

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
"VICTOR BABEȘ" TIMIȘOARA  
FACULTATEA DE MEDICINĂ  
DEPARTAMENTUL V – MEDICINĂ INTERNĂ I

NELU-MIHAI TROFENCIUC



# TEZĂ DE DOCTORAT

EXPRESIA TLR4 ÎN CORELAȚIE CU DEPUNERILE DE FIER  
CARDIAC PRIN RMN T2\* ÎN TRATAMENTUL CU  
DOXORUBICINĂ - EVALUAREA TRANSLAȚIONALĂ A  
RISULUI DE CARDIOTOXICITATE

## REZUMAT

Conducător Științific  
PROF. UNIV. DR. MIRELA CLEOPATRA TOMESCU

Timișoara  
2021

# CUPRINS

Lista lucrărilor publicate .....	VII
Lista abrevierilor.....	VIII
Indexul figurilor.....	XI
Indexul tabelor.....	XIV
Mulțumiri .....	XV
INTRODUCERE.....	XVII

## PARTEA GENERALĂ

1. Generalități cu privire la cardiotoxicitatea antraciclinelor .....	1
1.1. Clase de citostatice și incidența cardiotoxicității .....	1
1.2. Farmacocinetica și metabolismul Doxorubicinei .....	4
1.3. Efectele cardiace ale antraciclinelor .....	6
2. Rolul rezonanței magnetice cardiovasculare (CMR).....	9
2.1. Introducere în rezonanța magnetică .....	9
2.2. Analiza standard a structurii și funcției cardiace .....	10
2.3. Maparea miocardică T2 și T2 * .....	12
2.4. Date și parametri T2* .....	13
2.4.1. Factori care influențează .....	14
2.4.2. Interpretare.....	14
2.4.3. Aplicații clinice .....	15
2.4.4. Funcția vasculară .....	15
3. Efectele cardiace ale Doxorubicinei – principalele mecanisme moleculare (fizio)patologice .....	16
3.1. Stresul oxidativ și apoptoza celulară (programată) .....	16
3.2. Apoptoza celulară sau moartea celulară programată.....	17
3.3. Metaboliți secundari de alcool .....	22
3.4. Toxicitatea mediată de fier .....	22
3.5. Imunomodularea prin intermediul receptorilor Toll-like .....	28

## PARTEA SPECIALĂ

4. CONTEXT EXPERIMENTAL .....	31
4.1. Introducere.....	31
4.2. Efectele cardiotoxice ale agenților anticancer.....	32
4.2.1. Clasificarea cardiotoxicității .....	32
4.2.1.1. Clasificarea temporală .....	32
4.2.1.2. Reversibilitate .....	33
4.2.2. Toxicitatea antraciclinelor .....	40
4.2.3. Detectarea și monitorizarea toxicității cardiace .....	41
4.2.3.1. Evaluarea non-clinică a profilului de siguranță .....	41

4.2.3.2. Raportarea și monitorizarea evenimentelor adverse în studii clinice .....	42
4.2.3.3. Biomarkerii .....	43
4.2.3.4. Troponinele .....	44
4.2.3.5. Peptidele natriuretice .....	44
4.2.3.6. Biomarkeri de generație nouă.....	45
4.2.3.7. Întrebări actuale fără răspuns despre biomarkeri .....	45
4.2.3.8. Strategii imagistice .....	46
4.2.3.8.1. Ecocardiografia.....	46
4.2.3.8.2. Scanare cu achiziții multiple (MUGA).....	47
4.2.3.8.3. Tomografia computerizată cardiacă (CAD) .....	47
4.2.3.8.4. Rezonanța magnetică cardiacă (CMR) .....	47
4.2.3.9. Testarea de stress .....	48
4.2.3.10. Biopsia endomiocardică.....	48
4.2.3.11. Genetica in cardiotoxicitatea terapiei cancerului .....	49
5. STUDIUL EXPERIMENTAL .....	50
5.1. Obiective .....	50
5.2. Material și metodă.....	50
5.2.1. Aspecte generale .....	50
5.2.2. Populația studiată.....	51
5.2.2.1. Criterii de includere/excludere .....	51
5.2.3. Metodologia studiului.....	53
5.2.3.1. Metode de evaluare .....	53
5.2.3.2. Metodologie generală de investigare studiu genetic și biologic .....	53
5.2.3.3. Material și metodă studiu genetic.....	53
5.2.3.4. Materiale utilizate.....	54
5.2.3.5. Recoltarea probelor .....	54
5.2.3.6. Izolarea ARN-ului .....	55
5.2.3.7. Procedura de izolare a ARN-ului .....	55
5.2.3.8. Obținerea de ADN complementar (ADNc) .....	56
5.2.3.9. Determinarea expresie genice relative TLR4 din probele de ARN izolate .....	57
5.2.4. Analiza statistică.....	58
5.3. Rezultate.....	60
5.3.1. Caracterizarea lotului de studiu .....	60
5.3.1.1. Principalele caracteristici ale lotului de studiu .....	60
5.3.1.2. Distribuția vârstei .....	60
5.3.1.3. Distribuția sexului .....	62
5.3.1.4. Distribuția mediul de proveniență.....	62
5.3.1.5. Distribuția afecțiunii de bază. ....	64
5.3.1.6. Distribuția categoriei de risc.....	64
5.3.1.7. Distribuția comorbidităților .....	65

5.3.1.8. Distribuția complianței.....	66
5.3.1.9. Distribuția statusului de la sfârșitul studiului.....	66
5.3.1.10. Distribuția asocierii altor citostatice cardiotoxice .....	67
5.3.1.11. Distribuția asocierii radioterapiei .....	69
5.3.1.12. Distribuția dozei cumulative de antracicline .....	69
5.3.1.13. Distribuția cardiotoxicității .....	71
5.3.1.14. Distribuția categoriilor de cardiotoxicitate.....	72
5.3.1.15. Distribuția modificărilor patologice .....	73
5.3.1.16. Distribuția tratamentului cardioprotector.....	78
5.3.2. Rezultate studiu genetic și imagistic .....	79
5.4. Discuții .....	82
5.4.1. Ferroptoză și intercalația TLR4 în timpul tratamentului cu Doxorubicină .....	85
5.4.2. Economia Fierului la nivel cardiac .....	87
5.4.2.1. Evaluarea stării fierului în corpul uman .....	87
5.4.2.2. Transferina ca mediator imun înăscut.....	88
5.4.3. Caracterizarea țesuturilor cu LGE CMR și maparea T1 și T2* .....	88
5.4.4. Cardiotoxicitatea indusă de doxorubicină factor trigger pentru inflamația cardiacă, prin aportul sistemului imun nespecific. Imunomodulatoarele.....	91
5.4.5. Mecanismele endogene de protecție contra principalelor efecte cardiace ale antraciclinelor .....	91
6. CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE .....	93
6.1. Cardiotoxicitatea: Direcții viitoare de cercetare.....	97
6.2. Abordarea multidisciplinară a bolilor cardiace la pacienții cu cancer.....	98
6.3. Conceptul de Cardio-Oncologie.....	98
6.3.1. Importanța evaluării preliminare a riscului cv la pacienții cu cancer .....	99
6.3.2. Rolul examinării CV de bază .....	100
6.3.3. Rolul urmăririi cardiologiei în timpul cancerului .....	101
6.3.4. Urmărirea cardiologică după finalizarea terapiei chimioterapice .....	102
6.4. Cât de mare este problema? Perspectiva cardiologului .....	102
6.5. Rolul fierului în toxicitatea și apoptoza indusă de DOX: perspective vechi și noi .....	103
6.6. Expresia TLR în context oncologic și de tratament chimioterapic .....	107
BIBLIOGRAFIE .....	109
ANEXE .....	I
Anexa I – Formular de informare pacient.....	I
Anexa II – Drepturi de autor figuri si alte materiale grafice .....	V

