I.O.S.U.D. - Universitatea de Vest ”Vasile Goldiș” din Arad
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ

Arad, 2016

TEZA DE DOCTORAT

Cardiotoxicitatea antraciclinelor – noi aspecte în imunomodelarea TLR4, TLR2 ca factor trigger – studiu în corelație cu parametrii clinico-ecocardiografici

Doctorand:
Adina Ligia Pop-Moldovan

Conducător de doctorat:
Prof.Univ.Dr. Maria Puşchiţă

PhD THESIS

Cardiotoxicity of anthracyclines - new aspects in immunomodulation of TLR4, TLR2 as a trigger factor - study correlated with clinical and echocardiographic parameters

PhD Student:
Adina Ligia Pop-Moldovan

Scientific supervisor:
Prof.Univ.Dr. Maria Puşchiţă

CUPRINS

PARTEA GENERALĂ

STADIUL ACTUAL AL CUNOAŞTERII 12

CAPITOLUL I - EFECTELE CARDIACE ALE ANTRACICLINELOR 15

1.1. Scurt istoric al antraciclinelor 15

1.2. Farmacologia clinică a doxorubicinei 16

1.3. Proprietăţi farmacologice 17

1.3.1. Proprietăţi farmacodinamice 17

1.3.2. Proprietăţi farmacocinetice 17

1.3.3. Proprietăţi farmacodinamice ale doxorubicinei în celula cardiacă 20

1.4. Mecanismul molecular pentru efectele cardiace ale doxorubicinei 20

1.4.1. Stresul oxidativ şi apoptoza celulară 20

1.4.2. Apoptoza celulară 22

1.4.3. Metaboliţi secundari de alcool 25

1.4.4. Toxicitatea mediată de fier 26

1.4.5. Cardiotoxicitatea indusă de doxorubicină se asociază cu inflamaţia cardiacă, prin medierea sistemului imun nespecific. Imunomodulatoarele 30

