podmínkách *in vitro* získána rozdílná data v závislosti na zvoleném experimentálním modelu (primární kardiomyocyty izolované z novorozených vs. dospělých potkanů, NVCM vs. AVCM). Oba PI významně zvyšovaly cytotoxicitu ANT u NVCM, ale nikoliv u AVCM, i přesto že inhibice aktivity proteazomu byla u AVCM po expozici PI výraznější. Oba PI podávané *in vivo* v maximální tolerované dávce v kombinaci s ANT neměly významný negativní vliv na parametry chronické ANT kardiotoxicity na *in vivo* modelu u králíka. Podání PI navodilo významnou ale relativně krátkodobou inhibici aktivity proteazomu v myokardu, což by mohlo vysvětlit absenci negativního vlivu těchto léčiv na poruchu proteinové homeostázy pozorovanou v myokardu po chronickém podávání ANT. Celkově se tedy zdá, že kardiotoxický potenciál obou studovaných PI je alespoň u mladých dospělých zvířat omezený a získané důkazy nenasvědčují tomu, že by tato léčiva v uvedených podmínkách významně zvyšovala riziko kardiotoxicity a chronického selhání navozené ANT.

Inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu (ACEi) se dle některých zdrojů jeví jako potenciálně slibná léčiva, která by mohla chránit myokard před indukci chronické ANT kardiotoxicity při jejich užití v primární prevenci (tj. při podávání v průběhu celé chemoterapie ANT). Cílem druhé části bylo prozkoumat tuto hypotézu na experimentálním modelu zejména s ohledem na účinnost této intervence v období následného sledování po dokončení chemoterapie ANT (tzv. *follow up*, FU). Na *in vivo* modelu u králíka bylo zjištěno, že podávání klinicky relevantních dávek perindoprilu (ACEi) má na rozvoj chronické ANT kardiotoxicity různý vliv v závislosti na délce FU. Týden po dokončení chronického podávání ANT byla v kombinační skupině pozorována kompletní prevence či výrazné snížení většiny hodnocených parametrů kardiotoxicity. Nicméně po 3-10 týdnech FU bylo patrné významné zhoršení většiny sledovaných parametrů kardiotoxicity, včetně výskytu úhynů v důsledku těžkých forem srdečního selhání. Pokračování podávání perindoprilu i v průběhu prodlouženého FU zabránilo předčasným úhynům, ale nezvrátilo trend zhoršení většiny parametrů kardiotoxicity ve FU. Tyto výsledky se lišily od účinku klinicky užívaného kardioprotektiva DEX, který navodil v předchozích experimentech na stejném modelu s 10týdenním FU účinnou a velmi stálou protekci myokardu. Tato studie také ukázala, že benefit navozený ACEi v primární prevenci ANT kardiotoxicity je na rozdíl od DEX z velké části pouze dočasný, což může souviset s absencí vlivu ACEi na ANT navozené a TOP2B-dependentní poškození DNA a aktivaci buněčné odpovědi na poškození DNA (DDR, *DNA damage response*) v myokardu.

Ve třetí části byly zkoumány mechanismy kardioprotektivního účinku klinicky účinného kardioprotektiva DEX. Farmakokinetické experimenty prokázaly, že exogenní podání předpokládaného aktivního metabolitu DEX (ADR-925) s chelatačními účinky může navodit stejné nebo vyšší koncentrace této látky *in vitro* v NVCM a *in vivo* v myokardu králíka, než jaké jsou zjištěné po podání parentní látky. Nicméně exogenní podání ADR-925 nemělo na rozdíl od DEX žádný protektivní účinek vůči ANT kardiotoxicitě *in vitro* ani *in vivo*. Parentní molekula DEX ovšem inhibuje rekombinantní TOP2B *in vitro* v koncentracích, kdy toto léčivo navozuje kardioprotektivní účinky a také depletuje tento enzym *in vitro* v NVCM a *in vivo* v myokardu králíka a brání ANT navozenému poškození DNA. Spojení účinné kardioprotekce navozené DEX s ovlivněním TOP2B bylo též podpořeno experimenty s diastereoizomery nového derivátu DEX. Tyto výsledky hovoří proti platnosti tradiční hypotézy vysvětlující protekci proti ANT kardiotoxicitě navozenou DEX chelatačními vlastnostmi jeho metabolitu ADR-925 a naopak podporují vztah parentní molekuly DEX ke katalytické inhibici TOP2B a prevenci ANT navozeného poškození DNA.

This Ph.D. thesis is a commented collection of 3 original articles published in international journals. The first part deals with cardiotoxicity of proteasome inhibitors (PI) bortezomib and carfilzomib, which are biologically targeted drugs with a suspected risk of cardiotoxicity and heart failure (HF). As PIs are now being combined with anthracycline (ANT) anticancer drugs, which are well known for their damaging impact on the heart, a special attention was paid to this potentially risky combination. *In vitro* experiments with primary cardiomyocytes yielded different results depending on the employment of either neonatal or adult rat cardiomyocyte model (NVCM and AVCM, respectively). In particular, both PIs significantly increased toxicity of ANTs to NVCM, but not to AVCM, even though they inhibited proteasome activity in AVCM even more effectively. Both PIs administered in maximally tolerated doses in combination with ANT did not have a significant impact on the development of chronic ANT cardiotoxicity and HF in rabbits. Both PIs induced significant but relatively short-lived inhibition of proteasome activity in the heart, which might explain why they did not have a significant impact on a protein homeostasis impairment found in hearts with chronic ANT cardiotoxicity. Hence, the experimental data show that the combination of PIs with ANTs is not accompanied by an exaggerated risk of cardiotoxicity and HF at least in young adult animal cardiomyocytes and hearts.

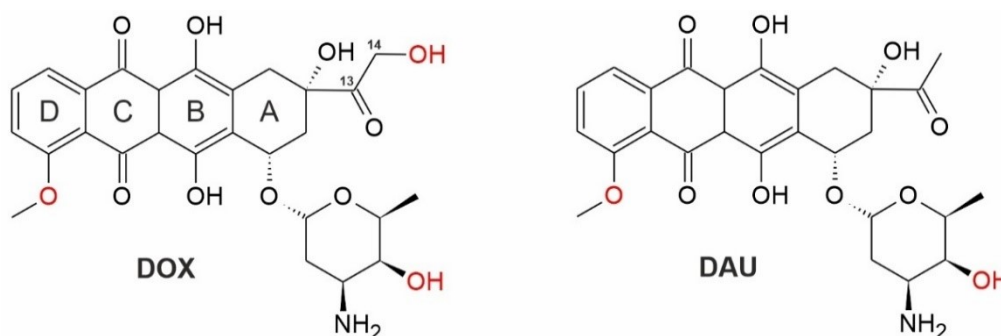
Inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACEi) have been recently hypothesized to be promising cardioprotective agents for prevention of the ANT-induced damage to the heart when used in primary prevention settings (i.e., throughout whole chemotherapy). This part aimed to address this question in animal experiments with focus on long-term outcomes of this intervention in post-treatment follow-up (FU). Using the model of chronic ANT cardiotoxicity in rabbits it was revealed that different benefits can be attributed to administration of clinically relevant doses of ACEi perindopril depending on the length of post-treatment FU. A week after the last ANT dose, perindopril administration seemed to completely overcome or markedly reduced most of the parameters describing toxic damage, including degenerative changes induced in cardiomyocytes. However, after additional 3–10-week FU, most of these cardiotoxicity parameters significantly deteriorated including occurrence of cases of end-stage HF with premature deaths. Continued administration of perindopril in the FU prevented cases of severe HF and related mortality but did not reverse the apparent trend for waning of benefits in the FU. These results were strikingly different from those obtained previously on the same rabbit model with clinically used DEX, where a sustained and robust cardioprotection was observed even after 10-week FU. Therefore, mechanistic differences in cardioprotective effects of these two drugs were studied. In sharp contrast to DEX, neither perindopril nor its active metabolite affected the activity of recombinant topoisomerase II beta (TOP2B) and prevented p53-mediated DNA damage signalling induced in the heart by a single ANT dose. Unlike DEX, ACEi provided largely only temporal benefits in the primary prevention of chronic ANT cardiotoxicity which may relate to their inability to prevent ANT induced and TOP2B-dependent DNA damage and related signalling in the myocardium.

In the last part of this thesis, mechanisms of cardioprotective effects of clinically used cardioprotectant DEX were investigated. Pharmacokinetic experiments showed that exogenous administration of the main DEX metabolite possessing metal chelating properties (ADR-925) induced even higher concentrations of this agent *in vitro* in NVCM and *in vivo* in rabbit's hearts than after administration of parent DEX. However, in head-to-head comparison with DEX, administration of ADR-925 did not show any cardioprotective potential both *in vitro* in NVCM and *in vivo* in rabbits. However, it was observed that parent DEX inhibited the activity of the recombinant TOP2B *in vitro* and depleted the same enzyme both *in vitro* in NVCM and *in vivo* in rabbit heart under the conditions it provides cardioprotective effects. Furthermore, DEX was also shown to protect cardiomyocytes against ANT-induced DNA damage. The mechanistic link towards TOP2B was further strengthened by experiments performed with diastereoisomers of a new derivative of DEX. Hence, these results supported a new mechanistic paradigm that attributes clinically effective cardioprotection against ANT cardiotoxicity to interactions with TOP2B, but not metal chelation.

1 Úvod

1.1 Antracykliny

Objev antracyklinů (ANT) přispěl k významnému průlomu v onkologické léčbě v druhé polovině 20. století. Zařazení těchto léčiv do chemoterapeutických režimů významně zvýšilo úspěšnost léčby řady hematologických i solidních nádorů u dětí i dospělých. Ačkoliv v následujících desetiletích došlo v této terapeutické oblasti k dramatickým změnám (zejména díky uvedení biologicky cílené protinádorové léčby do klinické praxe), zůstávají tato léčiva i dnes základním kamenem léčby řady malignit (Kiss et al., 2022). Důvodem je především jejich vysoká účinnost u mnoha nádorových onemocnění a spíše než jejich vytlačení z klinické praxe lze pozorovat jejich kombinaci s biologicky cílenou léčbou k dosažení maximální terapeutické odpovědi (Kiss et al., 2022). Příkladem je kombinace ANT s trastuzumabem u HER2 pozitivního karcinomu prsu (Mohan et al., 2018) nebo kombinace s proteazomovými inhibitory (např. s bortezomibem) v léčbě MM (Terwilliger et al., 2017).



Obr. 1. Chemická struktura antracyklinových antineoplastik. DOX, doxorubicin; DAU, daunorubicin.

Mechanismus protinádorového účinku ANT nebyl ani po půl století výzkumu uspokojivě objasněn. Za hlavních mechanismus protinádorového účinku je již delší dobu považována inhibice enzymu topoizomerázy II alfa (TOP2A) (Chen et al., 2013; van der Zanden et al., 2021). Enzym TOP2 katalyzuje vznik dvouřetězcových zlomů v DNA, čímž umožňuje řešení přirozených topologických problémů vyskytujících se během replikace a transkripce v DNA. Proliferující nádorové buňky exprimují zejména TOP2A, která je účinkem ANT ireverzibilně inhibována. ANT působí na TOP2A jako tzv. topoizomerázové jedy, tj. vedou ke vzniku stabilního ternárního komplexu ANT-TOP2A-DNA s následnou indukci permanentní dvojitého zlomu v DNA (Chen et al., 2013; van der Zanden et al., 2021). Vznik dvojitého zlomu spouští buněčnou signalizaci reagující na poškození DNA (DDR, *DNA damage response*), kde centrální úlohou hraje tumor supresorový protein p53. V důsledku jeho aktivace dojde k zástavě buněčného cyklu a indukci apoptotické buněčné smrti. Novější studie naznačují, že mechanismus protinádorového účinku může být komplexnější a jeho významnou součástí může být i poškození chromatinové struktury vypuzením histonů z nukleozomu (van der Zanden et al., 2021), což možná částečně souvisí s dlouho známou schopností ANT interkalovat (tj. vmezeřit se) do DNA mezi páry bází prostřednictvím planárního aglykonu. Samotná interkalace či oxidační stres mají v klinicky relevantních dávkách pro protinádorový účinek spíše malý význam (van der Zanden et al., 2021).

Použití ANT v klinické praxi je stejně jako u většiny cytostatik omezeno řadou akutních nežádoucích účinků a toxicit, které jsou ale většinou reverzibilní a zvládnutelné aktivní podpůrnou léčbou. Obávané jsou dlouhodobé komplikace léčby, které mohou mít významný dopad na morbiditu, mortalitu a kvalitu života pacientů dlouhodobě přežívajících nádorové onemocnění.

1.2 Antracyklinová kardiotoxicita

Kardiotoxicita je specifickou komplikací protinádorové léčby ANT s významným dopadem na jejich užití v klinické praxi (Zamorano et al., 2016; Sawicki et al., 2021). Může se manifestovat řadou

klinických projevů, od navození přechodných poruch rytmu, přes aseptické myokarditidy a perikarditidy až po rozvoj dilatační či restriktivní kardiomyopatie a chronického srdečního selhání (CHSS).