## INTRODUCERE

**Scurt istoric:** Antraciclinele se clasează printre cele mai eficiente medicamente anti-cancer dezvoltate vreodată. Primele antracicline au fost izolate din *Streptomyces peucetius* producătoare de pigmenți la începutul anilor 1960 și au fost denumite doxorubicină (**DOX**) și daunorubicină (**DNR**).

**Problematică:** Cardiotoxicitatea indusă de anumiți agenți farmacologici anticancer apare ca o posibilă problemă importantă în rândul supraviețuitorilor cancerului. Timp de câteva decenii, acest subiect a fost aproape exclusiv asociat cu antraciclinele, pentru care leziunea cardiacă cumulativă legată de doză a fost pasul limitativ în utilizarea lor. Deși s-au îndreptat o serie de eforturi predicția riscului, până în prezent nu există un consens cu privire la strategiile de prevenire și monitorizare a cardiotoxicității legate de chimioterapie.

Recent, o nouă dimensiune a problemei a apărut atunci când medicamentele care vizează activitatea anumitor tirozin kinaze sau receptori tumorali au fost recunoscute pentru a avea un efect nedorit asupra sistemului cardiovascular. Mai mult, incidența mai mare decât așteptată a disfuncției cardiace care apare la pacienții tratați cu o combinație de chimioterapice vechi și noi (de exemplu antracicline și trastuzumab) i-a determinat pe medici și cercetători să găsească o abordare eficientă a problemei.

**Perspective:** Din punct de vedere farmacologic, vor fi revizuite mecanismele moleculare presupuse implicate în cardiotoxicitatea indusă de chimioterapie.

Din punct de vedere clinic, strategiile actuale de reducere a cardiotoxicității vor fi abordate în mod critic. În această perspectivă, identificarea precisă a antitargetului (adică a țintei nedorite cauzând leziuni cardiace) și elaborarea de linii directe pentru monitorizarea pacienților supuși tratamentului cu agenți cardiotoxici par să constituie baza pentru gestionarea cardiotoxicității induse de medicamente.

Rezonanța magnetică cardiovasculară (CMR) este o tehnică de imagistică tomografică neinvazivă. Avantajele sale intrinseci sunt capacitatea de a achiziționa imagini în mai multe planuri fără limitarea ferestrei acustice și a habitusului corpului pacienților, lipsa expunerii la radiații, raporturi ridicate contrast-zgomot și acoperire volumetrică 3D reală, fără presupuneri geometrice. Cu toate acestea, oportunitatea unică pe care CMR o oferă este caracterizarea neinvazivă a țesutului miocardic.

## PARTEA GENERALĂ

### 1. GENERALITĂȚI CU PRIVIRE LA CARDIOTOXICITATEA ANTRACICLINELOR

#### 1.1. CLASE DE CITOSTATICE ȘI INCIDENȚA CARDIOTOXICITĂȚII

Progresele în domeniul oncologiei au dus la dezvoltarea multor agenți antineoplazici pentru tratamentul cancerului. Combinația cu alți agenți și modalități, împreună cu intensificarea dozei, a dus la apariția mai multor toxicități, necesitând adesea o gestionare și monitorizare atentă în cadrul îngrijirii medicale.

Antraciclinele se clasează printre cele mai eficiente medicamente anti-cancer dezvoltate vreodată. Primele antracicline au fost izolate din *Streptomyces peucetius*

producătoare de pigmenți la începutul anilor 1960 și au fost denumite doxorubicină (**DOX**) și daunorubicină (**DNR**).

Efectele adverse de natură cardiovasculară decurse în urma unei terapii de natură oncologică, pot avea ca rezultat o scădere a calității vieții și o creștere pentru riscul de mortalitate. Antraciclinele și compușii înrudiți (doxorubicina, daunorubicina, idarubicina, epirubicina și antrochinona mitoxantronă) se numără printre agenții chimioterapeutici implicați în cardiotoxicitate. Terapia cu antraciclină prezintă o asociere cu o creștere a riscului de apariție a insuficienței cardiace cu morbiditate și mortalitate asociată semnificativ crescută (1).

Cea mai distinctă cardiotoxicitate și cu cea mai evidentă exprimare clinică este de departe o consecință a utilizării și administrării de antracicline. Agenții alkilanți, de exemplu ciclofosfamida, ifosfamida, cisplatina, carmustina, busulfanul, au fost de asemenea incriminați pentru fenomenul de cardiotoxicitate chimioterapic indusă.

Familia de antibiotice antraciclinice cuprinde sute de analogi dar doar câțiva sunt în uz clinic real. Cea mai cunoscută și cea mai utilizată este doxorubicina. Antraciclinele sunt metabolizate prin reducerea unei grupări cetone la o grupare hidroxil, care sunt mai puțin active decât compusul părinte. Caracteristicile farmacocinetice includ o etapă de distribuție (celulară/tisulară) rapidă și o fază de eliminare lentă, cu timpul de înjumătățire plasmatică al doxorubicinei și al metaboliților săi în aproximativ 5 min, 1 oră și respectiv 30 de ore. Deoarece acestea sunt excretate în principal prin bilă, trebuie acordată o atenție specială pacienților cu disfuncție hepatică (2,3).

Cele mai noi antracicline, cum ar fi epirubicina, idarubicina sau preparatele lipozomale, au o lipofilitate mai mare și o siguranță presupus mai mare. Cu toate acestea, riscul de inducere a cardiomiopatiei nu este diminuat și există întotdeauna îngrijorare cu privire la eficacitatea tumorală (4).

În ultimele 2 decenii am asistat la numeroase încercări pentru identificarea antraciclinelor noi, care au fost concepute pentru a se dovedi superioare DOX sau DNR în ceea ce privește activitatea și / sau tolerabilitatea cardiacă.

