

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

Arad, 2016



TEZA DE DOCTORAT

**Modificări histologice ale
tubului digestiv și ficatului
consecutiv administrării
chimioterapiei
oncohematologice.
Evidențierea efectelor
protectoare ale flavonoidului
silimarină**

Doctorand:

Alciona Moiescu (Sasu)

Conducător de doctorat:

Prof Univ Dr Eftimie

Miuțescu



PhD THESIS

**Digestive tract and liver
histological changes after
onco-hematological
chemotherapy. Highlighting
the protective effects of
flavonoid silymarin**

PhD Student: **Alciona Moiescu
(Sasu)**

Scientific supervisor:
Prof.univ.dr. Eftimie Miutescu



CUPRINS

INTRODUCERE	17
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIU	19
1. CHIMIOTERAPIA ÎN BOLILE ONCOHEMATOLOGICE ...	20
1.1. Clase de citostatice si clasificare	20
1.1.1. Agenți alchilanți	20
1.1.2. Derivați naturali.....	20
1.1.3. Antimetaboliți.....	21
1.1.4. Agenți anti-tumorali diverși.....	21
1.2. Principii ale terapiei citostatice	21
1.3. Indicațiile și contraindicațiile chimioterapiei	22
1.4. Mecanismul de acțiune al citostaticelor.....	23
1.4.1. Modul de acțiune al citostaticelor asupra diviziunii celulare și funcționalității celulei.....	23
1.4.2. Mecanismul imun.....	25
1.5. Rezistența la citostatice.....	26
1.6. Evaluarea răspunsului la chimioterapie.....	27
1.7. Principii generale în cercetarea medicamentelor antineoplazice.....	29
1.8. Epirubicina.....	31
2. EFECTELE SECUNDARE ALE CHIMIOTERAPIEI ÎN PATOLOGIA ONCOHEMATOLOGICĂ	33
2.1. Toxicitatea acută	33
2.2. Toxicitatea tardivă/cronică.....	35
3. TOXICITATEA CITOSTATICELOR LA NIVELUL TRACTULUI GASTROINTESTINAL ȘI FICATULUI	37
3.1. Toxicitatea citostaticelor la nivelul tubului digestiv.....	37
3.2. Toxicitatea citostaticelor la nivelul ficatului.....	42
3.3. Metode de prevenție sau ameliorare a toxicității gastrointestinale și hepatice consecutive chimioterapiei în patologia oncohematologică.....	43
3.4. Concluzii.....	46
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	47
1. IPOTEZA DE LUCRU/SCOP/OBIECTIVE GENERALE	48
2. EVALUAREA ÎN VIVO A TOXICITĂȚII INDUSE DE EPIRUBICINĂ LA NIVELUL MUCOASEI TUBULUI	

DIGESTIV	50
2.1. Ipoteză/ scop/ obiective.....	50
2.2 Introducere.....	51
2.3. Materiale și metode.....	53
2.4. Rezultate.....	57
2.5. Discuții.....	76
2.6. Concluzii.....	83
3. EVALUAREA ÎN VIVO A TOXICITĂȚII INDUSE DE EPIRUBICINĂ LA NIVELUL FICATULUI	85
3.1. Ipoteză/ scop/ obiective.....	85
3.2 Introducere.....	86
3.3. Materiale și metode.....	87
3.4. Rezultate.....	89
3.5. Discuții.....	99
3.6. Concluzii.....	108
4. CORELAREA TOXICITĂȚII GASTROINTESTINALE ȘI HEPATICE CU TOXICITATEA HEMATOLOGICĂ LA ȘOARECI, CONSECUTIV TRATAMENTULUI CU EPIRUBICINĂ	109
4.1. Ipoteză/ scop/ obiective.....	109
4.2 Introducere.....	109
4.3. Materiale și metode.....	110
4.4. Rezultate.....	112
4.5. Discuții.....	116
4.6. Concluzii.....	119
5. EVALUAREA TOXICITĂȚII INDUSE DE EPIRUBICINĂ LA NIVELUL MUCOASEI COLONULUI PACIENȚILOR ONCOHEMATOLOGICI	121
5.1. Ipoteză/ scop/ obiective	121
5.2 Introducere.....	121
5.3. Materiale și metode.....	123
5.4. Rezultate.....	127
5.5. Discuții.....	153
5.6. Concluzii.....	168
CONCLUZII GENERALE	170
BIBLIOGRAFIE	177
LISTA DE PUBLICATII	197
ANEXE	198