1.4.6. Mecanismele endogene de apărare împotriva efectelor cardiace ale antraciclinelor 31

CAPITOLUL II - CARDIOMIOPATIA DILATATIVĂ CA EXPRIMARE A CARDIOTOXICITĂŢII 32

2.1. Fiziopatologia 32

2.2. Morfopatologia 32

2.3. Etiologia şi epidemiologia 33

2.4. Manifestări clinice în cardiomiopatia dilatativă 34

2.4.1. Radiografia toracică 34

2.4.2. ECG 35

2.4.3. Ecocardiografie, ventriculografie radioizotopică 35

2.4.4. Cateterismul cardiac şi coronarografia 35

2.4.5. Biopsia endomiocardică transvenoasă 35

2.4.6. Cardiotoxicitatea medicamentelor 36

2.4.7. Cardiotoxicitatea doxorubicinei 36

CAPITOLUL III - METODE DE DETECŢIE PENTRU EFECTELE SECUNDARE ALE ANTRACICLINELOR 38

3.1. Biopsia endomiocardică 38

3.2. Măsurarea funcţiei ventriculului stâng 38

3.2.1. Ecocardiografia 40

3.3. Markeri serici – troponinele cardiace si peptidul natriuretic 40

3.3.1 Troponinele cardiace 41

3.3.2 Peptidele natriuretice 41

3.4. Electrocardiografia 42

CAPITOLUL IV - TOOL LIKE RECEPTOR ŞI CARDIOTOXICITATEA 44

PARTEA SPECIALĂ 48

CAPITOLUL V - OBIECTIVELE STUDIULUI 49

5.1. Justificarea studiului 49

5.2. Ipoteza de lucru 50

5.3. Material şi metodă – aspecte generale 51

5.3.1. Design de studiu 51

5.3.2. Metodologia de studiu 52

5.3.3. Populaţia studiată 53

5.3.4. Metode de evaluare 54

5.4. Evaluare clinico-anamnestică 54

5.4.1. Anamneză pentru stabilirea eventualilor factori de risc şi a comorbidităţilor asociate 54

5.4.2. Examen clinic general şi local (aparat cardio-vascular) 55

5.5. Evaluare paraclinică 55

5.5.1. Electrocardiograma 56

5.5.2. Radiografia cardiotoracică 56

5.5.3. Ecocardiografia transtoracică 56

5.5.4. Evaluarea biomarkeri cardiaci - BNP si cTnI 58

5.5.5. Teste inflamatorii nespecifice 58

5.6. Analiza statistică a datelor 58

CAPITOLUL VI - RAPEL ECOCARDIOGRAFIC ŞI FIZIOPATOLOGIC 60

6.1. Modalităţi de examinare (ecografia transtoracică) 60

6.2. Examinarea Doppler 62

6.3. Măsurători de bază 63

6.4. Evaluarea funcţiei ventriculare 63

6.4.1. Funcţia sistolică a ventriculului stâng 63

6.4.2 Evaluarea funcţiei sistolice globale 64

6.4.3 Funcţia diastolică a ventriculului stâng 64

6.5. Evaluarea practică a funcţiei VS 66

CAPITOLUL VII - STUDIU GENETIC TLR2 ŞI TLR4 73

7.1. Context 73

7.2. Material şi metodă studiu genetic TLR2 şi TLR4 74

7.2.1 Materialele utilizate 74

7.2.2. Recoltarea probelor 75

7.2.3. Izolarea ARN-ului 76

7.2.4. Procedura de izolare a ARN 76

7.2.5. Determinarea expresiei genice relative pentru TLR2 şi TLR 4 din probele de ARN izolate 78

CAPITOLUL VIII - REZULTATE STUDIU CLINIC, BIOLOGIC ŞI IMAGISTIC 80

8.1. Principalele caracteristici ale lotului de studiu 80

8.2. Distribuţia în funcţie de vârstă 81

8.3. Distribuţia în funcţie de gen 82

8.4. Distribuţia în funcţie de mediul de provenienţă 82

8.5. Distribuţia în funcţie de afecţiunea de bază 83

8.6. Distribuţia în funcţie de categoria de risc 84

8.7. Distribuţia în funcţie de comorbidităţi 85

8.8. Distribuţia în funcţie de complianţă 86

8.9. Distribuţia în funcţie de statusul actual 86

8.10. Repartiţia în funcţie de asocierea altor citostatice cu efect cardiotoxic 87

8.11. Repartiţia în funcţie de asocierea radioterapiei 88

8.12. Repartiţia în funcţie de doza cumulativă de antracicline 89

8.13. Distribuţia în funcţie de cardiotoxicitate 90

8.14. Distribuţia în funcţie de categoriile de cardiotoxicitate 91

8.15. Tratamentul cardioprotector 92

8.16. Distribuţia în funcţie de modificările patologice 93

8.17. Evaluarea electrocardiografică 96

8.18. Evaluarea ecocardiografică 97

8.18.1. Evaluarea funcţiei sistolice 97

8.18.2. Evaluarea fracţiei de ejecţie şi de scurtare 98

8.18.3. Evaluarea indicelui de performanţă miocardică - indice Tei 100

8.18.4. Evaluarea timpului de contracţie izovolumică - TCIV 101

8.18.5. Evaluarea funcţiei diastolice 102

8.18.6. Evaluarea patternului fluxului transmitral 102

8.18.7. Evaluarea patternului fluxului venos pulmonar 103

8.18.8. Evaluarea timpului de relaxare izovolumică - TRIV 104

8.18.9. Evaluarea timpului de decelerare a undei E – TDE 105

8.18.10. Evaluarea disfuncţiei diastolice prin Doppler tisular 105

8.18.11. Factorii determinanţi ai indicilor din disfuncţia diastolică a ventriculului stâng prin analiză de regresie multiplă 106

8.18.11.1 Ce este regresia multiplă? 106

8.18.11.2. Rezultate analiză de regresie multiplă 107

CAPITOLUL IX - REZULTATE PENTRU STUDIUL GENETIC TLR2 ŞI TLR4 108

CAPITOLUL X - DISCUŢII 120

10.1. Evaluarea clinică, biologică şi imagistică 120

10.1.1. Analiza de corelaţie a parametrilor clinici şi ecocardiografici, cu indici ai funcţiei diastolice în rândul populaţiei de studiu 122

10.1.2. Evaluarea funcţiei sistolice 124

10.1.3. Imunomodularea mediată de TLR 2 si TLR4 128

10.2. Prezentarea clinică şi factorii de risc induşi de doxorubicină antraciclinică 132

10.3. Radio- şi chimioterapia pot spori imunitatea antitumorală prin furnizarea de liganzi TLR 134

10.4. Expresia TLR în context oncologic şi de tratament chimioterapic Doxorubicinic 135

10.5. Chimioterapia induce cardiomiopatie; patogeneza, monitorizare, management 136

10.5.1. Chimioterapia induce cardiomiopatie 136

10.5.2. Patogeneza 140

10.5.3. Monitorizare recomandată 140

10.5.4. Managementul pacientului sub tratament cu antraciclină (Doxorubicină) 141

CAPITOLUL XI - CONCLUZII 143

ORIGINALITATEA ŞI CONTRIBUŢIILE INOVATIVE ALE TEZEI 148

BIBLIOGRAFIE 149

LISTA PUBLICAŢIILOR 162

ANEXE 168

LISTA DE FIGURI ŞI TABELE 177

STADIUL ACTUAL AL CUNOAŞTERII

INTRODUCERE

Bolile cardiovasculare şi cancerul reprezintă cele mai răspândite patologii actuale cu o rată în continuă creştere. Tratamentul împotriva cancerului a devenit tot mai eficient, iar supravieţuirea pacienţilor este tot mai mare, în schimb afectarea cardiacă este tot mai frecventă.

Cardiotoxicitatea poate compromite eficacitatea clinică a chimioterapiei, care afectează supravieţuirea pacientului şi calitatea vieţii independent de prognosticul oncologic.

Efectele cardiotoxice permanente ale terapiei citostatice convenţionale impun găsirea unor metode de determinare precoce a injuriilor care apar la nivelul miocardului. Specificitatea oricărui test ar trebui să permită o analiză precisă a raportului risc/beneficiu, un echilibru între probabilitatea disfuncţiei cardiace datorate dozelor mari de medicamente şi consecinţele ce ar decurge din oprirea terapiei antitumorale.

Acest studiu a fost conceput cu scopul de a identifica şi corela precoce cardiotoxicitatea indusă de doxorubicină prin diverse metode paraclinice: imagistice (ecocardiografie 2D şi Doppler) şi biologice-markeri biochimici specifici distrucţiei miocardice (troponina), markeri neurohormonali ai disfuncţiei cardiace (brain natriuretic peptid-BNP). De asemenea prin acest studiu s-a urmărit determinarea şi analizarea unui scor de risc genetic prin cuantificarea genetică a prezenţei cupletului de expresivitate genetică pentru TLR2 şi TLR4.

