

Doktorský studijní program

**Lékařská farmakologie**

**Antracyklinová kardiotoxicita a studium nových  
farmakologických kardioprotektiv**

Anthracycline cardiotoxicity and study of new  
pharmacological cardioprotectants

**Mgr. Zuzana Pokorná**

Školitel: doc. PharmDr. Martin Štěrba, PhD.

## **Prohlášení autora**

---

### **Prohlášení:**

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

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

**Hradec Králové, 2022**

**Mgr. Zuzana Pokorná**

## Poděkování

---

Děkuji v první řadě svému školiteli doc. PharmDr. Martinu Štěrbovi, PhD. za odborné vedení, cenné rady a podněty v průběhu celého doktorského studia a za významnou pomoc při přípravě publikací i této práce. Dále bych chtěla poděkovat za výbornou kolektivní spolupráci členům výzkumné skupiny Lékařské fakulty v Hradci Králové, zejména PharmDr. Olze Lenčové, PhD., Mgr. Petře Kollárové, Bc. Kláře Lindrové a pracovnícím vivária, jakož i dalším spolupracovníkům z Ústavu lékařské farmakologie Lékařské fakulty v Hradci Králové. Mé poděkování nejen za odbornou spolupráci patří též pracovníkům z Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, jmenovitě PharmDr. Eduardu Jirkovskému, PhD., PharmDr. Anně Jirkovské, PhD., RNDr. Haně Jansové, PhD., Mgr. Janu Kubešovi a prof. PharmDr. Tomáši Šimůnkovi, PhD. Dále děkuji za odbornou spolupráci také RNDr. Markétě Hlaváčkové, PhD. a Mgr. Dítě Sotákové, PhD. z Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky. Dále děkuji především svým rodičům za optimismus a podporu v průběhu celého studia, Alešovi Ťučkovi především za jeho trpělivost a pomoc a kamarádům Emilce, Lofce a Čendovi za zpříjemnění volného času. Mé poděkování patří i kolegům z Masarykova onkologického ústavu, jmenovitě Zuzce, Vaškovi a Philovi, zejména za jejich vstřícnost, pozitivní přístup i důvěru.

Tato dizertační práce vznikla za finanční podpory následujících grantových agentur a institucí (v abecedním pořadí): GAČR 18-08169S, GAČR 21-16195S, GAUK 680216, INOMED CZ.02.1.01/0.0/0.0/18 069/0010046 a PROGRES Q40/5.

# Obsah

---

1	Úvod.....	1
1.1	Antracykliny .....	1
1.1.1	Historie, chemická struktura a postavení v klinické praxi.....	1
1.1.2	Mechanismus protinádorového účinku.....	2
1.1.3	Dávkování, cesta podání a farmakokinetika antracyklinů.....	3
1.1.4	Nežádoucí účinky antracyklinů mimo kardiotoxicitu .....	4
1.2	Antracyklinová kardiotoxicita .....	4
1.2.1	Mechanismy vzniku chronické antracyklinové kardiotoxicity.....	5
1.2.1.1	Oxidační poškození myokardu.....	5
1.2.1.2	TOP2B-dependentní poškození myokardu .....	7
1.2.1.3	Dysregulace proteazomu .....	8
1.2.2	Rizikové faktory uplatňující se v rozvoji antracyklinové kardiotoxicity .....	10
1.2.3	Kombinace antracyklinů s dalšími potenciálně kardiotoxickými léčivy.....	11
1.2.3.1	Kombinace s trastuzumabem .....	11
1.2.3.2	Kombinace s proteazomovými inhibitory .....	12
1.3	Opatření využívaná k omezení antracyklinové kardiotoxicity .....	14
1.3.1	Farmakologická kardioprotekce vůči antracyklinové kardiotoxicitě .....	15
1.3.1.1	Antioxidanty a chelátory železa .....	16
1.3.1.2	Dexrazoxan (DEX, ICRF-187) .....	17
1.3.1.3	Léčiva používaná k neurohormonální blokádě u CHSS .....	19
2	Cíle disertační práce .....	23
3	Výsledky.....	24
3.1	Publikované práce komentované v této disertaci.....	24
3.2	Komentáře k publikovaným pracím.....	25
4	Diskuse.....	31
5	Závěry.....	41
6	Seznam citací použité literatury .....	43
7	Přílohy .....	53
7.1	Příloha – publikace č. 1	
7.2	Příloha – publikace č. 2	
7.3	Příloha – publikace č. 3	

## Seznam použitých zkratek

---

ACEi	inhibitory angiotenzin-konvertujícího enzymu
ANP	atriální natriuretický peptid
ANT	antracykliny
ASCO	Americká společnost pro klinickou onkologii ( <i>American Society of Clinical Oncology</i> )
AVCM	kardiomyocyty izolované z komorového myokardu dospělého potkana
C-L	aktivita proteazomu podobná kaspázám ( <i>caspase-like</i> )
CT-L	aktivita proteazomu podobná chymotrypsinu ( <i>chymotrypsin-like</i> )
cTnT	plazmatické koncentrace srdečního troponinu T
DAU	daunorubicin
DEX	dexrazoxan
DOX	doxorubicin
DDR	buněčná odpověď na poškození DNA ( <i>DNA damage response</i> )
FU	období následného sledování po ukončení chronické expozice cytostatikem ( <i>follow up</i> )
HF	srdeční selhání ( <i>heart failure</i> )
HFrEF	srdeční selhání se sníženou ejekční frací ( <i>HF with reduced ejection fraction</i> )
HO1	hemoxygenáza 1
CHSS	chronické srdeční selhání
LK	levá komora srdeční
LVEF	ejekční frakce levé komory ( <i>left ventricular ejection fraction</i> )
LVFS	frakční zkrácení levé komory ( <i>left ventricular fractional shortening</i> )
MM	mnohočetný myelom
MnSOD	mitochondriální izoforma superoxiddismutázy (SOD2)
mtDNA	mitochondriální deoxyribonukleová kyselina
NOX	NADPH-oxidáza
NT-proBNP	N-terminální natriuretický propeptid typu B
NVCM	kardiomyocyty izolované z komorového myokardu novorozeného potkana
PI	proteazomové inhibitory
RCT	randomizovaná kontrolovaná studie
RF	rizikový faktor
ROS	reaktivní formy kyslíku

RT-PCR	polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí ( <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i> )
SOD	superoxiddismutáza
TOP2A	topoizomeráza II izoforma $\alpha$
TOP2B	topoizomeráza II izoforma $\beta$
T-L	aktivita proteazomu podobná trypsinu ( <i>trypsin-like</i> )
UPS	ubikvitin-proteazomový systém

## Souhrn

---

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

Inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu (ACEi) se dle některých údajů z literatury jeví jako potenciálně slibná léčiva, která by mohla chránit myokard před indukcí chronické ANT kardiotoxicity při jejich užití v primární prevenci (tj. při podávání v průběhu celé chemoterapie ANT). Cílem této části bylo prozkoumat tuto hypotézu na experimentálním modelu zejména s ohledem na účinnost této intervence v období následného sledování po dokončení chemoterapie ANT (tzv. *follow up*, FU). Dalším cílem bylo popsat případné molekulární mechanismy, které se na tomto potenciálním benefitu podílejí. Na *in vivo* modelu u králíka bylo zjištěno, že podávání klinicky relevantních dávek ACEi perindoprilu má na rozvoj chronické ANT kardiotoxicity odlišný vliv v závislosti na délce FU. Týden po dokončení chronického podávání ANT byla v kombinační skupině pozorována kompletní prevence či výrazné snížení většiny hodnocených parametrů kardiotoxicity, a to včetně známek degenerativního poškození kardiomyocytů. Nicméně po 3 týdnech FU bylo patrné významné zhoršení většiny sledovaných parametrů kardiotoxicity, přičemž zvýšení dávky perindoprilu

tomuto vývoji nezabránilo. Tyto výsledky byly potvrzeny v dalších experimentech s prodloužením FU na 10 týdnů, kde byla navíc popsána další progresse systolické dysfunkce i morfologického poškození myokardu, včetně výskytu úhynů v důsledku těžkých forem srdečního selhání. Následné podávání perindoprilu i v průběhu prodlouženého FU zabránilo předčasným úhynům a rozvoji těžkých forem srdečního selhání, ale nezvrátilo trend postupného snižování benefitu plynoucího z podávání ACEi. Protože DEX v předchozích experimentech na stejném modelu zajistil téměř kompletní a stálou kardioprotekci (bez významných změn v průběhu 10týdenního FU), byly zkoumány možné mechanismy vysvětlující tyto rozdíly. Na rozdíl od DEX perindopril ani jeho aktivní metabolit neměl vliv na aktivitu rekombinantní TOP2B *in vitro* a podání perindoprilu *in vivo* neovlivnilo p53-dependentní signalizaci spojenou s buněčnou odpovědí na poškození DNA (DDR) v myokardu králíka po jednorázovém podání ANT. Tato studie také ukázala, že benefit navozený ACEi v primární prevenci ANT kardiotoxicity je na rozdíl od DEX z velké části pouze dočasný, což může souviset s absencí vlivu ACEi na ANT navozené a TOP2B-dependentní poškození DNA a aktivaci DDR v myokardu.

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



## Summary

---

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

Inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACEi) have been recently hypothesized to be promising cardioprotective agents for prevention of the ANT-induced damage to the heart when used in primary prevention settings (i.e., throughout whole chemotherapy). This part aimed to address this question in animal experiments with focus on long-term outcomes of this intervention in post-treatment follow-up (FU) and possible mechanisms involved herein. Using the model of chronic ANT cardiotoxicity in rabbits it was revealed that different benefits can be attributed to administration of clinically relevant doses of ACEi perindopril depending on the length of post-treatment FU. A week after the last ANT dose, perindopril administration seemed to completely overcome or markedly reduced most of the parameters describing toxic damage, including degenerative changes induced in cardiomyocytes. However, after additional 3-week FU, most of these cardiotoxicity parameters significantly deteriorated which could not be rescued by increased ACEi dose. These results were confirmed in the experiments with 10-week FU, where further progression of the ANT-induced cardiac damage occurred in the extended drug-free FU including occurrence of cases of end-stage HF with premature deaths. Continued administration of perindopril in the FU prevented cases of severe HF and related mortality but did not reverse the apparent trend for waning of benefits in the

FU. These results were strikingly different from those obtained previously on the same rabbit model with clinically used DEX, where a sustained and robust cardioprotection was observed even after 10-week FU. Therefore, mechanistic differences in cardioprotective effects of these two drugs were studied. In sharp contrast to DEX, neither perindopril nor its active metabolite affected the activity of recombinant topoisomerase II beta (TOP2B) and prevented p53-mediated DNA damage signalling induced in the heart by a single ANT dose. Unlike DEX, ACEi provided largely only temporal benefits in the primary prevention of chronic ANT cardiotoxicity which may relate to their inability to prevent ANT induced and TOP2B-dependent DNA damage and related signalling in the myocardium.

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

# 1 Úvod

## 1.1 Antracykliny

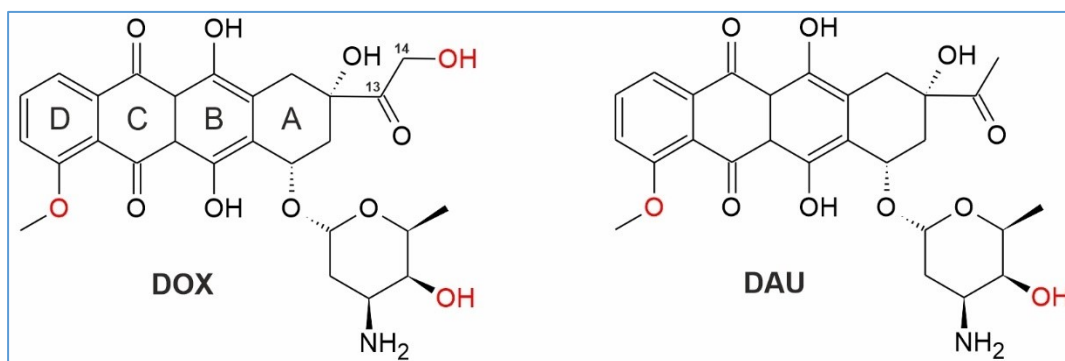
Objev protinádorového účinku antracyklinů (ANT) (Dimarco et al., 1964) přispěl k významnému průlomů v onkologické léčbě v druhé polovině 20. století. Zařazení těchto léčiv do chemoterapeutických režimů významně zvýšilo úspěšnost léčby řady hematologických i solidních nádorů u dětí i dospělých. Ačkoliv v následujících desetiletích došlo v této terapeutické oblasti k dramatickým změnám (zejména díky uvedení do klinické praxe biologicky cílené protinádorové léčby), zůstávají tato léčiva i dnes základním kamenem léčby řady malignit (Kiss et al., 2022). Důvodem je především jejich vysoká účinnost u širokého spektra nádorů vykazujících dostatečnou odpověď na léčbu a spíše než jejich vytlačení z klinické praxe lze pozorovat jejich kombinaci s biologicky cílenou léčbou k dosažení maximální terapeutické odpovědi (Cortes-Funes et al., 2007; Kiss et al., 2022).

### 1.1.1 Historie, chemická struktura a postavení v klinické praxi

Antracykliny (ANT) jsou protinádorovými antibiotiky, která byla poprvé izolována v průběhu 60. let 20. století z bakteriálních kultur rodu *Streptomyces* (*sp. peucetius a ceruleorubidus*). Do klinické praxe byly ANT velmi úspěšně uvedeny v průběhu následujícího desetiletí (Bloomfield et al., 1972; Blum et al., 1974). Prvním ANT schváleným pro užití v klinické praxi byl daunorubicin (DAU; někdy též zvaný daunomycin). Brzy po něm následoval doxorubicin (DOX; také někdy zvaný jako adriamycin dle chráněného názvu prvního léčivého přípravku), který je nejčastěji klinicky užívaným ANT vůbec. Úspěch obou léčiv v klinické praxi podnítil další výzkum v této oblasti, který vyústil v implementaci několika dalších ANT do klinické praxe (zejména epirubicinu a idarubicinu, 2. generace ANT) (Martins-Teixeira et al., 2020).

Z hlediska chemické struktury patří ANT mezi glykosidy skládající se z planárního antrachinonového aglykonu a aminocukru daunosaminu. Tetracyklický antrachinonový aglykon je znám svou schopností interkalovat mezi sousední páry bází DNA. Semichinonová část se poté může účastnit chelatace volných iontů železa a redoxní cyklizace s následnou tvorbou reaktivních forem kyslíku (ROS). Daunosamin se patrně podílí na inhibici enzymu topoizomerázy II (TOP2) a také na poškození struktury chromatinu (Martins-Teixeira et al., 2020; van der Zanden et al., 2021). DAU se liší od DOX jedinou hydroxylovou skupinou na karbonylu navázaném na antrachinonový aglykon. Epirubicin je epimerem DOX s odlišnou stereoizomerií hydroxyly na daunosaminu. ANT se zejména díky svému aglykonu jeví jako

poměrně lipofilní látky, ale při fyziologickém pH mají díky kladnému náboji na primárním aminu daunosaminu spíše amfifilní charakter (Regev et al., 2005; Martins-Teixeira et al., 2020).



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

ANT se v klinické praxi používají zejména v kombinaci s dalšími cytostatiky (Kiss et al., 2022). Zatímco se DAU významně uplatnil v léčbě akutní lymfoblastické a myeloblastické leukémie, DOX zahrnuje širší spektrum onkologických indikací (SmPC Doxorubicin Teva®; Kiss et al., 2022). DOX je indikován např. v léčbě karcinomu prsu, non-Hodgkinových i Hodgkinových lymfomů, mnohočetného myelomu (MM) či u vzácných onemocnění jako jsou sarkomy kostí a měkkých tkání. Epirubicin se používá zejména v terapii karcinomu prsu. Idarubicin se používá v léčbě akutní myeloblastické a lymfoblastické leukémie, kde z části nahrazuje tradičně užívaný DAU. ANT jsou nově kombinovány s řadou moderních biologicky cílených léčiv, což vedlo ke zvýšení úspěšnosti léčby u jinak obtížně léčitelných tumorů (Hahn et al., 2021; Kiss et al., 2022). Příkladem je kombinace ANT s trastuzumabem u HER2 pozitivního karcinomu prsu (Mohan et al., 2018) nebo kombinace s proteazomovými inhibitory (např. s bortezomibem) v léčbě MM (Terwilliger et al., 2017).

### 1.1.2 Mechanismus protinádorového účinku

Mechanismus protinádorového účinku ANT nebyl ani po půl století výzkumu uspokojivě objasněn. Prvním navrženým mechanismem byla interkalace (tj. vmezeření) molekuly ANT do DNA mezi páry bází (C-G) prostřednictvím planárního aglykonu vedoucí k inhibici replikace a transkripce DNA nádorových buněk (Pigram et al., 1972). Tento mechanismus zřejmě sám o sobě hraje při klinicky relevantních koncentracích ANT spíše minoritní úlohu, nicméně dle novějších informací se může podílet či přispívat k dalším mechanismům protinádorového účinku těchto léčiv (van der Zanden et al., 2021).

Za hlavních mechanismus protinádorového účinku je již delší dobu považována inhibice enzymu topoizomerázy II alfa (TOP2A) (Chen et al., 2013; van der Zanden et al., 2021). Topoizomerázy jsou enzymy potřebné k odstranění topologických problémů vyskytujících se během replikace a transkripce v DNA. Enzym TOP2 katalyzuje vznik dvouřetězcových zlomů v DNA, čímž umožňuje řešení přirozených topologických problémů. Proliferující nádorové buňky exprimují zejména TOP2A, která je účinkem ANT ireverzibilně inhibována. ANT působí na TOP2A jako tzv. topoizomerázové jedy, tj. vedou ke vzniku stabilního ternárního komplexu ANT-TOP2A-DNA. Protože nemůže dojít k religaci rozpojených řetězců DNA, v konečném důsledku dochází účinkem ANT ke vzniku permanentní dvojitého zlomu v DNA (Chen et al., 2013; van der Zanden et al., 2021). Vznik dvojitého zlomu spouští buněčnou signalizaci reagující na poškození DNA (DDR, *DNA damage response*), kde centrální úlohou hraje tumor supresorový protein p53. V důsledku jeho aktivace dojde k zástavě buněčného cyklu a indukci apoptotické buněčné smrti. Novější studie naznačují, že mechanismus protinádorového účinku může být komplexnější a jeho významnou součástí může být i poškození chromatinové struktury vypuzením histonů z nukleozomu (van der Zanden et al., 2021). Oxidačnímu stresu se v protinádorovém účinku přisuzuje spíše malá role (Keizer et al., 1990).

