

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

**Kardiotoxicita protinádorových léčiv:
Studium molekulárních mechanismů a
možností farmakologické kardioprotekce**

Disertační práce

Mgr. Anna Vávrová

Vedoucí disertační práce: Doc. PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D.

Hradec Králové, 2013

Poděkování

Děkuji svému školiteli doc. PharmDr. Tomáši Šimůnkovi, Ph.D. za vedení v průběhu pre- i postgraduálního studia a cenné rady a pomoc při tvorbě této disertační práce. Děkuji také svým kolegům a přátelům z Lékařské i Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy, kteří mi všichni pomáhali při tvorbě publikací a tedy i této disertační práce. Zvláště pak děkuji kolektivu Katedry biochemických věd, jehož osazenstvo mi zpříjemňovalo mé studium, co mu síly stačily.

Děkuji také za finanční podporu grantovým agenturám (GAČR 305/09/0416 a 13-15008S, UNCE 204019/304019/2012, GAUK 51308, 112409, 367911, 299511 a SVV 267 004).

Mé největší poděkování pak patří mým rodičům, Edovi Jirkovskému a celým našim rodinám. Jste úžasní a mám Vás moc ráda.

Prohlášení

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

Anna Vávrová

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Mgr. Anna Vávrová

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

Název disertační práce:

Kardiotoxicita protinádorových léčiv: Studium molekulárních mechanismů a možností farmakologické kardioprotekce

Antracyklinová antibiotika patří mezi nejpoužívanější cytostatika. Jejich použití je však omezeno kardiotoxicitou. Jediným doposud registrovaným léčivem schopným omezit kardiotoxicitu antracyklinů je dexrazoxan. Mechanismus jeho kardioprotektivního působení, stejně tak jako mechanismus antracyklinové kardiotoxicity zůstávají i přes půlstoletí výzkumu nejasné. V této práci jsme se soustředili na studium molekulárních mechanismů tohoto poškození, zvláště pak s ohledem na mechanismy kardioprotekce pomocí dexrazoxanu. Neprokázali jsme, že v patogenezi antracyklinové kardiotoxicity hraje významnou roli glutathion a s ním spojený enzymový systém, a to jak v experimentech *in vitro* tak i při analýze tkáně myokardu v rámci *in vivo* modelu chronické antracyklinové kardiotoxicity. Dále jsme zjistili, že dexrazoxan je schopen zabránit antracyklinové kardiotoxicitě v našem *in vitro* modelu izolovaných neonatálních kardiomyocytů, avšak nechrání tyto buňky před toxickým poškozením modelovým oxidačním insultem peroxidem vodíku. Protože dexrazoxan je také katalytickým inhibítorem topoisomerasy II, porovnali jsme jeho protektivní schopnosti s dalšími dvěma katalytickými inhibitory sobuzoxanem a merbaronem a zjistili jsme, že i tyto látky dokážou podobně jako dexrazoxan omezit antracyklinovou kardiotoxicitu

bez současného negativního ovlivnění protinádorové účinnosti antracyklinů, ale jsou neúčinné proti modelovému oxidačnímu poškození kardiomyocytů. Vztahy mezi strukturou a kardioprotektivním účinkem dexrazoxanu nejsou ještě dostatečně objasněny, stejně jako role jeho hydrolýzy na železo-chelatující metabolit ADR-925. Studovali jsme proto analogy dexrazoxanu a ADR-925, a porovnávali jejich potenciální kardioprotektivní vlastnosti s dexrazoxanem. Zjistili jsme, že tyto nové analogy nevykazují kardioprotektivní účinky, což je zřejmě způsobeno rozdíly v interakcích s topoisomerasou II. Z experimentů provedených v rámci této disertační práce i některých dalších nedávno uveřejněných studií tedy vyplývá, že spíše než tradičně udávaným mechanismem oxidačního poškození mohou antracykliny působit kardiotoxicky díky interakci s topoisomerasou II přítomnou v kardiomyocytech a na tento účinek by se mohlo zaměřit i hledání dalších účinných kardioprotektiv.

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Mgr. Anna Vávrová

Supervisor: Doc. PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D.

Title of Doctoral Thesis:

Cardiotoxicity of antineoplastic drugs: Study of the molecular mechanisms and the possibilities of pharmacological cardioprotection.

Anthracyclines are amongst the most widely used antineoplastic agents. Nevertheless, their use is limited by the risk of cardiotoxicity. Dexrazoxane has been the only approved cardioprotectant against anthracycline cardiotoxicity so far. Despite half a century of research, the mechanisms of its cardioprotective ability as well as the mechanisms of anthracycline toxicity are elusive. In this study, we focused on the study of the molecular mechanisms of dexrazoxane cardioprotection. We did not prove the principal role of glutathione and related antioxidant enzymes in the pathogenesis of anthracycline cardiotoxicity both in the *in vitro* experiments and *in vivo* in the samples of left ventricles from the well-established model of chronic anthracycline cardiotoxicity in rabbits. Moreover, we found that *in vitro* dexrazoxane is able to protect the isolated neonatal rat cardiomyocytes against anthracycline-, but not hydrogen peroxide-induced damage. As dexrazoxane is also a catalytic inhibitor of topoisomerase II, we compared its cardioprotective ability with two other topoisomerase II catalytic inhibitors, sobuzoxane and merbarone. All dexrazoxane, sobuzoxane and merbarone were comparably effective in the protection of neonatal rat cardiomyocytes against anthracycline toxicity, but were ineffective against

oxidative damage. At the same time, the catalytic inhibitors used in this study did not compromise the antiproliferative activity of anthracyclines on the HL-60 cell line. The structure-activity relationships of the dexrazoxane cardioprotection are not precisely determined, as well as the need of its hydrolysis to the metal-chelating metabolite ADR-925. Therefore, we studied the newly synthesized analogues of both dexrazoxane and ADR-925 regarding their cardioprotective potential. We found that these novel analogues are not protective compared to dexrazoxane, which is probably caused by their inactivity regarding topoisomerase II catalytic inhibition. From the data of this study as well as from the experimental data of other recent studies we can conclude, that rather than by the traditionally proposed oxidative damage, anthracyclines may be cardiotoxic due to their interaction with the topoisomerase II in cardiomyocytes.

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Teoretická část.....	13
2.1. Antracyklinová antibiotika.....	13
2.1.1. Mechanismy protinádorového působení antracyklinů.....	13
2.1.2. Mechanismy antracyklinové kardiotoxicity	14
2.1.3. Možnosti prevence antracyklinové kardiotoxicity.....	17
2.1.4. Mechanismy druhého typu kardiotoxicity způsobené protinádorovou terapií 31	
2.1.5. Shrnutí.....	33
3. Cíle práce	35
4. Komentáře k pracím	36
4.1. Oxidační stres a chelatace železa v antracyklinové kardiotoxicitě a farmakologické kardioprotekci.....	36
4.2. Topoisomerasa II beta: Role v regulaci genové exprese.....	37
4.3. Studium role glutathionu v antracyklinové kardiotoxicitě.....	38
4.4. Vliv dexrazoxanu a vybraných komerčně dostupných inhibitorů topoisomerasy II na kardiotoxicitu antracyklinů	41
4.5. Ovlivnění antracyklinové kardiotoxicity nově syntetizovanými analogy dexrazoxanu a ADR-925	42
4.6. Souhrnná diskuse a shrnutí	46
5. Závěry.....	49
6. Podíl předkladatelky na publikacích zahrnutých v disertační práci.....	51
7. Použitá literatura	53
8. Přehled publikační činnosti.....	65
9. Prezentace na konferencích	66
Přílohy	68

1. Úvod

Antracyklinová antibiotika se řadí mezi nejúčinnější protinádorová léčiva. Spektrum jejich indikací pokrývá jak krevní tak tkáňové malignity, používají se při terapii leukémií, karcinomů prsu, urogenitálního i gastrointestinálního traktu, malignit měkkých tkání a kostí až po lymfomy a myelomy (Brunton a kol. 2010). Jejich mimořádný význam se projevil zejména v pediatrické onkologii, kde se krátce po jejich zavedení zvýšila úspěšnost léčby akutní myeloblastické leukemie z 30 % až na 80 %. Uvádí se, že více než polovina dětských pacientů byla léčena antracykliny (Jemal a kol. 2009). Přestože antracykliny používány již 50 let, díky jejich výjimečné účinnosti se nestaly obsolentními. Naopak, nová cílená protinádorová léčiva se používají často v kombinaci právě s antracykliny (Brunton a kol. 2010). Přestože bylo za více než půlstoletí výzkumu nových analogů dvou původních látek, daunorubicinu a doxorubicinu, vyvinuto několik tisíc struktur, v současné klinické praxi je stále nejčastěji používanou látkou doxorubicin (Menna a kol. 2008).

Terapie antracyklinovými antibiotiky je limitována především dvěma nejzávažnějšími nežádoucími účinky, myelotoxicitou a kardiotoxicitou (Brunton a kol. 2010). Myelotoxicita antracyklinů se vyskytuje již v průběhu terapie a v současné době je možné ji omezit použitím růstových faktorů (Balducci 2000). Po ukončení podávání antracyklinů se pak krvetvorba obnovuje. Naopak kardiotoxicita antracyklinů se projeví často až po ukončení terapie jako dilatační kardiomyopatie s progresí do městnavého srdečního selhání. Toto poškození převážně kardiomyocytů v levé srdeční komoře je považováno za ireverzibilní a na terapii reaguje jen velmi omezeně, a to pouze zpomalením další progresse srdečního selhání (Elliott 2006). Některé novější studie však naznačují, že velmi časně započetí terapie pomocí inhibitorů angiotensin konvertujícího enzymu a antagonistů beta adrenergických receptorů může ztrátu srdeční funkce zvrátit. Zůstává ale stále otázkou, zda toto zlepšení není pouze důsledkem snížení krevního tlaku a nakolik zůstane funkce zachována po vysazení této terapie (Wells a Lenihan 2010). Proto panuje v rámci odborné veřejnosti jednoznačný konsenzus, že výhodnější strategií je snaha tomuto poškození předcházet.

Zatímco v prvotních klinických studiích byla pozorována kardiotoxicita u 7 % pacientů po dávce 550 mg/m² doxorubicinu a tato dávka byla následně zhodnocena jako nejvyšší dávka, která může být relativně bezpečně podána (Von Hoff a kol. 1979), v novější retrospektivní studii bylo zjištěno, že až u čtvrtiny pacientů léčených touto kumulativní dávkou doxorubicinu je pozorováno manifestní srdeční selhání (Swain a kol. 2003). Predikci rozvoje manifestního srdečního selhání komplikuje vysoká interindividuální variabilita. U některých pacientů se toxické účinky antracyklinů projeví už při dávkách nižších než 300 mg/m², kdežto u některých pacientů ani 1000 mg/m² nevyvolalo závažnější srdeční poškození (Von Hoff a kol. 1979). U dětí je pak incidence kardiovaskulárních komplikací léčby antracykliny ještě větší, což pravděpodobně souvisí také s delší dobou přežití těchto pacientů. Rozvoj asymptomatického srdečního poškození byl u dětí léčených doxorubicinem pozorován už při dosažení kumulativní dávky 100 mg/m², v dávce 270 mg/m² pak riziko tohoto poškození bylo 4,5 krát větší než u neléčené populace (Oeffinger a kol. 2006). Riziko srdečního poškození je ovlivněno také dalšími rizikovými faktory, jako jsou nízký nebo naopak vysoký věk, existující kardiovaskulární onemocnění, obezita, diabetes mellitus a také předchozí nebo současná léčba ozařováním mediastina nebo jinými léčivými s kardiotoxickým potenciálem (Ewer a Yeh 2006).

Jediným dosud registrovaným léčivem, které je schopné účinně předcházet kardiotoxicitě antracyklinů je dexrazoxan. Tato látka nebyla vyvinuta racionálním přístupem (Rhombert a Hellmann 2011). Původně byly studovány její protinádorové účinky a teprve kombinací s antracykliny bylo zjištěno, že vykazuje kardioprotektivní vlastnosti (Rhombert a Hellmann 2011). Tento účinek je od 80. let 20. století přisuzován metabolitu dexrazoxanu, molekule označené jako ADR-925, která je svou strukturou velmi podobná molekule známého chelátoru kovů EDTA. V současných učebnicích je proto obvykle prezentována „klasická“ teorie, že dexrazoxan působí kardioprotektivně díky metabolizaci a schopnosti vyvazovat volné katalyticky aktivní ionty železa a tak zabránit vzniku volných kyslíkových radikálů v buňce. Proto se v posledních desetiletích preklinický i klinický výzkum do značné míry zaměřil na oxidační stres způsobený antracykliny a jeho omezení použitím antioxidantů a selektivnějších a silnějších chelátorů železa. Avšak tyto studie neprokázaly účinnost

těchto látek, která by byla srovnatelná nebo překračovala účinnost dexrazoxanu (Šimůnek a kol. 2009). Proto se v současné době stále více studií zaměřuje na alternativní mechanismy kardiotoxicity antracyklinů a kardioprotekce pomocí dexrazoxanu.

S nástupem cílené terapie a rozpoznáním kardiotoxického působení některých novějších léčiv se kardiotoxicita protinádorových terapeutik začala klasifikovat do dvou skupin. Zatímco antracykliny způsobují takzvaný typ I kardiotoxicity navozené chemoterapeutiky, některá cílená léčiva působí takzvaný typ II tohoto poškození. Typ II je charakterizován na rozdíl od typu I nezávislostí poškození na podané dávce léčiva, vyskytuje se jen u některých pacientů, její závažnost je značně rozdílná a obvykle nezpůsobuje identifikovatelné poškození ultrastruktury myokardu (Ewer a Lippman 2005).

Tato disertační práce byla vypracována jako součást dlouhodobého výzkumu realizovaného na pracovištích Lékařské a Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Mechanismy antracyklinové kardiotoxicity a farmakologické kardioprotekce jsou na těchto pracovištích zkoumány už od 90. let minulého století. Na Ústavu farmakologie Lékařské fakulty byl zaveden skupinou prof. MUDr. Vladimíra Geršla, CSc. *in vivo* model antracyklinové kardiotoxicity na králících, který používá klinicky relevantní aplikace antracyklinů a byl také validován pomocí dexrazoxanu. Na Katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty pak probíhá pod vedením doc. PharmDr. Tomáše Šimůnka, Ph.D. *in vitro* hodnocení antracyklinové kardiotoxicity, a to jak na buněčné linii potkaních kardiomyoblastů H9c2, tak i na izolovaných primárních neonatálních potkaních kardiomyocytech. Na tomto pracovišti probíhá také hodnocení vlivu nových látek na aniproliferativní účinky antracyklinů. Nová potenciální kardioprotektiva jak z řady aroylhydrazonových chelátorů železa, tak nověji i analogů dexrazoxanu, jsou syntetizována na katedře anorganické a organické chemie FaF UK pod vedením doc. PharmDr. Kateřiny Vávrové, Ph.D. Studium farmakokinetických parametrů dexrazoxanu a jeho metabolismus, stejně jako hodnocení nových látek, se pak odehrává na katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv pod vedením doc. PharmDr. Petry Kovaříkové, Ph.D. Tímto komplexním přístupem se tato početná skupina snaží přispět k objasnění antracyklinové kardiotoxicity. V roce 2012 se tato

skupina, spolu s dalšími pracovišti stala součástí centra pro výzkum toxických a protektivních účinků léčiv na kardiovaskulární systém, které je jedním z univerzitních výzkumných center Univerzity Karlovy v Praze (UNCE 204019/304019/2012).

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. ANTRACYKLINOVÁ ANTIBIOTIKA

První zástupce antracyklinových antibiotik, daunorubicin, byl poprvé izolován z bakterie *Streptomyces peuceticus* v roce 1963 v Itálii (Grein a kol. 1963; Grein 1987). V roce 1969 byl následován doxorubicinem (adriamycin) (Arcamone a kol. 1969) a v průběhu dalších 40 let byla tato skupina rozšířena o dalších asi 2000 analogů, převážně semisyntetických, vyvinutých ve snaze o nalezení analogů s lepším terapeutickým indexem. Avšak pouze několik z nich bylo v různých státech registrováno a zavedeno do klinické praxe (většího uplatnění se dočkal pouze epirubicin) a dodnes nejpoužívanějšími látkami z této skupiny jsou dva „klasičtí“ zástupci, doxorubicin a daunorubicin. Jejich struktury se od sebe liší pouze přítomností hydroxyly na C-14 v molekule doxorubicinu, avšak tato malá změna má velký vliv na spektrum indikací těchto analogů. Zatímco daunorubicin se téměř výhradně používá v terapii akutní lymfoblastické a myeloblastické leukémie, spektrum použití doxorubicinu je mnohem širší, zahrnující jak krevní malignity, tak i solidní nádory (Minotti a kol. 2004; Brunton a kol. 2010). Struktury klinicky používaných zástupců antracyklinových antibiotik jsou znázorněny na Obr. 2.1.

2.1.1. MECHANISMY PROTINÁDOROVÉHO PŮSOBENÍ ANTRACYKLINŮ

V průběhu více než půlstoletí výzkumu antracyklinových antibiotik bylo navrženo několik možných mechanismů jejich protinádorového účinku. Tradičně byly antracykliny řazeny mezi tzv. interkalační cytostatika. Planární struktura antracyklinu se může zasunout mezi páry G-C v molekule DNA, kde je stabilizována van-der-Waalsovými silami a vodíkovými můstky, a tímto způsobem inhibovat jak replikaci, tak i transkripci DNA. Inhibice syntézy DNA a RNA může být způsobena také inhibicí DNA polymerasy nebo helikasy (Gewirtz 1999; Minotti a kol. 2004).

Spekulovalo se také o roli volných kyslíkových radikálů s následným poškozením okolních biomolekul, avšak většina studií prokazujících vliv volných kyslíkových radikálů

a oxidačního stresu používala značně supraterapeutické dávky antracyklinů. V některých studiích navíc nebyl prokázán vliv antioxidantních enzymů superoxid dismutasy, katalasy nebo glutathion peroxidasy na antiproliferativní působení antracyklinů (Lenehan a kol. 1995; DeGraff a kol. 1994).

Dalším pozorovaným jevem, který by mohl přinejmenším přispívat k antiproliferativnímu působení antracyklinů byla tvorba jejich DNA aduktů. Také tento jev byl pozorován pouze v supraterapeutických dávkách antracyklinů (Cummings a kol. 1991; Cummings a kol. 1992), avšak nepřímé důkazy svědčí o tom, že v buňce může tvorba aduktů probíhat i v nižších koncentracích (Skladanowski a Konopa 1994).

Dále pak je antracyklinům přisuzován také vliv na různé enzymy modifikující DNA, jako je helikasa II, DNA polymerasa, telomerasa nebo topoisomerasa II. V současné době je za hlavní mechanismus účinku antracyklinů označována právě interakce s topoisomerasou II (Brunton a kol. 2010). Antracykliny patří do skupiny inhibitorů topoisomerasy II označovaných jako topoisomerasové jedy. Zástupci této skupiny inhibují topoisomerasu II ve stádiu tzv. štěpného komplexu. V této fázi je enzym spojen s DNA tak, že molekula DNA je rozštěpena ve vzdálenosti 5 párů bazí a oba konce DNA jsou kovalentně vázány s tyrozinovými zbytky enzymu (Obr. 2.2 fáze 4). Tato fáze štěpného komplexu, která má za normálních podmínek velmi krátké trvání, je účinkem antracyklinů stabilizována a nedojde k opětovnému spojení molekuly DNA. Kolize replikačních nebo transkripčních enzymů s tímto komplexem vede k aktivaci proteolytických mechanismů, které vedou k degradaci topoisomerasy II a vzniku dvojitého zlomu v DNA (Deweese a Osheroff 2009).

Kromě ovlivnění DNA oxidačním stresem, přímou interkalací nebo ovlivnění enzymů manipulujících DNA se v poslední době objevují také studie sledující přímou aktivaci apoptotických cest molekul regulujících buněčný cyklus nebo expresi specifických růstových faktorů (Minotti a kol. 2004).

2.1.2. MECHANISMY ANTRACYKLINOVÉ KARDIOTOXICITY

Relativně častý nežádoucí účinek antracyklinů představuje myelotoxicita, která je, stejně jako další nežádoucí účinky vyskytující se při protinádorové léčbě obecně

(nauzea, zvracení, alopecie, mukositida), přechodná (Brunton a kol. 2010). V současné době díky moderní adjuvantní terapii hematopoetickými růstovými faktory a antiemetiky se podařilo závažnost těchto přechodných nežádoucích účinků snížit (Balducci 2000; Brunton a kol. 2010). Nejzásadnějším nežádoucím účinkem limitujícím celkovou podanou dávku antracyklinů je kardiotoxicita. Toxické působení antracyklinů na kardiomyocyty je na rozdíl od myelotoxicity irreverzibilní. Klinicky se projevuje jako dilatační kardiomyopatie s progresí do srdečního selhání. Tato toxicita postihuje především myocyty v levé komoře a septu (Hrdina a kol. 2000; Bird a Swain 2008; Colombo a kol. 2013).

Přes více než 50 let zevrubného výzkumu týkajícího se antracyklinové kardiotoxicity nejsou mechanismy vzniku tohoto poškození zcela vysvětleny. Žádná z dosud publikovaných hypotéz nebyla zatím jednoznačně prokázána, ale ani jednoznačně vyvrácena. Tradičně se největší podíl na patogenezi antracyklinové kardiotoxicity připisuje zvýšené tvorbě volných kyslíkových radikálů s následným poškozením vitálních struktur buňky. Avšak jednotlivé hypotézy se vzájemně nevylučují a je možné, že patogeneze antracyklinové kardiotoxicity je multifaktoriální (Štěrba a kol. 2013).

Zvýšená tvorba reaktivních forem kyslíku byla pozorována jak v *in vitro*, tak v *in vivo* experimentech a oproti dalším mechanismům byla právě tvorba kyslíkových radikálů antracykliny jako původce jejich kardiotoxicity studována nejvíce. V literatuře jsou popsány dva základní mechanismy tvorby volných kyslíkových radikálů molekulou antracyklinů. Jeden způsob vychází z tvorby semichinonové formy kyslíku na kruhu C. Radikál vzniklý touto jednoelektronovou redukcí se snadno stává donorem volného elektronu a v přítomnosti kyslíku vytváří superoxidový radikál ($\cdot\text{O}_2^-$). Za pomoci flavoproteinů a redukujících ekvivalentů (NADH nebo NADPH) je poté semichinonová forma regenerována. Tato sekvence reakcí je nazývána redoxním cyklem antracyklinů. Dismutací superoxidového radikálu katalyzovanou superoxid dismutasou vzniká relativně málo reaktivní peroxid vodíku, který je fyziologicky odstraňován pomocí katalasy a glutathion peroxidasy. Ovšem peroxid vodíku může také spolu se superoxidovým radikálem vytvářet vysoce reaktivní a toxický hydroxylový radikál ($\cdot\text{OH}$) při takzvané Haber-Weissově reakci. Tato reakce však, pokud není katalyzována některým přechodným kovem, zvláště pak železem, probíhá velmi pomalu (Halliwell a

Gutteridge 2007). Tvorbou superoxidového radikálu mohou antracykliny dále zvyšovat nitrobenčnou koncentraci volného katalyticky aktivního železa, jehož uvolňování z ferritinu je tímto radikálem podporováno (Thomas a Aust 1986).

Dalším mechanismem vzniku kyslíkových radikálů je jejich tvorba komplexem antracyklinu se železem. Díky kyslíkovým atomům přítomným v molekule antracyklinu na sousedních cyklech může železo tvořit s těmito kyslíkovými atomy a souborem elektronů nad benzenovými jádry cyklů redox-aktivní soustavu. V přítomnosti redukčních ekvivalentů (NADH, glutathionu nebo jiných thiolů) je trojmocné železo v tomto systému redukováno na dvojmocné, které vytváří s molekulou kyslíku opět superoxidový radikál. Komplex s dvojmocným železem může také reagovat přímo s peroxidem vodíku za vzniku hydroxylového radikálu. Komplex antracyklinů se železem může podléhat i intramolekulární redoxní reakci za vzniku radikálu s dvojmocným železem, který v přítomnosti kyslíku vytváří opět superoxidový radikál (Keizer a kol. 1990).

Oxidační poškození kardiomyocytů v souvislosti s tvorbou volných kyslíkových radikálů antracykliny jako hlavní mechanismus antracyklinové kardiotoxicity byl podpořen studii, v nichž zvýšením dostupnosti železa došlo ke zvýšení toxicity antracyklinů, a to jak v *in vitro* buněčné kultuře izolovaných kardiomyocytů (Hershko a kol. 1993), tak *in vivo* u potkanů (Link a kol. 1996). Přestože není pochyb o tom, že molekula antracyklinů má chemické vlastnosti více než příznivé ke tvorbě volných kyslíkových radikálů, přímé důkazy o oxidačním poškození kardiomyocytů antracykliny pocházejí často ze studií používajících velmi vysoké koncentrace antracyklinů aplikované navíc jen v jedné bolusové intraperitoneální dávce. Toto podání se však dramaticky liší od formy podání antracyklinů v klinické praxi, kde jsou antracykliny podávány spíše v prodloužených režimech z důvodu snížení maximální hladin antracyklinů v plasmě. V těchto studiích bylo tedy sledováno spíše akutní poškození srdce, které nemá k pozdějším formám kardiotoxicity antracyklinů jednoznačný vztah (Hrdina a kol. 2000). V klinické praxi jsou také antracykliny podávány striktně intravenózně. Při náhodné extravazaci dochází k závažným nekrotickým a tedy při intraperitoneálním podání se dá očekávat celková zánětlivá odpověď organismu, která může mít vliv i na redoxní homeostázu v srdci.

Antracykliny také interagují s metabolismem vápníku. Byla například prokázána snížená exprese ryanodinového receptoru (Boucek a kol. 1999). Antracykliny také ovlivňují vápníkové kanály na povrchu kardiomyocytů (Solem a Wallace 1993). Přetížení vápníkem, které bylo pozorováno v důsledku expozice kardiomyocytů antracyklinům vede k aktivaci proteolytického enzymu kalpainu, který dále štěpí kontraktální vlákna a další proteiny (například sarkoplasmatickou kaspázu 12) (Lim a kol. 2004). Přetížení vápníkem může také přímo působit na mitochondrie a vyvolávat uvolnění cytochromu c, vedoucí k aktivaci vnitřní cesty apoptózy. (Minotti a kol. 2004; Štěrbá a kol. 2013) .

V souvislosti s působením antracyklinů byly zaznamenány také změny v expresi některých proteinů jak ve smyslu zvýšené, tak i snížené exprese. Byla zaznamenána také zvýšená degradace proteinů, jak už dříve zmíněným kalpainem, tak i prostřednictvím proteazomu (Štěrbá a kol. 2011; Boucek a kol. 1999). V současné době však nelze vyvodit jasný závěr, který z pozorovaných jevů je primární příčinou poškození a který jen následkem nastartovaných procesů.

2.1.3. MOŽNOSTI PREVENCE ANTRACYKLINOVÉ KARDIOTOXICITY

Základním kardioprotektivním zásahem, nejčastěji používaným v klinické praxi je omezení celkově podané dávky antracyklinů. Tento přístup však může také mít za následek omezení terapeutického potenciálu antracyklinů. Jelikož bylo navrženo, že kardiotoxicita antracyklinů je spojena s vysokými plasmatickými koncentracemi, zatímco jejich protinádorová účinnost závisí spíše na koncentrací antracyklinů ve tkáních po co nejdelší dobu (Legha a kol. 1982a), studovaly se také různé způsoby aplikace antracyklinů. Prvotní studie porovnávající podání antracyklinů pacientům ve formě infuze s bolusovým podáním potvrzovaly zachování protinádorové aktivity spolu se současným snížením kardiotoxicity v tomto schématu (Hortobagyi a kol. 1989; Zalupski a kol. 1991), avšak novější studie signifikantní protekci nenalezly (Lipshultz a kol. 2002; Levitt a kol. 2004).

2.1.3.1. *Nové analogy antracyklinů*

Mitochondrie jako primární cíl antracyklinové kardiotoxicity vedly k myšlence vytvořit antracykliny, primárně cílené do buněčného jádra. Toto splňují konjugáty antracyklinů

s formaldehydem jak syntetizované, nebo vytvořené intracelulárně. Cílení do jádra se dá také dosáhnout substitucí aminoskupiny na C-3 za hydroxylové nebo acylové substituenty. Substituce hydroxylem sice nevede k modifikaci interakce s topoisomerasou II, ale ovlivňuje rozpustnost. Naopak acylové substituenty inhibici topoisomerasy a cytotoxicitu snižují. Nadějnou strategií se jevila syntéza morfolinových derivátů antracyklinů. Tyto deriváty modifikují mechanismus účinku, zvýšením podílu alkylace DNA a DNA cross-linking. U těchto derivátů, přestože schopnost tvorby kyslíkových radikálů je zachována, byla experimentálně potvrzena snížená kardiotoxicita. V klinických studiích byla u některých analogů zaznamenána vyšší gastrointestinální toxicita a poškození centrální nervové soustavy, ohledně kardiotoxicity dosáhly tyto studie smíšených výsledků (Bakker a kol. 1998; Fokkema a kol. 2000; Takemoto a kol. 1999; Kuratsu a kol. 2000).

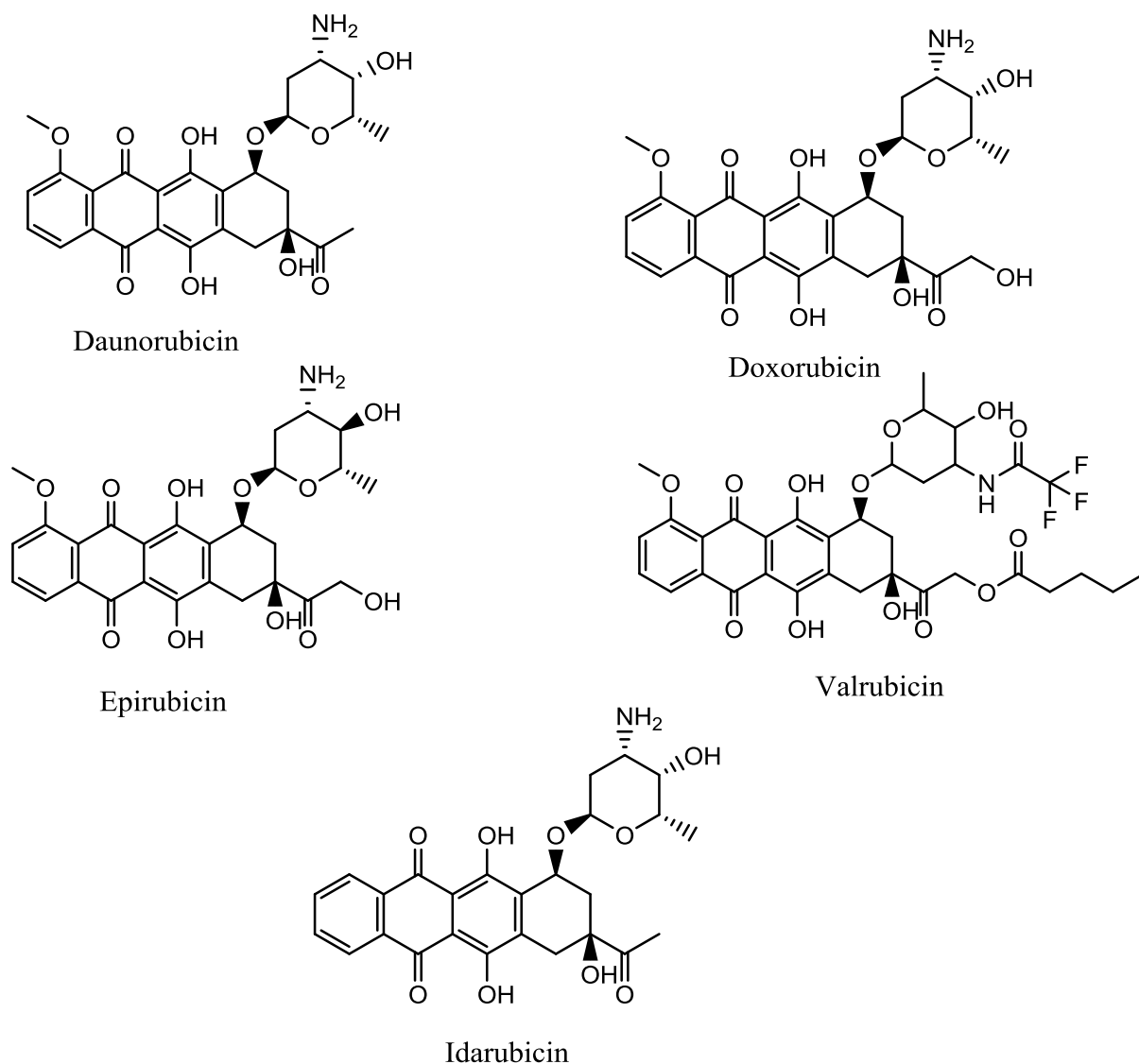
Další modifikací aminoskupiny C-3 schopnou zacílit molekulu antracyklinů do jádra je alkylace. Tyto analogy neinhibují topoisomerasu II, ale interkalují do DNA a kovalentně se váží na guaninové a adeninové zbytky. Tyto analoga byly účinné i u nádorů rezistentních na klasické alkylační látky (cis-platina, melfalan). V preklinickém hodnocení na potkanech byla pozorována asi dvacetinásobně snížena kardiotoxicita oproti dávce doxorubicinu indukujícím stejnou míru myelotoxicity, pravděpodobně díky zvýšené plasmatické clearance (Geroni a kol. 2001; Marchini a kol. 2001).

Disacharidová analoga antracyklinů jsou značně heterogenní skupinou s ohledem na jejich cytotoxicitu. I malá změna v konfiguraci často znamená vymizení protinádorového účinku. Avšak nejúspěšnější zástupci této skupiny vykazaly až sedminásobně vyšší cytotoxickou aktivitu než daunorubicin a srovnatelnou aktivitu s doxorubicinem. Cytotoxicita těchto analogů byla úměrná míře jejich interakce s topoisomerasou II (Arcamone a kol. 1999). Přestože v preklinických studiích vykazoval zatím nejvíce prostudovaný zástupce této skupiny sabarubicin slibné výsledky jak v případě protinádorové aktivity tak kardiotoxicity, v klinických studiích byl zaznamenán pokles srdeční funkce (Schrijvers a kol. 2002).

14-O-acylantracykliny jsou deriváty antracyklinů, které nebyly syntetizovány pro cílení do jádra, ale spíše do perinukleárního kompartmentu. Z této skupiny byl nejvíce

studován valrubicin, o němž se soudí, že je katalytickým inhibitorem proteinkinasy C (Wani a kol. 2000). Valrubicin jako jeden z mála nových analogů antracyklinů byl registrován americkou FDA pro léčbu rakoviny močového měchýře cestou přímé aplikace do močového měchýře (Kuznetsov a kol. 2001; van der Heijden a Witjes 2003).

Doposud se do klinické praxe dostalo z více než 2000 syntetizovaných analogů antracyklinů jen několik málo látek, jako je idarubicin, epirubicin, valrubicin (Obr. 2.1). Zvláštní pozornost byla věnována epirubicinu, protože v úvodních preklinických i klinických studiích byla pozorována nižší incidence kardiotoxicity, která byla přisuzována nižší tvorbě alkoholických metabolitů epirubicinu ve srovnání s doxorubicinem (Minotti a kol. 2000). Avšak novější studie ukazují, že v ekvipotentních dávkách je incidence kardiotoxicity srovnatelná mezi těmito dvěma látkami (Iarussi a kol. 2005).



Obr. 2.1 Chemické struktury klinicky používaných antracyklinů

2.1.3.2. Lipoosmální formulace antracyklinů

Inkorporace do liposomů je nejpoužívanější strategií pro pasivní cílení antracyklinů k nádorům (Minotti a kol. 2004). Pasivní cílení v tomto případě spočívá ve využití odlišností ve vlastnostech cév v normální a nádorové tkáni. Cévy v nádorové tkáni jsou charakterizovány vyšší fenestrací než cévy v běžných tkáních a na rozdíl od nich tedy propouští i tyto liposomální částice. Vedle toho jsou nádorové tkáně nedostatečně protkány lymfatickými cestami, kterými jsou liposomy z nádoru odstraňovány, a dochází tedy k jejich akumulaci v nádorové tkáni (Matsumura a Maeda 1986). Lipoosmální formulace antracyklinů jsou obecně charakterizovány sníženým distribučním objemem, sníženou clearance a prodlouženým biologickým poločasem

(Drummond a kol. 1999). Je snížen také metabolismus na aglykony a alkoholické metabolity antracyklinů. Touto formulací je také možno částečně omezit rezistenci nádorů způsobenou zvýšenou exkrecí antracyklinů z buněk P-glykoproteinem (Mickisch a kol. 1992). Lipidová dvojvrstva se vyznačuje značně omezenou propustností jak pro hydrofilní, tak pro amfifilní látky a proto jsou liposomální formulace značně stabilní jak při skladování, tak v plasmě. Kromě jednoduchých liposomálních částic se také často využívají tzv. stericky stabilizované liposomy, které se vyznačují přítomností polyethylenglykolu na svém povrchu. Tyto stericky stabilizované částice pravděpodobně mají omezenou vazbu na sérové opsoniny a také méně interagují s buňkami retikulo-endoteliálního systému, mají ještě delší plasmatický poločas a zvýšenou lokalizaci do nádorové tkáně, než klasické liposomy (Drummond a kol. 1999).

Liposomální formulace se také využívají k aktivnímu cílení antracyklinů a to pomocí jejich konjugace s molekulami cukrů, sérových proteinů, protilátek nebo jejich fragmentů. Tímto přístupem lze zvýšit přestup antracyklinů i do vnitřních vrstev solidních nádorů, které jsou pasivně cílenými formulacemi zasaženy méně, což by mohlo vést ke vzniku rezistentních populací uvnitř nádorů. Tento průnik do vnitřních vrstev byl pozorován například v případě podání liposomů vázajících Fab' fragment trastuzumabu (Park a kol. 2002). Konjugace s protilátkami je možno využít také pro cílení antracyklinů do jednotlivých orgánů, jak je tomu například v případě plicní lokalizace pomocí thrombomodulinu exprimovaného na plicním endotelu (Mori a kol. 1995).

V preklinických i klinických studiích zabývajících se srovnáním účinnosti tradičních a liposomálních antracyklinů se zdá, že liposomální formulace jsou účinnější a méně kardiotoxické než parentní látky (Waterhouse a kol. 2001). Také alopecie, nauzea a zvracení se vyskytovaly méně často. Avšak při podání liposomálních formulací se vyskytuje ve zvýšené míře palmoplantární dysestezie (tzv. hand-foot syndrom). Tento syndrom je jedním z nežádoucích účinků limitujících podanou dávku. Vyznačuje se hyperkeratózou a parakeratózou ve stratum corneum. Po přerušení terapie dojde k deskvamaci a reepitelizaci postižených oblastí v průběhu 3 až 7 týdnů. Tento syndrom byl popsán také při infuzním dlouhodobé podávání antracyklinů, ale v tomto případě je návrat poškozeného epitelu rychlejší. Lze tedy spekulovat, že liposomální formulace a

uvolňování antracyklinů z liposomů svým způsobem simuluje infuzní podání. Také výskyt mukositivity je při podání liposomálních antracyklinů (stejně jako při infuzním podání) vyšší (Waterhouse a kol. 2001). Dalším velmi závažným nežádoucím účinkem je snížení kompetence retikuloendoteliálního systému, převážně pak snížení počtu a fagocytární aktivity Kupferových buněk v játrech (Daemen a kol. 1995). Tento nežádoucí účinek souvisí s primární cestou eliminace liposomálních antracyklinů, která je právě fagocytózou jaterními nebo střevními makrofágy. Vedle obrany proti bakteriálním a virovým onemocněním a mykózám jsou makrofágy důležité při likvidaci metastáz nádorů, což by v tomto případě znamenat překážku v širším použití liposomálních antracyklinů (Drummond a kol. 1999). Recentní randomizované studie jak u dospělých, tak i dětských pacientů však potvrzují obecně menší toxicitu liposomálních antracyklinů se současným zvýšením účinnosti a možností podání u refrakterních nádorů a v kombinacích s dalšími protinádorovými látkami, které mohou zvýšit kardiotoxicitu antracyklinů (Fulbright a kol. 2010; Safra 2003).

2.1.3.3. Kardioprotektivní látky

Další z dvojice nejvíce studovaných směrů prevence kardiotoxicity stávajících antracyklinů je protekce pomocí látek s kardioprotektivním potenciálem. V tomto směru je zatím jedinou registrovanou léčivou látkou dexrazoxan (Brunton a kol. 2010).

Antioxidanty

Teorie oxidačního poškození kardiomyocytů jako mechanismu antracyklinové kardiotoxicity vedla k výzkumu možností kardioprotekce pomocí látek s antioxidantními vlastnostmi. Byly zkoušeny vitamíny (A, C, E), donory redukcujících thioskupin jak z oblasti látek tělu vlastních, tak syntetických (N-acetylcystein, glutathion, amifostin), některé flavonoidy a léčiva s antioxidantními vlastnostmi (Štěřba a kol. 2013).