Căutarea unei „antracicline mai bune” a dus la aproximativ 2000 de analogi, cifră care nu ar trebui să sune ca o surpriză dacă se ia în considerare numărul de modificări chimice sau substituții și / sau conjugări care pot fi introduse în inelul tetraciclic, lanțul lateral sau amino-zaharul. Cu toate acestea, doar puțini analogi au atins stadiul dezvoltării și aprobării clinice; printre acestea, epirubicina (EPI) și idarubicina (IDA) se bucură de popularitate ca alternative utile la DOX sau, respectiv, DNR (Figura 1).

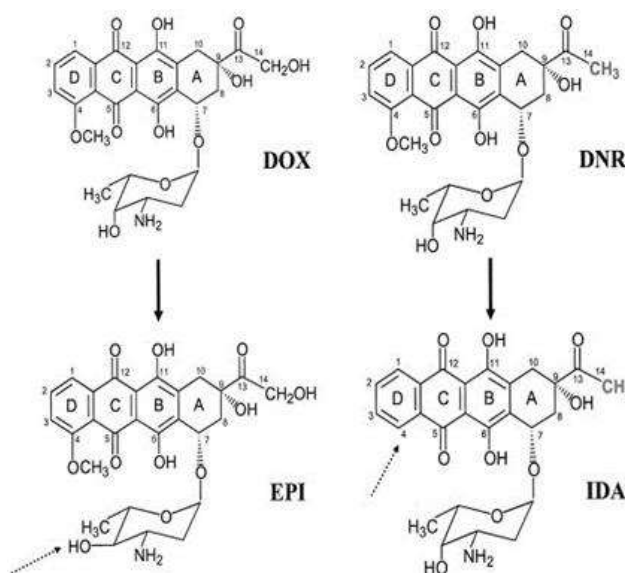


Figura 1 Structuri DOX, DNR, EPI și IDA. Reziduurile marcate cu gri indică faptul că lanțul lateral al DNR sau IDA se termină cu un metil în locul unui alcool primar în comparație cu DOX sau EPI. Săgețile punctate indică modificări structurale în EPI în comparație cu DOX (epimerizarea axială-ecuatorială a grupării hidroxil la C-4 în daunozamină) sau în IDA în comparație cu DNR (lipsa grupării metoxi la C-4 în inelul D). (Preluat și adaptat după Minotti et al. 2004).

EPI este un derivat semisintetic al DOX obținut printr-o epimerizare axial-ecuatorială a grupării hidroxil la C-4 în daunosamină (Figura 1). Această schimbare de poziție are un efect redus asupra modului de acțiune și spectrului de activitate al EPI în comparație cu DOX dar introduce modificări farmacocinetice și metabolice, cum ar fi volumul crescut de distribuție (Vd), 4-O-glucuronidarea și, prin urmare, clearance-ul total îmbunătățit (CL) sau timpul de înjumătățire terminal mai scurt.

Din cauza acestor modificări cinetice și metabolice, EPI a fost utilizat la doze cumulative aproape duble față de cele ale DOX, rezultând o activitate egală dar fără o creștere semnificativă a cardiotoxicității.

În practică, studiile timpurii la pacienții cu cancer mamar avansat au demonstrat că dozele medii pentru dezvoltarea indicilor de laborator de cardiotoxicitate au fost de 935 mg/m<sup>2</sup> EPI comparativ cu 468 mg/m<sup>2</sup> DOX, iar doza mediană cumulativă pentru apariția insuficienței cardiace (IC) simptomatică a fost 1134 mg/m<sup>2</sup> EPI comparativ cu 492 mg/m<sup>2</sup> DOX. Aceste cifre au fost rafinate în studiile ulterioare, deoarece s-a documentat un risc semnificativ de IC la pacienții cărora li s-au administrat doze cumulative mai mari de 950 mg/m<sup>2</sup>; astfel doza maximă recomandată de EPI a fost ajustată cu precauție la 900 mg/m<sup>2</sup>.

Astfel, înlocuirea DOX cu EPI nu elimină riscul de a dezvolta cardiotoxicitate cronică. De asemenea, trebuie remarcat faptul că mecanismele care stau la baza cardiotoxicității reduse a EPI versus DOX s-ar putea să nu se limiteze la glucuronidare și eliminare crescută. Mecanismele reale și dependența de doză a toleranței cardiace îmbunătățite a EPI pot necesita, prin urmare, o evaluare suplimentară atât în contextul preclinic, cât și în cel clinic.

## **2. ROLUL REZONANȚEI MAGNETICE CARDIOVASCULARE (CMR)**

### **2.1. INTRODUCERE IN REZONANȚA MAGNETICĂ**

Rezonanța magnetică cardiovasculară (CMR) este o tehnică de imagistică tomografică neinvazivă. Avantajele sale intrinseci sunt capacitatea de a achiziționa imagini în mai multe planuri fără limitarea ferestrei acustice și a habitusului corpului pacienților, lipsa expunerii la radiații, raporturi ridicate contrast-zgomot și acoperire volumetrică 3D reală, fără presupuneri geometrice. Cu toate acestea, oportunitatea unică pe care CMR o oferă este caracterizarea neinvazivă a țesutului miocardic.

CMR este contraindicat la pacienții cu implanturi feromagnetice, inclusiv dispozitive cardiace condiționate non-MR. În special, la pacienții cu cancer de sân trebuie folosită precauție la evaluarea expansiilor de țesut mamar care ar putea conține unele componente feromagnetice. Limitările suplimentare ale CMR (Figura 6) includ disponibilitatea și expertiza limitate (dar în creștere), costul și claustrofobia potențială a pacientului. La pacienții cu disfuncție renală și eGFR, administrarea de 30 ml / min / 1,73 m<sup>2</sup> de contrast gadolinium-chelat ar trebui luată în considerare cu prudență din cauza riscului potențial, deși minim, de scleroză sistemică nefrogenă (7).

### **2.2. MAPAREA MIOCARDICĂ T2 ȘI T2 \***

Cartografierea miocardică T2 este o tehnică utilizată pentru reconstituirea unei imagini parametrice pe baza valorii T2 măsurate în fiecare voxel. Acumularea de apă în miocard este asociată cu diferite tipuri de patologie, cum ar fi infarctul miocardic acut, miocardita și respingerea grefei. Având în vedere un timp lung de relaxare transversală a protonilor de apă, cartografierea miocardică T2 pare să fie promițătoare pentru detectarea apei intramiocardice și chiar cuantificarea edemului miocardic. Verhaert și colab. a raportat că cartarea T2 poate fi utilă pentru identificarea regiunilor miocardice cu risc și a obstrucției microvasculare (21).

Relaxarea  $T2^*$  se referă la scăderea rapidă a magnetizării transversale cauzată de neomogenitatea câmpului magnetic local. Inomogenitatea înregistrată magnetic provine din neomogenitatea câmpului magnetic static sau din diferențele de susceptibilitate magnetică dintre țesuturile vecine, cum ar fi interfețele aer-țesut, implanturi metalice, agenți de contrast paramagnetici sau depunerea de fier. În mod specific, cartografierea  $T2^*$  a miocardului este sensibilă la conținutul de fier tisular și, prin urmare, este utilizată pe scară largă pentru a cuantifica gradul de depunere a fierului în miocard la pacienții cu talasemie majoră și transfuzie repetată de sânge (22).

