

Samenvatting en algemene discussie

De behandeling tegen kanker met het anthracycline doxorubicine (DOX) is geassocieerd met een dosis afhankelijke cardiotoxiciteit, die snel toeneemt boven een cumulatieve dosis van 550 mg/m². Als gevolg hiervan is de maximale cumulatieve dosis DOX in de meeste behandelingsschema's voor volwassenen en kinderen beperkt tot 450–550 mg/m². Desondanks is er door een aanzienlijke variabiliteit in de individuele gevoeligheid voor de hartschade, geen absolute veilige dosis DOX. Hierbij komt dat DOX geïnduceerde hartschade toeneemt met de tijd na behandeling.

Verscheidende hypothesen zijn voorgesteld om deze hartschade te verklaren en er is veel bewijs dat de vorming van vrije radicalen een belangrijke rol speelt. Hiernaast lijken vele andere mechanismen een rol te spelen in de ontwikkeling van DOX geïnduceerde schade aan het hart.

Als de incidentie van DOX geïnduceerde hartschade die kan leiden tot hartfalen zou afnemen, zou de kwaliteit en de duur van het leven van patiënten die kanker overleven, verbeteren. In de muis is het beschermende effect van monoHER tegen DOX geïnduceerde hartschade *in vivo* aangetoond wanneer monoHER werd gegeven als een intraperitoneaal toegediende injectie (500 mg/kg) 1 uur voor DOX (4 mg/kg, i.v.), die éénmaal per week gedurende een periode van zes weken werd toegediend. Zowel *in vitro* als *in vivo* werd aangetoond dat monoHER geen invloed had op de antitumor activiteit van DOX. Behalve de radicaalvangende en ijzerchelerende eigenschappen, werd *in vivo* geobserveerd dat een gedeelte van de beschermende effecten van monoHER veroorzaakt zou kunnen worden door het anti-inflammatoire effect van monoHER. Tijdens het karakteriseren van het farmacokinetische profiel van monoHER onder beschermende omstandigheden (500 mg/kg, i.p.) werd 5–15 minuten na de i.p. toediening in muizen een gemiddelde piek plasma concentratie verkregen van ongeveer 131 µM, terwijl de gemiddelde AUC[∞] 6.3 µM.min was. In dit proefschrift zullen de werkingsmechanismen van monoHER verder worden bestudeerd, zal de invloed van het tijdsinterval tussen monoHER en DOX op het beschermend effect van monoHER worden bestudeerd en zal monoHER en het mogelijke cardioprotectieve effect van monoHER worden geëvalueerd in een klinische Fase I en II studie.

In **hoofdstuk 2** wordt aangetoond dat het toevoegen van anti-inflammatoire middelen tijdens de behandeling met DOX de hartschade in muizen vermindert. Ook wordt aangetoond dat behandeling met DOX een toename van N^ε-(carboxymethyl) lysine (CML) in de intramyocardiale arteriën van de muis induceert. De geïnduceerde toename in CML, dat wordt gezien als een marker voor locale endogene stress, wordt vermindert door anti-inflammatoire middelen en monoHER. Deze resultaten suggereren dat DOX geïnduceerde anti-inflammatoire effecten betrokken zijn bij de ontwikkeling van DOX geïnduceerde

hartschade. Tevens indiceren de resultaten dat monoHER naast zijn radicaalvangende en ijzerchelerende, ook anti-inflammatoire eigenschappen heeft.