### 1.1.3 Dávkování, cesta podání a farmakokinetika antracyklinů

ANT se téměř výhradně podávají intravenózně většinou formou krátké infúze do centrálního žilního vstupu, aby se minimalizovalo riziko lokálního poškození žilní stěny či extravazace cytostatika do okolní tkáně. Nejčastěji užívaný DOX se podává cyklicky s definovanými rozestupy (nejčastěji 21 dní) v dávkách 60-75 mg/m<sup>2</sup>. Po *i.v.* podání se ANT rychle distribuují do všech tkání s výjimkou mozku a varlat. Vysoké koncentrace jsou dosaženy v dobře prokrvených tkáních, mezi které patří i myokard (Danesi et al., 2002). ANT se váží na intracelulární komponenty (v jádře na DNA a v mitochondriích na kardiolipin), což může být důležité i s ohledem na riziko rozvoje kardiotoxicity (Nicolay et al., 1984). K poklesu plazmatické koncentrace eliminační fáze většinou dochází bifázicky, přičemž druhá fáze je typicky podstatně pomalejší, což determinuje relativně dlouhý terminální poločas eliminace (kolem 48 h). Většina léčiva je vyloučena žlučí do stolice (cca z poloviny v nezměněné formě). Hlavní biotransformační cestou je redukce karbonylu na C13 za tvorby hydroxylových metabolitů (např. doxorubicinol, daunorubicinol) (Danesi et al., 2002). Tyto metabolity mají nižší protinádorovou aktivitu, ale dle některých informací by se mohly podílet na rozvoji ANT kardiotoxicity (Olson et al., 1988). Parentní ANT jsou i substráty efluxních transportérů jako je P-glykoprotein.

### 1.1.4 Nežádoucí účinky antracyklinů mimo kardiotoxicitu

Použití ANT v klinické praxi je stejně jako u většiny cytostatik omezeno řadou akutních nežádoucích účinků a toxicit, které jsou ale většinou reverzibilní a zvládnutelné podpůrnou léčbou. Myelosuprese omezující dávku ANT může vést k závažné neutropenii. Dalšími častými NÚ je mukozitida, nevolnost, zvracení a alopecie. Obávané jsou dlouhodobé komplikace léčby, které mohou mít významný dopad na morbiditu, mortalitu a kvalitu života pacientů dlouhodobě přežívajících nádorové onemocnění. Mezi významné komplikace patří riziko sekundárních malignit a kardiotoxicita.

## 1.2 Antracyklinová kardiotoxicita

Kardiotoxicita je specifickou komplikací protinádorové léčby ANT s významným dopadem na jejich užití v klinické praxi (Buja et al., 1973; Lefrak et al., 1973; Zamorano et al., 2016; Sawicki et al., 2021). Může se manifestovat řadou klinických projevů, od navození přechodných poruch rytmu, přes aseptické myokarditidy a perikarditidy až po rozvoj dilatační či restriktivní kardiomyopatie a chronického srdečního selhání (CHSS). Dle staršího dělení lze rozlišit akutní a chronické formy ANT kardiotoxicity, které se liší svým nástupem, manifestací a klinickým významem (Gharib et al., 2002). Do akutních forem se zahrnují subklinické změny kardiiovaskulárních funkcí, které se objevují do 48 hodin po podání ANT (často se jedná o klinicky málo významné změny na EKG) (Gharib et al., 2002; Zamorano et al., 2016). Subakutně byl popsán vznik syndromu myokarditidy–perikarditidy, který se ale dnes vyskytuje jen velmi zřídka (Gharib et al., 2002).

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

příkladem typu I srdeční dysfunkce navozené protinádorovou léčbou (Ewer et al., 2015) vykazující významné rozdíly oproti typu II spojeným s biologicky cílenou léčbou.

Klinický význam klasifikace ANT kardiotoxicity na akutní, subakutní a chronickou formu je v poslední době zpochybňován. Symptomy akutní kardiotoxicity se vyskytují velmi zřídka a/nebo nejsou většinou klinicky významné. Na druhé straně chronická ANT kardiotoxicita není problémem pouze dlouhodobé léčby související s kumulativní dávkou ANT, ale představuje určité kontinuum počínající s již první dávkou tohoto léčiva. Každá expozice ANT patrně představuje dílčí nevratné poškození určitého množství kardiomyocytů. Toto poškození se klinicky nemanifestuje, dokud se nenakumuluje do určité kritické míry, kdy dojde k vyčerpání funkční rezervy myokardu. Následně po vyčerpání kompenzační mechanismů dojde k manifestaci symptomů (Ewer et al., 2015). Doposud není ani jasné, nakolik se liší pozdní chronická kardiotoxicita pozorovaná u dětí i několik let až desetiletí po proděláním chemoterapie od časných forem chronické kardiotoxicity popisované především u dospělých.

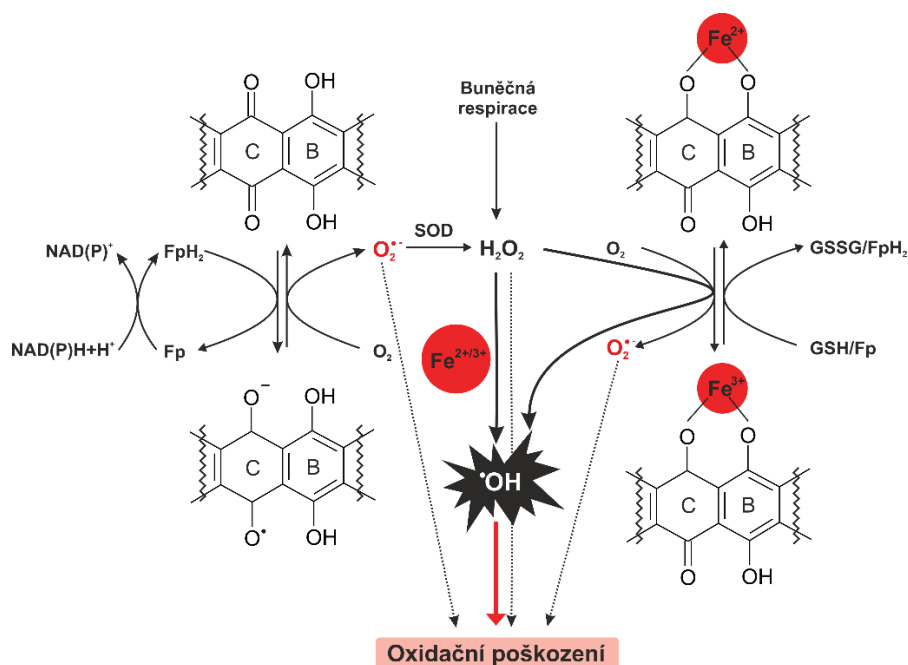
### **1.2.1 Mechanismy vzniku chronické antracyklinové kardiotoxicity**

Navzdory intenzivnímu experimentálnímu i klinickému výzkumu probíhajícího více než 40 let, patogeneze chronické ANT kardiotoxicity stále není objasněna. V minulosti převažovala hypotéza vysvětlující ANT navozené poškození myokardu pomocí přímého a/nebo nepřímého navození oxidačního stresu (Thayer, 1977; Minotti et al., 2004a). V poslední době je stále častěji zmiňována interakce ANT s beta izoformou enzymu TOP2 (TOP2B) vedoucí k poškození DNA kardiomyocytů (Vejpgonsa et al., 2014; Dadson et al., 2020; Sawicki et al., 2021). Další hypotézy poukazují na ANT indukovanou dysregulaci ubikvitin-proteazomového systému (UPS) (Kumarapeli et al., 2005; Dimitrakis et al., 2012), narušení mitochondriální bioenergetiky prostřednictvím poškozením mitochondriální DNA, narušení homeostázy  $Ca^{2+}$  a změny a poruchy exprese proteinů myofibril (Renu et al., 2018). V řadě případů ale zůstává nejasné, zdali se zmiňované mechanismy uplatňují i v klinicky relevantních podmínkách (dávkách/koncentracích a schématech podání) a jedná se o primární příčinu vzniku chronické ANT kardiotoxicity nebo spíše o její následek, popřípadě již o důsledek indukce CHSS.

#### **1.2.1.1 Oxidační poškození myokardu**

Nejčastěji citovanou teorií mechanismu vzniku chronické ANT kardiotoxicity je hypotéza stavící do popředí význam oxidačního stresu a oxidačního poškození myokardu (Thayer, 1977; Davies et al., 1983; Doroshow, 1983; Wallace, 2003; Simunek et al., 2009). ANT mohou navodit oxidační stres prostřednictvím redoxní cyklizace svého aglykonu. Chinonová část

aglykonu může být enzymaticky redukována za vzniku semichinonového radikálu, který po interakci s kyslíkem vede k tvorbě superoxidu (Thayer, 1977; Doroshov, 1983). Dále tato molekula dismutuje na peroxid vodíku (spontánně nebo podstatně efektivněji za katalýzy superoxiddismutázou). V přítomnosti volných iontů železa pak mohou vznikat ještě podstatně reaktivnější a toxičtější hydroxylové radikály (Keizer et al., 1990; Minotti et al., 2004b; Simunek et al., 2009), a to jednak z peroxidu vodíku prostřednictvím tzv. Fentonovy reakce a pak také po vytvoření komplexu iontů železa s ANT aglykonem. Komplex ANT-Fe je totiž redoxně značně aktivní a může za fyziologických podmínek cyklicky produkovat jak superoxid, tak i přímo hydroxylové radikály. Spojením těchto teorií vznikla tzv. „ROS and iron“ hypotéza vzniku ANT kardiotoxicity (obr. 2), která byla následně ještě posílena objevením kardioprotektivního účinku léčiva dexrazoxanu (DEX) (Myers, 1988; Hershko et al., 1993b; Hrdina et al., 2000; Minotti et al., 2004a; Štěrba et al., 2013), jež může prostřednictvím svého metabolitu odnímat volné ionty železa z tohoto komplexu. Rané studie ukázaly, že přetížení železem zvyšuje toxicitu DOX *in vitro* a *in vivo* (Hershko et al., 1993a). Vedle přímé indukce tvorby ROS prostřednictvím molekuly samotného ANT může mohou tato léčiva přispět k oxidačnímu stresu v myokardu též nepřímou – například indukcí exprese NADPH oxidáz (NOX), jež katalyzují vznik superoxidu/peroxidu vodíku, nebo oslabením antioxidační kapacity kardiomyocytů (např. snížením exprese SOD2) (Štěrba et al., 2013; Renu et al., 2018).



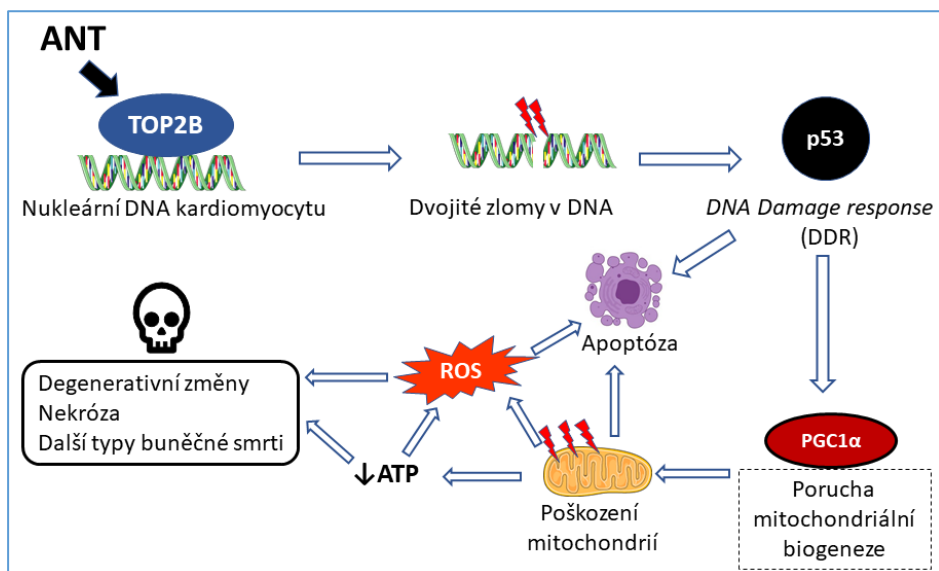
**Obr. 2. Antracyklinem zprostředkovaná tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS) s účastí volných iontů železa (tzv. „ROS and iron hypothesis“).** Kruh C aglykonu může být redukován flavoproteinovými enzymy (Fp, zejména komplexem I dýchacího řetězce v mitochondriích), čímž vznikají semichinonové radikály. Ty po interakci s kyslíkem dávají vznik superoxidového aniontu (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), jež následně dismutuje na peroxid vodíku (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) za katalýzy superoxiddismutázou (SOD). Volné ionty železa pak mohou katalyzovat tvorbu hydroxylových



radikálů ( $\bullet\text{OH}$ ) jednak z peroxidu vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) tzv. Fentonovou reakcí a pak také po tvorbě komplexu s aglykonem ANT. Komplex  $\text{ANT-Fe}^{3+}$  může být redukován enzymaticky či glutathionem (GSH). Při následné reakci s kyslíkem vznikají superoxidové anionty, zatímco reakcí s peroxidem vodíku jsou tvořeny přímo hydroxylové radikály.

### **1.2.1.2 TOP2B-dependentní poškození myokardu**

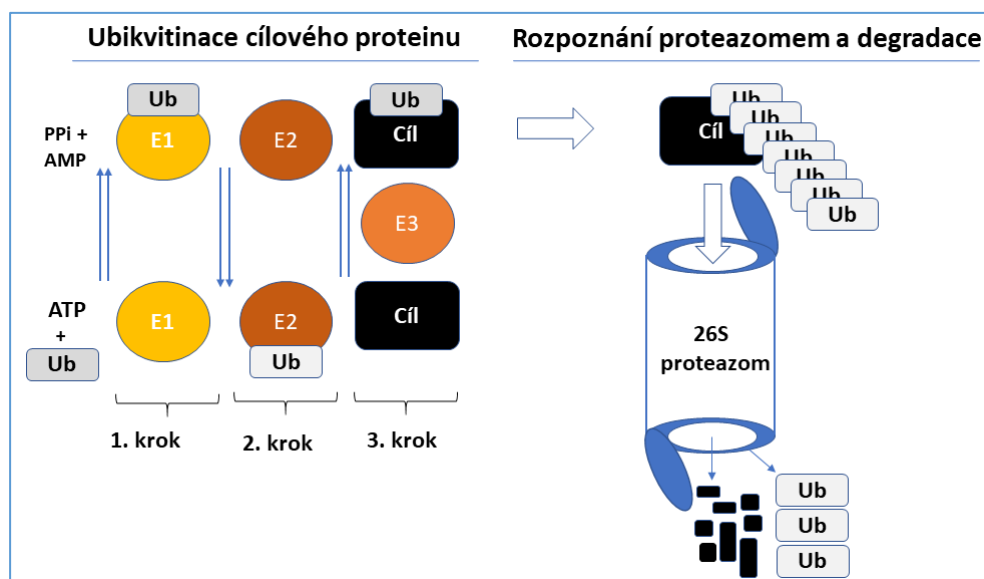
TOP2B je dominantní izoformou enzymu TOP2 v dospělých terminálně diferencovaných kardiomyocytech, přičemž izoforma TOP2A zde není téměř exprimována (Deweese et al., 2008; Vejpongsa et al., 2014). Souvislost mezi vznikem ANT kardiotoxicity a TOP2B byla nejprve navržena na základě *in vitro* pokusů provedených na buněčné linii H9c2 (Lyu et al., 2007; Deng et al., 2014). Tato data se ovšem ukázala být sporná právě díky zvolenému buněčnému modelu. Nejenže se H9c2 buňky značně liší od primárních kardiomyocytů, ale na rozdíl od kardiomyocytů také díky aktivní proliferaci exprimují jak TOP2B, tak i TOP2A (Lenco et al., 2015). Pro pochopení významu interakce ANT s TOP2B byla průlomovou prací studie Zhang et al. (2012) dokazující že, delece genu pro TOP2B v kardiomyocytech dovede zabránit rozvoji ANT kardiotoxicity v kardiomyocytech *in vitro* i *in vivo* na myším modelu chronické ANT kardiotoxicity (Zhang et al., 2012). V této studii bylo také ukázáno, že tato interakce vede k poškození DNA kardiomyocytů, aktivaci DDR, apoptotické buněčné smrti a poškození transkripční regulace mitochondriální biogeneze s následným vznikem mitochondriální dysfunkce a sekundárně i k produkci ROS (obr. 3). Ačkoliv se tato teorie dočkala pozitivního přijetí odbornou veřejností, stále zde existuje řada nejasností. Například není jasné, zda je tento mechanismus toxicity dominantní a ostatní popsané patogenetické mechanismy jsou jím podmíněny, jak vyplývá z výše uvedené studie, nebo zda se uplatňuje souběžně s dalšími probíhajícími ději. Platnost této hypotézy také nebyla ověřena u větších laboratorních zvířat mimo hlodavce a v neposlední řadě nebyly prozkoumány a definovány komplexní patogenetické mechanismy vedoucí od opakované interakci s TOP2B až k rozvoji CHSS. Některé zdroje také uvádějí, že aktivace DDR v myokardu není primárně TOP2B dependentní, ale je závislá na ANT indukované tvorbě ROS (Huang et al., 2011).