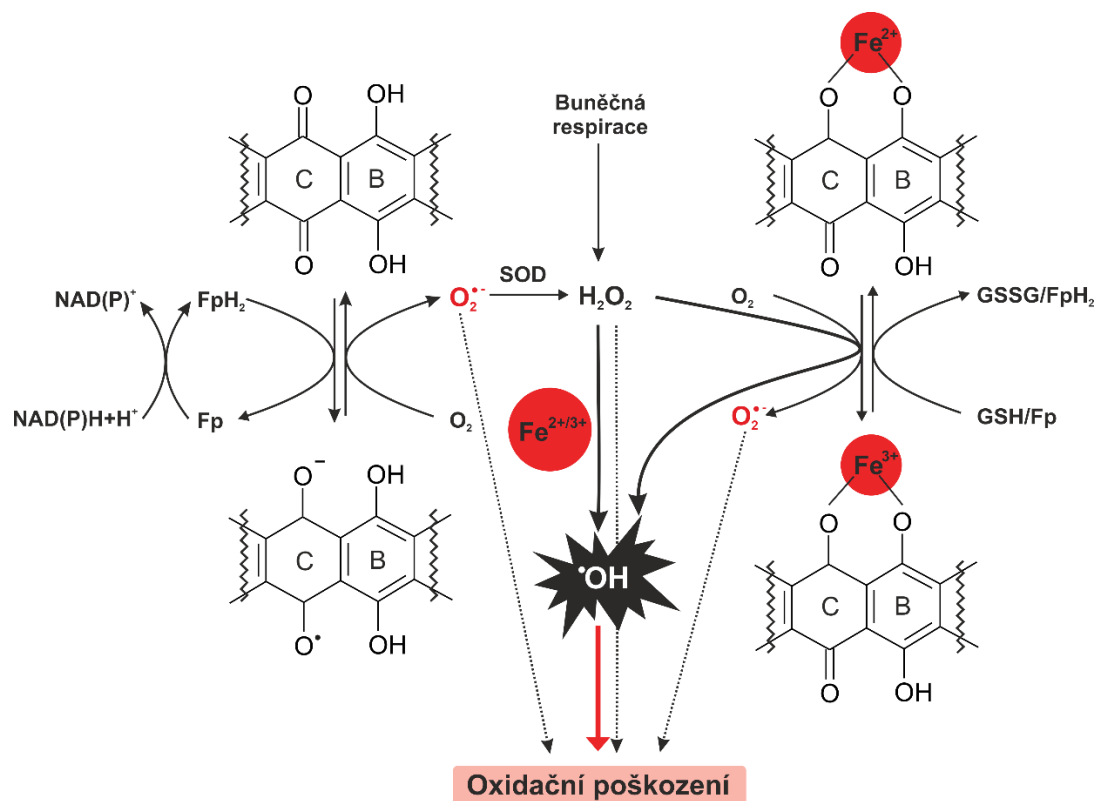
Z klinického hlediska jsou nejvýznamnější **chronické formy ANT kardiotoxicity**, které jsou vlastní všem klinicky užívaným léčivům této skupiny (jedná se o tzv. *class effect*) a rozvíjejí se pomalu v průběhu měsíců až několika let po chemoterapii (tzv. časný a opožděný typ chronické kardiotoxicity). Na rozdíl od akutních forem chronická kardiotoxicita závisí na kumulativní dávce ANT a je do značné míry ireverzibilní (Ewer et al., 2015). Z histopatologického hlediska je popisováno typické degenerativní poškození kardiomyocytů (zejména levé komory a mezikomorového septa) se ztrátou myofibril a vakuolizací cytoplazmy (Billingham et al., 1978). Vedle nekrotické buněčné smrti se zde uplatňuje i programovaná buněčná smrt – apoptóza, ale patrně i další formy programované smrti (Dadson et al., 2020; Sawicki et al., 2021). Uvedené změny vedou k rozvoji dilatační (případně restriktivní) kardiomyopatie a CHSS, které je z velké části ireverzibilní a omezeně odpovídající na dostupnou léčbu (Ewer et al., 2015). ANT kardiotoxicita je typickým příkladem typu I srdeční dysfunkce navozené protinádorovou léčbou (Ewer et al., 2015) vykazující významné rozdíly oproti typu II spojeným s biologicky cílenou léčbou.

1.2.1 Mechanismy vzniku chronické antracyklinové kardiotoxicity

Molekulární patogeneze chronické ANT kardiotoxicity stále není objasněna. V minulosti převažovala hypotéza vysvětlující ANT navozené poškození myokardu pomocí přímého a/nebo nepřímého navození oxidačního stresu (Minotti et al., 2004). V poslední době je stále častěji zmiňována interakce ANT s beta izoformou enzymu TOP2 (TOP2B) vedoucí k poškození DNA kardiomyocytů (Vejpgonsa et al., 2014; Dadson et al., 2020; Sawicki et al., 2021). Další hypotézy poukazují na ANT indukovanou dysregulaci ubikvitin-proteazomového systému (UPS) (Kumarapeli et al., 2005; Dimitrakis et al., 2012), narušení mitochondriální bioenergetiky prostřednictvím poškozením mitochondriální DNA, poruchu homeostázy Ca^{2+} či exprese proteinů myofibril (Renu et al., 2018). V řadě případů ale zůstává nejasné, zdali se zmiňované mechanismy uplatňují i v klinicky relevantních podmínkách (dávkách/koncentracích a schématech podání) a jedná se o primární příčinu vzniku chronické ANT kardiotoxicity nebo spíše o její následek, popřípadě již o důsledek indukce CHSS.

1.2.1.1 Oxidační poškození myokardu

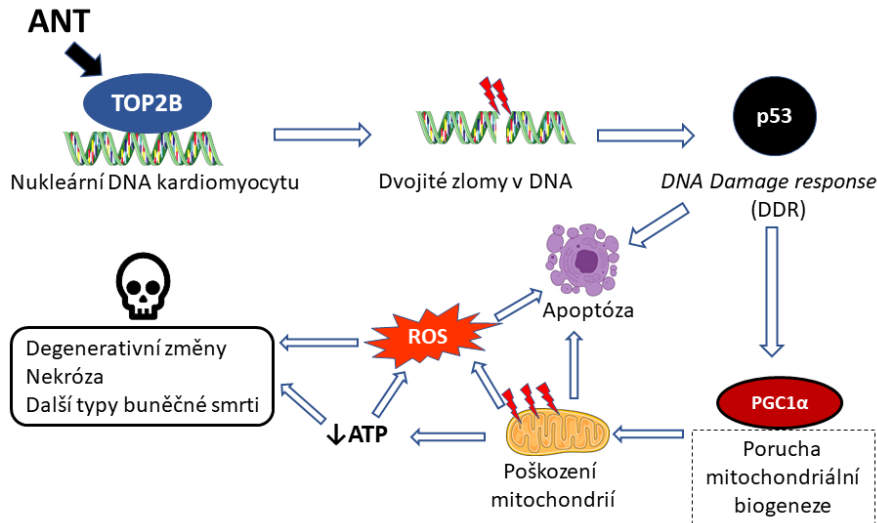
Nejčastěji citovanou teorií mechanismu vzniku chronické ANT kardiotoxicity je hypotéza stavící do popředí význam oxidačního stresu a oxidačního poškození myokardu (Doroshov, 1983; Simunek et al., 2009). ANT mohou navodit oxidační stres prostřednictvím redoxní cyklizace svého aglykonu. Chinonová část aglykonu může být enzymaticky redukována za vzniku semichinonového radikálu, který po interakci s kyslíkem vede k tvorbě superoxidu (Doroshov, 1983). Dále tato molekula dismutuje na peroxid vodíku (spontánně nebo podstatně efektivněji za katalýzy superoxid dismutázou). V přítomnosti volných iontů železa pak mohou vznikat ještě podstatně reaktivnější a toxičtější hydroxylové radikály (Minotti et al., 2004; Simunek et al., 2009), a to jednak z peroxidu vodíku prostřednictvím tzv. Fentonovy reakce a pak také po utvoření komplexu iontů železa s ANT aglykonem. Komplex ANT-Fe je totiž redoxně značně aktivní a může za fyziologických podmínek cyklicky produkovat jak superoxid, tak i přímo hydroxylové radikály. Spojením těchto teorií vznikla tzv. „*ROS and iron*“ hypotéza vzniku ANT kardiotoxicity (obr. 2), která byla následně ještě posílena objevením kardioprotektivního účinku léčiva dexrazoxanu (DEX) (Minotti et al., 2004; Simunek et al., 2009), jež může prostřednictvím svého metabolitu odnímat volné ionty železa z tohoto komplexu.



Obr. 2. Antracyklinem zprostředkovaná tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS) s účastí volných iontů železa (tzv. „ROS and iron hypothesis“). Kruh C aglykonu může být redukován flavoproteinovými enzymy (Fp, zejména komplexem I dýchacího řetězce v mitochondriích), čímž vznikají semichinonové radikály. Ty po interakci s kyslíkem dávají vznik superoxidového aniontu ($O_2^{\bullet-}$), jež následně dismutuje na peroxid vodíku (H_2O_2) za katalýzy superoxidodismutázou (SOD). Volné ionty železa pak mohou katalyzovat tvorbu hydroxylových radikálů ($\bullet OH$) jednak z peroxidu vodíku (H_2O_2) tzv. Fentonovou reakcí a pak také po tvorbě komplexu s aglykonem ANT. Komplex $ANT-Fe^{3+}$ může být redukován enzymaticky či glutathionem (GSH) a při následné reakci s kyslíkem vznikají superoxidové anionty, zatímco po reakci s peroxidem vodíku jsou tvořeny přímo hydroxylové radikály.

1.2.1.2 TOP2B-dependentní poškození myokardu

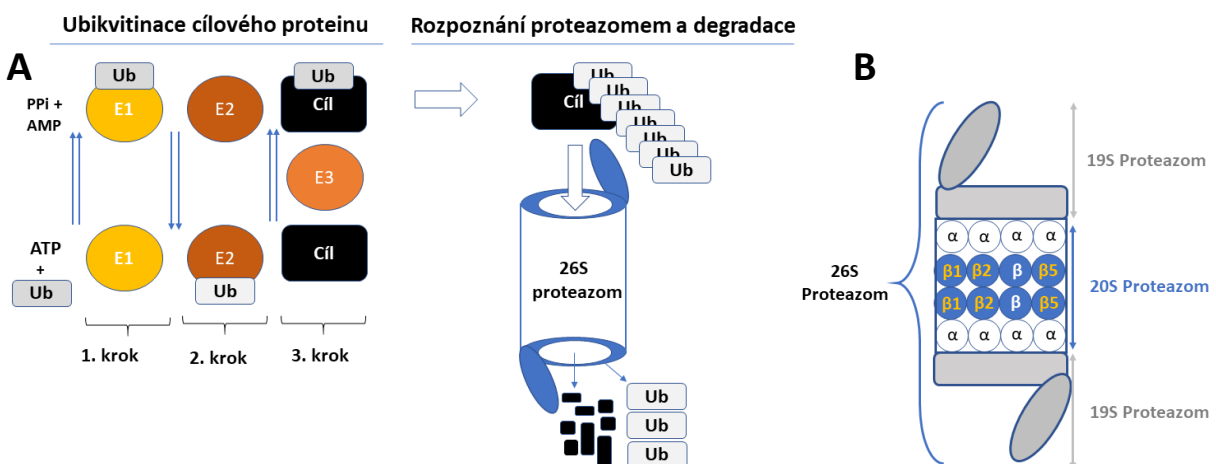
TOP2B je dominantní izoformou enzymu TOP2 v dospělých terminálně diferencovaných kardiomyocytech, přičemž izoforma TOP2A zde není téměř exprimována (Vejjongsang et al., 2014). Souvislost mezi vznikem ANT kardiotoxicity a TOP2B byla nejprve navržena na základě *in vitro* pokusů provedených na buněčné linii H9c2 (Lyu et al., 2007; Deng et al., 2014). Závěry této studie se ukázaly býti spornými především díky zvolenému buněčnému modelu. Nejenže se H9c2 buňky fenotypem značně liší od primárních kardiomyocytů, ale na rozdíl od kardiomyocytů také díky aktivní proliferaci exprimují jak TOP2B, tak i TOP2A (Lenco et al., 2015). Pro pochopení významu interakce ANT s TOP2B byla průlomovou prací studie Zhang et al. (2012) dokazující že, delece genu pro TOP2B v kardiomyocytech dovede zabránit rozvoji ANT kardiotoxicity v kardiomyocytech *in vitro* i *in vivo* na modelu chronické ANT kardiotoxicity na myším modelu. V této studii bylo také ukázáno, že tato interakce vede k poškození DNA kardiomyocytů, aktivaci DDR, apoptotické buněčné smrti a poškození transkripční regulace mitochondriální biogeneze s následným vznikem mitochondriální dysfunkce a sekundárně i k produkci ROS (obr. 3). Ačkoliv se tato teorie dočkala pozitivního přijetí odbornou veřejností, stále zde existuje řada nejasností. Některé zdroje také uvádějí, že aktivace DDR v myokardu není primárně TOP2B dependentní, ale je závislá na ANT indukované tvorbě ROS (Huang et al., 2011).



Obr. 3. Schématické zobrazení hypotézy vzniku antracyklinové (ANT) kardiotoxicity stavící do popředí topoizomerázu II beta (TOP2B). ANT působí v jádře kardiomyocytů na TOP2B jako topoizomerázový jed, což vede k poškození DNA dvojitými zlomy a aktivaci buněčné odpovědi na poškození DNA (DDR), která je koordinována zejména tumor supresorovým genem p53 (p53). Tímto způsobem je navozena apoptotická signalizace ale také transkripční změny vedoucí k poruše mitochondriální biogeneze, jejíž hlavním regulátorem je tzv. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 - alpha* (PGC1 α). Dlouhodobá porucha transkripce mitochondriálních proteinů z nukleární i mitochondriální DNA pak vede k poškození struktury i funkce mitochondrií, sekundární produkci volných kyslíkových radikálů (ROS) a poruše tvorby ATP. Tyto děje pak mohou ústít v degenerativní změny kardiomyocytů a v neprogramovanou i programovanou buněčnou smrt kardiomyocytů. Volně upraveno dle Vejpongsa and Yeh, 2014.

1.2.1.3 Dysregulace proteazomu

V eukaryotických buňkách je ubikvitin-proteazomový systém (UPS, obr. 4) hlavní cestou pro cílenou ATP-dependentní degradaci nežádoucích proteinů, ať už mutovaných, oxidovaných, špatně složených nebo již nepotřebných (Hershko et al., 1998).



Obr. 4. Ubikvitinace proteinu určeného k degradaci, jeho štěpení 26S proteazomem a struktura proteazomu. A. Protein určený k degradaci je označen molekulou ubikvitinu (3stupňový proces katalyzovanými enzymy E1-E3). Polyubikvitinovaný protein je rozpoznán a rozložen prostřednictvím 26S proteazomu (volně upraveno dle Wang and Maldonado, 2006). **B.** Struktura 26S proteazomu.

Tyto proteiny musí být označeny malým proteinem ubikvitinem, aby mohl být vzniklý komplex následně rozpoznáván multienzymovým komplexem – 26S proteazomem. Tzv. ubikvitinace vyžaduje 3 postupné kroky, které jsou katalyzovány 3 různými třídami enzymů (E1 až E3, obr. 4A), k dosažení polyubikvitinovaného produktu. V prvním kroku je ubikvitin enzymaticky aktivován pomocí enzymu E1. Následně je aktivovaný ubikvitin přenesen na enzym E2, se kterým je konjugován. Posledním krokem je přenesení ubikvitinu na cílový protein pomocí enzymu E3 (ubikvitin-protein ligáza). Tento

proces se několikrát opakuje, dokud nevznikne polyubikvitinový řetězec, který je následně rozpoznán regulačními podjednotkami 19S proteazomu (obr. 4B) o tvaru prstence s víkem. Proteolytická kapacita je pak spojena s 20S proteazomem, což je struktura o tvaru dutého válce, a jeho podjednotkami $\beta 1$, $\beta 2$ a $\beta 5$ s aktivitou podobnou kaspáze (tzv. *caspase-like*, C-L), trypsinu (tzv. *trypsin-like*, T-L) a chymotrypsinu (tzv. *chymotrypsin-like*, CT-L). Podjednotka $\beta 5$ spojená s CT-L aktivitou je primárním cílem inhibitorů proteazomu užívaných v protinádorové léčbě (Dou et al., 2014). Protein určený k degradaci je při průchodu proteazomem 20S štěpen na jednotlivé oligopeptidy.