In eerdere studies van onze groep liet monoHER zowel *in vitro* als *in vivo*, een sterke bescherming zien tegen de cardiotoxische effecten van DOX zonder hierbij de antitumor werking te verminderen. Omdat DOX apoptose induceert, is het effect van monoHER hierop bestudeerd in neonatale hartcellen van ratten (NeRCaMs), humane endotheelcellen (HUVECs) en ovarium kankercellijnen in **hoofdstuk 3**. Aangetoond wordt dat monoHER de NeRCaMs en de HUVECs beter beschermt tegen DOX geïnduceerde apoptose dan A2780 tumorcellen. Het gebruik van de brede caspase remmer z-VAD-fmk laat zien dat DOX caspase-afhankelijke apoptose veroorzaakt in HUVECs en A2780 cellen en een caspase-onafhankelijke celdood in NeRCaMs. Het blijkt dat als monoHER wordt toegevoegd aan DOX, monoHER effectief is in het onderdrukken van zowel caspase-afhankelijke als caspase-onafhankelijke apoptose. Tijdens het bestuderen van de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan het beschermende effect van monoHER, blijkt dat monoHER de door DOX-geïnduceerde toename van p53 in deze cellen vermindert. Waarschijnlijk zorgen de radicaalvangende eigenschappen van monoHER voor een afname van p53, waarvan bekend is dat het een sensor is van reactive oxygen species (ROS)-afhankelijke schade. Ook het onderdrukkende effect van monoHER op de activatie van caspase-9 and -3 en het substraat PARP kan worden verklaard door het neutraliseren van de ROS, die caspase activiteit stimuleren. Omdat monoHER de door DOX geïnduceerde apoptose in kankercellen onderdrukt, rijst de vraag of monoHER de antitumor werking van DOX in de kliniek zou kunnen verminderen. De concentratie monoHER die in deze studie gebruikt wordt is echter veel hoger dan die is bereikt in de muizen onder beschermende omstandigheden. Vandaar dat wordt geconcludeerd dat naast het beschermende effect dat wordt gezien bij verschillende routes van door DOX geïnduceerde celdood, het belangrijk is dat de dosis van monoHER niet hoger wordt gegeven dan de concentraties die bescherming lieten zien *in vivo*, omdat anders dit de antitumor activiteit van DOX negatief zou kunnen worden beïnvloed. De neiging van monoHER om de normale cellen meer te beschermen dan kankercellen, zou kunnen worden toegeschreven aan de proliferatie capaciteit van kankercellen. Dit wordt ondersteund door eerdere onderzoeken die alleen bescherming lieten zien van confluenta cellen en niet van delende cellen die behandeld waren met DOX. De verschillende effecten die monoHER laat zien tijdens het onderdrukken van apoptose, zou de activiteit van het aanwezige intrinsieke verdedigingssysteem van de cellen tegen ROS kunnen weergeven. Ook zou het geassocieerd kunnen zijn met de verschillende mechanismen die celdood kunnen veroorzaken.

Eerder is de bescherming van monoHER tegen DOX-geïnduceerde hartschade in muizen aangetoond als monoHER werd gegeven als een i.p. dosis van 500 mg/kg 1 uur voor DOX. Vanwege de relatief korte halfwaardetijd van monoHER (ongeveer 30 min), was de

verwachting dat het tijdsinterval tussen monoHER en DOX van invloed zou kunnen zijn op het cardioprotectieve effect van monoHER, namelijk dat het beter wordt bij een korter tijdsinterval en slechter als het tijdsinterval toeneemt. Onze data beschreven in **hoofdstuk 4** laten zien dat er geen significante verandering is in de bescherming tegen door DOX-geïnduceerde hartschade als het tijdsinterval tussen monoHER en DOX varieert tussen 2 uur en 10 minuten.

Het is bekend dat de toxiciteit van DOX op het hartweefsel kan toenemen met de tijd en een ernstige schade aan het hart kan veroorzaken, die uiteindelijk resulteert in cardiomyopathie of zelfs chronisch hartfalen. Eerdere studies toonden het beschermende effect aan van monoHER op DOX-geïnduceerde hartschade gedurende de eerste 8 weken van behandeling. Onze resultaten in **hoofdstuk 5** laten zien dat het cardioprotectieve effect van monoHER nog langere tijd hierna aanwezig is, maar dat tegen het einde van de observatie periode van 26 weken de bescherming van monoHER niet meer aanwezig is. Hierna wordt de toxiciteit vergelijkbaar met die van de met DOX behandelde dieren. Het continueren van de wekelijkse monoHER injecties (na de 6 weken van DOX toediening) gedurende 26 weken lijkt zelfs de ontwikkeling van DOX-geïnduceerde hartschade te verergeren. Deze waarneming sluit aan bij eerdere bevindingen, nl. dat flavonoiden, die bekend staan als antioxidanten, een pro-oxidante werking kunnen uitoefenen bij hogere doseringen en/of wanneer toegediend voor een langere periode. Door deze eigenschappen is het mogelijk dat monoHER in onze studie in een te hoge dosering is toegediend aan de dieren die monoHER vóór DOX hebben ontvangen en met name aan de dieren die monoHER ook nog elke week gedurende de observatie periode ontvingen. Het kan zijn dat de veronderstelde overdosis van de antioxidant monoHER zich als een pro-oxidant is gaan gedragen zoals eerder is gezien bij andere flavonoiden. Een mogelijke verklaring voor de pro-oxidant activiteit zou kunnen zijn dat monoHER wordt omgezet in een reactief oxidatie product dat vervolgens in het hartweefsel de al kleine hoeveelheid endogene antioxidanten uitput. De juiste balans tussen de dosis monoHER en zijn anti- of pro-oxidante eigenschappen is nog niet vastgesteld.

