

Prof. MUDr. Stanislav Mičuda, PhD.

Předseda komise pro obhajoby dizertačních prací

v doktorském studijním programu „Lékařská farmakologie“ - garant studijního programu

Přednosta Ústavu farmakologie, Lékařské fakulty v Hradci Králové

Univerzita Karlova

Šimkova 870, 50003 Hradec Králové

Věc: „posudek na doktorskou dizertační práci“

Vážený pane profesore,

s potěšením a velkým zájmem jsem vypracoval posudek na dizertační práci s názvem **„Antracyklinová kardiotoxicita a studium nových farmakologických kardioprotektiv“**.

A. Úvod – aktuálnost řešeného tématu a hodnocení formální formy dizertační práce.

Dizertační práce se zabývá různorodými aspekty antracyklinové (ANT) kardiotoxicity a možnostmi ochrany proti různým formám ANT-indukované kardiotoxicity. Jedná se o mimořádně důležité téma, neboť objev protinádorového účinku ANT před cca 70 lety byl významným milníkem v onkologické léčbě a ANT zůstávají základním kamenem léčby celé řady malignit i v současné době a jistě ještě další významné časové období budou. Avšak zejména tzv. „chronické formy“ ANT kardiotoxicity, které jsou do značné míry ireverzibilní, představují významný dlouhodobý problém, neboť z dlouhodobého hlediska přispívají k rozvoji tzv. „chemoterapií-indukované formy chronického srdečního selhání (CHSS)“. V současné době je odhadováno, že v USA je 500 000 a ve státech Evropské Unie 650 000 pediatrických pacientů, kteří podstoupili onkologickou léčbu obsahující ANT a vzhledem k faktu, že je odhadováno, že až u 10% z nich může ve věku 40 let vyvinout právě tu formu chemoterapií-indukovaného CHSS, tak je to závažný medicínský problém, který bude pro systém zdravotnické péče těžko zvládnutelný. A i z těchto důvodů studie, které přispívají k pochopení všech patofyziologických aspektů ANT-indukované kardiotoxicity a možnostem nových kardioprotektivních přístupů proti tomuto fenoménu jsou extrémně cenné.

Z formálního hlediska se jedná o práci, která je komentovaným souborem tří původních prací publikovaných v časopise Clinical Science (2x) a v časopise Circulation Heart Failure (1x). Práce je opatřena velmi hezkým úvodem do problematiky a jednotlivé práce jsou jasně okomentovány, včetně jednoznačného vymezení podílu autorky na těchto studiích. Následně jsou výsledky souhrnně diskutovány a jsou učiněny závěry, které vycházejí z těchto originálních studií. Celá práce je napsána velmi dobrým jazykem a s jedinou výjimkou (překlep na straně 21) jsem nenašel žádnou další formální chybu. Práce je navíc opatřena hezkými obrázky, které vysvětlují příslušné hypotézy. Již po přečtení úvodu této dizertační práce, lze jednoznačně dospět k závěru, že **autorka má schopnosti samostatné vědecké práce s literaturou a definováním vědeckých hypotéz, což je nezbytným předpokladem pro „udělení titulu Ph.D.“**

B. Zhodnocení výsledků vlastní dizertační práce.

Jak již bylo uvedeno výše, vlastní práce se skládá ze tří velmi komplexních studií, které tvoří logický celek. Jedná se o tyto studie.

1) Studie k zhodnocení kardiotoxicity spojené s léčbou pomocí proteazomových inhibitorů (PI) za podmínek izolované léčby a léčby kombinované s ANT.