STADIUL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIU

Citostaticele pot produce modificări structurale sau funcționale la nivelul tubului digestiv [1,2], datorită lipsei de înaltă selectivitate asupra țesutului tumoral, medicamentul antineoplazic nefăcând discriminarea între celula canceroasă și celula unui țesut normal aflat în diviziune rapidă, precum țesutul epitelial digestiv [3]. Epirubicina este un citostatic din clasa antraciclinelor, folosit în terapia onco-hematologică și oncologică, care poate produce relativ frecvent toxicitate mucoasă, hematologică și cardiacă. Mucozita, pornind din cavitatea bucală și faringe până în colon, este o complicație la nivelul mucoaselor care apare prin efectul citotoxic al chimioterapiei. Patogeneza mucozitei este complexă, un proces multifactorial și o cascadă de evenimente în multiple structuri tisulare [4]. Sonis și colab au descris cinci faze prin care se desfășoară mecanismul mucozitei, care încep în submucoasă și țintesc epitelul [4].

Modificările histologice constau în pierderea integrității barierei mucoase, reducerea mărimii vilozităților intestinale și chiar aplatizarea acestora [1], cu semne de apoptoză în microscopia optică și electronică, inflamație, alterarea joncțiunilor strânse celulare, modificări calitative și cantitative ale microflorei intestinale, alterări ale componentelor matricii extracelulare, reducerea numărului de celule caliciforme dar cu creșterea secreției de mucus [5,65] și modificarea calitativă a mucusului secretat.

Antraciclinele pot produce leziuni hepatice, provocând moartea hepatocitelor și alterarea metabolismului celular hepatic, cu modificarea valorilor markerilor serologici hepatici și alterări structurale. Expresia proteinelor familiei Bcl-2 este modificată în hepatotoxicitatea post

chimioterapie, sugerând apoptoza la acest nivel. De asemenea, mecanismele inflamatorii concură la distrucția hepatocitelor.

Toxicitatea hematologică produce cel mai frecvent anemie, leucopenie cu neutropenie și trombocitopenie.

Silimarina, o mixtură de flavonolignani, este extrasă din planta Armurariu (*Silybum marianum*) și are efecte antioxidante puternice, anticarcinogenetice, anti-inflamatorii și citoprotectoare.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Este structurată în patru experimente, primele trei derulate pe șoareci, iar ultimul pe pacienți voluntari. Obiectivele principale ale tezei sunt:

1. Demonstrarea experimentală *in vivo* a alterării structurii normale a epiteliului digestiv în mucozită, post administrare de epirubicină
2. Demonstrarea experimentală *in vivo* a efectului de ameliorare a leziunilor produse prin epirubicină la nivelul tubului digestiv, consecutiv administrării de silimarină
3. Demonstrarea experimentală *in vivo* a hepatotoxicității induse de epirubicină
4. Demonstrarea experimentală *in vivo* a efectului de ameliorare a leziunilor hepatice produse prin epirubicină, consecutiv administrării de silimarină
5. Evaluarea prezenței epirubicinei la nivel hepatic prin microscopie în câmp întunecat cu detecție hiperspectrală (hsDFM)
6. Evaluarea la șoareci a modificărilor hematologice în hemoleucogramă, post administrare de epirubicină
7. Evaluarea la pacienți voluntari a alterării structurii

normale a colonului în mucozită, post terapie cu epirubicină

1.EVALUAREA *IN VIVO* A TOXICITĂȚII INDUSE DE EPIRUBICINĂ LA NIVELUL MUCOASEI TUBULUI DIGESTIV

OBIECTIVE

Demonstrarea la șoareci a alterării structurii normale a epiteliului digestiv în mucozită, post administrare de epirubicină și a prevenției sau ameliorării produse prin administrarea de silimarină, prin: evaluarea modificărilor structurale, în microscopie optică, colorație Hematoxilină&Eozină, evaluarea modificărilor survenite în structura și numărul celulelor caliciforme, prin colorația Albastru Alcian P.A.S. și cuantificarea celulelor caliciforme la nivel de intestin subțire și colon, evaluarea mecanismelor mucozitei, în special a apoptozei, prin imunohistochimie, cu determinarea expresiei pentru P450, Bcl-2, Bax și P53, evaluarea degradării ADN-ului la nivel de tub digestiv în mucozita post epirubicină, prin electroforeza în gel agaroză.

MATERIAL ȘI METODE

Substanțele chimice

Autoanticorpii Bcl-2, Bax, p53 au fost achiziționați de la Santa Cruz (Darmstadt, Germania), cyt P450 de la Abcam (San Francisco, SUA) și toți ceilalți reactivi histologici au fost achiziționați de la Bio-optica (Milano, Italia). Silimarina a fost cumpărată de la Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) iar epirubicina hidroclohid 2mg/ml a fost fabricată de Actavis, Miami, FL.