Ačkoliv preklinické *in vitro* a také některé *in vivo* studie dokládaly velmi povzbudivé výsledky při použití antioxidantů proti antracyklinové kardiotoxicitě způsobené vysokými dávkami a koncentracemi antracyklinů v akutních experimentech, na chronických modelech vykazovaly často i opačné působení. Zvláště zajímavá byla v tomto ohledu především studie Berthiaume a kolegů (2005), kteří po suplementaci

vitamínem E zaznamenali snížení oxidačního stresu způsobeného doxorubicinem, avšak tato změna nebyla doprovázena změnou v parametrech srdeční funkce. Ani v klinických studiích, přestože byly prováděny na velmi malých souborech pacientů, suplementace vysokými dávkami antioxidantů nevykazovala jakékoli kardioprotektivní účinky (Legha a kol. 1982b; Dresdale a kol. 1982).

Také mnoho flavonoidů a rostlinných extraktů bylo s velmi příznivými výsledky zkoušeno na akutních modelech antracyklinové kardiotoxicity. Flavonoidy mohou vázat železnaté ionty a je pravděpodobné, že právě chelatace železa je zodpovědná za velkou část jejich antioxidační aktivity. Avšak při porovnání kardioprotektivních vlastností se schopností skupiny flavonoidů Kaiserová a kolegové (2007) neprokázali jakoukoli korelaci s jejich schopností chelatovat železo. Ze skupiny flavonoidů se do stádia klinického hodnocení dostal pouze monoHER, avšak povzbudivé výsledky z krátkodobých studií se v dlouhodobějším měřítku nepotvrdily (Bruynzeel a kol. 2007b; Bruynzeel a kol. 2007a).

Také některé registrované léčivé látky s antioxidačními vlastnostmi byly hodnoceny z hlediska jejich kardioprotektivního potenciálu. Signifikantní kardioprotekce byla prokázána po podání probukolu a karvediolu (Siveski-Iliskovic a kol. 1995; Matsui a kol. 1999). Opakovaně prokázané protektivní účinky probukolu byly však později přisouzeny interakci s antracykliny na úrovni farmakokinetiky (El-Demerdash a kol. 2003). Kardioprotektivní účinky karvediolu byly zkoumány pouze preklinicky ve zkrácených modelech antracyklinové kardiotoxicity. Pro vyloučení účinků závislých na beta1 receptorech byl účinek karvediolu srovnán s atenololem. Pouze karvediol vykazoval protektivní účinky, proto za podstatu jeho účinku byly označeny právě jeho antioxidační vlastnosti (Matsui a kol. 1999; Oliveira a kol. 2004).

2.1.3.4. *Dexrazoxan*

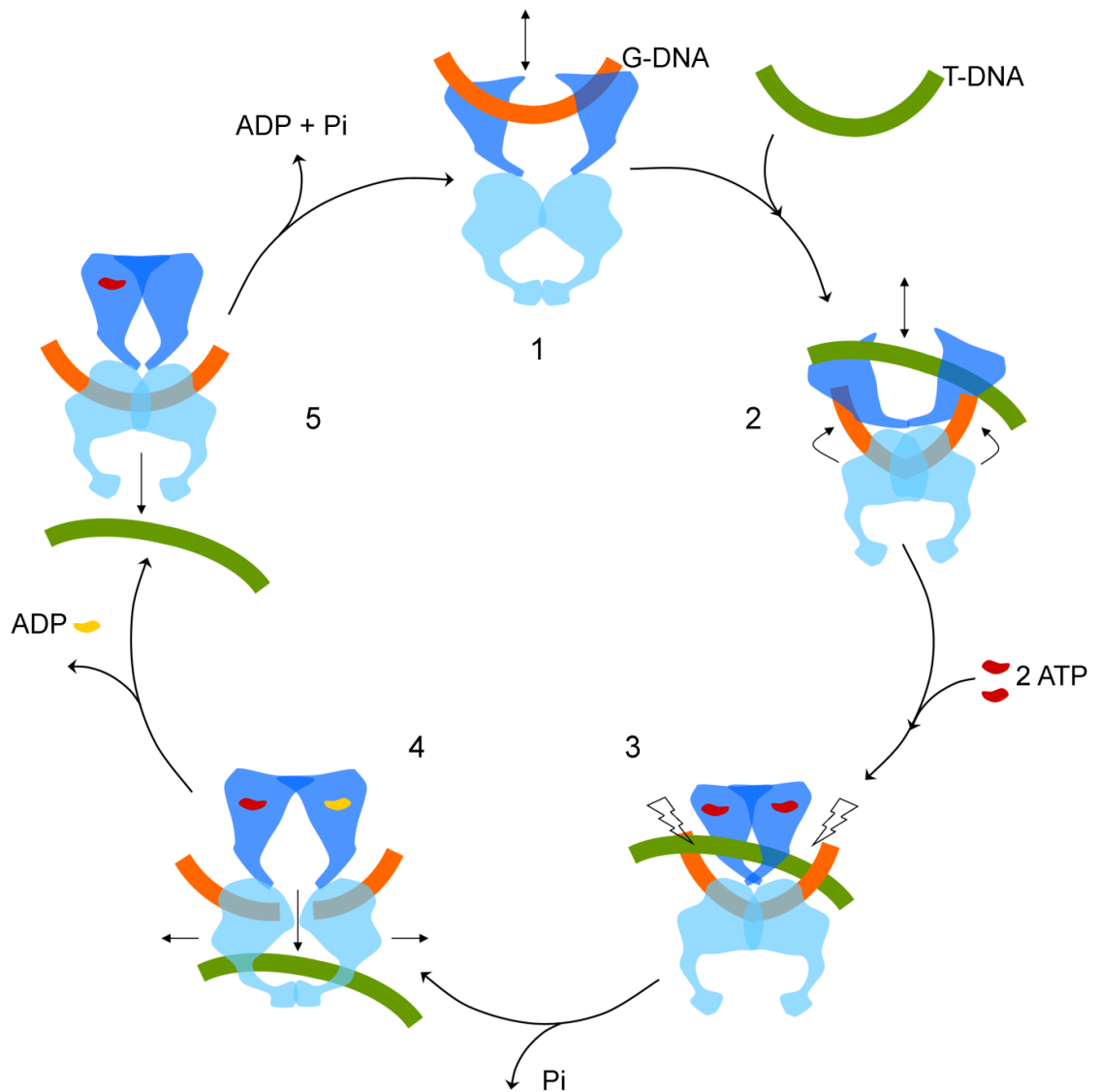
Dexrazoxan je pravotočivým enantiomerem racemického razoxanu. Ten byl původně vyvinut ve snaze najít analog EDTA schopný prostupovat do nádorových buněk a chelatovat důležité mikroprvky. Cytotoxické účinky razoxanu nejsou příliš výrazně vyjádřeny a razoxan působí spíše cytostaticky, navíc toto cytostatické působení selektivní pro nádorové buňky a jsou jím postiženy i jiné proliferující tělní buňky. Brzy

však byly objeveny jeho antimetastatické, antiinvazivní a radiosenzitizační účinky, díky kterým je razoxan využíván převážně v kombinační terapii některých malignit (Rhombert a Hellmann 2011).

Antiinvazivní a antimetastatické účinky jsou pravděpodobně spojeny s interakcí razoxanu s kolagenasami v extracelulární matrix nádoru. Tyto enzymy způsobují uvolnění nádorových buněk z bazální membrány degradací kolagenu, kterou razoxan inhibuje (Karakiulakis a kol. 1989). Svůj podíl na antimetastatickém působení mají také účinky razoxanu na normalizaci nádorových cév. Čím rychlejší je růst nádoru, tím více změn cévy vykazují. Zpomalením růstu nádoru je tedy dosaženo normalizace cév v nádoru. Zpomalení růstu nádoru bylo nazváno jako cytoallentrický účinek razoxanu (Rhombert a Hellmann 2011).

In vitro vykazuje jak razoxan tak dexrazoxan cytostatickou aktivitu bloádou buněčného cyklu v G₂/M fázi, kdy jsou buňky zvláště citlivé na ionizující záření (Kovacs a kol. 1979). Tato bloáda však postihuje také dělicí se nenádorové buňky. Dělicí se buňky, které jsou vystaveny těmto látkám, značně zvýší svůj objem. DNA se dokáže replikovat, ale buňka není schopná se rozdělit a vznikají polyploidní buňky (Hallowes a kol. 1974). Tento fakt může vysvětlit nálezy klinických zkoušek razoxanu a dexrazoxanu. Přestože v nich nedošlo ke zmenšení nádorů, celkové přežití bylo zvýšeno (Swain a kol. 1997a).

Tato G₂/M bloáda je způsobena katalytickou inhibicí topoisomerasy II. Katalytická inhibice, na rozdíl od inhibice způsobené topoisomerasovými jedy nevede k poškození DNA dvojitými zlomy, protože topoisomerasa je inhibována v jiné fázi katalytického cyklu než je štěpný komplex. Konkrétně dexrazoxan brání hydrolýze druhé molekuly ATP a tím dokončení celého katalytického cyklu (Larsen a kol. 2003). Topoisomerasa II patří do rodiny enzymů, které katalyzují změny v topologii DNA pomocí tvorby dočasného dvojitého zlomu v DNA, kterým je transportována druhá molekula DNA nebo část kruhové DNA za současné hydrolýzy dvou molekul ATP (Larsen a kol. 2003; Dewese a Osheroff 2010). Katalytický cyklus topoisomerasy je znázorněn na Obr. 2.2.



Obr. 2.2 Katalytický cyklus topoisomerasy II (Vávrová a Šimůnek 2012)

Topoisomerasa II jako společný cíl antracyklinů a dexrazoxanu vede logickým k obavám z možného negativního ovlivnění antineoplastického účinku antracyklinů dexrazoxanem. Studie provedená na proliferující, avšak nenádorové linii křeččích ovariálních (CHO) buněk naznačila možný antagonismus v závislosti na časovém schématu podání dexrazoxanu a antracyklinů (Hasinoff a kol. 1996).

V úvodních preklinických a klinických studiích se antagonismus dexrazoxanu a antracyklinů neprokázal (Woodman a kol. 1975; Rhomberg a Hellmann 2011). Jedinou studií, která upozornila na možný antagonismus, byla jedna ze dvou podobných studií třetí fáze klinického zkoušení této kombinace. V těchto studiích byla hodnocena

objektivní odpověď na léčbu, přežití i doba do progresu onemocnění. Jedna z těchto studií zahrnující 123 pacientů nenašla signifikantní rozdíl mezi skupinou léčenou antracykliny v kombinaci s dexrazoxanem a skupinou léčenou antracykliny s placebem v žádném z parametrů. Ve druhé studii, čítající 293 pacientů, byla nalezena signifikantně nižší odpověď na léčbu u dexrazoxanové skupiny, na další dva parametry úspěšnosti léčby (celkové přežití a doba do progresu onemocnění) vliv neměl (Swain a kol. 1997b). Avšak tento rozdíl, jak bylo později zhodnoceno, vyplýval spíše z nezvykle velkého procenta odpovědi ve skupině placeba. Přesto tato jedna studie ovlivnila doporučení posléze vydaná, podle kterých je navrženo podávat dexrazoxan pacientům až od dosažené kumulativní dávky antracyklinů větší než 300 mg/m² (Seymour a kol. 1999).

Interakce s topoisomerasou II je také mechanismem dalšího významného nežádoucího účinku dexrazoxanu. Přestože je dexrazoxan relativně netoxická látka a je většinou dobře snášen, ve vyšších dávkách byla zaznamenána myelotoxicita, která souvisí s neselektivním účinkem dexrazoxanu na nádorové i dělící se nenádorové buňky (Von Hoff 1998; Hallowes a kol. 1974). Dalším potenciálně závažným nežádoucím účinkem je možná indukce sekundárních malignit dexrazoxanem, především akutní myeloidní leukemie. První případ spjatý s razoxanem byl zaznamenán v roce 1981 poté ještě několik případů u pacientů léčených velmi vysokými dávkami razoxanu (Rhombert a Hellmann 2011). Z novějších klinických studií ale žádná neprokázala jejich vyšší výskyt při použití dexrazoxanu jako kardioprotektiva spolu s antracykliny (Van Dalen a kol. 2011). Později se ukázalo, že dexrazoxan je schopen ochránit i jiné tkáně proti antracyklinové toxicitě, ale také je schopen zamezit toxicitě i některých jiných protinádorových léčiv jako je mitoxantron (Weilbach a kol. 2004), bleomycin (Herman a kol. 1995), etoposid (Holm a kol. 1996) a cis-platina (Woodman 1974). Protekce byla také pozorována v některých pracích i proti kardiotoxicitě isoprenalinu, testosteronu, hypoxicko-reperfučnímu poškození srdce, hepatotoxicitě paracetamolu nebo toxickému poškození plic vyvolanému bleomycinem nebo hyperoxií (Rhombert a Hellmann 2011). Je zajímavé, že u většiny těchto látek je možná příčina ve vzniku dvojitých zlomů v DNA, ale také se v souvislosti s některými z těchto toxicit hovoří o možném oxidačním poškození v důsledku interakce s železnatými ionty.

Například v případě testosteronu byly zaznamenány v *post mortem* vzorcích sportovců postižených náhlou smrtí podobné histopatologické změny, jako u pacientů léčených antracykliny a při použití experimentálního modelu tohoto poškození bylo zjištěno, že i toxicita testosteronu může být zmírněna použitím dexrazoxanu (Belhani a kol. 2009). Mechanismus, kterým testosteron toto poškození způsobuje, nebyl dosud objasněn, avšak fakt, že testosteron je jaderný hormon, který ovlivňuje expresi různých proteinů, mezi jinými také topoisomerasy II (Bakshi a kol. 2001), naznačuje, že právě topoisomerasa II by mohla být spojovacím článkem mezi toxicitou testosteronu a její protekcí dexrazoxanem.

Bis-dioxopiperaziny jsou méně polárními analogy EDTA. Proto v raných klinických studiích byla monitorována hladina vápníku v séru pacientů po podání razoxanu, avšak významná změna zjištěna nebyla (Bellet a kol. 1973). Byl však potvrzen vliv dexrazoxanu na exkreci zinku a železa močí v průběhu 96-hodinové infuze, kdy exkrece vzrostla 2,4 – 3,7 krát (Tetef a kol. 2001). Metabolit dexrazoxanu ADR-925 váže jak železnaté, tak železité ionty, avšak mnohem slaběji, než EDTA (s rozdílem několika řádů). Podobně jako EDTA je komplex ADR se železem schopen tvořit volné kyslíkové radikály v tzv. redoxním cyklu, kdy vázané železo, podobně jako v molekule antracyklinů cyklicky mění svoje oxidační číslo a za přítomnosti redukujících ekvivalentů jsou tvořeny hydroxylové radikály (Malisza a Hasinoff 1995). ADR-925 je také schopen odnímat železo z komplexu s doxorubicinem a také jak dexrazoxan, tak jeho metabolity byly schopny vyvézt železo v buňkách z jeho komplexu s kalceinem, z čehož vyplývá, že nejen dexrazoxan, ale také jeho metabolity včetně ADR byly schopné pronikat do buněk (Hasinoff 2002).

Navzdory prokázané schopnosti metabolitů dexrazoxanu včetně ADR pronikat do buněk (i když pomaleji než dexrazoxan), nebyly tyto metabolity schopné ochránit kardiomyocyty před poškozením způsobeným klinicky relevantní dávkou doxorubicinu (1,5 μM) *in vitro*. Tato neschopnost byla přisouzena možnosti, že dexrazoxan, na rozdíl od jeho metabolitů, je schopen zabránit tvorbě volných radikálů na nejvíce antracyklinům exponovaných místech, tedy především v mitochondriích a sarkoplasmatickém retikulu (Hasinoff a kol. 2003b).

Za fyziologického pH nebyl ADR schopen vyvazovat železo z komplexu s transferinem a ferritinem, ale ukázalo se, že velmi pomalu vyvazuje měď z komplexu s ceruloplasminem (Hasinoff a Kala 1993). Volné ionty mědi mohou také jako katalyzátory Haber-Weissovy reakce a proto i chelatace volných iontů mědi by mohla být mechanismem působení ADR-925. Zvláště pokud, jak navrhl Kaiserová a kolektiv (2006), nehraje železo v oxidačním poškození doxorubicinem významnou roli.

2.1.3.5. *Analoga dexrazoxanu*

Další látky ze skupiny bis-dioxopiperazinů byly vyvíjeny a hodnoceny zejména z hlediska protinádorové aktivity (Creighton a kol. 1969). V mnohem menší míře byly studovány jejich kardioprotektivní vlastnosti. V roce 1985 Herman a kolegové studovali 19 bis-dioxopiperazinových derivátů na akutním modelu antracyklinové kardiotoxicity (jedna aplikace 25 mg/kg doxorubicinu) spolu s dexrazoxanem (12,5 – 200 mg/kg). Z této série pouze tři látky byly schopné snížit mortalitu: dexrazoxan, levrazoxan – jeho levotočivý enantiomer a bimolan) (Herman a kol. 1985b). Také na chronickém modelu používajícím spontánně hypertenzní potkany (1 mg/kg týdně po dvanáct týdnů) byl testován dexrazoxan, čtyři jeho analogy a také jeho metabolit ADR-925 v dávce 50 mg/kg intraperitoneálně. Přestože všechny zkoušené látky byly schopné hydrolyzy na železo-chelatující produkty, které v roztoku vyvazovaly železnaté ionty z komplexu s antracykliny, žádný z analogů nevykazoval lepší protektivní schopnosti než dexrazoxan. Avšak u dvou derivátů (ICRF-154 a ADR-559) byla pozorována protekce s dexrazoxanem srovnatelná. Metabolit dexrazoxanu ADR-925 nevykazoval žádné kardioprotektivní schopnosti (Zhang a kol. 1994).

Tato data byla nedávno doplněna o studii zabývající se porovnáním kardioprotektivního účinku dexrazoxanu s jeho blízkým analogem ICRF-161, který je schopen hydrolyzy na železo-chelatující metabolit, ale parentní látka nemá inhibiční vlastnosti na topoisomerasu II. V této studii byly účinky obou látek porovnávány jak na *in vitro* úrovni na modelu izolovaných neonatálních kardiomyocytů, tak i *in vivo* na chronickém modelu používajícím spontánně hypertenzní potkany (1 mg/kg, 12 týdnů). V *in vitro* studii byly obě látky schopné zabránit toxicitě navozené kontinuální expozicí kardiomyocytů 1,8 μ M doxorubicinu, ale pouze dexrazoxan chránil potkany v *in vivo*

experimentu před předčasným úhynem a také před typickým histopatologickým nálezem navozeným chronickou expozicí doxorubicinu (Martin a kol. 2009).

2.1.3.6. Chelátory železa

Studium chelatace železa jako způsobu prevence antracyklinové kardiotoxicity byl logickým důsledkem objevu protektivních vlastností dexrazoxanu. Tato strategie byla také podpořena zjištěním, že při přetížení buněk železem je antracyklinová kardiotoxicita významně zvýšena (Link a kol. 1996). Na rozdíl od antioxidantů, které se snaží omezit již vzniklé kyslíkové radikály, chelátory železa by mohly přímo zabraňovat jejich vzniku. Navíc díky tomu, že protinádorová účinnost antracyklinů není způsobena tvorbou volných radikálů, chelátory železa by pravděpodobně neměly účinnost antracyklinů omezovat, což bylo prokázáno i experimentálně. Většina chelátorů železa, které byly doposud zkoušeny pro prevenci antracyklinové kardiotoxicity, byla vyvinuta pro léčbu chorob spojených s přetížením železa, převážně pak beta-talasemie (Kalinowski a Richardson 2005).

První studovanou látkou byl v devadesátých letech minulého století deferoxamin. Při stavech spojených s přetížením železem deferoxamin váže volné železo v plasmě a urychluje jeho vylučování močí (Hershko a kol. 2003). Jeho použití proti antracyklinové kardiotoxicitě *in vitro* vedlo k protekci, avšak pouze u buněk se zvýšenou expozicí železu (Hershko a kol. 1993). Protekce byla také prokázána v akutním *ex vivo* experimentu na modelu izolovaných myších atrií. Avšak byla také pozorována zvláštní dávková závislost, která byla později pozorována i u jiných chelátorů. Již 2,5 násobné zvýšení dávky vedlo k vymizení účinku (Voest a kol. 1994). Naproti tomu v chronickém *in vivo* modelu nedokázal ochránit spontánně hypertenzní potkany proti toxicitě způsobené 12 dávkami doxorubicinu (1 mg/kg týdně) (Herman a kol. 1994). Vzhledem k vysoké molekulové hmotnosti a také hydrofilitě byla neúčinnost vysvětlena nedostatečným průchodem do buněk. Další výzkum se tedy soustředil na menší a lipofilnější chelátory.

Deferipron naopak velmi dobře proniká do tkání a buněk, kde chelatuje volné železo. Jeho aktivita byla prokázána také uvnitř mitochondrií a lysozomů (Glickstein a kol. 2006). Dvě *in vitro* studie demonstrovaly účinnost deferipronu proti antracyklinové

kardiotoxicitě jak v podmínkách se zvýšeným, tak i normálním obsahem železa (Barnabé a kol. 2002; Link a kol. 1996). Také v *ex vivo* podmínkách deferipron zabránil snížení kontraktility potkaních atrií po inkubaci s 30 μM doxorubicinem (Xu a kol. 2006). Avšak ani deferipron nebyl schopen dosáhnout protekce srovnatelné s dexrazoxanem v chronickém modelu antracyklinové kardiotoxicity u králíka. Naopak, vyšší použitá koncentrace deferipronu, která byla sama netoxická, vedla k časnějším úmrtím zvířat. Koncentrace deferipronu v této studii byly navrženy podle farmakokinetické studie tak, aby koncentrace v plasmě králíků odpovídaly koncentracím, jež vedly k protekci v *in vitro* studiích (Popelová a kol. 2008).

Ve stejném *in vitro* modelu jako deferipron byla hodnocena také ještě novější nízkomolekulární chelátor železa deferasirox. Na rozdíl od deferipronu však deferasirox izolované kardiomyocyty před poškozením navozeným doxorubicinem nechránil, přestože byla prokázána jeho schopnost chelátovat volné železo v srdci ve stavech přetížení železem a také chránit H9c2 kardiomyoblasty proti toxicitě *tert*-butyl hydroperoxidu (Hasinoff a kol. 2003a).

Aroylhydrazony jsou další skupinou, která byla vyvinuta pro léčbu toxicity spojené s přetížením železem. Nejdůležitějšími zástupci této skupiny jsou pyridoxal isonikotinoyl hydrazon (PIH) a jeho analogy se salicylaldehydovou (SIH) a *ortho*-chlorbenzoylovou skupinou (*o*-108). V experimentech *in vitro* SIH chránil izolované morčecí kardiomyocyty (Horackova a kol. 2000) a také H9c2 kardiomyoblasty proti oxidačnímu poškození způsobenému peroxidem vodíku (Šimůnek a kol. 2005). SIH a *o*-108 byly také použity v *in vivo* modelu chronické antracyklinové kardiotoxicity. Obě látky byly v nižší použité dávce schopné protekce proti předčasnému úhynu zvířat, snížení kontraktility myokardu, histopatologickým změnám i uvolnění troponinů z kardiomyocytů. Avšak stejně jako v případě deferoxaminu zvýšení dávky vedlo k vymizení protektivních účinků (Štěrbá a kol. 2007). V případě aroylhydrazonů však tato zvláštní dávková závislost, která není pozorována u dexrazoxanu může být způsobena jejich farmakokinetickými vlastnostmi, tedy velmi krátkým biologickým poločasem a naopak vysokými maximálními plasmatickými koncentracemi.

Nedávno bylo zjištěno, že antracykliny s metabolismem železa interagují komplexněji a můžou paradoxně způsobovat deficit železa, jehož optimální hladina je nutná pro funkci některých enzymů (což je pravděpodobně principem protinádorového působení chelátorů železa), zvláště v mitochondriích, kde je tento deficit spojen s oxidačním poškozením. Chelátory by tento stav mohly dále prohlubovat a tímto způsobovat zvýšenou toxicitu v kombinaci s antracykliny (Minotti a kol. 2001; Kwok a Richardson 2003; Walter a kol. 2002).

Je také důležité poznamenat, že relativní neúčinnost chelátorů železa v porovnání s dexrazoxanem může být způsobena faktem, že dexrazoxan je proléčivem aktivovaným na místě účinku. Prochelátory odvozené od aroylhydrazonů jsou v současné době studovány z hlediska jejich aktivace a následné protekce proti modelovému oxidačnímu poškození, avšak proti antracyklinové toxicitě tyto látky doposud použity nebyly (Štěřba a kol. 2013).

2.1.4. MECHANISMY DRUHÉHO TYPU KARDIOTOXICITY ZPŮSOBENÉ PROTINÁDOROVOU TERAPIÍ

Na rozdíl od antracyklinové kardiotoxicity (nebo též typu I kardiotoxicity protinádorových látek) je kardiotoxicita typu II obvykle na dávce nezávislá, reverzibilní a nezpůsobuje změny v ultrastruktuře myokardu. Tento typ kardiotoxicity může být způsoben novými látkami ze skupiny cílených protinádorových léčiv. U některých látek byly v klinických studiích pozorovány nežádoucí účinky na kardiovaskulární systém, zvláště pak v případech, kdy pacienti byli v předchozí nebo současné terapii vystaveni některému z antracyklinů (Yeh a Bickford 2009; Ewer a Lippman 2005).

Monoklonální protilátky jsou tradičními představiteli cílené protinádorové terapie. Využívají své vazby na specifický receptor, který je ve zvýšené míře exprimován na povrchu nádorových buněk. Například v případě prsního karcinomu je tímto cílem receptor HER2, jehož množství je zvýšeno na povrchu buněk asi v 25 - 30 % případů nádorů prsu. Jeho zvýšená exprese je spojena s vyšší agresivitou nádoru a horší prognózou pacientek (Yeh a kol. 2004). Trastuzumab je monoklonální protilátka cílená právě proti HER2 receptoru. Jeho použití u HER2-pozitivních nádorů jako adjuvantní

terapie vedlo k 50% snížení relapsu onemocnění a 33% prodloužení přežití (Curigliano a kol. 2010). Velmi záhy byl však také pozorován zvýšený výskyt dysfunkce levé srdeční komory, zvláště pak při použití trastuzumabu současně s antracykliny. Proto bylo nadále využíváno pouze sekvenční použití trastuzumabu až po ukončení podávání antracyklinů. I v tomto schématu je ale zvýšená kardiotoxicita pozorována. Z klinických studií vyplývá, že terapie antracykliny je spojena s asi 2% zvýšením dysfunkce levé komory (jak symptomatickým tak asymptomatickým). Při následném adjuvantním podání trastuzumabu se incidence dysfunkce dále zvyšuje na 4 %. Současná retrospektivní studie porovnávající data pacientek léčených touto kombinací mimo klinické studie ukázala, že oproti pacientkám bez adjuvantní léčby měly pacientky léčené trasuzumabem čtyřikrát větší riziko vzniku kardiomyopatie nebo srdečního selhání. U pacientek, kterým byl podáván kromě trastuzumabu i antracyklin bylo toto riziko sedmkrát větší. Kardiotoxické působení trastuzumabu má pravděpodobně příčinu v interakci s Erb2 receptory, které jsou exprimovány na povrchu kardiomyocytů a mají anti-apoptickou funkci a jejich blokáda tedy může zvyšovat zranitelnost kardiomyocytů (Colombo a kol. 2013; Suter a kol. 2004).

Také v případě bevacizumabu, monoklonální protilátky cílené na receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor, byly zaznamenány případy jak symptomatického (2 %), tak asymptomatického (2 %) snížení ejekční frakce u pacientů léčených kombinací s antracykliny. Po vysazení bevacizumabu pak došlo k upravení srdeční funkce. Stejně jako v předchozím případě však díky poměrně krátké době sledování zatím nelze jasně vyhodnotit dlouhodobé důsledky této terapie (Curigliano a kol. 2010).

Další skupinou cílených léčiv jsou inhibitory tyrosinkinás. Kardiotoxický potenciál byl popsán především u inhibitoru HER2 receptoru a receptoru pro endoteliální růstový faktor lapatinibu a inhibitoru receptoru pro vaskulární endoteliální růstový faktor sunitinibu, který ovšem inhibuje také další tyrosinkinásové receptory (Motzer a kol. 2006). Zatímco lapatinib se používá především pro terapii trastuzumab-rezistentních prsních karcinomů, sunitinib je využíván při terapii nádorů ledvin a hepatocelulárních karcinomech gastrointestinálního traktu, ale jeho možné použití je zkoumáno i u jiných typů nádorů, právě díky zkřížené reaktivitě s různými tyrosinkinásovými receptory (Strevel a Siu 2009). Avšak právě zkřížená reaktivita je pravděpodobně příčinou vyšší

kardiotoxicity sunitinibu ve srovnání s bevacizumabem. V klinických studiích způsoboval až 21% výskyt asymptomatického snížení srdeční funkce, z čehož u 4 % pacientů byla funkce snížena o více než 20 % pod původní hodnoty. Po vysazení sunitinibu došlo opět ke kompletní obnově srdeční funkce (Motzer a kol. 2006; Telli a kol. 2008). Vyšší výskyt kardiotoxicity však může být vysvětlen i odlišnou kohortou pacientů. Tu v případě studií používajících sunitinib pro léčbu renálních malignit tvořili především muži z 50 % trpící předcházející hypertenzí (40 % bylo léčeno inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu), zatímco ve studiích využívajících trastuzumab byly léčeny ženy bez předchozího kardiovaskulárního rizika (Curigliano a kol. 2010).

Přestože typ II kardiotoxicity protinádorových látek pravděpodobně nezpůsobuje nezvratné poškození srdečního svalu, díky relativně častému použití u pacientů dříve léčených antracykliny nebo jejich použití v kombinační terapii zahrnující i antracykliny je nezbytné vyhodnotit možná rizika a dlouhodobé komplikace, které mohou tyto kombinace vyvolat. Také možné interakce antracyklinů a nových cílených terapeutik na úrovni buněčné signalizace mohou přispět k pochopení mechanismů antracyklinové kardiotoxicity a tedy i k racionálnímu přístupu ve vývoji kardioprotektivních látek.

2.1.5. SHRNUTÍ

Kardiotoxicita léčiv patří mezi závažné komplikace farmakoterapie s potenciálně významnými zdravotními i socioekonomickými následky. Mezi její nejobávanější formy patří chronické srdeční selhání, neboť často zůstává klinicky němé v průběhu samotné protinádorové léčby a projeví se až s odstupem mnoha měsíců či dokonce let po úspěšné léčbě nádorového onemocnění (Yeh a Bickford 2009). Výsledkem je pak negativní vliv na celkovou kvalitu života a také mortalitu pacientů, kteří úspěšně projdou protinádorovou terapií.

Symptomatická kardiovaskulární toxicita protinádorových léčiv navíc podle některých autorů reprezentuje pouze pomyslnou „špičku ledovce“, přičemž skutečný rozsah celého problému může být podstatně větší. Protinádorová léčiva v běžně užívaných dávkách navozují daleko častěji pouze subklinické poškození kardiovaskulárního systému, které se projeví v dlouhodobém horizontu díky kumulaci rizikových faktorů. Tyto úvahy podpořilo i třicetileté sledování pacientů, kteří v dětském věku prodělali

úspěšnou léčbu chemoterapeutiky, kteří ve srovnání s běžnou populací vykazovali 15-krát vyšší riziko srdečního selhání a 10-krát vyšší riziko ischemické choroby srdeční (Oeffinger a kol. 2006).

Nejvyšší riziko srdečního poškození a rozvoje srdečního selhání je bezesporu spojeno s antracyklinovými antibiotiky (doxorubicin, daunorubicin, epirubicin), která stále patří k nejúčinnějším a nejčastěji užívaným chemoterapeutickým látkám. Kromě některých nefarmakologických přístupů k omezení antracyklinové kardiotoxicity, jako jsou omezení celkové podané dávky nebo modifikace lékové formy antracyklinů, je jediným klinicky účinným kardioprotektivem je dexrazoxan. S ohledem na možné nežádoucí účinky a vysokou cenu je však v současnosti dexrazoxan podáván pouze cca 7 % evropských pacientů léčených antracykliny.

Kromě klasických chemoterapeutik je kardiotoxicita prokázanou komplikací i u řady nových biologicky cílených protinádorových léčiv (např. trastuzumab, sunitinib, sorafenib nebo lapatinib) (Force a Kolaja 2011). Je tedy zřejmé, že tento problém zůstává vysoce aktuálním i v nové éře protinádorové léčby. Hledání molekulární podstaty kardiovaskulární toxicity různých protinádorových léčiv spolu s komplexním výzkumem možností farmakologické kardioprotekce - při zachování (případně zvýšení) antineoplastické účinnosti - je proto důležitým cílem současného výzkumu (Gianni a kol. 2008).

3. CÍLE PRÁCE

- Analýza současné odborné literatury zabývající se mechanismy antracyklinové kardiotoxicity a možnostmi farmakologické kardioprotekce
- Analýza odborné literatury zkoumající topoisomerasu II a její beta isoformu zejména s ohledem na její funkce odlišné od alfa isoromy, včetně možného vztahu k antracyklinové kardiotoxicitě
- Studium role hlavního intracelulárního antioxidačního systému - glutathionu a s ním souvisejících enzymů - v antracyklinové kardiotoxicitě
- Studium možnosti farmakologické kardioprotekce pomocí vybraných katalytických inhibitorů topoisomerasy II
- Studium nově syntetizovaných analogů dexrazoxanu a ADR-925 v souvislosti s jejich možnými kardioprotektivními vlastnostmi, hodnocení jejich schopnosti chelátovat ionty železa jak v roztoku, tak uvnitř buněk a zhodnocení jejich vlivu na topoisomerasu II

4. KOMENTÁŘE K PRACÍM

Tato disertační práce je předkládána jako soubor publikací, z nichž tři jsou otištěny v odborných časopisech s impaktním faktorem, jedna je t.č. rukopisem v recenzním řízení a jedna je připravovaným rukopisem. Z těchto prací se dvě věnují shrnutí současných poznatků, a to konkrétně o roli oxidačního stresu v patogenezi antracyklinové kardiotoxicity a farmakologické kardioprotekci a o beta isoformě topoisomerasy II, která by podle několika současných publikací mohla být možným zprostředkovatelem antracyklinové kardiotoxicity. Tři publikace (resp. rukopisy) jsou původními experimentálními pracemi, zabývajícími se mechanismy antracyklinové kardiotoxicity a možnou farmakologickou kardioprotekcí.

4.1. OXIDAČNÍ STRES A CHELATAČE ŽELEZA V ANTRACYKLINOVÉ KARDIOTOXICITĚ A FARMAKOLOGICKÉ KARDIOPROTEKCI.

Štěrbá M., Popelová O., Vávrová A., Jirkovský E., Kovaříková P., Geršl V., and Šimůnek T. 2013. Oxidative Stress, Redox Signaling, and Metal Chelation in Anthracycline Cardiotoxicity and Pharmacological Cardioprotection. *Antioxidants & Redox Signaling* 18 (8): 899–929 (IF 2011: 8.456).

Ve vyzvaném přehledovém článku jsme kriticky analyzovali dosud publikovanou literaturou zabývající se mechanismy antracyklinové kardiotoxicity a kardioprotekce, zejména s ohledem na tradičně nejvíce citovaný mechanismus spojený s oxidačním poškozením kardiomyocytů. Tato teorie byla výrazně podpořena zejména kardioprotektivní účinností dexrazoxanu, který byl původně syntetizován jako polárnější proléčivo analogické EDTA, které by bylo použitelné jako protinádorová látka s mechanismem chelatace vitálních mikroprvků v nádorových buňkách. V poslední době však tato teorie antracyklinové kardiotoxicity nazvaná „ROS and iron hypothesis“ stává stále kontroverznější, zvláště pak díky neuspokojivým výsledkům klinických studií hodnotících nejrůznější antioxidanty (Van Dalen a kol. 2011). Také řada

experimentálních výsledků naznačuje, že mechanismy antracyklinové kardiotoxicity mohou být i zcela odlišné od pouhého oxidačního poškození a že oxidační působky, které byly pozorovány po expozici antracyklinů mohou být pouze důsledkem komplexních změn vyvolaných primárně jinou příčinou.

Klíčem k pochopení mechanismů antracyklinové kardiotoxicity může být právě kardioprotektivní působení dexrazoxanu, který kromě metabolismu na látku s chelatačními schopnosti, má jako parentní látka také schopnost katalycky inhibovat topoisomerasu II. Doposud však nebyl jasně prokázán význam metabolismu dexrazoxanu na jeho kardioprotektivní působení.

4.2. TOPOISOMERASA II BETA: ROLE V REGULACI GENOVÉ EXPRESE

Vávrová A., and Šimůnek T. 2012. DNA Topoisomerase II β : a Player in Regulation of Gene Expression and Cell Differentiation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44 (6): 834–7 (IF 2011: 4.634).

V tomto přehledovém článku jsme se soustředili na stručný souhrn dostupných informací o beta isoformě topoisomerasy II. Topoisomerasa II je enzym regulující konformaci DNA. Katalyzuje dekatenaci a relaxaci DNA a je nezbytná pro buněčné dělení. Po duplikaci DNA je zodpovědná za rozdělení sesterských chromatid. V buňkách obratlovců jsou exprimovány dvě isoformy, alfa a beta. Aktivita topoisomerasy je obecně vyšší v dělicích se buňkách, a to převážně v G₂/M fázi buněčného cyklu, kde je exprese alfa isoformy zvýšena, právě kvůli její nezbytnosti pro rozdělení sesterských chromatid. V průběhu buněčného cyklu pak exprese této isoformy klesá, stejně jako při buněčné diferenciaci. U diferencovaných nedělicích se buněk je alfa isoforma často nedetekovatelná a hlavní isoformou v těchto buňkách je isoforma beta. Beta isoforma nepodléhá v průběhu buněčného cyklu výrazné fluktuaci a její aktivita je relativně stálá. Právě díky tomuto rozdílu v aktivitě topoisomerasy II v dělicích a nedělicích se buňkách je dosaženo relativní selektivity protinádorových látek cílících právě na topoisomerasu, inhibitorů topoisomerasy.

Inhibitory topoisomerasy jsou skupinou léčiv obsahující velmi různorodou směs struktur, ale v zásadě mohou být rozděleny na dvě skupiny, katalytické inhibitory a topoisomerasové jedy. Topoisomerasové jedy inhibují topoisomerasu ve fázi, kdy je DNA v jejím katalytickém centru rozštěpena a zabraňují její religaci. Tímto způsobem topoisomerasové jedy (vedle samotné inaktivace topoisomerasy) způsobují poškození DNA ve formě dvojitých zlomů. Naopak, mezi katalytické inhibitory topoisomerasy se řadí látky, které působí na enzym v jiných fázích jeho katalytického cyklu a zlomy DNA nevznikají (Hande 2008).

Zatímco antracykliny se řadí mezi topoisomerasové jedy, dexrazoxan inhibuje topoisomerasu katalyticky. Inhibice topoisomerasy má jiné důsledky v buňkách diferencovaných a dělících se. U dělících buněk vysoké nároky na aktivitu topoisomerasy vedou při jakémkoli typu inhibice k přerušení buněčného cyklu až navození apoptózy. Avšak u nedělících se buněk se deficit topoisomerasy II ke ztrátě viability nevede (Zhang a kol. 2012). Dvojitě zlomy způsobené topoisomerasovými jedy však mohou DNA těchto buněk poškodit a katalytická inhibice v tomto případě může vést k ochraně nedělících se buněk před tímto typem poškození.

4.3. STUDIUM ROLE GLUTATHIONU V ANTRACYKLINOVÉ KARDIOTOXICITĚ

Vávrová A., Popelová O., Štěrba M., Jirkovský E., Hašková P., Mertlíková-Kaiserová H., Geršl V., and Šimůnek T. 2011. In Vivo and in Vitro Assessment of the Role of Glutathione Antioxidant System in Anthracycline-induced Cardiotoxicity. *Archives of Toxicology* 85 (5): 525–35 (IF 2010: 4.674).

V první experimentální práci jsem se věnovala rozšíření poznatků získaných v rámci mé diplomové práce (Vávrová 2008). Z těchto výsledků vyplývalo, že expozice buněčné linie immortalizovaných potkaních kardiomyocytů H9c2 daunorubicinu v relativně širokém rozmezí koncentrací (0,1 – 10 μM) nevede ke statisticky významnému ovlivnění celkového ani oxidovaného glutathionu v buňkách i přes signifikantní toxicitu, pozorovanou ve stejném dávkování. Množství celkového a oxidovaného glutathionu

bylo měřeno spektrofotometricky pomocí enzymatické recyklační metody využívající reakce glutathionu s 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoovou kyselinou. Rychlost reakce je pak úměrná koncentraci glutathionu ve vzorku (Tietze 1969). Množství celkového glutathionu však vykazovalo dávkově nezávislý trend ke snížení. Stejně tak ve vzorcích z *in vivo* modelu chronické antracyklinové kardiotoxicity (3 mg/kg daunorubicinu týdně po dobu 10 týdnů) nebyla pozorována významná změna v obsahu celkového a oxidovaného glutathionu i přes významné snížení kontraktility po chronickém podávání daunorubicinu. Dále jsme studovali také ovlivnění toxicity daunorubicinu a peroxidu vodíku jako modelového oxidačního insultu po snížení nebo zvýšení hladiny glutathionu v H9c2 buněčné kultuře. Zatímco toxicita peroxidu vodíku byla při nižší koncentraci glutathionu zvýšena, na toxicitě daunorubicinu se tato změna obsahu glutathionu neprojevila. Tyto výsledky tedy ukazovaly na rozdílnou formu toxicity způsobené daunorubicinem a peroxidem vodíku na buněčné linii imortalizovaných potkaních kardiomyblastů H9c2.