In **hoofdstuk 6** worden de mogelijke bijwerkingen en de farmacokinetiek van monoHER geëvalueerd in een klinische fase I studie met gezonde vrijwilligers. Totaan de hoogste dosis monoHER van 1500 mg/m², wordt monoHER goed verdragen en worden er geen ernstige bijwerkingen waargenomen. Omdat de van tevoren vastgestelde farmacokinetische eindpunten werden bereikt, namelijk een gemiddelde piek plasma concentratie van 360 ± 69.3 µM en een gemiddelde AUC[∞] van 6,3 ± 2,1 µmol.min/ml bij een dosis van 1500 mg/m², werd geen poging meer gedaan de maximaal getolereerde dosis (MTD) van monoHER te bereiken. Bij dit dosis niveau is tevens de oplosbaarheid van monoHER voor een intraveneuze oplossing bereikt. De gebonden snelle verdeling en eliminatie van monoHER uit het plasma compartiment correspondeert met een snelle opname van monoHER in het muizenhart

vanwaar het ook weer snel wordt geëlimineerd. Onze conclusie is dat 1500 mg/m² monoHER een potentieel effectieve dosis is die veilig toegediend kan worden.

In **hoofdstuk 7** wordt beschreven dat deze dosis wordt gebruikt in een klinische fase II studie waarin de cardioprotectie van monoHER wordt onderzocht in kankerpatiënten die DOX ontvangen. Acht patiënten met gemetastaseerde ziekte zijn behandeld met DOX voorafgegaan door een 10 minuten durend intraveneus infuus met een dosis van 1500 mg/m² monoHER. Van hen bereiken 5 patiënten een cumulatieve dosis van 300 mg/m² DOX en ondergaan dan een endomyocardiobiopt. Van deze patiënten worden 3 behandeld met een tijdsinterval (ΔT) van 1 uur tussen monoHER en DOX, één met een $\Delta T = 10$ min en één met een $\Delta T = 2$ uur. Tussen de patiënten wordt geen verschil in biopsie score gevonden. De gemiddelde biopsie score van de vijf patiënten (2,7) is hoger dan de gemiddelde score (1,4) van patiënten die beschreven zijn in de literatuur die een vergelijkbare cumulatieve dosis DOX hebben ontvangen. Ondanks de grote variabiliteit binnen het kleine aantal onderzochte patiënten, lijkt monoHER de door DOX-geïnduceerde hartschade te verergeren.

Een interessante bevinding is dat alle vier de patiënten die een gemetastaseerd weke delen sarcoom hadden gunstig reageren (3 PR, 1SD) op de combinatie behandeling. Dit is veel meer dan verwacht wordt bij deze groep. Ondanks het feit dat deze effecten van monoHER tegengesteld zijn aan wat eerder is gezien in dierenstudies, laten deze resultaten een zekere overeenkomst zien met de resultaten van hoofdstuk 5. De verschillen zouden verklaard kunnen worden door een mogelijk verschil in het monoHER metabolisme tussen muizen en patiënten. In zowel patiënten (dit hoofdstuk) als in muizen (hoofdstuk 4) is aangetoond dat het tijdsinterval tussen monoHER en DOX niet relevant is. Aan de andere kant zou de dosis monoHER cruciaal kunnen zijn zoals gevonden is in muizen (hoofdstuk 5) en in patiënten (hoofdstuk 7). Een mogelijke verklaring kan zijn dat de antioxidant monoHER bij de reactie met de reactieve oxygen species wordt omgezet in een oxidatie product dat reactief is met thiolen. Een dergelijke reactie kan op twee manieren tot toxiciteit leiden. Ten eerste door een reductie van de antioxidant status van de cardiomyocyt waardoor de bescherming tegen cardiotoxiciteit afneemt. Ten tweede doordat het oxidatie product van monoHER zou kunnen reageren met andere thiolen, zoals eiwit thiolen. Deze adducten kunnen accumuleren in de cel en zo additionele toxiciteit veroorzaken. Eerdere studies hebben laten zien dat de concentratie van de antioxidant glutathione een rol kan spelen bij het antitumor effect in de weke delen sarcoom cellen. Hierdoor zou hetzelfde mechanisme een rol kunnen spelen zoals is voorgesteld voor de hartcellen. Geconcludeerd is dat de dosis van monoHER een cruciale rol speelt: bij een dosis van 1500 mg/m² wordt geen bescherming waargenomen tegen DOX-geïnduceerde hartschade in patiënten met gemetastaseerde ziekte. Daarentegen zou een versterkend effect aanwezig zijn op de antitumor werking van DOX in de patiënten die een gemetastaseerd weke delen sarcoom hebben.