Valorile rezonanței magnetice  $T2^*$  ale miocardului sunt direct legate de nivelurile de fier tisular. Efectele minore ale oxigenării miocardice și fibrozei sunt copleșite de efectul de fier extrem de dominant în nivelurile relevante clinic de supraîncărcare a fierului miocardic. Valorile miocardice  $T2^*$  mai mici de 20 ms indică o supraîncărcare a fierului, iar acest lucru este considerat sever atunci când  $T2^*$  este mai mic de 10 ms. Scăderea nivelului miocardic  $T2^*$  este asociată cu disfuncție ventriculară sistolică și diastolică. De exemplu, cele mai multe cazuri înregistrate de insuficiență cardiacă în talasemie au apărut până în prezent la pacienții cu valori  $T2^*$  foarte mici (în intervalul sever).

Excepții la acest lucru au apărut la pacienții cu alte cauze ale insuficienței cardiace, cum ar fi bolile cardiace congenitale concomitente. La pacienții care prezintă insuficiență cardiacă care suferă chelare agresivă cu deferoxamină intravenoasă continuă, studiile longitudinale arată că  $T2^*$  miocardic crește și acest lucru este însoțit de creșteri ale fracției de ejeție și ameliorarea insuficienței cardiace. În studiile transversale,  $T2^*$  miocardic și fracția de ejeție a pacienților cu deferipronă au fost superioare celei pacienților cu deferoxamină.

Tehnica  $T2^*$  a fost inițial dezvoltată cu scopul de a minimiza artefactele imagistice, de exemplu, a fost utilizată compensarea fluxului și respirația mișcată a fost suprimată prin reținerea respirației. Pentru măsurarea miocardului  $T2^*$  in vivo, se dobândește o felie cu ax scurt scurt ventricular mediu și se definește o regiune omogenă de interes care cuprinde atât regiuni epicardice, cât și regiuni endocardice, deoarece fierul este stabilit preferențial în epicard în comparație cu endocardul. Analiza este limitată la sept pentru a evita artefactele de susceptibilitate care apar din venele vaselor cardiace anterioare și posterioare și din plămâni (Figura 7). În plus,  $T2^*$  din sept s-a dovedit a fi un bun indicator al fierului global din inimă (22). Cu scopul de a aborda eterogenitatea în distribuția fierului în miocard, a fost de asemenea propusă o achiziție  $T2^*$  cu mai multe felii, dar este consumatoare de timp, iar analiza este confundată cu includerea unor artefacte de susceptibilitate.

### **3. EFECTELE CARDIACE ALE DOXORUBICINEI – PRINCIPALELE MECANISME MOLECULARE (FIZIO)PATOLOGICE**

Cardiotoxicitatea Doxorubicinei are cel mai probabil o cauză mediată de o inducere a unei apoptoze celulare (moarte celulară "programată"), prin producerea și eliberarea de multipli radicali liberi; potrivit unor studii recente, se poate extrapola și o suprapunere și o posibilă dereglare pentru homeostazia calciului intracelular (3). Efectul acesta este diferit de efectul țintă antitumoral, care se produce prin interferența la nivel de replicare a ADN-ului, al alchilării și a cross-linking-ului, la nivelul transcripției RNA-ului cât și al inhibiției topozomerazei II (6).

#### **3.1. STRESUL OXIDATIV ȘI APOPTOZA CELULARĂ (PROGRAMATĂ)**

Stresul oxidativ poate să fie caracterizat ca o dereglare în economia și balanța dintre agenții prooxidanți – antioxidanți. Tot acest proces multifactorial de stres are o vădită influență asupra agenților prooxidanți, putând să aibă astfel o direcție către posibile dereglări și lezări de natură celulară și la aparatele și sistemele intracelulare (24).



Inechitatea acestor doi tipuri de agenți, este posibil să aibă ca și punct de plecare, fie un exces de specii reactive de oxigen – **SRO** - [Engleză - **ROS** (*reactive oxygen species*)] sau o cantitate redusă sau necorespunzătoare de agenți antioxidanți, cum ar fi superoxid dismutaza (**SOD**), vitamine sau o catalază.

Dintr-o perspectivă fiziopatologică, stresul oxidativ este deopotrivă învinuit și în apariția și evoluția unor alte patologii diferite și ROS dețin un rol destul de elocvent în apariția cardiotoxicității induse de agenți antraciclinici. În urma administrării de Dox, apar radicalii liberi, prin procesul de adiție a unui electron la fracțiunea chinonă a acesteia, continuând ca acest compus să aibă o revenire la statusul inițial, prin reducerea unui oxigen la un **anion superoxid** ( $O_2^{\cdot-}$ ) (Figura 9).

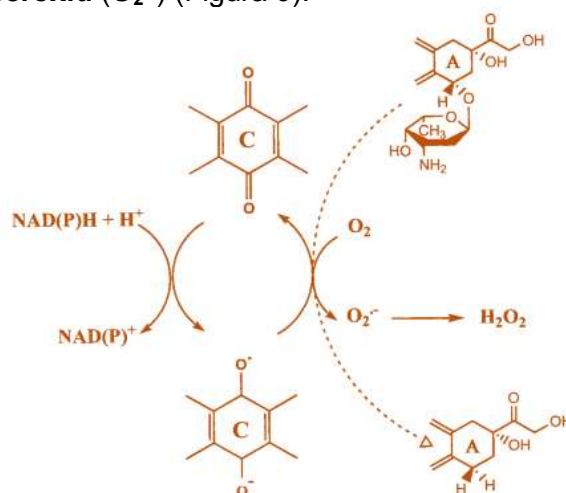


Figura 2 Producerea radicalilor liberi de oxigeni (ROS) după utilizarea de antraciclină [Y] ; NAD(P)+ - nicotinamidă adenozină dinucleotidă fosfat

Speciile reactive de oxigen determină inducerea apoptozei, fie urmând calea extrinsecă [cu mediere *Fas* (este un complex proteinic transmembranar tip II și care aparține familiei factorului de necroză tumorală - TNF)] cât și urmând calea intrinsecă (de natură mitocondrială) .

### 3.2. APOPTOZA CELULARĂ SAU MOARTEA CELULARĂ PROGRAMATĂ

Actualmente, pentru a explica moartea celulară programată, este extrem de utilizată ipoteza “SRO și fierului”. Recent au fost vehiculate date noi conform cărora Dox poate interacționa direct cu anumiți factorii trigger pentru moartea celulară (programată) (25).