Tyto výsledky jsme rozšířili o sledování ovlivnění enzymů, účastnících se na metabolismu glutathionu. Sledovali jsme ovlivnění aktivity glutathion peroxidasy a glutathion reduktasy jak v H9c2 buněčné linii po 24 hodinové inkubaci s daunorubicinem v dávce 0,1 – 10 μM , tak i ve vzorcích levé srdeční komory z *in vivo* modelu chronické antracyklinové kardiotoxicity metodami založenými na stanovení úbytku NADPH při reakci těchto enzymů v přítomnosti specifických substrátů (GSSG v případě glutathion reduktasy a peroxidu vodíku a redukovaného glutathionu v případě glutathion peroxidasy). Zjistili jsme, že v H9c2 kardiomyblastech způsobuje daunorubicin ve vyšších dávkách (1 – 10 μM) statisticky významné zvýšení aktivity glutathion peroxidasy, zatímco aktivita glutathion reduktasy zůstala nezměněna.

V souvislosti se statisticky nevýznamným snížením celkového glutathionu v H9c2 buňkách bez jasně patrné koncentrační závislosti je možné vyvodit, že jistému oxidačnímu působení buňky pravděpodobně vystaveny jsou, avšak toto oxidační působení zřejmě není v kauzální souvislosti se snížením viability buněk po expozici daunorubicinu.

Také ve vzorcích levé komory myokardu králíka po desetitýdenním intravenózním podávání daunorubicinu (3 mg/kg týdně) byla zaznamenána statisticky významně zvýšená aktivita glutathion peroxidasy, avšak výše aktivity u jednotlivých zvířat nekorelovala s poškozením myokardu měřeným pomocí ejekční frakce srdce zvířat a hladinou srdečního troponinu T. Tedy i tyto *in vivo* výsledky nenaznačují kauzální roli glutathionu v patogenezi antracyklinové kardiotoxicity.

4.4. VLIV DEXRAZOXANU A VYBRANÝCH KOMERČNĚ DOSTUPNÝCH INHIBITORŮ TOPOISOMERASY II NA KARDIOTOXICITU ANTRACYKLINŮ

Vávrová A., Jansová H., Macková E., Macháček M., Hašková P., Tichotová L., Štěřba M., Šimůnek T. Catalytic inhibitors of topoisomerase II differentially modulate the toxicity of anthracyclines towards cardiac and cancer cells. (*rukopis v recenzním řízení*)

Výsledky nedávných studií, naznačující možné zapojení topoisomerasy II v kardiotoxicitě antracyklinů (Lyu a kol. 2007; Zhang a kol. 2012) podnítily naši studii vlivu katalytických inhibitorů topoisomerasy II na toxicitu antracyklinů v našem *in vitro* modelu primárních potkaních neonatálních kardiomyocytů. Zjistili jsme, že dexrazoxan je schopen tyto buňky statisticky významně ochránit před toxicitou navozenou tříhodinovou inkubací s daunorubicinem nebo doxorubicinem následovanou 48 hodinovou inkubací bez antracyklinů. V těchto experimentech byly použity koncentrace antracyklinů dosahované v plasmě pacientů v klinické praxi. Dexrazoxan v tomto schématu chránil proti statisticky významné toxicitě způsobené daunorubicinem a doxorubicinem v rozmezí koncentrací od 0,8 do 1,4 μM . Pro zjištění vlivu dexrazoxanu na oxidační poškození jsme primární kardiomyocyty inkubovali také s modelovým oxidačním insultem peroxidem vodíku. Dexrazoxan nebyl schopen této toxicitě zabránit v žádné použité dávce.

Dále jsme v této studii srovnávali účinek dvou dalších komerčně dostupných inhibitorů topoisomerasy II sobuzoxanu a merbaronu na toxicitu způsobenou daunorubicinem, doxorubicinem a peroxidem vodíku. Sobuzoxan je strukturním analogem dexrazoxanu ze skupiny bis-dioxopiperazinů, kdežto merbaron je látka strukturně odlišná, která pravděpodobně neposkytuje metabolit, který by vykazoval železo chelatační účinky. V našich studiích byly jak sobuzoxan, tak i merbaron stejně jako dexrazoxan schopny částečně omezit antracyklinovou toxicitu, avšak byly neúčinné na toxicitu vyvolanou peroxidem vodíku.

Ve shodě s našimi předchozími výsledky jsme také nezaznamenali signifikantní ovlivnění obsahu oxidovaného a redukovaného glutathionu po inkubaci

s daunorubicinem, preinkubace s dexrazoxanem tudíž také nijak neovlivnila ani oxidovaný ani redukovaný glutathion. Obsah celkového a oxidovaného glutathionu byl stejně jako v předchozí studii sledován enzymatickou recyklační metodou užívající reakce 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny s redukovaným glutathionem sledující přírůstek žluté 5-thiobis-2-nitrobenzoové kyseliny spektrofotometricky.

V této studii jsme také hodnotili ovlivnění antiproliferativních účinků daunorubicinu a doxorubicinu na buněčnou linii HL-60 lidské promyelocytární leukemie katalytickými inhibitory topoisomerasy II pomocí Chou-Talalay metody (Chou a Talalay 1984; Chou 2010). Zjistili jsme, že jak dexrazoxan, tak i sobuzoxan a merbaron neomezují antiproliferativní schopnosti antracyklinů, naopak působí spíše synergicky.

Z výsledků této studie tedy vyplývá, že spíše než chelatační vlastnosti a antioxidační působení mají na antracyklinovou toxicitu v našem modelu vliv inhibiční schopnosti na katalytický cyklus topoisomerasy II.

4.5. OVLIVNĚNÍ ANTRACYKLINOVÉ KARDIOTOXICITY NOVĚ SYNTETIZOVANÝMI ANALOGY DEXRAZOXANU A ADR-925

Vávrová A., Roh J., Lenčová-Popelová O., Jirkovský E., Hrušková K., Macková E., Jansová H., Hašková P., Martínková P., Eisner T., Kratochvíl M., Šūs J., Tichotová L., Geršl V., Vávrová K., Richardson D.R., Štěřba M., Šimůnek T. Synthesis and examination of novel analogues of dexrazoxane and its open-ring hydrolysis product for protection against anthracycline cardiotoxicity. (*připravovaný rukopis*)

Doposud jediným kardioprotektivem účinným jak v experimentálních modelech je dexrazoxan. Protože nebyl dexrazoxan vyvinut cestou racionálního vývoje, ale jeho protektivní vlastnosti byly objeveny spíše náhodně, mechanismus jeho protektivního působení je nejasný. Ze skupiny bis-dioxopiperazinů bylo zkoumáno ještě několik dalších analogů, avšak většinou se zaměřením na jejich antiproliferativní účinek a pouze několik studií se zaměřilo na vztah kardioprotektivního účinku a struktury. Na

modelu akutní antracyklinové kardiotoxicity u křečků porovnávali Herman a kolegové kardioprotektivní účinek 19 derivátů ze skupiny bis-dioxopiperazinů. V této studii bylo zjištěno, že i relativně malé změny struktury dexrazoxanu vedou k vymizení účinku (Herman a kol. 1985a). Stejná skupina pak tyto výsledky rozšířila o několik dalších látek na modelu chronické antracyklinové kardiotoxicity spontánně hypertenzních potkanů. Ani ve druhé studii však žádný z analogů nevykazoval lepší kardioprotektivní schopnosti než dexrazoxan. Bylo také zjištěno, že kardioprotektivní schopnosti nesouvisí s mírou chelatace železa nebo se schopností jednotlivých látek odnímat železo z komplexu s doxorubicinem. Avšak některé látky s protektivními schopnostmi se ukázaly být katalytickými inhibitory topoisomerasy II (Herman a kol. 1997). V roce 2009 pak byla publikována studie porovávající dexrazoxan s jeho analogem ICRF-161, který je schopen se metabolizovat na železo-chelatující strukturu, avšak je neaktivní s ohledem na katalytickou inhibici topoisomerasy II. Přestože obě látky byly schopny ochránit izolované neonatální kardiomyocyty před toxicitou způsobenou 48 hodinovou kontinuální expozicí 1,8 μM doxorubicinu, pouze dexrazoxan ochránil také spontánně hypertenzní potkany před chronickou antracyklinovou toxicitou. Také u metabolitů dexrazoxanu byl zkoumán jejich vliv na kardiotoxicitu antracyklinů jak *in vitro* na modelu izolovaných neonatálních kardiomyocytů (Hasinoff a kol. 2003b), tak i v *in vivo* modelu (Herman a kol. 1997). Tato neúčinnost byla přisouzena neschopnosti polární struktury ADR-925 prostupovat buněčnými membránami k místu účinku.

V naší studii jsme se proto zaměřili na syntézu analogů dexrazoxanu a ADR-925 a jejich úvodní *in vitro* a *in vivo* hodnocení. Byly syntetizovány dva analogy ADR-925 – KH-TA4 a JR-159, které měly díky alkylamidovým substituentům vyšší lipofilitu než samotné ADR-925 a mohly by tedy účinněji pronikat biologickými membránami. Dále pak byly syntetizovány dva analogy dexrazoxanu – MK-15 a ES-5. MK-15 byl navržen tak, aby jeho velikost a uspořádání bylo shodné s dexrazoxanem, avšak terminální amid byl nahrazen imidem. Díky této změně by mohla být snížena schopnost hydrolýzy a také chelatace volného železa vzniklým produktem by byla pravděpodobně snížena. Analog ES-5 pak byl navržen s modifikací spojovacího řetězce jako uzavřená forma chelátoru diethylenetriaminpentaoctové kyseliny (DTPA).

Na našem *in vitro* modelu izolovaných neonatálních kardiomyocytů jsme zjistili, že nové analogy nejsou v dávkách 10 – 100 μM výrazněji toxické s výjimkou KH-TA4, který v nejvyšší použité dávce vykazoval statisticky signifikantní toxicitu ve srovnání s kontrolou. Na rozdíl od dexrazoxanu, který chránil kardiomyocyty před poškozením navozeným inkubací s daunorubicinem (1,2 μM po 3 hodiny následované 48 hodinovou inkubací bez daunorubicinu) nezávisle na době preinkubace (0 – 24 hodin) a podané dávce (10 – 100 μM), žádný nový analog nebyl takové protekce schopen. V případě KH-TA4 došlo dokonce ke zvýšení samotné toxicity antracyklinů. Naopak, ve stejných dobách preinkubace, ve kterých KH-TA4 zvyšoval toxicitu antracyklinů, byl schopen ochránit kardiomyocyty před oxidačním poškozením způsobeným peroxidem vodíku. Také v modelu chronické antracyklinové kardiotoxicity u králíků nedosáhl žádný z analogů efektivity dexrazoxanu, který zabránil jak předčasnému úhynu králíků, tak i snížení srdeční funkce a vyplavení srdečních troponinů v důsledku podávání antracyklinů. Naopak, konzistentně s výsledky *in vitro* hodnocení, podání KH-TA4 způsobilo časnější úhyn zvířat a také zhoršení srdeční funkce.

Při analýze možných molekulárních mechanismů takto výrazných rozdílů mezi protektivními schopnostmi dexrazoxanu a nových analogů jsme studovali schopnost těchto látek cheltovat volné železo v roztoku a i uvnitř buněk pomocí sledování fluorescence volného kalceinu, avšak jak dexrazoxan, tak ani nové analogy nevykazovaly chelatační schopnosti. Také při hodnocení jejich schopností zvyšovat mobilizaci železa z buněk pomocí transferinu značeného radioaktivním železem (^{59}Fe) ani dexrazoxan, ani nové analogy vylučování železa z buněk nezpůsobovaly, na rozdíl od experimentálního chelátoru železa SIH, který efektivně vázal železo v roztoku i v buňkách a také zvyšoval vylučování železa buňkami.

Zaměřili jsme se proto také na studium interakce dexrazoxanu a nových analogů s topoisomerasou II. Ve shodě s dříve publikovanými výsledky (Lyu a kol. 2007) jsme pozorovali časově závislou depleci topoisomerasy II beta po inkubaci primárních neonatálních kardiomyocytů s dexrazoxanem (0 – 24 hodin, 10 μM) pomocí western blottingu buněčného lyzátu. Tuto depleci jsme však nepozorovali u žádného z nově syntetizovaných analogů. Také jsme zjistili, že na rozdíl od dexrazoxanu žádný z nových analogů nepůsobí inhibicí topoisomerasy II sledované pomocí enzymatické metody

využívající katenované plasmidové DNA jako substrátu a její dekatence topoisomerasou II alfa. Tento rozdíl v interakci s topoisomerasou II mezi dexrazoxanem a novými analogy tedy naznačuje, že spíše než chelatací volných iontů železa dexrazoxan působí kardioprotektivně díky svým schopnostem katalyticky inhibovat topoisomerasu II.

4.6. SOUHRNNÁ DISKUSE A SHRNUÍ

Riziko vzniku toxického poškození srdce je vážným omezením klinického použití antracyklinů. Mechanismy tohoto poškození jsou však stále nedostatečně vysvětleny (Gianni a kol. 2008; Sawyer a kol. 2010). Již několik desetiletí však převládá tradiční názor, že antracykliny působí toxické poškození myokardu svou schopností tvořit volné kyslíkové radikály za katalýzy volnými ionty železa (Keizer a kol. 1990; Colombo a kol. 2013).

V naší první experimentální práci jsme se proto zaměřili na studium hlavního intracelulárního antioxidačního systému, tedy glutathionu a s ním souvisejících enzymů – glutathion reductasy a glutathion peroxidasy a to jak v chronickém *in vivo* modelu, tak i *in vitro*. Přestože desetidenní podávání daunorubicinu způsobilo snížení srdeční funkce vedoucí u některých zvířat i k předčasnému úhynu, jak srdeční, tak plasmatický glutathion nebyl signifikantně změněn. Ani aktivita glutathion reductasy, jež zajišťuje regeneraci redukováného glutathionu, nebyla pozměněna. Pouze u aktivity glutathion peroxidasy jsme zaznamenali malý, avšak statisticky signifikantní nárůst, což by mohlo naznačovat, že jisté zvýšení tvorby volných radikálů v kardiomyocytech nastává, avšak glutathionový systém zůstává stále kompetentní, neboť nedochází ke zvýšení koncentrace oxidovaného glutathionu. *In vitro* experimenty dále potvrdily tato zjištění. Inkubace s daunorubicinem sice vedla k poklesu celkového glutathionu, avšak tento pokles nebyl statisticky signifikantní, dávkově závislý a ani nevedla expozice k nárůstu oxidovaného glutathionu. Navíc na rozdíl od oxidačního poškození vyvolaného peroxidem vodíku nebylo možno modulací obsahu glutathionu v buňkách ovlivnit toxicitu daunorubicinu. Glutathionový systém tedy nehraje pravděpodobně v antracyklinové kardiotoxicitě významnou roli. Tato studie spolu s dalšími experimentálními daty, které jsme shrnuli v přehledovém článku, naznačuje, že zvýšení tvorby volných kyslíkových radikálů může být spíše průvodním jevem než samotnou příčinou antracyklinové kardiotoxicity.

V dalších studiích jsme se proto zaměřili na možné alternativní mechanismy antracyklinové toxicity. Dexrazoxan je dosud jediné kardioprotektivum u kterého byla ověřena účinnost na všech úrovních od buněčných kultur až po randomizované klinické

studie (Sawyer a kol. 2010). Přesný mechanismus jeho kardioprotektivního účinku je ale stejně jako u antracyklinové kardiotoxicity nejasný. V souladu s „ROS and iron“ hypotézou antracyklinové kardiotoxicity se soudí, že pro jeho účinek je nezbytná metabolizace na železo-chelatující strukturu ADR-925 (Cvetković a Scott 2005). Avšak parentní struktura dexrazoxanu je také katalytickým inhibitorem topoisomerasy II (Andoh a Ishida 1998). Proto jsme se v další studii snažili srovnat kardioprotektivní účinek dexrazoxanu se dvěma dalšími komerčně dostupnými inhibitory topoisomerasy II, sobuzoxanem a merbaronem. Tyto látky podobně jako dexrazoxan chránily izolované neonatální kardiomyocyty před poškozením vyvolaným antracykliny, avšak stejně jako dexrazoxan byly neúčinné proti modelovému oxidačnímu poškození peroxidem vodíku. Jelikož jednou z příčin omezeného klinického použití dexrazoxanu je obava ze snižování protinádorového účinku antracyklinů právě kvůli interakci s topoisomerasou II, která je hlavním molekulárním cílem antracyklinů, studovali jsme také ovlivnění antiproliferativních účinků antracyklinů katalytickou inhibicí topoisomerasy II pomocí důkladné metody Chou-Talalay (Chou a Talalay 1984; Chou 2010). Jak dexrazoxan, tak ani sobuzoxan a merbaron nevykazovaly s antracykliny antagonistické působení. Naopak, zejména v případě merbaronu vedla jejich kombinace k silnému synergismu. I výsledky této studie tedy naznačují, že spíše než antioxidační aktivita dexrazoxanu může s jeho protektivním účinkem souviset spíše katalytická inhibice topoisomerasy II. Rozdíly v účinku dexrazoxanu na proliferující nádorové buňky a terminálně diferencované a nedělící se kardiomyocyty může být vysvětlen různou expresí topoisomerasy v těchto buněčných typech. Na tyto rozdíly jsme se soustředili v dalším přehledovém článku.

Buňky vyšších obratlovců obsahují dvě strukturně velmi podobné isoformy topoisomerasy II. V rychle se dělících buňkách je zvýšena exprese alfa isoformy, která je nezbytná pro buněčné dělení (Austin a Marsh 1998). V diferencovaných nedělících se buňkách je naopak exprese této isoformy potlačena. V těchto buňkách je většina topoisomerasy zastoupena její beta isoformou, která je důležitá spíše při transkripčních procesech a v současné době byly publikovány některé studie dokazující její roli v regulaci genové exprese (Ju a kol. 2006; Kitagawa a kol. 2012; McNamara a kol. 2010). Modifikovaná forma topoisomerasy II beta byla také nalezena v mitochondriích

(Low a kol. 2003), které jsou důležitým cílem antracyklinové kardiotoxicity (Wallace 2003).

Interakce s topoisomerasou II byla také hlavní odlišností nově syntetizovaných analogů dexrazoxanu a ADR-925 od dexrazoxanu. Na rozdíl od dexrazoxanu nové analogy nevykazovaly kardioprotektivní schopnosti, neinhibovaly topoisomerasu II a ani nezpůsobovaly její depleci v neonatálních kardiomyocytech. Tedy i tato studie poukazuje na význam interakce s topoisomerasou II v antracyklinové kardiotoxicitě a protekci pomocí dexrazoxanu.

Na výsledky dosažené v rámci této disertační studie a také výsledky dalších skupin implikují nutnost dalšího výzkumu možnosti důležitosti interakce s topoisomerasou II v antracyklinové kardiotoxicitě a kardioprotekci pomocí dexrazoxanu. V současné době se naše skupina zaměřila na studium farmakokinetického profilu dexrazoxanu a jeho metabolismus. Další studie by se pak měly zaměřit také na syntézu nových analogů racionálně vytvořených molekulárním modelováním pomocí struktury topoisomerasy II. Také další molekulárně-biologické přístupy, například použití siRNA pro selektivní ovlivnění exprese proteinů, by mohly přispět k objasnění molekulárních mechanismů antracyklinové kardiotoxicity.

5. ZÁVĚRY

- Mechanismy antracyklinové kardiotoxicity nejsou stále dostatečně objasněny. Přestože hypotéza oxidačního stresu jako primární příčiny tohoto poškození byla dlouho tradičně přijímána, vzrůstající část recentní odborné literatury s touto hypotézou polemizuje a věnuje se alternativním mechanismům. Pochopení mechanismu kardioprotekce pomocí dexrazoxanu by mohlo napomoci také objasnění mechanismů antracyklinové kardiotoxicity a tedy i další racionální tvorbě kardioprotektivních látek.
- V buňkách vyšších obratlovců se vyskytují dvě isoformy topoisomerasy II. Alfa isoforma topoisomerasy II je nezbytná pro buněčné dělení a její funkce jsou popsány poměrně detailně. Značně méně je známo o její isoformě beta. Ta pro replikaci buněk nezbytná není, avšak jak bylo nedávno zjištěno, hraje důležitou úlohu v regulaci transkripce některých genů.
- Toxicita daunorubicinu není na rozdíl od oxidačního poškození způsobeného peroxidem vodíku ovlivnitelná modulací hladin glutathionu v buňkách. Daunorubicin také nepůsobí ovlivnění hladin celkového ani oxidovaného glutathionu ani významněji neovlivňuje aktivitu glutathion reduktasy a glutathion peroxidasy. Glutathion a oxidační poškození tedy pravděpodobně nehraje v patogenezi antracyklinové kardiotoxicity významnější roli.
- V našem *in vitro* modelu antracyklinové kardiotoxicity jsme prokázali, že jak dexrazoxan, tak i další dva katalytické inhibitory topoisomerasy II, sobuzoxan a merbaron, jsou schopny částečně zabránit toxicitě antracyklinů, avšak neomezují modelové oxidační poškození peroxidem vodíku. Katalytická inhibice topoisomerasy II proto může být podstatou protekce antracyklinové kardiotoxicity pomocí dexrazoxanu.

- Nově syntetizované analogy dexrazoxanu a ADR-925 ve srovnání s dexrazoxanem nevykázaly kardioprotektivní vlastnosti. Ani jedna z nových látek nevykazovala chelatační schopnosti a na rozdíl od dexrazoxanu ani schopnost interagovat s topoisomerasou II, což opět naznačuje možnou klíčovou úlohu tohoto enzymu u antracyklinové kardiotoxicity a kardioprotekce.

6. PODÍL PŘEDKLADATELKY NA PUBLIKACÍCH ZAHRNUTÝCH V DISERTAČNÍ PRÁCI

Štěrbá M., Popelová O., Vávrová A., Jirkovský E., Kovaříková P., Geršl V., and Šimůnek T. 2013. Oxidative Stress, Redox Signaling, and Metal Chelation in Anthracycline Cardiotoxicity and Pharmacological Cardioprotection. *Antioxidants & Redox Signaling* 18 (8): 899–929 (IF 2011: 8.456).

- podíl na části textu zabývající se molekulárními mechanismy antracyklinové kardiotoxicity.

Vávrová A., and Šimůnek T. 2012. DNA Topoisomerase II β : a Player in Regulation of Gene Expression and Cell Differentiation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44 (6): 834–7 (IF 2011: 4.634).

- hlavní podíl na analýze literatury a textu přehledového článku

Vávrová A., Popelová O., Štěrbá M., Jirkovský E., Hašková P., Mertlíková-Kaiserová H., Geršl V., and Šimůnek T. 2011. In Vivo and in Vitro Assessment of the Role of Glutathione Antioxidant System in Anthracycline-induced Cardiotoxicity. *Archives of Toxicology* 85 (5): 525–35 (IF 2010: 4.674).

- kultivace buněčné linie H9c2, stanovení *in vitro* toxicity
- stanovení obsahu celkového a oxidovaného glutathionu
- stanovení aktivity glutathion reductasy a glutathion peroxidasy
- fotodokumentace změn buněčné morfologie a mitochondriálního potenciálu
- hlavní podíl na analýze dat a textu publikace

Vávrová A., Jansová H., Macková E., Macháček M., Hašková P., Tichotová L., Štěrbá M., Šimůnek T. Catalytic inhibitors of topoisomerase II differentially modulate the toxicity of anthracyclines towards cardiac and cancer cells. (*rukopis v recenzním řízení*)

- izolace primárních neonatálních kardiomyocytů a hodnocení *in vitro* toxicity a protekce studovaných látek na tomto modelu
- stanovení obsahu celkového a oxidovaného glutathionu
- stanovení aktivit kaspáz ve vzorcích primárních neonatálních kardiomyocytů
- fotodokumentace změn buněčné morfologie kardiomyocytů a mitochondriálního potenciálu
- hlavní podíl na analýze dat a textu publikace

Vávrová A., Roh J., Lenčová-Popelová O., Jirkovský E., Hrušková K., Macková E., Jansová H., Hašková P., Martínková P., Eisner T., Kratochvíl M., Šůs J., Tichotová L., Geršl V., Vávrová K., Richardson D.R., Štěrba M., Šimůnek T. Synthesis and examination of novel analogues of dexrazoxane and its open-ring hydrolysis product for protection against anthracycline cardiotoxicity. (*připravovaný rukopis*)

- izolace primárních neonatálních kardiomyocytů hodnocení *in vitro* toxicity a protekce studovaných látek na tomto modelu
- stanovení aktivity topoisomerasy II
- podíl na přípravě vzorků a stanovení obsahu topoisomerasy II beta v primárních neonatálních kardiomyocytech
- hlavní podíl na analýze dat a textu publikace

7. POUŽITÁ LITERATURA

- Andoh T. a Ishida R. Catalytic Inhibitors of DNA Topoisomerase II. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1998; 1400 (1-3): 155–71.
- Arcamone F., Animati F., Bigioni M., Capranico G., Caserini C., Cipollone A., De Cesare M., Ettorre A., Guano F., Manzini S., Monteagudo E., Pratesi G., Salvatore C., Supino R. a Zunino F. Configurational Requirements of the Sugar Moiety for the Pharmacological Activity of Anthracycline Disaccharides. *Biochemical Pharmacology*, 1999; 57 (10): 1133–9.
- Arcamone F., Cassinelli G., Fantini G., Grein A., Orezzi P., Pol C. a Spalla C. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a New Antitumor Antibiotic from *S. Peuceetius* Var. *Caesius*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1969; 11 (6): 1101–10.
- Austin C.A. a Marsh K.L. Eukaryotic DNA Topoisomerase II Beta. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 1998; 20 (3): 215–26.
- Bakker M., Droz J.P., Hanauske A.R., Verweij J., Van Oosterom A.T., Groen H.J., Pacciarini M.A., Domenigoni L., Van Weissenbruch F., Pianezzola E. a De Vries E.G. Broad Phase II and Pharmacokinetic Study of Methoxy-morpholino Doxorubicin (FCE 23762-MMRDX) in Non-small-cell Lung Cancer, Renal Cancer and Other Solid Tumour Patients. *British Journal of Cancer*, 1998; 77 (1): 139–46.
- Bakshi R.P., Galande S., Bali P., Dighe R. a Muniyappa K. Developmental and Hormonal Regulation of Type II DNA Topoisomerase in Rat Testis. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2001; 26 (3): 193–206.
- Balducci L. Management of Cancer in the Older Person: A Practical Approach. *The Oncologist*, 2000; 5 (3): 224–237.
- Barnabé N., Zastre J.A., Venkataram S. a Hasinoff B.B. Deferiprone Protects Against Doxorubicin-induced Myocyte Cytotoxicity. *Free Radical Biology & Medicine*, 2002; 33 (2): 266–75.
- Belhani D., Fanton L., Vaillant F., Descotes J., Manati W., Tabib A., Bui-Xuan B. a Timour Q. Cardiac Lesions Induced by Testosterone: Protective Effects of Dexrazoxane and Trimetazidine. *Cardiovascular Toxicology*, 2009; 9 (2): 64–9.
- Bellet R.E., Mastrangelo M.J., Dixon L.M. a Yarbro J.W. Phase I Study of ICRF-159 (NSC-129943) in Human Solid Tumors. *Cancer Chemotherapy Reports. Part 1*, 1973; 57 (2): 185–9.
- Berthiaume J.M., Oliveira P.J., Fariss M.W. a Wallace K.B. Dietary Vitamin E Decreases Doxorubicin-induced Oxidative Stress Without Preventing Mitochondrial Dysfunction. *Cardiovascular Toxicology*, 2005; 5 (3): 257–67.

- Bird B.R.J.H. a Swain S.M. Cardiac Toxicity in Breast Cancer Survivors: Review of Potential Cardiac Problems. *Clinical Cancer Research: an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 2008; 14 (1): 14–24.
- Boucek R.J., Miracle A., Anderson M., Engelman R., Atkinson J. a Dodd D. a. Persistent Effects of Doxorubicin on Cardiac Gene Expression. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 1999; 31 (8): 1435–46.
- Brunton L., Chabner B. a Knollman B. *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Twelfth Edition*, 2010. McGraw-Hill Professional.
- Bruynzeel A.M.E., Niessen H.W.M., Bronzwaer J.G.F., Van der Hoeven J.J.M., Berkhof J., Bast A., Van der Vijgh W.J.F. a Van Groeningen C.J. The Effect of Monohydroxyethylrutoside on Doxorubicin-induced Cardiotoxicity in Patients Treated for Metastatic Cancer in a Phase II Study. *British Journal of Cancer*, 2007a; 97 (8): 1084–9.
- Bruynzeel A.M.E., Vormer-Bonne S., Bast A., Niessen H.W.M. a Van der Vijgh W.J.F. Long-term Effects of 7-monohydroxyethylrutoside (monoHER) on DOX-induced Cardiotoxicity in Mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2007b; 60 (4): 509–14.
- Colombo A., Cipolla C., Beggiato M. a Cardinale D. Cardiac Toxicity of Anticancer Agents. *Current Cardiology Reports*, 2013; 15 (5): 362.
- Creighton A.M., Hellmann K. a Whitecross S. Antitumour Activity in a Series of Bisdiketopiperazines. *Nature*, 1969; 222 (5191): 384–5.
- Cummings J., Bartoszek A. a Smyth J.F. Determination of Covalent Binding to Intact DNA, RNA, and Oligonucleotides by Intercalating Anticancer Drugs Using High-performance Liquid Chromatography. Studies with Doxorubicin and NADPH Cytochrome P-450 Reductase. *Analytical Biochemistry*, 1991; 194 (1): 146–55.
- Cummings J., Willmott N., Hoey B.M., Marley E.S. a Smyth J.F. The Consequences of Doxorubicin Quinone Reduction in Vivo in Tumour Tissue. *Biochemical Pharmacology*, 1992; 44 (11): 2165–74.
- Curigliano G., Mayer E.L., Burstein H.J., Winer E.P. a Goldhirsch A. Cardiac Toxicity from Systemic Cancer Therapy: a Comprehensive Review. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 2010; 53 (2): 94–104.
- Cvetković R.S. a Scott L.J. Dexrazoxane : a Review of Its Use for Cardioprotection During Anthracycline Chemotherapy. *Drugs*, 2005; 65 (7): 1005–24.
- Daemen T., Hofstede G., Ten Kate M.T., Bakker-Woudenberg I.A. a Scherphof G.L. Liposomal Doxorubicin-induced Toxicity: Depletion and Impairment of Phagocytic Activity of Liver Macrophages. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 1995; 61 (5): 716–21.
- Van Dalen E.C., Caron H.N., Dickinson H.O. a Kremer L.C. Cardioprotective Interventions for Cancer Patients Receiving Anthracyclines. *Cochrane Database of Systematic Reviews (Online)*, 2011 (6): CD003917.

- DeGraff W., Hahn S.M., Mitchell J.B. a Krishna M.C. Free Radical Modes of Cytotoxicity of Adriamycin and Streptonigrin. *Biochemical Pharmacology*, 1994; 48 (7): 1427–35.
- Deweese J.E. a Osheroff N. The DNA Cleavage Reaction of Topoisomerase II: Wolf in Sheep's Clothing. *Nucleic Acids Research*, 2009; 37 (3): 738–48.
- Deweese J.E. a Osheroff N. The Use of Divalent Metal Ions by Type II Topoisomerases. *Metallomics : Integrated Biometal Science*, 2010; 2 (7): 450–9.
- Dresdale A.R., Barr L.H., Bonow R.O., Mathisen D.J., Myers C.E., Schwartz D.E., d'Angelo T. a Rosenberg S.A. Prospective Randomized Study of the Role of N-acetyl Cysteine in Reversing Doxorubicin-induced Cardiomyopathy. *American Journal of Clinical Oncology*, 1982; 5 (6): 657–63.
- Drummond D.C., Meyer O., Hong K., Kirpotin D.B. a Papahadjopoulos D. Optimizing Liposomes for Delivery of Chemotherapeutic Agents to Solid Tumors. *Pharmacological Reviews*, 1999; 51 (4): 691–743.
- El-Demerdash E., Ali A.A., Sayed-Ahmed M.M. a Osman A.-M.M. New Aspects in Probucol Cardioprotection Against Doxorubicin-induced Cardiotoxicity. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2003; 52 (5): 411–6.
- Elliott P. Pathogenesis of Cardiotoxicity Induced by Anthracyclines. *Seminars in Oncology*, 2006; 33 (3 Suppl 8): S2–7.
- Ewer M.S. a Lippman S.M. Type II Chemotherapy-related Cardiac Dysfunction: Time to Recognize a New Entity. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2005; 23 (13): 2900–2.
- Ewer M.S. a Yeh E.T.H. *Cancer and the Heart*, 2006. Hamilton: BC Decker, U.S.A.
- Fokkema E., Verweij J., Van Oosterom A.T., Uges D.R., Spinelli R., Valota O., De Vries E.G. a Groen H.J. A Prolonged Methoxymorpholino Doxorubicin (PNU-152243 or MMRDX) Infusion Schedule in Patients with Solid Tumours: a Phase 1 and Pharmacokinetic Study. *British Journal of Cancer*, 2000; 82 (4): 767–71.
- Force T. a Kolaja K.L. Cardiotoxicity of Kinase Inhibitors: The Prediction and Translation of Preclinical Models to Clinical Outcomes. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 2011; 10 (2): 111–26.
- Fulbright J.M., Huh W., Anderson P. a Chandra J. Can Anthracycline Therapy for Pediatric Malignancies Be Less Cardiotoxic? *Current Oncology Reports*, 2010; 12 (6): 411–9.
- Geroni C., Ripamonti M., Arrigoni C., Fiorentini F., Capolongo L., Moneta D., Marchini S., Della Torre P., Albanese C., Lamparelli M.G., Ciomei M., Rossi R. a Caruso M. Pharmacological and Toxicological Aspects of 4-demethoxy-3'-deamino-3'-aziridinyl-4'-methylsulphonyl-daunorubicin (PNU-159548): a Novel Antineoplastic Agent. *Cancer Research*, 2001; 61 (5): 1983–90.

- Gewirtz D.A. A Critical Evaluation of the Mechanisms of Action Proposed for the Antitumor Effects of the Anthracycline Antibiotics Adriamycin and Daunorubicin. *Biochemical Pharmacology*, 1999; 57 (7): 727–41.
- Gianni L., Herman E.H., Lipshultz S.E., Minotti G., Sarvazyan N. a Sawyer D.B. Anthracycline Cardiotoxicity: From Bench to Bedside. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2008; 26 (22): 3777–84.
- Glickstein H., El R. Ben, Link G., Breuer W., Konijn A.M., Hershko C., Nick H. a Cabantchik Z.I. Action of Chelators in Iron-loaded Cardiac Cells: Accessibility to Intracellular Labile Iron and Functional Consequences. *Blood*, 2006; 108 (9): 3195–203.
- Grein A. Antitumor Anthracyclines Produced by *Streptomyces Peucetius*. *Adv Appl Microbiol*, 1987.
- Grein A., Spalla C., Marco A. Di a Canevazzi G. Descrizione e Classificazione Di Un Attinomicete (*Streptomyces Peucetius* Sp. Nova) Produttore Di Una Sostanza Ad Attivita Antitumorale: La Daunomicina. *G Microbiol*, 1963.
- Halliwell B. a Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 2007. Oxford University Press, USA.
- Hallowes R.C., West D.G. a Hellmann K. Cumulative Cytostatic Effect of ICRF 159. *Nature*, 1974; 247 (441): 487–90.
- Hande K.R. Topoisomerase II Inhibitors. *Update on Cancer Therapeutics*, 2008; 3 (1): 13–26.
- Hasinoff B.B. Dexrazoxane (ICRF-187) Protects Cardiac Myocytes Against Hypoxia-reoxygenation Damage. *Cardiovascular Toxicology*, 2002; 2 (2): 111–8.
- Hasinoff B.B. a Kala S. V. The Removal of Metal Ions from Transferrin, Ferritin and Ceruloplasmin by the Cardioprotective Agent ICRF-187 [(+)-1,2-bis(3,5-dioxopiperazinyl-1-yl)propane] and Its Hydrolysis Product ADR-925. *Agents and Actions*, 1993; 39 (1-2): 72–81.
- Hasinoff B.B., Patel D. a Wu X. The Oral Iron Chelator ICL670A (deferasirox) Does Not Protect Myocytes Against Doxorubicin. *Free Radical Biology & Medicine*, 2003a; 35 (11): 1469–79.
- Hasinoff B.B., Schroeder P.E. a Patel D. The Metabolites of the Cardioprotective Drug Dexrazoxane Do Not Protect Myocytes from Doxorubicin-induced Cytotoxicity. *Molecular Pharmacology*, 2003b; 64 (3): 670–8.
- Hasinoff B.B., Yalowich J.C., Ling Y. a Buss J.L. The Effect of Dexrazoxane (ICRF-187) on Doxorubicin- and Daunorubicin-mediated Growth Inhibition of Chinese Hamster Ovary Cells. *Anti-cancer Drugs*, 1996; 7 (5): 558–67.
- Van der Heijden A.G. a Witjes J.A. Future Strategies in the Diagnosis, Staging and Treatment of Bladder Cancer. *Current Opinion in Urology*, 2003; 13 (5): 389–95.
- Herman E.H., el-Hage A.N., Creighton A.M., Witiak D.T. a Ferrans V.J. Comparison of the Protective Effect of ICRF-187 and Structurally Related Analogues Against Acute

- Daunorubicin Toxicity in Syrian Golden Hamsters. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, 1985a; 48 (1): 39–55.
- Herman E.H., Ferrans V.J., Myers C.E. a Van Vleet J.F. Comparison of the Effectiveness of (+/-)-1,2-bis(3,5-dioxopiperazinyl-1-yl)propane (ICRF-187) and N-acetylcysteine in Preventing Chronic Doxorubicin Cardiotoxicity in Beagles. *Cancer Research*, 1985b; 45 (1): 276–81.
- Herman E.H., Hasinoff B.B., Zhang J., Raley L.G., Zhang T.M., Fukuda Y. a Ferrans V.J. Morphologic and Morphometric Evaluation of the Effect of ICRF-187 on Bleomycin-induced Pulmonary Toxicity. *Toxicology*, 1995; 98 (1-3): 163–75.
- Herman E.H., Zhang J. a Ferrans V.J. Comparison of the Protective Effects of Desferrioxamine and ICRF-187 Against Doxorubicin-induced Toxicity in Spontaneously Hypertensive Rats. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 1994; 35 (2): 93–100.
- Herman E.H., Zhang J., Hasinoff B.B., Chadwick D.P., Clark J.R. a Ferrans V.J. Comparison of the Protective Effects Against Chronic Doxorubicin Cardiotoxicity and the Rates of Iron (III) Displacement Reactions of ICRF-187 and Other Bisdiketopiperazines. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 1997; 40 (5): 400–8.
- Hershko C., Abrahamov A., Konijn A.M., Breuer W., Cabantchik Z.I., Pootrakul P. a Link G. Objectives and Methods of Iron Chelation Therapy. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2003; 1 (2): 151–68.
- Hershko C., Link G., Tzahor M., Kaltwasser J.P., Athias P., Grynberg A. a Pinson A. Anthracycline Toxicity Is Potentiated by Iron and Inhibited by Deferoxamine: Studies in Rat Heart Cells in Culture. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1993; 122 (3): 245–51.
- Von Hoff D.D. Phase I Trials of Dexrazoxane and Other Potential Applications for the Agent. *Seminars in Oncology*, 1998; 25 (4 Suppl 10): 31–6.
- Von Hoff D.D., Layard M.W., Basa P., Davis H.L., Von Hoff A.L., Rozenzweig M. a Muggia F.M. Risk Factors for Doxorubicin-induced Congestive Heart Failure. *Annals of Internal Medicine*, 1979; 91 (5): 710–7.
- Holm B., Jensen P.B. a Sehested M. ICRF-187 Rescue in Etoposide Treatment in Vivo. A Model Targeting High-dose Topoisomerase II Poisons to CNS Tumors. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 1996; 38 (3): 203–9.
- Horackova M., Ponka P. a Byczko Z. The Antioxidant Effects of a Novel Iron Chelator Salicylaldehyde Isonicotinoyl Hydrazone in the Prevention of H₂O₂ Injury in Adult Cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*, 2000; 47 (3): 529–36.
- Hortobagyi G.N., Frye D., Buzdar A.U., Ewer M.S., Fraschini G., Hug V., Ames F., Montague E., Carrasco C.H., Mackay B. a Benjamin R.S. Decreased Cardiac Toxicity of Doxorubicin Administered by Continuous Intravenous Infusion in Combination Chemotherapy for Metastatic Breast Carcinoma. *Cancer*, 1989; 63 (1): 37–45.
- Hrdina R., Gersl V., Klimtová I., Šimůnek T., Machácková J. a Adamcová M. Anthracycline-induced Cardiotoxicity. *Acta Medica (Hradec Králové) / Universitas Carolina, Facultas Medica Hradec Králové*, 2000; 43 (3): 75–82.