În literatura de specialitate nu sunt date suficiente cu privire la manifestările şi severitatea cardiotoxicităţii şi nu a fost identificat cu certitudine nici un factor genetic care să fie răspunzător de apariţia semnelor de afectare miocardică la pacienţii trataţi cu doxorubicin sau derivaţii acestuia.

Motivaţia studiului de faţă constă în identificarea unor factori genetici mai exact TLR2 şi TLR4 care sunt implicaţi în cardiotoxicitatea indusă de doxorubicină. Ideea implicării unor factori genetici in cardiotoxicitatea a venit de la observaţia clinică conform căreia anumiţi pacienţi prezintă fenomene de cardiotoxicitate în urma unui tratament cu antracicline, în vreme ce alţi pacienţi urmând un tratament similar şi cu o patologie asemănătoare nu dezvoltă elemente cardiotoxice.

In cadrul studiului a fost evaluată performanţa cardiacă exprimată prin fracţia de ejecţie a ventriculului stâng (FEVS), parametrii funcţiei diastolice (E/E', E/A,TDE, IVRT) şi evaluare genetică (TLR2 /TLR4) la pacienţii cu neoplasm aflaţi în tratament citostatic. Criteriile de includere în studiu au fost: boala neoplazică tratată prin chimioterapie sistemică cu

antracicline, vârstă peste 18 ani şi mai mică de 70 ani, FE>50%, consimţământul informat al pacienţilor.

Studiul s-a desfăşurat pe o perioadă de 48 luni septembrie 2011- septembrie 2014 şi s-au evaluat pacienţii înainte de tratament chimioterapic şi după 6 luni când a fost încheiat ciclul de tratament.

CONTRIBUŢIA PERSONALĂ

Justificarea studiului

Schimbările profunde şi inerente care au intervenit în practica medicală din ultimele decenii au dus la conturarea unei alte tendinţe în ceea ce priveste rolul medicului în societate, necesitatea de informare şi de progres în domeniul cercetării biomedicale.

Medicina Bazată pe Dovezi nu este doar o orientare "la moda" a tinerei generaţii, ea reuşeşte să ne ancoreze în realitatea care nu mai poate fi concepută în afara sistemului informaţional.

Etapele istorice ale progresului medical ne-au facut să devenim din ce în ce mai circumspecţi astfel că, în prezent, mai mult decât oricând, privim medicina prin prisma limitelor cunoaşterii noastre.

Deoarece "Medicina este ştiinţa incertitudinii şi arta probabilităţii" (Sir William Osler), având în vedere că "Cel mai bun antrenament medical constă în învăţarea de a lucra cu nesiguranţa şi cu limitele cunoştinţelor medicale" (J.D. McCue), ultimele decenii ale secolului XX au pregătit printr-o nouă şi necesară orientare premisele medicinii mileniului trei, a medicinii "bazate pe dovezi".

Direcţiile noi conturate în ultimii ani conduc către o implicare din ce în ce mai mare a geneticii, în special a screeningului genetic în utilizarea interdiscplinară în studiului evenimentelor şi fenomenelor cardiologice, oncologice şi multe altele.

Obiectivele scontate ale studiului

Efectele cardiotoxice permanente ale terapiei citostatice convenţionale impune găsirirea unor metode de diagnostic precoce, cu o mare sensibilitate, care să permită evidenţierea cât mai precoce a semnelor de disfuncţie cardiacă. Specificitatea oricărui test ar trebui să permită o analiză precisă a raportului risc/beneficiu, un echilibru între probabilitatea disfuncţiei cardiace datorată dozelor mari de droguri şi consecinţele ce ar decurge din oprirea terapiei antitumorale.

În literatura de specialitate autohtonă există prea puţine date privitoare la monitorizarea şi managementul cardiotoxicităţii doxorubicinei.

Studiul poate conferi soluţii pentru stabilirea modului de reducere şi prevenţie a cardiotoxicităţii, chiar prin utilizarea de doze mai mari de antracicline, cu o rată mai ridicată de vindecare concomitent cu îmbunătăţirea calităţii vieţii pacienţilor.

Ţinta acestei lucrări este reprezentată de identificarea şi corelarea precoce a cardiotoxicităţii doxorubicinei prin diverse metode paraclinice: imagistice (ecocardiografie 2D si Doppler) şi biologice - markeri biochimici specifici distrucţiei miocardice [troponin -

cTnI], markeri neurohormonali ai disfunctiei cardiace [brain natriuretic peptide -BNP] precum şi prin determinarea şi analiza unui scor de risc genetic exprimat prin cuantificarea genetică a prezenţei cupletului de expresivitate genetică pentru TLR2 respectiv TLR4.

Rezultatele se doresc să fie demonstrate ca utile stabilirii unui nou instrument de screening pe termen lung, cât şi pentru supravegherea, prevenţia şi tratamentul ulterior, unde este cazul la supravieţuitorii unei afecţiuni neoplazice.

Material şi metodă – aspecte generale

Lucrarea de faţă reprezintă un studiu de tip analitic, descriptiv prospectiv.

Acesta a fost derulat pe o perioadă de aproximativ 48 luni, din septembrie 2011 până în septembrie 2014.

Studiul prospectiv a inclus cazuri noi de malignităţi la adult, internaţi la secţia Hemato-Oncologie a spitalului Clinic Judeţean de Urgenţă Arad, în perioada 2011–2014, pentru diverse afecţiuni oncologice şi cu tratament de elecţie având doxorubicina.