Animalele de experiență

S-au folosit șoareci CD 1 din coloniile de creștere ale Institutului de Științe ale Vieții, Universitatea de Vest "Vasile Goldiș" din Arad. Șoarecii au avut 2 luni, cu

greutate între 30 ± 2 g și au fost hrăniți cu hrană standard pentru rozătoare (Institutul Cantacuzino, București, România). Animalele au fost ținute în ciclu de 12 ore lumină/întuneric, la o temperatură constantă ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) și umiditate constantă ($50 \pm 5\%$). Toate procedurile experimentale au fost efectuate în conformitate cu legile în vigoare și ghidurile instituționale, și au fost aprobate de Comisia de Etică în Cercetare instituțională.

Modelul experimental

Șoarecii au fost împărțiți randomizat în 6 loturi: lotul control ($n=10$), lotul tratat cu epirubicină (Epi) ($n=10$), lotul tratat cu epirubicină+50 mg/kg silimarină (Epi+50Si) ($n=10$), lotul tratat cu epirubicină+100 mg/kg silimarină (Epi+100Si) ($n=10$), lotul tratat cu 50 mg/kg silimarină (50Si) ($n=10$) și lotul tratat cu silimarină 100 mg/kg (100Si) ($n=10$). La lotul de control și la lotul Epi s-a administrat zilnic prin gavaj soluție de carboximetil celuloză 0.7% (CMC). Pentru a reflecta situația clinică, la soareci s-a administrat intraperitoneal o doză cumulativă de 12mg/kg de epirubicină, care este relevantă la om [189] (Alderton et al., 1992), divizată în 6 doze a câte 2mg/kg (intraperitoneal) la 2 zile, începând cu ziua a doua a experimentului. Alegerea a două doze de silimarină s-a bazat pe datele din literatura de specialitate publicate în prealabil, conform cărora o doză între 50 și 100mg/kg administrată pe o perioadă de până la 2 săptămâni și-a dovedit eficiența în prevenirea injuriei gastrointestinale [190,191,192]. Pudra de silimarină a fost în prealabil dizolvată în carboximetil celuloză 0.7%. Pentru ambele grupuri co-tratate (50 mg/kg și 100 mg/kg), administrarea silimarinei a început cu 24 de ore înaintea primei injecții de epirubicină, și s-a administrat zilnic prin gavaj între zilele 1 și 13 ale experimentului.

În ziua 14 toți șoarecii au fost aneșteziați prin inhalarea de isoflurane și eutanasiați prin dislocare cervicală. După sacrificare s-au prelevat stomacul, intestinul subțire și colonul.

Examinarea histologică

Secțiunile pentru examinarea histopatologică au fost colorate cu Hematoxină&Eozină (HE) și Alcian Blue P.A.S pentru mucine, ulterior au fost examinate la microscopul optic (Olympus BX43, Hamburg, Germania).

Determinarea cantitativă a celulelor caliciforme

S-au numărat celulele caliciforme umplute cu mucină în proporție mai mare de 80%, cu un total de cel puțin 15 vilozități/cripte/secțiune analizată, folosind softul Olympus Cell Dimension.

Determinarea imunohistochimică a cyt P450, Bcl-2, Bax și p53

Analiza imunohistochimică a fost efectuată pe secțiunile tisulare parafinate din stomac, jejun și colon folosind anticorpi monoclonali de șoarece împotriva cyt P450 diluat 1:100, Bcl-2 diluat 1:50, Bax diluat 1:50 (San Francisco, Santa-Cruz, SUA) și p53 diluat 1:50 (San Francisco, Santa-Cruz, SUA).

Fragmentarea ADN prin electroforeza în gel agaroză

ADN-ul izolat a fost separat pe un gel de agaroză (1% agaroză în tampon Tris-acid acetic-EDTA 1% (TAE) cu bromură de etidiu) iar benzile au fost vizualizate la un transiluminator cu lumină ultravioletă UVP BioDoc-IT.

Analiza statistică

Toate rezultatele au fost exprimate ca medie \pm DS (deviația standard). Datele au fost analizate pentru semnificație statistică prin „one-way” ANOVA urmată de un test Bonferroni post-hoc folosind softul GraphPad versiunea 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, SUA).

Valoarea lui $p < 0.05$ a fost considerată ca prag pentru semnificația statistică.