Kardiomyocyty jsou fyziologicky trvale vystaveny intenzivní zátěži, která zvyšuje riziko poškození mnoha proteinů klíčových pro zajištění jejich adekvátní struktury a funkce (Christians et al., 2012). Insuficience UPS vede k nedostatečné kontrole kvality proteinů, což může samo o sobě vyústit v poškození kardiomyocytů, mj. i tzv. proteotoxicitou kumulujících se agregátů špatně složených proteinů, a/nebo přímo v jejich buněčnou smrt (Shukla et al., 2019; Maejima, 2020). Efektivní kontrola kvality proteinů díky UPS je pro kardiomyocyty zásadní, protože tyto terminálně diferencované buňky vykazují minimální schopnost regenerace, je tedy nutné zajistit jejich dlouhodobé přežití, což je do značné míry zajištěno i kontinuální selektivní obměnou poškozených proteinů prostřednictvím UPS (Maejima, 2020). Toxické poškození myokardu ANT představuje výrazný zásah do proteinové homeostázy myokardu a není vyloučeno, že by tento proces mohl mít podíl v patogenezi degenerativních změn kardiomyocytů navozených právě ANT (Kumarapeli et al., 2005; Dimitrakis et al., 2012). Z dostupných informací také vyplývá, že ANT mohou významně zasahovat do exprese a funkce jednotlivých složek UPS v myokardu – například zvyšují expresi E3 ligáz a proteazomových podjednotek a zvyšují proteolytickou aktivitu proteazomu (Kumarapeli et al., 2005; Liu et al., 2008; Sterba et al., 2011; Sishi et al., 2012).

1.2.2 Kombinace antracyklinů s dalšími potenciálně kardiotoxickými léčivy

Riziko vzniku ANT kardiotoxicity je také významně kodeterminováno kombinací s dalšími protinádorovými léčivy s toxickým účinkem na myokard, a to i těch, které mají samy o sobě kardiotoxický potenciál spíše omezený. Z klasických chemoterapeutik byly ze zvýšení rizika kardiotoxicity podezřívány např. taxany (Minotti et al., 2004). Významnější se nakonec ukázala kombinace ANT s některými biologicky cílenými léčivy, u kterých se riziko kardiotoxicity původně vůbec nepředpokládalo. Překvapivě výrazné zvýšení srdeční dysfunkce bylo pozorováno v prvních studiích při současném podávání ANT s trastuzumabem, což je monoklonální protilátka protilátka proti extracelulární části lidského epidermálního růstového faktoru (HER2). Tento problém byl z velké části vyřešen sekvenčním podáváním těchto léčiv, díky čemuž riziko srdeční dysfunkce kleslo na klinicky přijatelnou úroveň (Ewer et al., 2015). Nicméně existují obavy, že riziko zvýšení kardiotoxického potenciálu ANT by se mohlo týkat i dalších biologicky cílených léčiv, které byly asociovány s rizikem srdeční dysfunkce.

1.2.2.1 Kombinace s proteazomovými inhibitory

Proteazomové inhibitory (PI) jsou moderní biologická léčiva, která jsou indikována převážně v léčbě mnohočetného myelomu (MM) a lymfomu z plášťových buněk. V rychle dělících se nádorových buňkách selektivní inhibice proteazomu vede k vyvolání buněčné smrti prostřednictvím mnoha mechanismů (Wang et al., 2021). Inhibice NF- κ B vede k inhibici jeho transkripční aktivity a down-regulaci mnoha proneoplastických drah. Aktivace dráhy JNK vede k aktivaci kaspáz a indukci apoptózy. Apoptotická signalizace je též podpořena inhibicí degradace proapoptotických proteinů (Bim, BID a Bax), zvýšením exprese proteinu NOXA a indukci stresu endoplazmatického retikula.

PI jsou v uvedených indikacích velmi účinné a prodlužují dobu přežití pacientů bez progresu onemocnění i jejich celkové přežití. V závislosti na pokročilosti onemocnění se volí ze zástupců této skupiny léčiv – na počátku převážně reverzibilní borteomib, při progresi ireverzibilní karfilzomib či nověji perorálně podávaný ixazomib (Wang et al., 2021).

Navzdory zásadní roli UPS ve všech buňkách v organismu jsou klinicky užívané PI poměrně dobře tolerovány s omezeným spektrem závažných nežádoucích účinků (Wang et al., 2021). Nicméně tato skupina léčiv je spojována se **zvýšeným výskytem kardiovaskulárních nežádoucích účinků, včetně kardiotoxicity a dysfunkce levé komory (LK) typu II** (Agunbiade et al., 2019). Celkové riziko toxického poškození myokardu a navození srdečního selhání je stále předmětem debat, stejně tak do jaké míry se toto riziko liší u jednotlivých PI a jaké faktory predeterminují pacienty k této toxicitě (Agunbiade et al., 2019).

Vliv experimentálních i klinicky užívaných PI na myokard byl studován v několika experimentálních studiích. Opakované podávání bortezomibu navodilo srdeční dysfunkci u potkana (Nowis et al., 2010) a negativní vliv na myokard byl popsán i u některých experimentálně užívaných PI (Tang et al., 2010; Herrmann et al., 2013). Na druhou stranu experimentálně podávané PI vykazovaly i určité protektivní účinky – např. vůči ischemicko-reperfúznímu poškození myokardu či tlakovému přetížením LK (Campbell et al., 1999; Pye et al., 2003). V *in vitro* studiích bortezomib vykazoval významnou toxicitu na H9c2 myoblastech a kardiomyocytech izolovaných z komorového myokardu novorozeného potkana (NVCN) (Nowis et al., 2010). Následně byla také dalšími autory popsána významná toxicita jak bortezomibu, tak i karfilzomibu *in vitro* u NVCN (Hasinoff et al., 2017). Překvapivě ale nebyla žádná významná toxicita bortezomibu pozorována na kardiomyocytech izolovaných z myokardu dospělého potkana (AVCN) (Nowis et al., 2010).

U rezistentních/relabujících forem onemocnění se ukázala účinnou **kombinační léčba PI s ANT** (např. DOX či DAU) (Sonneveld et al., 2008; Bertaina et al., 2017; Terwilliger et al., 2017). Protože se jedná o kombinaci dvou protinádorových léčiv s potenciálním kardiotoxickým potenciálem, kardiovaskulární bezpečnost této kombinace si zasluhuje pozornost, tím spíše, že dle dostupných informací se UPS patrně podílí na odstranění poškozených myokardiálních proteinů při rozvoji ANT kardiotoxicity (Kumarapeli et al., 2005; Dimitrakis et al., 2012). Nebylo možné vyloučit, že by PI mohly působit přinejmenším aditivně k ANT kardiotoxicitě, nebo dokonce, že by tuto kardiotoxicitu mohly potencovat. Z publikovaných klinických studií ovšem ke kardiovaskulární bezpečnosti této kombinace není dostatek informací. Obecně se pouze doporučuje obezřetnost a případně upřednostnění lipozomálních forem ANT chemoterapeutik. V experimentálních podmínkách bylo zjištěno, že v embryonálních kardiomyocytech inhibice CT-L aktivity asociované s podjednotkou $\beta 5$, která je cílem pro klinicky užívané PI, vede ke zvýšení toxicity ANT. V dalších studiích provedených na NVCN bylo též pozorované zvýšení cytotoxicity ANT v kombinaci s PI (Nowis et al., 2010; Hasinoff et al., 2017). Ale nejsou k dispozici žádná data ohledně cytotoxicity této kombinace vůči kardiomyocytům izolovaným z myokardu dospělých zvířat, navzdory tomu, že se tato kombinace klinicky používá téměř výhradně u dospělých (převážně starších) pacientů. K dispozici také nebyla žádná studie, která by zkoumala vliv PI na rozvoj chronické ANT kardiotoxicity na zavedeném experimentálním *in vivo* modelu u dospělých pokusných zvířat.

1.3 Opatření využívaná k omezení antracyklinové kardiotoxicity

Toxické poškození myokardu ANT je do značné míry ireverzibilní a obtížně odpovídá na léčbu, proto je nejvýhodnější toxicitě předcházet. Mezi rutinně uplatňovaná opatření patří **monitorování pacienta** a omezení celkové **kumulativní dávky ANT** (Ewer et al., 2015). Nicméně je známo, že neexistuje naprosto „bezpečná“ kumulativní dávka ANT, protože každé podání těchto léčiv představuje určité subklinické poškození myokardu (Ewer et al., 2015), které se ovšem může klinicky projevit na kardiovaskulární morbiditě a mortalitě pacientů dlouhodobě přežívajících nádorové onemocnění. Další snahou o snížení rizika ANT kardiotoxicity je využití lékových forem **pro cílenou distribuce ANT** do nádoru, čímž se sníží expozice myokardu ANT. V současnosti jsou klinicky dostupné LP s lipozomálně enkapsulovaným DOX a DAU. (Minotti et al., 2004), které jsou ale schváleny jen v některých z mnoha indikací ANT.

1.3.1 Farmakologická kardioprotekce vůči antracyklinové kardiotoxicitě

Ačkoliv v této oblasti bylo publikováno velké množství experimentálních prací s nadějnými pozitivními výsledky, jejich přenositelnost do klinicky relevantnějších podmínek se ukázala být problematická (Štěrba et al., 2013).

1.3.1.1 Antioxidanty a chelátory železa

Z antioxidantů byly mezi prvními látkami studován vitamín E a acetylcystein. Obě látky vykazovaly signifikantní kardioprotektivní účinky na akutních *in vivo* modelech s užitím jedné supraterapeutické dávky ANT, ale na klinicky relevantnějších chronických experimentálních modelech vykazovaly tyto látky velmi malou či dokonce žádnou kardioprotekci (shrnuto ve (Štěrba et al., 2013)). Absence významného kardioprotektivního potenciálu vyplynula také z prospektivních randomizovaných kontrolovaných studií (RCT) (Štěrba et al., 2013). Podobně byla studována řada přírodních či semisyntetických flavonoidů, ale jen málo z nich bylo hodnoceno na modelu chronické ANT kardiotoxicity. Jednou z mála výjimek byl 7-monohydroxyethyl-rutosid, u kterého byl nejdříve popsán významný protektivní účinek, ale následně bylo zjištěno, že tento účinek není dlouhodobý v experimentu ani v klinických podmínkách (Bruynzeel et al., 2007a; Bruynzeel et al., 2007b).

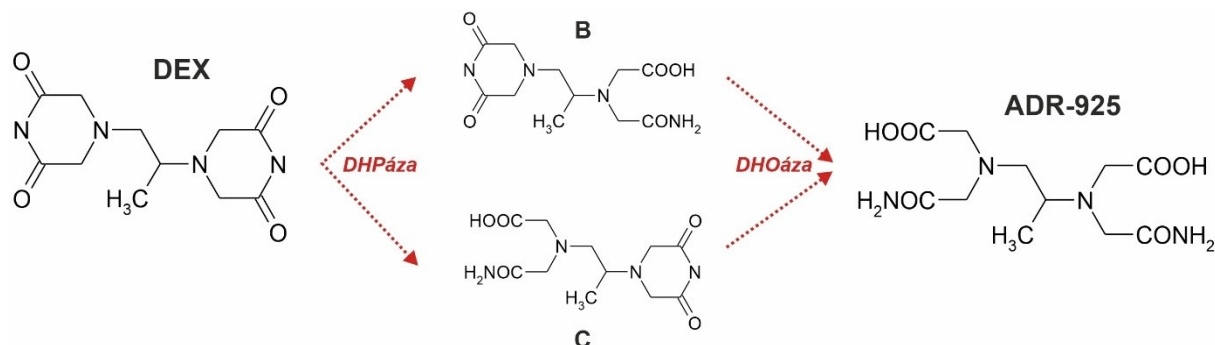
Z chelatačních látek byl zkoumán kardioprotektivní účinek u několika klinicky dostupných selektivních intracelulárních chelátorů volných iontů železa, které užívají u onemocnění spojených s přetížením organismu železem jako je např. β -talasemie. Kromě dostatečné selektivity je pro tato léčiva důležitá stabilita vzniklých komplexů se železem a jejich nízká redoxní aktivita, což znamená, že takto vázané ionty železa nemohou participovat na tvorbě ROS. Deferoxamin a deferipron, což jsou klinicky užívaná léčiva splňující tyto požadavky, vykazovaly určité zajímavé kardioprotektivní účinky *in vitro* a na modelech akutní ANT kardiotoxicity *in vivo*, ale jejich hodnocení na zavedených a DEX-validovaných modelech chronické ANT kardiotoxicity ale kardioprotektivní potenciál nepotvrdilo (Herman et al., 1994; Popelova et al., 2008). Zatímco v případě deferoxaminu by mohl problém souviset s hydrofilním charakterem molekuly a nízkou penetrací do kardiomyocytů, tento argument nemůže vysvětlit absenci účinku u deferipronu, který dobře proniká i do subcelulárních kompartmentů včetně mitochondrií. Částečný kardioprotektivní účinek (ovšem s paradoxní dávkovou) závislostí byl pozorován u experimentálních aroylhydrazonových chelátorů železa (shrnuto v Štěrba et al. (2013)).

1.3.1.2 Dexrazoxan (DEX, ICRF-187)

Dexrazoxan (DEX; ICRF-187) je jediným léčivem s jasně prokázaným kardioprotektivním účinkem vůči klinicky relevantním formám ANT kardiotoxicity jak v různých experimentálních modelech (*in vitro/in vivo*), tak v klinických studiích (Štěrba et al., 2013). Účinky DEX byly úspěšně reprodukovány v různých laboratořích s užitím celé škály různých experimentálních modelů zahrnující různá *species* (myš, potkan, křeček, králík, pes). Bylo zjištěno, že pro kardioprotektivní účinek je důležité podání DEX před/nebo nejpozději spolu s ANT a optimální poměr dávek DEX a ANT je 10-20:1 (Cvetkovic et al., 2005; Štěrba et al., 2013). Kardioprotektivní účinek DEX byl potvrzen v mnoha klinických studiích nezávisle na věku, pohlaví, typu karcinomu a léčebnému schématu (Reichardt et al., 2018). Díky prevenci nástupu ANT toxicity v myokardu také DEX poskytuje dlouhotrvající kardioprotektivní účinek (Jirkovský et al., 2013; Reichardt et al., 2018).