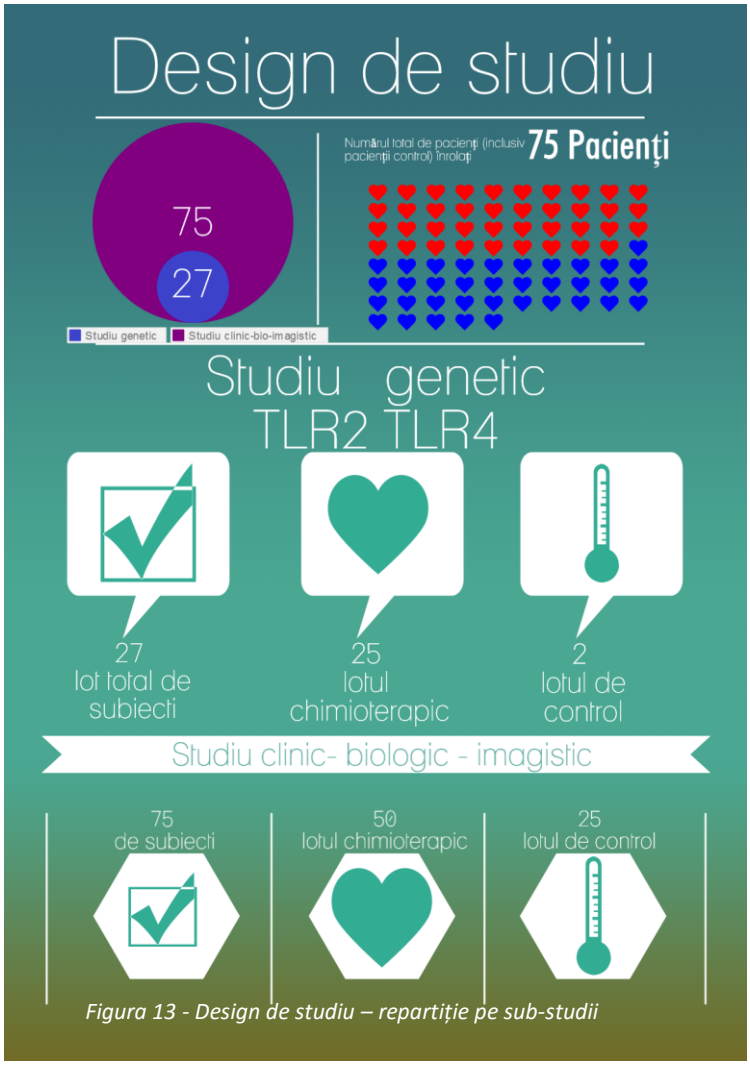

Figura 13 - Design de studiu – repartiție pe sub-studii

Au fost înrolați în studiu 75 de pacienți : 50 de pacienți au fost cu neoplazii și au urmat un tratament chimioterapic cu doxorubicină, iar 25 de pacienți au reprezentat lotul martor de subiecți cu patologie asemănătoare celor 50 de subiecți investigați, dar fără neoplazie și tratament chimioterapic. La tot lotul s-au efectuat studiul clinico-biologic și imagistic.

Studiul genetic de expresie a genelor TLR2 si TLR4 s-a efectuat la un număr de 27 de subiecţi, 25 din cei 50 care au primit tratament cu doxorubicină şi 2 subiecţi de control sănătoşi (Figura 13).

S-a intentat măsurarea velocităţii undei pulsului folosind ca metodă ecografia Doppler. Practic, s-a măsurat timpul dintre vârful undei R al înregistrării electrocardiografice, concomitent cu începutul anvelopei spectrale al undei pulsului, reprezentate ecografic la nivelul arterei carotide commune, respectiv femurale comune. În final, s-a măsurat diametrul dintre cele două puncte de pe artere. S-a calculat, pentru fiecare pacient, coeficientul de distensibilitate arterială şi complianţa arterială, prin măsurarea ecografică mod M a diametrului sistolic şi diastolic al arterei carotide comune.

Mai apoi, s-au folosit formule matematice preexistente, pentru calcularea acestor parametrii. S-a determinat elastanţa arterială cu ajutorul formulei de aproximare: 0.9 x tensiunea brahială sistolică, iar elastanţa ventriculară pe baza ecuaţiei: EVs = presiunea tele-sistolică /volumul tele-sistolic - V0, unde V0 este volumul teoretic la o presiune egală cu zero, şi considerat ca fiind neglijabil în comparaţie cu volumul tele-sistolic. Cuplarea ventriculo-arterială a fost evaluată prin determinarea raportului dintre elastanţa arterială şi cea ventriculară. Datele au fost introduse şi analizate statistic în programul SPSS, versiunea 20.0.

Variabilele continue cu distribuţie normală sunt prezentate ca medii şi deviaţii standard, iar semnificaţia diferenţelor a fost testată prin testul t Student. Variabilele continue cu distribuţie neuniformă sunt exprimate ca mediane (interval interquartile, IQR), iar semnificaţia diferenţelor a fost testată prin testul Kruskal-Wallis sau testul Mann- Whitney U. Variabilele categorice sunt exprimate ca procente. Normalitatea de distribuţie a variabilelor a fost evaluată prin testul Shapiro-Wilk. Pentru corelaţii între variabile nedistribuite normal, s-a aplicat coeficientul de corelaţie Spearman, iar testul Pearson hi-pătrat s-a folosit pentru compararea valorilor categorice. Regresia logistică multivariată s-a realizat pentru a evalua relaţia dintre variabilele dependente categorice şi variabilele independente. Analiza de supravieţuire a fost realizată pentru a investiga relaţia dintre nivelurile ridicate ale galectinei-3 şi timpul până la evenimentul primar sau secundar, folosind curbele Kaplan-Meier şi testul log-rank. Pentru a calcula raportul de risc pentru evenimentul primar (mortalitatea cardiovasculară pe o perioadă de 18 luni) în funcţie de

galectina-3, a fost utilizat modelul Cox de regresie al riscului proporţional.