Principalele tipuri de moarte celulară sunt catalogate după cum urmează:

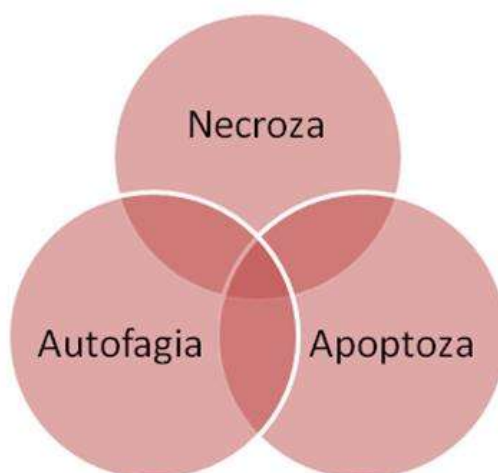


Figura 3 Principalele forme de moarte celulară programată

Necroza este definită ca o moarte celulară extinsă și cu un caracter necontrolat cu un proces infiltrativ celular inflamatoriu intens.

Apoptoza exprimă un ansamblu de procese celulare programate, însă fără o rupere a membranei plasmatică, cu multiple modificări morfologice caracteristice, manifestate printr-o micșorare a volumului celular, o condensare a cromatinei și o fragmentare a nucleului celular (nucleară).

Autofagia decurge la un nivel local, de exemplu într-o celulă și arată un intens proces catabolic, care cuprinde o degradare pentru propriile componente intracelulare prin inițierea unui mecanism lizozomal.

Doxorubicina induce un proces de deteriorare a ADN-ului mitocondrial, o lezare a membranei mitocondriale, multiple disfuncții mitocondriale și o depleție de ATP, toți acești factori concurând la un proces intens și extins de necroză (26–29).

La ora actuală sunt multiple studii care susțin ideea conform căreia Dox induce un proces de apoptoză celulară la nivelul cardiomiocitar printr-o activarea a componentei p53 (30,31), apariția așa numitului proces de “down-regulation” (reglare negativă) pentru GATA-4 (27,32) și pentru un proces de degradare al p300 (33,34). Factorul de transcripție GATA-4 are un rol principal în procesul de supraviețuire al cardiomiocitelor postnatale, diferențiate și mai exprimă un activator al genei antiapotoză Bcl-X (35). Acest proces reglator negativ inițiat de către compușii antraciclinici pentru GATA-4 este intermediat de o inhibiție a transcriptorului pentru gena GATA-4, acest proces de inhibiție fiind direct dependent de p53, care prezintă un rol în blocarea legării CBF/NFY la secvența CCAAT, din cadrul promoterului GATA-4 (36). Factorul de coactivare transcripțional p300 are o implicare pentru o multitudine de reacții intracelulare, inclusiv ca factor reglativ al ciclurilor celulare, al diferențierii celulare și nu în ultimul rând în procesele de geneză tumorală și apoptoză (18,37). Anumite kinaze, de exemplu p38 alfa și beta, activate de către Dox, sunt coroborate cu o fosforilare a factorului p300 și sunt responsabile și în procesul de degradare al acestuia, toate aceste fenomene fiind desfășurate în paralel cu o apoptoză celulară care a fost observată la nivelul cardiomiocitelor neonatale primare, ca și un răspuns la administrarea de Dox (4). O blocadă de ordin farmacologic pentru p38 este un factor de prevenție pentru o degradare a p300. O refacere a GATA-4 (38) și p300 (39) inhibă apoptoza cardiomiocitară, indusă de doxorubicină.

Autofagia, care precum am specificat reprezintă un proces la nivel lizozomal pentru degradarea propriilor constituenți de natură celulară, și prezintă un rol extrem de important în procesul de reînnoire al cardiomiocitelor, în cazul acesta reprezentat de celulele postmitotice cu o durată de viață mare (31). Astfel se poate spune ca autofagia reciclează anumiți constituenți celulari de degradare și că aceasta este potențată în anumite condiții patologice, inclusiv în hipertrofia și dilatația cardiacă, în cardiomiopatiile și în insuficiența cardiacă. Există anumite date din literatura de specialitate care indică că procesul de autofagie prezintă un puternic efect dual la nivelul inimii supuse unui factor de stres: un puternic beneficiu prin procesul de îndepărtare al acelor agregate de natură proteinică și pentru organele intracelulare distruse, ajutând astfel la menținerea unei homeostazii energetice și un rezultat negativ, de natură dăunătoare, printr-un proces excesiv autofagic, rezultând moartea celulară (40).

## **5. STUDIUL EXPERIMENTAL**

### **5.1. OBIECTIVE**

Efectele cardiotoxice cu un caracter permanent cauzate de terapia citostatică convențională subliniază necesitatea unor metodologii de diagnosticare precoce dotate cu o specificitate și sensibilitate crescută care să aprobe evidențierea cât mai timpuriu semnele de disfuncție cardiacă, o consecință primară pentru efectelor cardiotoxice a medicației

citostatice. Specificitatea și sensibilitatea oricărui test ar trebui să admită o examinare distinctă pentru raportul risc/beneficiu, care reprezintă un element de echilibru dintre probabilitatea de apariție a unei disfuncții cardiace datorată unor doze crescute cumulative de medicație și consecințele ce ar deriva din oprirea acelei terapii de sorginte antitumorală.

În studiile de specialitate autohtone, cu referire la acest subiect, există foarte puține informații cu privire la procesul de monitorizare și de management pentru cardiotoxicitatea Dox. Analiza acestui studiu poate să confere implicit un set larg de soluții în vederea unei stabilirii pentru metoda de reducere și prevenție a cardiotoxicității, chiar și printr-o utilizare de doze crescute de antracicline, cu o cotă mai înaltă a vindecării concomitent și cu o îmbunătățire pentru calitatea vieții acelor pacienți.

Targetul acestei teze este reprezentat de o identificare și o corelare cât mai precoce pentru cardiotoxicitatea Dox prin utilizarea unei palete diverse de metode paraclinice: imagistice (rezonanță magnetică nucleară T2\*) și biologice - markeri biochimici specifici metabolismului și economiei fierului [transferina], precum și printr-o determinare și analiză a unui scor de risc genetic indicat printr-o cuantificare de natură genetică pentru prezența unui cuplet de expresivitate genetică al TLR4.

Se dorește ca principalele rezultate ale acestui studiu să fie confirmate ca de utilitate în vederea determinării unui nou instrument de screening pe termen lung, pentru o supraveghere, prevenție și un tratament ulterior, acolo unde este necesar la pacienții care au supraviețuit unor afecțiuni de natura neoplazică.

## **5.2. MATERIAL ȘI METODĂ**

### **5.2.1. ASPECTE GENERALE**

Acest studiu a fost un studiu prospectiv analitic, multicentric, care a avut loc între 2018 și 2019.