Tato studie byla publikována v časopise *Clinical Science*, 133: 1827-1844, 2019. PI představují v současnosti velmi moderní biologickou léčbu u pacientů s hematologickými malignitami a jejich kardiotoxicita a zejména potenciální rozvoj CHSS je stále předmětem kontroverzí, ale jsou vnímány jako potenciálně kardiotoxické látky. Avšak vzhledem k faktu, že se čím dál tím více PI rovněž kombinují v léčbě hematologických malignit s ANT, tak je velká obava, že právě kombinace PI a ANT by mohla vyvolat významné kardiotoxické účinky a vést následně k rozvoji CHSS. A právě toto bylo hlavním cílem autorčiny studie. Autorka prováděla *in vitro* studie na primárních kardiomyocytech izolovaných z novorozených potkanů a kardiomyocytech izolovaných z dospělých potkanů. Cílem bylo získat *in vitro* model, který by odpovídal pediatrickým a dospělým pacientům, kteří jsou léčeni pomocí PI a pomocí kombinace PI a ANT. Následně byly rovněž prováděny *in vivo* studie na modelu chronické ANT-indukované kardiotoxicity navozené opakovaným podáváním daunorubicinu (DAU) dospělým králíkům.

Všechny experimenty jsou z mého pohledu výborně naplánovány, provedeny a interpretovány a byla získána celá řada zcela originálních výsledků. Z mého pohledu jsou nejdůležitější tyto výsledky, které autorka získala:

- a) *Léčba pomocí PI významně zvyšovala cytotoxicitu ANT na modelu kardiomyocytů izolovaných z novorozených potkanů, ale nikoliv u kardiomyocytů izolovaných z dospělých potkanů.*
- b) *Kombinace léčby pomocí PI a DAU nevykazovala na modelu *in vivo* přídavné negativní účinky na funkční, morfologické (histologické), biochemické a molekulární aspekty chronické ANT-indukované kardiotoxicity.*

Data získaná na kardiomyocytech izolovaných z novorozených potkanů by mohla vyvolat obavy, ale je potřeba si uvědomit, že léčba pomocí PI a zejména kombinovaná léčba pomocí PI a ANT není používána u pediatrických pacientů a z těchto důvodů je potřeba se zaměřit na výsledky získané na kardiomyocytech izolovaných z dospělých potkanů a zejména na výsledky z králíčího modelu *in vivo*.

Z těchto důvodů plně souhlasím se závěrem autorky, že léčba pomocí PI s vysokou pravděpodobností nezvyšuje riziko chronické ANT-indukované kardiotoxicity a následného rozvoje chemoterapií-indukovaného CHSS.

2) Studie k zhodnocení účinnosti farmakologické blokády renin-angiotenzinového systému (RAS) pomocí inhibitoru angiotenzin-konvertujícího enzymu (ACEi) na prevenci chronické ANT-indukované kardiotoxicity.

Tato studie byla rovněž publikována v časopise *Clinical Science*, 136: 139-161, 2022. Vzhledem ke skutečnosti, že použití dexrazoxanu (DEX), který je jedinou látkou s jasně prokázaným kardioprotektivním účinkem proti všem formám ANT-indukované kardiotoxicity, je omezeno regulačními orgány, tak jsou hledány nové farmakologické přístupy pro prevenci chronické ANT-indukované kardiotoxicity. Velká

pozornost je věnována lékům, které blokují RAS, neboť jsou to léky bezpečné a navíc zvýšená aktivita RAS je uznávaným rizikovým faktorem pro rozvoj chronické ANT-indukované kardiotoxicity a rovněž pro rozvoj chemoterapií-indukovaného CHSS. Léčba pomocí ACEi patří k pilířům léčby CHSS, tudíž použití ACEi se jeví logickým krokem i v tomto případě. Cílem této studie bylo ověřit účinnost léčby pomocí ACEi v primární prevenci chronické ANT-indukované kardiotoxicity, ale zejména, zda tyto eventuálně příznivé účinky budou přetrvávat i po ukončení léčby pomocí ACEi. Autorka opět prováděla své studie na *in vivo* modelu chronické ANT-indukované kardiotoxicity navozené opakovaným podáváním DAU dospělým králíkům.