Semnificaţia statistică a fost evaluată printr-un test two-tailed şi un $p < 0,05$ a fost considerat semnificativ statistic.

Metodologia generală de studiu

Principalele criterii şi aspecte utilizate în cadrul acestui studiu sunt sintetizate şi redate prin cele ce urmează:

Populaţia de studiu

- **Eligibilitate**
  - **Vârste eligibile pentru studiu**: 18 ani - 70 ani;
  - Sexe eligibile pentru studiu: Ambele

Criterii

***Criterii de includere*:**

- Leucemie, limfoame maligne sau mielom multiplu care se tratează prin chimioterapie sistemică cu antracicline
- Limfom decelat histologic(Hodgkin sau non-Hodgkin)
- Ani > 18 şi < 70
- WHO (World Health Organisation) scor < sau = 2
- Supravieţuire > 6 luni
- Fracţia de ejecţie a ventricului stâng > 50%
- Consinţământul pacientului

***Criterii de excludere*:**

- Tratamente cu antracicline în atecedente
- Istoric de radioterapie
- Insuficienţă cardiacă congestivă
- Insuficienţă renală cronică
- Contraindicaţii la CT/RMN
- Fibrilaţie atrială şi alte aritmii signifiante
- Sarcină

Populaţia studiată

Studiul s-a efectuat cu prelucrarea statistică a datelor a unui lot de 50 pacienţi cu neoplazii. Din momentul stabilirii diagnosticului şi iniţierii tratamentului cu protocoale ce includ doxorubicina s-a efectuat şi monitorizare cardiologică în dinamică: examen clinic,

radiografie cardiotoracică, electrocardiogramă de suprafaţă, ecocardiografie Doppler şi dozare markeri biochimici (troponina I, BNP) şi evaluare genetică (Tool Like receptorii 2 şi 4 -TLR4/TLR2). Fiecare bolnav a beneficiat de evaluare anamnestico-clinică şi explorări paraclinice complexe prin colaborări interdisciplinare pentru încadrarea corectă în categoriile de boală menţionate mai sus. Pacienţii care prezentau semne de afectare cardiacă anterior iniţierii chimioterapiei au fost excluşi din studiu.

Pacienţii şi reprezentanţii legali ai acestora au fost informaţi în prealabil de potenţialul efect toxic al chimioterapiei, inclusiv cardiotoxicitate. Deasemenea, li s-au prezentat metodele de evaluare a funcţiei cardiace şi opţiunile terapeutice în eventualitatea dezvoltării cardiotoxicităţii.

Pacienţii au fost incluşi în studiu doar după ce s-a obţinut consimţământul informat individual în scris de la aceştia sau de la reprezentanţii legali ai acestora.

Premergător iniţierii, studiul a fost prezentat comisiei de etică din cadrul Spitalului Clinic Judeţean de urgenţă din Arad şi aprobat de către aceasta şi respectă toate normele şi normativele naţionale şi europene la momentul desfăşurării acestuia.

Notă : Formulare şi toate anexele legale şi organizatorice legate de acest studiu se regăsesc în anexa acestei teze de doctorat.

Studiul a urmat regulamente internaţionale foarte stricte, el desfăşurându-se în conformitate cu Recomandările ICH-GCP (International Conference of Harmonization - Good Clinical Practice = Conferinţa Internaţională de Armonizare – Regulile de Bună Practică) şi Declaraţia de la Helsinki, adoptată de Adunarea Generală a Asociaţiei Medicale Mondiale din iunie 1964.

Metode de evaluare

Notă: pe parcurusul întregii lucrări există o corelaţie de prezentare a cazurilor clinice (a pacienţilor); astfel de exemplu, P1 ca şi corespondent al primului pacient analizat la rezultatele studiului imagistic este acelaşi pacient şi la studiul genetic ş.a.m.d.

Principalele criterii şi aspecte utilizate în cadrul acestui studiu privitoare la metodologia de studiu sunt sintetizate şi redate prin cele ce urmează:

- Proceduri de studiu
    - Electrocardiografic
    - Echocardiografic – în concordanţă cu metoda recomandată de Societatea Americană de Echocardiografie; modul M, echocardiografia bidimensională şi Doppler; imagistică Strain pentru viabilitatea miocardică

    - Biormarkeri: troponinele cardiace T și I, atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP) și C-type natriuretic peptide (CNP) acolo unde este necasar
    - Makeri genetici: pentru TLR2 și TLR4 din sângele periferic
- Analiza statistică
    - Studiu Cohort prospectiv: utilizarea QMedical 1.6.2 pentru sisteme MacOS

STUDIU GENETIC TLR2 ȘI TLR4

Mai mulți receptori Toll-like (TLR) sunt exprimați în cardiomiocite, inclusiv TLR 2 și 4. Prin intermediul acestor TLR, cardiomiocitele răspund la semnalele endogene sau exogene care pot influența răspunsurile fiziopatologice pentru cardiomiopatie dilatativă. Expresia sau activarea atât a TLR2 și a TLR4 sunt supra-reglate pe modele experimentale și in vivo (cu hipertensiune și/sau la pacienții cu insuficiență cardiacă clinică). Prin urmare, inhibarea TLR semnalizării poate fi de mare beneficiu terapeutic pentru cardiomiopatia dilatativa (CMD), mai ales în cadrul tratamentului cu Doxorubicină.