DEX je tradičně považován za proléčivo, které je v organismu metabolizováno hydrolýzou obou dioxopiperazinových cyklů na aktivní metabolit ADR-925 (obr. 6) (Hasinoff et al., 1998). Uvedené cykly jsou hydrolyzovány dihydropyrimidinázou a dihydroorotázou se vznikem dvou hydrolytických meziproductů (B a C). Předpokládá se, že finální metabolit ADR-925 chrání kardiomyocyty před ANT kardiotoxicitou prostřednictvím vyvážení volných iontů železa a jejich odnětí z komplexu s ANT (Hasinoff et al., 1998). Tento mechanismus je tradičně uváděn v odborné literatuře (Cvetkovic et al., 2005; Štěrba et al., 2013) a lze ho nalézt i v platných SmPC léčivého přípravku obsahujících dexrazoxan (SmPC Cyrdanax®). Nicméně je třeba podotknout, že v literatuře pro potvrzení této

teorie chybí přímý důkaz, a proto nelze vyloučit, že by mohlo jít o náhodnou koincidence. Objevily se také pochybnosti, jestli je DEX proléčivem, jak se uvádí v literatuře (Hasinoff et al., 2007). Také je třeba také zmínit, že na rozdíl od chelátorů železa používaných u onemocnění spojených s přetížením organismu železem (viz výše) je komplex ADR-925 s ionty železa stále významně redoxně aktivní (Thomas et al., 1993). V neposlední řadě tento mechanismus nekoresponduje s nověji navrženou teorií ANT kardiotoxicity, která předpokládá, že primárním příčinou je interakce ANT s TOP2B a úloha oxidačního stresu je pouze sekundární. Ačkoliv některé *in vitro* práce (Lyu et al., 2007; Deng et al., 2014) spojovaly kardioprotektivní účinek DEX s inhibicí TOP2B, tyto poznatky byly získány pouze na proliferujících H9c2 myoblastech, které na rozdíl od terminálně diferencovaných kardiomyocytů ve skutečnosti exprimují obě izoformy TOP2 (TOP2A i TOP2B), přičemž obě jsou významně ovlivněny ANT. Spojení kardioprotekce s TOP2B tedy bylo stále velmi nejisté. Někteří jiní autoři pak význam TOP2B pro kardioprotekci DEX přímo zpochybňují a navrhují alternativní mechanismy účinku (McCormack, 2018).



Obr. 6. Chemická struktura dexrazoxanu (DEX) a jeho bioaktivace na chelatačně aktivní metabolit ADR-925. B, C – hydrolytické meziprodukty vzniklé otevřením jednoho cyklu. DHPáza – dihydropyrimidináza, DHOáza – dihydroorotáza.

Přestože kardioprotektivní účinky DEX jsou doloženy mnoha klinickými studii, toto léčivo se v současné klinické praxi užívá jen velmi omezeně. Důvodem je zejména obava z nežádoucích účinků. DEX může v kombinaci ANT navodit myelosupresi (Reichardt et al., 2018). Dalšími zmiňovanými potenciálními nežádoucími účinky DEX je riziko ovlivnění protinádorové účinnosti a riziko vzniku sekundárních malignit. Obavy z těchto nežádoucích účinků a související předběžná opatrnost měly na osud klinického užití DEX velký dopad, ačkoliv pro významnou asociaci těchto komplikací s DEX neexistují přesvědčivé důkazy (Reichardt et al., 2018; Simmons, 2019). V současnosti podávání DEX doporučeno jen u dětí i dospělých léčených ANT pouze po překroční kumulativní dávky (300 mg/m² u DOX), což vede k velmi malému užití v klinické praxi (vyšší kumulativní dávky ANT se dnes užívají jen u malého procenta pacientů). Navzdory důkazům i recentním odborným diskusím zůstávají tato doporučení pro klinickou praxi nezměněna (Simmons, 2019).

1.3.1.3 Léčiva používaná k neurohormonální blokádě u CHSS

V poslední dekádě se zájem odborné veřejnosti postupně přesunul ke klinicky užívaným léčivům, jež lze bezpečně použít i u pacientů léčených ANT. Největší pozornost byla věnována léčivům užívaných pro neurohormonální blokádu při léčbě CHSS typu HFrEF (srdeční selhání se sníženou ejekční frakcí) – **inhibitorům angiotenzin konvertujícího enzymu (ACEi), blokátorům receptorů AT1 pro angiotensin II (sartanům), β-blokátorům a antagonistům mineralokortikoidních receptorů.** Tato léčiva jsou pilířem terapie HFrEF bez ohledu na jeho etiologii, včetně CHSS navozeného podáním ANT (Zamorano et al., 2016). Jejich komplexní farmakologické účinky, které zřejmě zahrnují i inhibici oxidačního stresu v myokardu, zánětu a prevenci patologické remodelaci myokardu, vzbudily zájem o využití jejich potenciálu jednak v sekundární prevenci ANT kardiotoxicity (tj. při nasazení v průběhu či po dokončení chemoterapie ANT při detekci prvních známek kardiotoxicity), tak i v primární prevenci (tj. podání před první dávkou ANT a pokračování léčby po celou dobu chemoterapie ANT).

Americká společnost pro klinickou onkologii (ASCO) ve svých doporučeních pro prevenci a monitorování srdeční dysfunkce u dospělých pacientů léčených ANT (Armenian et al., 2017) zmiňuje možnost užití těchto léčiv u pacientů s vysokým rizikem rozvoje srdeční dysfunkce, ačkoliv připouští, že pro toto doporučení zatím nejsou k dispozici dostatečné důkazy. Podobně recentní přehledová práce zabývající se pacientkami s karcinomem prsu léčených ANT (Brown et al., 2020) uvádí, že i když některé malé klinické studie naznačují, že ACEi a β -blokátory by mohly být účinné v primární prevenci ANT kardiotoxicity, z dostupných dat nelze zatím formulovat jednoznačný závěr.

Ze skupiny β -blokátorů byly na experimentálních modelech ANT kardiotoxicity získány poměrně zajímavé výsledky u karvedilolu (Matsui et al., 1999). Toto léčivo je známo svými přímými antioxidačními účinky, které byly dávány do souvislosti s jeho kardioprotektivním potenciálem vůči ANT kardiotoxicitě. Klinické studie s β -blokátory vedly ke smíšeným výsledkům. První pilotní studie, která využila karvedilol pro primární prevenci ANT kardiotoxicity u pacientů s relativně vysokými kumulativními dávkami ANT zaznamenala výrazný signifikantní benefit z hlediska prevence systolické dysfunkce (hlavním sledovaným parametrem byla LVEF) (Kalay et al., 2006). Naproti tomu v novější studii s větším souborem pacientů nebyl u tohoto léčiva zaznamenán žádný benefit (Avila et al., 2018) a obdobné výsledky byly popsány ve studii s jiným zástupcem této skupiny - metoprololem (Gulati et al., 2016).

ACEi jako kardioprotektiva vůči chronické ANT kardiotoxicitě. ACEi jsou po dlouhou dobu užívány u pacientů s ANT navozenou srdeční dysfunkcí (Zamorano et al., 2016). Studie Cardinale et al. (2006) ukázala, že by tato léčiva mohla být účinná i v sekundární prevenci, a to u pacientů vykazujících subklinické poškození myokardu. V této studii byl hodnocen účinek enalaprilu u pacientů, kteří podstoupili léčbu vyššími dávkami ANT a bylo u nich zjištěno zvýšení srdečního troponinu I v plazmě (léčba enalapilem byla zahájena měsíc po chemoterapii a trvala 1 rok). Podávání enalaprilu u těchto pacientů snížilo koncentrace srdečního troponinu I v plazmě a zabránilo poklesu systolické funkce LK. Tyto velmi zajímavé výsledky vyvolaly značnou odezvu a podnítily hypotézu, že by ochranné účinky ACEi na myokard mohly být využitelné již v primární prevenci ANT-indukované kardiotoxicity s cílem zabránit či významně omezit samotné navození této toxicity.

Hypotéza o potenciálním kardioprotektivním účinku ACEi (či sartanů) v primární prevenci vůči chronické ANT kardiotoxicitě byla testována v několika RCT, avšak s poměrně heterogenními výsledky. Nedávné meta-analýzy těchto klinických dat našly určitý pozitivní protektivní vliv ACEi vůči ANT navozené systolické dysfunkci (Vaduganathan et al., 2019), avšak četná omezení a problémy zjištěné v těchto studiích nedovolily vyvodit silné závěry pro klinickou praxi. Rozdíly v primárních studovaných parametrech (většinou LVEF) byly v těchto studiích mezi studovanými skupinami často velmi malé (např. pouze 1,8 % ve studii PRADA, (Gulati et al., 2016)), poměrně variabilní, a ne vždy statisticky signifikantní. Jednotlivé studie se také mezi sebou podstatně lišily populačními charakteristikami (včetně celkově podané kumulativní dávky ANT či kombinacemi s dalšími kardiotoxickými léčivy jako je např. trastuzumab). Následné sledování pacientů po chemoterapii (FU, *follow up*) bylo typicky časově velmi omezené a ACEi zde byly podávány až do konce FU. Poslední zmiňovaný fakt mohl mít vliv na zjištěný rozdíl mezi skupinami při echokardiografickém vyšetření systolické funkce LK, což také bylo diskutováno v odborné literatuře (van der Meer et al., 2016). Z provedených studií nebylo zřejmé, zdali potenciální přínos zjištěný v některých těchto studiích bude zachován i po vysazení ACEi. Nebylo také jasné, zda ACEi mohou skutečně účinně zabránit navození toxicity ANT a tím zajistit robustní a trvalou kardioprotekci, nebo pouze modulují obecnější patofyziologické procesy uplatňující se na nižších úrovních a tím inhibují progresi již navozeného poškození myokardu směrem k srdečnímu selhání. V současnosti se odborná veřejnost přiklání k teorii, že primárním krokem patogeneze ANT kardiotoxicity je TOP2B-dependentní poškození DNA kardiomyocytů, ale není zřejmé, jestli ACEi mohou mít na tyto iniciační mechanismy poškození myokardu nějaký vliv. V této oblasti bylo také provedeno relativně velké množství experimentálních studií (shrnuje (Sobczuk et al., 2020)). Ty ale vedly k velmi heterogenním výsledkům a z dostupných dat nebylo možné nalézt odpovědi na výše uvedené otázky.

2 Cíle disertační práce

Cíle této disertační práce byly následující:

1. Experimentální studium kardiotoxického potenciálu dvou klinicky užívaných PI (reverzibilního bortezomibu a ireverzibilního karfilzomibu) se zaměřením na jejich kombinaci s ANT a ovlivnění rizika rozvoje srdečního selhání. Studovány byly také mechanismy těchto účinků zejména s ohledem na aktivitu proteazomového systému a buněčnou signalizaci spojenou s poruchou proteinové homeostázy.
2. Experimentální studium kardioprotektivních účinků ACEi perindoprilu v primární prevenci chronické ANT kardiotoxicity na modelu u králíka se zaměřením na účinnost této intervence při následném sledování pokusných zvířat po chemoterapii s/bez dalšího podávání perindoprilu. Studovány byly také molekulární mechanismy s důrazem na ovlivnění ANT navozené DDR signalizace v myokardu při porovnání s klinicky užívaným DEX.
3. Experimentální hodnocení mechanismů účinku kardioprotektiva DEX, zejména s ohledem na úlohu jeho chelatačně aktivního metabolitu ADR-925 a interakci parentní látky (a jejích metabolitů) s enzymem TOP2B.

3 Výsledky

3.1 Komentáře k publikovaným pracím

Publikace č. 1:

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., Štěrbá M. *In vitro and in vivo investigation of cardiotoxicity associated with anticancer proteasome inhibitors and their combination with anthracycline. Clin Sci (Lond).* 2019 Aug 27;133(16):1827-1844. Přijato k publikaci 13. 8. 2019. $IF_{2019} = 5,223$ (Q1); $AIS_{2019} = 1,327$ (Q1)

Tato práce se zabývala studiem kardiotoxicity PI užívaných v léčbě MM, a to reverzibilně působícího bortezomibu a ireverzibilního karfilzomibu. Cytotoxicita obou zkoumaných PI byla hodnocena *in vitro* na kardiomyocytech izolovaných z myokardu novorozeného a dospělého potkana (NVCM a AVCM), a to jak při expozici buněk samotným PI, tak i při jejich kombinaci s klinicky relevantními koncentracemi daunorubicinu (DAU) jako modelového ANT. S užitím NVCM byla pozorována cytotoxicita obou PI v koncentracích kolem jejich maximální koncentrace v plazmě a také statisticky významné zvýšení cytotoxicity DAU. Výsledky získané na AVCM byly ale odlišné. Bortezomib v terapeuticky relevantních koncentracích nenavodil statisticky signifikantní cytotoxicitu, zatímco karfilzomib ano. Ještě důležitější bylo ale zjištění, že ani jeden ze studovaných PI signifikantně nezvýšil cytotoxicitu navozenou DAU u AVCM, a to navzdory tomu, že inhibice *chymotrypsin-like* (CT-L) aktivity proteazomu, která je hlavním cílem pro oba PI, byla inhibována u AVCM ještě výrazněji než u NVCM. Mimo to byla u AVCM inhibována i *trypsin-like* T-L aktivita proteazomu, což nebylo významné u NVCM. Zajímavým zjištěním z těchto pokusů také bylo, že bazální CT-L a T-L aktivity proteazomu se mezi těmito typy primárních kardiomyocytů podstatně liší.

Na *in vivo* modelu chronické ANT kardiotoxicity navozené opakovaným podáváním DAU dospělým samcům králíka (3 mg/kg, i.v., 1x týdně po 10 týdnů) bylo studováno, jestli bude mít maximálně tolerovaná dávka obou PI v kombinaci s DAU významný vliv na závažnost ANT kardiotoxicity. Z výsledků plyne, že kombinace obou PI s DAU neměla významný vliv na funkční, morfologické, biochemické a molekulární aspekty chronické ANT kardiotoxicity. V myokardu LK zvířat, kterým byl chronicky podáván DAU, byly zjištěny významné změny molekulárních markerů poruchy proteinové homeostázy (např. zvýšená exprese GRP78 a HSP70 či zvýšené zastoupení polyubikvitinovaných proteinů). Nicméně kombinace DAU s oběma PI v chronickém experimentu na tyto změny neměla žádný významný vliv. Chronická ANT kardiotoxicita byla též spojená s indukcí T-L aktivity proteazomu v myokardu LK, ale kombinace DAU s PI tento nálezný neovlivnila. Stanovení aktivity proteazomu v myokardu LK 2 h po akutním podání obou PI králíkům potvrdilo významnou inhibici CT-L aktivity, která je hlavním cílem pro oba PI, zatímco vliv na T-L aktivitu nebyl významný. Nicméně 24 h po podání obou PI se CT-L aktivita proteazomu v myokardu vrátila k původním hodnotám. Relativně krátkodobý účinek obou PI na aktivitu proteazomu v myokardu a absence jejich účinku na T-L aktivitu proteazomu, která je u ANT kardiotoxicity významně indukována, by mohly vysvětlit proč, oba PI nezvyšují riziko ANT kardiotoxicity a CHSS na experimentálním modelu u králíka.