Fiecărui subiect inclus în studiu i s-au efectuat evaluări anamnestice clinice și explorări paraclinice complexe. Pacienții care prezentau simptomatologie de afectare cardiacă anterior inițierii chimioterapiei nu au fost incluși în acest studiu.

Pacienții sau reprezentanții legali ai acestora au fost informați (verbal și în scris) în prealabil, pentru eventualul potențialul efect toxic al chimioterapiei, inclusiv cardiotoxicitate (de către medical currant). Deasemenea, li s-au prezentat metodele de evaluare a funcției cardiace și opțiunile terapeutice în eventualitatea dezvoltării cardiotoxicității.

Includerea pacienților în studiu s-a efectuat doar după ce s-a obținut consimțământul individual informat în scris de la aceștia sau de la reprezentanții legali ai acestora.

Studiul a fost prezentat comisiei de etică din cadrul Spitalului Clinic Județean de urgență din Arad și aprobat de către aceasta comisie și respectă toate normele și normativele naționale și europene în momentul desfășurării (**Anexa II**).

Formulare și un set complet pentru anexele legale ale acestui studiu sunt prezentate la finalul acestei teze (Anexa).

Acest studiu s-a conformat regulamentelor internaționale în vigoare, desfășurându-se în conformitate cu Recomandările ICH-GCP (International Conference of Harmonization - Good Clinical Practice = Conferința Internațională de Armonizare – Regulile de Bună Practică) și Declarația de la Helsinki, adoptată de Adunarea Generală a Asociației Medicale Mondiale din iunie 1964.

### **5.2.2. POPULAȚIA STUDIATĂ**

Cohorta noastră a inclus 25 de pacienți consecutivi cu vârsta cuprinsă între 18 și 65 de ani care au primit tratament Dox pentru afecțiuni maligne hematologice (leucemie, limfoame sau mielom multiplu) cu o probabilitate de supraviețuire > 6 luni și o FEVS > 50% și care au acordat consimțământul scris în scris.

#### **5.2.2.1. Criterii de includere/excludere**

Principalele criterii aplicate în selecția subiecților din cadrul acestui studiu sunt redată în cele ce urmează:

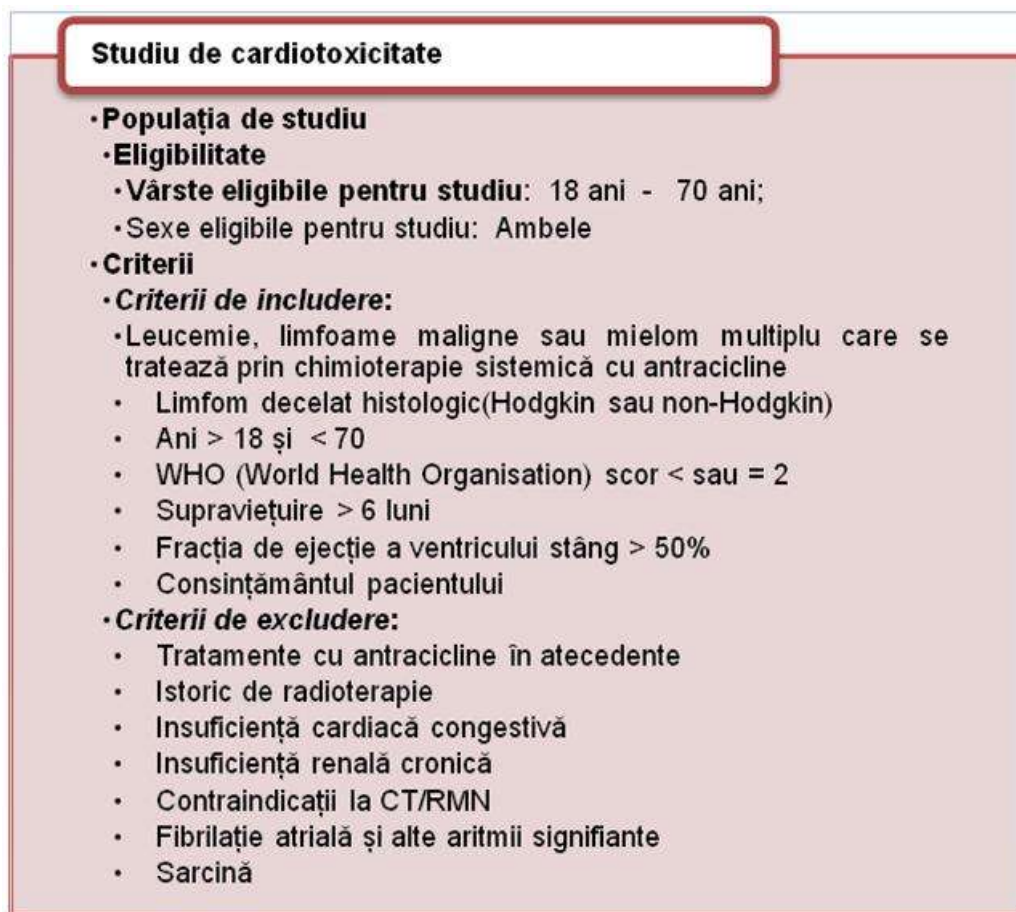


Figura 4 Prezentare generală a metodologiei de studiu – criterii de includere/excludere

### 5.2.3. METODOLOGIA STUDIULUI

#### 5.2.3.1. Metode de evaluare

- Principalele metode de studiu:
- **Prođuși biologici: Transferina**
    - din sângele periferic
  - **Rezonanță magnetică cardiacă**
    - T2\* - încărcarea cu fier
  - **Makeri genetici pentru TLR4**
    - din sângele periferic
  - **Analiza statistică**
    - **Studiu Cohort prospectiv:** utilizarea **GraphPad Prism version 8.0.0 for Mac OS X**

#### 5.2.3.2. Metodologie generală de investigare studiu genetic și biologic

O probă de sânge periferic a fost prelevată de la toți pacienții aflați în starea de repaus alimentar de cel puțin 12 ore pentru a evalua expresia genei TLR4 și nivelurile serice ale transferinei serice.

Expresia genică a fost evaluată și cuantificată prin qRT-PCR utilizând următorii pași: colectarea sângelui (3 ml), izolarea ARN, transcrierea inversă a ADNc, qRT-PCR și cuantificarea expresiei relative. Moștra de sânge prelevată a fost extrasă direct într-un tub de prezervare de ARN din sânge, Tempus (4342792 Applied Biosystems).

Nivelurile de transferină serică au fost, de asemenea, cuantificate la urmărire (3 și 6 săptămâni).