Experimenty jsou z mého pohledu opět výborně naplánovány a provedeny. Nejdůležitější výsledky, které autorka získala, jsou:

- a) *V případě, že léčba pomocí ACEi byla zahájena týden před první dávkou DAU a bylo v ní pokračováno po celou dobu podávání DAU, tak bylo zabráněno předčasným úhynům zvířat a rozvoji systolické dysfunkce levé komory srdeční.*
- b) *Avšak po ukončení léčby pomocí ACEi (která byla podávána pouze po dobu podávání DAU) všechny příznivé účinky vymizely během následujících 3 týdnů a k dalšímu výraznému zhoršení všech parametrů došlo během následujících 10 týdnů.*

Tato data ukazují, že léčba pomocí ACEi v tzv. schématu primární prevence sice vykazuje kardioprotektivní účinky vůči ANT-indukované kardiotoxicitě, nicméně tyto účinky nejsou trvalé a tudíž se nezdá, že léčba pomocí ACEi by byla optimálním přístupem pro léčbu ANT-indukované kardiotoxicity.

3) Studie k objasnění mechanismu odpovědného za kardioprotektivní účinek léčby pomocí DEX vůči chronické ANT-indukované kardiotoxicitě.

Tato studie byla publikována v časopise *Circulation Heart Failure*, 14: e008209, 2021 a autorka byla významnou členkou řešitelského kolektivu dominantně odpovědná za *in vivo* studie na modelu chronické ANT-indukované kardiotoxicity navozené opakovaným podáváním DAU dospělým králíkům.

DEX je v současnosti jediný účinný lék pro prevenci ANT-indukované kardiotoxicity. Avšak ohledně mechanismu jeho kardioprotektivního účinku zůstává spousta nedorozumění, která jsou citována i v recentních publikacích. Dlouhá desetiletí přetrvával názor, že odpovědným mechanismem za rozvoj ANT-indukované kardiotoxicity je zvýšená produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) a zvýšený oxidativní stres, a proto byl výzkum orientován na možnosti snížení produkce ROS. V této souvislosti je rovněž známa úloha intracelulárního železa, a protože DEX má chelatační účinky, tak bylo ověřeno, že jeho kardioprotektivní účinek je zprostředkován skrze jeho chelatační účinky a následné sekundární snížení produkce ROS a oxidativního stresu. Avšak relativně nedávno byla představena hypotéza, že za rozvoj ANT-indukované kardiotoxicity je odpovědná interakce ANT s topoizomerázou II izoformou β (TOP2B) a následné TOP2B-dependentní poškození DNA v myokardu. Cílem této studie bylo zjistit, který mechanismus je odpovědný za kardioprotektivní účinek DEX vůči ANT-indukované kardiotoxicitě. Studie byly opět prováděny *in vitro* na primárních kardiomyocytech izolovaných z novorozených potkanů a *in vivo* na modelu chronické ANT-indukované kardiotoxicity navozené opakovaným podáváním DAU dospělým králíkům.

Nejdůležitější nálezy jsou krásně shrnuty v obrázku číslo 7, který je součástí originální studie a písemně je lze shrnout:

- a) *Exogenní podání aktivního metabolitu DEX (ADR-925), který má významné chelatační účinky, ale žádným způsobem neinhibuje aktivitu TOP2B nevykazovalo žádné kardioprotektivní účinky vůči ANT-indukované kardiotoxicitě a to ani in vitro a ani in vivo.*
- b) *Naproti tomu léčba pomocí DEX významným způsobem inhibovala aktivitu TOP2B a vykazovala významné kardioprotektivní účinky vůči ANT-indukované kardiotoxicitě a to jak in vitro, tak i in vivo.*

Výsledky této studie ukázaly, že pro kardioprotektivní účinky vůči ANT-indukované kardiotoxicitě nejsou důležité chelatační vlastnosti DEX, ale jeho inhibiční účinky vůči TOP2B.