Podíl studenta na komentované práci: Studentka je první autorkou této publikace a spolu se školitelem (doc. Štěrbou) měla hlavní podíl na designu experimentů realizovaných v této publikaci, interpretaci a zpracování většiny výsledků, jakož i sepisování manuskriptu. Z hlediska realizace experimentů měla klíčový podíl na provádění většiny *in vivo* experimentů v této práci (práce s pokusnými zvířaty, podávání zkoumaných léčiv, odběry vzorků pro další analýzy), dále pak na invazivním hodnocení funkce LK a molekulárních analýzách z myokardu (stanovení aktivity proteazomu ve vzorcích z *in vitro* a *in vivo* experimentů, stanovení exprese na úrovni mRNA metodou qRT-PCR a na úrovni proteinu metodou Western Blot).

Publikace č. 2:

Pokorná Z., Kollárová-Brázdová P., Lenčová-Popelová O., Jirkovský E., Kubeš J., Mazurová Y., Adamcová M., Holečková M., Palička V., Šimůnek T., Štěrba M. 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)*. 2022 Jan 14;136(1):139-161. Přijato k publikaci 8. 12. 2021. $IF_{2020} = 6,124 (Q1)$; $AIS_{2020} = 1,568 (Q1)$

V této práci byly experimentálně hodnoceny kardioprotektivní účinky ACEi perindoprilu podávaného v primární prevenci chronické ANT kardiotoxicity (tj. při jeho podávání před první dávkou ANT a dále v průběhu celé chemoterapie). Tyto účinky byly hodnoceny na *in vivo* modelu chronické ANT kardiotoxicity u králíka. Tato studie byla zaměřena zejména na hodnocení případného kardioprotektivního benefitu z podávání ACEi v období následného sledování zvířat po ukončení chemoterapie ANT (3-10 týdnů, tzv. *follow up* – FU). Chronická ANT-kardiotoxicita byla indukována DAU (3 mg/kg/týden po dobu 10 týdnů). Perindopril byl nasazen 1 týden před první dávkou DAU a podáván *p.o.* v klinicky relevantních dávkách (0,05 mg/kg/den) po celou dobu chronického podání DAU v pitné vodě. Týden po poslední dávce DAU byl ve skupině se současným podáváním perindoprilu zaznamenán výrazný benefit v porovnání se skupinou se samotným DAU. Podání perindoprilu zcela zabránilo předčasným úhynům navozeným DAU, zvýšení plazmatických hladin srdečního troponinu T (cTnT) a předešlo vzniku či významně omezilo systolickou dysfunkci LK indukovanou DAU. Podání perindoprilu též efektivně snížilo degenerativní změny v kardiomyocytech navozené DAU. Protektivní účinek perindoprilu do značné míry korespondoval s inhibicí DAU navozených změn v expresi proteinů zánětlivé reakce, proteinů důležitých pro hospodaření s vápníkem a volnými kyslíkovými radikály.

Zjištěný přínos podávání perindoprilu byl ale významně nižší při následném 3týdenním sledování pokusných zvířat po ukončení podávání DAU. Po vysazení perindoprilu došlo k významnému vzestupu koncentrací cTnT v plazmě, rozvoji degenerativních změn v kardiomyocytech a poklesu systolické funkce LK. Většina molekulárních parametrů studovaných v myokardu LK se též přiblížila výsledkům pozorovaným ve skupině se samotným DAU. Zvýšení dávky perindoprilu (na 0,1 mg/kg/den) nemělo na změnu v FU žádný pozitivní vliv. Při delším (10týdenním) FU bez podávání léčiv došlo významné progresi systolické dysfunkce LK, což bylo provázeno závažnějším morfologickým poškozením myokardu, známkami oběhového městnání jakož i mortalitou související s CHSS. Následné podávání perindoprilu i v období FU tento trend nezvrátilo, ale zabránilo rozvoji nejtěžších forem CHSS a morfologického poškození myokardu, což vysvětlilo absenci předčasných úhynů. Tato data ukázala, že protektivní účinek perindoprilu vůči chronické ANT kardiotoxicitě není trvalý, což jasně kontrastuje s účinkem DEX, který v přechodí studii naší skupiny na stejném modelu s 10týdenním FU bez další následné léčby navodil velmi robustní a dlouhotrvající ochranu bez jakékoliv progresu ve FU.

Proto byly studovány také mechanismy, které by mohly vysvětlit rozdílné výsledky kardioprotekce vůči ANT kardiotoxicitě pomocí ACEi a DEX. Na rozdíl od DEX perindopril ani jeho aktivní metabolit neměl žádný vliv na aktivitu TOP2B enzymu *in vitro*. V kontrastu s účinkem DEX perindopril také významně nechránil myokard *in vivo* před DAU navozenou a p53-zprotdkovanou DDR signalizací v myokardu králíka. Absence účinku perindoprilu na TOP2B-depedentní poškození DNA a následnou DDR v myokardu by mohla vysvětlit proč toto léčivo nenavozuje dlouhodobě účinnou protekci myokardu před ANT kardiotoxicitou.

Podíl studenta na komentované práci: Studentka je prvním autorem této publikace a spolu se školitelem (doc. Štěrba) měla hlavní podíl na designu experimentů realizovaných v této publikaci, interpretaci a zpracování většiny výsledků a sepisování manuskriptu. Z hlediska realizace experimentů měla klíčový podíl na provádění chronických *in vivo* experimentů v této práci (práce s pokusnými zvířaty, podávání zkoumaných léčiv, odběry vzorků pro další analýzy), dále pak na invazivním hodnocení funkce LK a molekulárních analýzách myokardu z těchto experimentů (stanovení exprese na úrovni mRNA metodou qRT-PCR a proteinu metodou Western Blot).

Publikace č. 3:

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., Štěřbová-Kovaříková P., Štěřba M. Clinically translatable prevention of anthracycline cardiotoxicity by dexrazoxane is mediated by topoisomerase II beta and not metal chelation. *Circ Heart Fail.* 2021; Oct 14:e008209. Přijato k publikaci 17. 8. 2021. IF₂₀₂₀ = 8,846 (Q1); AIS₂₀₂₀ = 3,335 (D1/Q1)

Tato práce byla zaměřena na objasnění mechanismů účinku DEX. Nejdříve byla zkoumána úloha jeho chelatačního metabolitu ADR-925 prostřednictvím farmakokineticky řízeného studia jeho kardioprotektivních účinků po exogenním podání *in vitro* a *in vivo*. Z výsledků těchto experimentů vyplynulo, že exogenní podání ADR-925 navozuje stejné nebo vyšší koncentrace této látky v NVCM (*in vitro*) i v myokardu králíka (*in vivo*), než jaké vznikají přirozenou metabolickou přeměnou po podání klinicky užívaných dávek DEX. Na rozdíl od podání parentního DEX, ovšem exogenní podání ADR-925 nemělo žádné protektivní účinky vůči ANT kardiotoxicitě. Infuzní podání ADR-925 králíkům v kombinaci s DAU nemělo na rozdíl od podání DEX žádný vliv na systolickou dysfunkci LK, toxické poškození myokardu a předčasné úhyny v důsledku CHSS navozené podáváním DAU. Ani zvýšení expozice myokardu podáním další dávky ADR-925 po každé aplikaci DAU nemělo žádný významný vliv na rozvoj ANT kardiotoxicity. Výsledky těchto experimentů tedy zpochybňují tradiční hypotézu vysvětlující kardioprotektivní účinky DEX chelatační aktivitou jeho metabolitu ADR-925. Další experimenty pak také ukázaly, že je velmi nepravděpodobné, aby tento účinek byl spojen s jeho přechodnými metabolity B a C, které mají hydrolyticky otevřený jenom jeden dioxopiperazinový kruh.

Série dalších experimentů naopak ukázala, že by za kardioprotektivní účinek DEX mohla zodpovídat interakce jeho parentní molekuly s enzymem TOP2B. Na rozdíl od metabolitů DEX je jeho parentní molekula účinným katalytickým inhibítorem TOP2B *in vitro* v koncentracích, které odpovídají plazmatickým koncentracím navozujícím kardioprotektivní účinek v experimentu i v klinické praxi. DEX (ale nikoliv jeho metabolity) také indukují depleci enzymu TOP2B v NVCM *in vitro* a myokardu králíka *in vivo* za podmínek, kdy toto léčivo navozuje kardioprotektivní účinky. DEX na rozdíl od jeho metabolitu také chránil NVCM *in vitro* před poškozením DNA navozeným DAU. Vztah kardioprotektivního účinku DEX k inhibici TOP2B byl také podpořen experimenty s jeho novým ethylmethyl derivátem (EDM). Tato látka tvoří dva diastereoizomery (EDMa a EDMb), jejichž metabolity mají téměř shodnou schopnost odnímat ionty železa z komplexu s ANT. Tyto diastereoizomery se ale podstatně liší ve schopnosti chránit NVCM *in vitro* před cytotoxicitou ANT a tento účinek dobře koreloval s jejich rozdílnou schopností inhibovat enzym TOP2B.

Výsledky této studie zásadně zpochybnily souvislost kardioprotektivních účinků DEX s jeho chelatačním metabolitem ADR-925 a naopak naznačují vztah parentní molekuly k interakci s TOP2B.

Podíl studenta na komentované práci: Studentka je spoluautorkou této publikace a ve spolupráci s prvním autorem (Dr. Jirkovský) se významně podílela na realizaci *in vivo* farmakokinetických a farmakodynamických experimentů (práce s pokusnými zvířaty, podávání zkoumaných léčiv, odběry vzorků pro další analýzy), na invazivním hodnocení funkce LK a interpretaci získaných výsledků.

4 Diskuse

Ve výsledcích prezentovaných v Publikaci č. 1 bylo zjištěna relativně mírná ale signifikantní cytotoxicita reverzibilního inhibitoru PI bortezomibu vůči kardiomyocytům izolovaným z myokardu novorozeného potkana (NVCM), nicméně bez možnosti dosažení IC_{50} i při užití významně supratherapeutických koncentrací léčiva. Tyto výsledky se lišily od dat publikovaných v přechodí práci (Nowis et al., 2010), kde bortezomib na stejném modelu (NVCM potkana) navodil podstatně výraznější cytotoxicitu. V této publikaci byla také prezentována vysoká cytotoxicita bortezomibu na buněčné linii H9c2. Nicméně tyto nálezy je třeba interpretovat velmi opatrně díky limitacím tohoto buněčného modelu – proliferace H9c2 buněk může vést k významnému uplatnění antiproliferačního a proapoptotického účinku PI (podobně jako v nádorových buňkách) a molekulární fenotyp těchto buněk se od primárních kardiomyocytů (včetně NVCM) podstatně liší (Lenco et al., 2015). Výsledky získané s NVCM v Publikaci č. 1 ale poměrně dobře odpovídají výsledkům publikovaným v jiné práci užívající tento buněčný model (Hasinoff et al., 2017). V případě kardiomyocytů izolovaných z komorového myokardu dospělého potkana (AVCM) jsme nezjistili významnou cytotoxicitu bortezomibu v klinicky relevantních koncentracích, což je ve shodě s daty z publikace Nowis et al. (2010). Tento poznatek nebyl ve zmíněné práci řádně diskutován a závěry této publikace byly odvozeny pouze z experimentů provedených na NVCM a H9c2 linii, která se fenotypem blíží myoblastům, ačkoliv se tato léčiva používají téměř výhradně u dospělých pacientů.

Opakované podání samotných PI u králíka nenavodilo žádné známky kardiotoxického působení. Použité dávky byly přitom velmi podobné dávkám použitým ve studiu embryo-fetální toxicity u králíka (Bray, 2012). Nicméně je možné, že expozice myokardu mohla být v monoterapii PI submaximální, protože dávkování těchto léčiv bylo v našich pokusech primárně odvozeno od jejich tolerability v kombinaci s ANT. Jelikož bylo zjištěno, že se efektivní inhibice proteazomu v myokardu po podání PI relativně rychle navrácí k původním hodnotám, absence toxického poškození myokardu v monoterapii PI u mladých zdravých zvířat nemusí být překvapující. V publikaci Nowis et al. (2010) byla ale u bortezomibu podávaného 3x týdně na modelu potkana pozorována významná dysfunkce LK. Stejně podání bortezomibu v našich podmínkách ale vedlo k časným úhynům z extrakardiálních příčin bez významných známek kardiotoxicity, což svědčí o významně supratherapeutické expozici. V další studii (van Hees et al., 2008) nebyla pozorována srdeční dysfunkce *in vivo* na modelu u potkana při podání bortezomibu 2x týdně a ani opakované podání tohoto léčiva myším s xenotransplatací lidských nádorových buněk nevedlo k navození kardiotoxicity při expozici zajišťující významný protinádorový účinek (LeBlanc et al., 2002). Tyto údaje naznačují, že kardiotoxicita obou studovaných PI je v monoterapii v klinicky relevantních dávkách u mladých dospělých pokusných zvířat spíše omezená.

Pravděpodobnost vzniku kardiotoxicity vedoucí k CHSS je v klinické praxi u těchto léčiv stále předmětem debat. Některé RCT hodnotící terapii bortezomibem v indikaci MM neshledaly rozdíl ve výskytu CHSS oproti kontrolní skupině (Richardson et al., 2005) a srdeční selhání bylo jen velmi zřídka důvodem pro přerušení léčby (Koulaouzidis et al., 2017). Podobné výsledky vplynuly v případě bortezomibu i ze systematického *review* a následné meta-analýzy (Xiao et al., 2014). V případě karfilzomibu byl v třetí fázi klinického hodnocení zaznamenán vyšší výskyt kardiotoxicity a srdeční dysfunkce než u bortezomibu (Chari et al., 2018). Nicméně některé meta-analýzy naznačovaly, že celkový výskyt kardiotoxicity (zvláště jejich závažných forem) je stále poměrně nízký (Chari et al., 2018). Echokardiografické hodnocení systolické srdeční funkce také neodhalilo žádné statisticky významné rozdíly mezi skupinou pacientů léčenou bortezomibem a karfilzomibem (Russell et al., 2015). *Posthoc* analýza uvedených dat ovšem naznačila možnost zvýšeného rizika kardiotoxicity a srdeční dysfunkce u pacientů vyššího věku s preexistujícím kardiovaskulárním onemocněním (Chari et al., 2018). Zde je třeba poznamenat, že námi prezentovaná experimentální data, stejně tak jako všechny ostatní experimentální výsledky v literatuře, se týkala výhradně mladých zdravých laboratorních zvířat.