- Chou T.-C. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. *Cancer Research*, 2010; 70 (2): 440–6.
- Chou T.-C. a Talalay P. Quantitative Analysis of Dose-effect Relationships: The Combined Effects of Multiple Drugs or Enzyme Inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation*, 1984; 22: 27–55.
- Iarussi D., Indolfi P., Casale F., Martino V., Di Tullio M.T. a Calabrò R. Anthracycline-induced Cardiotoxicity in Children with Cancer: Strategies for Prevention and Management. *Paediatric Drugs*, 2005; 7 (2): 67–76.
- Jemal A., Siegel R., Ward E., Hao Y., Xu J., Murray T. a Thun M.J. Cancer Statistics, 2008. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 2009; 58 (2): 71–96.
- Ju B.-G., Lunyak V. V, Perissi V., Garcia-Bassets I., Rose D.W., Glass C.K. a Rosenfeld M.G. A Topoisomerase IIbeta-mediated dsDNA Break Required for Regulated Transcription. *Science (New York, N.Y.)*, 2006; 312 (5781): 1798–802.
- Kaiserová H., Den Hartog G.J.M., Šimůnek T., Schröterová L., Kvasnicková E. a Bast A. Iron Is Not Involved in Oxidative Stress-mediated Cytotoxicity of Doxorubicin and Bleomycin. *British Journal of Pharmacology*, 2006; 149 (7): 920–30.
- Kaiserová H., Šimůnek T., Van der Vijgh W.J.F., Bast A. a Kvasnicková E. Flavonoids as Protectors Against Doxorubicin Cardiotoxicity: Role of Iron Chelation, Antioxidant Activity and Inhibition of Carbonyl Reductase. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2007; 1772 (9): 1065–74.
- Kalinowski D.S. a Richardson D.R. The Evolution of Iron Chelators for the Treatment of Iron Overload Disease and Cancer. *Pharmacological Reviews*, 2005; 57 (4): 547–83.
- Karakiulakis G., Missirlis E. a Maragoudakis M.E. Mode of Action of Razoxane: Inhibition of Basement Membrane Collagen-degradation by a Malignant Tumor Enzyme. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 1989; 11 (4): 255–61.
- Keizer H.G., Pinedo H.M., Schuurhuis G.J. a Joenje H. Doxorubicin (adriamycin): a Critical Review of Free Radical-dependent Mechanisms of Cytotoxicity. *Pharmacology & Therapeutics*, 1990; 47 (2): 219–31.
- Kitagawa H., Fujiki R., Yoshimura K., Mezaki Y., Uematsu Y., Matsui D., Ogawa S., Unno K., Okubo M., Tokita A., Nakagawa T., Ito T., Ishimi Y., Nagasawa H., Matsumoto T., Yanagisawa J. a Kato S. Retraction Notice to: The Chromatin-remodeling Complex WINAC Targets a Nuclear Receptor to Promoters and Is Impaired in Williams Syndrome. *Cell*, 2012; 149 (1): 245.
- Kovacs C.J., Evans M.J., Burholt D.R. a Schenken L.L. ICRF-159 Enhancement of Radiation Response in Combined Modality Therapies. II. Differential Responses of Tumour and Normal Tissues. *British Journal of Cancer*, 1979; 39 (5): 524–30.
- Kuratsu J.I., Arita N., Kayama T., Kubo N., Mori T., Sawamura Y. a Ushio Y. Phase II Trial of Pre-irradiation KRN8602 (MX2) in Malignant Glioma Patients. *Journal of Neuro-oncology*, 2000; 48 (2): 145–9.

- Kuznetsov D.D., Alsikafi N.F., O'Connor R.C. a Steinberg G.D. Intravesical Valrubicin in the Treatment of Carcinoma in Situ of the Bladder. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2001; 2 (6): 1009–13.
- Kwok J.C. a Richardson D.R. Anthracyclines Induce Accumulation of Iron in Ferritin in Myocardial and Neoplastic Cells: Inhibition of the Ferritin Iron Mobilization Pathway. *Molecular Pharmacology*, 2003; 63 (4): 849–61.
- Larsen A.K., Escargueil A.E. a Skladanowski A. Catalytic Topoisomerase II Inhibitors in Cancer Therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, 2003; 99 (2): 167–81.
- Legha S.S., Benjamin R.S., Mackay B., Ewer M.S., Wallace S., Valdivieso M., Rasmussen S.L., Blumenschein G.R. a Freireich E.J. Reduction of Doxorubicin Cardiotoxicity by Prolonged Continuous Intravenous Infusion. *Annals of Internal Medicine*, 1982a; 96 (2): 133–9.
- Legha S.S., Wang Y.M., Mackay B., Ewer M.S., Hortobagyi G.N., Benjamin R.S. a Ali M.K. Clinical and Pharmacologic Investigation of the Effects of Alpha-tocopherol on Adriamycin Cardiotoxicity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1982b; 393 (1 Vitamin E): 411–8.
- Lenehan P.F., Gutiérrez P.L., Wagner J.L., Milak N., Fisher G.R. a Ross D.D. Resistance to Oxidants Associated with Elevated Catalase Activity in HL-60 Leukemia Cells That Overexpress Multidrug-resistance Protein Does Not Contribute to the Resistance to Daunorubicin Manifested by These Cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 1995; 35 (5): 377–86.
- Levitt G.A., Dorup I., Sorensen K. a Sullivan I. Does Anthracycline Administration by Infusion in Children Affect Late Cardiotoxicity? *British Journal of Haematology*, 2004; 124 (4): 463–8.
- Lim C.C., Zuppinger C., Guo X., Kuster G.M., Helmes M., Eppenberger H.M., Suter T.M., Liao R. a Sawyer D.B. Anthracyclines Induce Calpain-dependent Titin Proteolysis and Necrosis in Cardiomyocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004; 279 (9): 8290–9.
- Link G., Tirosch R., Pinson A. a Hershko C. Role of Iron in the Potentiation of Anthracycline Cardiotoxicity: Identification of Heart Cell Mitochondria as a Major Site of Iron-anthracycline Interaction. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1996; 127 (3): 272–8.
- Lipshultz S.E., Giantris A.L., Lipsitz S.R., Kimball Dalton V., Asselin B.L., Barr R.D., Clavell L.A., Hurwitz C.A., Moghrabi A., Samson Y., Schorin M.A., Gelber R.D., Sallan S.E. a Colan S.D. Doxorubicin Administration by Continuous Infusion Is Not Cardioprotective: The Dana-Farber 91-01 Acute Lymphoblastic Leukemia Protocol. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2002; 20 (6): 1677–82.
- Low R.L., Orton S. a Friedman D.B. A Truncated Form of DNA Topoisomerase IIbeta Associates with the mtDNA Genome in Mammalian Mitochondria. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 2003; 270 (20): 4173–86.
- Lyu Y.L., Kerrigan J.E., Lin C.-P., Azarova A.M., Tsai Y.-C., Ban Y. a Liu L.F. Topoisomerase IIbeta Mediated DNA Double-strand Breaks: Implications in Doxorubicin Cardiotoxicity and Prevention by Dexrazoxane. *Cancer Research*, 2007; 67 (18): 8839–46.

- Malisza K.L. a Hasinoff B.B. Production of Hydroxyl Radical by iron(III)-anthraquinone Complexes Through Self-reduction and Through Reductive Activation by the Xanthine Oxidase/hypoxanthine System. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1995; 321 (1): 51–60.
- Marchini S., Damia G., Broggin M., Pennella G., Ripamonti M., Marsiglio A. a Geroni C. 4-Demethoxy-3'-deamino-3'-aziridinyl-4'-methylsulphonyl-daunorubicin (PNU-159548), a Novel Anticancer Agent Active Against Tumor Cell Lines with Different Resistance Mechanisms. *Cancer Research*, 2001; 61 (5): 1991–5.
- Martin E., Thougard A.V., Grauslund M., Jensen P.B., Bjorkling F., Hasinoff B.B., Tjørnelund J., Sehested M. a Jensen L.H. Evaluation of the Topoisomerase II-inactive Bisdioxopiperazine ICRF-161 as a Protectant Against Doxorubicin-induced Cardiomyopathy. *Toxicology*, 2009; 255 (1-2): 72–9.
- Matsui H., Morishima I., Numaguchi Y., Toki Y., Okumura K. a Hayakawa T. Protective Effects of Carvedilol Against Doxorubicin-induced Cardiomyopathy in Rats. *Life Sciences*, 1999; 65 (12): 1265–74.
- Matsumura Y. a Maeda H. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumorotropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Research*, 1986; 46 (12 Pt 1): 6387–92.
- McNamara S., Nichol J.N., Wang H. a Miller W.H. Targeting PKC Delta-mediated Topoisomerase II Beta Overexpression Subverts the Differentiation Block in a Retinoic Acid-resistant APL Cell Line. *Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K*, 2010; 24 (4): 729–39.
- Menna P., Salvatorelli E. a Minotti G. Cardiotoxicity of Antitumor Drugs. *Chemical Research in Toxicology*, 2008; 21 (5): 978–89.
- Mickisch G.H., Rahman A., Pastan I. a Gottesman M.M. Increased Effectiveness of Liposome-encapsulated Doxorubicin in Multidrug-resistant-transgenic Mice Compared with Free Doxorubicin. *Journal of the National Cancer Institute*, 1992; 84 (10): 804–5.
- Minotti G., Licata S., Saponiero A., Menna P., Calafiore A.M., Di Giammarco G., Liberi G., Animati F., Cipollone A., Manzini S. a Maggi C.A. Anthracycline Metabolism and Toxicity in Human Myocardium: Comparisons Between Doxorubicin, Epirubicin, and a Novel Disaccharide Analogue with a Reduced Level of Formation and [4Fe-4S] Reactivity of Its Secondary Alcohol Metabolite. *Chemical Research in Toxicology*, 2000; 13 (12): 1336–1341.
- Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G. a Gianni L. Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*, 2004; 56 (2): 185–229.
- Minotti G., Ronchi R., Salvatorelli E., Menna P. a Cairo G. Doxorubicin Irreversibly Inactivates Iron Regulatory Proteins 1 and 2 in Cardiomyocytes: Evidence for Distinct Metabolic Pathways and Implications for Iron-mediated Cardiotoxicity of Antitumor Therapy. *Cancer Research*, 2001; 61 (23): 8422–8.

- Mori A., Kennel S.J., Van Borssum Waalkes M., Scherphof G.L. a Huang L. Characterization of Organ-specific Immunoliposomes for Delivery of 3',5'-O-dipalmitoyl-5-fluoro-2'-deoxyuridine in a Mouse Lung-metastasis Model. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 1995; 35 (6): 447–56.
- Motzer R.J., Hoosen S., Bello C.L. a Christensen J.G. Sunitinib Malate for the Treatment of Solid Tumours: a Review of Current Clinical Data. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 2006; 15 (5): 553–61.
- Oeffinger K.C., Mertens A.C., Sklar C. a, Kawashima T., Hudson M.M., Meadows A.T., Friedman D.L., Marina N., Hobbie W., Kadan-Lottick N.S., Schwartz C.L., Leisenring W. a Robison L.L. Chronic Health Conditions in Adult Survivors of Childhood Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 2006; 355 (15): 1572–82.
- Oliveira P.J., Bjork J.A., Santos M.S., Leino R.L., Froberg M.K., Moreno A.J. a Wallace K.B. Carvedilol-mediated Antioxidant Protection Against Doxorubicin-induced Cardiac Mitochondrial Toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2004; 200 (2): 159–68.
- Park J.W., Hong K., Kirpotin D.B., Colbern G., Shalaby R., Baselga J., Shao Y., Nielsen U.B., Marks J.D., Moore D., Papahadjopoulos D. a Benz C.C. Anti-HER2 Immunoliposomes: Enhanced Efficacy Attributable to Targeted Delivery. *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 2002; 8 (4): 1172–81.
- Popelová O., Štěrba M., Šimůnek T., Mazurová Y., Gunčová I., Hroch M., Adamcová M. a Geršl V. Deferiprone Does Not Protect Against Chronic Anthracycline Cardiotoxicity in Vivo. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2008; 326 (1): 259–69.
- Rhomberg W. a Hellmann K. *Razoxane and Dexrazoxane - Two Multifunctional Agents*. Edited by Kurt Hellmann a Walter Rhomberg. 1st ed., 2011. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Safra T. Cardiac Safety of Liposomal Anthracyclines. *The Oncologist*, 2003; 8 Suppl 2 (90002): 17–24.
- Sawyer D.B., Peng X., Chen B., Pentassuglia L. a Lim C.C. Mechanisms of Anthracycline Cardiac Injury: Can We Identify Strategies for Cardioprotection? *Progress in Cardiovascular Diseases*, 2010; 53 (2): 105–13.
- Seymour L., Bramwell V. a Moran L.A. Use of Dexrazoxane as a Cardioprotectant in Patients Receiving Doxorubicin or Epirubicin Chemotherapy for the Treatment of Cancer. The Provincial Systemic Treatment Disease Site Group. *Cancer Prevention & Control : CPC = Prévention & Contrôle En Cancérologie : PCC*, 1999; 3 (2): 145–59.
- Schrijvers D., Bos A.M.E., Dyck J., De Vries E.G.E., Wanders J., Roelvink M., Fumoleau P., Bortini S. a Vermorken J.B. Phase I Study of MEN-10755, a New Anthracycline in Patients with Solid Tumours: a Report from the European Organization for Research and Treatment of Cancer, Early Clinical Studies Group. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 2002; 13 (3): 385–91.
- Siveski-Iliskovic N., Hill M., Chow D.A. a Singal P.K. ProbucoI Protects Against Adriamycin Cardiomyopathy Without Interfering with Its Antitumor Effect. *Circulation*, 1995; 91 (1): 10–5.

- Skladanowski A. a Konopa J. Relevance of Interstrand DNA Crosslinking Induced by Anthracyclines for Their Biological Activity. *Biochemical Pharmacology*, 1994; 47 (12): 2279–87.
- Solem L.E. a Wallace K.B. Selective Activation of the Sodium-independent, Cyclosporin A-sensitive Calcium Pore of Cardiac Mitochondria by Doxorubicin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1993; 121 (1): 50–7.
- Strevel E.L. a Siu L.L. Cardiovascular Toxicity of Molecularly Targeted Agents. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)*, 2009; 45 Suppl 1: 318–31.
- Suter T.M., Cook-Bruns N. a Barton C. Cardiotoxicity Associated with Trastuzumab (Herceptin) Therapy in the Treatment of Metastatic Breast Cancer. *Breast (Edinburgh, Scotland)*, 2004; 13 (3): 173–83.
- Swain S.M., Whaley F.S. a Ewer M.S. Congestive Heart Failure in Patients Treated with Doxorubicin: a Retrospective Analysis of Three Trials. *Cancer*, 2003; 97 (11): 2869–79.
- Swain S.M., Whaley F.S., Gerber M.C., Ewer M.S., Bianchine J.R. a Gams R.A. Delayed Administration of Dexrazoxane Provides Cardioprotection for Patients with Advanced Breast Cancer Treated with Doxorubicin-containing Therapy. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 1997a; 15 (4): 1333–40.
- Swain S.M., Whaley F.S., Gerber M.C., Weisberg S., York M., Spicer D., Jones S.E., Wadler S., Desai A., Vogel C., Speyer J., Mittelman A., Reddy S., Pendergrass K., Velez-Garcia E., Ewer M.S., Bianchine J.R. a Gams R.A. Cardioprotection with Dexrazoxane for Doxorubicin-containing Therapy in Advanced Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 1997b; 15 (4): 1318–32.
- Šimůnek T., Boer C., Bouwman R.A., Vlasblom R., Versteilen A.M.G., Štěřba M., Geršl V., Hrdina R., Ponka P., De Lange J.J., Paulus W.J. a Musters R.J.P. SIH--a Novel Lipophilic Iron Chelator--protects H9c2 Cardiomyoblasts from Oxidative Stress-induced Mitochondrial Injury and Cell Death. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2005; 39 (2): 345–54.
- Šimůnek T., Štěřba M., Popelová O., Adamcová M., Hrdina R. a Geršl V. Anthracycline-induced Cardiotoxicity: Overview of Studies Examining the Roles of Oxidative Stress and Free Cellular Iron. *Pharmacological Reports : PR*, 2009; 61 (1): 154–71.
- Štěřba M., Popelová O., Lenčo J., Fučíková A., Brčáková E., Mazurová Y., Jirkovský E., Šimůnek T., Adamcová M., Mičuda S., Stulík J. a Geršl V. Proteomic Insights into Chronic Anthracycline Cardiotoxicity. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2011; 50 (5): 849–62.
- Štěřba M., Popelová O., Šimůnek T., Mazurová Y., Potáčková A., Adamcová M., Gunčová I., Kaiserová H., Palička V., Ponka P., Others a Geršl V. Iron Chelation-afforded Cardioprotection Against Chronic Anthracycline Cardiotoxicity: a Study of Salicylaldehyde Isonicotinoyl Hydrazone (SIH). *Toxicology*, 2007; 235 (3): 150–166.
- Štěřba M., Popelová O., Vávřová A., Jirkovský E., Kovaříková P., Geršl V. a Šimůnek T. Oxidative Stress, Redox Signaling, and Metal Chelation in Anthracycline Cardiotoxicity and

- Pharmacological Cardioprotection. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2013; 18 (8): 899–929.
- Takemoto Y., Sampi K., Kuraishi Y., Okabe K., Tamura K., Mizoguchi H., Saito H., Masaoka T. a Ogawa M. A Prospective Randomized Trial of KRN8602 and Cytosine Arabinoside Vs. Daunorubicin and Cytosine Arabinoside in Adult Patients with Newly Diagnosed Acute Myelogenous Leukemia. The KRN8602 Leukemia Study Group. *International Journal of Hematology*, 1999; 70 (1): 20–5.
- Telli M.L., Witteles R.M., Fisher G. a a Srinivas S. Cardiotoxicity Associated with the Cancer Therapeutic Agent Sunitinib Malate. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 2008; 19 (9): 1613–8.
- Tetef M.L., Synold T.W., Chow W., Leong L., Margolin K., Morgan R., Raschko J., Shibata S., Somlo G., Yen Y., Groshen S., Johnson K., Lenz H.J., Gandara D. a Doroshow J.H. Phase I Trial of 96-hour Continuous Infusion of Dexrazoxane in Patients with Advanced Malignancies. *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 2001; 7 (6): 1569–76.
- Thomas C.E. a Aust S.D. Release of Iron from Ferritin by Cardiotoxic Anthracycline Antibiotics. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1986; 248 (2): 684–9.
- Tietze F. Enzymic Method for Quantitative Determination of Nanogram Amounts of Total and Oxidized Glutathione: Applications to Mammalian Blood and Other Tissues. *Analytical Biochemistry*, 1969; 27 (3): 502–22.
- Vávrová A. Studium Role Glutathionu u Poškození Srdečních Buněk Antracyklinovými Cytostatiky, 2008. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.
- Vávrová A. a Šimůnek T. DNA Topoisomerase II β : a Player in Regulation of Gene Expression and Cell Differentiation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2012; 44 (6): 834–7.
- Voest E.E., Van Acker S.A., Van der Vijgh W.J.F., Van Asbeck B.S. a Bast A. Comparison of Different Iron Chelators as Protective Agents Against Acute Doxorubicin-induced Cardiotoxicity. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 1994; 26 (9): 1179–85.
- Wallace K.B. Doxorubicin-induced Cardiac Mitochondrionopathy. *Pharmacology & Toxicology*, 2003; 93 (3): 105–15.
- Walter P.B., Knutson M.D., Paler-Martinez A., Lee S., Xu Y., Viteri F.E. a Ames B.N. Iron Deficiency and Iron Excess Damage Mitochondria and Mitochondrial DNA in Rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002; 99 (4): 2264–9.
- Wani M.K., Koseki Y., Yarber R.H., Sweatman T.W., Ahmed A., Samant S., Hengesteg A., Israel M. a Robbins K.T. Rationale for Intralesional Valrubicin in Chemoradiation of Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *The Laryngoscope*, 2000; 110 (12): 2026–32.
- Waterhouse D.N., Tardi P.G., Mayer L.D. a Bally M.B. A Comparison of Liposomal Formulations of Doxorubicin with Drug Administered in Free Form: Changing Toxicity Profiles. *Drug*

Safety: an International Journal of Medical Toxicology and Drug Experience, 2001; 24 (12): 903–20.

Weilbach F.X., Chan A., Toyka K. V a Gold R. The Cardioprotector Dexrazoxane Augments Therapeutic Efficacy of Mitoxantrone in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Clinical and Experimental Immunology*, 2004; 135 (1): 49–55.

Wells Q.S. a Lenihan D.J. Reversibility of Left Ventricular Dysfunction Resulting from Chemotherapy: Can This Be Expected? *Progress in Cardiovascular Diseases*, 2010; 53 (2): 140–8.

Woodman R.J. Enhancement of Antitumor Effectiveness of ICRF-159 (NSC-129943) Against Early L1210 Leukemia by Combination with Cis-diamminedichloroplatinum (NSC-119875) or Daunomycin (NSC-82151). *Cancer Chemotherapy Reports. Part 2*, 1974; 4 (1): 45–52.

Woodman R.J., Csyk R.L., Kline I., Gang M. a Venditti J.M. Enhancement of the Effectiveness of Daunorubicin (NSC-82151) or Adriamycin (NSC-123127) Against Early Mouse L1210 Leukemia with ICRF-159 (NSC-129943). *Cancer Chemotherapy Reports. Part 1*, 1975; 59 (4): 689–95.

Xu L., Jin L., Pan H., Zhang A., Wei G., Li P. a Lu W. Deferiprone Protects the Isolated Atria from Cardiotoxicity Induced by Doxorubicin. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2006; 27 (10): 1333–9.

Yeh E.T.H. a Bickford C.L. Cardiovascular Complications of Cancer Therapy: Incidence, Pathogenesis, Diagnosis, and Management. *Journal of the American College of Cardiology*, 2009; 53 (24): 2231–47.

Yeh E.T.H., Tong A.T., Lenihan D.J., Yusuf S.W., Swafford J., Champion C., Durand J.-B., Gibbs H., Zafarmand A.A. a Ewer M.S. Cardiovascular Complications of Cancer Therapy: Diagnosis, Pathogenesis, and Management. *Circulation*, 2004; 109 (25): 3122–31.

Zalupski M., Metch B., Balcerzak S., Fletcher W.S., Chapman R., Bonnet J.D., Weiss G.R., Ryan J., Benjamin R.S. a Baker L.H. Phase III Comparison of Doxorubicin and Dacarbazine Given by Bolus Versus Infusion in Patients with Soft-tissue Sarcomas: a Southwest Oncology Group Study. *Journal of the National Cancer Institute*, 1991; 83 (13): 926–32.

Zhang J., Herman E.H. a Ferrans V.J. Effects of ICRF-186 [(L)1,2-bis(3,5-dioxopiperazinyl-1-yl)propane] on the Toxicity of Doxorubicin in Spontaneously Hypertensive Rats. *Toxicology*, 1994; 92 (1-3): 179–92.

Zhang S., Liu X., Bawa-Khalfe T., Lu L.-S., Lyu Y.L., Liu L.F. a Yeh E.T.H. Identification of the Molecular Basis of Doxorubicin-induced Cardiotoxicity. *Nature Medicine*, 2012; 18 (11): 1639–42.

8. PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI

- Kovaříková P., Pasakova-Vrbatova I., Vávrová A., Stariat J., Klimes J. a Šimůnek T. Development of LC-MS/MS Method for the Simultaneous Analysis of the Cardioprotective Drug Dexrazoxane and Its Metabolite ADR-925 in Isolated Cardiomyocytes and Cell Culture Medium. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2013; 76: 243–51. (IF 2011: 2,967)
- Jirkovský E., Popelová O., Kriváková-Stanková P., Vávrová A., Hroch M., Hašková P., Brcáková-Dolezelová E., Micuda S., Adamcová M., Šimůnek T., Cervinková Z., Geršl V. a Štěřba M. Chronic Anthracycline Cardiotoxicity: Molecular and Functional Analysis with Focus on Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2 and Mitochondrial Biogenesis Pathways. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2012; 343 (2): 468–78. (IF 2011: 3.828)
- Štěřba M., Popelová O., Vávrová A., Jirkovský E., Kovaříková P., Geršl V. a Šimůnek T. Oxidative Stress, Redox Signaling, and Metal Chelation in Anthracycline Cardiotoxicity and Pharmacological Cardioprotection. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2013; 18 (8): 899–929. (IF 2011: 8.456)
- Macková E., Hrušková K., Bendová P., Vávrová A., Jansová H., Hašková P., Kovaříková P., Vávrová K. a Šimůnek T. Methyl and Ethyl Ketone Analogs of Salicylaldehyde Isonicotinoyl Hydrazone: Novel Iron Chelators with Selective Antiproliferative Action. *Chemico-biological Interactions*, 2012; 197 (2-3): 69–79. (IF 2011: 2.865)
- Vávrová A. a Šimůnek T. DNA Topoisomerase II β : a Player in Regulation of Gene Expression and Cell Differentiation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2012; 44 (6): 834–7. (IF 2011: 4.634)
- Hašková P., Koubková L., Vávrová A., Macková E., Hrušková K., Kovaříková P., Vávrová K. a Šimůnek T. Comparison of Various Iron Chelators Used in Clinical Practice as Protecting Agents Against Catecholamine-induced Oxidative Injury and Cardiotoxicity. *Toxicology*, 2011; 289 (2-3): 122–31. (IF 2011: 3.681)
- Hrušková K., Kovaříková P., Bendova P., Hašková P., Macková E., Stariat J., Vávrová A., Vávrová K. a Šimůnek T. Synthesis and Initial in Vitro Evaluations of Novel Antioxidant Aroylhydrazone Iron Chelators with Increased Stability Against Plasma Hydrolysis. *Chemical Research in Toxicology*, 2011; 24 (3): 290–302. (IF 2010: 3.779)
- Hašková P., Kovaříková P., Koubková L., Vávrová A., Macková E. a Šimůnek T. Iron Chelation with Salicylaldehyde Isonicotinoyl Hydrazone Protects Against Catecholamine Autoxidation and Cardiotoxicity. *Free Radical Biology & Medicine*, 2011; 50 (4): 537–49. (IF 2010: 5.423)

Vávrová A., Popelová O., Štěřba M., Jirkovský E., Hašková P., Mertlíková-Kaiserová H., Geršl V. a Šimůnek T. In Vivo and in Vitro Assessment of the Role of Glutathione Antioxidant System in Anthracycline-induced Cardiotoxicity. *Archives of Toxicology*, 2011; 85 (5): 525–35. (IF 2010: 4.674)

Bendova P., Macková E., Hašková P., Vávrová A., Jirkovský E., Štěřba M., Popelová O., Kalinowski D.S., Kovaříková P., Vávrová K., Richardson D.R. a Šimůnek T. Comparison of Clinically Used and Experimental Iron Chelators for Protection Against Oxidative Stress-induced Cellular Injury. *Chemical Research in Toxicology*, 2010; 23 (6): 1105–14. (IF 2010: 4.148)

9. PREZENTACE NA KONFERENCÍCH

Vávrová A., Roh J, Hrušková K, Tichotová L, Jansová H, Šimůnek T. Otevřené analogy ADR-925 nejsou schopny ochránit izolované neonatální kardiomyocyty před poškozením navozeným antracyklinovými antibiotiky. Čtyřicet let komise experimentální kardiologie: Odkud jsme vyšli a kam směřujeme. 40. Pracovní konference Komise experimentální kardiologie při České a Slovenské fyziologické společnosti ČLS JEP, Vranovská ves, Česká republika, 17. – 19. 10. 2012, sborník abstrakt str. 34, ISSN 1801-6103

Vávrová A., Hrušková K, Kratochvíl M, Eisner T, Macháček M, Tichotová L, Roh J, Vávrová K, Šimůnek T. Dexrazoxane and ADR-925 analogues in the protection of anthracycline and oxidative damage to neonatal rat cardiomyocytes. 10th New Frontiers in Basic Cardiovascular Research: France - New EU Members Meeting, Hradec Králové, Česká republika, 12. – 15. 6. 2012, sborník abstrakt str. 63-64, ISBN978-80-8678-50-4

Vávrová A., Hrušková K., Vávrová K., Šimůnek T. Dexrazoxane protection of anthracycline cardiotoxicity on the model of isolated neonatal rat cardiomyocytes: ROS or DNA topoisomerase II. 20th National Students' Scientific Conference of the Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Hradec Králové, Czech Republic, 31. 1. – 1. 2. 2012

Vávrová A., Jansová H, Šimůnek T. Anthracycline cardiotoxicity on the model of isolated neonatal rat cardiomyocytes: Is DNA topoisomerase II involved? 61. Česko-Slovenské farmakologické dny, Brno, 14. – 16. 9. 2011, sborník abstrakt str. 154, ISBN 978-80-7399-770-0

Vávrová A., Jansová H, Šimůnek T. Anthracycline cardiotoxicity on the model of isolated neonatal rat cardiomyocytes: Is DNA topoisomerase II involved?, The XXX Annual meeting of the European Section of the International Society of Heart Research, Haifa, Izrael, 26. – 29. 6. 2011, sborník abstrakt str. 210

Vávrová A., Jansová H., Šimůnek T. Anthracycline cardiotoxicity on the model of isolated neonatal rat cardiomyocytes: Is DNA topoisomerase II involved? 19th National

Students' Scientific Conference of the Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Hradec Králové, Czech Republic, 31. 1. – 1. 2. 2012

Vávrová A, Hrušková K, Jansová H, Hašková P, Vávrová K, Šimůnek T. Anthracycline cardiotoxicity on isolated neonatal rat cardiomyocytes and possible pharmacological cardioprotection by dexrazoxane and its analogues. 9th New Frontiers in Basic Cardiovascular Research, Toulouse, France, 14. – 17. 10. 2010, sborník abstrakt str. 50

Vávrová A, Hrušková K., Jansová H., Hašková P., Vávrová K., Šimůnek T. Study of anthracycline cardiotoxicity and possible pharmacological cardioprotection by dexrazoxane and its analogues on isolated neonatal rat cardiomyocytes. 60. Česko-slovenské farmakologické dny, Hradec Králové, Česká republika, 15. – 17. 9. 2010, sborník abstrakt str. 27

Vávrová A, Jirkovský E., Popelová O., Hašková P., Štěrbá M., Geršl V., Šimůnek T. Glutathione antioxidant system in the anthracycline-induced cardiotoxicity – in vivo and in vitro studies. XX World congress ISHR – Paradigm shift to integrated cardiology – gene, function and life, Kyoto, Japonsko, 13. – 16. 5. 2010, sborník abstrakt str. P-2-12-4

Vávrová A, Popelová O, Štěrbá M, Jirkovský E, Geršl V, Šimůnek T. Vliv obsahu redukovaného a oxidovaného glutathionu na kardiotoxicitu antracyklinových cytostatik. Farmakológia 2009, Zborník prác, 59. Farmakologické dni, Bratislava, Slovenská republika, 2. – 4. 9. 2009, sborník abstrakt str.126, ISBN-978-80-223-2708-4

Vávrová A, Jirkovský E., Hašková P., Popelová O., Štěrbá M., Geršl V., Šimůnek T. Role of glutathion in anthracycline-induced cardiotoxicity. Heart failure 2009, Nice, France, 30. 5. – 2. 6. 2009

PŘÍLOHY

I.

Oxidative stress, redox signaling, and metal chelation in
anthracycline cardiotoxicity and pharmacological
cardioprotection.

Štěrbá M., Popelová O., Vávrová A., Jirkovský E., Kovaříková P., Geršl V.,
Šimůnek T.

Štěřba M., Popelová O., Vávrová A., Jirkovský E., Kovaříková P., Geršl V. a
Šimůnek T. Oxidative Stress, Redox Signaling, and Metal Chelation in
Anthracycline Cardiotoxicity and Pharmacological Cardioprotection.
Antioxidants & Redox Signaling, 2013; 18 (8): 899–929.

II.

DNA topoisomerase II β : a player in regulation of gene expression and cell differentiation.

Vávrová A., Šimůnek T.

Vávrová A. a Šimůnek T. DNA Topoisomerase II β : a Player in Regulation of Gene Expression and Cell Differentiation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2012; 44 (6): 834–7.

III.

In vivo and in vitro assessment of the role of glutathione antioxidant system in anthracycline-induced cardiotoxicity.

Vávrová A., Popelová O., Štěrbá M., Jirkovský E., Hašková P., Mertlíková-Kaiserová H., Geršl V., Šimůnek T.

Vávrová A., Popelová O., Štěřba M., Jirkovský E., Hašková P., Mertlíková-Kaiserová H., Geršl V. a Šimůnek T. In Vivo and in Vitro Assessment of the Role of Glutathione Antioxidant System in Anthracycline-induced Cardiotoxicity. *Archives of Toxicology*, 2011; 85 (5): 525–35.

IV.

Catalytic inhibitors of topoisomerase II differentially modulate the toxicity of anthracyclines towards cardiac and cancer cells.

Vávrová A., Jansová H., Macková E., Macháček M., Hašková P., Tichotová L., Štěrba M., Šimůnek T.

Catalytic inhibitors of topoisomerase II differentially modulate the toxicity of anthracyclines to cardiac and cancer cells

A Vávrová¹, H Jansová¹, E Macková¹, M Macháček¹, P Hašková¹, L Tichotová¹, M Štěrbá², T Šimůnek^{1,*}

¹Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Heyrovského 1203, 500 03 Hradec Králové, Czech Republic

²Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Hradec Králové, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové, Czech Republic

Running title: Catalytic TOP2 inhibitors and anthracyclines.

***Corresponding author:**

Dr. Tomáš Šimůnek
Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy
Department of Biochemical Sciences
Heyrovského 1203
500 05 Hradec Králové
Czech Republic
Tel.: +420 495 067 422
Fax: +420 495 067 168
E-mail: Tomas.Simunek@faf.cuni.cz

Summary

Background and purpose: Anthracyclines (such as doxorubicin or daunorubicin) are among the most effective anticancer drugs, but their usefulness is hampered by the risk of irreversible cardiotoxicity. Dexrazoxane is the only clinically approved cardioprotective agent against anthracycline cardiotoxicity. Its activity has traditionally been attributed to the iron-chelating effects of its metabolite with subsequent protection from oxidative stress. However, dexrazoxane is also a catalytic inhibitor of topoisomerase II (TOP2). Therefore, we examined whether dexrazoxane and two other TOP2 catalytic inhibitors, sobuzoxane and merbarone, protect cardiomyocytes from anthracycline toxicity and assessed their effects on anthracycline antineoplastic efficacy.

Experimental approach: We used isolated rat cardiomyocytes and HL-60 promyelocytic leukaemia cells to compare the effects of TOP2 catalytic inhibitors on anthracycline toxicity to cardiac and cancer cells.

Results: Dexrazoxane and two other TOP2 inhibitors protected isolated neonatal rat cardiomyocytes against toxicity induced by both doxorubicin and daunorubicin. However, none of the TOP2 inhibitors significantly protected cardiomyocytes in a model of hydrogen peroxide-induced oxidative injury. In contrast, the catalytic inhibitors did not compromise the antiproliferative effects of the anthracyclines in the HL-60 leukaemic cell line; instead, synergistic interactions were mostly observed. Additionally, anthracycline-induced caspase activation was differentially modulated by the TOP2 inhibitors in cardiac and cancer cells.

Conclusion: Our data indicate that dexrazoxane may protect cardiomyocytes via its catalytic TOP2 inhibitory activity rather than antioxidant activity. The differential expression and/or regulation of TOP2 isoforms in cardiac and cancer cells by catalytic inhibitors may be responsible for the selective modulation of anthracycline action observed.

Keywords: Doxorubicin; daunorubicin; anthracycline cardiotoxicity; topoisomerase II; dexrazoxane.

1. INTRODUCTION

Anthracycline (ANT) antibiotics, such as doxorubicin (DOX, Fig. 1), daunorubicin (DAU, Fig. 1) or epirubicin, rank among the most effective and frequently used antineoplastic agents and remain indispensable components of modern chemotherapy protocols for numerous haematological malignancies as well as solid tumours. However, the risk of irreversible and potentially fatal toxicity to cardiac tissue is the main drawback of ANT use in clinical practice (Gianni *et al.*, 2008).

Numerous hypotheses have been proposed regarding the mechanisms underlying both the antineoplastic and cardiotoxic effects of ANTs (Minotti *et al.*, 2004). Currently, topoisomerase II (TOP2) is generally recognised as the principal molecular target for ANT antitumor action. ANTs belong to the group of "TOP2 poisons", which consist of cytotoxic agents that stabilise the "cleavable complex" (Deweese *et al.*, 2009). In terms of cardiotoxicity, the iron (Fe)-catalysed intramyocardial production of reactive oxygen species (ROS) has traditionally been implicated. The C ring of ANT aglycone readily undergoes redox-cycling, and Fe ions may form redox-active complexes with ANTs, resulting in the formation of superoxide, peroxide and eventually highly reactive and toxic hydroxyl radicals (Keizer *et al.*, 1990; Simunek *et al.*, 2009).

This traditional "ROS and Fe" hypothesis of ANT-induced cardiotoxicity has been reinforced by the protective efficiency of dexrazoxane (DEX, ICRF-187, Fig. 1), which is the only clinically approved cardioprotectant. The cardioprotective effects of DEX have been attributed to its hydrolysis product ADR-925, strikingly similar to the well-known metal chelator EDTA. Following the metabolism of DEX into ADR-925, this product can chelate free and redox-active intracellular Fe and/or replace Fe in ANT-Fe complexes, thus preventing site-specific hydroxyl radical formation and oxidative damage to cardiac tissue (Hasinoff *et al.*, 1998).

However, DEX is also an established catalytic inhibitor of TOP2 (Tanabe *et al.*, 1991), and therefore, it cannot be ruled out that DEX may exert protective effects through interference with ANT-induced TOP2 poisoning in the heart (Hasinoff *et al.*, 2007; Sawyer, 2013). Indeed, a recent study reported that deletion of the TOP2 beta isoform (*Top2b* gene) protected cardiomyocytes from DNA double-strand breaks and

transcriptome changes induced by acute in vivo DOX treatment, with subsequent prevention of defective mitochondrial biogenesis and ROS formation. Furthermore, cardiomyocyte-specific deletion of the *Top2b* gene protected mice from the development of progressive heart failure induced by repeated DOX treatment, suggesting that DOX-induced cardiotoxicity is primarily mediated by cardiomyocyte TOP2B (Zhang *et al.*, 2012).

Questions arising from these previous studies encouraged us to investigate the involvement of TOP2 in ANT cardiotoxicity and to assess other TOP2 catalytic inhibitors as potential cardioprotectants. In this study, using primary cultures of isolated rat neonatal ventricular cardiomyocytes (NVCMs), we examined the protective effects of DEX and two other catalytic inhibitors of TOP2, sobuzoxane (SOB, Fig. 1) and merbarone (MER, Fig. 1), against cardiotoxicity induced by DAU and DOX. For comparison, we also investigated the effects of these agents in a model of H₂O₂-induced oxidative cardiomyocyte injury. Additionally, the HL-60 leukemic cell line was used to assess whether TOP2 catalytic inhibitors can affect ANT cardiotoxicity without compromising their antiproliferative efficacy against leukemic cancer cells.

2. Materials and methods

2.1. *Materials*

Dulbecco's modified Eagle's medium, nutrient mixture F-12 (DMEM/F12), horse serum (HS), foetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin solution (5000 U ml⁻¹; P/S) and sodium pyruvate solution (100 mM; PYR) were purchased from Lonza (Belgium). The sera were heat-inactivated prior to use. DEX was obtained from Huaren Chemicals (Chang-Zhou, China). RPMI-1640 medium with L-glutamine and NaHCO₃, lactic acid, nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺), MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, SOB, MER, and other chemicals (e.g., constituents of various buffers) were purchased from Sigma (Germany) or Penta (Czech Republic) and were of the highest available pharmaceutical or analytical grade. Dimethyl sulfoxide was used to dissolve DEX, SOB and MER.

2.2. *Cardiomyocyte isolation and toxicity assessments*

All animal procedures and the preparation of NVCMs were approved and supervised by the Charles University Animal Care Committee. Primary cultures of NVCMs were prepared from 2-day-old Wistar rats and cultured as described previously (Kaiserova *et al.*, 2007; Simunek *et al.*, 2008). The isolation procedure resulted in a confluent cellular monolayer with ~90 % of cardiomyocytes beating synchronically. To assess cytotoxicity, cellular morphology and caspase activity, the cells were plated on 12-well plates pre-coated with 1 % gelatin at a density of 0.8 million cells per well. To measure glutathione content, the cells were plated on 60-mm Petri dishes at a density of 4.8 million cells per dish. All experiments were started on the fourth day after isolation. Using both serum and PYR-free medium, NVCMs were incubated at 37 °C with the tested agents either alone or in combination. The activity of lactate dehydrogenase (LDH) released from cardiomyocytes was determined in cell culture media as a standard marker of cytotoxicity and cellular breakdown using a well-established spectrophotometric method; in our previous studies, this method correlated well with release of cardio-specific troponins T and I (Adamcova *et al.*, 2007). The activity of LDH released from cardiomyocytes was expressed as the percentage of total cellular LDH as measured following cell lysis for 15 min (0.1 M

potassium phosphate, 1 % Triton X-100, 1 mM DTT [(-) -1,4-dithio-L-threitol], 2 mM EDTA, pH 7.8) at room temperature.