Utilitatea troponinelor a fost demonstrată în principal după administrarea de medicamente antineoplazice și β-simpatomimetice, deși utilizarea de rutină a acestor markeri în monitorizarea la pacienții care au primit terapie cu antracicline este departe de a fi rezolvată.

Determinarea expresiei genice relative pentru TLR2 și TLR 4 din probele de ARN izolate

Pentru amplificarea qRT-PCR s-a utilizează kit-ul LightCycler 480 SYBR Green I Master, care este optimizat pentru Termocycler-ul LighCycler 480. Ca genă de referință a fost aleasă GAPDH. Secvența amplimerilor utilizați pentru experimente este redată în cadrul tezei (*TLR2 and TLR4 expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic cystic echinococcosis and its relationship with IL-10, Parasite Immunology, 2011, 33, 692–696, J.-Y. SHAN, W.-Z. JI, H.-T. LI, T. TUXUN, R.-Y. LIN1, & H. WEN*).

Înainte de utilizare secventa amplimerilor a fost verificată utilizând programul Primer-BLAST al National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

DISCUȚII

O reprezentare simplă a conceptului unui sistem de cercetat (sau de cunoaștere), în știință și inginerie, poate fi imaginată ca o "cutie neagră" (engleză black box), considerată numai în termenii intrărilor (input), ieșirilor (output) și funcției sistemului sau a procesului efectuat în sistemul respectiv.

Stadiul actual al cunoașterii din perspectiva imunomodulării miocardice în timpul și după un tratament (posibil) cardiotoxic cu antraciclină (în special Doxorubicină) se poate exemplifica empiric prin acest termen de "Black box". Adică, deținem o "cutie neagră", știm ce intră în această "cutie", știm la fel de bine ce iese DAR nu știm ce se petrece în interiorul acestei "cutii".

Astfel, știm de prezența unui proces inflamator imunomodulat ca răspuns la acțiunea și reacțiunea moleculară la antraciclină/Doxorubicină, știm despre "remodelarea cardiovasculară cardiotoxică" dar nu cunoaștem detaliat mecanismele prin care se produc aceste fenomene sau activatorii imunologici specifici responsabili.

Imunomodularea mediată de TLR 2 si TLR4

Context - receptorii Toll-like (TLRs) sunt membri ai familiei receptorului pentru interleukina-1 (IL1) și sunt implicați în capacitatea de reacție la triggerele moleculare asociate microorganismelor patogene. Studii recente au demonstrat că receptorii TLR sunt activați de semnalele endogene, cum ar fi proteinele de șoc termic și stresul oxidativ, care pot contribui la insuficiență cardiacă congestivă. Stresul oxidativ este unul dintre factorii majori de disfuncție cardiacă indusă de doxorubicină (Dox). Astfel, am emis ipoteza ca receptorii TLR contribuie la patogeneza disfuncției cardiace Doxorubicin-induse.

Cardiomiopatia dilatativă, o cauză comună de insuficienta cardiacă, este caracterizată de o remodelare cardiacă progresivă și de un declin al funcțiilor cardiace. Actualmente, în literatura de specialitate, mortalitatea la cinci ani pentru pacienții cu cardiomiopatie dilatativă este de 50%. În timp ce numeroase studii au documentat că, cardiomiopatia dilatativă are origini idiopatice cât și genetice, se încearcă la nivel medical academic internațional demonstrarea faptului că inflamația de diferitele origini și manifestări induce de asemenea cardiomiopatie dilatativă.

Doxorubicina (Dox) este un agent eficient anti-tumoral. În ciuda utilizarea acestuia ca un agent chimioterapeutic comun, utilizarea Dox poate conduce la cardiotoxicitate. Multiple tratamente intravenoase cu Doxorubicina mai mult de o perioadă de câteva luni s-au dovedit a induce cardiomiopatie la șoareci și cardiomiopatie la om [8].

Răspunsul imun înnăscut constituie prima linie de aparare și este responsabil pentru recunoașterea imediată și contracararea invaziei microbiene sau împotriva oricăror agenți consideraţi nocivi organismului. Aceasta componentă a sistemului imun este alcatuită în principal din fagocite - macrofage și neutrofile - care ingeră și ucid agenții patogeni, apoi transmit informații spre sistemul imun adaptativ prin producerea de citokine si chemokinesis prin prezentarea către limfocite a antigenului microbian, ceea ce duce la dezvoltarea unui răspuns înalt specific. Această specificitate a răspunsului imun adaptativ, care este mediat de limfocite B și T, se realizează prin mutații somatice și selecția receptorilor care recunosc cu cea mai mare acurateţe antigenele microbiene. În contrast, răspunsul imun înnăscut utilizează "pattern recognition receptors" (PRR), care recunosc structuri microbiene înalt conservate, permițând gazdei să identifice rapid o gamă largă de patogeni, fără timpul necesar mutațiilor somatice. În general, fiecare receptor recunoaște o serie de microorganisme pe baza specificităților de ligand. Unii receptori au de asemenea liganzi endogeni și joacă roluri esențiale în homeostazie (Brown G.D. 2006).