Ačkoliv PI nenavozovaly významnou kardiotoxicitu v myokardu zdravých králíků, při současném rozvoji toxického poškození myokardu ANT by mohl být výsledek odlišný, proto jsme se na tuto hypotézu zaměřili. V podmínkách *in vitro* bylo ovšem zjištěno, že se mohou podstatně lišit data

získaná s užitím primárních kardiomyocytů izolovaných z myokardu novorozeného a dospělého potkana (tj. NVCM a AVCM). Kombinace obou PI (v koncentracích kolem jejich c_{max} v plazmě) s klinicky relevantními koncentracemi ANT vedla k signifikantnímu nárůstu toxicity u NVCM, což odpovídá výsledkům publikovaným v literatuře (Nowis et al., 2010; Hasinoff et al., 2017). Nicméně stejný pokus provedený na AVCM v Publikaci č.1 žádné významné ovlivnění toxicity ANT nezaznamenal a výsledná cytotoxicita byla podobná jako u samotného ANT. Tyto výsledky byly velmi dobře reprodukovatelné a nezávislé i na použité metodě stanovení cytotoxicity. Důvodem těchto výsledků také nemohla být absence významných inhibičních účinků na aktivitu proteazomu u AVCM, protože naše pokusy prokázaly paradoxně ještě výraznější efekt než u NVCM (včetně ovlivnění T-L aktivity). Zároveň byly v těchto experimentech poprvé popsány podstatné rozdíly v bazální tedy fyziologické proteazomové aktivitě (CT-L a T-L) mezi oběma typy primárních kardiomyocytů, což by mohlo kodeterminovat některé rozdílné výsledky pozorované na těchto *in vitro* modelech v našich experimentech. Protože se tato léčiva užívají pouze u dospělých pacientů, upřednostnění NVCM modelu před AVCM patrně zkreslilo (nadhodnotilo) reálné riziko kardiotoxicity plynoucí z kombinace ANT a PI ve většině předchozích publikací.

Co se týče kardiotoxicity kombinace PI a ANT *in vivo* nejsou mimo naši publikaci v literatuře dostupné žádné informace. Předložená studie dokládá, že oba PI při podání v maximálně tolerované dávce s ANT (na osvědčeném modelu chronické ANT kardiotoxicity) nevede ke zhoršení toxického poškození myokardu. A to navzdory tomu, že podání těchto léčiv vedlo k signifikantní inhibici CT-L aktivity proteazomu v myokardu pokusných zvířat. Přitom samotné podání ANT vedlo k indukci exprese proteinů signalizujících poruchou homeostázy proteinů a byla zjištěna i indukce aktivity samotného proteazomu (nicméně pouze T-L aktivity, která není oběma PI *in vivo* v myokardu významně ovlivněna). Tyto nálezy lze zřejmě interpretovat jako adaptační změny v UPS reagující na toxické poškození myokardu ANT, které ale v daných podmínkách nedostačují k udržení optimální proteinové homeostázy. V tomto kontextu se může jevit poněkud paradoxní, že podání PI na tyto děje ani celkový fenotyp ANT kardiotoxicity nemělo žádný vliv. Možným vysvětlením by mohl být přechodný charakter ovlivnění proteazomu v myokardu po podání obou PI (s normalizací do 24 hodin), což je rámcově v souladu s literaturou o účinku PI na zdravé tkáň (Yang et al., 2011). Dalším možným faktorem je absence významného vlivu obou PI na T-L aktivitu proteazomu, která je chronickou ANT kardiotoxicitou indukována.

Nelze vyloučit, že by vyšší expozice myokardu těmto PI by mohla vést k významnějšímu dopadu na ANT kardiotoxicitu. Nicméně ANT navozené poškození myokardu králíka bylo v našich podmínkách poměrně výrazné (u části zvířat to dokonce vedlo k terminální fázi CHSS s předčasnými úhyny). V případě významné účasti proteazomu na patogenezi ANT kardiotoxicity by tedy bylo očekávatelné, že by i menší expozice PI mohla mít významný dopad na závažnost kardiotoxicity. Protože k tomu nedošlo, je pravděpodobnější, že dysfunkce UPS hraje v rozvoji chronické ANT-kardiotoxicity spíše menší a/nebo pouze sekundární roli. Získané výsledky by také mohly naznačovat, že oba klinicky užívané PI také neovlivňují závažnost CHSS bez ohledu na jeho etiologii a některé informace z literatury by tomu také napovídaly (van Hees et al., 2008).

Riziko významného zvýšení závažnosti chronické ANT kardiotoxicity se tedy při kombinaci s PI jeví jako relativně nízké, přinejmenším u mladých dospělých jedinců. Klinická evidence k této problematice pocházející z RCT je stále velmi omezená. V publikovaných studiích nebylo hlášeno významně zvýšené riziko CHSS oproti skupině se samotným ANT, ale tyto studie na nebyly na hodnocení rizika kardiotoxicity designovány, což může mít na získaná data podstatný vliv. Také je třeba vzít v potaz, že v některých těchto studiích byly užity liposomální ANT, u kterých je riziko kardiotoxicity nižší díky cílené distribuci ANT do nádorů (Sonneveld et al., 2008).

Další dvě studie, jež jsou součástí tohoto komentovaného souboru jsou zaměřeny na problematiku farmakologické ochrany myokardu vůči chronické ANT kardiotoxicitě. První z těchto prací se zaměřuje na studium kardioprotektivních účinků ACEi při jejich podání v primární prevenci chronické ANT-kardiotoxicity na experimentálním modelu u králíka. Druhá práce si kladla za cíl objasnění mechanismů kardioprotektivních účinků klinicky užívaného kardioprotektiva DEX. Zatímco většina prací jakož i platné SmPC uvádějí, že DEX navozuje kardioprotekci prostřednictvím chelatace iontů železa a prevenci ANT indukované tvorby ROS v myokardu (SmPC Cyrdanax®;

Cvetkovic et al., 2005; Štěrbá et al., 2013), tedy tzv. nespecifický mechanismus účinku zprostředkovaný fyzikálně-chemickými vlastnostmi jeho metabolitu, některé novější teorie zmiňují možnost specifické interakce ANT s TOP2B jako cílovou molekulou (Deng et al., 2014). Jiné práce ale souvislost mezi kardioprotekcí DEX a TOP2B interakcí zpochybňují (McCormack, 2018). DEX se v dnešní v klinické praxi bohužel užívá jen velmi omezeně a žádné jiné kardioprotektivum se do klinické praxe zatím nedostalo. Proto se řada autorů zaměřila na zkoumání potenciálně kardioprotektivních účinků zavedených skupin léčiv jako jsou ACEi a další léčiva užívaná pro léčbu CHSS typu HFREF. K tomuto zájmu podstatně přispěla data o možném protektivním účinku těchto léčiv při užití v sekundární prevenci ANT kardiotoxicity u rizikových pacientů s elevací srdečních troponinů po chemoterapii obsahující ANT (Cardinale et al., 2006). Ačkoliv bylo provedeno i několik klinických studií s podáváním ACEi v primární prevenci (tj. při podávání v průběhu celé chemoterapie), stále není zřejmé, jestli tato léčba předchází poškození myokardu, tj. zabraňuje indukci primárního toxického poškození, nebo jenom mírní jeho progresi směrem k detekovatelné či klinicky manifestní ANT-kardiotoxicitě. S tímto souvisí otázka, jak moc je taková kardioprotekce dlouhodobě účinná (i po vysazení léčby ACEi).

Při studiu kardioprotektivních účinků ACEi v Publikaci č. 2 byla zjištěna řada nových informací. Prvním zajímavým zjištěním bylo, že podání ACEi v primární prevenci může mít v období postupného rozvoje ANT kardiotoxicity překvapivě výrazný vliv na většinu studovaných parametrů. Týden po ukončení podávání ANT (tj. již po vysazení ACEi a jeho majoritního vyloučení z organismu) byl jasně patrný benefit z léčby ACEi, a to nejen na rozvoj systolické dysfunkce LK a oběhové městnání s předčasnými úhyny, ale inhibován byl evidentně i rozvoj degenerativního poškození kardiomyocytů. Zjištěný pozitivní vliv ACEi na ANT toxicitu by mohl korespondovat s některými nadějnými nálezy z experimentálních studií bez dostatečného následného sledování pokusných zvířat (Sobczuk et al., 2020). Výsledky dále naznačují, že tento účinek ACEi by mohl souviset s ovlivněním molekulárních mechanismů přinejmenším částečně regulovaných systémem renin-angiotensin aldosteron (RAAS). Konkrétně by to mohla být inhibice zánětlivé reakce, prevence dysregulace hemostázy vápníku a ROS, zmírnění poruchy mitochondriální biogeneze a inhibice patologické remodelace extracelulární matrix.

Nicméně z následného 3-10týdenního sledování zvířat po chemoterapii DAU bez dalšího podávání ACEi bylo zřejmé, že dochází významnému oslabení výše popsaného benefitu podání ACEi, včetně výskytu těžkých forem CHSS s předčasnými úhyny. Tento trend byl zřejmý z většiny hodnocených parametrů (včetně degenerativních změn v kardiomyocytech) a nebylo jej možné ovlivnit zvýšením dávky ACEi. Benefit z podávání ACEi v primární prevenci ANT kardiotoxicity tedy není stálý a může se lišit v závislosti na délce následného sledování po ukončení chemoterapie. Tento zajímavý nálezy zatím nebyl v literatuře jasně popsán. Nutno dodat, že většina experimentálních prací se dlouhodobým sledováním pokusných zvířat po ukončení chronického podávání ANT nezabývala a když byl FU zahrnut v designu studie, tak byl často krátký (např. 2 týdny od poslední dávky ANT (Boutagy et al., 2020)). V literatuře byly také popsány smíšené či nesignifikantní výsledky týkající se účinku ACEi či sartanů v primární prevenci ANT navozené dysfunkce LK s různě dlouhým FU (Vaynblat et al., 2002; Sobczuk et al., 2020). Není vyloučeno, že se těchto výsledcích již mohl odrážet snižující se benefit z podávání ACEi s odstupem od ukončení chronického podávání ANT a délka zvoleného FU pak mohla mít významný vliv na velikost zjištěného přínosu v těchto studiích.

Jestli je výše uvedený fenomén platný i pro klinické užití ACEi v primární prevenci ANT kardiotoxicity zatím není zřejmé. Většina dosud provedených klinických studií sledovala pacienty po ukončení chemoterapie jen po omezenou dobu, a navíc byl ACEi vždy podáván až do samého konce studie. Není vyloučené, že by komplexní účinek ACEi mohl kodeterminovat relativně malý rozdíl v LVEF zjištěný oproti kontrolní skupině bez ACEi v těchto studiích, což bylo též diskutováno v literatuře (van der Meer et al., 2016). Účinky navozené následným podáváním ACEi i v období FU byly studovány i v naší práci (Publikace č. 2). Další podávání ACEi králíkům ale evidentně nezvrátilo trend ve zhoršení většiny parametrů ve FU, nicméně byla patrná inhibice progresu do těžkých forem CHSS, což zabránilo předčasným úhynům pokusných zvířat. Zde se ale pravděpodobně mohly uplatnit dobře známé účinky ACEi vůči progresi CHSS a patologické remodelaci myokardu bez ohledu na primární etiologii patologického stavu.

Výsledky naší práce ukazují, že kardioprotekce indukovaná ACEi a DEX se od sebe vzájemně zásadně liší. V předchozí práci naší skupiny (Jirkovský et al., 2013) zajistilo podávání DEX (před každou dávkou ANT) na totožném experimentálním modelu téměř kompletní kardioprotekci, a to jak na konci chronického podávání ANT, tak i po 10 týdnech FU. Dokonce i parciální protekce navozená DEX na téže modelu při zahájení podávání tohoto léčiva až po dosažení kumulativní dávky ANT 300 mg/m² (tj. od 7. dávky DAU) nedoznala žádných změn v průběhu FU. Kardioprotektivní účinek DEX je tedy zjevně velmi stálý bez ohledu na odstup od dokončení chemoterapie, což plyne i z další experimentální práce (Lebrecht et al., 2007) s ještě delším FU (30 týdnů). Údaje o dlouhodobém benefitu z léčby DEX jsou také dostupné z klinických studií (Reichardt et al., 2018).

Další publikace v tomto souboru komentovaných prací (Publikace č. 3) byla zaměřena na studium mechanismů kardioprotektivních účinků DEX. Sérií farmakokineticky řízených *in vitro* a *in vivo* experimentů s exogenním podáním domnělého aktivního metabolitu ADR-925 bylo dosaženo výsledků, které vyvrací hypotézu, že kardioprotektivní účinky DEX vycházejí z chelatačních vlastností jeho hlavního metabolitu. Tyto výsledky ale poměrně dobře zapadají do celé řady informací dostupných v literatuře. Kardioprotektivní potenciál ADR-925 nebyl pozorován ani v předchozí *in vitro* práci (Hasinoff et al., 2003), avšak tento výsledek byl dáván do zdánlivě logické souvislosti s hydrofilním charakterem této molekuly, jež by mohl způsobit nízkou penetraci ADR-925 sarkolemou do kardiomyocytů. Naše výsledky ale vyvrátily tento předpoklad, jelikož intracelulární expozice byla po inkubaci kardiomyocytů s ADR-925 ještě větší než po inkubaci s DEX. Také je třeba připomenout, že ADR-925 tvoří s volnými ionty železa komplexy, kterou jsou stále redoxně aktivní (Thomas et al., 1993), což je v rozporu s předpokládanou ochranou myokardu před oxidačním poškozením navozeným ANT. Tyto výsledky také osvětlují, proč v předchozích pokusech lipofilnější deriváty ADR-925 se snadněji penetračí do intracelulárního kompartmentu kardiomyocytu nevykazovaly žádný kardioprotektivní potenciál (Jirkovská-Vávrová et al., 2015). Tyto výsledky také pomohly vysvětlit, proč řada derivátů DEX neměla žádnou kardioprotektivní aktivitu, ačkoliv mohly být podobně jako DEX metabolizované na chelataující metabolity blízké ADR-925 (Martin et al., 2009; Jirkovská-Vávrová et al., 2015; Jirkovská et al., 2021; Pokorná et al., 2022). Ve světle těchto výsledků je také zřejmé, proč účinnější a selektivnější chelátory železa, které tvoří redoxně inaktivní komplexy s těmito ionty (např. deferoxamin či deferipron) neposkytovaly podobný kardioprotektivní účinek jako DEX (Herman et al., 1994; Popelova et al., 2008).