**Obr. 3. Hypotézy patogeneze antracyklinové (ANT) kardiotoxicity stavící do popředí topoizomerázu II beta (TOP2B).** ANT působí v jádře kardiomyocytů na TOP2B jako topoizomerázový jed, což vede k poškození DNA dvojitými zlomy a aktivaci buněčné odpovědi na poškození DNA (DDR, *DNA damage response*), která je koordinována tumor supresorovým genem p53 (p53). Tímto způsobem je navozena apoptotická signalizace a transkripční změny vedoucí k poruše mitochondriální biogeneze, jejíž hlavním regulátorem je PGC1 $\alpha$  (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 – alpha*). Porucha transkripce mitochondriálních proteinů z nukleární i mitochondriální DNA pak vede k poškození struktury i funkce mitochondrií, sekundární produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) a poruše tvorby ATP. Tyto děje pak mohou vést k degenerativním změnám a buněčné smrti kardiomyocytů. Volně upraveno dle Vejpongsa and Yeh, 2014.

### 1.2.1.3 Dysregulace proteazomu

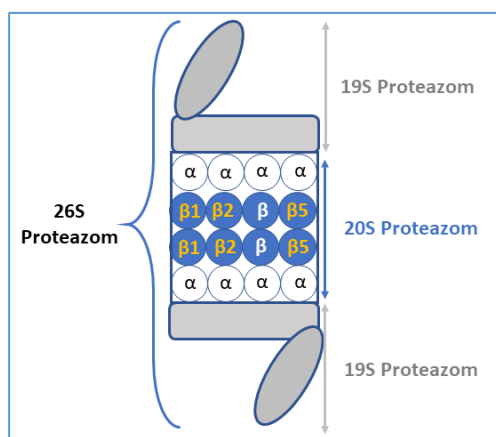
V eukaryotických buňkách je ubikvitin-proteazomový systém (UPS, obr. 4) hlavní cestou pro cílenou ATP-dependentní degradaci nežádoucích proteinů, ať už mutovaných, oxidovaných, špatně složených nebo již nepotřebných (Hershko et al., 1998; Lecker et al., 2006).



**Obr. 4. Ubikvitinace proteinu určeného k degradaci a jeho štěpení 26S proteazomem.** Protein určený k degradaci je označen molekulou ubikvitinu (3stupňový proces katalyzovaný enzymy E1-E3).

Polyubikvitinovaný protein je rozpoznán a rozložen prostřednictvím 26S proteazomu. Volně upraveno dle (Wang et al., 2006).

Tyto proteiny jsou označeny malým proteinem ubikvitinem a vzniklý komplex je následně rozpoznáván multienzymovým komplexem – 26S proteazomem. Ubikvitinace proteinu určeného k degradaci vyžaduje 3 postupné kroky k dosažení polyubikvitinovaného produktu, které jsou katalyzovány 3 různými třídami enzymů (E1 až E3, obr. 4). V prvním kroku je ubikvitin enzymaticky aktivován pomocí enzymu E1. Následně je aktivovaný ubikvitin přenesen na enzym E2, se kterým je konjugován. Poslední krok je přenesení ubikvitin na cílový protein pomocí enzymu E3 (ubikvitin-protein ligáza). Tento proces se několikrát opakuje, dokud nevznikne polyubikvitinový řetězec, který je následně rozpoznán regulačními podjednotkami 19S proteazomu (obr. 5), které mají tvar prstence s víkem. Proteolytická kapacita je pak spojena s 20S proteazomem, což je struktura o tvaru dutého válce, a jeho podjednotkami  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  a  $\beta 5$  s aktivitou podobnou kaspáze (tzv. *caspase-like*, C-L), trypsinu (tzv. *trypsin-like*, T-L) a chymotrypsinu (tzv. *chymotrypsin-like*, CT-L). Podjednotka  $\beta 5$  spojená s CT-L aktivitou je primárním cílem inhibitorů proteazomu užívaných v protinádorové léčbě (Dou et al., 2014). Protein určený k degradaci je při průchodu 20S proteazomem štěpen na jednotlivé oligopeptidy.



**Obr. 5. Struktura 26S proteazomu.** 26S proteazom se skládá z 19S proteazomu a 20S proteazomu. Proteázová aktivita je spojená s podjednotkami  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  a  $\beta 5$  20S proteazomu.

Kardiomyocyty jsou fyziologicky vystaveny trvalé intenzivní zátěži, která zvyšuje riziko poškození mnoha proteinů klíčových pro zajištění jejich adekvátní struktury a funkce (Christians et al., 2012). Insuficience UPS vede k nedostatečné kontrole kvality proteinů, což může samo o sobě vyústit v poškození kardiomyocytů, mj. i tzv. proteotoxicitou kumulujících se agregátů špatně složených proteinů, a/nebo přímo v jejich buněčnou smrt (Shukla et al., 2019; Maejima, 2020). Efektivní kontrola kvality proteinů díky UPS je pro kardiomyocyty zásadní, protože tyto terminálně diferencované buňky vykazují minimální schopnost

regenerace, tudíž je nutné zajistit jejich dlouhodobé přežití, což je do značné míry založeno na kontinuální selektivní obměně poškozených proteinů prostřednictvím UPS (Maejima, 2020). V neposlední řadě se UPS účastní regulace dostupnosti a aktivity celé řady transkripčních faktorů se zásadní důležitostí pro kardiomyocyty za normálního i patologického stavu. Toxické poškození myokardu ANT představuje výrazný zásah do proteinové homeostázy myokardu a není vyloučeno, že by tento proces mohl mít podíl v patogenezi degenerativních změn kardiomyocytů navozených právě ANT (Kumarapeli et al., 2005; Dimitrakis et al., 2012). Z dostupných informací také vyplývá, že ANT mohou významně zasahovat do exprese a funkce jednotlivých složek UPS v myokardu – například zvyšují expresi E3 ligázy a proteazomových podjednotek a zvyšují proteolytickou aktivitu proteazomu (Kumarapeli et al., 2005; Liu et al., 2008a; Sterba et al., 2011; Sishi et al., 2013). Bylo též publikováno, že se proteazom přinejmenším v nádorových buňkách také účastní transportu ANT do buněčného jádra (Kiyomiya et al., 2001).

### **1.2.2 Rizikové faktory uplatňující se v rozvoji antracyklinové kardiotoxicity**

Závažnost poškození myokardu ANT vykazuje významnou interindividuální variabilitu (Ewer et al., 2015; Sawicki et al., 2021). Byly definovány rizikové faktory (RF), které pacienty predisponují k vyššímu riziku rozvoji ANT kardiotoxicity. Nejdůležitější RF jsou shrnuté v tabulce níže.

Řada RF (např. velikost kumulativní dávky, pre-existující kardiovaskulární onemocnění) jsou dobře zdůvodnitelné a opírají se o konzistentní důkazy. U některých RF nejsou příčiny zcela jasné. Dlouhodobě se například uvádí, že ženské pohlaví predisponuje pacienty k vyššímu riziku kardiotoxicity. Z podrobnější analýzy ale vyplynulo, že konzistentněji lze tento vztah nalézt pouze u prepubertálních dívek a u žen po menopauze (Cadeddu Dessalvi et al., 2019). Porovnání vlivu pohlaví na rozvoj ANT kardiotoxicity u dospělého člověka (ve fertilním věku) je složitější pro nedostatek studií s přímým srovnáním. V experimentu na dospělých hlodavcích bylo opakovaně zjištěno významně vyšší riziko kardiotoxicity u samců než u samic, přičemž tento rozdíl byl do značné míry snížen ovariektomií (Cadeddu Dessalvi et al., 2019).

Interindividuální variabilita ve vnímavosti pacientů k ANT zůstává velmi vysoká i po vyloučení vlivu výše uvedených RF. Podstata tohoto klinicky velmi důležitého jevu zůstává nejasná. Farmakogenomické analýzy poukázaly na asociaci míry rizika kardiotoxicity s polymorfismy několika potenciálně souvisejících genů (Bhatia, 2020) – např. geny pro transportéry z rodiny *ATP Binding Cassette* (ABCC5 a ABCB4), pro transportéry z rodiny *Solute*

*Carrier* (SLC28A3, SLC 22A7 a SLC 22A17), karbonyl reduktázu 3 (CBR3), glukuronosyltransferázu UGT1A6 nebo *Retinoic Acid Receptor Gamma* (RARG). Pro vyhodnocení významu polymorfismů výše uvedených genů pro predikci individuálního rizika ANT kardiotoxicity bude potřeba provést další studie.

**Tab. 1. Rizikové faktory antracyklinové kardiotoxicity.**

<b>Rizikový faktor</b>	<b>Specifikace</b>
<b>věk</b>	nízký ( $\leq 18$ ) nebo naopak vyšší věk ( $\geq 65$ ) v době diagnózy
<b>pohlaví</b>	ženské (u prepubertálních dívek a u žen po menopauze)
<b>celková kumulativní dávka antracyklinů</b>	vyšší než 300 mg/m <sup>2</sup> doxorubicinu, dramatický nárůst rizika nad 400-450 mg/m <sup>2</sup>
<b>délka infúze</b>	u dospělých pacientů kontinuální infúze zřejmě snižuje riziko oproti bolusovému podání (u dětí neprokázáno)
<b>genetické predispozice</b>	hemochromatóza, Downův syndrom, afroamerický původ
<b>komorbidity</b>	kardiovaskulární onemocnění (hypertenze, ischemická choroba srdeční aj.), obezita, diabetes, onemocnění ledvin a endokrinopatie
<b>další terapie</b>	radiační terapie (ozařování mediastina), kombinace s dalšími protinádorovými léčivy

### 1.2.3 Kombinace antracyklinů s dalšími potenciálně kardiotoxickými léčivy

Riziko vzniku ANT kardiotoxicity je také významně kodeterminováno kombinací s dalšími protinádorovými léčivy s toxickým účinkem na myokard. Zde je zajímavé, že se to může týkat i léčiv, které mají samy o sobě kardiotoxický potenciál spíše omezený. Z klasických chemoterapeutik byly ze zvýšení rizika kardiotoxicity podezřívány např. taxany (Menna et al., 2012), novější publikace již toto riziko většinou nezdůrazňují. Významnější se nakonec ukázala kombinace ANT s některými biologicky cílenými léčivy, u kterých se riziko kardiotoxicity původně vůbec nepředpokládalo.

#### 1.2.3.1 Kombinace s trastuzumabem

Trastuzumab je humanizovaná monoklonální protilátka selektivně blokující extracelulární část receptoru pro lidský epidermální růstový faktor (HER2)(Mohan et al., 2018). Kombinace trastuzumabu s ANT se ukázala velmi účinnou u pacientek s HER2 pozitivním karcinomem prsu, ale v pilotní studii bylo sekundárně explorativní analýzou poukázáno na násobné zvýšení rizika dysfunkce LK a CHSS (27 % v kombinační skupině se souběžným podáním trastuzumabu s DOX vs. 8 % u samotného DOX) (Slamon et al., 2001). Následně bylo

zjištěno, že při sekvenčním podání těchto léčiv riziko kardiotoxicity výrazně klesá na klinicky akceptovatelnou úroveň (Mohan et al., 2018). Předpokládá se, že mechanismus kardiotoxicity trastuzumabu je zprostředkován bloádou receptoru HER2/neu v myokardu. Exprese HER2 receptorů je u kardiomyocytů fyziologicky významná v embryonálním vývoji srdce a *knock-out HER2* vede k rozvoji dilatační kardiomyopatii a zvýšené citlivosti k ANT (Mohan et al., 2018). Kardiotoxicita trastuzumabu je zcela odlišného charakteru než kardiotoxicita ANT, a proto je často klasifikována jako tzv. typ II kardiotoxicity, který je také z větší části reversibilní. Kardiotoxicita samotného trastuzumabu je poměrně nízká a sama o sobě je spíše zřídka klinickým problémem. Naopak při souběžné léčbě s ANT trastuzumab potencuje toxicitu těchto cytostatik, protože zřejmě inhibuje reparační procesy a snižuje odolnost kardiomyocytu vůči programované i neprogramované buněčné smrti navozené ANT. HER2 receptory na kardiomyocytech jsou totiž důležité pro parakrinní stimulaci neuregulinem 1, což vede k zvýšené rezistenci kardiomyocytů k apoptóze a poškození degenerativními změnami ve stresových podmínkách (Ewer et al., 2015). Sekvenční podání těchto léčiv do značné míry umožňuje se vyhnout potenciaci toxického poškození myokardu, a proto se v klinické praxi běžně tato kombinace léčiv užívá. ANT jsou mimo jiné podávány i s lapatinibem, který inhibuje intracelulární signalizaci vedoucí od HER2 receptoru a vykazuje k trastuzumabu tzv. komplementární mechanismus účinku. Z dostupných informací se v tomto případě riziko kardiotoxicity ale nezdá být tak významné a jeho užití omezují spíše jiné toxicity. (Eiger et al., 2020).

### **1.2.3.2 Kombinace s proteazomovými inhibitory**

Proteazomové inhibitory (PI) jsou moderní biologická léčiva, která jsou indikována převážně v léčbě mnohočetného myelomu (MM) a lymfomu z plášťových buněk. Minoritně jsou tato léčiva užívána v tzv. *orphan designacích* u folikulárního non-Hodgkinova lymfomu, akutní lymfoblastické leukémie či neurofibromatózy typu 2 (Wang et al., 2021). V rychle dělících se nádorových buňkách selektivní inhibice proteazomu vede k vyvolání buněčné smrti prostřednictvím mnoha mechanismů (Wang et al., 2021). Inhibice NF-κB vede k inhibici jeho transkripční aktivity a down-regulaci mnoha proneoplastických drah. Aktivace dráhy JNK vede k aktivaci kaspáz a indukci apoptózy. Apoptotická signalizace je též podpořena inhibicí degradace proapoptotických proteinů (Bim, BID a Bax), zvýšením exprese proteinu NOXA a indukcí stresu endoplazmatického retikula (Wu et al., 2020).

PI jsou v uvedených indikacích velmi účinné a prodlužují dobu přežití pacientů bez progresu onemocnění i celkové přežití. V závislosti na pokročilosti onemocnění se volí ze zástupců této

terapeutické skupiny léčiv – na počátku je indikován převážně reverzibilní bortezomib, při progresi ireverzibilní karfilzomib či nověji perorálně podávaný ixazomib (Wang et al., 2021).

Navzdory zásadní roli UPS ve všech buňkách v organismu jsou PI poměrně dobře tolerovány s omezeným spektrem závažných nežádoucích účinků (Wang et al., 2021). Nicméně tato skupina léčiv je spojována se zvýšeným výskytem kardiovaskulárních nežádoucích účinků, včetně kardiotoxicity a dysfunkce levé komory (LK) typu II (Agunbiade et al., 2019; Wu et al., 2020). Celkové riziko toxického poškození myokardu a navození srdečního selhání je stále předmětem debat, stejně tak do jaké míry se toto riziko liší u jednotlivých PI a jaké faktory predeterminují pacienty k této toxicitě (Agunbiade et al., 2019; Wu et al., 2020).

**Tab. 2. Přehled klinicky používaných inhibitorů proteazomu.**

Účinná látka	Farmakodynamika	Chemická struktura	Indikace	Cesta podání
<b>bortezomib</b>	reverzibilní inhibitor $\beta 5 > \beta 1 > \beta 2$	boronát	MM a MCL	<i>i.v. /s.c.</i>
<b>karfilzomib</b>	ireverzibilní inhibitor $\beta 5 > \beta 2/\beta 1$	epoxyketon	MM	<i>i.v.</i>
<b>ixazomib</b>	reverzibilní inhibitor $\beta 5 > \beta 1$	boronát	MM	<i>p.o.</i>

MCL, lymfom plášťových buněk; MM, mnohočetný myelom; *i.v.*, intravenózní podání; *p.o.*, perorální podání; *s.c.*, subkutánní podání

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

Klinický účinek bortezomibu je ve schválených indikacích poměrně výrazný, a toto léčivo je často léčivem volby v 1. linii onemocnění. Až v pokročilejších fázích onemocnění (zpravidla po progresi onemocnění navozené farmakorezistencí) je nasazen další zástupce z této skupiny, tj. karfilzomib či ixazomib (Kiss et al., 2022). U vážných rezistentních/relabujících forem

onemocnění se ukázalo jako výhodné použití kombinační léčby těchto léčiv s ANT (např. DOX či DAU) (Sonneveld et al., 2008; Bertaina et al., 2017; Terwilliger et al., 2017). Protože se jedná o kombinaci dvou protinádorových léčiv s potenciálním kardiotoxickým potenciálem, kardiovaskulární bezpečnost této kombinace si zasluhuje pozornost, tím spíše, že dle dostupných informací se UPS patrně podílí na odstranění poškozených myokardiálních proteinů při rozvoji ANT kardiotoxicity (Kumarapeli et al., 2005; Dimitrakis et al., 2012). Nebylo možné vyloučit, že by PI mohly působit přinejmenším aditivně k ANT kardiotoxicitě, nebo dokonce, že by tuto kardiotoxicitu mohly potencovat. Z publikovaných klinických studií ovšem ke kardiovaskulární bezpečnosti této kombinace není dostatek informací. Obecně se pouze doporučuje obezřetnost a případně upřednostnění lipozomálních forem ANT chemoterapeutik (FDA data Velcade®, 2008). V experimentálních podmínkách bylo zjištěno, že v embryonálních kardiomyocytech inhibice CT-L aktivity asociované s podjednotkou  $\beta 5$ , která je cílem pro klinicky užívané PI, vede ke zvýšení toxicity ANT. V dalších studiích provedených na NVCN bylo též pozorované zvýšení cytotoxicity ANT v kombinaci s PI (Nowis et al., 2010; Hasinoff et al., 2017; Hasinoff et al., 2018). Ale nejsou k dispozici žádná data ohledně cytotoxicity této kombinace vůči kardiomyocytům izolovaným z myokardu dospělých zvířat, navzdory tomu, že se tato kombinace klinicky používá téměř výhradně u dospělých (převážně starších) pacientů. K dispozici také nebyla žádná studie, která by zkoumala vliv PI na rozvoj chronické ANT kardiotoxicity na zavedeném experimentálním *in vivo* modelu užívající dospělá pokusná zvířata.