O schemă a întregului proces este ilustrată în **Error! Reference source not found..**

### 5.2.3.3. Material și metodă studiu genetic

#### 5.2.3.3.1 Materiale utilizate

1. Tempus TM Blood RNA Tubes 50/Pkg
2. Tempus Spin RNA purification kit, 50/Pkg
3. 50 ml Conical Tubes (racked) 200/Pkg
4. RNase Inhibitor, 20 Units/μl, 100 reactions 2000 Units
5. Nuclease-free Water (1.75 ml/tube)
6. Eppendorf epTIPS LoRetention Reloads, PCR clean,
7. epTIPS LoRetention Reloads, PCR clean, 2-200Åμl, 10
8. epTIPS LoRetention Reloads, PCR clean, 50-1000Åμl,
9. twin.tec real-time PCR Plate 96, skirted (Wells white)
10. Eppendorf PCR tubes 0.5ml., colourless, 500 pcs
11. Eppendorf 0.2 ml PCR tubes, colourless, per 1,000 pcs,
12. Heat Sealing film, 100 pcs.
13. PCR Film (self-adhesive), 100 pcs.
14. ETHANOL PURISS P.A. ABSOLUTE puriss. p.a.,
15. High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit

Figura 5 Materiale utilizate - studiu genetic

## 5.3. REZULTATE

Rezultatele investigațiilor întreprinse sunt formulate în continuare și dezbătute în perspectiva datelor din literatură actuală medicală și ilustrate utilizând graficele, tabelele și alte forme de reprezentări grafice sugestive.

### 5.3.1. CARACTERIZAREA LOTULUI DE STUDIU

#### 5.3.1.1. Principalele caracteristici ale lotului de studiu

Lotul total constitutiv al studiului avut în vedere este alcătuit din 25 de subiecți (pacienți) care prezintă o diversă patologie oncologică și care au primit un o schema terapeutică oncologică cu doxorubicină.

Lotul cu subiecții pentru control luat în considerare a fost compus din 25 de subiecți. Caracteristicile esențiale și elemente principale utilizate pentru elaborarea acestui lot sunt formulate pe baza următoarelor criterii:

- ♥ O medie de vârstă cu o valoare apropiată pentru cea de la lotul de studiu
- ♥ și o distribuție cu un caracter uniform pentru repartitia și distribuția pe sexe.

Un alt element avut în vedere a fost non-existența premergătoare studiului pentru o patologie oncologică (indiferent dacă a fost cu sau fără tratament din clasa antraciclinelor).

Conform datelor din categoria de referință "vârstă", procesul de analiză descriptivă a decelat că un număr crescut de pacienți au fost incluși la categoria de vârstă <57 ani, respectiv 13 cazuri (66%); urmează categoria >57 ani cu 8 cazuri (22%); cele mai mici valori au fost pentru 4 cazuri (12%) fiind distribuite în categoria >60 ani.

Din totalul de 25 pacienți luați în lotul studiului și încorporați în cohorta principală de analiză (100%), 8 pacienți (32%) au fost diagnosticați cu diferite hemopatii de natură malignă și 17 (68%), cu tumori de natură solidă (Figura 30).

Dintre aceste cazuri, se distribuie: LAL 3 (12%), 1 (4%) cazuri LAM, 4 (16%) cazuri cu LNH.

16 pacienți (64%) nu au primit tratament cu alți agenți antineoplazici cu efect cardiotoxic, 3 pacienți (12%) au primit doar ciclofosamidă, 3 (12%) au beneficiat de ciclofosamidă și ifosfamidă high-doses, 2 (8%) ciclofosamidă și citarabin high-doses, 1 pacient (4%) a fost tratat doar cu actinomycină.

La finalizarea studiului pentru subiecții înrolați s-au cuantificat următoarele doze cumulative de antracicline. Doza medie cumulativă este de 450-500 mg/mp, cu o mediană de 432 mg/mp, realizând în acest fel menținerea unei doze cumulative antraciclinice sub o valoare cu potențial de risc de 450 mg/mp. Dozele minime administrate anumitor subiecți din lotul de studiu a fost de 240 mg/mp, iar cele maxime de 600 mg/mp.

Distribuția datelor la subiecții incluși în studiu, se expune astfel: 3 subiecți (12%) au fost încadrați în categoria < 200 mg/mp, 6 pacienți (24%) în categoria 200-450 mg/mp, 8 pacienți (32%) au fost incluși în categoria 450-550 mg/mp, și 5 pacienți (20%) au avut doze cumulative de agenți antraciclinici care au fost peste dozele limită de 550 mg/mp: 2 pacienți (8%) în grupul 550-700mg/mp și 1 pacient (4%) > 700mg/mp.

Distribuția în funcție de tipul de manifestare a cardiotoxicității se prezintă astfel: 16 pacienți (64%) nu au arătat nici o manifestare cardiotoxică de natură clinică sau paraclinică pe toată perioada monitorizării, 6 pacienți (24%) au expus elemente de cardiotoxicitate subclinică, iar 3 pacienți (12%) au exprimat manifestări clinice de cardiotoxicitate.

Repartiția cazurilor în funcție de această clasificare „temporală” a fost următoarea (n=9): 2 cazuri (22,22%) cu prezentare cardiotoxică cu un debut precoce, 6 cazuri (66,66%) cu elemente cronice de cardiotoxicitate și în cele din urmă 1 caz (11,11%) pentru cardiotoxicitate instalare tardivă.

Cantitatea medie de unități de expresie genică a fost de 0,121 pentru TLR4 (interval 0,051-0,801). Nivelurile de ARNm pentru genele țintă au fost normalizate cu referire la o genă GAPDH; rezultatul este prezentat ca expresie genică relativă. Cantitatea medie extrasă de ARNm a fost de 113.571 μg / pl (Figura 50).

Există o relație liniară descendentă puternică (negativă) între expresia TLR4 și valorile CMR T2 \* ( $r = -0,9106$ , \*\*\*\*  $P < 0,0001$ ), unde  $r$  = coeficientul maxim de corelație simplă (Pearson). Există, de asemenea, o corelație liniară (fie pozitivă, fie negativă) cu EF și Transferrin; nicio relație stabilită legată de genul genetic al pacienților. Principalele corelații TLR4 sunt prezentate în Tabel 8.

Nivelurile de transferină serică (90 - 25,87 ng / mL) în determinarea inițială au avut o corelație semnificativă ( $r = 0,898$ ;  $P < 0,0001$ ) cu determinarea de 6 săptămâni (108 - 40,13 ng / mL). Nu a existat nicio diferență statistică bazată pe sex sau corelație pentru acest parametru evaluat (Figura 51).

## 5.4. DISCUȚII

Deși chimioterapia tradițională citotoxică este încă utilizată pe scară largă, dezvoltarea clinică și utilizarea agenților care vizează căile de semnalizare au crescut semnificativ. Perturbarea acestor căi de semnalizare poate duce la efecte asupra țesutului cardiovascular (CV) care poate duce la evenimente cardiace adverse, adesea denumite în general cardiotoxicitate. Cardiotoxicitatea poate apărea în orice moment în timpul sau după terapia cancerului, în funcție de efectele fiziopatologice ale agentului, de factorii de risc cardiovascular preexistent ai pacientului și de rezervele fiziologice ale pacientului. Leziunea prin radiație a țesutului cardiovascular expus apare într-o manieră dependentă de doză, ducând la răspuns inflamator, moarte celulară și fibroză rezultată.