Souhrnné zhodnocení dosažených výsledků vlastní dizertační práce:

Autorka získala celou řadu nových dat a zásadně rozšířila poznatky ohledně patofyziologie ANT-indukované kardiotoxicitě, které mohou být použity v přípravě nových kardioprotektivních schémat. Zásadní nálezy lze shrnout následovně:

- I. **Léčba pomocí PI s vysokou pravděpodobností nezvyšuje riziko chronické ANT-indukované kardiotoxicity a následného rozvoje chemoterapií-indukovaného CHSS.**
- II. **Léčba pomocí ACEi v tzv. schématu primární prevence sice vykazuje kardioprotektivní účinky vůči ANT-indukované kardiotoxicitě, ale tyto účinky nejsou trvalé a tudíž se nezdá, že léčba pomocí ACEi by byla optimálním přístupem pro léčbu ANT-indukované kardiotoxicity.**
- III. **Pro kardioprotektivní účinky vůči ANT-indukované kardiotoxicitě nejsou důležité chelatační vlastnosti DEX, ale jeho inhibiční účinky vůči TOP2B.**

C. Zhodnocení úrovně publikací, které jsou součástí dizertační práce.

Publikační činnost doktorandky je mimořádně kvalitní a je to výsledek její práce, ale je také potřeba zdůraznit, že je to obrazem skvělé činnosti výzkumné skupiny. ***Z mého pohledu jsou práce publikovány v těch nejlepších možných odborných časopisech a tato publikační činnost nejenže je plně dostačující pro udělení titulu Ph.D., ale významně požadavky převyšuje.***

D. Připomínky a dotazy oponenta.

K práci nemám žádné zásadní připomínky, mám spíše tři dotazy a rád bych znal názor autorky.

- 1) I když nebyl potvrzen negativní vliv DEX na protinádorový účinek ANT, tak je toto téma pořád diskutováno a je použití DEX omezeno pouze na dospělé pacienty a to ještě navíc na pacienty léčené vyššími kumulativními dávkami, což limituje příznivé účinky DEX pro velkou část pacientů. Chci se zeptat, zda si autorka myslí, že:
Pokud by se podařilo vyvinout skutečně selektivní inhibitor TOP2B, zda by tato problematika byla vyřešena? Tedy za předpokladu, že se definitivně prokáže, že ANT-kardiotoxicita je zprostředkována skrze TOP2B v kardiomyocytech atd.
- 2) ***Rovněž bych ocenil názor autorky na použití ACEi v léčbě již rozvinutého „chemoterapií-indukovaného CHSS“?*** Důvod proč bych rád znal tento názor, je můj dojem ze všech doposud publikovaných studií, včetně autorčiny studie, že léčba pomocí farmakologické blokády RAS u této

formy CHSS není účinná na rozdíl od jiných forem srdečního selhání s redukovanou ejekční frakcí. A můj dojem je, že chemoterapií-indukované CHSS podobně jako srdeční selhání se zachovalou ejekční frakcí na stávající farmakologické přístupy příliš pozitivně nereaguje a tato forma bude asi vyžadovat nové farmakologické přístupy.

- 3) *In vivo* model chronické ANT-indukované kardiotoxicity navozené opakovaným podáváním DAU dospělým králíkům pokládám za velmi prospěšný a moje otázka zní: **proč ve všech studiích používáte výhradě samce?** Ptám se, neboť jistě máte nějaký důvod (asi „technický“), protože pohlavní rozdíly jsou v problematice chemoterapií-indukované CHSS dobře známy.

Závěr:

Na základě podrobného prostudování dizertační práce a publikační činnosti autorky konstatuji, že doktorandka dle mého názoru má všechny předpoklady k samostatné tvořivé vědecké práci a v případě úspěšné obhajoby doporučuji Mgr. Zuzaně Pokorné udělení titulu „Ph.D.“.

S přátelským pozdravem,

Prof. MUDr. Luděk Červenka, CSc., MBA.