### 1.3 Opatření využívaná k omezení antracyklinové kardiotoxicity

Toxické poškození myokardu ANT je do značné míry ireverzibilní a obtížně odpovídá na léčbu, proto je nejvýhodnější toxicitě předcházet. Jedním z přístupů k omezení kardiotoxicity v klinické praxi je **monitorování pacienta** (Celutkiene et al., 2020; Pudil et al., 2020), které je založeno na spolupráci mezi onkology a kardiology, a mělo by umožnit včasnou personalizaci léčby na základě individuálního posouzení míry rizika. Sledování pacienta je tradičně založeno na monitorování změn systolické funkce (zejména ejekční frakci LK, LVEF) nejčastěji pomocí echokardiografie. Vyšetření se provádí před léčbou, v jejím průběhu a po jejím dokončení. Nicméně takto lze detekovat až poměrně výraznější poškození myokardu navozené ANT. Citlivější se ukazují pokročilé zobrazovací metody (vyšetření pomocí magnetické rezonance nebo tzv. *strain* echokardiografie) a biomarkery toxického poškození kardiomyocytů (stanovení srdečních troponinů v plazmě či NT-proBNP) (Celutkiene et al., 2020; Pudil et al., 2020).



Běžně užívaným opatřením ke snížení rizika ANT kardiotoxicity je omezení celkové **kumulativní dávky ANT**, protože to je jeden z nejvýznamnějších nezávislých prediktorů vzniku CHSS. V současnosti je maximální kumulativní dávka omezena na 400-450 mg/m<sup>2</sup>, přičemž většina protinádorových režimů preferuje celkové kumulativní dávky ještě podstatně nižší (<300 mg/m<sup>2</sup> u DOX) (Kiss et al., 2022). Za těchto podmínek se sice podařilo snížit riziko výskytu CHSS s časným nástupem, zároveň ale v mnoha případech nemusí být dosaženo maximální terapeutické odpovědi. Je také známo, že neexistuje naprosto „bezpečná“ kumulativní dávka ANT, protože každé podání těchto léčiv představuje určité subklinické poškození myokardu (Menna et al., 2012), které se ovšem může klinicky projevit na kardiovaskulární morbiditě a mortalitě pacientů dlouhodobě přežívajících nádorové onemocnění.

Další snahou o snížení rizika ANT kardiotoxicity je využití lékových forem **pro cílenou distribuce ANT** do nádoru, čímž se sníží expozice myokardu ANT. V současnosti jsou klinicky dostupné LP s lipozomálně enkapsulovaným DOX a DAU. Většina dostupných informací u nich potvrzuje nižší výskyt kardiotoxicity (Menna et al., 2017). Na druhou stranu je pro tyto lékové formy typický výskyt palmo-plantárním syndromu (tzv. *hand-foot syndrome*), což je specifický nežádoucí účinek, jež vede k omezenému podávání u některých skupin pacientů. Užití lipozomálních ANT je schváleno jen v některých z mnoha indikací ANT, častěji u pokročilých onemocnění, kde se předpokládá dosažení vyšší kumulativní dávky.

### **1.3.1 Farmakologická kardioprotekce vůči antracyklinové kardiotoxicitě**

Farmakologická kardioprotekce patřila od počátku mezi nejstudovanější způsoby omezení ANT kardiotoxicity. Vzhledem k převládajícímu názoru o důležitosti ROS a oxidačního stresu při rozvoji ANT indukovaného poškození myokardu, byl tento výzkum od počátku mechanisticky orientován zejména na antioxidanty a „zhášeče“ ROS. Ačkoliv v této oblasti bylo publikováno velké množství experimentálních prací s nadějnými pozitivními výsledky, jejich přenositelnost do klinicky relevantnějších podmínek se ukázala být problematická (Štěrba et al., 2013). Významná pozornost byla upřena i na chelataci iontů železa, protože mohou být zásadní pro katalýzu vzniku velmi reaktivních a toxických hydroxylových radikálů, vůči kterým by antioxidanty nemusely být dostatečně protektivně účinné. K popularitě této hypotézy přispělo potvrzení kardioprotektivního účinku léčiva DEX, který je v organismu metabolizován na chelatačně aktivní metabolit podobný EDTA (Myers, 1988; Hershko et al., 1993b). Mimo to byla navržena celá řada dalších molekulárních cílů pro účinnou

kardioprotekci (Renu et al., 2018), ovšem jen část těchto výsledků byla získána z relevantních chronických *in vivo* modelů ANT kardiotoxicity a jen velmi málo z nich lze označit za obecně akceptovatelná.

#### **1.3.1.1 Antioxidanty a chelátory železa**

**Z antioxidantů** byly mezi prvními látkami studován vitamín E a acetylcystein. Obě látky vykazovaly signifikantní kardioprotektivní účinky na akutních *in vivo* modelech s užitím jedné supratherapeutické dávky ANT, ale na klinicky relevantnějších chronických experimentálních modelech vykazovaly tyto látky velmi malou či dokonce žádnou kardioprotekci (shrnuto ve (Štěrbá et al., 2013). Absence významného kardioprotektivního potenciálu vyplynula také z prospektivních randomizovaných kontrolovaných (RCT) studiích (Dresdale et al., 1982; Legha et al., 1982). Podobně byla studována řada přírodních či semisyntetických flavonoidů, ale jen málo z nich bylo hodnoceno na modelu chronické ANT kardiotoxicity. Jednou z mála výjimek byl 7-monohydroxyethyl-rutosid, u kterého byl nejdříve popsán významný protektivní účinek na modelu chronické ANT kardiotoxicity (van Acker et al., 2000), ale následně bylo zjištěno, že tento účinek není dlouhodobý (Bruynzeel et al., 2007b). Kardioprotektivní účinek této látky nebyl potvrzen ani v RCT (Bruynzeel et al., 2007a).

**Z chelatačních látek** byl zkoumán kardioprotektivní účinek u několika klinicky dostupných selektivních intracelulárních chelátorů volných iontů železa, které užívají u onemocnění spojených s přetížením organismu železem jako je např.  $\beta$ -talasemie. Kromě dostatečné selektivity je pro tato léčiva důležitá stabilita vzniklých komplexů se železem a jejich nízká redoxní aktivita, což znamená, že takto vázané ionty železa nemohou participovat na tvorbě ROS. Deferoxamin a deferipron, což jsou klinicky užívaná léčiva splňující tyto požadavky, vykazovaly určité zajímavé kardioprotektivní účinky *in vitro* a na modelech akutní ANT kardiotoxicity *in vivo*, ale jejich hodnocení na zavedených a DEX-validovaných modelech chronické ANT kardiotoxicity ale kardioprotektivní potenciál nepotvrdilo (Herman et al., 1994; Popelova et al., 2008). Zatímco v případě deferoxaminu by mohl problém souviset s hydrofilním charakterem molekuly a nízkou penetrací do kardiomyocytů, tento argument nemůže vysvětlit absenci účinku u deferipronu, který dobře proniká i do subcelulárních kompartmentů včetně mitochondrií. Částečný kardioprotektivní účinek (ovšem s paradoxní dávkovou) závislostí byl pozorován u experimentálních aroylhydrazonových chelátorů železa (Simunek et al., 2005; Šterba et al., 2006).

### 1.3.1.2 Dexrazoxan (DEX, ICRF-187)

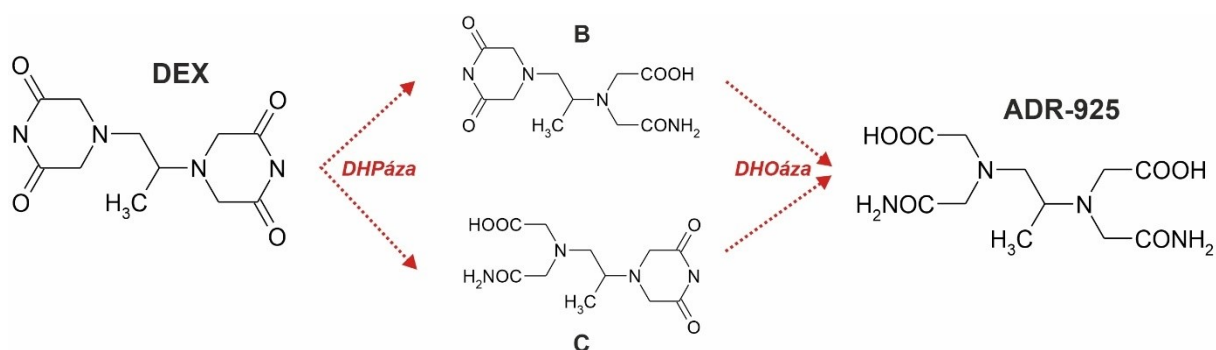
Dexrazoxan (DEX; ICRF-187) je jediným léčivem s jasně prokázaným kardioprotektivním účinkem vůči klinicky relevantním formám ANT kardiotoxicity jak v různých experimentálních modelech (*in vitro/in vivo*) (Herman et al., 1998; Štěřba et al., 2013), tak i v RCT (Reichardt et al., 2018). Většina dostupných dat se vztahuje k chronické ANT kardiotoxicitě s časným nástupem (tzv. „*early-onset*“), ale rostoucí množství klinických důkazů naznačuje, že DEX je také účinný proti pozdnímu typu kardiotoxicity (tzv. „*late-onset*“) (Chow et al., 2022).

DEX patří mezi bisdioxopiperazinové látky, u kterých jsou dva dioxopiperazinové cykly spojeny dvouuhlíkatým alifatickým řetězcem. Tyto látky byly studovány od 60. let 20. století se záměrem vyvinout protinádorová léčiva. Ačkoliv se původně mělo jednat o proléčiva, která by dobře pronikala do nádorových buněk, kde by uvolnila chelatační metabolit podobný kyselině ethylendiamintetraoctové (EDTA) vyvazující intracelulární biogenní ionty (zejména iontů železa) (Creighton et al., 1969), později bylo zjištěno že za antiproliferační účinek zodpovídá katalytická inhibice TOP2A (Tanabe et al., 1991). Většina experimentů a klinických studií v onkologii byla provedena s razoxanem (ICRF-159), který je racemickou směsí dexrazoxanu a levorazoxanu. Následně bylo zjištěno, že DEX je lépe rozpustný ve vodě, což umožňuje jeho intravenózní podání (Repta et al., 1976), a proto většina studií zaměřených na kardioprotekci již užívala téměř výhradně DEX.

Kardioprotektivní účinky DEX vůči chronické ANT kardiotoxicitě byly jasně prokázány a úspěšně reprodukovány v různých laboratořích s užitím celé škály různých experimentálních modelů zahrnující různá *species* (myš, potkan, křeček, králík, pes) (Herman et al., 1998). Bylo zjištěno, že pro kardioprotektivní účinek je důležité podání DEX před/nebo nejpozději spolu s ANT a optimální poměr dávek DEX a ANT je 10-20:1 (Herman et al., 1993; Herman et al., 1998). Kardioprotektivní účinek DEX byl potvrzen v mnoha klinických studiích nezávisle na věku, pohlaví, typu karcinomu a léčebném schématu (Reichardt et al., 2018). Díky prevenci nástupu ANT toxicity v myokardu také DEX poskytuje dlouhotrvající kardioprotektivní účinek (Lebrecht et al., 2007b; Jirkovský et al., 2013).

DEX je tradičně považován za proléčivo, které je v organismu metabolizováno hydrolyzou obou dioxopiperazinových cyklů na aktivní metabolit ADR-925 (obr. 6) (Hasinoff et al., 1998). Uvedené cykly jsou hydrolyzovány dihydropyrimidinázou a dihydroorotázou se vznikem dvou hydrolytických meziproductů (B a C). Předpokládá se, že finální metabolit ADR-925 chrání kardiomyocyty před ANT kardiotoxicitou prostřednictvím vyvázání volných iontů železa a jejich odnětí z komplexu s ANT (Hasinoff et al., 1998). Tento mechanismus je

tradičně uváděn v odborné literatuře (Cvetkovic et al., 2005; Štěrba et al., 2013; Sawicki et al., 2021) a lze ho nalézt i v platných SmPC léčivého přípravku obsahujících dexrazoxan - např. (SmPC Cyrdanax®). Nicméně je třeba podotknout, že v literatuře pro tuto teorii chybí přímý důkaz, a proto nelze vyloučit, že by mohlo jít náhodnou koincidence. Objevily se také pochybnosti, jestli je DEX proléčivem, jak se uvádí v literatuře (Hasinoff et al., 2007). Nutno také podotknout, že na rozdíl od chelátorů železa používaných u onemocnění spojených s přetížením organismu železem (viz výše) je komplex ADR-925 s ionty železa stále významně redoxně aktivní (Thomas et al., 1993). V neposlední řadě tento mechanismus nekoresponduje s nověji navrženou teorií ANT kardiotoxicity, která předpokládá, že primárním příčinou je interakce ANT s TOP2B a úloha oxidačního stresu je pouze sekundární. Ačkoliv některé *in vitro* práce (Lyu et al., 2007; Deng et al., 2014) spojovaly kardioprotektivní účinek DEX s inhibicí TOP2B, tyto poznatky byly získány pouze na proliferujících H9c2 myoblastech, které na rozdíl od terminálně diferencovaných kardiomyocytů ve skutečnosti exprimují obě izoformy TOP2 (TOP2A i TOP2B), přičemž obě jsou významně ovlivněny ANT. Spojení kardioprotekce s TOP2B tedy bylo stále velmi nejisté. Někteří jiní autoři pak význam TOP2B pro kardioprotekci DEX přímo zpochybňují a navrhují alternativní mechanismy účinku (McCormack, 2018).



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

Přestože kardioprotektivní účinky DEX jsou doloženy mnoha klinickými studiemi (shrnuto v Reichardt et al. (2018)), toto léčivo se v současné klinické praxi užívá jen velmi omezeně. Důvodem je zejména obava z nežádoucích účinků. DEX může v kombinaci ANT navodit myelosupresi, a to byl i jeden z důvodů pro doporučení snížení poměr DEX k ANT v klinické praxi z 20:1 na 10:1 (Reichardt et al., 2018). Dalším zmiňovaným potenciálním nežádoucím účinkem DEX je riziko ovlivnění protinádorové účinnosti a riziko vzniku sekundárních malignit. Obavy z těchto nežádoucích účinků a související předběžná opatrnost měly na osud

klinického užití DEX velký dopad, ačkoliv pro významnou asociaci těchto komplikací s DEX s těmito léčivými neexistují přesvědčivé důkazy (Simmons, 2019).

**Podezření na ovlivnění protinádorové účinku** vzešlo jedné ze dvou klinických studií fáze III, kde DEX v kombinaci s DOX v porovnání s placebem vedl k nižší četnosti nádorové odpovědi (ORR; *objective response rate*) v porovnání se samotným DOX (Swain et al., 1997). Žádný z dalších parametrů hodnotící terapeutický účinek ale nebyl významně ovlivněn, včetně celkového přežití, a druhá paralelně probíhající studie s téměř totožným designem nenašla žádný vliv na jakýkoliv parametr terapeutické účinnosti. Z důvodu předběžné opatrnosti bylo ale použití DEX v klinické praxi omezeno, a to pouze na dospělé pacienty léčené vyššími kumulativními dávkami (> 300 mg/m<sup>2</sup> DOX). Ačkoliv žádná další klinická studie nepotvrdila významný vliv DEX na protinádorový účinek ANT (van Dalen et al., 2011; Reichardt et al., 2018), původní doporučení užívat DEX jen při vysokých kumulativních dávkách ANT zůstalo nezměněno.

Dalším potenciálním rizikem spojovaným s užitím DEX bylo **zvýšené riziko sekundárních malignit**. Toto podezření se objevilo zejména díky studii Tebbi et al. (2007), která naznačila, že by současné podání DEX s DOX (v protokolu obsahující také rizikový etoposid) mohlo zvýšit výskyt sekundárních malignit u pediatrických pacientů. Tato studie vzbudila obavy o poměru *risk vs. benefit* této léčby, což vyústilo k rozhodnutí EMA o paušální kontraindikaci užití DEX u dětí (Reichardt et al., 2018). Toto rozhodnutí Evropské lékové agentury (EMA) bylo schváleno i přes četné limitace v designu studie (Lipshultz et al., 2007). Rozhodnutí EMA o kontraindikaci DEX v léčbě pediatrických pacientů bylo změněno až v roce 2017 po publikaci dat z nových klinických studií, které popsaly benefit plynoucí z užití DEX bez významného zvýšeného rizika sekundárních malignit (Reichardt et al., 2018).

I přesto je v současnosti podávání DEX doporučeno jen u dětí i dospělých léčených ANT po překročení kumulativní dávky (300 mg/m<sup>2</sup> u DOX), což vede k velmi malému užití v klinické praxi (vyšší kumulativní dávky ANT se dnes užívají jen u malého procenta pacientů). Navzdory důkazům i recentním odborným diskusím zůstávají tato doporučení pro klinickou praxi nezměněna (Simmons, 2019; Benjamin et al., 2021).

### **1.3.1.3 Léčiva používaná k neurohormonální blokádě u CHSS**

Protože výzkum nových kardioprotektiv pro ochranu myokardu před ANT kardiotoxicitou nepřinesl kromě DEX žádné jiné léčivo, které by bylo použitelné v klinické praxi, zájem odborné veřejnosti se postupně přesunul k léčivům již klinicky užívaným, jež lze bezpečně použít i u pacientů léčených ANT. Největší pozornost byla věnována léčivům užívaných pro

neurohormonální blokádu při léčbě CHSS typu HFrEF (srdeční selhání se sníženou ejekční frakcí) – tedy **inhibitorům angiotenzin konvertujícího enzymu (ACEi), blokátorům receptorů AT1 pro angiotensin II (sartanům), β-blokátorům a antagonistům mineralokortikoidních receptorů**. Tato léčiva se běžně užívají pro léčbu HFrEF bez ohledu na jeho etiologii, včetně CHSS navozeného ANT (Zamorano et al., 2016). Jejich komplexní farmakologické účinky, které zřejmě zahrnují i inhibici oxidačního stresu v myokardu, zánětu a prevenci patologické remodelaci myokardu, vzbudily zájem o využití jejich potenciálu jednak v sekundární prevenci ANT kardiotoxicity (tj. při nasazení v průběhu či po dokončení chemoterapie ANT při detekci prvních známek kardiotoxicity), tak i v primární prevenci (tj. podání před první dávkou ANT a pokračování léčby po celou dobu chemoterapie ANT)(Vuong et al., 2022).