Receptorii cheie implicaţi în recunoașterea agenților infecțioși și a produșilor eliberaţi de celulele lezate sau "muribunde" sunt receptorii TLR (Toll like receptors). Activarea receptorilor sistemului imun înnăscut este urmată de modificări rapide în expresia genelor, incluzând genele pentru citokine, chemokine, enzime degradative și enzime responsabile de producerea mediatorilor inflamatori cu molecula mică. Astfel se poate spune că citokinele și chemokinele eliberate activează și recrutează alte celule la locul infecției sau la locul "prezenței simțite a non-selfului" (în cazul nostru al doxorubicinei atât prin efect direct pe receptori cât și prin produși de sinteză și degreadare), ducând în final la activarea răsunsului imun adaptativ.

La mamifere, activarea semnalizării prin TLR induce atât răspunsul imun înnăscut, cat și pe cel adaptativ. Prin fagocitarea agenților patogeni microbieni sau a agenților non-self, TLR membranari (TLR-2, TLR-4) sunt recrutaţi de fagozomi și devin astfel activaţi (maturaţi ca și componente de sine stătătoare) prin componentele peretelui celular sau microbian.

Această maturare a fagozomului este reglată la rândul ei prin semnale intracelulare transmise de TLR și asigură selectarea antigenelor microbiene și prezentarea lor de către moleculele MHC II. Este imperios necesar ca răspunsurile imune înnăscute să fie fin controlate. Răspunsurile întârziate sau insuficient de ample conduc la un eșec al controlului infecției sau al răspunsului inflamator supraexprimat în cazul nostru (cura cu doxorubicină).

Totuși, o inflamație excesivă sau necorespunzătoare poate fi dăunatoare și chiar fatală. Răspunsurile hiperinflamatorii care caracterizează răspunsul organismului la tratamentul cu Doxorubicină sau alte antracicline, furnizează un exemplu paradigmic, cum ar fi și cel că inflamațiile excesive conduc la boala intestinală inflamatorie și artrită *(Ardizzone et al., 2012; Beutler et al., 2013)*.

Printre liganzii endogeni ai TLR2 si TLR4 se numără produşi ai matrixului extracelular (hialuronat şi heparan sulfat), molecule eliberate de celulele moarte sau lezate (HMGB1, fibronectină, proteine de şoc termic, fibrinogen şi lipoproteine de densitate joasă modificate). Multe dintre aceste molecule se acumulează în articulaţiile pacientilor sau în alte situsuri inflamatorii, cum este de exemplu şi la nivelul miocardului cu exprimare ulterioară printr-un proces inflamator. Mecanismul precis prin care TLR recunosc o gamă atât de largă de structuri nu este încă clarificat *(Marshak-Rothstein A, 2006).*

Multiplii receptorii Toll-like (TLRs) sunt exprimaţi în cardiomiocite, inclusiv TLR2 şiTLR 4. Prin aceşti TLR, cardiomiocitele răspund la semnalele endogene sau exogene care pot influenţa răspunsurile fiziopatologice pentru a induce cardiomiopatie dilatativă [147], [25]. Expresia sau activarea atât a TLR2 şi TLR4 este exprimată de cele mai multe ori, în modele experimentale şi de cercetare (atât umane cât şi animale) prin hipertensiune arterială şi cu insuficienta cardiaca clinic dovedita [6], [7]. Prin urmare, inhibarea semnalizării TLR poate fi de mare beneficiu terapeutic pentru cardiomiopatia cardiotoxică indusa de doxorubicina

Receptorii Toll-like (TLR) recunosc agenţii patogeni asociaţi cu modele moleculare, cum ar fi lipopolizaharide, peptidoglican, lipoproteinele bacteriene şi oligonucleotide în timpul răspunsului inflamator.

TLR-urile prezintă căi de răspuns asemănătoare cu interleukina1 (IL1) ca mijloc de semnalizare intracelulară, care conduc la localizarea nucleară a factorului nuclear (NF) de transcripţie *-κB/Rel tip*. Mai mult, TLR-urile sunt exprimate în diferite organe, cum ar fi plămân, creier, rinichi, inimă etc.. Studii recente au sugerat că "miocardul activat", prin căi de semnalizare TLR mediate, ca răspuns la liganzii exogeni induce disfuncţie miocardică.

Alte studii analizate de către noi, în vederea documentării ştiinţifice, au demonstrat, de asemenea, că există şi alte căi TLR mediate de semnalizare şi care sunt activate de semnalele endogene, cum ar fi proteina de şoc termic şi stresul oxidativ în cardiomiocitele izolate de la nivel ventricular.

Mai trebuie să ţinem cont ca s-a demonstrat recent că TLR2 joacă un rol important în remodelarea ventriculară după infarctul miocardic,acesta fiind şi cu specificitate cardiacă (TLR4 în comparaţie cu acesta nu prezintă o specificitate de sistem/organ).

Doxorubicina (Dox) este un antibiotic eficient antitumoral din clasa antraciclinelor. Cu toate acestea, Doxorubicina induce, de asemenea, cardiomiopatie care duce la insuficienţă cardiacă congestivă, limitând astfel de multe ori utilizarea sa clinică. Cardiomiopatia Doxorubicin-indusă este cauzată în principal de creşterea producţiei de oxidant la nivel cardiac. S-a raportat, de asemenea, că tratamentul cu Doxorubicină provoacă eliberarea citocromului C şi are ca rezultat activarea caspazei 3 şi a apoptozei celulare. Aceste studii indică

de asemenea faptul că radicalii liberi joacă un rol important în cardiotoxicitate Doxorubicin-induse.

Pentru că stresul oxidativ după administrarea Doxorubicină a fost identificat în a juca un rol central în disfuncția cardiacă, am emis ipoteza că exprimarea (sau supraexprimarea mai exact) a TLR2 și TLR4 contribuie la patogeneza disfuncției cardiace Doxorubicin-induse.