V komentované práci (Publikace č. 3) byl navržen i alternativní mechanismus kardioprotektivního účinku DEX, a to katalytická inhibice TOP2B prostřednictvím parentní molekuly DEX. Tento účinek nesouvisí s konkrétní optickou izomerií molekuly DEX a může se uplatnit za klinicky relevantních koncentrací a podmínek. DEX také navozuje depleci TOP2B v kardiomyocytech *in vitro* a *in vivo*, což je zřejmě následek inhibice této molekuly zprostředkovaný aktivitou UPS (Deng et al., 2014). Zdali pro účinnou kardioprotekci stačí pouze katalytická inhibice TOP2B nebo je nutná i deplece tohoto enzymu v kardiomyocytech, není prozatím jasné. Souvislost mezi kardioprotektivními účinky DEX a inhibicí TOP2B bylo dále v této práci potvrzeno prostřednictvím analýzy účinků ethylmethyl derivát DEX (označovaného EMD), protože významně odlišný protektivní potenciál jeho diastereoizomerů vůči ANT kardiotoxicitě koreloval s jejich schopností inhibovat TOP2B (chelatační schopnosti jejich metabolitů byly přitom téměř totožné). Souvislost kardioprotektivního účinku s inhibicí TOP2B také vyplynula z hodnocení kardioprotektivního účinku derivátů DEX v přechodných studiích. Většina i velmi malých obměn chemické struktury DEX vedla ke ztrátě inhibice TOP2B a ve všech případech vedlo ke ztrátě kardioprotektivního účinku *in vitro* i *in vivo* (Martin et al., 2009; Jirkovská-Vávrová et al., 2015; Kollárová-Brázdová et al., 2020; Jirkovská et al., 2021). Naopak derivát DEX s vyšší inhibiční účinností vůči TOP2B, než DEX byl následně také shledán účinnějším kardioprotektivem vůči ANT kardiotoxicitě *in vitro* i *in vivo* (Jirkovská et al., 2021; Kollárová-Brázdová et al., 2021).

Z recentních výsledků obecně vyplývá, že kardioprotektivní účinek DEX je založen na interakci parentního léčiva s TOP2B vedoucí k tzv. katalytické inhibici aktivity tohoto enzymu bez poškození DNA. Tímto může být tento enzym chráněn před účinkem ANT, který by jinak jako tzv. topoizomerázový jed navodil poškození DNA vyúsťující v dvojité zlomy. Tento nálezh byl potvrzen v Publikaci č. 3 stanovením fosforylace histonu H2AX, což je marker poškození DNA. Tato teorie

odpovídá výsledkům hodnocení DDR v myokardu po akutním podání ANT v Publikaci č.2. Zde podání DEX před ANT velmi efektivně zabránilo ANT indukované aktivaci DDR signalizaci v myokardu králíka za podmínek, kdy toto léčivo působí kardioprotektivně v chronickém experimentu. Recentní práce naší skupiny také ukázala, že inhibiční účinek derivátů DEX vůči ANT indukované DDR v myokardu velmi dobře koreluje s jejich kardioprotektivní účinností vůči chronické ANT kardiotoxicitě (Kollárová-Brázdová et al., 2021). Protože stejný účinek DEX lze očekávat i na TOP2A v nádorových buňkách, vyvstává otázka, jestli DEX a jeho deriváty stejným mechanismem nemohou chránit i nádorové buňky před toxicitou ANT. Výsledky prezentované v Publikaci č. 3, další výsledky naší skupiny (Jirkovská et al., 2021; Kollárová-Brázdová et al., 2021) i data publikována jinými autory (Pearlman et al., 2003) tuto obavu nepotvrzují. Mechanistické vysvětlení těchto nálezů si ale vyžádá další studium.

Všechna tato data velmi dobře korespondují s průlomovou prací, která prokázala, že podmíněná genetická delece TOP2B v kardiomyocytech zabraňuje indukci ANT kardiotoxicity (Zhang et al., 2012). Kardioprotekce DEX tedy zřejmě směřuje přímo k iniciálnímu kroku vedoucím k indukci ANT kardiotoxicity, proto předchází navození toxicity a poskytnutý benefit je evidentně trvalý. Naopak ACEi, který dle výsledků prezentovaných v Publikaci 2 nemá na TOP2B žádný účinek, neovlivňuje ANT navozenou DDR signalizaci v myokardu po podání ANT, a proto poskytuje pouze dočasný benefit, který je patrně založen na ovlivnění nižších úrovní patogeneze rozvíjejícího se toxického poškození a srdeční dysfunkce. Tomu že ACEi neovlivňují primární příčiny ANT kardiotoxicity by mohly odpovídat i výsledky klinické studie ICOS ONE (Cardinale et al., 2018). Zde totiž užití ACEi v primární a sekundární prevenci vůči ANT kardiotoxicitě vedlo k identickým výsledkům, což znamená, že ovlivnění iniciálních mechanismů pro účinek těchto léčiv zřejmě není klíčové. Pokračování klinické studie PRADA (Heck et al., 2021) pak přineslo velmi zajímavou informaci o tom, že původně zjištěný malý, ale statisticky významný benefit plynoucí z užití sartanu v primární prevenci ANT kardiotoxicity (Gulati et al., 2016), zcela vymizel při následném dlouhodobém sledování těchto pacientů (Heck et al., 2021). Tyto výsledky by mohly odpovídat snižujícím se kardioprotektivním účinkům ACEi ve FU u zvířat v našich pokusech (Publikace č.2). Při hodnocení kardioprotektivního potenciálu ACEi, sartanů a dalších léčiv užívaných pro léčbu HFrEF v experimentu i klinické praxi je zřejmě velmi důležité zaměřit se na výsledky této intervence s delším časovým odstupem od ukončení chemoterapie ANT. Pro definitivní klinické závěry o roli ACEi v primární prevenci chronické ANT kardiotoxicity je třeba více dat z RCT (Vaduganathan et al., 2019).

5 Závěry

Výsledky této práce naznačují, že klinicky užívané PI (bortezomib a karfilzomib) podávané v monoterapii vykazují jen velmi omezené známky kardiotoxicity *in vitro* a *in vivo* u mladých dospělých pokusných zvířat a z nich izolovaných primárních kardiomyocytů (AVCM). V těchto podmínkách také oba studované PI nezvyšují riziko kardiotoxicity ANT, a to i přesto, že aktivitu proteazomu v myokardu mohou významně inhibovat a samotná ANT kardiotoxicita vede k poruchám funkce UPS. Vyšší toxicitu ovšem navozují studované PI vůči primárním neonatálním kardiomyocytům (NVCM), a to zejména v kombinaci s ANT, což je v souladu s dostupnou literaturou. Vzhledem k tomu, že se tato léčiva užívají pouze u dospělých pacientů, tak tyto alarmující výsledky mají zřejmě omezený klinický význam. Uvedené rozdíly v citlivosti mezi AVCM a NVCM mohou souviset s rozdílnou fyziologickou aktivitou proteazomu jednotlivých podjednotek. Tato práce nenaznačuje, že by riziko kardiotoxicity plynoucí z kombinace těchto protinádorových léčiv u mladých dospělých jedinců bylo vyšší než v monoterapii ANT.

V další práci byla pozornost věnována studiu kardioprotektivních účinků DEX a ACEi v primární prevenci chronické ANT kardiotoxicity *in vivo*. Zde bylo zjištěno, že ACEi mohou ve většině studovaných parametrů navodit významný kardioprotektivní účinek v období postupného rozvoje chronické kardiotoxicity. Tento benefit se přitom neomezuje jen na inhibici remodelace myokardu a funkčních aspektů ANT toxicity či mortalitu spojenou s pokročilým CHSS. ACEi také mohou inhibovat rozvoj ANT indukovaných degenerativních změn kardiomyocytů. Nicméně tento benefit je ve všech aspektech dočasný a významně slábne při následném sledování pokusných zvířat po ukončení chemoterapie včetně možností výskytu těžkých forem CHSS vyúsťující v předčasný úhyn pokusných zvířat. Tuto tendenci nelze účinně zvrátit zvýšením dávky ACEi ani delším podáváním toho léčiva ve FU po ukončení podávání ANT. Uvedená zjištění také jasně poukazují na význam následného sledování pro adekvátní zhodnocení kardioprotektivního potenciálu ACEi v primární prevenci chronické ANT kardiotoxicity.

Kardioprotektivní účinky ACEi se tedy významně liší od DEX, který navozuje robustní a dlouhodobou kardioprotekci vůči ANT kardiotoxicitě. Důvodem jsou patrně odlišné mechanismy účinku obou léčiv. DEX zřejmě účinkuje prostřednictvím katalytické inhibice TOP2B v kardiomyocytech, kde předchází ANT-navozenému poškození DNA a indukcí DDR signalizace v myokardu, což odpovídá novější hypotéze o mechanismu vzniku ANT kardiotoxicity. Získané důkazy také jednoznačně hovoří proti významné úloze chelatačních metabolitů DEX v navození kardioprotektivního účinku DEX. Tato zjištění zpochybňují nejen dosud převládající mechanismus kardioprotektivního účinku DEX, který předpokládá vyvázání volného železa z komplexu s ANT prostřednictvím metabolitů DEX, ale i platnost tradiční teorie vzniku ANT kardiotoxicity zdůrazňující roli volných iontů železa a tvorby ROS (tzv. „*ROS and iron*“ hypotéza). Tento nálezy by též mohl vysvětlit, proč se selektivnějších chelátory železa neuplatnily v prevenci ANT kardiotoxicity. ACEi neovlivňují TOP2B dependentní poškození myokardu navozené ANT, což by mohlo vysvětlovat méně účinnou, a především nestálou kardioprotekci pozorovanou s užitím perindoprilu v této práci. ACEi tedy zřejmě účinkují jen na nižší patogenetické mechanismy rozvoje ANT kardiotoxicity, což se s ohledem na výsledky této práce jeví celkově méně efektivní.

6 Použitá literatura

- Agunbiade TA, Zaghlol RY and Barac A (2019) Heart Failure in Relation to Tumor-Targeted Therapies and Immunotherapies. *Methodist Debaquey Cardiovasc J* **15**:250-257.
- Armenian SH, Lacchetti C, Barac A, et al. (2017) Prevention and Monitoring of Cardiac Dysfunction in Survivors of Adult Cancers: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol* **35**:893-911.
- Avila MS, Ayub-Ferreira SM, de Barros Wanderley MR, Jr., et al. (2018) Carvedilol for Prevention of Chemotherapy-Related Cardiotoxicity: The CECCY Trial. *J Am Coll Cardiol* **71**:2281-2290.
- Bertaina A, Vinti L, Strocchio L, et al. (2017) The combination of bortezomib with chemotherapy to treat relapsed/refractory acute lymphoblastic leukaemia of childhood. *Br J Haematol* **176**:629-636.
- Billingham ME, Mason JW, Bristow MR, et al. (1978) Anthracycline cardiomyopathy monitored by morphologic changes. *Cancer Treat Rep* **62**:865-872.
- Boutagy NE, Feher A, Pfau D, et al. (2020) Dual Angiotensin Receptor-Nepriylisin Inhibition With Sacubitril/Valsartan Attenuates Systolic Dysfunction in Experimental Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *JACC CardioOncol* **2**:774-787.
- Bray J (2012) FDA memorandum - Kyprolis, in, http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2012/202714Orig1s000PharmR.pdf.
- 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.
- Campbell B, Adams J, Shin YK, et al. (1999) Cardioprotective effects of a novel proteasome inhibitor following ischemia and reperfusion in the isolated perfused rat heart. *J Mol Cell Cardiol* **31**:467-476.
- Cardinale D, Ciceri F, Latini R, et al. (2018) Anthracycline-induced cardiotoxicity: A multicenter randomised trial comparing two strategies for guiding prevention with enalapril: The International CardioOncology Society-one trial. *Eur J Cancer* **94**:126-137.
- 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.
- 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.
- 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.
- Dimitrakis P, Romay-Ogando MI, Timolati F, et al. (2012) Effects of doxorubicin cancer therapy on autophagy and the ubiquitin-proteasome system in long-term cultured adult rat cardiomyocytes. *Cell Tissue Res* **350**:361-372.

- Doroshov JH (1983) Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. *Cancer Res* **43**:460-472.
- Dou QP and Zonder JA (2014) Overview of proteasome inhibitor-based anti-cancer therapies: perspective on bortezomib and second generation proteasome inhibitors versus future generation inhibitors of ubiquitin-proteasome system. *Curr Cancer Drug Targets* **14**:517-536.
- Ewer MS and Ewer SM (2015) Cardiotoxicity of anticancer treatments. *Nature Reviews Cardiology* **12**:547-558.
- 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, Hellmann K, Herman EH, et al. (1998) Chemical, biological and clinical aspects of dexrazoxane and other bisdioxopiperazines. *Curr Med Chem* **5**:1-28.
- Hasinoff BB and Herman EH (2007) Dexrazoxane: how it works in cardiac and tumor cells. Is it a prodrug or is it a drug? *Cardiovasc Toxicol* **7**:140-144.
- Hasinoff BB, Patel D and Wu X (2017) Molecular Mechanisms of the Cardiotoxicity of the Proteasomal-Targeted Drugs Bortezomib and Carfilzomib. *Cardiovasc Toxicol* **17**:237-250.
- Hasinoff BB, Schroeder PE and Patel D (2003) The metabolites of the cardioprotective drug dexrazoxane do not protect myocytes from doxorubicin-induced cytotoxicity. *Mol Pharmacol* **64**:670-678.
- Heck SL, Mecinaj A, Ree AH, et al. (2021) Prevention of Cardiac Dysfunction During Adjuvant Breast Cancer Therapy (PRADA): Extended Follow-Up of a 2×2 Factorial, Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Clinical Trial of Candesartan and Metoprolol. *Circulation* **143**:2431-2440.
- 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.
- Herrmann J, Wohler C, Saguner AM, et al. (2013) Primary proteasome inhibition results in cardiac dysfunction. *Eur J Heart Fail* **15**:614-623.
- Hershko A and Ciechanover A (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **67**:425-479.
- Huang J, Yang J, Maity B, et al. (2011) Regulator of G protein signaling 6 mediates doxorubicin-induced ATM and p53 activation by a reactive oxygen species-dependent mechanism. *Cancer Res* **71**:6310-6319.
- Chari A, Stewart AK, Russell SD, et al. (2018) Analysis of carfilzomib cardiovascular safety profile across relapsed and/or refractory multiple myeloma clinical trials. *Blood Adv* **2**:1633-1644.
- Chen SH, Chan NL and Hsieh TS (2013) New mechanistic and functional insights into DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem* **82**:139-170.
- Christians ES and Benjamin IJ (2012) Proteostasis and REDOX state in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **302**:H24-37.
- 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 IIβ Interactions. *J Med Chem* **64**:3997-4019.