Conclusie

Het semisynthetische flavonoid 7-monohydroxyethylrutoside (monoHER) heeft naast zijn radicaalvangende en ijzerchelerende eigenschappen, anti-inflammatoire activiteit. Dit is aangetoond door remming van door DOX-geïnduceerde neutrofiel adhesie aan endotheelcellen die plaatsvindt via de door DOX geïnduceerde VCAM en E-selectin overexpressie *in vitro* en het reducerende effect op de door DOX-geïnduceerde toename van CML *in vivo*. Hiernaast zijn anti-apoptotische eigenschappen van monoHER gevonden. Dit effect wordt waarschijnlijk veroorzaakt door de eigenschap van monoHER ROS te kunnen neutraliseren.

Door de relatief korte halfwaardetijd van monoHER werd verwacht dat het tijdsinterval tussen monoHER en DOX van invloed zou zijn op het cardioprotectieve effect van monoHER. Er werd echter geen invloed waargenomen. De beschreven onderzoeksresultaten in dit proefschrift geven wel aan dat de dosis van monoHER belangrijk zou zijn. Hoge concentraties monoHER (> 7 keer de maximale plasma concentratie die onder beschermende omstandigheden gevonden is bij de muis) in combinatie met DOX gaven bescherming van ovarium kankercellen *in vitro*. Deze observatie suggereert dat de dosis monoHER niet mag leiden tot een concentratie die hoger is dan de concentratie die bescherming laat zien *in vivo* (131 μM). Hiernaast neigt herhaalde dosering van monoHER na de behandelperiode met DOX tot verergering van de ontwikkeling van DOX-geïnduceerde hartschade in muizen. Verondersteld wordt dat de gecreëerde overdosis van de antioxidant monoHER zich gaat gedragen als een pro-oxidant zoals eerder is gezien bij andere flavonoiden. Daarom is het waarschijnlijk cruciaal de dosis en de frequentie van monoHER toediening te verfijnen om het optimale en verlangde effect (antioxidant activiteit of pro-oxidant activiteit) van monoHER te verkrijgen. Deze conclusies zijn in overeenstemming met de bevindingen in de patiënten tijdens de fase II studie.

Implicaties en onderzoek in de toekomst

Het huidige onderzoek suggereert dat de dosis en de frequentie van monoHER toediening cruciaal zou zijn in de bescherming tegen DOX-geïnduceerde hartschade. Er zou een dosisafhankelijke overgang kunnen zijn in het effect van monoHER, namelijk een hoge dosis ($\geq 1500 \text{ mg/m}^2$) om het versterkende effect op de antitumor werking voor weke delen sarcomen te verkrijgen en een lage dosis (ergens lager onder 1500 mg/m^2) om cardioprotectie te krijgen.

Verskillende interessante onderzoekslijnen zijn open voor de toekomst. De eerste is het bestuderen van het versterkende effect van monoHER op het effect van DOX in humane weke delen sarcoma cellijnen. Als deze effecten positief zijn, zal het onderliggende mechanisme geëvalueerd worden. Als het mogelijk is zullen de bevindingen geëxtrapoleerd worden naar andere tumortypes. In de tussentijd wordt een klinische fase II studie gestart waarin het antitumor effect van monoHER in combinatie met DOX in patiënten met WDS zal worden bestudeerd.

Een tweede vraag die beantwoord moet worden is of mogelijke verschillen in het metabolisme van monoHER tussen muis en patiënten (deels) verantwoordelijk zijn voor de waargenomen verschillen in de hart toxiciteit tussen de species.

Een derde gebied van speciale aandacht is de kritische dosis van monoHER die noodzakelijk is voor cardioprotectie op de lange termijn. Nadat meer inzicht is verkregen in de veranderingen van het intracellulaire metabolisme veroorzaakt door monoHER, zullen nieuwe *in vivo* experimenten worden gestart.