Apetoh și colab. a propus recent ca HMGB1, care este eliberat din celulele tumorale iradiate, acționează ca un endogen TLR4 ligand. Ei au demonstrat ca TLR4 este esențială pentru eficiența prezentării antigenului de tumoră în cazul radio sau chimioterapiei și a propus că HMGB1 se leagă si activează TLR4 pe celulele afectate.

Ideea de bază, pe care doresc să o enunț cu ocazia acestei teze se poate rezuma cel mai bine prin următoarea supoziție:

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

CONCLUZII GENERALE

- În prezent lipseşte încă o definiţie consensuală a cardiotoxicităţii.
- Semnalizarea TLR declanşează activarea şi maturarea celulelor sistemului imunitar şi este indispensabilă pentru răspunsul imun eficient împotriva microorganismelor patogene, precum şi împotriva celulelor maligne.
- Semnalizarea TLR declanşează activarea şi maturarea celulelor sistemului imunitar şi este indispensabilă pentru răspunsul imun eficient împotriva microorganismelor patogene, precum şi împotriva celulelor maligne. Un sistem imunitar eficient reprezintă cel mai important element în primele faze ale carcinogenezei, când celulele canceroase sunt puţine şi nu sunt limitate la clone celulare puţin imunogene. Dacă imunitatea împotriva celulelor aberante este nedefinită şi în transformare şi nu are succes în stadiu incipient, tumorile vor depăşi rapid capacităţile citotoxice ale celulelor imune.
- Expresia TLR4 la celule tumorale poate fi un factor care contribuie şi care promovează proliferarea celulelor tumorale, de supravieţuire, sau imunosupresie. Intervenţiile terapeutice la nivel de stimulare a TLR4 reprezintă o sabie cu două tăişuri, deoarece diferite studii demonstreaza efecte pozitive precum şi negative ale acestei stimulări TLR4 asupra dezvoltării cancerului sau a tratamentului.
- Cardiotoxicitatea antraciclinică se asociază cu inflamaţia cardiacă prin medierea sistemului imun nespecific.
- Metodologia de lucru concepută pentru acest studiu poate să constituie un etalon pentru elaborarea şi diversificarea altor schiţe experimentale din acest domeniu de interes (sau nu numai, prin însăşi abordarea interdisciplinară sau corelată de studiu uman şi pe model experimental, a acestei teze).

BIBLIOGRAFIE

[1] Tjeerdsma G, Meinardi MT, van der Graaf WTA, van den Berg MP, Mulder NH, Crijns HJGM, et al. Early detection of anthracycline induced cardiotoxicity in asymptomatic patients with normal left ventricular systolic function: autonomic versus echocardiographic variables. Heart 1999 Apr 1;81(4):419-23.

[2] Legha SS, Benjamin RS, Mackay B, Ewer M, Wallace S, Valdivieso M, et al. Reduction of doxorubicin cardiotoxicity by prolonged continuous intravenous infusion. Ann Intern Med 1982 Feb;96(2):133-9.

[3] van Dalen EC, van der Pal HJ, Caron HN, Kremer LC. Different dosage schedules for reducing cardiotoxicity in cancer patients receiving anthracycline chemotherapy. Cochrane Database Syst Rev 2009;(4):CD005008.

[4] Myers C, Bonow R, Palmeri S, Jenkins J, Corden B, Locker G, et al. A randomized controlled trial assessing the prevention of doxorubicin cardiomyopathy by N-acetylcysteine. Semin Oncol 1983 Mar;10(1 Suppl 1):53-5.

[5] Iarussi D, Auricchio U, Agretto A, Murano A, Giuliano M, Casale F, et al. Protective effect of coenzyme Q10 on anthracyclines cardiotoxicity: control study in children with acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin lymphoma. Mol Aspects Med 1994;15 Suppl:s207-s212.

[6] Wagdi P, Rouvinez G, Fluri M, Aeschbacher B, Thoni A, Schefer H, et al. [Cardioprotection in chemo- and radiotherapy for malignant diseases--an echocardiographic pilot study]. Praxis (Bern 1994) 1995 Oct 24;84(43):1220-3.

[7] Whittaker JA, Al Ismail SA. Effect of digoxin and vitamin E in preventing cardiac damage caused by doxorubicin in acute myeloid leukaemia. Br Med J (Clin Res Ed) 1984 Jan 28;288(6413):283-4.

[8] Task FM, Swedberg K, Writing Committee:, Cleland J, Dargie H, Drexler H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology. European Heart Journal 2005 Jun 1;26(11):1115-40.

[9] Silber JH, Cnaan A, Clark BJ, Paridon SM, Chin AJ, Rychik J, et al. Enalapril to prevent cardiac function decline in long-term survivors of pediatric cancer exposed to anthracyclines. J Clin Oncol 2004 Mar 1;22(5):820-8.

[10] Silber JH, Cnaan A, Clark BJ, Paridon SM, Chin AJ, Rychik J, et al. Design and baseline characteristics for the rna Inhibitor After Anthracycline (AAA) study of cardiac dysfunction in long-term pediatric cancer survivors. Am Heart J 2001 Oct;142(4):577-85.

[11] Hauser M, Wilson N. Anthracycline induced cardiomyopathy: successful treatment with angiotensin converting enzyme inhibitors. Eur J Pediatr 2000 May;159(5):389.

[12] **Număr total referinţe în text 185**