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

**Z β-blokátorů** byly na experimentálních modelech ANT kardiotoxicity získány poměrně zajímavé výsledky u karvedilolu (Matsui et al., 1999; Santos et al., 2002). Toto léčivo je známo svými přímými antioxidačními účinky, které byly dávány do souvislosti s jeho kardioprotektivním potenciálem vůči ANT kardiotoxicitě (atenolol podávaný za stejných podmínek účinný nebyl). Některé z těchto studií ale užívaly intenzivní schémata podání DOX (3x týdně po 2 týdny) (Matsui et al., 1999), kde přenositelnost výsledků do klinické situace nikdy nebyla ověřena. Klinické studie s β-blokátory vedly ke smíšeným výsledkům. První pilotní studie, která využila karvedilol pro primární prevenci ANT kardiotoxicity u pacientů s relativně vysokými kumulativními dávkami ANT zaznamenala výrazný signifikantní benefit z hlediska prevence systolické dysfunkce (hlavním sledovaným parametrem byla LVEF) (Kalay et al., 2006). Naproti tomu v podstatně větší a novější studii s karvedilolem, nebyl zaznamenán žádný benefit (Avila et al., 2018) a obdobně tomu bylo ve studii s metoprololem (Georgakopoulos et al., 2010; Gulati et al., 2016).

**ACEi jako kardioprotektiva vůči chronické ANT kardiotoxicitě.** ACEi jsou dlouho užívány u pacientů s ANT navozenou srdeční dysfunkcí (Zamorano et al., 2016). Studie

Cardinale et al. (2006) ukázala, že by tato léčiva mohla mít místo i v sekundární prevenci u pacientů vykazujících subklinické poškození myokardu (Cardinale et al., 2006). V této studii byl hodnocen účinek enalaprilu u pacientů, kteří podstoupili léčbu vyššími dávkami ANT a bylo u nich zjištěno zvýšení srdečního troponinu I v plazmě (léčba ACEi byla zahájena měsíc po chemoterapii a trvala 1 rok). Podávání enalaprilu u těchto pacientů snížilo koncentrace srdečního troponinu I v plazmě a zabránilo poklesu systolické funkce LK. Tyto velmi zajímavé výsledky vyvolaly značnou odezvu u odborné veřejnosti a podnítily hypotézu, že by ochranné účinky ACEi na myokard mohly být využitelné i v primární prevenci ANT-indukované kardiotoxicity s cílem zabránit či významně omezit samotné navození této toxicity (Vuong et al., 2022).

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

V této oblasti bylo provedeno relativně velké množství experimentálních studií (shrnuto v Sobczuk et al. (2020)). Ty ale vedly k velmi heterogenním výsledkům a z dostupných dat

nebylo možné nalézt odpovědi na výše uvedené otázky. Při bližším prozkoumání je zjevné, že bylo provedeno jen málo studií zkoumající účinek ACEi v primární prevenci na klinicky relevantním experimentálním modelu chronické ANT kardiotoxicity s dostatečným FU po ukončení opakovaného podávání ANT. Pozornost také prozatím nebyla věnována tomu, co se děje po vysazení léčby ACEi po dokončení chemoterapie. Také není jasné, jestli se potenciální kardioprotektivní účinek ACEi liší kvalitativně či kvantitativně od klinicky užívaného DEX. Žádná z provedených studií také nezkoumala, jestli ACEi mohou ovlivnit ANT-indukované a TOP2B-depedetní poškození DNA a spuštění DDR signalizace v myokardu.



## 2 Cíle disertační práce

*Cíle této disertační práce byly následující:*

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

## 3 Výsledky

### 3.1 Publikované práce komentované v této disertaci

#### Publikace č. 1:

**Pokorná Z.**, Jirkovský E., Hlaváčková M., Jansová H., Jirkovská A., Lenčová-Popelová O., Brázdová P., Kubeš J., Sotáková-Kašparová D., Mazurová Y., Adamcová M., Vostatková L., Holzerová K., Kolář F., Šimůnek T., Štěřba M. *In vitro* and *in vivo* investigation of cardiotoxicity associated with anticancer proteasome inhibitors and their combination with anthracycline. *Clin Sci (Lond)*. 2019 Aug 27;133(16):1827-1844. doi: 10.1042/CS20190139. Přijato k publikaci 13. 8. 2019.

IF<sub>2019</sub> = 5,223 (Q1); AIS<sub>2019</sub> = 1,327 (Q1)

#### Publikace č. 2:

**Pokorná Z.**, Kollárová-Brázdová P., Lenčová-Popelová O., Jirkovský E., Kubeš J., Mazurová Y., Adamcová M., Holečková M., Palička V., Šimůnek T., Štěřba M. Primary prevention of chronic anthracycline cardiotoxicity with ACE inhibitor is temporarily effective in rabbits, but benefits wane in post-treatment follow-up. *Clin Sci (Lond)*. 2022 Jan 14;136(1):139-161. doi: 10.1042/CS20210836. Přijato k publikaci 8. 12. 2021.

IF<sub>2020</sub> = 6,124 (Q1); AIS<sub>2020</sub> = 1,568 (Q1)

#### Publikace č. 3:

Jirkovský E., Jirkovská A., Bavlovič Piskáčková H., Skalická V., **Pokorná Z.**, Karabanovich G., Kollárová-Brázdová P., Kubeš J., Lenčová-Popelová O., Mazurová Y., Adamcová M., Lyon A. R., Roh J., Šimůnek T., Štěřbová-Kovaříková P., Štěřba M. Clinically translatable prevention of anthracycline cardiotoxicity by dexrazoxane is mediated by topoisomerase II beta and not metal chelation. *Circ Heart Fail*. 2021; 14:e008209.

doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.120.008209. Přijato k publikaci 17. 8. 2021.

IF<sub>2020</sub> = 8,846 (Q1); AIS<sub>2020</sub> = 3,335 (D1/Q1)

## 3.2 Komentáře k publikovaným pracím

### Publikace č. 1:

**Pokorná Z.**, Jirkovský E., Hlaváčková M., Jansová H., Jirkovská A., Lenčová-Popelová O., Brázdová P., Kubeš J., Sotáková-Kašparová D., Mazurová Y., Adamcová M., Vostatková L., Holzerová K., Kolář F., Šimůnek T., Štěrba M. *In vitro and in vivo investigation of cardiotoxicity associated with anticancer proteasome inhibitors and their combination with anthracycline. Clin Sci (Lond).* 2019 Aug 27;133(16):1827-1844. doi: 10.1042/CS20190139.

Přijato k publikaci 13. 8. 2019.

$IF_{2019} = 5,223 (Q1)$ ;  $AIS_{2019} = 1,327 (Q1)$

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

Na *in vivo* modelu chronické ANT kardiotoxicity navozené opakovaným podáváním DAU dospělým samcům králíka (3 mg/kg, i.v., 1x týdně po 10 týdnů) bylo studováno, jestli bude mít maximálně tolerovaná dávka obou PI v kombinaci s DAU významný vliv na závažnost ANT kardiotoxicity. Kombinace obou PI s DAU neměla významný vliv na funkční, morfologické, biochemické a molekulární aspekty chronické ANT kardiotoxicity. V myokardu LK zvířat, kterým byl chronicky podáván DAU, byly zjištěny významné změny molekulárních

markerů poruchy proteinové homeostázy (např. zvýšená exprese GRP78 a HSP70 či zvýšené zastoupení polyubikvitinovaných proteinů). Nicméně kombinace DAU s oběma PI v chronickém experimentu na tyto změny neměla žádný významný vliv. Chronická ANT kardiotoxicita byla též spojená s indukcí T-L aktivity proteazomu v myokardu LK, ale kombinace DAU s PI tento náález nijak neovlivnila. Stanovení aktivity proteazomu v myokardu LK 2 h po akutním podání obou PI králíkům potvrdilo významnou inhibici CT-L aktivity, která je hlavním cílem pro oba PI, zatímco vliv na T-L aktivitu nebyl významný. Nicméně 24 h po podání obou PI se CT-L aktivita proteazomu v myokardu vrátila k původním hodnotám. Relativně krátkodobý účinek obou PI na aktivitu proteazomu v myokardu a absence jejich účinku na T-L aktivitu proteazomu, která je u ANT kardiotoxicity významně indukována, by mohly vysvětlit proč, oba PI nezvyšují riziko ANT kardiotoxicity a CHSS na experimentálním modelu u králíka.

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

## Publikace č. 2:

**Pokorná Z.**, Kollárová-Brázdová P., Lenčová-Popelová O., Jirkovský E., Kubeš J., Mazurová Y., Adamcová M., Holečková M., Palička V., Šimůnek T., Štěrba M. Primary prevention of chronic anthracycline cardiotoxicity with ACE inhibitor is temporarily effective in rabbits, but benefits wane in post-treatment follow-up. *Clin Sci (Lond)*. 2022 Jan 14;136(1):139-161. doi: 10.1042/CS20210836. Přijato k publikaci 8. 12. 2021.

IF<sub>2020</sub> = 6,124 (Q1); AIS<sub>2020</sub> = 1,568 (Q1)

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

Zjištěný přínos podávání perindoprilu byl ale významně nižší při následném 3týdenním sledování pokusných zvířat po ukončení podávání DAU. Po vysazení perindoprilu došlo k významnému vzestupu plazmatických koncentrací cTnT, rozvoji degenerativních změn v kardiomyocytech a poklesu systolické funkce LK. Většina molekulárních parametrů studovaných v myokardu LK se též přiblížila výsledkům pozorovaným ve skupině se samotným DAU. Zvýšení dávky perindoprilu (na 0,1 mg/kg/den) nemělo na změnu v FU

žádný pozitivní vliv. Při delším (10týdenním) FU bez podávání léčiv došlo významné progresi systolické dysfunkce LK, což bylo provázeno závažnějším morfologickým poškozením myokardu, známkami oběhového městnání jakož i mortalitou související s CHSS. Pokračování podávání perindoprilu i v období FU tento trend nezvrátilo, ale zabránilo rozvoji nejtěžších forem CHSS a morfologického poškození myokardu, což vysvětlilo absenci předčasných úhynů. Tato data ukázala, že účinek perindoprilu na ochranu myokardu před známkami chronické ANT kardiotoxicity není trvalý, což jasně kontrastovalo s účinkem DEX, který v přechodí studii naší skupiny na stejném modelu s 10týdenním FU bez další léčby navodil velmi robustní a dlouhotrvající ochranu bez jakékoliv progresy ve FU.

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

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

### Publikace č. 3:

Jirkovský E., Jirkovská A., Bavlovič Piskáčková H., Skalická V., **Pokorná Z.**, Karabanovich G., Kollárová-Brázdová P., Kubeš J., Lenčová-Popelová O., Mazurová Y., Adamcová M., Lyon A. R., Roh J., Šimůnek T., Štěrbová-Kovaříková P., Štěřba M. Clinically translatable prevention of anthracycline cardiotoxicity by dexrazoxane is mediated by topoisomerase II beta and not metal chelation. *Circ Heart Fail.* 2021; Oct 14:e008209.

doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.120.008209. Přijato k publikaci 17. 8. 2021.

IF<sub>2020</sub> = 8,846 (Q1); AIS<sub>2020</sub> = 3,335 (D1/Q1)

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

Série dalších experimentů naopak ukázala, že by za kardioprotektivní účinek DEX mohla zodpovídat interakce jeho parentní molekuly s enzymem TOP2B. Na rozdíl od metabolitů DEX je jeho parentní molekula účinným katalytickým inhibitorem TOP2B *in vitro* v koncentracích, které odpovídají plazmatickým koncentracím navozujícím kardioprotektivní účinek v experimentu i v klinické praxi. DEX (ale nikoliv jeho metabolity) také indukují depleci enzymu TOP2B v NVCM *in vitro* a myokardu králíka *in vivo* za podmínek, kdy toto léčivo navozuje kardioprotektivní účinky. DEX na rozdíl od jeho metabolitu také chrání NVCM *in vitro* před poškozením DNA navozeným DAU. Vztah kardioprotektivního účinku

DEX k inhibici TOP2B byl také podpořen experimenty s jeho novým ethylmethyl derivátem (EDM). Tato látka tvoří dva diastereoizomery (EDMa a EDMb), jejichž metabolity mají téměř shodnou schopnost odnímat ionty železa z komplexu s ANT. Tyto diastereoizomery se ale podstatně liší ve schopnosti chránit NVCM *in vitro* před cytotoxicitou ANT a tento účinek dobře koreloval s jejich rozdílnou schopností inhibovat enzym TOP2B.

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

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



## 4 Diskuse

Kardiotoxicita protinádorové léčby představuje závažný problém, jehož klinická relevance byla paradoxně umocněna úspěchem onkologické léčby vedoucím k významného prodloužení života pacientů. Se zvyšujícím se množstvím dlouhodobě přežívajících pacientů je nutné pečlivěji sledovat celkové dopady onkologické léčby na morbiditu, mortalitu a kvalitu života těchto pacientů. Z dostupných informací je zjevné, že dlouhodobé dopady kardiiovaskulární toxicity mohou být velmi významné (Oeffinger et al., 2006). Z tradičních chemoterapeutik je riziko kardiotoxicity a CHSS nejčastěji spojováno s ANT, ale dnes je zřejmé, že kardiotoxicita se pojí i s řadou biologicky cílených léčiv včetně PI (Ewer et al., 2015; Wu et al., 2020). Z hlediska reverzibility, histopatologických změn v myokardu a dalších aspektů se jedná o odlišné typy kardiotoxicity. ANT kardiotoxicita se v literatuře označuje jako typ I a je charakterizována z velké části nevratným poškozením myokardu s typickým histopatologickým obrazem a s jasnou závislostí na podané kumulativní dávce. U biologických léčiv mluvíme o typu II kardiotoxicity (Ewer et al., 2015), jež je charakterizována poškozením myokardu bez typického histopatologického obrazu, které je přinejmenším z části reverzibilní a je na dávce patrně nezávislé. Ačkoliv biologicky cílená léčiva mají v monoterapii kardiotoxický potenciál spíše omezený, jejich současné podání spolu s ANT může přinést dramatické zvýšení toxického poškození struktury a funkce myokardu, což bylo s překvapením pozorováno v prvních klinických studiích se současným podáním ANT a trastuzumabu (Slamon et al., 2001).

Poznatky o relativním riziku kardiotoxicity a vzniku CHSS byly u PI a jejich kombinace s ANT před publikací naší práce (Publikace č. 1) jen omezené. Údaje z některých klinických studií ukazovaly na možné riziko srdeční dysfunkce po podávání PI (Koulaouzidis et al., 2017; Wu et al., 2020). Informace o kardiiovaskulární bezpečnosti jejich kombinace s ANT v klinických podmínkách zcela chyběly. Bylo tedy možné pracovat jen s experimentálními daty, a to konkrétně s výsledky z *in vitro* experimentů, které opakovaně popisovaly možné zvýšení rizika kardiotoxicity při kombinaci těchto léčiv (Nowis et al., 2010; Hasinoff et al., 2017). Obavy o kardiiovaskulární bezpečnost léčby PI též podporovaly i informace z literatury o zásadním fyziologickém významu UPS pro udržení proteinové homeostázy myokardu (Shukla et al., 2019; Maejima, 2020). Dlouhodobého přežití těchto terminálně diferencovaných a velmi specializovaných buněk je do značné míry podmíněno jejich schopností efektivně se vypořádávat s poškozenými proteiny (např. oxidací či pouze špatným „poskládáním“) (Christians et al., 2012; Myeku et al., 2018). Dle některých názorů je dysregulace UPS také podstatnou součástí patogeneze chronické ANT kardiotoxicity (Liu et al., 2008b; Sishi et al.,

2012; Sishi et al., 2013). Významné změny ve funkci UPS byly také pozorovány v myokardu králíka s experimentálně navozenou ANT kardiotoxicitou (Sterba et al., 2011; Lencova-Popelova et al., 2014). Jiní autoři spojují dysfunkci proteazomu také s patogenezí CHSS a řady kardiomyopatií (Maejima, 2020).

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

Opakované podání PI v monoterapii u králíka nenavodilo žádné známky kardiotoxického působení. Použité dávky byly přitom velmi podobné těm, které byly užity pro studium embryo-fetální toxicity u králíka (Bray, 2012). Nicméně je možné, že expozice myokardu mohla být v monoterapii PI submaximální, protože dávkování těchto léčiv bylo v našich pokusech primárně odvozeno od jejich tolerability v kombinaci s ANT. Jelikož bylo zjištěno, že se efektivní inhibice proteazomu v myokardu po podání PI relativně rychle navrácí k původním hodnotám, absence toxického poškození myokardu v monoterapii PI u mladých zdravých zvířat nemusí být překvapující. V předchozí práci (Nowis et al., 2010) byla ale u bortezomibu podávaného 3x týdně na modelu potkana pozorována významná dysfunkce LK. Stejný podání bortezomibu v našich podmínkách králíkům ovšem vedlo k časným úhynům z

extrakardiálních příčin bez významných známek kardiotoxicity, což svědčí o významně supratherapeutické expozici. V další studii (van Hees et al., 2008) nebyla pozorována srdeční dysfunkce *in vivo* na modelu u potkana při podání bortezomibu 2x týdně a ani opakované podání tohoto léčiva myším s xenotransplatací lidských nádorových buněk nevedlo k navození kardiotoxicity při expozici zajišťující významný protinádorový účinek (LeBlanc et al., 2002). Tyto údaje naznačují, že kardiotoxicita obou studovaných PI je v monoterapii v klinicky relevantních dávkách u mladých dospělých pokusných zvířat spíše omezená.