Changes in cellular morphology were documented using an Eclipse TS100 inverted epifluorescence microscope (Nikon, Japan), and the NIS-Elements AR 2.20 software (Laboratory Imaging, Czech Republic). To visualise active mitochondria, cells were loaded with 0.5 μ M JC-1 (Molecular Probes/Invitrogen, U.S.A.) for 30 min at 37 °C.

2.3. *Proliferation studies*

The HL-60 cell line, derived from a patient with acute promyelocytic leukaemia (Gallagher et al., 1979), was purchased from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, U.S.A.). Cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10 % FBS and 1 % P/S in 75-cm² tissue culture flasks (TPP, Switzerland) at 37 °C in a humidified atmosphere of 5 % CO₂. For proliferation assays, cells were plated on 96-well plates at a density of 10,000 cells per well. The combination studies were designed according to the Chou – Talalay method (Chou, 2006). Cellular proliferation was assessed using a viability assay based on the ability of active mitochondria to change yellow 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide tetrazole (MTT; Sigma) to purple formazan according to the manufacturer's instructions and using a Tecan Infinite 200 M plate reader. The proliferation rates of the experimental groups were expressed as percentages of the untreated controls (100 %).

2.4. *Assessment of caspase activity*

The activities of caspases 3/7, 8 and 9 were determined using a commercially available kit (Caspase Glo Assays, Promega, U.S.A.) based on the ability of caspases to cleave specific amino acid sequences present in a substrate for luciferase. Caspase activities were determined in relation to protein content, which was assessed using the bicinchoninic acid method according to the manufacturer's protocol (Sigma, Germany). Lysates were diluted to equal protein concentrations.

2.5. *Determination of total and oxidised glutathione*

NVCMs were washed with PBS (2 x 2.5 ml, 4 °C), harvested with a cell scraper, and centrifuged (10 min at 700 x g, 4 °C), and the pellet was resuspended in 250 μ l of 4°C cold sulphosalicylic acid (Sigma, Germany) and then sonicated on ice for 10 s (Bandelin

Sonoplus, Bandelin Instruments, Germany). The samples were then centrifuged for 15 min at 18,000 x g, and the supernatants were used to determine the amount of reduced and oxidised glutathione (GSH/GSSG) present using an enzymatic recycling method as described previously (Vávrová *et al.*, 2011).

2.6. Flow cytometry cell cycle analysis

After incubation, HL60 cells were centrifuged at 300 x g, washed in PBS with 5 % FBS (PBS + FBS) and suspended in a small amount of PBS + FBS. Then, ice-cold 70 % ethanol was added drop-wise, and the cells were fixed for 3 hours at -20 °C. After fixation, ethanol was removed by centrifugation; cells were washed in PBS + FBS and suspended in 4 mM sodium citrate in PBS + FBS. Finally, cells were incubated with 200 µg ml⁻¹ RNase A (Sigma, Germany) and 30 µg ml⁻¹ PI for 20 min at 37 °C. Cells were analysed using an Accuri C6 flow cytometer (Accuri Cytometers Europe Ltd., U.K.) as described previously (Mackova *et al.*, 2012). PI was excited at 488 nm, and fluorescence was analysed at 585 nm (FL-2). Per analysis, 10,000 events were collected. Cell cycle analysis was evaluated using MultiCycle AV Software (Phoenix Flow Systems, U.S.A.). Cell cycle figures were created with Cyflogic software (CyFlo Ltd, Finland).

2.7. Statistical analysis

All data are presented as the means ± SD. Data were subjected to one-way ANOVA with Dunnett's post-test using GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, California, U.S.A.) with $P \leq 0.05$ as the level of significance. All measurements were performed in duplicate (or more) from more than four independent experiments. IC₅₀ values (concentration of agents inducing a 50 % proliferation decrease compared to untreated controls) as well as combination index values (*CI* – a quantitative measure of the degree of drug interaction) were calculated using CalcuSyn 2.0 software (Biosoft, Cambridge, U.K.).

3. Results

3.1. *In vitro* cardiotoxicity studies

First, the cardiotoxic effects of ANTs and potential protective interventions were assessed using a previously published protocol consisting of a 3-hour exposure of isolated cardiomyocytes to DAU or DOX, followed by washes to remove ANTs and myocyte incubation in ANT-free medium; cellular injury was determined using an LDH release assay (Hasinoff *et al.*, 2003). As observed in Fig. 2a-b, the exposure of isolated cardiomyocytes to DAU or DOX for 3 hours followed by a 48-hour washout period led to a statistically significant loss of viability (determined as the percentage of total LDH release) ranging from ~20 % at 0.6 μM for both ANTs to ~55 % at 2.0 μM . Pre-incubation of the cells with 10, 100 and 1000 μM DEX for 3 hours induced significant protection from the toxicity of both ANTs at concentrations up to 1.2 μM (DAU) and 1.4 μM (DOX). This effect did not appear to be dose-dependent, as in most experiments the 10 μM and 100 μM DEX concentrations offered better protection than 1000 μM (Fig. 2a-b). In cardiomyocytes exposed to the oxidative stress-inducing agent H_2O_2 , toxicity ranging from ~36 % at 200 μM to ~60 % at 500 μM H_2O_2 was detected. However, no significant protection against H_2O_2 -induced toxicity was found with any assayed concentration of DEX (Fig. 2c). Of the three TOP2 catalytic inhibitors used in this study, DEX (10 – 1000 μM) and SOB (in concentrations up to its solubility limit of 300 μM) did not cause any significant loss of NVCM viability. Conversely, MER exhibited significant toxicity at concentrations \geq 60 μM (Fig. 3d). DEX, SOB and MER were then compared for their cardioprotective potential at a concentration of 30 μM , i.e., the highest concentration at which none of the drugs induced its own toxicity. All three TOP2 catalytic inhibitors were able to partially but significantly protect NVCMs against 1.2 μM DAU or DOX with ~10 – 15 % toxicity reduction in comparison with DAU or DOX toxicity alone, but the TOP2 inhibitors had no significant effect on the toxicity caused by 300 μM H_2O_2 (Fig. 3a-c).

As observed in Fig. 3e, the incubation of NVCMs with 1.2 μM DAU for 3 hours followed by 48 hours in DAU-free medium did not lead to a statistically significant change in either reduced or oxidised glutathione cellular content, despite the significant toxicity caused by this concentration and incubation schedule. The pre-incubation of

cardiomyocytes with 30 μ M DEX for 3 hours followed by co-incubation with DAU showed an insignificant trending increase in reduced glutathione levels, but this occurred in the absence of changes to oxidised glutathione levels. The control incubation with DEX alone did not induce any significant difference from control values for either oxidised or reduced glutathione content (Fig. 3e).

A three-hour exposure of NVCMs to 1.2 μ M DAU or DOX caused marked changes in cardiomyocyte morphology, including cytoplasmic vacuolisation and granulation, which proceeded into discontinuation of the cellular monolayer and cellular and nuclear shrinkage. Cardiomyocytes were stained with the JC-1 probe, and its signal was visualised by fluorescence microscopy. Following exposure to DAU or DOX, there was a conspicuous transition of normal red-stained mitochondria with polarised inner membranes to diffuse green fluorescence indicating dying cells with depolarised mitochondria. Pre-incubation with 30 μ M DEX, SOB and, to a lesser extent, MER, partially prevented both ANT-induced changes in cellular morphology as well as the dissipation of the mitochondrial inner membrane potential (Fig. 4).

3.2. Proliferation studies

After incubation for 72- hours, all substances examined had significant and dose-dependent antiproliferative effects on HL-60 cells. The ANTs (DAU and DOX) were effective at concentrations that were three orders of magnitude lower than the catalytic inhibitors; the IC_{50} values for all drugs were as follows: 19 nM for DAU, 38 nM for DOX, 25 μ M for DEX, 48 μ M for SOB and 38 μ M for MER. Single agents and combinations of ANTs and TOP2 catalytic inhibitors were then incubated for 72 hours at concentrations corresponding to their IC_{50} values, and their interactions were analysed according to the Chou-Talalay method. Additionally, as drug-drug interactions can change as a function of concentration or activity, we also examined combinations of chelators and anticancer drugs at fractions and multiples (1/8; 1/4; 1/2; 1; 2; 4) of their IC_{50} values, and Fraction affected (*Fa*) – combination index (*CI*) plots were calculated using computer simulations. Proliferation data are shown in panels a and b in Figs. 5-7, and combination index (*CI*) calculated values are summarised in Tables 1–3. These analyses revealed that DEX, SOB and MER potentiated the antiproliferative effects of both DAU and DOX when these substances were co-incubated

simultaneously, as the corresponding *CI* values ranged from moderate to strong synergism.

In another series of experiments, DEX, SOB and MER were pre-incubated for 3 or 6 hours prior to the addition of DAU with a subsequent 72-hour co-treatment (panels c and d in Figs. 5-7). As observed in these figures and in Table 1, these drug combinations remained synergistic with the exception of combinations of DAU with DEX at its highest concentration; in this case, the *CI* values were additive or in one rare case moderately antagonistic. Additionally, apart from the standard Chou-Talalay combination study design (where the agents are applied at equipotent doses), DAU and DEX were also examined using the fixed 1:20 concentration ratio used in clinical practice (Swain *et al.*, 2004). While rather less pronounced synergism was detected for lower concentrations, here, no antagonism occurred, even following preincubation with DEX for 3 hours, and in this setting, all concentrations of DEX potentiated the antiproliferative activity of DAU towards HL-60 cells (Fig. 5 e-f).

3.3. Caspase activity assays

In addition to evaluating their effects on overall cardiomyocyte viability or the proliferation of HL-60 leukaemic cells, after relevant incubations corresponding to previous experiments, combinations of ANTs and TOP2 catalytic inhibitors were also examined for their ability to activate caspases, which are key mediators of apoptosis. Incubation of NVCMs with 1.2 μ M DAU for 48 hours caused significant activation of caspases 8 and 9, which are the key extrinsic (receptor-mediated) and intrinsic (mitochondrial) apoptotic pathway initiators, respectively, as well as the execution caspases 3/7 to ~200 % of control values. Incubation with 30 μ M concentrations of all three TOP2 catalytic inhibitors did not cause any significant increase in the activity of any caspase, but DEX and SOB significantly protected cardiomyocytes against caspase activation by DAU. Although MER pre-treatment also showed a trend towards decreased activation of all caspases, this did not reach statistical significance compared to the DAU group. Consistent with the results of the LDH leakage assay, the activation of caspases after incubation with DOX was generally less pronounced than after DAU incubation. The activation of both initiation caspases was insignificant compared with the control (Fig. 8e-f), although there was a slight increase. Overall, preincubation of

the cells with DEX, SOB or MER did not significantly change initiation caspase activation, despite the trend towards lower activity. However, the activity of the executive caspase 3/7 was significantly increased following DOX treatment, while TOP2 catalytic inhibitors effectively prevented this change (Fig. 8d).

In HL-60 cells, the activity of all caspases (3/7, 8 and 9) was significantly increased by all the compounds (with the exception of MER and caspase 3/7) after 72-hour incubations at concentrations corresponding to their IC₅₀ values. For individual caspases, these increases ranged from ~200 % to ~500 % for DEX, SOB and MER and ~600 % to 700 % for DOX. The combinations of DOX with DEX or SOB increased caspase activity significantly in comparison to both control and individual drugs alone. DOX combined with MER did not induce a significant increase in caspase activation compared to DOX alone, nor was the activation caused by DOX alone mitigated by MER co-treatment (Fig. 8i).

3.4. Effects of treatments on the cell cycle in HL-60 cells

Control HL-60 cell populations in our experiments consisted of ~50 % G₁ cells, ~5 % of cells in S phase, and ~10 % of cells in G₂/M phase of the cell cycle. The remaining ~5 % constituted dead cells (sub-G₁ population). A 72-hour incubation with 19 nM DOX (a concentration corresponding to its IC₅₀ value) caused significant reductions in the G₁ and S phase populations (approximately a 1/3 drop for each) in favour of the G₂/M phase (~1/3 increase), sub-G₁ population (~1/4 increase) and polynuclear cells (~2 %). Incubation with the IC₅₀ DEX concentration (25 μM) also induced a drop in the G₁ and S phase cell populations; this drop was, however, significantly lower than that following DOX treatment (26 % vs. 20 %, respectively). The number of cells in G₂/M arrest was also significantly lower than in the DOX group. The sub-G₁ population (~45 %) for the DEX group was significantly higher than both the control and DOX-treated cells, and the polynuclear population was also significantly higher (~5 %) than in control cells. In contrast, no polynuclear cells were found following the incubation of HL-60 cells with 38 μM SOB. Additionally, despite a slight trend, there was no significant G₂/M phase arrest. Significant decreases in the G₁ and S phase cell populations occurred in

comparison to the control; however, these populations were simultaneously significantly higher than for the DOX-treated group. MER (48 μ M) treatment induced the most pronounced G₂/M arrest of all the drugs tested in monotherapy (~65 %), and this result was significantly higher than both the control and DOX treatment. MER also caused the most pronounced decrease in the G₁ and S phase populations (~45 % and ~35 % decrease compared to the control, respectively). The sub-G₁ population increased over the control values to a similar extent as DOX treatment (28 %). The induction of polyploidy (2 % of polynuclear cells) was also similar to DOX. The combination of DOX with DEX or SOB increased the sub-G₁ population but not significantly more than DOX alone. Both DEX and SOB in combination with DOX caused a marked decrease in G₁ (~10 % each) and S (1 and 0.2 %, respectively) phase cells together with a marked increase in the polynuclear cell population (15 and 10 %, respectively). The combination of DOX with MER did not induce any significant changes compared to MER treatment alone (Fig. 9).

4. Discussion

During the last decade, both the traditional "ROS and Fe" hypothesis of ANT-induced cardiotoxicity as well as the notion that DEX protects cardiomyocytes *via* its Fe-chelating metabolite ADR-925 have been subjects of renewed discussion and growing controversy. Classical antioxidants and ROS scavengers (such as N-acetylcysteine, coenzyme Q10, vitamins E and C), although usually very effective in acute ANT cardiotoxicity experiments, have failed in all controlled and randomised clinical trials conducted so far (van Dalen *et al.*, 2011). Furthermore, several Fe chelators that are both stronger and more selective for Fe than ADR-925 have failed to match the unique and experimental model-independent cardioprotective efficacy of DEX (Sterba *et al.*, 2013). Of significance, ADR-925 complexed with Fe may promote redox reactions rather than inhibiting them (Malisza *et al.*, 1995), and ADR-925 failed to protect isolated cardiomyocytes (Hasinoff *et al.*, 2003). In a model of chronic DAU-induced heart failure in rabbits, DEX was able to prevent increased cardiomyocyte apoptosis in hearts, but this protection was not accompanied by a significant reduction in lipoperoxidation (Popelova *et al.* 2009), suggesting that oxidative stress may merely be a secondary by-product that accompanies ANT cardiotoxicity and subsequent heart failure rather than a primary culprit. Furthermore, a close derivative of DEX (ICRF-161) that lacks TOP2 inhibitory action but can be activated to produce a metabolite with similar metal-chelating potential as DEX has been found to be ineffective against chronic ANT cardiotoxicity in rats when compared to DEX (Martin *et al.*, 2009). Thus, there has been a search for alternative hypotheses to explain the mechanisms of both ANT cardiotoxicity as well as DEX-induced cardioprotection.

The effective cardioprotective properties of DEX have been demonstrated by many clinical studies (Rhombert and Hellmann 2011; Swain and Vici 2004) and were firmly confirmed with a recent meta-analysis (van Dalen *et al.*, 2011). However, focused *in vitro* analyses of DEX cardioprotection and the mechanism(s) involved have been scarce. Hasinoff *et al.* found that pre-incubation with DEX (90 µM, 3 hours) protected cardiomyocytes from mitochondrial membrane potential loss induced by relatively low concentrations of DOX (0.15 – 0.5 µM, 3 hours incubation followed by 48 hours post-incubation in DOX-free media) (Hasinoff *et al.* 2003). In the same study, the authors

showed that signs of apoptosis are increased by approximately 200 % after 48 hours treatment with clinically relevant concentrations of DOX (0.2 and 1 μ M), which is comparable to our results obtained under similar conditions. In the present study, we employed a wide range of concentrations of DEX (10 – 1000 μ M) as well as two different ANTs (DAU and DOX, 0.6 – 2.0 μ M) to describe in detail the effects of these drugs at concentrations that can be present in the plasma of patients after drug administration (Gewirtz, 1999). Furthermore, we directly compared these results in a model of oxidative insult induced by H₂O₂ (200 – 500 μ M), which resulted in viability loss comparable to both ANTs. Although DEX was able to consistently reduce LDH release from cardiomyocytes induced by DAU or DOX, it demonstrated no protection against any concentration of H₂O₂ employed in this study. Furthermore, the protective effects of DEX against DAU-induced toxicity were not associated with changes to oxidised or reduced glutathione content within cardiomyocytes, which suggests that these effects are oxidative stress-independent. These results agree well with Lyu *et al.*, who demonstrated that 200 μ M DEX protected the H9c2 cardiomyoblast-derived cell line from DOX (0.5 – 5 μ M), but not H₂O₂- or camptothecin-induced DNA double strand breaks as determined by elevated γ -H2AX expression. At the same time, vitamin C and N-acetylcysteine did not protect these cells against DOX (Lyu *et al.*, 2007). These data are also in good agreement with our previous study showing that the glutathione antioxidant system was not affected by DAU treatment either *in vitro* in H9c2 cells or *in vivo* using a chronic ANT cardiotoxicity model (Vávrová *et al.* 2011). Additionally, in the present study, we observed no effects of DAU, DEX or their combination on oxidised or reduced glutathione cellular levels in NVCMs.

The use of DEX in clinical practice has been relatively limited. One of the major reasons for this is attributed to doubts concerning the possible interference of this drug with ANT anticancer effects. This question becomes even more urgent considering the possibility that ANTs and DEX may share TOP2 as a molecular target both for their anticancer and potentially cardioprotective actions. To examine this issue, we used a model with the HL-60 human promyelocytic leukaemia cell line and performed thorough analyses of combinations of DEX with DAU or DOX following 72-hour co-incubations using the rigorous Chou-Talalay method (Chou 2010; Chou and Talalay

1984). The obtained *CI* values demonstrated the synergistic antiproliferative effects of DEX with DAU or DOX, mainly at lower concentrations. Previously, using Chinese hamster ovary cells (which are neither cancerous nor cardiac), one study reported that DEX might exhibit antagonism of DOX- or DAU-mediated growth inhibition when cells were pre-incubated with DEX before ANT was added (Hasinoff *et al.*, 1996). Therefore, an additional series of experiments was undertaken under conditions similar to those in previous cardioprotective experiments. The pre-incubation of HL-60 cells for 3 hours with DEX prior to DAU caused a trend towards a less synergistic antiproliferative interaction. At most concentrations, the *CI* values were still indicative of synergistic effects; however, combinations at the highest concentrations (2x and 4x IC_{50}) resulted in nearly additive effects or moderate antagonism. Surprisingly, prolonged pre-incubation with DEX for 6 hours did not result in further aggravation of the combination outcomes; rather, in comparison to the 3-hour pre-incubation period, the *CI* values were consistently lower. The standard Chou and Talalay combination study design involves the application of examined agents at equipotent doses (IC_{50} concentrations and their multiples and fractions). However, as the IC_{50} values of the ANTs and DEX differ by three orders of magnitude, we also assessed their combination at the ratio of 1:20 ANT to DEX used in clinical practice (Swain *et al.*, 2004). At this fixed concentration ratio, we obtained synergistic outcomes as well. Interestingly, even a 3-hour DEX pre-incubation prior to DAU did not result in antagonism with this ratio, although the *CI* values were consistently higher than for combination experiments with no pre-incubation.

Apoptosis is the most important form of programmed cell death, and it is considered to be an important component of both ANT tumoricidal action as well as cardiotoxicity (Minotti *et al.*, 2004). In this study, we observed significant caspase activation in both cardiomyocytes as well as in HL-60 cells. In both cell types, there were non-specific increases in both the executive downstream caspases 3 and 7 and the initiation caspases 8 and 9, suggesting a concomitant involvement of both intrinsic (mitochondrial) as well as extrinsic (receptor-mediated) apoptotic pathways and/or crosstalk between them. Pre-incubation with DEX reduced ANT-induced caspase activation in cardiomyocytes, whereas the marked activation of all assayed caspases

induced by 72-hour DOX treatment was not blunted but rather further enhanced by DEX in HL-60 cells. This striking difference in DEX-induced apoptotic signalling in heart and cancer cells may be of considerable importance, and its molecular mechanisms deserve further study.

The incubation of HL-60 cells with DEX caused significant depletion of G₁ and S-phase cells. Conversely, the sub-G₁ cell population, which is composed of cell debris, as well as the polynuclear cell population were significantly increased. When cells were co-incubated with DOX, the G₁ and S-phase cell depletion was even more pronounced, and the proportion of polynuclear cells and cell debris was significantly higher than with DOX treatment alone. Therefore, these results strongly support the notion that DEX does not reduce the antineoplastic ability of ANTs, which is in line with previous clinical data obtained in a leukaemia setting as well as the conclusions of a recent meta-analysis of all randomised clinical trials performed thus far (van Dalen *et al.*, 2011).

The group of TOP2 catalytic inhibitors consists of many compounds with various chemical structures, including bisdioxopiperazines (DEX, SOB), fostriecin, aclarubicin, suramin, novobiocin, and MER, as well as numerous other experimental agents (Larsen *et al.*, 2003). Unlike TOP2 poisons, catalytic inhibitors do not promote double-strand break formation and thus do not cause permanent DNA damage (Larsen *et al.*, 2003). SOB (MST-16) is a pro-drug of ICRF-154, a bisdioxopiperazine DEX analogue. It has been licensed in Japan for the treatment of blood neoplasms, in particular malignant lymphoma and adult T-cell leukaemia (Fujiwara, 1999). According to unpublished data quoted by (Inutsuka *et al.*, 1998), SOB has been shown to be protective against DOX cardiac and renal toxicity in rats. Additionally, SOB (750 mg kg⁻¹) exhibited synergy with DOX (7.5 mg kg⁻¹) in colon-26 tumour-bearing mice as measured by prolonged survival of the animals (Inutsuka *et al.*, 1998). In the same study, the authors observed an increased G₂/M population (by 10 %) after incubating colon-26 cells with a combination of SOB (10 µM) and DOX (0.1 µM) for 24 hours compared to DOX-treated samples (Inutsuka *et al.*, 1998). The G₂/M arrest was also reported in a human mammary tumour cell line (MDA-MB-435) exposed to 4 µM SOB for 20 hours (Lu *et al.*, 2005). Given the gradual increase in ANT sensitivity as cells transition from relatively

resistant G₁ phase to G₂/M phase, which was observed in exponentially growing Molt-4 cells (Minderman *et al.*, 1993), the accumulation of G₂/M cells before ANT treatment could be beneficial as the relatively resistant population is depleted in favour of the more sensitive population. In our study, SOB alone did not induce significant G₂/M phase arrest of HL-60 cells after treatment for 72 hours. However, SOB significantly reduced the G₁ and S phase populations, which could be favourable for increasing HL-60 cell sensitivity to DOX. The combination of SOB with DOX caused even more pronounced depletion of G₁ and S phase cells together with an increase in polyploid cells and cell debris. Indeed, the combination of DOX or DAU with SOB in our study provoked unequivocally synergistic antiproliferative effects in HL-60 cells at all assessed concentrations and schedules (including 3- and 6-hour SOB pre-incubations), and SOB also enhanced the activation of caspases induced by DOX. Conversely, SOB pre-incubation with NVCMs led to significant protection from DAU- and DOX-induced toxicity as assessed by LDH release, mitochondrial membrane potential measurements and caspase activity measurements.

MER is a non-sedative barbiturate derivative that is structurally unrelated to bisdioxopiperazines (Cooney *et al.*, 1985). Its principal effect on replicating cells is the inhibition of chromosome condensation, activation of c-Jun and JNKs and induction of G₂/M cell cycle blockade (Larsen *et al.*, 2003). In this study, although MER significantly protected NVCMs against both DAU- and DOX-induced LDH release, it also induced some toxicity in NVCMs. MER insignificantly reduced the DAU-induced activation of caspases and also only partially protected cardiomyocytes from $\Delta\Psi_m$ loss. However, of the three catalytic inhibitors examined in this study, MER showed the highest potential to act synergistically with ANTs in HL-60 cells, particularly at higher concentrations for which there was no tendency towards increased *CI* values. Additionally, with 3- or 6-hour pre-incubations, the drug combinations remained consistently synergistic. The effects of MER on the cell cycle in HL-60 cells differed considerably from the bisdioxopiperazines. MER alone caused dramatic G₂/M arrest, which was even more pronounced than that induced by DOX. In addition, the sub G₁ and polynuclear populations increased. However, unlike DEX or SOB, the MER + DOX combination did not induce more pronounced cell cycle changes.

Mammalian cells contain two distinct TOP2 isoforms. The alpha isoform (TOP2A) is present in high amounts in proliferating and undifferentiated cells, and its expression is cell cycle-dependent, reaching a maximum in G₂/M phase. Conversely, the beta isoform (TOP2B) is expressed at relatively steady levels throughout the cell cycle and is the major TOP2 form in quiescent cells. Whereas TOP2A is implicated predominantly in DNA replication, TOP2B has important roles in the regulation of gene transcription (Austin *et al.*, 1998; Vávrová *et al.*, 2012). These marked differences in the expression, function and regulation of the TOP2 isoforms in cardiac and cancer cells may be responsible for differential modulation of ANT toxicity. Lyu *et al.* detected preferential proteasomal degradation of TOP2B isoform in H9c2 cardiomyoblast-derived cells after DEX exposure, coupled with a lack of significant changes to TOP2A (Lyu *et al.*, 2007). The selective degradation of TOP2B could prevent ANT-induced damage to the cardiomyocyte genome due to poisoning by this isoform and subsequent DNA double-strand breaks while sparing the TOP2A isoform in cancer cells. Additionally, a truncated form of TOP2B was discovered in mitochondria (Low *et al.*, 2003), providing a plausible explanation for ANT-induced damage (as well as DEX-mediated protection) of cardiac mitochondria, organelles that are known to be important targets of ANT-induced cardiotoxicity (Sterba *et al.*, 2013). The most straightforward argument for the TOP2B isoform as a mediator of DEX-induced cardioprotection is the recent study from Zhang *et al.* reporting that the cardiomyocyte-specific deletion of the *Top2b* gene protected mice from developing DOX cardiotoxicity (Zhang *et al.*, 2012). Interestingly, preferential inhibition of the TOP2A isoform has been suggested for MER (Larsen *et al.*, 2003), which may correspond to the relatively weaker cardioprotective efficacy seen with this drug in this study compared to DEX or SOB.

In conclusion, our results demonstrate that the TOP2 catalytic inhibitors DEX, SOB and MER differentially and favourably modulate toxicity of DAU or DOX to cardiac and leukemic cancer cells. One plausible explanation for these effects could involve the targeting of different TOP2 isoforms (alpha and beta) in these cells. Catalytic TOP2 inhibitors may directly protect the heart from ANT cardiotoxicity but also potentially sensitise cancer cells to ANTs, which in turn may permit ANT dose reduction with secondary reduction of cardiotoxicity risk. Taken together, this study provides a strong

rationale for further investigations of TOP2 catalytic inhibitors as cardioprotectants against ANT cardiotoxicity.

Acknowledgements

This study was supported by the Czech Science Foundation (project 13-15008S), Charles University in Prague (project SVV 267 004) and the Education for Competitiveness Operational Program (CZ.1.07/2.3.00/30.0022).

Conflict of interest Disclosure

The authors declare no conflicts of interest.

References

Adamcova, M, Simunek, T, Kaiserova, H, Popelova, O, Sterba, M, Potacova, A, Vavrova, J, Malakova, J, Gersl, V (2007) In vitro and in vivo examination of cardiac troponins as biochemical markers of drug-induced cardiotoxicity. *Toxicology* **237**(1-3): 218-228.

Austin, CA, Marsh, K (1998) Eukaryotic DNA topoisomerase II β . *Bioessays* **20**: 215-226.

Cooney, DA, Covey, JM, Kang, GJ, Dalal, M, McMahon, JB, Johns, DG (1985) Initial mechanistic studies with merbarone (NSC 336628). *Biochem Pharmacol* **34**: 3395-3398.

Deweese, JE, Osheroff, N (2009) The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: wolf in sheep's clothing. *Nucleic Acids Res* **37**(3): 738-748.

Fujiwara, Y (1999) Current status of oral anticancer drugs in Japan. *J Clin Oncol* **17**: 3360-3365.

Gewirtz, DA (1999) A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* **57**: 727-741.

Gianni, L, Herman, EH, Lipshultz, SE, Minotti, G, Sarvazyan, N, Sawyer, DB (2008) Anthracycline cardiotoxicity: from bench to bedside. *J Clin Oncol* **26**(22): 3777-3784.

Hasinoff, BB, Hellmann, K, Herman, EH, Ferrans, VJ (1998) Chemical, biological and clinical aspects of dexrazoxane and other bisdioxopiperazines. *Curr Med Chem* **5**(1): 1-28.

Hasinoff, BB, Herman, EH (2007) Dexrazoxane: how it works in cardiac and tumor cells. Is it a prodrug or is it a drug? *Cardiovasc Toxicol* **7**(2): 140-144.

Hasinoff, BB, Schroeder, PE, Patel, D (2003) The metabolites of the cardioprotective drug dexrazoxane do not protect myocytes from doxorubicin-induced cytotoxicity. *Mol Pharmacol* **64**(3): 670-678.

Hasinoff, BB, Yalowich, JC, Ling, Y, Buss, JL (1996) The effect of dexrazoxane (ICRF-187) on doxorubicin- and daunorubicin-mediated growth inhibition of Chinese hamster ovary cells. *Anticancer Drugs* **7**(5): 558-567.

Chou, TC (2006) Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev* **58**(3): 621-681.

Inutsuka, S, Baba, H, Maehara, Y, Sugimachi, K (1998) MST-16, a novel derivative of bis (2, 6-dioxopiperazine), synergistically enhances the antitumor effects of anthracyclines. *Cancer Chemother Pharmacol* **42**: 194-200.

- Kaiserova, H, Simunek, T, van der Vijgh, WJ, Bast, A, Kvasnickova, E (2007) Flavonoids as protectors against doxorubicin cardiotoxicity: role of iron chelation, antioxidant activity and inhibition of carbonyl reductase. *Biochim Biophys Acta* **1772**(9): 1065-1074.
- Keizer, HG, Pinedo, HM, Schuurhuis, GJ, Joenje, H (1990) Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmacol Ther* **47**(2): 219-231.
- Larsen, AK, Escargueil, AE, Skladanowski, A (2003) Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics* **99**: 167 - 181.
- Low, RL, Orton, S, Friedman, DB (2003) A truncated form of DNA topoisomerase IIbeta associates with the mtDNA genome in mammalian mitochondria. *Eur J Biochem* **270**: 4173-4186.
- Lu, D, Huang, M, Xu, C, Yang, W, Hu, C, Lin, L, Tong, L, Li, M, Lu, W, Zhang, X, Ding, J (2005) Anti-proliferative effects, cell cycle G2/M phase arrest and blocking of chromosome segregation by probimane and MST-16 in human tumor cell lines. *BMC Pharmacology* **5**: 11.
- Lyu, YL, Kerrigan, JE, Lin, C-P, Azarova, AM, Tsai, Y-C, Ban, Y, Liu, LF (2007) Topoisomerase IIbeta mediated DNA double-strand breaks: implications in doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dexrazoxane. *Cancer Res* **67**: 8839-8846.
- Mackova, E, Hruskova, K, Bendova, P, Vavrova, A, Jansova, H, Haskova, P, Kovarikova, P, Vavrova, K, Simunek, T (2012) Methyl and ethyl ketone analogs of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone: novel iron chelators with selective antiproliferative action. *Chem Biol Interact* **197**(2-3): 69-79.
- Malisza, KL, Hasinoff, BB (1995) Doxorubicin reduces the iron(III) complexes of the hydrolysis products of the antioxidant cardioprotective agent dexrazoxane (ICRF-187) and produces hydroxyl radicals. *Arch Biochem Biophys* **316**(2): 680-688.
- Martin, E, Thougard, AV, Grauslund, M, Jensen, PB, Bjorkling, F, Hasinoff, BB, Tjornelund, J, Sehested, M, Jensen, LH (2009) Evaluation of the topoisomerase II-inactive bisdioxopiperazine ICRF-161 as a protectant against doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Toxicology* **255**(1-2): 72-79.
- Minderman, H, Linssen, P, Wessels, J, Haanen, C (1993) Cell cycle related uptake, retention and toxicity of idarubicin, daunorubicin and doxorubicin. *Anticancer Res* **13**: 1161-1165.
- Minotti, G, Menna, P, Salvatorelli, E, Cairo, G, Gianni, L (2004) Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* **56**: 185-229.

- Sawyer, DB (2013) Anthracyclines and heart failure. *N Engl J Med* **368**(12): 1154-1156.
- Simunek, T, Sterba, M, Popelova, O, Adamcova, M, Hrdina, R, Gersl, V (2009) Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Rep* **61**(1): 154-171.
- Simunek, T, Sterba, M, Popelova, O, Kaiserova, H, Adamcova, M, Hroch, M, Haskova, P, Ponka, P, Gersl, V (2008) Anthracycline toxicity to cardiomyocytes or cancer cells is differently affected by iron chelation with salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone. *Br J Pharmacol* **155**(1): 138-148.
- Sterba, M, Popelova, O, Vavrova, A, Jirkovsky, E, Kovarikova, P, Gersl, V, Simunek, T (2013) Oxidative stress, redox signaling, and metal chelation in anthracycline cardiotoxicity and pharmacological cardioprotection. *Antioxid Redox Signal* **18**(8): 899-929.
- Swain, SM, Vici, P (2004) The current and future role of dexrazoxane as a cardioprotectant in anthracycline treatment: expert panel review. *J Cancer Res Clin Oncol* **130**(1): 1-7.
- Tanabe, K, Ikegami, Y, Ishida, R, Andoh, T (1991) Inhibition of Topoisomerase II by Antitumor Agents Bis(2,6-dioxopiperazine) Derivatives. *Cancer Res* **51**: 4903-4908.
- van Dalen, EC, Caron, HN, Dickinson, HO, Kremer, LC (2011) Cardioprotective interventions for cancer patients receiving anthracyclines. *Cochrane Database Syst Rev*(6): CD003917.
- Vávrová, A, Popelová, O, Štěřba, M, Jirkovský, E, Hašková, P, Mertlíková-Kaiserová, H, Geršl, V, Šimůnek, T (2011) In vivo and in vitro assessment of the role of glutathione antioxidant system in anthracycline-induced cardiotoxicity. *Arch Toxicol* **85**: 525-535.
- Vávrová, A, Šimůnek, T (2012) DNA topoisomerase II β : A player in regulation of gene expression and cell differentiation. *Int J Biochem Cell Biol* **44**: 834-837.
- Zhang, S, Liu, X, Bawa-Khalfe, T, Lu, LS, Lyu, YL, Liu, LF, Yeh, ET (2012) Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med* **18**(11): 1639-1642.

Figure Legends

Fig. 1. Chemical structures of the anthracyclines doxorubicin (DOX) and daunorubicin (DAU) and topoisomerase II catalytic inhibitors dexrazoxane (DEX), sobuzoxane (SOB) and merbarone (MER).

Fig. 2. Protection of neonatal rat cardiomyocytes from daunorubicin (DAU), doxorubicin (DOX) and hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced toxicity.

Cells were pre-incubated with three concentrations of DEX for 3 hours and then co-incubated with increasing concentrations of DAU (a) or DOX (b) for 3 hours following a 48-hour anthracycline-free period or for 48 hours with H₂O₂ (c). Toxicity was assessed as the % of total lactate dehydrogenase (LDH) released from cardiomyocytes into the cell culture medium. Data obtained from ≥ 4 independent experiments are expressed as the mean \pm SD, statistical significance: c – compared with drug-free control (DMSO); d – compared with DAU or DOX; p – compared with H₂O₂ (one-way ANOVA with Dunnett's post-test, $P \leq 0.05$).

Fig. 3. a-c: Effects of dexrazoxane (DEX), sobuzoxane (SOB) or merbarone (MER) on toxicity induced by daunorubicin (DAU), doxorubicin (DOX) or hydrogen peroxide (H₂O₂) to neonatal rat cardiomyocytes; d: toxicity of DEX, SOB and MER individually applied to cardiomyocytes; e: effects of DEX, DAU and combinatorial treatment on oxidised and reduced glutathione content in neonatal rat cardiomyocytes.

Cells were pre-incubated with DEX, SOB or MER for 3 hours and then incubated with DAU (a) or DOX (b) for 3 hours following a 48-hour anthracycline-free period or for 48 hours with H₂O₂ (c). DEX, SOB and MER toxicity after incubation for 48 hours (d). Effects of DEX pre-treatment for 3 hours with a 3-hour DAU incubation and subsequent 48-hour DAU-free period on cellular oxidised and reduced glutathione content (e). Data obtained from ≥ 4 independent experiments are expressed as the mean \pm SD, statistical significance: c – compared to control; d – compared to DAU or DOX, p – compared to H₂O₂ (one-way ANOVA with Dunnett's post-test, $P \leq 0.05$).

Fig. 4. Effects of dexrazoxane (DEX), sobuzoxane (SOB) or merbarone (MER) on cardiomyocyte morphology and mitochondrial depolarisation induced by daunorubicin (DAU) or doxorubicin (DOX).

Neonatal ventricular cardiomyocytes were pre-treated with 30 μ M dexrazoxane (DEX), sobuzoxane (SOB) or merbarone (MER) for 3 hours, then incubated with 1.2 μ M of either daunorubicin (DAU) or doxorubicin (DOX) for 3 hours, followed by an anthracycline-free incubation period for 48 hours. Upper panels – brightfield phase contrast photomicrographs, lower panels – darkfield epifluorescence images of the same cells taken after loading with the JC-1 probe (red emission reflects mitochondrial inner membrane potential-dependent accumulation of probe dimers in actively respiring mitochondria, green fluorescence indicates monomers of the probe released into the cytoplasm after mitochondrial depolarisation, lack of fluorescence reflects probe release from necrotic or late-stage apoptotic cells). Scale bars represent 100 μ m; all panels taken at the same magnification.

Fig. 5. Effects of combinations of dexrazoxane (DEX) with daunorubicin (DAU - a, c-f) and doxorubicin (DOX - b) on proliferation of the HL-60 cell line. Cells were incubated either continuously with all drugs for 72 hours (a-b) or pre-incubated with DEX for 3 hours (c) or 6 hours (d) and then incubated for 72 hours with all drugs at concentrations corresponding to their IC_{50} values and IC_{50} fractions and multiples (1/8; 1/4; 1/2; 1; 2; 4). Alternatively, cells were either co-incubated for 72 hours (e) or pre-incubated with DEX for 3 hours (f) and then co-incubated with DAU for 72 hours at a ratio of 1:20 DAU:DEX. g: Computer simulations of combination index (CI) - cellular proliferation (fraction affected - Fa) dependences, obtained using CalcuSyn 2.0 software. Data from 4 independent experiments expressed as the mean \pm SD, statistical significance: c – compared to control; d – compared to DAU or DOX (one-way ANOVA with Dunnett's post-test, $P \leq 0.05$).

Fig. 6. Effects of combinations of sobuzoxane (SOB) with daunorubicin (DAU – a, c, d) and doxorubicin (DOX - b) on proliferation of the HL-60 cell line. Cells were incubated either continuously with all drugs for 72 hours (a-b) or pre-incubated with SOB for 3 hours (c) or 6 hours (d) and then incubated for 72 hours with SOB and DAU at

concentrations corresponding to their IC₅₀ values and IC₅₀ fractions and multiples (1/8; 1/4; 1/2; 1; 2; 4). e: Computer simulations of combination index (CI) - cellular proliferation (fraction affected - Fa) dependences, obtained using CalcuSyn 2.0 software. Data from 4 independent experiments expressed as the mean ± SD, statistical significance: c – compared to control; d – compared to DAU or DOX (one-way ANOVA with Dunnett's post-test, P ≤ 0.05).

Fig. 7. Effects of combinations of merbarone (MER) with daunorubicin (DAU – a, c, d) and doxorubicin (DOX - b) on proliferation of the HL-60 cell line. Cells were incubated either continuously with all drugs for 72 hours (a-b) or pre-incubated with MER for 3 hours (c) or 6 hours (d) and then incubated for 72 hours with MER and DAU at concentrations corresponding to their IC₅₀ values and IC₅₀ fractions and multiples (1/8; 1/4; 1/2; 1; 2; 4). E: Computer simulations of combination index (CI) - cellular proliferation (fraction affected - Fa) dependences, obtained using CalcuSyn 2.0 software. Data from 4 independent experiments expressed as the mean ± SD, statistical significance: c – compared to control; d – compared to DAU or DOX (one-way ANOVA with Dunnett's post-test, P ≤ 0.05).