- 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.
- Kalay N, Basar E, Ozdogru I, et al. (2006) Protective effects of carvedilol against anthracycline-induced cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* **48**:2258-2262.
- Kiss I, Adámková Krákorová D, Andrašina T, et al. (2022) Modrá kniha České onkologické společnosti.
- Kollárová-Brázdová P, Jirkovská A, Karabanovich G, et al. (2020) Investigation of Structure-Activity Relationships of Dexrazoxane Analogs Reveals Topoisomerase II β Interaction as a Prerequisite for Effective Protection against Anthracycline Cardiotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* **373**:402-415.
- Kollárová-Brázdová P, Lenčová-Popelová O, Karabanovich G, et al. (2021) Prodrug of ICRF-193 provides promising protective effects against chronic anthracycline cardiotoxicity in a rabbit model in vivo. *Clinical Science* **135**:1897-1914.
- Koulaouzidis G and Lyon AR (2017) Proteasome Inhibitors as a Potential Cause of Heart Failure. *Heart Fail Clin* **13**:289-295.
- Kumarapeli AR, Horak KM, Glasford JW, et al. (2005) A novel transgenic mouse model reveals deregulation of the ubiquitin-proteasome system in the heart by doxorubicin. *Faseb j* **19**:2051-2053.
- LeBlanc R, Catley LP, Hideshima T, et al. (2002) Proteasome inhibitor PS-341 inhibits human myeloma cell growth in vivo and prolongs survival in a murine model. *Cancer Res* **62**:4996-5000.
- 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. *British journal of pharmacology* **151**:771-778.
- Lenco J, Lencova-Popelova 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.
- Liu JB, Zheng HQ, Tang MX, et al. (2008) A therapeutic dose of doxorubicin activates ubiquitin-proteasome system-mediated proteolysis by acting on both the ubiquitination apparatus and proteasome. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **295**:H2541-H2550.
- Lyu YL, Kerrigan JE, Lin C-P, et al. (2007) Topoisomerase II β -mediated DNA double-strand breaks: implications in doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dexrazoxane. *Cancer research* **67**:8839-8846.
- Maejima Y (2020) The critical roles of protein quality control systems in the pathogenesis of heart failure. *J Cardiol* **75**:219-227.
- 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.
- Matsui H, Morishima I, Numaguchi Y, et al. (1999) Protective effects of carvedilol against doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *Life Sci* **65**:1265-1274.
- 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**.

- 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.
- Mohan N, Jiang J, Dokmanovic M, et al. (2018) Trastuzumab-mediated cardiotoxicity: current understanding, challenges, and frontiers. *Antib Ther* **1**:13-17.
- Nowis D, Maczewski M, Mackiewicz U, et al. (2010) Cardiotoxicity of the Anticancer Therapeutic Agent Bortezomib. *Am J Pathol* **176**:2658-2668.
- Pearlman M, Jendiroba D, Pagliaro L, et al. (2003) Dexrazoxane's protection of jejunal crypt cells in the jejunum of C3Hf/Kam mice from doxorubicin-induced toxicity. *Cancer Chemother Pharmacol* **52**:477-481.
- 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.
- Popelova O, Sterba M, Simunek T, et al. (2008) Deferiprone does not protect against chronic anthracycline cardiotoxicity in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* **326**:259-269.
- Pye J, Ardeshipour F, McCain A, et al. (2003) Proteasome inhibition ablates activation of NF-kappa B in myocardial reperfusion and reduces reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**:H919-926.
- 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.
- Renu K, V GA, P BT, et al. (2018) Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy - An update. *Eur J Pharmacol* **818**:241-253.
- Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW, et al. (2005) Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med* **352**:2487-2498.
- Russell SD, Lyon A, Lenihan DJ, et al. (2015) Serial Echocardiographic Assessment of Patients (Pts) with Relapsed Multiple Myeloma (RMM) Receiving Carfilzomib and Dexamethasone (Kd) Vs Bortezomib and Dexamethasone (Vd): A Substudy of the Phase 3 Endeavor Trial (NCT01568866). *Blood* **126**.
- Sawicki KT, Sala V, Prever L, et al. (2021) Preventing and Treating Anthracycline Cardiotoxicity: New Insights. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **61**:309-332.
- Shukla SK and Rafiq K (2019) Proteasome biology and therapeutics in cardiac diseases. *Transl Res* **205**:64-76.
- Simmons CE (2019) Overcoming Inertia to Tame the Red Devil*. *JACC: CardioOncology* **1**:80-83.
- Simunek T, Sterba M, Popelova 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.
- Sishi BJ, Bester DJ, Wergeland A, et al. (2012) Daunorubicin therapy is associated with upregulation of E3 ubiquitin ligases in the heart. *Exp Biol Med (Maywood)* **237**:219-226.
- SmPC Cyrdanax® Souhrn údajů o přípravku Cyrdanax 20 mg/ml prášek pro infuzní roztok, in, <https://www.sukl.cz/modules/medication/search.php>.
- Sobczuk P, Czerwińska M, Kleibert M, et al. (2020) Anthracycline-induced cardiotoxicity and renin-angiotensin-aldosterone system-from molecular mechanisms to therapeutic applications. *Heart Fail Rev*.
- Sonneveld P, Hajek R, Nagler A, et al. (2008) Combined pegylated liposomal doxorubicin and bortezomib is highly effective in patients with recurrent or refractory multiple myeloma who received prior thalidomide/lenalidomide therapy. *Cancer* **112**:1529-1537.

- Sterba M, Popelova O, Lenco J, et al. (2011) Proteomic insights into chronic anthracycline cardiotoxicity. *J Mol Cell Cardiol* **50**:849-862.
- 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.
- Tang M, Li J, Huang W, et al. (2010) Proteasome functional insufficiency activates the calcineurin-NFAT pathway in cardiomyocytes and promotes maladaptive remodelling of stressed mouse hearts. *Cardiovasc Res* **88**:424-433.
- Terwilliger T and Abdul-Hay M (2017) Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J* **7**:e577.
- 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.
- 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 der Meer P, Gietema JA, Suter TM, et al. (2016) Cardiotoxicity of breast cancer treatment: no easy solution for an important long-term problem. *Eur Heart J* **37**:1681-1683.
- van der Zanden SY, Qiao X and Neefjes J (2021) New insights into the activities and toxicities of the old anticancer drug doxorubicin. *Febs j* **288**:6095-6111.
- van Hees HW, Li YP, Ottenheijm CA, et al. (2008) Proteasome inhibition improves diaphragm function in congestive heart failure rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **294**:L1260-1268.
- Vaynblat M, Shah HR, Bhaskaran D, et al. (2002) Simultaneous angiotensin converting enzyme inhibition moderates ventricular dysfunction caused by doxorubicin. *Eur J Heart Fail* **4**:583-586.
- Vejpongsa P and Yeh ETH (2014) Topoisomerase 2 β : A Promising Molecular Target for Primary Prevention of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity. *Clin Pharmacol Ther* **95**:45-52.
- Wang J, Fang Y, Fan RA, et al. (2021) Proteasome Inhibitors and Their Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Metabolism. *Int J Mol Sci* **22**.
- Xiao Y, Yin J, Wei J, et al. (2014) Incidence and risk of cardiotoxicity associated with bortezomib in the treatment of cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* **9**:e87671.
- Yang J, Wang Z, Fang Y, et al. (2011) Pharmacokinetics, pharmacodynamics, metabolism, distribution, and excretion of carfilzomib in rats. *Drug Metab Dispos* **39**:1873-1882.
- 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). *European Heart Journal* **37**:2768-2801.
- Zhang S, Liu X, Bawa-Khalife T, et al. (2012) Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med* **18**:1639-1642.

7 Přehled publikační činnosti

7.1 Původní vědecké práce v časopisech s IF se vztahem k disertační práci

Celkem: 7 (z toho 2 provoautorské)

Prvoautorské publikace s IF (2x)

- **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. *Clin Sci (Lond)*. 2022, 136(1):139-161. (IF₂₀₂₀ = 6,124, Q1; AIS₂₀₂₀ = 1,568, Q1).
- **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. *Clin Sci (Lond)*. 2019, 133(16):1827-1844. (IF₂₀₁₉ = 5,223, Q1; AIS₂₀₁₉ = 1,327, Q1).

Spoluautorské publikace s IF (5x)

- 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., Štěřbová-Kovaříková P., Štěřba M. Clinically translatable prevention of anthracycline cardiotoxicity by dexrazoxane is mediated by topoisomerase II beta and not metal chelation. *Circ Heart Fail*. 2021, 14(11):e008209. (IF₂₀₂₀ 8,846, D1; AIS₂₀₂₀ = 3,335, D1).
- 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., Štěřbová-Kovaříková P., Roh J., Šimůnek T., Štěřba M. Investigation of structure-activity relationships of dexrazoxane analogs reveals topoisomerase IIb interaction as a prerequisite for effective protection against anthracycline cardiotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther*. 2020, 373(3):402-415. (IF₂₀₂₀ = 4,030, Q2; AIS₂₀₂₀ = 1,141, 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., Štěřba M. Pharmacokinetics of the cardioprotective drug dexrazoxane and its active metabolite ADR-925 with focus on cardiomyocytes and the heart. *J Pharmacol Exp Ther*. 2018, 364(3):433-446. (IF₂₀₁₈ = 3,615, Q1; AIS₂₀₁₈ = 1,128, Q1).
- Lenčová-Popelová O., Jansová H., Jirkovský E., Bureš J., Jirkovská-Vávrová A., Mazurová Y., Reimerová P, Vostatková L., Adamcová M., Hroch M., **Pokorná Z.**, Kovaříková P., Šimůnek T., Štěřba M. Are cardioprotective effects of NO-releasing drug molsidomine translatable to chronic anthracycline cardiotoxicity settings? *Toxicology*. 2016, 372:52-63. (IF₂₀₁₆ = 3,582, Q1; AIS₂₀₁₆ = 0.932, Q1).
- Lenčová-Popelová O., Jirkovský E., Jansová H., Jirkovská-Vávrová A., Vostatková-Tichotová L., Mazurová Y., Adamcová M., Chládek J., Hroch M., **Pokorná Z.**, Geršl V., Šimůnek T., Štěřba M. Cardioprotective effects of inorganic nitrate/nitrite in chronic anthracycline cardiotoxicity: Comparison with dexrazoxane. *J Mol Cell Cardiol*. 2016, 91:92-103. (IF₂₀₁₆ 5,680, Q1; AIS₂₀₂₀ = 1,614, Q1).

7.2 Přednášky a posterová sdělení na odborných setkáních

Jako prezentující autor: 14 (4x přednáška, 10x poster; z toho 6 mezinárodních):

- **Z. Pokorná**, E. Jirkovský, A. Jirkovská, O. Lenčová, P. Kovaříková, T. Šimůnek, M. Štěřba. Vliv proteasomového inhibitoru bortezomibu na rozvoj chronické antracyklinové kardiotoxicity *in vivo*. (poster, Farmakologické dny – FD 2015, Praha, Česká republika)
- **Z. Pokorná**, E. Jirkovský, O. Lenčová, A. Jirkovská, M. Adamcová, Y. Mazurová, V. Geršl, T. Šimůnek, M. Štěřba. Vliv proteasomového inhibitoru bortezomibu na rozvoj chronické antracyklinové kardiotoxicity *in vivo*. (moderovaný poster, Komise experimentální kardiologie – KEK 2015, Buchlov, Česká republika)
- **Z. Pokorná**, E. Jirkovský, O. Lenčová, P. Brázdová, A. Jirkovská, M. Adamcová, Y. Mazurová, T. Šimůnek, M. Štěřba. Impact of clinically used proteasome inhibitors on development of chronic anthracycline cardiotoxicity. (poster, New Frontiers in Basic Cardiovascular Research – NFBCVR 2016, Châtenay-Malabry, Francie)
- **Z. Pokorná**, A. Jirkovská, E. Jirkovský, O. Lenčová, P. Brázdová, M. Adamcová, Y. Mazurová, T. Šimůnek, M. Štěřba. Vliv proteasomových inhibitorů bortezomibu a karfilzomibu na rozvoj chronické antracyklinové kardiotoxicity. (poster FD 2016, Česká republika, sborník abstraktů, str. 127, ISBN 978-80-260-9782-2)
- **Z. Pokorná**, E. Jirkovský, A. Jirkovská, O. Lenčová, M. Adamcová, Y. Mazurová, P. Brázdová, T. Šimůnek, M. Štěřba. Vliv klinicky užívaných proteasomových inhibitorů na rozvoj chronické antracyklinové kardiotoxicity *in vivo*. (přednáška, KEK 2016, Stará Lesná, Slovensko, sborník abstraktů, str. 30, ISBN 978-80-971699-6-1)
- **Z. Pokorná**, E. Jirkovský, A. Jirkovská, O. Lenčová, M. Adamcová, Y. Mazurová, P. Brázdová, T. Šimůnek, M. Štěřba. Vliv klinicky užívaných proteasomových inhibitorů na rozvoj chronické antracyklinové kardiotoxicity *in vivo*. (přednáška, University Center – UNCE Cardiotox meeting 2016, Hradec Králové, Česká republika)
- **Z. Pokorná**, P. Brázdová, E. Jirkovský, M. Adamcová, Y. Mazurová, M. Štěřba. Are ACEi able to provide effective and sustained protection against chronic anthracycline cardiotoxicity *in vivo*? (poster, Global Cardiooncology Summit 2017, Londýn, Spojené Království)
- **Z. Pokorná**, P. Brázdová, E. Jirkovský, M. Adamcová, Y. Mazurová, M. Štěřba. Investigation of ACE-I-based cardioprotective intervention against chronic anthracycline cardiotoxicity *in vivo* (poster, FD 2017, Stará Lesná, Slovensko)
- **Z. Pokorná**, P. Brázdová, E. Jirkovský, M. Adamcová, Y. Mazurová, M. Štěřba. Jsou ACE-inhibitory schopny poskytnout účinnou a dlouhotrvající protekci před rozvojem chronické antracyklinové kardiotoxicity? (poster, KEK 2017, Kutná Hora, Česká republika)
- **Z. Pokorná**, P. Brázdová, E. Jirkovský, M. Adamcová, Y. Mazurová, M. Štěřba. Study of cardioprotective effects of the ACE inhibitor perindopril against chronic anthracycline cardiotoxicity on dexrazoxane-validated *in vivo* model. (poster, ESC Heart Failure Winter Research Meeting 2018, Les Diablerets, Švýcarsko)
- **Z. Pokorná**, P. Brázdová, E. Jirkovský, M. Adamcová, Y. Mazurová, M. Štěřba. Study of cardioprotective effects of the ACE inhibitor perindopril against chronic anthracycline cardiotoxicity on dexrazoxane-validated *in vivo* model. (poster, Heart Failure 2018 & World Congress on Acute Heart Failure, Vídeň, Rakousko)
- **Z. Pokorná**, P. Brázdová, E. Jirkovský, M. Adamcová, M. Štěřba. Studium kardioprotektivních účinků ACE inhibitorů proti rozvoji chronické antracyklinové kardiotoxicity *in vivo*. (přednáška, KEK 2018, Bukovany, Česká republika)
- **Z. Pokorná**, P. Brázdová, M. Adamcová, M. Štěřba. Study of cardioprotective effects of the ACE inhibitor perindopril against chronic anthracycline cardiotoxicity. (poster, NFBCVR 2018, Praha, Česká republika).
- **Z. Pokorná**, P. Brázdová, E. Jirkovský, M. Adamcová, M. Štěřba. Studium kardioprotektivních účinků ACE-inhibitoru, dexrazoxanu a jeho nových derivátů vůči chronické antracyklinové kardiotoxicitě u králíka (přednáška, XXIII. Vědecká konference LFHK a FNHK, Hradec Králové, Česká republika).