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

Ačkoliv PI nenavozovaly významnou kardiotoxicitu v myokardu zdravých králíků, při současném rozvoji toxického poškození myokardu ANT by mohl být výsledek odlišný, proto jsme se na tuto hypotézu zaměřili. V podmínkách *in vitro* bylo ovšem zjištěno, že se mohou podstatně lišit data získaná s užitím primárních kardiomyocytů izolovaných z myokardu novorozeného a dospělého potkana (tj. NVCM a AVCM). Kombinace obou PI (v koncentracích kolem jejich  $c_{max}$  v plazmě) s klinicky relevantními koncentracemi ANT vedla k signifikantnímu nárůstu toxicity u NVCM, což odpovídá výsledkům publikovaným v literatuře (Nowis et al., 2010; Hasinoff et al., 2017; Hasinoff et al., 2018). Zvýšení toxicity ANT při kombinaci s experimentálně užívaným inhibitorem PI bylo též popsáno v literatuře s užitím myších embryonálních kardiomyocytů (Spur et al., 2016). Nicméně stejný pokus provedený na AVCM v Publikaci č.1 žádné významné ovlivnění toxicity ANT nezaznamenal

a výsledná cytotoxicita byla podobná jako u samotného ANT. Tyto výsledky byly velmi dobře reprodukovatelné a nezávislé i na použité metodě stanovení cytotoxicity. Důvodem těchto výsledků také nemohla být absence významných inhibičních účinků na aktivitu proteazomu v AVCM, protože naše pokusy prokázaly paradoxně ještě výraznější efekt než v NVCM (včetně ovlivnění T-L aktivity). Zároveň byly v těchto experimentech poprvé popsány podstatné rozdíly v bazální (fyziologické) proteazomové aktivitě (CT-L a T-L) mezi oběma typy primárních kardiomyocytů, což by mohlo kodeterminovat některé rozdílné výsledky pozorované na těchto *in vitro* modelech v našich experimentech. Protože tato léčiva se užívají pouze u dospělých pacientů, upřednostnění NVCM modelu před AVCM patrně zkreslilo (nadhodnotilo) reálné riziko kardiotoxicity plynoucí z kombinace ANT a PI ve většině předchozích publikací.

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

Nelze vyloučit, že by vyšší expozice myokardu těmto PI by mohla vést k významnějším dopadu na ANT kardiotoxicitu. Nicméně ANT navozené poškození myokardu králíka bylo v našich podmínkách poměrně výrazné (u části zvířat to dokonce vedlo k terminální fázi CHSS s předčasnými úhyny). V případě významné účasti proteazomu na patogenezi ANT kardiotoxicity by tedy bylo očekávatelné, že by i menší expozice myokardu PI mohla mít významný dopad na závažnost ANT kardiotoxicity. Protože k tomu nedošlo, je pravděpodobnější, že dysfunkce UPS hraje v rozvoji chronické ANT-kardiotoxicity spíše

menší a/nebo pouze sekundární roli. Získané výsledky by také mohly naznačovat, že oba klinicky užívané PI také neovlivňují závažnost CHSS bez ohledu na jeho etiologii. V jedné z publikovaných prací bortezomib podávaný 2x týdně v klinicky relevantních dávkách, také nevykazoval významný vliv na závažnost CHSS experimentálně navozeného infarktem myokardu (van Hees et al., 2008).

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

Další dvě studie, jež jsou součástí tohoto komentovaného souboru jsou zaměřeny na problematiku farmakologické ochrany myokardu vůči chronické ANT kardiotoxicitě. První z těchto prací se zaměřuje na studium kardioprotektivních účinků ACEi při jejich podání v primární prevenci chronické ANT-kardiotoxicity na experimentálním modelu u králíka. Druhá práce si kladla za cíl objasnění mechanismů kardioprotektivních účinků klinicky užívaného kardioprotektiva DEX. Zatímco starší práce a platné SmPC uvádějí, že DEX navozuje kardioprotekci prostřednictvím chelatace iontů železa a prevenci ANT indukované tvorby ROS v myokardu (SmPC Cyrdanax®), tedy tzv. nespecifický mechanismus účinku zprostředkovaný fyzikálně-chemickými vlastnostmi jeho metabolitu, některé novější teorie zmiňují možnost specifické interakce ANT s TOP2B jako cílovou molekulou (Deng et al., 2014). Jiné práce ale souvislost mezi kardioprotekcí DEX a TOP2B interakcí zpochybňují (McCormack, 2018). DEX se v dnešní v klinické praxi bohužel užívá jen velmi omezeně a žádné jiné kardioprotektivum se do klinické praxe zatím nedostalo. Proto se řada autorů zaměřila na zkoumání potenciálně kardioprotektivních účinků zavedených skupin léčiv jako jsou ACEi a další léčiva užívaná pro léčbu CHSS typu HFrEF. K tomuto zájmu podstatně přispěla data o možném protektivním účinku těchto léčiv při užití v sekundární prevenci ANT kardiotoxicity u rizikových pacientů s elevací srdečních troponinů po chemoterapii obsahující ANT (Cardinale et al., 2006). Ačkoliv bylo provedeno i několik klinických studií s podáváním ACEi v primární prevenci (tj. při podávání v průběhu celé chemoterapie), stále není zřejmé, jestli tato léčba předchází poškození myokardu, tj. zabraňuje indukci primárního toxického poškození, nebo jenom mírní jeho progresi směrem k detekovatelné či klinicky manifestní

ANT-kardiotoxicitě. S tímto souvisí otázka, jak moc je taková kardioprotekce dlouhodobě účinná (i po vysazení léčby ACEi) a do jaké míry se podobá účinkům popsaným u klinicky užívaného kardioprotektiva DEX.

Při studiu kardioprotektivních účinků ACEi v Publikaci č. 2 byla zjištěna řada nových informací. Prvním zajímavým zjištěním bylo, že podání ACEi v primární prevenci může mít v období postupného rozvoje ANT kardiotoxicity překvapivě výrazný vliv na většinu studovaných parametrů. Týden po ukončení podávání ANT (tj. již po vysazení ACEi a jeho majoritního vyloučení z organismu) byl jasně patrný benefit z léčby ACEi, a to nejen na rozvoj systolické dysfunkce LK a oběhové měštnání s předčasnými úhyny, ale inhibován byl evidentně i rozvoj degenerativního poškození kardiomyocytů. Zjištěný pozitivní vliv ACEi na ANT toxicitu by mohl korespondovat s některými nadějnými nálezy z experimentálních studií bez dostatečného následného sledování pokusných zvířat (Sobczuk et al., 2020). Naše výsledky dále naznačují, že tento účinek ACEi by mohl souviset s ovlivněním molekulárních mechanismů přinejmenším částečně regulovaných systémem renin-angiotensin aldosteron (RAAS) (Ghigo et al., 2016; Forrester et al., 2018; Renu et al., 2018). Konkrétně by to mohla být inhibice zánětlivé reakce, prevence dysregulace hemostázy vápníku a ROS, zmírnění poruchy mitochondriální biogeneze a inhibice patologické remodelace extracelulární matrix.

Nicméně z následného 3-10týdenního sledování zvířat po chemoterapii DAU bez dalšího podávání ACEi bylo zřejmé, že dochází významnému oslabení výše popsaného benefitu podání ACEi, včetně výskytu těžkých forem CHSS s předčasnými úhyny. Tento trend byl zřejmý z většiny hodnocených parametrů (včetně degenerativních změn v kardiomyocytech) a nebylo jej možné ovlivnit zvýšením dávky ACEi. Benefit z podávání ACEi v primární prevenci ANT kardiotoxicity tedy není stálý a může se lišit v závislosti na délce následného sledování po ukončení chemoterapie. Tento zajímavý nálezn zatím nebyl v literatuře jasně popsán. Nutno dodat, že většina experimentálních prací se dlouhodobým sledováním pokusných zvířat po ukončení chronického podávání ANT nezabývala a když byl FU zahrnut v designu studie, tak byl často krátký (např. 2 týdny od poslední dávky ANT (Boutagy et al., 2020)). V literatuře byly také popsány smíšené či nesignifikantní výsledky týkající se účinku ACEi či sartanů v primární prevenci ANT navozené dysfunkce LK s různě dlouhým FU (Vaynblat et al., 2002; Hiona et al., 2011; Akolkar et al., 2015; Boutagy et al., 2020). Není vyloučeno, že se těchto výsledcích již mohl odrážet snižující se benefit z podávání ACEi s odstupem od ukončení chronického podávání ANT, ale protože až na řídké výjimky nebyly studovány změny sledovaných parametrů v čase, tento trend nemusel být rozpoznán. Délka zvoleného FU, pak mohla mít významný vliv na velikost zjištěného přínosu v těchto studiích.

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

Výsledky naší práce ukazují, že přinejmenším za experimentálních podmínek se kardioprotekce indukovaná ACEi a DEX zásadně liší. V předchozí práci provedené naší skupinou na totožném modelu u králíka (Jirkovský et al., 2013) podávání DEX (před každou dávkou ANT) zajistilo téměř kompletní kardioprotekci, a to jak na konci chronického podávání ANT, tak i po 10 týdnech FU. Dokonce i parciální protekce navozená DEX na témže modelu při zahájení podávání tohoto léčiva až po dosažení kumulativní dávky ANT 300 mg/m<sup>2</sup> (tj. od 7. dávky DAU) nedoznala žádných změn v průběhu FU. Kardioprotektivní účinek DEX je tedy zjevně velmi stálý bez ohledu na odstup od dokončení chemoterapie, což plyne i z další experimentální práce (Lebrecht et al., 2007a) s ještě delším FU (30 týdnů). Údaje o dlouhodobém benefitu z léčby DEX jsou také dostupné z klinických studií (Reichardt et al., 2018; Chow et al., 2022).

Další publikace v tomto souboru komentovaných prací (Publikace č.3) byla zaměřena na studium mechanismů kardioprotektivních účinků DEX. Sérií farmakokineticky řízených *in vitro* a *in vivo* experimentů s exogenním podání domnělého aktivního metabolitu ADR-925 bylo dosaženo výsledků, které odporují hypotéze, že kardioprotektivní účinek DEX závisí na chelatačních vlastnostech jeho hlavního metabolitu. Tyto výsledky ale poměrně dobře zapadají do celé řady informací dostupných v literatuře. Kardioprotektivní potenciál ADR-925 totiž nebyl pozorován ani v předchozí *in vitro* práci (Hasinoff et al., 2003), avšak tento výsledek byl dáván do zdánlivě logické souvislosti s hydrofilním charakterem této molekuly, který by mohl způsobit nízkou penetraci ADR-925 sarkolemou do kardiomyocytů. Naše výsledky ale vyvrátily tento předpoklad, jelikož intracelulární expozice byla po inkubaci kardiomyocytů s ADR-925 ještě větší než po inkubaci s DEX, což může být z části dáno i aktivním transportem

ADR-925 do buněk (Jirkovský et al., 2018). Také je třeba připomenout, že ADR-925 tvoří s volnými ionty železa komplexy, kterou jsou stále redoxně aktivní (Thomas et al., 1993), což je v rozporu s předpokládanou ochranou myokardu před oxidačním poškozením navozeným ANT. Tyto výsledky také osvětlují, proč v předchozích pokusech lipofilnější deriváty ADR-925 se snadněji penetrující do intracelulárního kompartmentu kardiomyocytu nevykazovaly žádný kardioprotektivní potenciál (Jirkovská-Vávrová et al., 2015). Tyto výsledky také pomohly vysvětlit, proč řada derivátů DEX neměla žádnou kardioprotektivní aktivitu, ačkoliv mohly být podobně jako DEX metabolizované na chelatující metabolity blízké ADR-925 (Martin et al., 2009; Jirkovská-Vávrová et al., 2015; Kollárová-Brázdová et al., 2020; Jirkovská et al., 2021). Ve světle těchto výsledků je také zřejmé, proč účinnější a selektivnější chelátory železa, které tvoří redoxně inaktivní komplexy s těmito ionty (např. deferoxamin či deferipron) neposkytovaly podobný kardioprotektivní účinek jako DEX (Herman et al., 1994; Popelova et al., 2008).

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



Z recentních výsledků obecně vyplývá, že kardioprotektivní účinek DEX je založen na interakci parentního léčiva s TOP2B vedoucí k tzv. katalytické inhibici aktivity tohoto enzymu bez poškození DNA. Tímto může být tento enzym chráněn před účinkem ANT, který by jinak jako tzv. topoizomerázový jed navodil poškození DNA s dvojitými zlomy. Tento nálezn byl potvrzen v Publikaci č. 3 stanovením fosforylace histonu H2AX, což je marker poškození DNA. Tato teorie odpovídá výsledkům hodnocení DDR v myokardu po akutním podání ANT v Publikaci č.2. Zde podání DEX před ANT velmi efektivně zabránilo ANT indukované aktivaci DDR signalizaci v myokardu králíka za podmínek, kdy toto léčivo působí kardioprotektivně v chronickém experimentu. Recentní práce naší skupiny také ukázala, že inhibiční účinek derivátů DEX vůči ANT indukované DDR v myokardu velmi dobře koreluje s jejich kardioprotektivní účinností vůči chronické ANT kardiotoxicitě (Kollárová-Brázdová et al., 2021). Protože stejný účinek DEX lze očekávat i na TOP2A v nádorových buňkách, vyvstává otázka, jestli DEX a jeho deriváty stejným mechanismem nemohou chránit i nádorové buňky před toxicitou ANT. Výsledky prezentované v Publikaci č. 3, další výsledky naší skupiny (Jirkovská et al., 2021; Kollárová-Brázdová et al., 2021) i data publikována jinými autory (Pearlman et al., 2003) tuto obavu nepotvrzují. Mechanistické vysvětlení těchto nálezů si ale vyžádá další studium.

Všechna tato data dobře korespondují s průlomovou prací prokazující, že podmíněná genetická delece TOP2B v kardiomyocytech zabraňuje indukci ANT kardiotoxicity (Zhang et al., 2012). Kardioprotekce DEX tedy zřejmě směřuje přímo k iniciálnímu kroku vedoucím k indukci ANT kardiotoxicity, proto předchází navození toxicity a poskytnutý benefit je evidentně trvalý. Naopak ACEi, který dle výsledků prezentovaných v Publikaci 2 nemá na TOP2B žádný účinek, neovlivňuje ANT navozenou DDR signalizaci v myokardu po podání ANT, a proto poskytuje pouze dočasný benefit, který je patrně založen na ovlivnění nižších úrovní patogeneze rozvíjejícího se toxického poškození a srdeční dysfunkce. Tomu že ACEi neovlivňují primární příčiny ANT kardiotoxicity by mohly odpovídat i výsledky klinické studie ICOS ONE (Cardinale et al., 2018). Zde totiž užití ACEi v primární a sekundární prevenci ANT kardiotoxicity vedlo k identickým výsledkům, což patrně znamená, že ovlivnění iniciálních mechanismů pro účinek těchto léčiv není klíčové. Pokračování klinické studie PRADA (*Extended follow-up*) (Heck et al., 2021) pak přineslo velmi zajímavou informaci o tom, že původně zjištěný malý, ale statisticky významný benefit plynoucí z užití sartanu v primární prevenci ANT kardiotoxicity (Gulati et al., 2016), zcela vymizel při následném dlouhodobém sledování těchto pacientů (Heck et al., 2021). Tyto výsledky by mohly odpovídat snižujícím se kardioprotektivním účinkům ACEi ve FU u zvířat v našich pokusech

(Publikace č.2). Při hodnocení kardioprotektivního potenciálu ACEi, sartanů a dalších léčiv užívaných pro léčbu HFrEF v experimentu i klinické praxi je zřejmě velmi důležité zaměřit se na výsledky této intervence s delším časovým odstupem od ukončení chemoterapie ANT. Pro definitivní klinické závěry o roli ACEi v primární prevenci chronické ANT kardiotoxicity je třeba více dat z RCT (Vaduganathan et al., 2019; Brown et al., 2020; Vuong et al., 2022).

## 5 Závěry

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

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

Kardioprotektivní účinky ACEi se tedy významně liší od DEX, který navozuje robustní a dlouhodobou kardioprotekci vůči ANT kardiotoxicitě. Důvodem jsou patrně odlišné mechanismy účinku obou léčiv. DEX zřejmě účinkuje prostřednictvím katalytické inhibice TOP2B v kardiomyocytech, kde předchází ANT-navozenému poškození DNA a indukci DDR signalizace v myokardu, což odpovídá novější hypotéze o mechanismu vzniku ANT kardiotoxicity. Získané důkazy také jednoznačně hovoří proti významné úloze chelatačních

metabolitů DEX v navození kardioprotektivního účinku DEX. Tato zjištění zpochybňují nejen dosud převládající mechanismus kardioprotektivního účinku DEX, který předpokládá vyvázání volného železa z komplexu s ANT prostřednictvím metabolitů DEX, ale i platnost tradiční teorie vzniku ANT kardiotoxicity zdůrazňující roli volných iontů železa a tvorby ROS (tzv. „ROS and iron“ hypotéza). Tento nálezn by též mohl vysvětlit, proč se selektivnějších chelátory železa neuplatnily v prevenci ANT kardiotoxicity. ACEi neovlivňují TOP2B dependentní poškození myokardu navozené ANT, což by mohlo vysvětlovat méně účinnou, a především nestálou kardioprotekci pozorovanou s užitím perindoprilu v této práci. ACEi tedy zřejmě účinkují jen na nižší patogenetické mechanismy rozvoje ANT kardiotoxicity, což se s ohledem na výsledky této práce jeví celkově méně efektivní.