Fig. 8. Caspase activity in cardiomyocytes (a-f) and the HL-60 cell line (g-i). Neonatal rat cardiomyocytes (a-f) were pre-incubated with 30 μM dexrazoxane (DEX), sobuzoxane (SOB) and merbarone (MER) for 3 hours and then co-incubated with 1.2 μM daunorubicin (DAU; a-c) or doxorubicin (DOX; d-f) for 3 hours, followed by an anthracycline-free 48-hour period. The HL-60 cell line (g-i) was co-incubated with 25 μM DEX, 38 μM SOB, 48 μM MER and 19 nM doxorubicin (DOX) for 72 hours. The activity of caspases 3/7 (a, d, g), 8 (b, e, h) and 9 (c, f, i) was assessed with a chemiluminescence assay as described in the materials and methods, corrected for protein content and expressed as the percentage of untreated control cells (100 %). Data from ≥ 4 experiments are expressed as the mean ± SD, statistical significance c – compared to control; d – compared to DAU or DOX; n.s. – not significant (one-way ANOVA with Dunnett's post-test, P ≤ 0.05).

Fig. 9. Cell-cycle analyses. The human acute promyelocytic leukaemia HL-60 cell line was incubated with dexrazoxane (DEX), sobuzoxane (SOB), merbarone (MER) and

doxorubicin (DOX) and combinations thereof in concentrations corresponding to their IC_{50} values for 72 hours and then subjected to flow cytometry cell cycle analysis as described in the materials and methods. Data are expressed as the mean \pm SD, statistical significance: c – compared to untreated control cells; d – compared to DOX-treated cells (one-way ANOVA with Dunnett's post-test, $P \leq 0.05$).

Fig. 1.

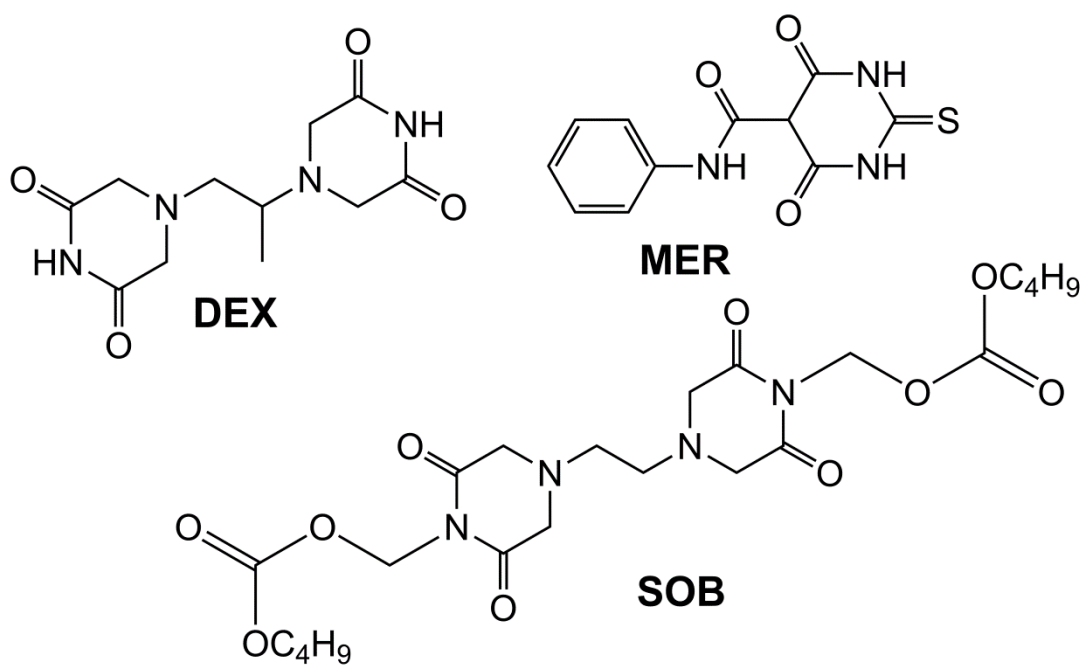
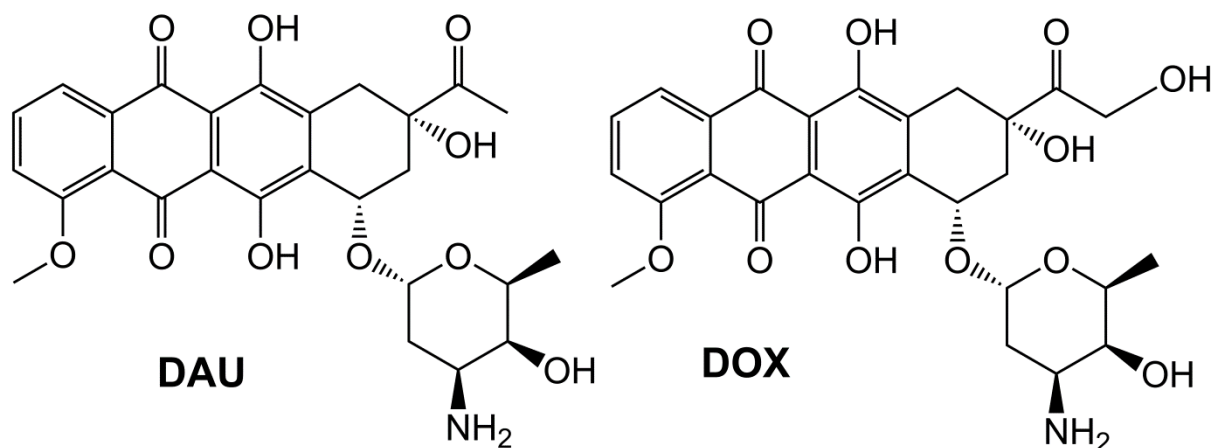


Fig. 2.

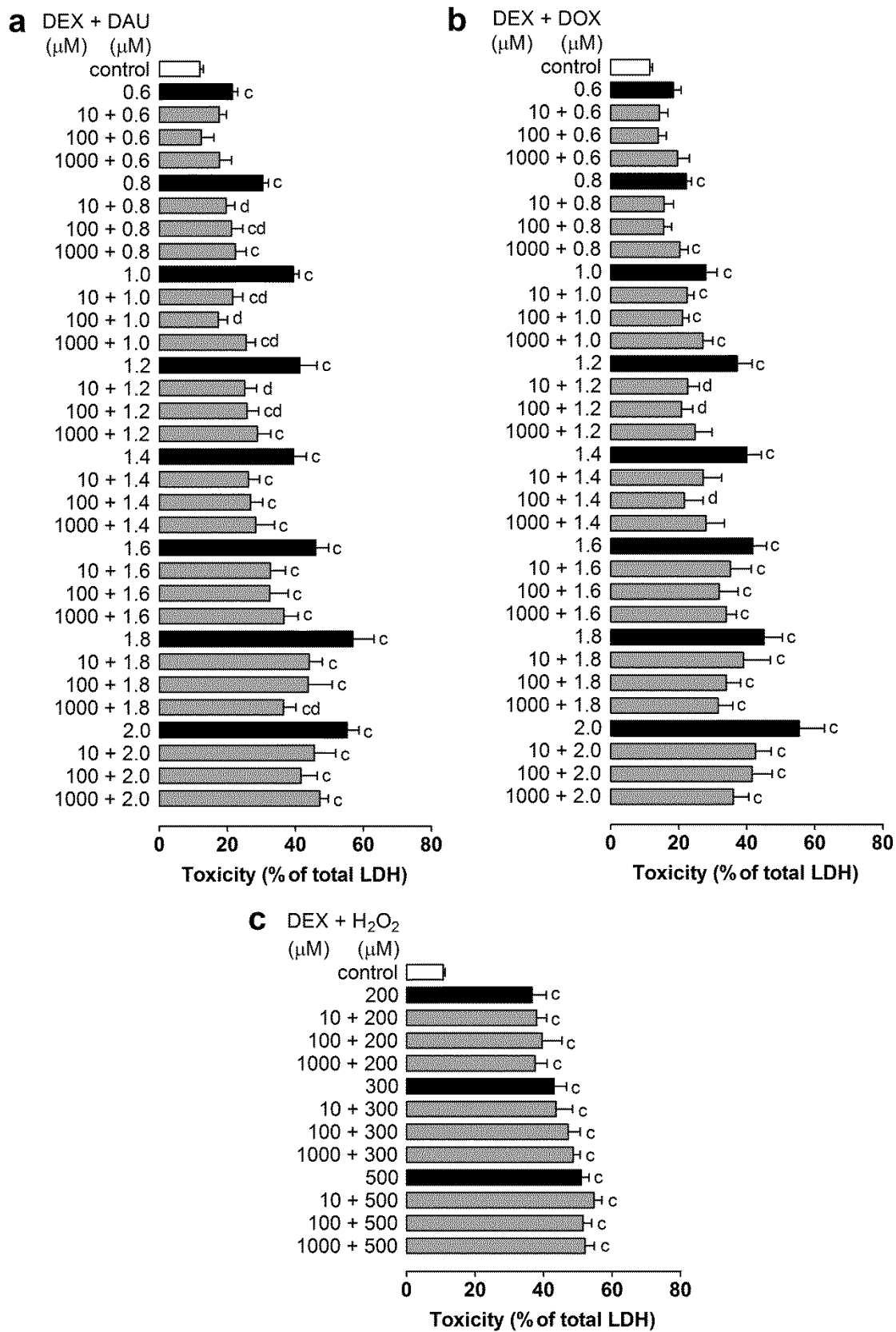


Fig. 3.

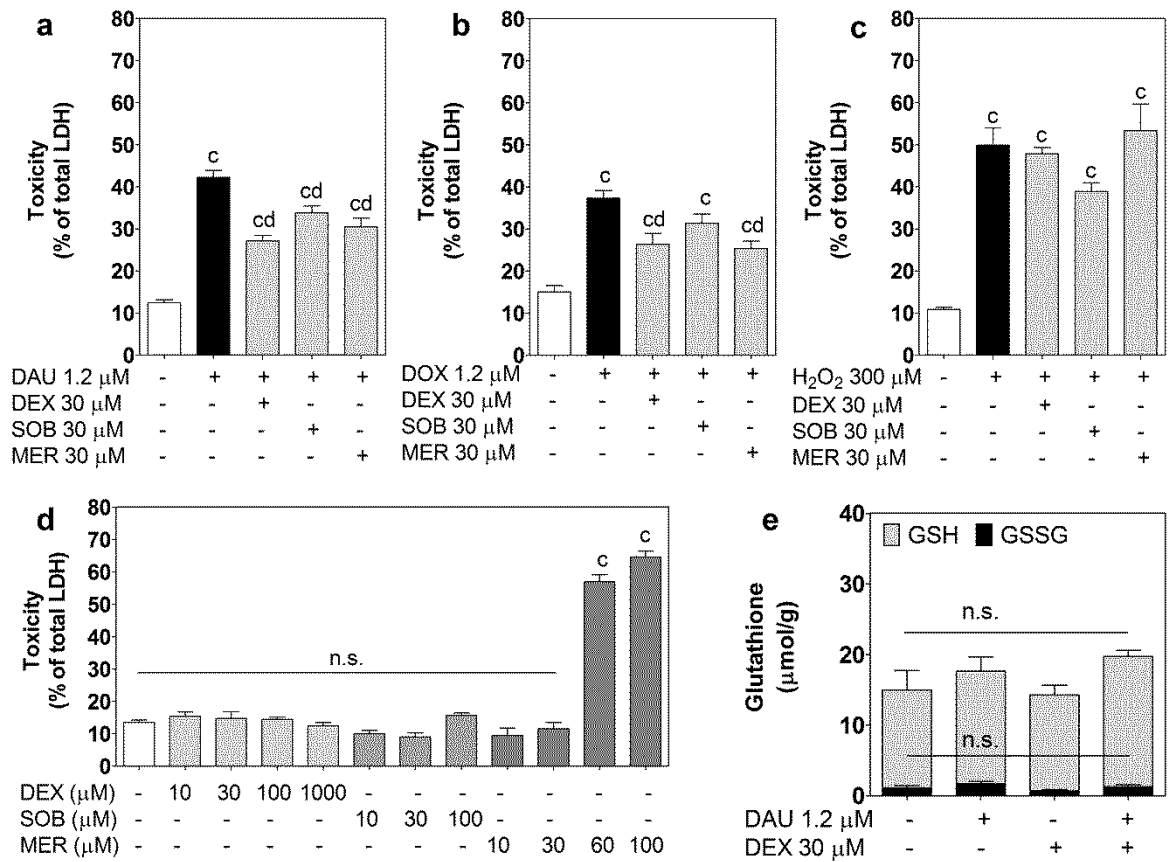


Fig. 4.

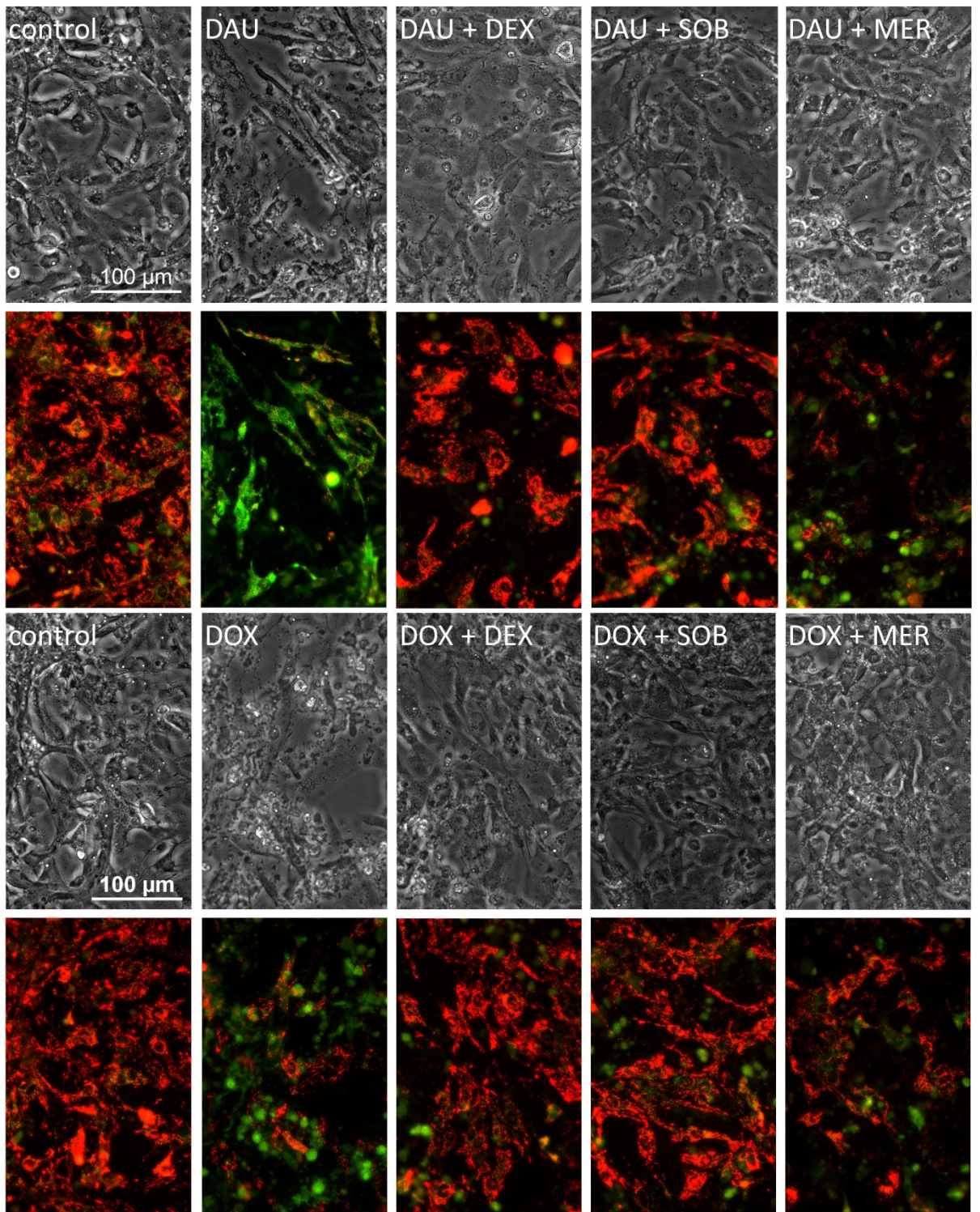


Fig. 5.

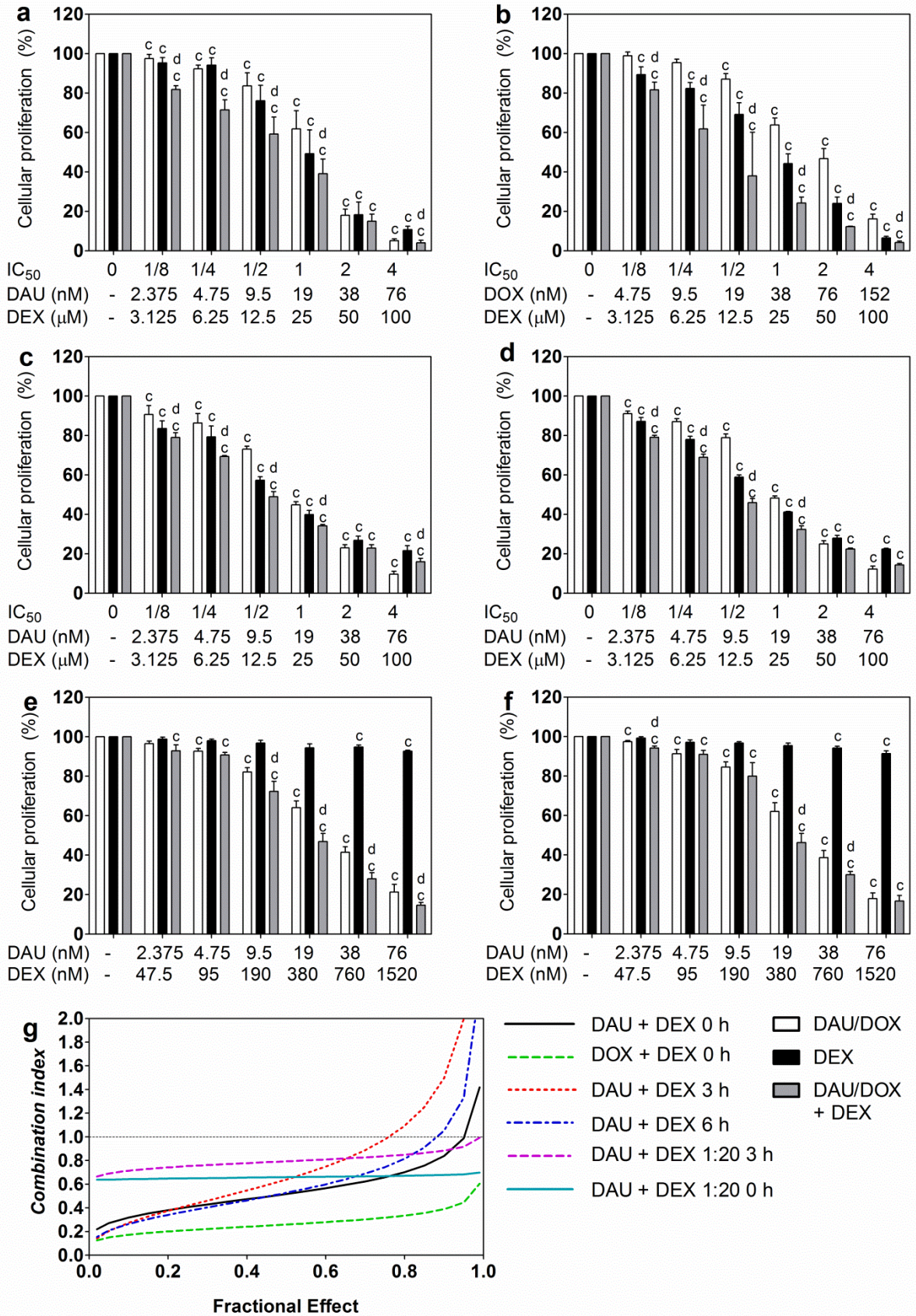


Fig. 6.

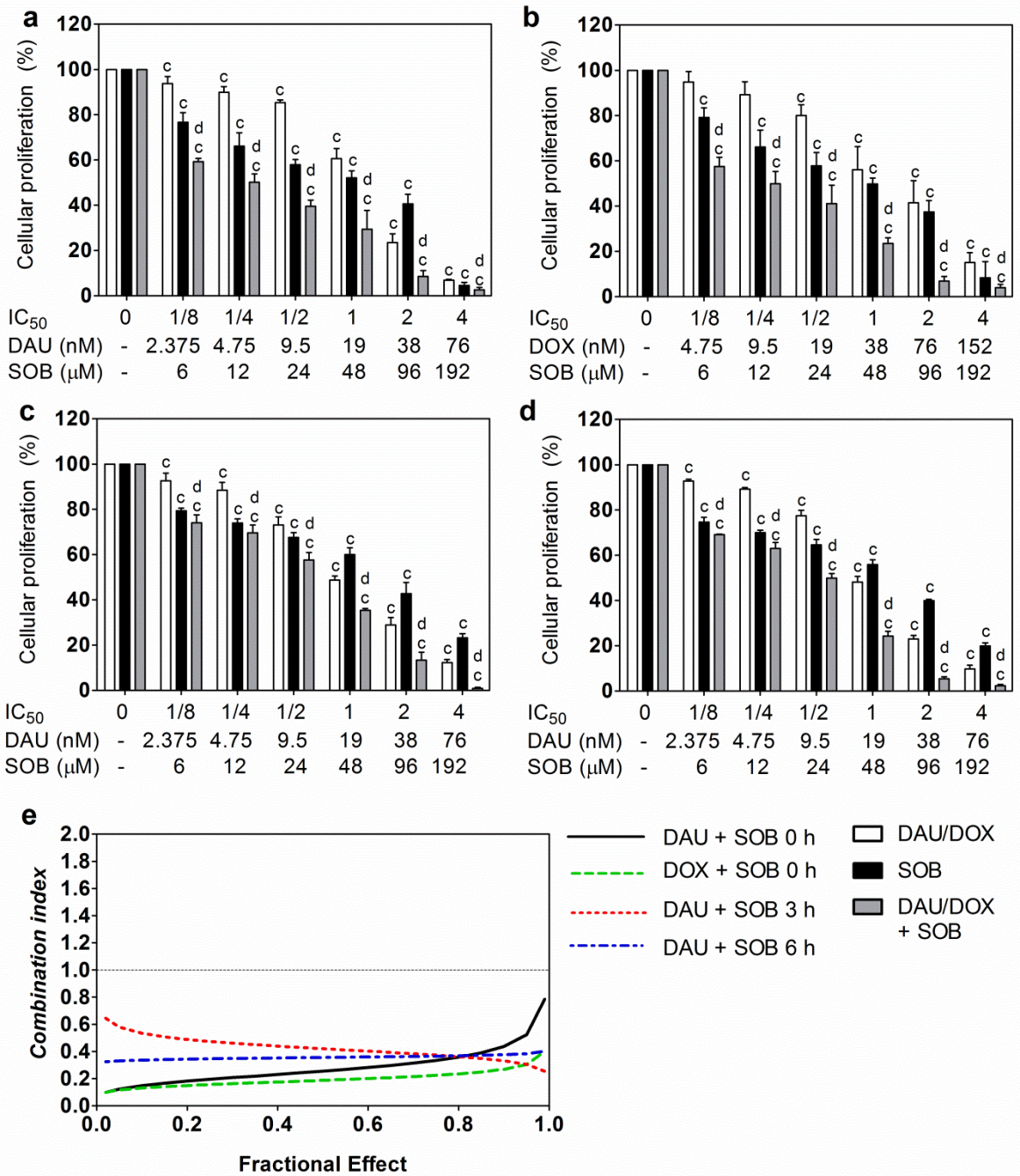


Fig. 7.

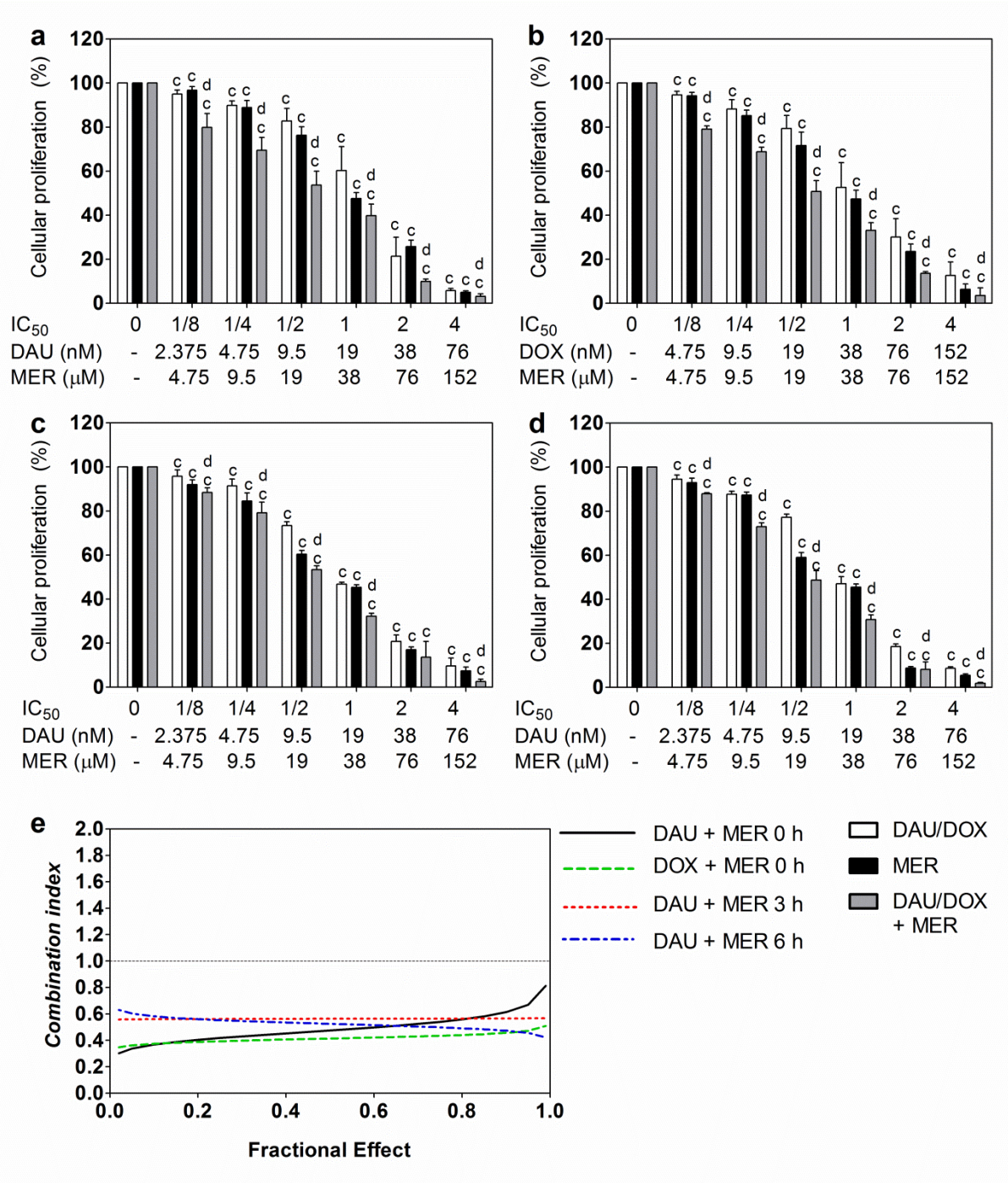


Fig. 8.

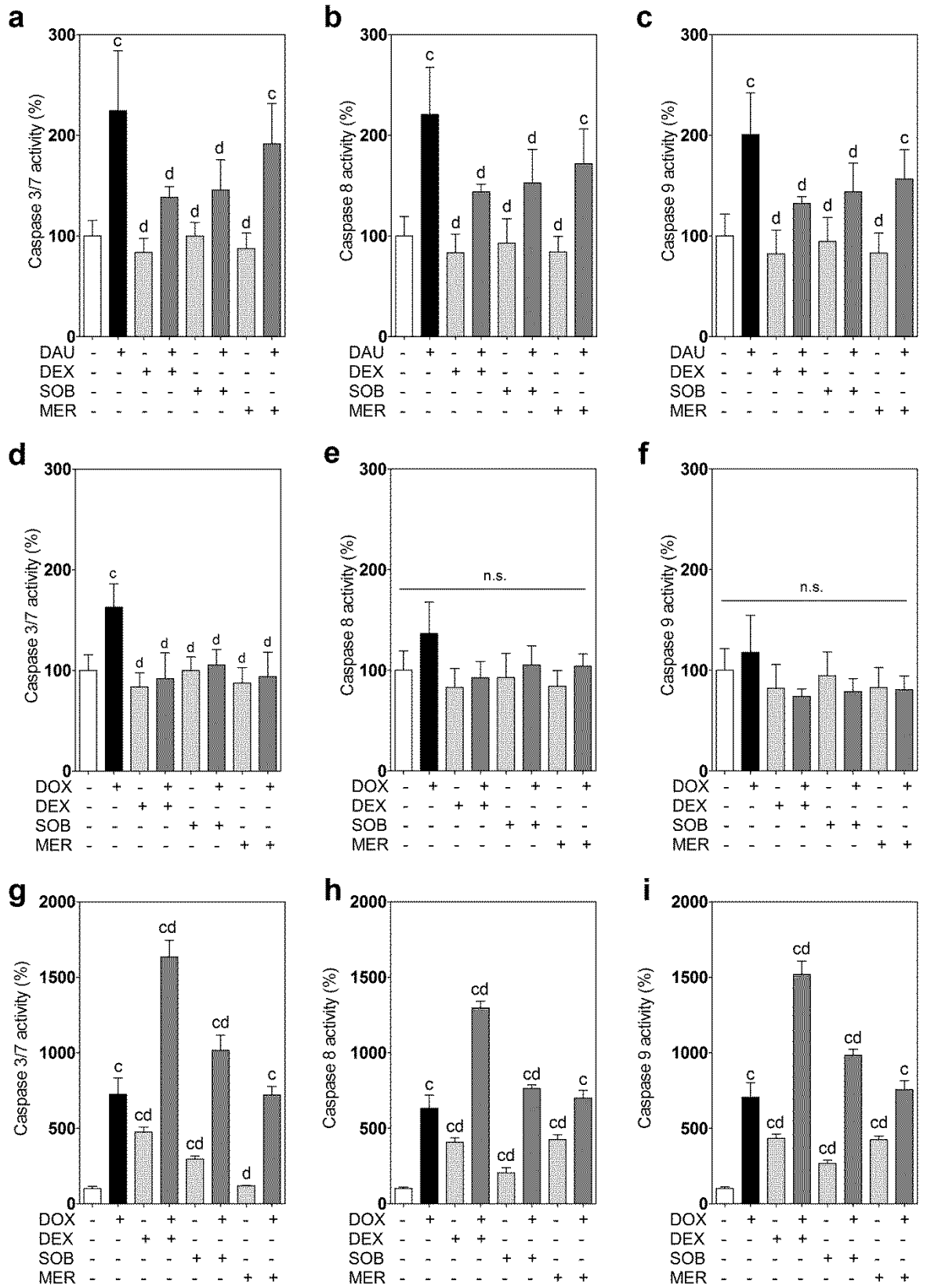
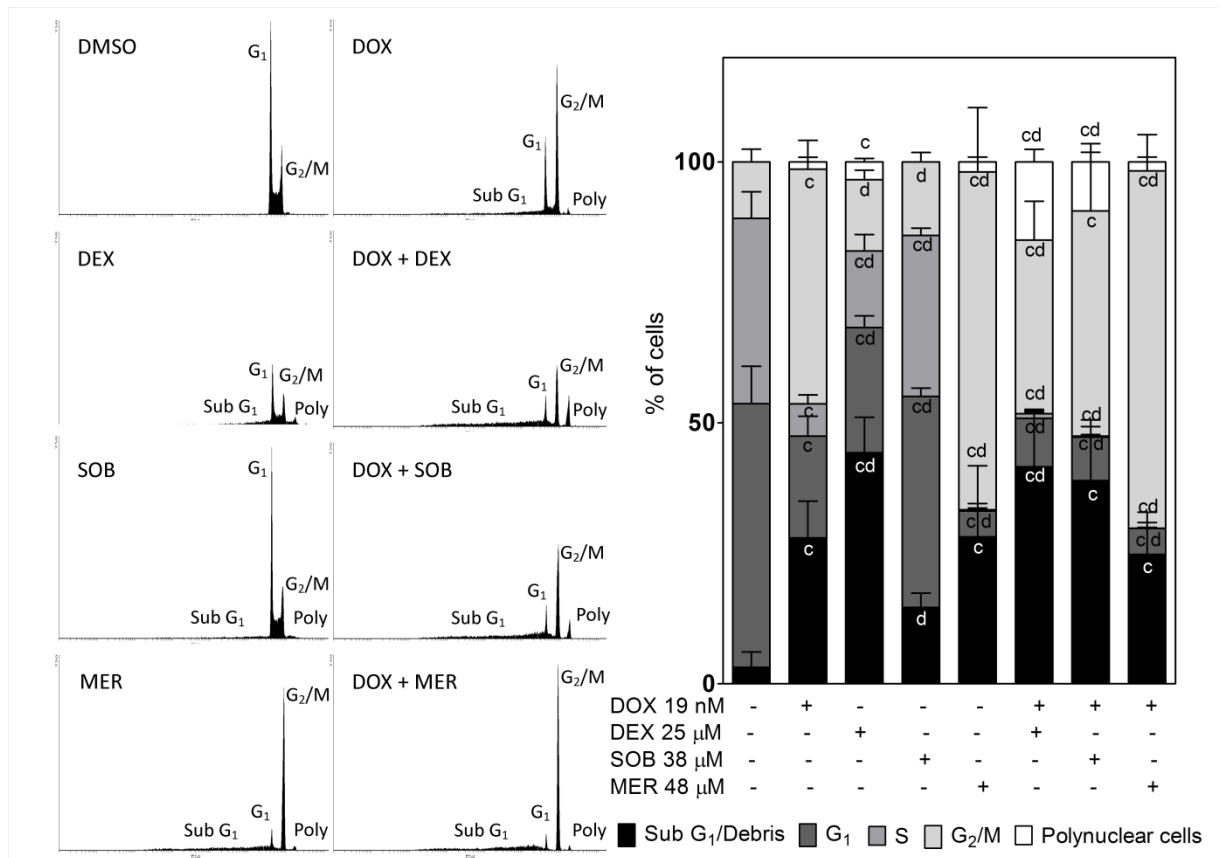


Fig. 9.



V.

Synthesis and examination of novel analogues of
dexrazoxane and its open-ring hydrolysis product for
protection against anthracycline cardiotoxicity

Vávrová A., Roh J., Lenčová-Popelová O., Jirkovský E., Hrušková K.,
Macková E., Jansová H., Hašková P., Martínková P., Eisner T., Kratochvíl
M., Šůs J., Tichotová L., Geršl V., Vávrová K., Richardson D.R., Štěrbá M.,
Šimůnek T.

Synthesis and examination of novel analogues of dexrazoxane and its opening hydrolysis product for protection against anthracycline cardiotoxicity

Anna Vávrová[†], Jaroslav Roh[†], Olga Lenčová-Popelová[‡], Eduard Jirkovský[‡], Kateřina Hrušková[†], Eliška Macková[†], Hana Jansová[†], Pavlína Hašková[†], Pavla Martínková[†], Tomáš Eisner[†], Marek Kratochvíl[†], Jan Šůs[†], Lucie Tichotová[†], Vladimír Geršl[‡], Kateřina Vávrová[†], Des R. Richardson[§], Martin Štěřba[‡], Tomáš Šimůnek^{†,*}

[†]*Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic*

[‡]*Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Hradec Králové, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové, Czech Republic*

[§]*Iron Metabolism and Chelation Program, Bosch Institute and Department of Pathology, University of Sydney, Sydney, Australia*

***Corresponding author:**

Dr. Tomáš Šimůnek
Department of Biochemical Sciences
Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy
Heyrovského 1203
500 05 Hradec Králové
Czech Republic
Tel.: +420 495 067 422
Fax: +420 495 067 168
E-mail: Tomas.Simunek@faf.cuni.cz

ABSTRACT

Cardiotoxicity is a serious drawback of anthracycline anticancer drugs that compromises their clinical usefulness. Dexrazoxane is the only cardioprotective agent with clinically established efficacy, but its use has been very limited. Traditionally, iron-mediated oxidative stress is believed to be the key culprit of anthracycline cardiotoxicity, and dexrazoxane-induced cardioprotection is attributed to its hydrolysis product ADR-925 that can chelate free iron, and thus prevent cardiac oxidative injury. However, parent structure of dexrazoxane is also a catalytic inhibitor of topoisomerase II (TOP2), and the role of oxidative stress in clinical cardiotoxicity is increasingly questioned. In this study, novel analogues of dexrazoxane (MK-15, ES-5) and ADR-925 (KH-TA4, JR-159) were synthesized, and their protective activities against daunorubicin cardiotoxicity were examined *in vitro* on isolated neonatal rat ventricular cardiomyocytes and *in vivo* using rabbit model of chronic anthracycline cardiotoxicity. The antiproliferative activities were assessed using the human leukemic cell line HL-60. In contrast to the reference agent dexrazoxane, none of the novel agents was able to significantly protect against the daunorubicin cardiotoxicity, and the newly synthesized agents also did not display considerable antiproliferative properties. On the other hand, KH-TA4 significantly protected cardiomyocytes from model oxidative damage by hydrogen peroxide, whereas dexrazoxane was ineffective. The examined agents did not differ from dexrazoxane in their ability to bind or mobilize iron from cardiomyocytes, but unlike dexrazoxane they were shown to lack TOP2 inhibition properties. In conclusion, our data indicate that rather than by antioxidative properties, the interaction with TOP2 may be involved in both in anthracycline cardiotoxicity as well as it may be indispensable for effective pharmacological cardioprotection.

Keywords: Anthracycline cardiotoxicity; Cardioprotection; Daunorubicin; Dexrazoxane (ICRF-187); Iron chelation; Topoisomerase II (TOP2).

1. INTRODUCTION

Anthracyclines (ANTs), such as doxorubicin (DOX), daunorubicin (DAU), or epirubicin are highly effective antineoplastic agents.¹ ANTs inhibit tumor growth by blocking the function of topoisomerase II (TOP2), an enzyme crucial for alleviating tension introduced to the DNA double helix during replication and transcription.² Although more than 50 years old, ANTs are still widely prescribed for the treatment of a number of hematological as well as solid malignancies.³

However, ANTs are associated with the risk of cardiotoxicity, which can manifest (usually as dilated cardiomyopathy and heart failure) even years after the successful completion of chemotherapy.³ Despite numerous proposed theories, the exact pathophysiological mechanism how ANTs cause heart injury still remains elusive. The dominant and most cited theory involves the iron (Fe)-mediated generation of reactive oxygen species (ROS).^{4,5} ANTs can induce the production of superoxide radicals *via* redox cycling of the quinone/semiquinone moiety of its aglycone. The superoxide dismutates into hydrogen peroxide (H₂O₂), which may in turn enter the Fe-catalyzed Haber-Weiss reaction, resulting into extremely reactive and toxic hydroxyl radicals, which cause damage to DNA, proteins and lipids, and promotes myocyte dysfunction and death. Furthermore, ANTs are able to form complexes with free Fe ions, which can undergo a cascade of reactions resulting in hydroxyl radical production.⁴

To date, the only pharmacological agent with demonstrated ability to prevent ANT-induced cardiotoxicity is dexrazoxane (DEX, ICRF-187, 4-[(2S)-2-(3,5-dioxopiperazin-1-yl)propyl]piperazine-2,6-dione).⁶ According to the prevailing hypothesis, DEX may protect cardiomyocytes against the ANT-induced damage through its metal-chelating hydrolysis product ADR-925 (an analogue of well-known chelator EDTA), which may act by displacing Fe from the complexes with the ANT or by chelating free redox-active intracellular Fe ions, and thus preventing the site-specific Fe-based ROS damage.^{7,8} However, the parent structure of DEX is also a catalytic TOP2 inhibitor, and recent studies also suggested that DEX may be cardioprotective through its ability to interfere with ANT-induced effects on DNA mediated by TOP2 within the cardiomyocytes.^{9,10}

Clinical trials have demonstrated that patients with DEX added to ANT treatment have a significantly lower incidence of cardiac events than those without it, and that DEX also permits administration of ANTs in higher than standard cumulative doses.^{11,12} However, treatment with DEX is also associated with certain disadvantages. DEX may aggravate the ANT-induced hematotoxicity, in particular there is an increased risk of severe leucopenia.^{8,13} Also studies suggesting possibly higher rate of secondary malignancies,¹⁴ or interference with ANT antitumor effectiveness¹⁵ further reduced the use of DEX in clinical practice. A study published in 2004 reported that in Europe only a relative small percentage ($\approx 7\%$) of patients receiving ANTs are prescribed DEX.¹⁶ In 2011, the U.S. Food and Drug Administration released a statement restricting DEX use only for adult breast cancer patients who have received rather high ($>300 \text{ mg/m}^2$) cumulative dose of DOX.¹⁷ Hence, despite unequivocal potential of DEX to prevent ANT-induced cardiotoxicity both in adults and children, the real or perceived problems associated with DEX, resulting in its generally low appraisal among clinical oncologists, are unfortunately the obstacles of wider employment of pharmacological cardioprotection in clinical practice. These problems therefore encourage search for alternative cardioprotectants.