Înțelegerea mecanismului de acțiune al agenților anticancerigeni noi (sau de investigație) asupra țesutului cardiovascular poate ajuta la identificarea efectelor specifice de evaluat în studii non-clinice și apoi la monitorizarea prospectivă a acestor evenimente în studiile clinice. Atenuarea cardiotoxicității și implementarea strategiilor cardioprotectoare pot fi luate în considerare înainte, în timpul sau după terapie. Combinația de biomarkeri multipli și o strategie integrată de biomarkeri și măsuri imagistice sunt, de asemenea, domenii de investigație activă în cardio-oncologie.

Pe lângă formele de moarte celulară apoptotică, deja studiate și cunoscute, există forme non-apoptotice de moarte celulară, care pot declanșa un proces sistematic de cascadă a inflamației prin eliberarea modelelor moleculare asociate pericolului (DAMP), care urmează să fie recunoscute de către înnăscute receptorii imuni (IIR) (137). Mecanismele de fiziopatologie care declanșează o disfuncție cardiomiocitară secundară unui proces de supraîncărcare a fierului sunt parțial necunoscute (Figura 54).

Postulăm că intrarea unei endotoxine în circulație declanșează inflamația sistemică mediată de TLR4 (un răspuns precoce IIR). Endotoxina reprezintă în acest caz scenariul de raționament o componentă cheie pentru bacteriile Gram-negative și, de asemenea, un ligand de TLR4 (138,139). În circumstanțe normale de homeostazie, o cantitate mare de



bacterii care prezintă endotoxină locuiesc în intestin și sunt strict limitate de bariera mucoasa intestinală. Dar această barieră ar putea fi spartă de doxorubicină, despre care se știe că este capabilă să perturbe epiteliul pentru a induce ulcere orale, inflamații intestinale și cistită hemoragică la pacienții cu cancer (140,141). Dacă doxorubicina a cauzat leziuni la nivelul mucoasei intestinale, endotoxina ar putea intra în circulație și ar putea stimula inflamația sistemică.

Mai mult, s-a constatat că doxorubicina reglează în sus expresia TLR2 și 4 în cardiomiocite (31). Este posibil ca această moleculă să ridice direct nivelul TLR4 în macrofage, rezultând răspunsuri inflamatorii mai puternice la endotoxină și leziuni mai severe la diferite organe.

De obicei, o disfuncție ventriculară stângă semnificativă (scădere cu peste 10% pentru FEVS) a apărut deja atunci când cardiotoxicitatea este detectată prin tehnici de imagistică (cu manifestări clinice). Biomarkerii, cel mai important peptidele natriuretice cardiace și troponinele, au fost markeri promițătoare pentru identificarea pacienților cu risc potențial de simptome clinice de insuficiență cardiacă (142). Cu toate acestea, până acum, acești biomarkeri nu și-au dovedit utilitatea practică ca instrument de screening și management al cardiotoxicității indus de antraciclină.

Pentru a fi și mai specific, utilitatea troponinei a fost demonstrată în principal după administrarea de medicamente antineoplazice și  $\beta$ -simpatomimetice, deși utilizarea de rutină a acestor markeri în monitorizare la pacienții care primesc terapie cu antraciclină este departe de a fi rezolvată (143).

Comorbiditățile preexistente sau stilul de viață nefavorabil (hipertensiune arterială, diabet, hiperlipidemie, activitate fizică redusă) sunt cunoscute de mult timp pentru a crește riscul de cardiotoxicitate la pacienții care urmează să primească antraciline și au fost astfel determinate și analizate în cadrul studiului pe loturi.

În practica noastră medicală zilnică, identificarea pacienților cu risc crescut de cardiotoxicitate este extrem de importantă.

Trebuie remarcat faptul că există, de asemenea, o mare variabilitate individuală a sensibilității la antraciclină pentru fiecare pacient.

## 6. CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE

- ♥ Teza de față a avut scopul de a studia posibile aplicații ale metodelor imagistice și biologic-genetice de avangardă, cum sunt RMN cardiac T2\* și analiza TLR4 din sângele periferic, în studiul cardiotoxicității induse de Doxorubicină.
- ♥ În prezent, încă nu avem o definiție consensuală pentru cardiotoxicitate.
- ♥ Semnalizarea TLR produce o activare și o maturare a celulelor sistemului imunitar și este indispensabilă pentru un răspuns imun eficient îndreptat împotriva microorganismelor patogene, precum și împotriva celulelor maligne.
- ♥ Anumite studii experimentale, au demonstrat că Doxorubicina poate să determine o creștere directă a nivelului fierului intracelular din "bazinul" (pool) de fier labil intracelular, care, în mod normal, este corespondentul a aproximativ <5% din fierul total intracelular.
- ♥ Fiziologic, marea majoritate a celulelor organismului uman acceptă fierul prin intervenția unei glicoproteine plasmatică, transferina.
- ♥ Fiziopatologia doxorubicinei constă în acumularea și suprapunerea efectelor acesteia, având ca elemente principale formarea de radicali liberi și perturbarea metabolismului fierului.
- ♥ Chiar dacă teoria SRO și a fierului este în mare proporție recunoscută ca și un mecanism primar în toxicitatea doxorubicinei, utilizarea în practică de antioxidanți, pe parcursul unor teste clinice și a modelelor de reproducere experimentală pe

animale, a dat greș în a amortiza și în a reduce cardiotoxicitatea indusă de antracicline.



Valorificarea efectelor benefice ale stimulării TLR4 rămâne o provocare pentru cercetarea din domeniul cancerului.



Cardiotoxicitatea antraciclinică se asociază cu inflamația cardiacă , prin medierea sistemului imun nespecific.



Metodologia de lucru concepută pentru acest studiu poate să constituie un etalon pentru elaborarea și diversificarea altor schițe experimentale din acest domeniu de interes (sau nu numai, prin însăși abordarea interdisciplinară sau corelată de studiu uman și pe model experimental, a acestei teze).



Se pot utiliza unii agenți de protecție cardiacă, care se asociază cu o scădere a cardiotoxicității și facilitează utilizarea unor doze mai mari cumulative de antracicline. De asemenea, cardiotoxicitatea la antracicline poate fi minimizată prin utilizarea analogilor care ar putea fi mai puțin cardiotoxici.



Trebuie actualizate definițiile și cerințele științifice și tehnice detaliate privind medicamentele utilizate în terapia genică și medicamentele utilizate în prevenirea cardiotoxicității induse de antracicline. Mai mult, trebuie stabilite cerințe științifice și tehnice detaliate privind produsele obținute prin inginerie tisulară, precum și privind dispozitivele medicale care conțin medicamente pentru terapii avansate și medicamentele combinate pentru terapii genice .