## 6 Seznam citací použité literatury

- Agunbiade TA, Zaghlol RY and Barac A (2019) Heart Failure in Relation to Tumor-Targeted Therapies and Immunotherapies. *Methodist Debaquey Cardiovasc J* **15**:250-257.
- Akolkar G, Bhullar N, Bews H, Shaikh B, Premecz S, et al. (2015) The role of renin angiotensin system antagonists in the prevention of doxorubicin and trastuzumab induced cardiotoxicity. *Cardiovasc Ultrasound* **13**:18.
- Armenian SH, Lacchetti C, Barac A, Carver J, Constine LS, et al. (2017) Prevention and Monitoring of Cardiac Dysfunction in Survivors of Adult Cancers: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol* **35**:893-911.
- Avila MS, Ayub-Ferreira SM, de Barros Wanderley MR, Jr., das Dores Cruz F, Goncalves Brandao SM, et al. (2018) Carvedilol for Prevention of Chemotherapy-Related Cardiotoxicity: The CECCY Trial. *J Am Coll Cardiol* **71**:2281-2290.
- Benjamin RS and Minotti G (2021) Doxorubicin-Dexrazoxane from Day 1 for Soft-tissue Sarcomas: The Road to Cardioprotection. *Clin Cancer Res* **27**:3809-3811.
- Bertaina A, Vinti L, Strocchio L, Gaspari S, Caruso R, et al. (2017) The combination of bortezomib with chemotherapy to treat relapsed/refractory acute lymphoblastic leukaemia of childhood. *Br J Haematol* **176**:629-636.
- Bhatia S (2020) Genetics of Anthracycline Cardiomyopathy in Cancer Survivors: JACC: CardioOncology State-of-the-Art Review. *JACC CardioOncol* **2**:539-552.
- Billingham ME, Mason JW, Bristow MR and Daniels JR (1978) Anthracycline cardiomyopathy monitored by morphologic changes. *Cancer Treat Rep* **62**:865-872.
- Bloomfield CD, Brunning RD and Kennedy BJ (1972) Daunorubicin therapy in adult acute lymphatic leukemia. *Cancer* **30**:47-55.
- Blum RH and Carter SK (1974) Adriamycin. A new anticancer drug with significant clinical activity. *Ann Intern Med* **80**:249-259.
- Boutagy NE, Feher A, Pfau D, Liu Z, Guerrera NM, et al. (2020) Dual Angiotensin Receptor-Nepriylsin Inhibition With Sacubitril/Valsartan Attenuates Systolic Dysfunction in Experimental Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *JACC CardioOncol* **2**:774-787.
- Bray J (2012) FDA memorandum - Kyprolis, in, [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2012/202714Orig1s000PharmR.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2012/202714Orig1s000PharmR.pdf).
- Bristow MR, Billingham ME, Mason JW and Daniels JR (1978) Clinical spectrum of anthracycline antibiotic cardiotoxicity. *Cancer Treat Rep* **62**:873-879.
- Brown SA, Okwuosa TM, Barac A and Volgman AS (2020) The Role of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors and  $\beta$ -Blockers in Primary Prevention of Cardiac Dysfunction in Breast Cancer Patients. *J Am Heart Assoc* **9**:e015327.
- Bruynzeel AM, Niessen HW, Bronzwaer JG, van der Hoeven JJ, Berkhof J, et al. (2007a) The effect of monohydroxyethylrutoside on doxorubicin-induced cardiotoxicity in patients treated for metastatic cancer in a phase II study. *Br J Cancer* **97**:1084-1089.
- Bruynzeel AM, Vormer-Bonne S, Bast A, Niessen HW and van der Vijgh WJ (2007b) Long-term effects of 7-monohydroxyethylrutoside (monoHER) on DOX-induced cardiotoxicity in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* **60**:509-514.

- Buja LM, Ferrans VJ, Mayer RJ, Roberts WC and Henderson ES (1973) Cardiac ultrastructural changes induced by daunorubicin therapy. *Cancer* **32**:771-788.
- Cadeddu Dessalvi C, Pepe A, Penna C, Gimelli A, Madonna R, et al. (2019) Sex differences in anthracycline-induced cardiotoxicity: the benefits of estrogens. *Heart Fail Rev* **24**:915-925.
- Campbell B, Adams J, Shin YK and Lefer AM (1999) Cardioprotective effects of a novel proteasome inhibitor following ischemia and reperfusion in the isolated perfused rat heart. *J Mol Cell Cardiol* **31**:467-476.
- Cardinale D, Ciceri F, Latini R, Franzosi MG, Sandri MT, et al. (2018) Anthracycline-induced cardiotoxicity: A multicenter randomised trial comparing two strategies for guiding prevention with enalapril: The International CardioOncology Society-one trial. *Eur J Cancer* **94**:126-137.
- Cardinale D, Colombo A, Sandri MT, Lamantia G, Colombo N, et al. (2006) Prevention of high-dose chemotherapy-induced cardiotoxicity in high-risk patients by angiotensin-converting enzyme inhibition. *Circulation* **114**:2474-2481.
- Celutkiene J, Pudil R, Lopez-Fernandez T, Grapsa J, Nihoyannopoulos P, et al. (2020) Role of cardiovascular imaging in cancer patients receiving cardiotoxic therapies: a position statement on behalf of the Heart Failure Association (HFA), the European Association of Cardiovascular Imaging (EACVI) and the Cardio-Oncology Council of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur J Heart Fail* **22**:1504-1524.
- Cortes-Funes H and Coronado C (2007) Role of anthracyclines in the era of targeted therapy. *Cardiovasc Toxicol* **7**:56-60.
- Creighton AM, Hellmann K and Whitecross S (1969) Antitumour activity in a series of bisdiketopiperazines. *Nature* **222**:384-385.
- Cvetkovic RS and Scott LJ (2005) Dexrazoxane : a review of its use for cardioprotection during anthracycline chemotherapy. *Drugs* **65**:1005-1024.
- Dadson K, Calvillo-Argüelles O, Thavendiranathan P and Billia F (2020) Anthracycline-induced cardiomyopathy: cellular and molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)* **134**:1859-1885.
- Danesi R, Fogli S, Gennari A, Conte P and Del Tacca M (2002) Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of the anthracycline anticancer drugs. *Clin Pharmacokinet* **41**:431-444.
- Davies KJ, Doroshov JH and Hochstein P (1983) Mitochondrial NADH dehydrogenase-catalyzed oxygen radical production by adriamycin, and the relative inactivity of 5-iminodaunorubicin. *FEBS Lett* **153**:227-230.
- Deng S, Yan T, Jendry C, Nemecek A, Vincetic M, et al. (2014) Dexrazoxane may prevent doxorubicin-induced DNA damage via depleting both Topoisomerase II isoforms. *BMC Cancer* **14**:842.
- Deweese JE, Osheroff MA and Osheroff N (2008) DNA Topology and Topoisomerases: Teaching a "Knotty" Subject. *Biochem Mol Biol Educ* **37**:2-10.
- Dimarco A, Gaetani M, Dorigotti L, Soldati M and Bellini O (1964) Daunomycin: A New Antibiotic with Antitumor Activity. *Cancer Chemother Rep* **38**:31-38.
- Dimitrakis P, Romay-Ogando MI, Timolati F, Suter TM and Zuppinger C (2012) Effects of doxorubicin cancer therapy on autophagy and the ubiquitin-proteasome system in long-term cultured adult rat cardiomyocytes. *Cell Tissue Res* **350**:361-372.

- Doroshov JH (1983) Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. *Cancer Res* **43**:460-472.
- Dou QP and Zonder JA (2014) Overview of proteasome inhibitor-based anti-cancer therapies: perspective on bortezomib and second generation proteasome inhibitors versus future generation inhibitors of ubiquitin-proteasome system. *Curr Cancer Drug Targets* **14**:517-536.
- Dresdale AR, Barr LH, Bonow RO, Mathisen DJ, Myers CE, et al. (1982) Prospective randomized study of the role of N-acetyl cysteine in reversing doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Am J Clin Oncol* **5**:657-663.
- Eiger D, Ponde NF, Agbor-Tarh D, Moreno-Aspitia A, Piccart M, et al. (2020) Long-term cardiac outcomes of patients with HER2-positive breast cancer treated in the adjuvant lapatinib and/or trastuzumab Treatment Optimization Trial. *Br J Cancer* **122**:1453-1460.
- Ewer MS and Ewer SM (2015) Cardiotoxicity of anticancer treatments. *Nature Reviews Cardiology* **12**:547-558.
- FDA data Velcade® (2008) in, [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2008/021602s015lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2008/021602s015lbl.pdf).
- Forrester SJ, Booz GW, Sigmund CD, Coffman TM, Kawai T, et al. (2018) Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev* **98**:1627-1738.
- Georgakopoulos P, Roussou P, Matsakas E, Karavidas A, Anagnostopoulos N, et al. (2010) Cardioprotective effect of metoprolol and enalapril in doxorubicin-treated lymphoma patients: a prospective, parallel-group, randomized, controlled study with 36-month follow-up. *Am J Hematol* **85**:894-896.
- Gharib M and Burnett A (2002) Chemotherapy - induced cardiotoxicity: current practice and prospects of prophylaxis. *European journal of heart failure* **4**:235-242.
- Ghigo A, Li M and Hirsch E (2016) New signal transduction paradigms in anthracycline-induced cardiotoxicity. *Biochim Biophys Acta* **1863**:1916-1925.
- Gulati G, Heck SL, Ree AH, Hoffmann P, Schulz-Menger J, et al. (2016) Prevention of cardiac dysfunction during adjuvant breast cancer therapy (PRADA): a 2 × 2 factorial, randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial of candesartan and metoprolol. *Eur Heart J* **37**:1671-1680.
- Hahn VS, Zhang KW, Sun L, Narayan V, Lenihan DJ, et al. (2021) Heart Failure With Targeted Cancer Therapies: Mechanisms and Cardioprotection. *Circ Res* **128**:1576-1593.
- Hasinoff BB, Hellmann K, Herman EH and Ferrans VJ (1998) Chemical, biological and clinical aspects of dexrazoxane and other bisdioxopiperazines. *Curr Med Chem* **5**:1-28.
- Hasinoff BB and Herman EH (2007) Dexrazoxane: how it works in cardiac and tumor cells. Is it a prodrug or is it a drug? *Cardiovasc Toxicol* **7**:140-144.
- Hasinoff BB and Patel D (2018) Myocyte-Damaging Effects and Binding Kinetics of Boronic Acid and Epoxyketone Proteasomal-Targeted Drugs. *Cardiovasc Toxicol* **18**:557-568.
- Hasinoff BB, Patel D and Wu X (2017) Molecular Mechanisms of the Cardiotoxicity of the Proteasomal-Targeted Drugs Bortezomib and Carfilzomib. *Cardiovasc Toxicol* **17**:237-250.

- Hasinoff BB, Schroeder PE and Patel D (2003) The metabolites of the cardioprotective drug dexrazoxane do not protect myocytes from doxorubicin-induced cytotoxicity. *Mol Pharmacol* **64**:670-678.
- Heck SL, Mecinaj A, Ree AH, Hoffmann P, Schulz-Menger J, et al. (2021) Prevention of Cardiac Dysfunction During Adjuvant Breast Cancer Therapy (PRADA): Extended Follow-Up of a 2×2 Factorial, Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Clinical Trial of Candesartan and Metoprolol. *Circulation* **143**:2431-2440.
- Herman EH and Ferrans VJ (1993) Timing of treatment with ICRF-187 and its effect on chronic doxorubicin cardiotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol* **32**:445-449.
- Herman EH and Ferrans VJ (1998) Preclinical animal models of cardiac protection from anthracycline-induced cardiotoxicity, in *Semin Oncol* pp 15-21.
- Herman EH, Zhang J and Ferrans VJ (1994) Comparison of the protective effects of desferrioxamine and ICRF-187 against doxorubicin-induced toxicity in spontaneously hypertensive rats. *Cancer Chemother Pharmacol* **35**:93-100.
- Herrmann J, Wohler C, Saguner AM, Flores A, Nesbitt LL, et al. (2013) Primary proteasome inhibition results in cardiac dysfunction. *Eur J Heart Fail* **15**:614-623.
- Hershko A and Ciechanover A (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **67**:425-479.
- Hershko C, Link G, Tzahor M, Kaltwasser JP, Athias P, et al. (1993a) Anthracycline toxicity is potentiated by iron and inhibited by deferoxamine: studies in rat heart cells in culture. *J Lab Clin Med* **122**:245-251.
- Hershko C, Link G, Tzahor M and Pinson A (1993b) The role of iron and iron chelators in anthracycline cardiotoxicity. *Leuk Lymphoma* **11**:207-214.
- Hiona A, Lee AS, Nagendran J, Xie X, Connolly AJ, et al. (2011) Pretreatment with angiotensin-converting enzyme inhibitor improves doxorubicin-induced cardiomyopathy via preservation of mitochondrial function. *J Thorac Cardiovasc Surg* **142**:396-403.e393.
- Hrdina R, Gersl V, Klíntová I, Šimunek T, Macháková J, et al. (2000) Anthracycline-induced cardiotoxicity. *Acta Medica (Hradec Kralove)* **43**:75-82.
- Huang J, Yang J, Maity B, Mayuzumi D and Fisher RA (2011) Regulator of G protein signaling 6 mediates doxorubicin-induced ATM and p53 activation by a reactive oxygen species-dependent mechanism. *Cancer Res* **71**:6310-6319.
- Chari A, Stewart AK, Russell SD, Moreau P, Herrmann J, et al. (2018) Analysis of carfilzomib cardiovascular safety profile across relapsed and/or refractory multiple myeloma clinical trials. *Blood Adv* **2**:1633-1644.
- Chen SH, Chan NL and Hsieh TS (2013) New mechanistic and functional insights into DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem* **82**:139-170.
- Chow EJ, Aplenc R, Vrooman LM, Doody DR, Huang YV, et al. (2022) Late health outcomes after dexrazoxane treatment: A report from the Children's Oncology Group. *Cancer* **128**:788-796.
- Christians ES and Benjamin IJ (2012) Proteostasis and REDOX state in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **302**:H24-37.
- Jirkovská-Vávrová A, Roh J, Lenčová-Popelová O, Jirkovský E, Hrušková K, et al. (2015) Synthesis and analysis of novel analogues of dexrazoxane and its open-ring hydrolysis product for protection against anthracycline cardiotoxicity in vitro and in vivo. *Toxicol Res* **4**:1098-1114.



- Jirkovská A, Karabanovich G, Kubeš J, Skalická V, Melnikova I, et al. (2021) Structure–Activity Relationship Study of Dexrazoxane Analogues Reveals ICRF-193 as the Most Potent Bisdioxopiperazine against Anthracycline Toxicity to Cardiomyocytes Due to Its Strong Topoisomerase II $\beta$  Interactions. *J Med Chem* **64**:3997-4019.
- Jirkovský E, Jirkovská A, Bureš J, Chládek J, Lenčová O, et al. (2018) Pharmacokinetics of the Cardioprotective Drug Dexrazoxane and Its Active Metabolite ADR-925 with Focus on Cardiomyocytes and the Heart. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **364**:433-446.
- Jirkovský E, Lenčová-Popelová O, Hroch M, Adamcová M, Mazurová Y, et al. (2013) Early and delayed cardioprotective intervention with dexrazoxane each show different potential for prevention of chronic anthracycline cardiotoxicity in rabbits. *Toxicology* **311**:191-204.
- Kalay N, Basar E, Ozdogru I, Er O, Cetinkaya Y, et al. (2006) Protective effects of carvedilol against anthracycline-induced cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* **48**:2258-2262.
- Keizer H, Pinedo H, Schuurhuis G and Joenje H (1990) Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmacology & therapeutics* **47**:219-231.
- Kiss I, Adámková Krákorová D, Andrašina T, Arenberger P, Babjuk M, et al. (2022) Modrá kniha České onkologické společnosti.
- Kiyomiya K, Matsuo S and Kurebe M (2001) Mechanism of specific nuclear transport of adriamycin: the mode of nuclear translocation of adriamycin-proteasome complex. *Cancer Res* **61**:2467-2471.
- Kollárová-Brázdová P, Jirkovská A, Karabanovich G, Pokorná Z, Bavlovič Piskáčková H, et al. (2020) Investigation of Structure-Activity Relationships of Dexrazoxane Analogs Reveals Topoisomerase II $\beta$  Interaction as a Prerequisite for Effective Protection against Anthracycline Cardiotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* **373**:402-415.
- Kollárová-Brázdová P, Lenčová-Popelová O, Karabanovich G, Kocúrová-Lengvarská J, Kubeš J, et al. (2021) Prodrug of ICRF-193 provides promising protective effects against chronic anthracycline cardiotoxicity in a rabbit model in vivo. *Clinical Science* **135**:1897-1914.
- Koulaouzidis G and Lyon AR (2017) Proteasome Inhibitors as a Potential Cause of Heart Failure. *Heart Fail Clin* **13**:289-295.
- Kumarapeli AR, Horak KM, Glasford JW, Li J, Chen Q, et al. (2005) A novel transgenic mouse model reveals deregulation of the ubiquitin-proteasome system in the heart by doxorubicin. *Faseb j* **19**:2051-2053.
- LeBlanc R, Catley LP, Hideshima T, Lentzsch S, Mitsiades CS, et al. (2002) Proteasome inhibitor PS-341 inhibits human myeloma cell growth in vivo and prolongs survival in a murine model. *Cancer Res* **62**:4996-5000.
- Lebrecht D, Geist A, Ketelsen UP, Haberstroh J, Setzer B, et al. (2007a) Dexrazoxane prevents doxorubicin - induced long - term cardiotoxicity and protects myocardial mitochondria from genetic and functional lesions in rats. *British journal of pharmacology* **151**:771-778.
- Lebrecht D, Geist A, Ketelsen UP, Haberstroh J, Setzer B, et al. (2007b) Dexrazoxane prevents doxorubicin-induced long-term cardiotoxicity and protects myocardial mitochondria from genetic and functional lesions in rats, in *Br J Pharmacol* pp 771-778.