The aim of this study was to synthesize novel analogues of DEX as well as its putatively active metabolite ADR-925, and evaluate their cardioprotective potential both *in vitro* and *in vivo*. To this end, we used primary cultures of rat isolated neonatal ventricular cardiomyocytes (NVCM), as well as a well-established and DEX-validated model of chronic ANT-induced heart failure in rabbits.¹⁸⁻²⁰ Fe chelation and mobilization properties of the examined agents as well as their effects on TOP2 activity or expression were used to analyze which properties are necessary for effective cardioprotection.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. MATERIALS

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), DMEM with Ham's F-12 nutrient mixture (DMEM/F12), horse serum (HS), fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin solution (5000 U/mL; P/S) and sodium pyruvate solution (100 mM; PYR) were purchased from Lonza (Belgium). The sera were heat-inactivated prior to use. Cell culture plastic was purchased from TPP (Switzerland). DEX was obtained from Huaren Chemicals (China). RPMI-1640 medium with L-glutamine and NaHCO₃, pyruvate-free DMEM, lactic acid, nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺), MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide as well as other chemicals (*e.g.* constituents of various buffers) were purchased from Sigma-Aldrich (Czech Republic) or Penta (Czech Republic), and were of the highest available pharmaceutical or analytical grade. Dimethyl sulfoxide was used to dissolve the tested compounds.

2.2. SYNTHESIS OF DEXRAZOXANE AND ADR-925 ANALOGUES

All chemicals for synthesis were obtained from Sigma-Aldrich, and used as received. TLC was performed on Merck aluminum sheets with silica gel 60 F254 or Merck aluminum sheets with silica gel 60 RP-18 F254s. Merck Kieselgel 60 (0.040-0.063 mm) was used for column chromatography. Melting points were recorded on a Büchi B-545 apparatus, and are uncorrected. Infrared spectra were measured on Nicolet 6700 (ATR mode). ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on Varian Mercury Vx BB 300 or VNMR S500 NMR spectrometers. Chemical shifts were reported as δ values in parts per million (ppm), and were indirectly referenced to tetramethylsilane (TMS) *via* the solvent signal. The elemental analysis was carried out on Automatic Microanalyser EA1110CE (Fisons Instruments S.p.A., Italy). Mass spectra were recorded on Agilent 500 Ion Trap LC/MS (Agilent Technologies, U.S.A.).

2.3. CELL CULTURES AND *IN VITRO* TOXICITY AND PROLIFERATION ASSESSMENTS

HL-60 cell line, derived from a single patient with acute promyelocytic leukemia,²¹ was purchased from the American Type Culture Collection (U.S.A.). Cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, 1% P/S in 75 cm² tissue culture flasks at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. For the cytotoxicity assays the cells were plated on 96-well plates in a density of 10,000 cells per well. The cells were incubated with examined agents for 72 h. The proliferation was determined using the MTT assay. Briefly, 25 µL of 3 mg/mL MTT solution in PBS was added to each well, and after 2 h of incubation in 37 °C the cells were lysed with lysis buffer (isopropanol, 0.1 M HCl, 10% Triton X-100) for 30 min at room temperature (rt). After dissolving, the absorbance of the samples was measured at 570 and 690 nm.

Neonatal ventricular rat cardiomyocytes (NVCMs) were isolated from 1-3 day old Wistar rats. Briefly, neonatal hearts were minced in ADS buffer (1.2 mM MgSO₄·7H₂O; 116 mM NaCl; 5.3 mM KCl; 1.13 mM NaH₂PO₄·H₂O; 20 mM HEPES) on ice, digested at 37 °C with collagenase type II (Invitrogen, U.S.A.). After 2 h pre-plating on 150 mm Petri dish per approx. 20 hearts to minimize nonmyocyte contamination, cells were plated on 12-well gelatin-coated plates in a density of 80,000 cells per well. NVCMs were cultured at 37 °C and 5% CO₂ in the DMEM/F12 supplemented with 10% HS, 5% FBS, 20% PYR and 1% P/S. Newly isolated NVCMs were left for 40 h to attach properly, and form a culture of spontaneously beating cardiomyocytes, then the medium was changed to DMEM/F12 supplemented with 5% FBS, 20% PYR and 1% P/S. For the experiments the medium was changed to serum- and pyruvate-free DMEM/F12 with 1% P/S. In this medium the cells were maintained to the end of experiment. The myocytes were pre-treated with DEX or the novel analogues for 3 h, and then co-incubated with DAU for 3 h. After that the culture medium was changed, and the cells were post-incubated with DEX or the novel analogues for 48 h. Alternatively, after pre-treatment, the cells were co-incubated with H₂O₂ for 48 h. Subsequently the sample of the culture medium was taken from each well for the assessment of the lactate dehydrogenase (LDH) activity; the control wells were treated with lysis buffer (0.1 M potassium phosphate, 1% Triton X-100, 1 mM DTT, 2 mM EDTA, pH 7.8, 15 min in rt) for total LDH amount. All the samples were frozen immediately, and kept in -80 °C until

they were analyzed. Activity of LDH was assayed in Tris–HCl buffer pH 8.9 containing 35 mM lactic acid and 5 mM NAD⁺. The rate of NAD⁺ reduction was monitored spectrophotometrically at 340 nm for 2 min. The slope of the linear region was calculated, and the data were expressed as the percent of total LDH amount.

The H9c2 cell line, derived from embryonic rat heart tissue using selective serial passages,²² was purchased from the American Type Culture Collection (U.S.A.). Cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS, 1% P/S and 10 mM HEPES in 75 cm² tissue culture flasks at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. Subconfluent cells were subcultured every 3–4 days. For calcein assay, the cells were seeded on 12-well plates at a density 75,000 cells per well. Cells were left for 24 h to attach. Afterwards the culture medium was replaced with serum- and pyruvate-free DMEM. After 24 h of serum deprivation, the cells were essentially non-proliferating, and were used for experiments.

2.4. IN VIVO CARDIOTOXICITY AND CARDIOPROTECTION EXAMINATIONS

For pilot *in vivo* evaluation of cardioprotective effects of novel DEX analogues we used a well-established and reproducible model of chronic ANT cardiotoxicity in rabbits.^{18,19,23} Chinchilla male rabbits (\approx 3.5 kg, n = 34) were randomized into groups as follows. Cardiotoxicity was induced with daunorubicin (DAU, 3 mg/kg, i.v., Daunoblastina; Pharmacia Italia, Italy, n = 6), while control group received saline (1 mL/kg, i.v., n = 6). Dexrazoxane (60 mg/kg, Cardioxane, Novartis, Switzerland, n = 6), MK-15 (60 mg/kg, n = 5), ES-5 (60 mg/kg, n = 3), KH-TA4 (25 mg/kg, n = 7) and JR-159 (50 mg/kg, n = 1) were dissolved in saline, and were administered intraperitoneally 30 min prior each DAU administration. All drugs were administered once weekly for 10 weeks. DEX was administered in a recommended 1:20 ratio to DAU which has been previously found well effective and tolerable in rabbits.^{19,20} Tolerabilities of repeated weekly coadministrations of the newly synthesized agents with DAU were estimated prior the study of potential cardioprotective effects. The results of these preliminary experiments suggested a need of dose reduction in KH-TA4 and JR-159 to 25 and 50 mg/kg, respectively.

Administration of drugs, blood sampling and noninvasive measurements of cardiac function were carried out under combined light anesthesia of ketamine (30 mg/kg, i.m.) and midazolam (1.25 mg/kg, i.m.). Weight gain was monitored weekly, while changes in behavior and possible external signs of toxicity were observed daily. The study was terminated 5-7 days after the last drug administration by pentobarbital overdose. During autopsy or necropsy, heart weight and the presence of pleural effusions and ascites were evaluated. All experiments were approved and supervised by the Ethical Committee of Charles University in Prague, the Faculty of Medicine in Hradec Králové, and were in accordance with the Institute of Laboratory Animal Resources (1996).

The LV systolic function was followed by echocardiography (Vivid 4, with a 10 MHz probe; GE Medical Systems Ultrasound; GE Healthcare, U.K.). LV fractional shortening (FS), as an index of the LV systolic function, was obtained from LV end-systolic and end-diastolic diameters determined by guided M-mode scanning from the left parasternal long and short axis view. The examination was performed at the beginning of the study and weekly in the later period of the study (8th-11th week), when the DAU-induced decline in systolic function is observed.

Concentrations of cardiac troponin T (cTnT) in plasma were determined using an Elecsys Troponin T hs (Roche Diagnostics, Switzerland) at the beginning of the study, before 5th, 8th, 10th drug administration and at the end of the study.

2.5. CALCEIN ASSAYS FOR DETERMINATIONS OF FE-CHELATING PROPERTIES

The complex of calcein (free acid, 20 nM) with ferrous-diammonium sulfate (FAS; 200 nM) was prepared in HEPES-buffered saline (150 mM NaCl and 40 mM HEPES; pH 7.2). Calcein and FAS were continuously stirred for 45 min in the dark after which >90% of fluorescence was quenched. Then 995 μ L of the complex solution was pipetted into a stirred cuvette, and the baseline measurement was started. After 100 s, 5 μ L of assessed potential Fe chelator solution was added yielding a final concentration of 5 μ M. It should be noted, that as the ferrous ions (from FAS) get oxidized to ferric before the actual measurement, the assay is in effect looking at ferric Fe binding.

The change in fluorescence intensity was measured as a function of time at rt using a Perkin-Elmer LS50B fluorimeter (Perkin-Elmer, U.S.A.) at $\lambda_{\text{ex}} = 486 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em}} = 517 \text{ nm}$ for 350 s. The Fe chelation efficiency in solution was expressed as a percentage of efficiency of the reference chelator SIH (100%).

The experiments analyzing Fe-chelating efficiencies in cultured cells were performed according to Glickstein et al.²⁴ with slight modifications. H9c2 cells were seeded on 96-well plates (10,000 cells per well). The cells were loaded with 100 μM ferric-ammonium citrate (FAC) in serum-free medium 24 h before the experiment. The cells were then washed, and to prevent potential interferences (especially with regard to various trace elements) the medium was replaced with a buffer prepared from Millipore-filtered (demineralized) water, containing 116 mM NaCl, 5.3 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 1.13 mM NaH₂PO₄, 5 mM glucose and 20 mM HEPES (pH 7.4). Cells were then loaded for 30 min at 37 °C with 1 μM cell-permeable acetoxymethyl ester of calcein green (Molecular Probes/KRD, Czech Republic), and washed. Cellular esterases cleave the acetoxymethyl groups to render the cell membrane-impermeable calcein green, which fluorescence was quenched by FAC. Intracellular fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$) was then followed in time (1 min before and 10 min after the addition of chelator) at 37 °C using an Infinite 200 M plate reader (Tecan, Austria). The novel agents were compared to the previously characterized chelator SIH that was used a reference agent.

2.6. FE MOBILIZATION ASSAY

For ⁵⁹Fe mobilization, H9c2 cells were seeded in 35 mm Petri dishes in density of 250,000 cells per dish. Human Transferrin (Tf, Sigma) was labeled with ⁵⁶Fe or ⁵⁹Fe (DuPont NEN, U.S.A.) to produce ⁵⁶Fe2-Tf or ⁵⁹Fe2-Tf, respectively, as previously described.^{25,26} Unbound ⁵⁹Fe was removed by exhaustive vacuum dialysis against a large excess of 0.15 M NaCl buffered to pH 7.4 with 1.4% NaHCO₃.^{25,26}

To examine the ability of the novel substances to mobilize ⁵⁹Fe from H9c2 cells, Fe efflux experiments were performed using established techniques.^{25,27} In brief after pre-labeling cells with ⁵⁹Fe-Tf (0.75 μM) for 3 h at 37 °C, the cells were washed four times with ice-cold PBS, and then subsequently incubated with each studied substance

(25 μ M) for 3 h at 37 °C. The overlying media containing released ^{59}Fe was then separated from the cells. Radioactivity was measured in both the cell pellet and supernatant using a γ -scintillation counter (Wallac Wizard 3, Finland). The novel agents were compared to the previously characterized chelator SIH that was used as positive control.

2.7. TOPOISOMERASE IIA (TOP2A) ACTIVITY ASSAY

TOP2A inhibition assays were performed using Topoisomerase II Drug Screening Kit (Topogen Inc., U.S.A.) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 200 μ g of kinetoplast DNA was incubated with 1 U of TOP2A in reaction buffer containing 0.1 M Tris-HCl, 0.3 M NaCl, 20 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 60 μ g/mL bovine serum albumin and 100 μ M of tested compounds for 30 min at 37 °C. Then the reaction was stopped by addition of 1% SDS, and 50 ng proteinase K was used to digest topoisomerase for 15 min at 37 °C. Then, 1/10 volume of gel loading buffer (0.25% bromphenol blue, 50% glycerol) was added, and the samples were loaded into the 1% agarose gel in electrophoresis buffer (50 mM Tris-borate, 1 mM EDTA, pH 8.5). Electrophoresis was conducted at 10 V/cm for approximately 1 h at rt. The gels were visualized using GelDoc with QuantityOne software (Bio-Rad, Czech Republic).

2.8. WESTERN BLOT ANALYSIS OF TOPOISOMERASE IIB (TOP2B) IN CARDIOMYOCYTES

The NVCMs plated on 60 mm Petri dishes were incubated with DEX, MK-15, ES-5, ADR-925, KH-TA4 and JR-159 for 3, 6, 12 or 24 h, washed twice in ice-cold PBS, harvested with the cell scraper and centrifuged at 700 \times g for 10 min at 4 °C. Supernatant was discarded and cell pellets were kept at -80 °C until homogenization in RIPA buffer (Sigma-Aldrich) with 10 mM N-ethylmaleimide and protease inhibitor solution (Roche, Germany). After centrifugation, the supernatant was collected, and 10 μ g of protein was loaded into each lane of TGX Any kD Mini-PROTEAN TGX Precast Gel (Bio-Rad). After the separation, the proteins were electrically transferred using Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) onto PVDF (Pall Corporation, USA). Rabbit monoclonal anti-TOP2B (Abcam, U.K.; dilution 1:7500) was used as primary

antibody, and horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (DakoCytomation, Denmark; dilution 1:1000) was used as the secondary one. BM Chemiluminescence Blotting Substrate (Roche) was used for detection. Densitometric quantification was performed using Quantity One software (Bio-Rad). Protein loading was controlled with anti-GAPDH antibody (Sigma-Aldrich; dilution 1:2000) and horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (DakoCytomation; dilution 1:10,000). Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope (Bio-Rad) were used as molecular weight markers.

2.9. STATISTICAL ANALYSIS

The data are presented as means \pm SD, and they were subjected to one-way ANOVA with Dunnett's post-test or unpaired two-tailed *t* test (Mann-Whitney) using GraphPad Prism version 6.00 for Windows (GraphPad Software, U.S.A.). Significance was accepted at the $P \leq 0.05$. All measurements were performed in more than three independent experiments. In the case of chelation in solution a representative from three measurements is presented.

3. RESULTS

3.1. SYNTHESSES OF NOVEL ANALOGUES OF DEXRAZOXANE AND ADR-925

Synthesis of Ethyl-2-{bis[2-(3,5-dioxopiperazin-1-yl)ethyl]amino}acetate 3 (MK-15; Figure 1)

2-{bis[2-(3,5-dioxopiperazin-1-yl)ethyl]amino}acetic acid (**2**): The stirred suspension of diethylenetriaminepentaacetic acid **1** (10 g, 25.4 mmol) in formamide (40 mL) was heated under vacuum (1.5-2 kPa) for 1 h. Reaction flask was then filled with argon, and the reaction was heated to 150-160 °C for 5 h under argon atmosphere. Approx. 30 mL of formamide were evaporated under reduced pressure; the dark residue was cooled to rt, diluted with 20 mL of methanol and cooled until precipitate forms. The product was filtered, washed several times with methanol and dried.

Yield: 68% (6.14 g) as cream-colored solid; mp 254 °C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 11.06 (s, 2H), 3.34 (s, 8H), 3.31 (s, 2H), 2.78 (t, *J* = 6.4 Hz, 4H), 2.55 (t, *J* = 6.4 Hz, 4H); ¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ 3.82 (s, 2H), 3.56 (s, 8H), 3.50-3.41 (m, 4H), 3.04-2.94 (m, 4H);

¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ 171.76, 171.55, 55.31, 55.24, 52.56, 50.90; ¹³C NMR (75 MHz, D₂O) δ 173.45, 170.56, 57.20, 54.83, 51.80, 49.30. LRMS *m/z* (APCI) 356.6 (100, M+H⁺), 357.6 (16%).

Ethyl-2-{bis[2-(3,5-dioxopiperazin-1-yl)ethyl]amino}acetate (**3**): Amino acid **2** (2 g, 5.63 mmol) and K₂CO₃ (0.39 g, 2.82 mmol) were suspended in dimethylsulfoxide (DMSO) under vigorous stirring. Then, ethylbromide (0.4 ml, 5.35 mmol) was added drop wise, and the reaction mixture was stirred at rt for 10 h. The reaction mixture was filtered, DMSO was evaporated under reduced pressure, and the residue was purified using column chromatography on silica (mobile phase: ethyl acetate) and subsequent recrystallization (acetone/ethyl acetate).

Yield: 56% (1.2 g) as yellowish solid; mp 110 °C; R_f (ethyl acetate) 0.18; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11.06 (s, 2H), 4.02 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.38 (s, 2H), 3.32 (s, 8H), 2.69 (t, *J* = 6.3 Hz, 4H), 2.56-2.46 (m, 4H), 1.16 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ

171.66, 171.27, 59.85, 55.41, 54.60, 53.27, 50.83, 14.31. LRMS m/z (APCI) 384.3 (100, $M+H^+$), 385.1 (18%).

Synthesis of 4,4'-(Propane-1,2-diyl)bis(piperazin-2-one) 7 (ES-5; Figure 1)

Piperazin-2-one (**6**): Ethylenediamine **5** (160 ml, 2.4 mol) and K_2CO_3 (36 g, 0.26 mol) were added to AcCN (1 L) in two-liter flask. Ethyl bromoacetate **4** (27.5 mL, 0.25 mol) was added in several portions to stirred suspension of ethylenediamine (160 mL, 2.4 mol) and K_2CO_3 (36 g, 0.26 mol) in AcCN (1 L). Reaction mixture was heated to reflux for 6 h under microwave irradiation. Then, reaction mixture was cooled to rt and filtered, and the volatiles were evaporated under reduced pressure. The residue was recrystallized twice from acetone.

Yield: 65% (16 g) as yellowish crystalline solid; mp 133 °C; 1H NMR (300 MHz, D_2O) δ 3.40 (s, 2H), 3.38-3.28 (m, 2H), 3.00-2.89 (m, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, D_2O) δ 173.21, 47.88, 41.99, 40.93.

4,4'-(Propane-1,2-diyl)bis(piperazin-2-one) (**7**): Piperazin-2-one **6** (14.95 g, 0.149 mol), K_2CO_3 (20.6 g, 0.149 mol) and 1,2-dibromopropane (7.8 mL, 0.074 mol) was heated under argon atmosphere to 90 °C for 10 h in 100 mL of *N,N*-dimethylformamide (DMF). The reaction mixture was cooled and filtered, and DMF was evaporated under reduced pressure. The residue was purified using silica gel column chromatography (mobile phase: $CHCl_3/MeOH$, 5:1)

Yield: 26% (4.66 g) as yellowish crystalline solid; mp 155-156 °C (with decomp.); R_f ($CHCl_3/MeOH$, 2:1) 0.42; 1H NMR (300 MHz, D_2O) δ 3.42-3.32 (m, 4H), 3.31 (s, 2H), 3.23 (s, 2H), 3.08 – 2.94 (m, 1H), 2.93-2.81 (m, 3H), 2.80-2.63 (m, 2H), 2.57-2.46 (m, 1H), 1.11 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H); 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.69 (s, 1H), 7.65 (s, 1H), 3.16-3.02 (m, 6H), 2.93 (d, $J = 4.6$ Hz, 2H), 2.91-2.80 (m, 1H), 2.66-2.39 (m, 5H), 2.22 (dd, $J = 12.5, 7.1$ Hz, 1H), 0.91 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, D_2O) δ 172.51, 171.98, 59.69, 56.18, 55.33, 51.83, 48.55, 44.05, 40.99, 40.44, 13.15. ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 168.53, 168.02, 59.90, 57.42, 54.54, 52.82, 49.36, 44.75, 41.06, 40.60, 13.05; LRMS m/z (APCI) 241.4 (100, $M+H^+$), 242.2 (12%).

Synthesis of *N,N,N',N'*-tetrakis(*N,N*-dimethylcarbamoylmethyl)-1,2-diaminopropane 10 (JR-159; Figure 1)

N,N,N',N'-tetrakis(*N,N*-dimethylcarbamoylmethyl)-1,2-diaminopropane (**10**): The stirred mixture of 1,2-diaminopropane (1 mL, 11.7 mmol), 2-chloro-*N,N*-dimethylacetamide (7.24 mL, 70.4 mmol), K₂CO₃ (10 g, 72.4 mmol) and NaI (1 g, 6.67 mmol) in AcCN (60 mL) were heated to reflux for 4 h under the microwave irradiation. The reaction mixture was cooled and stirred overnight at rt. Then the suspension was filtered and AcCN was evaporated under reduced pressure. The residue (9 g) was purified by three consecutive column chromatographies (1. mobile phase: Aceton/TEA, gradient 15:1-10:1; 2. mobile phase: Aceton/EtOH/TEA, gradient 10:0:1-10:10:1, 3. mobile phase: EtOH/TEA, gradient 10:0-10:1).

Yield: 21% (1.04 g) as yellowish viscous oil; R_f (EtOH) 0.1; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 3.48-3.34 (m, 6H), 3.24-3.10 (m, 2H), 3.03 (s, 6H), 2.95 (s, 6H), 2.86-2.68 (m, 14H), 2.38 (dd, *J* = 12.4, 6.1 Hz, 1H), 0.88 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 170.12, 169.99, 56.89, 55.96, 53.82, 52.72, 36.61, 36.41, 35.19, 34.99, 13.21. LRMS *m/z* (APCI) 415.5 (100, M+H⁺), 416.5 (21%)

Synthesis of *N,N,N',N'*-tetrakis(*N*-butylcarbamoylmethyl)-1,2-diaminopropane 12 (KH-TA4; Figure 1)

N-butyl-2-bromoacetamide (**11**): A solution of bromoacetyl bromide (2.08 g, 0.01 mol) in dry Et₂O (6 mL) was cooled to -20 °C. During 30 min a solution of butylamine (1.51 g, 0.02 mol) in 6 mL of dry Et₂O was added dropwise. The reaction mixture was stirred at -20 °C for 30 min, 12 mL of cold water was added to the reaction mixture, and the organic layer was removed, washed twice with 12 mL of 1 M HCl, 12 mL of 1 M NaOH and 12 mL of brine. The organic layer was dried with anhydrous Na₂SO₄ and evaporated under reduced pressure.

Yield: 65% as colorless oil, solidifying at 4 °C to an amorphous solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.22 (s, 1H), 3.80 (s, 2H), 3.09-3.01 (m, 2H), 1.46-1.17 (m, 4H), 0.86 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ 165.99, 38.81, 31.07, 29.77, 19.63, 13.79.

N,N,N',N'-tetrakis(*N*-butylcarbamoylmethyl)-1,2-diaminopropane (**12**): 1,2-diaminopropane (0.28 g, 0.004 mol) was dissolved in 10 mL of acetonitrile. Potassium carbonate (2.6 g, 0.019 mol) and *N*-butyl-2-bromoacetamide (3.7 g, 0.019 mol) were added, and the reaction mixture was heated in a microwave reactor to reflux for 4 h. The reaction mixture was cooled to 4 °C and stayed overnight. The resulting solid was filtered off, washed thoroughly with water and dried under reduced pressure.

Yield: 88% as white solid, mp 160-162 °C. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.58 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 7.49 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 3.34-3.02 (m, 16H), 2.96-2.87 (m, 1H), 2.58 (dd, *J* = 13.8, 9.8 Hz, 1H), 2.37 (dd, *J* = 13.8, 4.6 Hz, 1H), 1.54-1.41 (m, 8H), 1.38-1.26 (m, 8H), 0.94-0.87 (m, 15H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 170.97, 170.36, 58.98, 58.90, 55.21, 55.00, 39.22, 39.10, 31.66, 31.64, 20.11, 13.71, 13.70, 12.30. LRMS *m/z* (APCI) 527.5 (100, M+H⁺), 528.5 (29%).

3.2. *IN VITRO* TOXICITY AND PROLIFERATION ASSESSMENTS

First, the newly synthesized analogues of DEX (MK-15 and ES-5) and ADR-925 (KH-TA4 and JR-159) were examined for antiproliferative activity using the 72 h incubations with the human acute promyelocytic leukemia cell line HL-60. Within the range of concentrations achievable in cell culture medium ($\leq 100 \mu\text{M}$), none of the novel analogues displayed marked antiproliferative activity as the reductions of proliferation did not reach 50% of control value (IC₅₀). This contrasted with DEX, which induced concentration-dependent inhibition of cellular proliferation with IC₅₀ = 25 μM . Also, pilot experiments were undertaken to assess effects of the novel analogues on antiproliferative action of DAU. Here, the novel agents, assayed at maximal achievable concentrations (100 μM) did not compromise the inhibition of proliferation induced by 20 nM DAU, *i.e.* a concentration corresponding to its IC₅₀ value (data not shown).

The toxicities of DEX and the novel analogues were then assayed on isolated NVCMs using 48 h incubations, and LDH release was used as a marker of cardiotoxicity. As seen in Figure 3A, the novel analogues were generally non-toxic at concentrations tested ($\leq 100 \mu\text{M}$), with the only exception being KH-TA4, which showed statistically significant, although rather minor toxicity ($\approx 13\%$ of total cellular LDH release as compared to $\approx 10\%$ in control cells) towards NVCMs at its highest, $100 \mu\text{M}$, concentration.

The analogues of DEX were then thoroughly examined for their potential to protect NVCMs from the toxicity caused by 3 h $1.2 \mu\text{M}$ DAU exposure, followed by wash-out and 48 h post-incubation. Apart from concentration-dependence, various times of pre-incubations (0-24 h) with potential cardioprotectants prior to the addition of DAU were examined. Exposure of cardiomyocytes to DAU induced significant LDH release ($\approx 50\%$ of total cellular LDH as compared to $\approx 10\%$ in control cells). DEX induced significant protection of cardiomyocytes at all assayed concentrations ($10\text{-}100 \mu\text{M}$) and pre-incubation times (Figure 3B). From the novel agents, without pre-incubation, only ES-5 showed significant protection against the DAU-induced toxicity, although the data showed much higher variability compared to the DAU + DEX groups. Some protection was observed also after 3 and 6 h of pre-incubation, but was lost after 24 h of pre-incubation. The best protection was reached with 3 h of pre-incubation, where the protection of ES-5 was even slightly more pronounced (although insignificantly) than that of DEX, but only in the lowest concentration. Also MK-15 showed some trend towards cardioprotection in the group without pre-incubation, but the trend was not significant. In other pre-incubation times and other concentrations, there was a lack of protection. The analogues of ADR-925 were essentially non-protective against DAU-induced toxicity (Figure 3B). JR-159 had no effect on the DAU-induced toxicity, whereas pre-incubations of NVCMs with KH-TA4 for 3 and 6 h significantly aggravated the toxicity of DAU.

Apart from DAU, a potential for cardioprotection was also determined against the model oxidative stress induced by $300 \mu\text{M}$ H_2O_2 , which induced comparable degree of LDH release as the $1.2 \mu\text{M}$ DAU. In contrast to DAU-induced toxicity, DEX did not protect myocytes against the H_2O_2 -induced injury at any concentration or pre-

incubation time (Figure 3C). Conversely, both MK-15 and ES-5 induced significant cardioprotection in the highest concentrations used (100 μ M) in 0 and 6 h of pre-incubation schedule. Moreover, after 6 h of pre-incubation, all the concentrations of MK-15 were able to protect cardiomyocytes against the H_2O_2 . The highest concentration of ES-5 was also protective in the 24 h pre-incubation schedule. Rather surprisingly, after 3 h of pre-incubation, both substances showed significant aggravation of H_2O_2 -induced toxicity in some concentrations (30 μ M of MK-15, 10 and 30 μ M of ES-5).

The analogues of ADR-925 also displayed some protection against H_2O_2 (Figure 3C). Both KH-TA4 and JR-159 (100 μ M) were effective without pre-incubation. After 3 h of pre-incubation, the protection was seen with all the three tested concentrations of KH-TA4, but surprisingly with no JR-159 concentration. The most pronounced decrease in toxicity was observed after 6 h of pre-incubation with 100 μ M KH-TA4. Moreover, in this schedule the protection was also observed with 10 and 30 μ M KH-TA4 and 10 μ M JR-159. Also after 24 h of pre-incubation, 100 μ M JR-159 displayed significant protection against H_2O_2 .

3.3. *IN VIVO* CARDIOTOXICITY AND CARDIOPROTECTION EXAMINATIONS

10-week DAU-treatment induced premature death in 2 out of 6 animals that both occurred by the end of the treatment period (Figure 4A). Marked heart dilation and pale myocardium were observed in both cases along with the significant pleural effusion and ascites found in necropsy suggested development of severe chronic ANT cardiotoxicity. Similar findings, although less pronounced were observed in animals surviving until the end of DAU-treatment. DEX co-treatment resulted in complete survival, and no signs of blood congestion or heart dilation were found during the autopsy. KH-TA4 co-treatment resulted in two early premature deaths soon after 4th or 5th drug co-administration. However, no signs of congestive heart failure or any other gross pathological findings were found during the necropsy which suggested that these deaths were not related to chronic ANT cardiotoxicity and heart failure development. In the later part of the study premature deaths were observed in animals co-treated

with KH-TA4 (n = 1), ES-5 (n = 2) and MK-15 (n = 1) (Figure 4A). The necropsy findings in these animals were similar to those observed in the DAU group. Only single animal co-treated with JR-159 survived until the end of experiment, but autopsy also revealed marked changes similar to the DAU group. Chronic DAU-treatment and also co-treatment with KH-TA4 and MK-15 prevented body weight gain, and significant difference was therefore found in comparison with the control group (Figure 4B). Body weight change was insignificant to the control group in the animals co-treated with DEX and ES-5.

10-week DAU-treatment induced marked drop in the LV systolic function (Figure 4C). This was particularly true for prematurely dying animals which showed the most severe changes (>50% reduction of the normal values) indicating severe global heart failure with dilation of heart chambers. In contrast, DEX co-treatment prevented the drop in the LV systolic function; the results were comparable to the control group. However, this was not the case of KH-TA4 and ES-5, where significant decline in LV systolic function similar to the DAU group was found in animals surviving until the later part of the study which together with the autopsy findings confirmed that the premature deaths were associated with heart failure. Hence, unlike DEX, KH-TA4 and ES-5 were clearly unable to offer any meaningful cardioprotection against ANT-cardiotoxicity. Although rather moderate decrease in systolic function was found with MK-15, it was not significantly different from either control or DAU group values. Hence, the systolic function examination together with autopsy findings in animals surviving until the end of the study may suggest certain protective potential of the compound. However, the single animal that died prematurely in this group also showed a drop of systolic function (by >25% of the normal values), and considering pronounced blood congestion from necropsy examination (hydrothorax 145 mL, ascites 45 mL and marked dilation of all heart chambers), the heart failure was the most likely explanation of the premature death. Hence, although MK-15 was the only compound which showed only insignificant change of systolic function as compared to controls and lower mortality than in the DAU group, its potential to prevent cardiac failure is clearly inferior to DEX. The single rabbit co-treated with JR-159 also showed

moderate to marked systolic dysfunction (FS = 26%), which again contrasted with excellent cardioprotection found in the DEX group.

Determination of cTnT in plasma showed marked increase in DAU-treated animals; while DEX co-treatment resulted into comparable values as in controls (Figure 4D). However, the co-treatment of animals with all the new compounds was unable to protect the hearts from release of this cardiospecific biomarker, and the values were comparable to the DAU group. The single animal co-treated with JR-159 showed very high (0.735 µg/L) concentration of the biomarker which also argues against any distinct cardioprotective potential of this compound. The 3 animals co-treated with KH-TA4, which prematurely died around the middle of the experiment (not included in the Figure 4D), were found have a low to moderate concentrations of the biomarkers by the time of death (0.028, 0.033 and 0.142 µg/L) which confirmed, that the deaths were not related to chronic ANT cardiotoxicity development.

3.4. INTERACTION WITH FE IN SOLUTION AND IN H9c2 CELLS

The ability of DEX and the novel analogues to chelate Fe ions was assessed fluorimetrically using the calcein assay.²⁸ The chelation properties were first determined in buffered solution, and typical result was obtained with experimental Fe chelator SIH²⁹ (100 µM), which increased the fluorescence of calcein in solution to almost five times over the control in ≈50 s (Figure 5A). Also in H9c2 cells, SIH increased the intracellular-trapped calcein fluorescence, although only to ≈120% of control (Figure 2B). In solution, 100 µM DEX did not change the calcein fluorescence. Furthermore, in cells a decrease in fluorescence was observed. The analogues of DEX (MK-15 and ES-5) were also not able to displace Fe from its calcein complex in solution. In cells, the DEX analogues had no effect on calcein fluorescence. Surprisingly, the analogues of ADR-925 (KH-TA4 and JR-159) slightly decreased the fluorescence of calcein in solution, whereas in cells they had no effect.

In addition to assessments of Fe chelation, we examined the abilities of DEX and its novel analogues to induce Fe release from H9c2 cells using an established method of

transferrin labeled with ^{59}Fe .^{27,30} As seen in Figure 5C, neither DEX, nor the novel analogues had any effect on the Fe mobilization from H9c2 cells, which contrasted with effective Fe release induced by the strong Fe chelator SIH used as a positive control.

3.5. INTERACTION OF STUDIED COMPOUNDS WITH TOP2

To assess the effects of DEX and the novel analogues on various TOP2 isoforms, first the inhibition properties were determined using recombinant human TOP2A and supercoiled kinetoplast DNA as a substrate. As seen in Figure 6A, 100 μM DEX inhibited its relaxation activity forming a series of topoisomers, which is consistent with the pattern of catalytic TOP2 inhibition. On the other hand, none of the novel analogues showed any inhibition activity towards this enzyme isoform (Figure 6A).

Furthermore, western blotting was used to determine TOP2B protein levels in NVCM cells. As seen in Figure 6B, 10 μM DEX induced time-dependent TOP2B depletion with significant change in protein content after 12 h, when the TOP2B protein was decreased to less than 50% of control values. After 6 h a slight but insignificant trend was observed. Surprisingly, after 3 h of incubation, minor insignificant increase of TOP2B protein content was observed. Contrary to DEX, 24 h incubation of NVCMs with any of the novel analogues in the same concentration (10 μM) did not lead to any significant change in TOP2B protein content, although with all the compounds a slight but insignificant increase could be observed (Figure 6C).

4. DISCUSSION

To date, numerous agents have been examined for protective potential against ANT-induced cardiotoxicity.^{8,31-33} Based on the traditional hypothesis that ANT-induced cardiotoxicity is primarily caused by intramyocardial oxidative stress, the most popular strategy involved the use of various antioxidants – either synthetic or isolated from various natural sources.³⁴ Indeed, many published studies reported beneficial effects of antioxidants. However, vast majority of these experiments involved acute *in vitro* or *in vivo* cardiotoxicity models, often employing supratherapeutic ANT doses with little clinical relevance.³⁵ Several antioxidants, such as N-acetyl-cysteine, coenzyme Q10, L-carnitine, vitamins E and C,³⁶ or the semisynthetic flavonoid 7-mono-hydroxyethylrutin, ³⁷ advanced to the stage of clinical trials, but they have all failed to induce cardioprotection against the chronic-type ANT cardiotoxicity in clinical practice.³⁶ Apart from ROS scavengers, related approach focused on Fe chelating agents. The rationale was to search for an alternative to ADR-925, the putatively active metabolite of DEX with Fe-chelating properties. Again, although promising data have been reported with some chelators (such as deferiprone–L1) using *in vitro* or acute *in vivo* models, negative or at best mixed results have been obtained when assayed using chronic and clinically-relevant animal models, which is contradictory to the classical "ROS and iron" hypothesis of ANT cardiotoxicity and DEX cardioprotection.³⁴

Hence, despite years of testing thousands potentially protective agents, DEX remains the only drug that has shown convincing and experimental model-independent protective potential, including several randomized, double-blind and placebo-controlled clinical trials.³¹ Ironically, DEX is not an outcome of any hypothesis-driven drug design; its racemate razoxane (ICRF-159) was originally synthesized as a potential anticancer drug, and their protective properties were discovered accidentally during its preclinical *in vivo* testing in a combination with DAU. In fact, the bis-dioxopiperazine compounds were studied mainly regarding their antiproliferative activity,^{38,39} and much less attention has been paid to their structure-activity relationships with respect to their cardioprotective properties.

Hence, in this study, two analogues of DEX and two analogues of ADR-925 were synthesized. Firstly, ES-5 (**3**), presents DEX analogue with modified linker between terminal piperazin-2,6-dione cycles. Its predicted ring-open metabolite could possess the Fe-chelating properties similarly to ADR-925. Structurally, ES-5 is a ring-closed derivative of chelator diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA). In the first step, cyclization of terminal carboxylic acids of DTPA in formamide was carried out. Surprisingly, in contrast to previously published observations,⁴⁰ central carboxyl remained untouched, and aminoacid **2** with intended terminal piperazin-2,6-dione cycles was isolated. However, this compound was found to be soluble only in water and partially in DMSO. This fact hindered the efforts for functionalization of central carboxyl via modern methods known from peptide chemistry. Only simple alkylation in DMSO led to the formation of target ethylester **3** in sufficient amount, accompanied with derivatives alkylated also on imide nitrogens, which had to be carefully separated using column chromatography.

The second DEX analogue, MK-15, was designed to have the same size and arrangement as DEX, but with the terminal amide instead of parent imide moieties. Thus MK-15 is bearing piperazin-2-ones instead of piperazin-2,6-diones terminal cycles. First, piperazin-2-one (**6**) was prepared using reaction of ethyl 2-bromoacetate with ethylenediamine in acetonitrile. Improved reaction protocol allowed obtaining sufficient amount of pure piperazin-2-one by simple work up and final recrystallization from acetone. Its reaction with 1,2-dibromopropane in DMF led to the formation of MK-15, which was purified by column chromatography.

Previously, the metabolites of DEX (ADR-925 and one ring-open intermediates) did not protect NVCMs from DOX toxicity, and this effect was attributed to the limited intake of hydrophylic metabolites by the cells.⁴¹ Hence, in the present study, two alkylamide analogues of ADR-925, namely JR-159 and KH-TA4, were designed to possess higher lipophilicity, which would facilitate their permeation through the biological membranes. Both ADR-925 analogues were prepared using the reaction of 1,2-diaminopropane with corresponding N-substituted 2-chloroacetamide in acetonitrile. These procedures led to the formation of a mixture of products, especially tri- and tetra-substituted 1,2-diaminopropane and also quaternary ammonium salts. In the

case of KH-TA4, product crystallized from the reaction mixture, and simple filtration and washing with water afforded the pure product. The purification of JR-159 turned to be more complex, because the product and the by-products were viscous liquids highly soluble in water and also polar organic solvents, and have nearly the same retention factors even on C-18 reverse phase. Several consecutive column chromatographies were therefore necessary to obtain the pure product.

The biological properties of the prepared substances were first examined using the HL-60 acute promyelocytic leukemia cell line. In contrast to DEX, which dose-dependently reduced the cellular proliferation ($IC_{50} \approx 25 \mu M$), all the four newly synthesized agents reduced the cellular proliferation only very moderately with IC_{50} values $>100 \mu M$. On the other hand, the agents did not display a trend towards reduction of the antiproliferative effects of DAU, which is obviously a pre-requisite for any potential cardioprotective agent.