- Lecker SH, Goldberg AL and Mitch WE (2006) Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Am Soc Nephrol* **17**:1807-1819.
- Lefrak EA, Pitha J, Rosenheim S and Gottlieb JA (1973) A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. *Cancer* **32**:302-314.
- Legha SS, Wang YM, Mackay B, Ewer M, Hortobagyi GN, et al. (1982) Clinical and pharmacologic investigation of the effects of alpha-tocopherol on adriamycin cardiotoxicity. *Ann N Y Acad Sci* **393**:411-418.
- Lenco J, Lencova-Popelova O, Link M, Jirkovska A, Tambor V, et al. (2015) Proteomic investigation of embryonic rat heart-derived H9c2 cell line sheds new light on the molecular phenotype of the popular cell model. *Exp Cell Res* **339**:174-186.
- Lencova-Popelova O, Jirkovsky E, Mazurova Y, Lenco J, Adamcova M, et al. (2014) Molecular remodeling of left and right ventricular myocardium in chronic anthracycline cardiotoxicity and post-treatment follow up. *PLoS One* **9**:e96055.
- Lipshultz SE, Lipsitz SR and Orav EJ (2007) Dexrazoxane-associated risk for secondary malignancies in pediatric Hodgkin's disease: a claim without compelling evidence. *J Clin Oncol* **25**:3179; author reply 3180.
- Liu J, Zheng H, Tang M, Ryu YC and Wang X (2008a) A therapeutic dose of doxorubicin activates ubiquitin-proteasome system-mediated proteolysis by acting on both the ubiquitination apparatus and proteasome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **295**:H2541-2550.
- Liu JB, Zheng HQ, Tang MX, Ryu YC and Wang XJ (2008b) A therapeutic dose of doxorubicin activates ubiquitin-proteasome system-mediated proteolysis by acting on both the ubiquitination apparatus and proteasome. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **295**:H2541-H2550.
- Lyu YL, Kerrigan JE, Lin C-P, Azarova AM, Tsai Y-C, et al. (2007) Topoisomerase II $\beta$ -mediated DNA double-strand breaks: implications in doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dexrazoxane. *Cancer research* **67**:8839-8846.
- Maejima Y (2020) The critical roles of protein quality control systems in the pathogenesis of heart failure. *J Cardiol* **75**:219-227.
- Martin E, Thougard AV, Grauslund M, Jensen PB, Bjorkling F, et al. (2009) Evaluation of the topoisomerase II-inactive bisdioxopiperazine ICRF-161 as a protectant against doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Toxicology* **255**:72-79.
- Martins-Teixeira MB and Carvalho I (2020) Antitumour Anthracyclines: Progress and Perspectives. *ChemMedChem* **15**:933-948.
- Matsui H, Morishima I, Numaguchi Y, Toki Y, Okumura K, et al. (1999) Protective effects of carvedilol against doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *Life Sci* **65**:1265-1274.
- McCormack K (2018) The cardioprotective effect of dexrazoxane (Cardioxane) is consistent with sequestration of poly (ADP-ribose) by self-assembly and not depletion of topoisomerase 2B. *ecancermedicalscience* **12**.
- Menna P, Paz OG, Chello M, Covino E, Salvatorelli E, et al. (2012) Anthracycline cardiotoxicity. *Expert Opin Drug Saf* **11 Suppl 1**:S21-36.
- Menna P and Salvatorelli E (2017) Primary Prevention Strategies for Anthracycline Cardiotoxicity: A Brief Overview. *Chemotherapy* **62**:159-168.

- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G and Gianni L (2004a) Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* **56**:185-229.
- Minotti G, Recalcati S, Menna P, Salvatorelli E, Corna G, et al. (2004b) Doxorubicin cardiotoxicity and the control of iron metabolism: quinone-dependent and independent mechanisms. *Methods Enzymol* **378**:340-361.
- Mohan N, Jiang J, Dokmanovic M and Wu WJ (2018) Trastuzumab-mediated cardiotoxicity: current understanding, challenges, and frontiers. *Antib Ther* **1**:13-17.
- Myeku N and Duff KE (2018) Targeting the 26S Proteasome To Protect Against Proteotoxic Diseases. *Trends Mol Med* **24**:18-29.
- Myers CE (1988) Role of Iron in Anthracycline Action, in *Organ Directed Toxicities of Anticancer Drugs* (Hacker MP, Lazo JS and Tritton TR eds) pp 17-30, Springer US, Boston, MA.
- Nicolay K, Timmers RJ, Spoelstra E, Van der Neut R, Fok JJ, et al. (1984) The interaction of adriamycin with cardiolipin in model and rat liver mitochondrial membranes. *Biochim Biophys Acta* **778**:359-371.
- Nowis D, Maczewski M, Mackiewicz U, Kujawa M, Ratajska A, et al. (2010) Cardiotoxicity of the Anticancer Therapeutic Agent Bortezomib. *Am J Pathol* **176**:2658-2668.
- Oeffinger KC, Mertens AC, Sklar CA, Kawashima T, Hudson MM, et al. (2006) Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer. *N Engl J Med* **355**:1572-1582.
- Olson RD, Mushlin PS, Brenner DE, Fleischer S, Cusack BJ, et al. (1988) Doxorubicin cardiotoxicity may be caused by its metabolite, doxorubicinol. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:3585-3589.
- Pearlman M, Jendiroba D, Pagliaro L, Keyhani A, Liu B, et al. (2003) Dexrazoxane in combination with anthracyclines lead to a synergistic cytotoxic response in acute myelogenous leukemia cell lines. *Leukemia Research* **27**:617-626.
- Pigram WJ, Fuller W and Hamilton LD (1972) Stereochemistry of intercalation: interaction of daunomycin with DNA. *Nat New Biol* **235**:17-19.
- Popelova O, Sterba M, Simunek T, Mazurova Y, Guncova I, et al. (2008) Deferiprone does not protect against chronic anthracycline cardiotoxicity in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* **326**:259-269.
- Pudil R, Mueller C, Čelutkienė J, Henriksen PA, Lenihan D, et al. (2020) Role of serum biomarkers in cancer patients receiving cardiotoxic cancer therapies: a position statement from the Cardio-Oncology Study Group of the Heart Failure Association and the Cardio-Oncology Council of the European Society of Cardiology. *Eur J Heart Fail* **22**:1966-1983.
- Pye J, Ardeshirpour F, McCain A, Bellinger DA, Merricks E, et al. (2003) Proteasome inhibition ablates activation of NF-kappa B in myocardial reperfusion and reduces reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**:H919-926.
- Regev R, Yeheskely-Hayon D, Katzir H and Eytan GD (2005) Transport of anthracyclines and mitoxantrone across membranes by a flip-flop mechanism. *Biochemical Pharmacology* **70**:161-169.
- Reichardt P, Tabone M-D, Mora J, Morland B and Jones RL (2018) Risk–benefit of dexrazoxane for preventing anthracycline-related cardiotoxicity: re-evaluating the European labeling. *Future Oncol* **14**:2663-2676.

- Renu K, V GA, P BT and Arunachalam S (2018) Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy - An update. *Eur J Pharmacol* **818**:241-253.
- Repta AJ, Baltezor MJ and Bansal PC (1976) Utilization of an enantiomer as a solution to a pharmaceutical problem: application to solubilization of 1,2-di(4-piperazine-2,6-dione)propane. *J Pharm Sci* **65**:238-242.
- Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW, Irwin D, Stadtmauer EA, et al. (2005) Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med* **352**:2487-2498.
- Russell SD, Lyon A, Lenihan DJ, Moreau P, Joshua D, et al. (2015) Serial Echocardiographic Assessment of Patients (Pts) with Relapsed Multiple Myeloma (RMM) Receiving Carfilzomib and Dexamethasone (Kd) Vs Bortezomib and Dexamethasone (Vd): A Substudy of the Phase 3 Endeavor Trial (NCT01568866). *Blood* **126**.
- Santos DL, Moreno AJ, Leino RL, Froberg MK and Wallace KB (2002) Carvedilol protects against doxorubicin-induced mitochondrial cardiomyopathy. *Toxicol Appl Pharmacol* **185**:218-227.
- Sawicki KT, Sala V, Prever L, Hirsch E, Ardehali H, et al. (2021) Preventing and Treating Anthracycline Cardiotoxicity: New Insights. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **61**:309-332.
- Shukla SK and Rafiq K (2019) Proteasome biology and therapeutics in cardiac diseases. *Transl Res* **205**:64-76.
- Simmons CE (2019) Overcoming Inertia to Tame the Red Devil\*. *JACC: CardioOncology* **1**:80-83.
- Simunek T, Klimtova I, Kaplanova J, Sterba M, Mazurova Y, et al. (2005) Study of daunorubicin cardiotoxicity prevention with pyridoxal isonicotinoyl hydrazone in rabbits. *Pharmacol Res* **51**:223-231.
- Simunek T, Sterba M, Popelova O, Adamcova M, Hrdina R, et al. (2009) Anthracycline-induced cardiotoxicity: Overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Rep* **61**:154-171.
- Sishi BJ, Bester DJ, Wergeland A, Loos B, Jonassen AK, et al. (2012) Daunorubicin therapy is associated with upregulation of E3 ubiquitin ligases in the heart. *Exp Biol Med (Maywood)* **237**:219-226.
- Sishi BJ, Loos B, van Rooyen J and Engelbrecht AM (2013) Doxorubicin induces protein ubiquitination and inhibits proteasome activity during cardiotoxicity. *Toxicology* **309**:23-29.
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, et al. (2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* **344**:783-792.
- SmPC Cyrdanax® Souhrn údajů o přípravku Cyrdanax 20 mg/ml prášek pro infuzní roztok, in, <https://www.sukl.cz/modules/medication/search.php>.
- SmPC Doxorubicin Teva® Souhrn údajů o přípravku Doxorubicin Teva 2 mg/ml koncentrát pro infuzní roztok, in, <https://www.sukl.cz/modules/medication/search.php>.
- Sobczuk P, Czerwińska M, Kleibert M and Cudnoch-Jędrzejewska A (2020) Anthracycline-induced cardiotoxicity and renin-angiotensin-aldosterone system-from molecular mechanisms to therapeutic applications. *Heart Fail Rev*.

- Sonneveld P, Hajek R, Nagler A, Spencer A, Blade J, et al. (2008) Combined pegylated liposomal doxorubicin and bortezomib is highly effective in patients with recurrent or refractory multiple myeloma who received prior thalidomide/lenalidomide therapy. *Cancer* **112**:1529-1537.
- Spur EM, Althof N, Respondek D, Klingel K, Heuser A, et al. (2016) Inhibition of chymotryptic-like standard proteasome activity exacerbates doxorubicin-induced cytotoxicity in primary cardiomyocytes. *Toxicology* **353-354**:34-47.
- Sterba M, Popelova O, Lenco J, Fucikova A, Brcakova E, et al. (2011) Proteomic insights into chronic anthracycline cardiotoxicity. *J Mol Cell Cardiol* **50**:849-862.
- Sterba M, Popelova O, Simunek T, Mazurova Y, Potacova A, et al. (2006) Cardioprotective effects of a novel iron chelator, pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone, in the rabbit model of daunorubicin-induced cardiotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* **319**:1336-1347.
- Swain SM, Whaley FS, Gerber MC, Weisberg S, York M, et al. (1997) Cardioprotection with dexrazoxane for doxorubicin-containing therapy in advanced breast cancer. *J Clin Oncol* **15**:1318-1332.
- Štěrba M, Popelova O, Vávrová A, Jirkovský E, Kovaříková P, et al. (2013) Oxidative stress, redox signaling, and metal chelation in anthracycline cardiotoxicity and pharmacological cardioprotection. *Antioxid Redox Signal* **18**:899-929.
- Tanabe K, Ikegami Y, Ishida R and Andoh T (1991) Inhibition of topoisomerase II by antitumor agents bis(2,6-dioxopiperazine) derivatives. *Cancer Res* **51**:4903-4908.
- Tang M, Li J, Huang W, Su H, Liang Q, et al. (2010) Proteasome functional insufficiency activates the calcineurin-NFAT pathway in cardiomyocytes and promotes maladaptive remodelling of stressed mouse hearts. *Cardiovasc Res* **88**:424-433.
- Tebbi CK, London WB, Friedman D, Villaluna D, De Alarcon PA, et al. (2007) Dexrazoxane-associated risk for acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome and other secondary malignancies in pediatric Hodgkin's disease. *J Clin Oncol* **25**:493-500.
- Terwilliger T and Abdul-Hay M (2017) Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J* **7**:e577.
- Thayer WS (1977) Adriamycin stimulated superoxide formation in submitochondrial particles. *Chem Biol Interact* **19**:265-278.
- Thomas C, Vile GF and Winterbourn CC (1993) The hydrolysis product of ICRF-187 promotes iron-catalysed hydroxyl radical production via the Fenton reaction. *Biochem Pharmacol* **45**:1967-1972.
- Totzeck M, Mincu RI, Heusch G and Rassaf T (2019) Heart failure from cancer therapy: can we prevent it? *ESC Heart Fail* **6**:856-862.
- Vaduganathan M, Hirji SA, Qamar A, Bajaj N, Gupta A, et al. (2019) Efficacy of Neurohormonal Therapies in Preventing Cardiotoxicity in Patients with Cancer Undergoing Chemotherapy, in *JACC CardioOncol* pp 54-65.
- van Acker FA, van Acker SA, Kramer K, Haenen GR, Bast A, et al. (2000) 7-monohydroxyethylrutoside protects against chronic doxorubicin-induced cardiotoxicity when administered only once per week. *Clin Cancer Res* **6**:1337-1341.
- van Dalen EC, Caron HN, Dickinson HO and Kremer LCM (2011) Cardioprotective interventions for cancer patients receiving anthracyclines. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.

- van der Meer P, Gietema JA, Suter TM and van Veldhuisen DJ (2016) Cardiotoxicity of breast cancer treatment: no easy solution for an important long-term problem. *Eur Heart J* **37**:1681-1683.
- van der Zanden SY, Qiao X and Neefjes J (2021) New insights into the activities and toxicities of the old anticancer drug doxorubicin. *Febs j* **288**:6095-6111.
- van Hees HW, Li YP, Ottenheijm CA, Jin B, Pigmans CJ, et al. (2008) Proteasome inhibition improves diaphragm function in congestive heart failure rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **294**:L1260-1268.
- Vaynblat M, Shah HR, Bhaskaran D, Ramdev G, Davis WJ, 3rd, et al. (2002) Simultaneous angiotensin converting enzyme inhibition moderates ventricular dysfunction caused by doxorubicin. *Eur J Heart Fail* **4**:583-586.
- Vejpongsa P and Yeh ETH (2014) Topoisomerase 2 $\beta$ : A Promising Molecular Target for Primary Prevention of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity. *Clin Pharmacol Ther* **95**:45-52.
- Vuong JT, Stein-Merlob AF, Cheng RK and Yang EH (2022) Novel Therapeutics for Anthracycline Induced Cardiotoxicity. *Front Cardiovasc Med* **9**:863314.
- Wallace KB (2003) Doxorubicin-induced cardiac mitochondrionopathy. *Pharmacol Toxicol* **93**:105-115.
- Wang J, Fang Y, Fan RA and Kirk CJ (2021) Proteasome Inhibitors and Their Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Metabolism. *Int J Mol Sci* **22**.
- Wang J and Maldonado MA (2006) The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases. *Cell Mol Immunol* **3**:255-261.
- Wu P, Oren O, Gertz MA and Yang EH (2020) Proteasome Inhibitor-Related Cardiotoxicity: Mechanisms, Diagnosis, and Management. *Curr Oncol Rep* **22**:66.
- Xiao Y, Yin J, Wei J and Shang Z (2014) Incidence and risk of cardiotoxicity associated with bortezomib in the treatment of cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* **9**:e87671.
- Yang J, Wang Z, Fang Y, Jiang J, Zhao F, et al. (2011) Pharmacokinetics, pharmacodynamics, metabolism, distribution, and excretion of carfilzomib in rats. *Drug Metab Dispos* **39**:1873-1882.
- Zamorano JL, Lancellotti P, Rodriguez Muñoz D, Aboyans V, Asteggiano R, et al. (2016) 2016 ESC Position Paper on cancer treatments and cardiovascular toxicity developed under the auspices of the ESC Committee for Practice Guidelines: The Task Force for cancer treatments and cardiovascular toxicity of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal* **37**:2768-2801.
- Zhang S, Liu X, Bawa-Khalfe T, Lu LS, Lyu YL, et al. (2012) Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med* **18**:1639-1642.

## **7 Přílohy**

## 7.1 Příloha – publikace č. 1

**Pokorná Z.**, Jirkovský E., Hlaváčková M., Jansová H., Jirkovská A., Lenčová-Popelová O., Brázdová P., Kubeš J., Sotáková-Kašparová D., Mazurová Y., Adamcová M., Vostatková L., Holzerová K., Kolář F., Šimůnek T., Štěrbá M. *In vitro* and *in vivo* investigation of cardiotoxicity associated with anticancer proteasome inhibitors and their combination with anthracycline. *Clin Sci (Lond)*. 2019 Aug 27;133(16):1827-1844. <https://doi.org/10.1042/CS20190139>. Přijato k publikaci 13. 8. 2019.

IF<sub>2019</sub> = 5,223 (Q1); AIS<sub>2019</sub> = 1,327 (Q1)



## 7.2 Příloha – publikace č. 2

**Pokorná Z.**, Kollárová-Brázdová P., Lenčová-Popelová O., Jirkovský E., Kubeš J., Mazurová Y., Adamcová M., Holečková M., Palička V., Šimůnek T., Štěrbá M. Primary prevention of chronic anthracycline cardiotoxicity with ACE inhibitor is temporarily effective in rabbits, but benefits wane in post-treatment follow-up. *Clin Sci (Lond)*. 2022 Jan 14;136(1):139-161. <https://doi.org/10.1042/CS20210836>. Přijato k publikaci 8. 12. 2021.

IF<sub>2020</sub> = 6,124 (Q1); AIS<sub>2020</sub> = 1,568 (Q1)

### 7.3 Příloha – publikace č. 3

Jirkovský E., Jirkovská A., Bavlovič Piskáčková H., Skalická V., **Pokorná Z.**, Karabanovich G., Kollárová-Brázdová P., Kubeš J., Lenčová-Popelová O., Mazurová Y., Adamcová M., Lyon A. R., Roh J., Šimůnek T., Štěřbová-Kovaříková P., Štěřba M. Clinically translatable prevention of anthracycline cardiotoxicity by dexrazoxane is mediated by topoisomerase II beta and not metal chelation. *Circ Heart Fail.* 2021; 14:e008209.

<https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.120.008209>. Přijato k publikaci 17. 8. 2021.

IF<sub>2020</sub> = 8,846 (Q1); AIS<sub>2020</sub> = 3,335 (D1/Q1)