The cardioprotective properties were assayed using *in vitro* model of isolated NVCMs as well as an *in vivo* model of chronic DAU-induced heart failure in rabbits, which was previously approved as consistent and reliable, and was validated with DEX as model cardioprotectant.¹⁸⁻²⁰ The efficiency of DEX in cardioprotection has been demonstrated and well confirmed by many clinical studies.⁴² Nevertheless, detailed *in vitro* analyses of DEX cardioprotection and particularly those focused on its molecular mechanisms are still rather limited. Hasinoff *et al.* achieved protection from cardiomyocyte mitochondrial membrane potential loss induced by rather low doses of DOX by the preincubation of NVCMs with $90 \mu M$ DEX for 3 h, following 3 h of incubation with DOX ($0.15-0.5 \mu M$) and subsequent 48 h of DOX-free incubation.⁴³ Based on this study, and using the similar incubation protocol, we found that DEX protected NVCMs against DAU- and DOX-induced LDH leakage to the culture medium within a wide range of DEX concentrations ($10-1000 \mu M$) (unpublished data). However, another study by the Hasinoff group demonstrated that DEX may induce a preincubation time- and concentration-dependent antagonism of DAU or DOX growth inhibition of chinese hamster ovary cells, which is a non-cancerous, but continuously proliferating cell line.⁴⁴ Hence, in this study, we performed a series of experiments with variable times of DEX preincubation. DEX was able to protect NVCMs from toxicity

induced by 3 h incubation with 1.2 μ M DAU followed by 48 h DAU-free period irrespective on the preincubation time varying from 0 to 24 h. Also *in vivo*, DEX was able to completely prevent both the overall mortality and the changes in the cardio-specific parameters of chronic DAU-induced toxicity-both from the functional point of view (LVFS) as well the plasma concentration of cTnT-highly sensitive and specific biomarker of drug-induced cardiotoxicity.^{45,46}

Compared to the DEX-afforded significant protection from DAU-induced cardiotoxicity, none of the novel substances examined in the present study provided the same degree of protection, irrespectively on the time and concentration used *in vitro* as well as during the pilot *in vivo* assessments. Although MK-15 did not protect the isolated cardiomyocytes, *in vivo* it showed some trend for cardioprotection, as the overall survival was 80% compared to 60% in the DAU-only treated group of animals. On the other hand, there still was observed some toxicity, as cardiac contractility and also cTnT released to the plasma was significantly higher than in control or DAU + DEX group. ES-5 showed cardioprotection *in vitro* comparable to DEX, but only in its 10 μ M concentration. Moreover, the cardioprotection was lost after 24 h of preincubation. *In vivo*, ES-5 rather aggravated the toxicity of DAU causing higher overall mortality. With respect to the *in vitro* data, where ES-5 displayed some protection only in lower concentrations, this may have been caused by higher than optimal dose of ES-5.

While JR-159 had generally no effect *in vitro*, KH-TA4 aggravated the DAU-induced LDH release from cardiomyocytes in higher concentrations after 3 and 6 h of preincubation, which may reflect slower penetration of hydrophilic KH-TA4 into the cells compared to DEX. Notably, KH-TA4 alone showed some significant toxicity towards NVCMs, although this was rather minor (3%), compared to almost 30% aggravation of DAU-induced toxicity. This substantial aggravation was also demonstrated *in vivo*, where rabbits pretreated with KH-TA4 prior every dose of DAU exhibited premature deaths as soon as after 4 weeks of treatment.

Assuming the still prevailing hypothesis of oxidative stress as a cause of ANT-induced cardiotoxicity, we also examined the effects of DEX and the novel agents on the *in vitro* model of oxidative damage to cardiomyocytes induced by H₂O₂. The concentration of

H₂O₂ was chosen to cause comparable LDH release as DAU. Contrary to the protection from DAU-induced damage, DEX was not able to protect NVCMs from H₂O₂-induced toxicity after any preincubation time. On the other hand, KH-TA4 showed protection against H₂O₂-induced toxicity after 3 and 6 h of pre-incubation, *i.e.* at the same time points as it aggravated the toxicity of DAU. This suggests that the toxicity of DAU towards cardiomyocytes is mediated by different mechanism(s) than the oxidative damage by H₂O₂.

To assess what properties might be responsible for effective cardioprotection (or lack of it), first the Fe chelating potential of the newly synthesized agents was examined in buffered solution and also in H9c2 rat embryonic cardiomyoblast-derived cell line, using the measurements of calcein fluorescence intensity. The experimental strong lipophilic Fe chelator SIH was repeatedly documented to chelate free Fe both in solution as well as in cells, and to displace Fe from its complex with calcein resulting in dequenching of its fluorescence.^{29,47} In our study, fast increase in calcein fluorescence could be observed upon addition of 100 μM SIH to the calcein-Fe complex (4.5-fold increase over control within ≈50 s). In contrast, neither DEX, nor any of the four newly synthesized agents induced change in calcein fluorescence intensity. SIH also rapidly entered H9c2 cells, and replaced Fe from its intracellular complex with calcein. But in contrast to the study of Hassinof *et al.*, who documented that not only ADR-925, but also DEX replaced Fe from its calcein complex in solution,⁴¹ we did not observe such effect. Moreover, in cells, DEX rather caused drop in calcein fluorescence, which could be possibly related to some interaction with the calcein molecule. Like DEX, the four new analogues did not increase calcein fluorescence either in solution or within the H9c2 cells. Finally, we examined whether DEX and its four novel analogues are able to induce Fe mobilization from H9c2 cells previously loaded with ⁵⁹Fe-transferrin. However, in contrast to SIH, which again served as a positive control, none of the studied substances (including DEX) was able to induce significant Fe release from H9c2 cells.

Previously, Hermann *et al.* evaluated 19 bis-dioxopiperazine agents on acute model of ANT cardiotoxicity in hamsters (25 mg/kg of DOX in a single dose) and then the same group of authors used a chronic cardiotoxicity model in spontaneously hypertensive

rats (1 mg/kg of DOX, i.v., weekly for 12 weeks), and evaluated some analogues used in the previous study as well as several new agents. Apart from protection against ANT cardiotoxicity, the authors studied the rates of hydrolysis of these agents to form their individual Fe-chelating metabolites and the ability of these metabolites to bind and displace Fe from its complex with DOX. In the first study, they concluded that only minor changes can be made to the DEX structure without activity loss.⁴⁸ Also, in the second study they found that Fe displacement rates do not correlate with cardioprotection.⁴⁹ None of the assayed DEX derivatives displayed better cardioprotective properties than DEX. Some cardioprotection and decreased mortality were found in a demethylated derivative of DEX (ICRF-154) and bis(N-morpholinomethyl) derivative (ADR-559), whereas no protection was found with ADR-925 and an ethyl analogue of DEX (ICRF-192). On the other hand, some protective analogues were discovered to be TOP2 catalytic inhibitors. These studies were recently amended by the work of Martin *et al.* comparing cardioprotection by DEX and TOP2-inactive bis-dioxopiperazine analogue ICRF-161. Both compounds were hydrolysable and comparable in Fe-displacement, also both of them protected NVCMs from toxicity caused by 1.8 μ M DOX continuous exposure for 24-72 h, but only DEX protected spontaneously hypertensive rats from chronic ANT toxicity (1 mg/kg i.v. weekly for 12 weeks).⁵⁰

The bis-dioxopiperazine derivatives have been shown to possess the ability to inhibit TOP2 without cleavable complex formation, thus without inducing double stranded breaks.⁵¹ There are two distinct TOP2 isoforms in mammalian cells.⁵² TOP2A is predominantly expressed in proliferating and undifferentiated cells. On the contrary, TOP2B is expressed relatively steadily throughout the cell cycle, and is the major TOP2 form in quiescent cells. Whereas TOP2A is implicated predominantly in DNA replication, TOP2B has important roles during the regulation of gene transcription.^{53,54} Hence, in the present study, we studied DEX and the novel analogues regarding their possible interactions with the two TOP2 isoforms. While DEX inhibited the catalytic activity of recombinant TOP2A, none of the novel analogues showed such activity. This correlates well with the marked decrease of antiproliferative action observed in this

study in HL-60 cells, as this DEX action has been attributed to catalytic inhibition of TOP2A isoform.

DEX was recently shown to cause depletion of TOP2B in H9c2 cells that was both concentration- and time- dependent, and this effect was proposed as possible alternative mechanism of DEX protection from ANT cardiotoxicity.⁹ In addition, recent study reported that deletion of TOP2B isoform (*Top2b* gene) protected cardiomyocytes from DNA double-strand breaks and transcriptome changes induced by acute *in vivo* DOX treatment with subsequent prevention of defective mitochondrial biogenesis and ROS formation. Furthermore, the cardiomyocyte-specific deletion of *Top2b* gene protected mice from the development of progressive heart failure induced by repeated DOX treatment, suggesting that DOX-induced cardiotoxicity is primarily mediated by cardiomyocyte TOP2B.¹⁰ In the present study, we proved the time-dependent depletion of TOP2B protein in NVCM cells by 10 μ M DEX. Although after 3 h of incubation with DEX there was a slight trend towards an increase, significant decrease of TOP2B protein was seen after 12 and 24 h. As in the case of the catalytic inhibition of TOP2A, the novel analogues did not deplete TOP2B protein in cardiomyocytes. Hence, the lack of interference with TOP2 is the most likely reason for limited cardioprotective efficiency of the four DEX analogues examined in this study.

In conclusion, ANTs remain important components of numerous chemotherapeutic protocols of both hematological malignancies as well as solid tumors, but the risk of cardiotoxicity continue to hamper their clinical usefulness. The ability to rationally design effective cardioprotective agents depends on our understanding of the molecular basis of the ANT cardiotoxicity. Recent evidence suggests that future strategies should focus on inhibition or depletion of TOP2 and its individual isoforms, rather than on Fe chelating or antioxidant properties.

FUNDING SOURCES

This work was supported by the grants from the Czech Science Foundation (13-15008S) and the Czech Republic Education for Competitiveness Operational Program (CZ.1.07/2.3.00/30.0022).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank to Mrs. Alena Pakostová and Mrs. Klára Lindrová for technical assistance.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- (1) Brunton, L., Chabner, B., and Knollman, B. (2010) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Twelfth Edition, p 1808, McGraw-Hill Professional.
- (2) Zunino, F., and Capranico, G. (1990) DNA topoisomerase II as the primary target of anti-tumor anthracyclines, *Anti-Cancer Drug Design* 5, 307–317.
- (3) Ewer, M. S., and Yeh, E. T. H. (2006) Cancer and the Heart, p 395, BC Decker, U.S.A., Hamilton.
- (4) Keizer, H. G., Pinedo, H. M., Schuurhuis, G. J., and Joenje, H. (1990) Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity., *Pharmacol. Ther.* 47, 219–31.
- (5) Yeh, E. T. H., and Bickford, C. L. (2009) Cardiovascular complications of cancer therapy: incidence, pathogenesis, diagnosis, and management., *J. Am. Coll. Cardiol.* 53, 2231–47.
- (6) Fulbright, J. M., Huh, W., Anderson, P., and Chandra, J. (2010) Can anthracycline therapy for pediatric malignancies be less cardiotoxic?, *Curr Oncol Rep* 12, 411–9.
- (7) Kiyomiya, K., Matsuo, S., and Kurebe, M. (2001) Differences in intracellular sites of action of Adriamycin in neoplastic and normal differentiated cells., *Cancer Chemother. Pharmacol.* 47, 51–6.
- (8) Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., and Gianni, L. (2004) Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity., *Pharmacol. Rev.* 56, 185–229.
- (9) Lyu, Y. L., Kerrigan, J. E., Lin, C.-P., Azarova, A. M., Tsai, Y.-C., Ban, Y., and Liu, L. F. (2007) Topoisomerase IIbeta mediated DNA double-strand breaks: implications in doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dexrazoxane., *Cancer Res.* 67, 8839–46.
- (10) Zhang, S., Liu, X., Bawa-Khalfe, T., Lu, L.-S., Lyu, Y. L., Liu, L. F., and Yeh, E. T. H. (2012) Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity., *Nat. Med.* 18, 1639–42.
- (11) Speyer, J. L., Green, M. D., Zeleniuch-Jacquotte, A., Wernz, J. C., Rey, M., Sanger, J., Kramer, E., Ferrans, V., Hochster, H. S., and Meyers, M. (1992) ICRF-187 permits longer treatment with doxorubicin in women with breast cancer., *J. Clin. Oncol.* 10, 117–27.
- (12) Rhomberg, W., and Hellmann, K. (2011) Razoxane and Dexrazoxane - Two Multifunctional Agents, 1st ed. (Hellmann, K., and Rhomberg, W., Eds.), p 243, Springer Netherlands, Dordrecht.
- (13) Hochster, H. S., Liebes, L., Wadler, S., Oratz, R., Wernz, J. C., Meyers, M., Green, M. D., Blum, R. H., and Speyer, J. L. (1992) Pharmacokinetics of the cardioprotector

ADR-529 (ICRF-187) in escalating doses combined with fixed-dose doxorubicin., *J. Natl. Cancer Inst.* 84, 1725–30.

(14) Tebbi, C. K., London, W. B., Friedman, D., Villaluna, D., De Alarcon, P. A., Constone, L. S., Mendenhall, N. P., Sposto, R., Chauvenet, A., and Schwartz, C. L. (2007) Dexrazoxane-associated risk for acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome and other secondary malignancies in pediatric Hodgkin's disease., *J. Clin. Oncol.* 25, 493–500.

(15) Swain, S. M., Whaley, F. S., Gerber, M. C., Weisberg, S., York, M., Spicer, D., Jones, S. E., Wadler, S., Desai, A., Vogel, C., Speyer, J., Mittelman, A., Reddy, S., Pendergrass, K., Velez-Garcia, E., Ewer, M. S., Bianchini, J. R., and Gams, R. A. (1997) Cardioprotection with dexrazoxane for doxorubicin-containing therapy in advanced breast cancer., *J. Clin. Oncol.* 15, 1318–32.

(16) Swain, S. M., and Vici, P. (2004) The current and future role of dexrazoxane as a cardioprotectant in anthracycline treatment: expert panel review., *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, Springer 130, 1–7.

(17) Center for Drug Evaluation and Research. (2011) Drug Safety and Availability - FDA Statement on Dexrazoxane, Center for Drug Evaluation and Research.

(18) Gersl, V., and Hrdina, R. (1994) Noninvasive polygraphic cardiac changes in daunorubicin-induced cardiomyopathy in rabbits., *Sborník vědeckých prací Lékařské fakulty Karlovy university v Hradci Králové* 37, 49–55.

(19) Šimůnek, T., Klímová, I., Kaplanová, J., Mazurová, Y., Adamcová, M., Štěřba, M., Hrdina, R., and Geršl, V. (2004) Rabbit model for in vivo study of anthracycline-induced heart failure and for the evaluation of protective agents., *European journal of heart failure* 6, 377–87.

(20) Popelová, O., Štěřba, M., Hašková, P., Šimůnek, T., Hroch, M., Gunčová, I., Nachtigal, P., Adamcová, M., Geršl, V., and Mazurová, Y. (2009) Dexrazoxane-afforded protection against chronic anthracycline cardiotoxicity in vivo: effective rescue of cardiomyocytes from apoptotic cell death., *Br. J. Cancer* 101, 792–802.

(21) Gallagher, R., Collins, S., Trujillo, J., McCredie, K., Ahearn, M., Tsai, S., Metzgar, R., Aulakh, G., Ting, R., Ruscetti, F., and Gallo, R. (1979) Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia., *Blood* 54, 713–33.

(22) Kimes, B. W., and Brandt, B. L. (1976) Properties of a clonal muscle cell line from rat heart., *Exp. Cell Res.* 98, 367–81.

(23) Štěřba, M., Popelová, O., Šimůnek, T., Mazurová, Y., Potáčková, A., Adamcová, M., Kaiserová, H., Ponka, P., and Geršl, V. (2006) Cardioprotective effects of a novel iron chelator, pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone, in the rabbit model of daunorubicin-induced cardiotoxicity., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319, 1336–47.

- (24) Glickstein, H., El, R. Ben, Link, G., Breuer, W., Konijn, A. M., Hershko, C., Nick, H., and Cabantchik, Z. I. (2006) Action of chelators in iron-loaded cardiac cells: Accessibility to intracellular labile iron and functional consequences., *Blood* 108, 3195–203.
- (25) Richardson, D. R., Tran, E. H., and Ponka, P. (1995) The potential of iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class as effective antiproliferative agents., *Blood* 86, 4295–306.
- (26) Richardson, D. R., and Milnes, K. (1997) The potential of iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class as effective antiproliferative agents II: the mechanism of action of ligands derived from salicylaldehyde benzoyl hydrazone and 2-hydroxy-1-naphthylaldehyde benzoyl hydrazone., *Blood* 89, 3025–38.
- (27) Baker, E., Richardson, D., Gross, S., and Ponka, P. (1992) Evaluation of the iron chelation potential of hydrazones of pyridoxal, salicylaldehyde and 2-hydroxy-1-naphthylaldehyde using the hepatocyte in culture., *Hepatology* 15, 492–501.
- (28) Espósito, B. P., Epsztejn, S., Breuer, W., and Cabantchik, Z. I. (2002) A review of fluorescence methods for assessing labile iron in cells and biological fluids., *Anal. Biochem.* 304, 1–18.
- (29) Bendova, P., Macková, E., Hašková, P., Vávrová, A., Jirkovský, E., Štěřba, M., Popelová, O., Kalinowski, D. S., Kovaříková, P., Vávrová, K., Richardson, D. R., and Šimůnek, T. (2010) Comparison of clinically used and experimental iron chelators for protection against oxidative stress-induced cellular injury., *Chem. Res. Toxicol.* 23, 1105–14.
- (30) Richardson, D. R., Tran, E. H., and Ponka, P. (1995) The potential of iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class as effective antiproliferative agents., *Blood* 86, 4295–306.
- (31) Wouters, K. A., Kremer, L. C. M., Miller, T. L., Herman, E. H., and Lipshultz, S. E. (2005) Protecting against anthracycline-induced myocardial damage: a review of the most promising strategies., *Br. J. Haematol.* 131, 561–78.
- (32) Bast, A., Haenen, G. R. M. M., Bruynzeel, A. M. E., and Van der Vijgh, W. J. F. (2007) Protection by flavonoids against anthracycline cardiotoxicity: from chemistry to clinical trials., *Cardiovasc. Toxicol.* 7, 154–9.
- (33) Kaiserová, H., Šimůnek, T., Štěřba, M., Den Hartog, G. J. M., Schröterová, L., Popelová, O., Geršl, V., Kvasnicková, E., and Bast, A. (2007) New iron chelators in anthracycline-induced cardiotoxicity., *Cardiovasc. Toxicol.* 7, 145–50.
- (34) Šimůnek, T., Štěřba, M., Popelová, O., Adamcová, M., Hrdina, R., and Geršl, V. (2009) Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron., *Pharmacol Rep* 61, 154–71.
- (35) Gianni, L., Herman, E. H., Lipshultz, S. E., Minotti, G., Sarvazyan, N., and Sawyer, D. B. (2008) Anthracycline cardiotoxicity: from bench to bedside., *J. Clin. Oncol.* 26, 3777–84.

- (36) Van Dalen, E. C., Caron, H. N., Dickinson, H. O., and Kremer, L. C. (2011) Cardioprotective interventions for cancer patients receiving anthracyclines., *Cochrane Database Syst Rev* CD003917.
- (37) Bruynzeel, A. M. E., Niessen, H. W. M., Bronzwaer, J. G. F., Van der Hoeven, J. J. M., Berkhof, J., Bast, A., Van der Vijgh, W. J. F., and Van Groeningen, C. J. (2007) The effect of monohydroxyethylrutoside on doxorubicin-induced cardiotoxicity in patients treated for metastatic cancer in a phase II study., *Br. J. Cancer* 97, 1084–9.
- (38) Creighton, A. M., Hellmann, K., and Whitecross, S. (1969) Antitumour activity in a series of bisdiketopiperazines., *Nature* 222, 384–5.
- (39) Hasinoff, B. B., Kuschak, T. I., Yalowich, J. C., and Creighton, A. M. (1995) A QSAR study comparing the cytotoxicity and DNA topoisomerase II inhibitory effects of bisdioxopiperazine analogs of ICRF-187 (dexrazoxane)., *Biochem. Pharmacol.* 50, 953–8.
- (40) Geigy, J. R. (1962) Manufacture of new poly-n-diacetic acid imides.
- (41) Hasinoff, B. B., Schroeder, P. E., and Patel, D. (2003) The metabolites of the cardioprotective drug dexrazoxane do not protect myocytes from doxorubicin-induced cytotoxicity., *Mol. Pharmacol.* 64, 670–8.
- (42) Van Dalen, E. C., Caron, H. N., and Kremer, L. C. M. (2007) Prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity in children: the evidence., *Eur. J. Cancer* 43, 1134–40.
- (43) Hasinoff, B. B., Schnabl, K. L., Marusak, R. A., Patel, D., and Huebner, E. (2003) Dexrazoxane (ICRF-187) protects cardiac myocytes against doxorubicin by preventing damage to mitochondria., *Cardiovasc. Toxicol.* 3, 89–99.
- (44) Hasinoff, B. B., Yalowich, J. C., Ling, Y., and Buss, J. L. (1996) The effect of dexrazoxane (ICRF-187) on doxorubicin- and daunorubicin-mediated growth inhibition of Chinese hamster ovary cells., *Anticancer Drugs* 7, 558–67.
- (45) Adamcová, M., Geršl, V., Hrdina, R., Melka, M., Mazurová, Y., Vávrová, J., Palicka, V., and Kokstein, Z. (1999) Cardiac troponin T as a marker of myocardial damage caused by antineoplastic drugs in rabbits., *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 125, 268–74.
- (46) Adamcová, M., Šimůnek, T., Kaiserová, H., Popelová, O., Štěrbá, M., Potáčková, A., Vávrová, J., Maláková, J., and Geršl, V. (2007) In vitro and in vivo examination of cardiac troponins as biochemical markers of drug-induced cardiotoxicity., *Toxicology* 237, 218–28.
- (47) Hrušková, K., Kovaříková, P., Bendova, P., Hašková, P., Macková, E., Stariat, J., Vávrová, A., Vávrová, K., and Šimůnek, T. (2011) Synthesis and initial in vitro evaluations of novel antioxidant aroylhydrazone iron chelators with increased stability against plasma hydrolysis., *Chem. Res. Toxicol.* 24, 290–302.
- (48) Herman, E. H., el-Hage, A. N., Creighton, A. M., Witiak, D. T., and Ferrans, V. J. (1985) Comparison of the protective effect of ICRF-187 and structurally related

analogues against acute daunorubicin toxicity in Syrian golden hamsters., *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **48**, 39–55.

(49) Herman, E. H., Zhang, J., Hasinoff, B. B., Chadwick, D. P., Clark, J. R., and Ferrans, V. J. (1997) Comparison of the protective effects against chronic doxorubicin cardiotoxicity and the rates of iron (III) displacement reactions of ICRF-187 and other bisdiketopiperazines., *Cancer Chemother. Pharmacol.* **40**, 400–8.

(50) Martin, E., Thougard, A. V., Grauslund, M., Jensen, P. B., Bjorkling, F., Hasinoff, B. B., Tjørnelund, J., Sehested, M., and Jensen, L. H. (2009) Evaluation of the topoisomerase II-inactive bisdioxopiperazine ICRF-161 as a protectant against doxorubicin-induced cardiomyopathy., *Toxicology* **255**, 72–9.

(51) Tanabe, K., Ikegami, Y., Ishida, R., and Andoh, T. (1991) Inhibition of topoisomerase II by antitumor agents bis(2,6-dioxopiperazine) derivatives., *Cancer Res.* **51**, 4903–8.

(52) Drake, F. H., Zimmerman, J. P., McCabe, F. L., Bartus, H. F., Per, S. R., Sullivan, D. M., Ross, W. E., Mattern, M. R., Johnson, R. K., and Crooke, S. T. (1987) Purification of topoisomerase II from amsacrine-resistant P388 leukemia cells. Evidence for two forms of the enzyme., *J. Biol. Chem.* **262**, 16739–47.

(53) Austin, C. A., and Marsh, K. L. (1998) Eukaryotic DNA topoisomerase II beta., *Bioessays* **20**, 215–26.

(54) Vávrová, A., and Šimůnek, T. (2012) DNA topoisomerase IIβ: a player in regulation of gene expression and cell differentiation., *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**, 834–7.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 Chemical structures of dexrazoxane (DEX), its putatively active metabolite ADR-925 and four newly synthesized analogues examined in this study: MK-15, ES-5, KH-TA4 and JR-159.

Figure 2 Syntheses of new analogues of dexrazoxane (DEX) and its metabolite ADR-925 as described in Materials and methods section: Ethyl-2-{bis[2-(3,5-dioxopiperazin-1-yl)ethyl]amino}acetate (3-ES-5**); 4,4'-(Propane-1,2-diyl)bis(piperazin-2-one) (**7-MK-15**); *N,N,N',N'*-tetrakis(*N,N*-dimethylcarbamoylmethyl)-1,2-diaminopropane (**10-JR-159**); *N,N,N',N'*-tetrakis(*N*-butylcarbamoylmethyl)-1,2-diaminopropane (**12-KH-TA4**)**

Figure 3 Toxicities of dexrazoxane (DEX), MK-15, ES-5, KH-TA4 and JR-159 and their effects on daunorubicin (DAU)- and hydrogen peroxide (H₂O₂)- induced toxicity on the neonatal ventricular rat cardiomyocytes (NVCM). NVCM cells were incubated with DEX, MK-15, ES-5, KH-TA4 and JR-159 for 48 h (A), or the cells were pre-incubated with these substances for 0, 3, 6 and 24 h, respectively, and then incubated with either DAU for 3 h following 48 h of DAU-free period (B) or H₂O₂ for 48 h (C). The toxicity was assessed by the lactate dehydrogenase (LDH) leakage to the culture medium; data are presented as mean ± SD of more than three independent experiments. Statistical significance: One-way ANOVA, Dunnet's post-hoc test, P ≤ 0.05; c—compared to control, n.s.—non-significant compared to control; *—compared to DAU/H₂O₂.

Figure 4 *In vivo* cardiotoxicity assessments. General toxicity was determined as animal survival (A) or body weight change (B); cardiac function was assessed by echocardiography as left ventricular fraction shortening (LV FS) (C), and the concentration of cardiac troponin T in plasma (D) was determined at the end of the

treatment period as described in Materials and methods. The data are presented as mean \pm SD. Statistical significance: unpaired two-tailed *t* test (Mann-Whitney); $p \leq 0.05$; c–compared to control, d–compared to DAU.

Figure 5 Iron (Fe) chelation properties measured as the rate of Fe displacement from the Fe-calcein complex in solution (A) and in H9c2 cells (B) and ^{59}Fe mobilization from H9c2 cells (C). The change of calcein fluorescence was monitored in solution after the addition of studied substance (100 μM) to the Fe-calcein complex (A). The change of fluorescence of the intracellular-trapped calcein in the H9c2 cells loaded with 100 μM ferric-ammonium citrate was assessed after adding the studied substances (100 μM) as described in Materials and methods section. The experimental Fe chelator SIH was used as a positive control. The representative of three measurements or mean \pm SD of three independent measurements is presented. Statistical significance: One-way ANOVA Dunnet's post-hoc test, $P \leq 0.05$; c–compared to control.

Figure 6 The effects of examined agents, dexrazoxane (DEX), MK-15, ES-5, KH-TA4 and JR-159 on the topoisomerase II alpha (TOP2A) activity (A) and its beta isoform (TOP2B) protein content in neonatal rat ventricular cardiomyocytes (B, C) . A) TOP2A activity was measured by the enzymatic assay using human recombinant TOP2A and supercoiled kinetoplast DNA as the substrate. The representative of three independent measurements is presented. B) NVCM cells were incubated with 10 μM DEX for 0, 3, 6, 12 and 24 h, and the amount of TOP2B protein was assessed by western-blotting as described in Materials and methods. C) NVCM cells were incubated for 24 h with 10 μM DEX, MK-15, ES-5, KH-TA4 and JR-159, and the amount of TOP2B protein was assessed by western-blotting as described in Materials and methods. The data from three independent experiments are presented as mean \pm SD; statistical significance: One-way ANOVA Dunnet's post-hoc test, $P \leq 0.05$; c–compared to control, n.s.–non-significant compared to control.

Figure 1

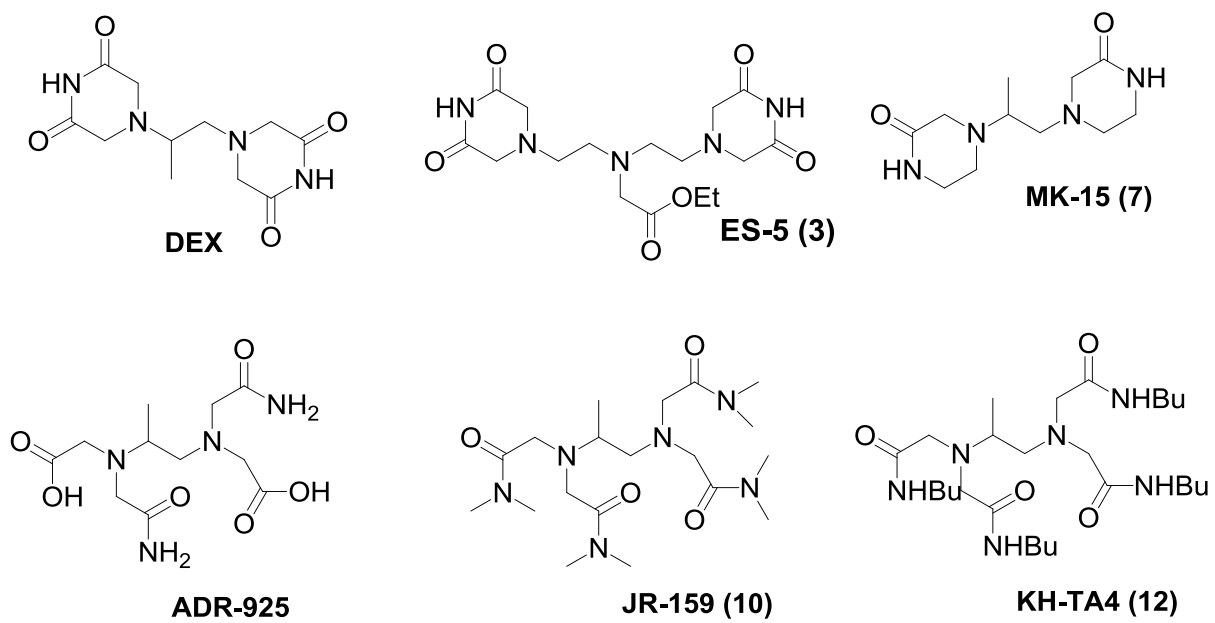


Figure 2

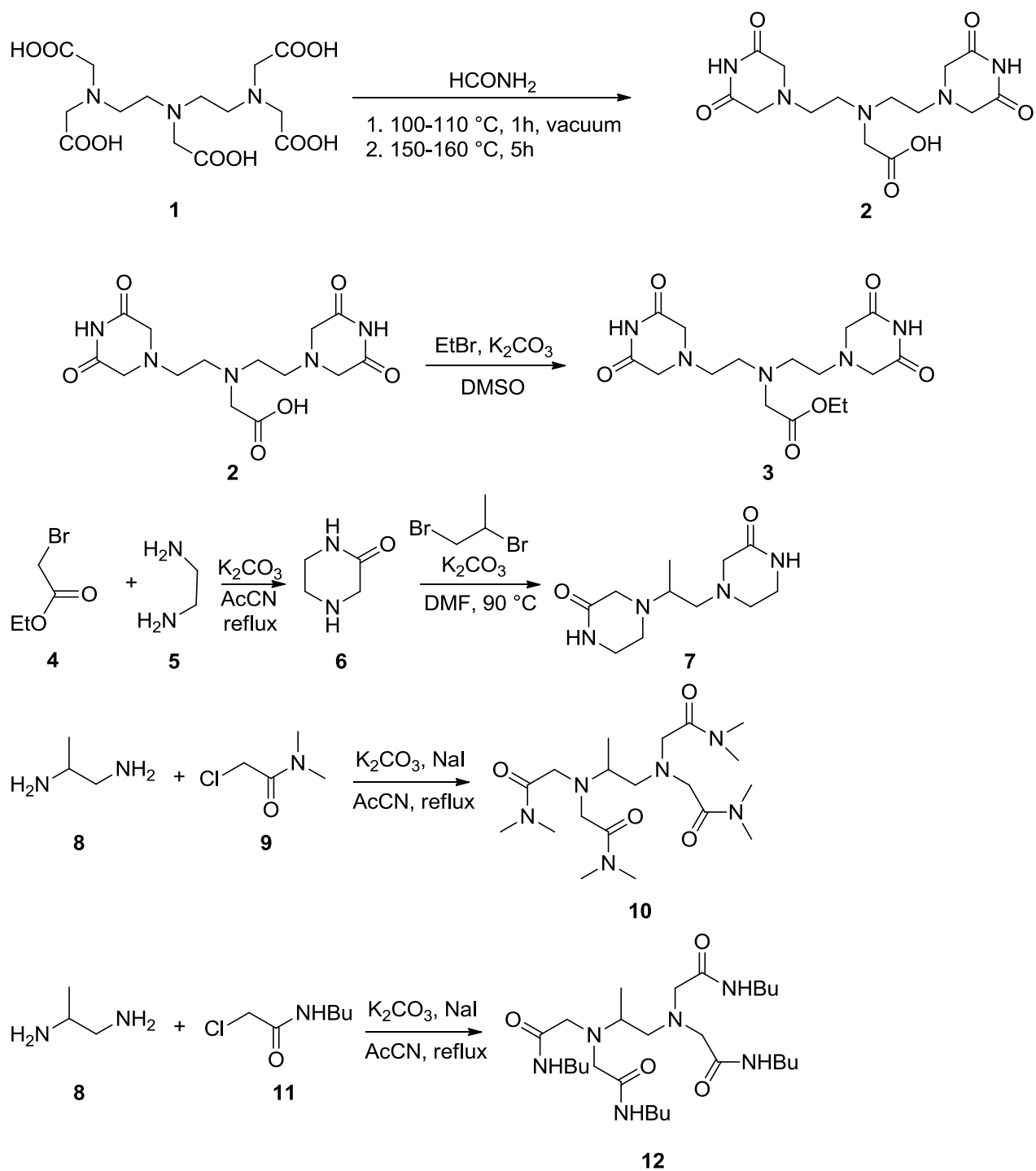


Figure 4

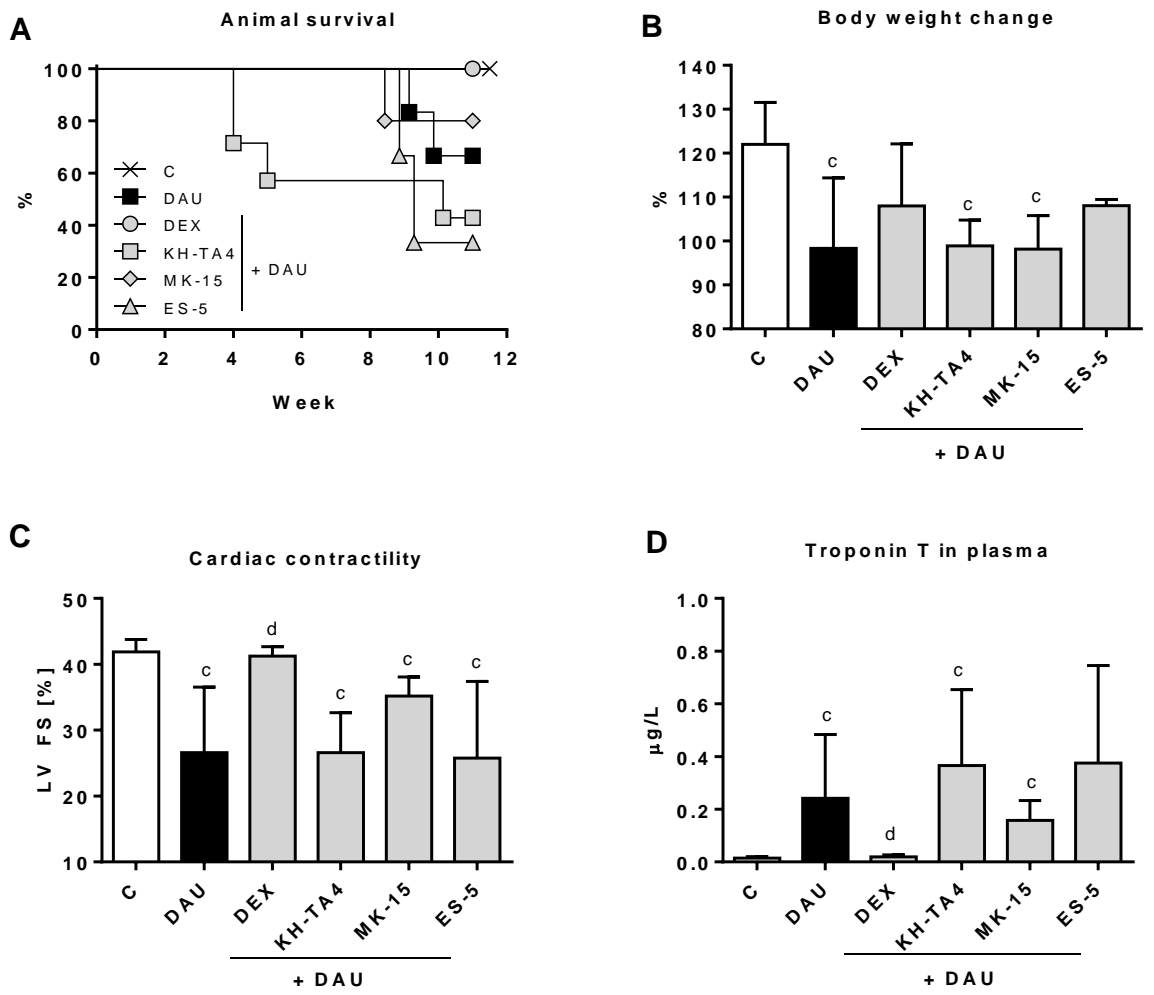


Figure 5

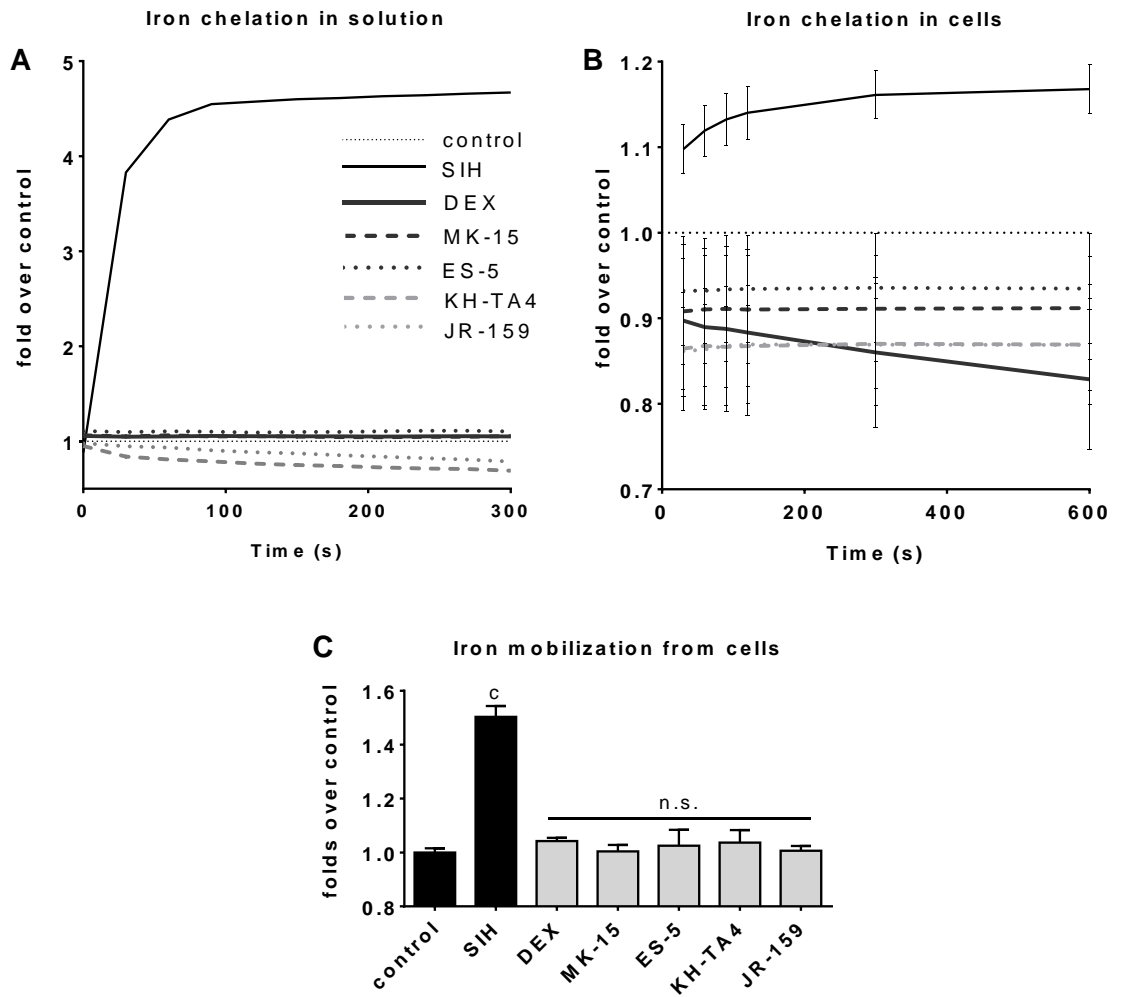


Figure 6