REZULTATE

În urma examinării în colorație Hematoxină-Eozină și Albastru Alcian PAS, am observat că vilozitățile intestinale sunt ușor aplatizate la lotul Epi, celulele caliciforme au devenit mai condensate și cu localizare în porțiunea superioară a vilozităților intestinale; în colon la lotul Epi celulele caliciforme sunt mai mari, condensate, cu o cantitate de mucus mai mare față de lotul martor. Numărul total de celule caliciforme de la nivelul vilozităților și al criptelor colonului la lotul tratat cu epirubicină este redus față de lotul martor. Examinarea imunohistochimică a arătat că expresia P450 este crescută la lotul Epi, în celulele epiteliale din intestinul subțire, stomac și colon, expresia Bcl-2 scade la lotul Epi în toate segmentele tubului digestiv analizate, expresia Bax este crescută la lotul Epi în intestinul subțire, stomac și colon, expresia p53 este de asemenea crescută la lotul Epi în toate cele trei segmente examinate, față de lotul martor. În concordanță cu schimbările generale care apar în apoptoză, fragmentarea internucleosomală a ADN a fost observată la grupurile tratate cu epirubicină în toate țesuturile analizate. Silimarina a avut următoarele efecte: a crescut numărul de celule caliciforme la nivel de intestine subțire și colon, a scăzut expresia Bax, P450 și p53, și a crescut expresia Bcl-2 față de lotul Epi, în doze de 50mg/kg respectiv 100mg/kg. De asemenea, a redus fragmentarea ADN în stomac, intestin subțire și colon față de lotul Epi.

CONCLUZII

La nivelul tubului digestiv la șoareci, epirubicina produce apoptoza celulelor epiteliale, modificări numerice și calitative ale celulelor caliciforme, degradarea ADN-ului.

Silimarina are efecte protectoare asupra tubului digestiv în toxicitatea postchimioterapie.

2. EVALUAREA *IN VIVO* A TOXICITĂȚII INDUSE DE EPIRUBICINĂ LA NIVELUL FICATULUI

OBIECTIVE

Demonstrarea hepatotoxicității induse de epirubicină la șoareci și a efectului de prevenire și ameliorare a leziunilor produse prin epirubicină, consecutiv administrării de silimarină, prin: determinarea markerilor biochimici hepatici la șoareci, cu evaluarea modificărilor valorilor aspartat aminotransferazei (ASAT), alanin aminotransferazei (ALAT) și gama glutamiltransferazei (GGT), evaluarea modificărilor structurale, în microscopie optică, colorație Hematoxilină&Eozină, evaluarea expresiei markerilor pro-apoptotici și antiapoptotici Bax și Bcl-2, precum și a expresiei P450, evaluarea prezenței epirubicinei la nivel hepatic prin microscopie în câmp întunecat cu detecție hiperspectrală.

MATERIAL ȘI METODE

Substanțele chimice

Pentru analizarea testelor sanguine la șoareci, s-a folosit kitul de detecție Roche reagents.

Animalele de experiență

Pentru experiment au fost folosiți șoareci CD 1 din coloniile de creștere ale Institutului de Științe ale Vieții, Universitatea de Vest "Vasile Goldiș" Arad, în aceleași condiții ca la primul experiment.

Modelul experimental

Șoarecii au fost împărțiți randomizat în 6 loturi, identice cu cele folosite în experimentul 1. După sacrificare s-a prelevat ficatul și sânge din vena cavă pentru testele biochimice.

Analizele biochimice

S-a evaluat activitatea enzimatică a aspartat aminotransferazei ASAT, alanin aminotransferazei ALAT și gama glutamiltranspeptidazei GGT prin spectrofotometrie

Examinarea histologică

Secțiunile pentru examinarea histopatologică au fost colorate cu Hematoxină&Eozină.

Determinarea imunohistochimică a Bax, Bcl-2 și cyt P450

Analiza imunohistochimică a fost efectuată pe secțiunile tisulare parafinate din ficat folosind anticorpi monoclonali de șoarece împotriva Bax diluat 1:50, Bcl-2 diluat 1:50 și cyt P450 diluat 1:100 (San Francisco, Santa-Cruz, SUA).

Microscopia în câmp întunecat cu detecție hiperspectrală (hsDFM)

Imagistica hiperspectrală în combinație cu microscopia în câmp întunecat a fost folosită pentru a evalua distribuția epirubicinei în ficat, la nivelul secțiunilor tisulare histologice. Imaginile din microscopia în câmp întunecat și ariile hiperspectrale au fost captate folosind un microscop optic cu transmisie în câmp întunecat îmbunătățit (Olympus BX43), echipat cu spectrofotometru de imagistică hiperspectrală (Headwall, CytoVivaInc, Auburn, AL). Imaginile au fost achiziționate folosind lentile 100X cu imersie în ulei.

Analiza statistică

Analiza statistică a fost efectuată folosind „one-way” ANOVA cu softul Stata 13 (StataCorp LP, Texas, USA). Valoarea lui $p < 0.05$ a fost considerată ca fiind semnificativă statistic.

REZULTATE

La 24 de ore de la terminarea chimioterapiei, toți cei trei markeri biochimici hepatici, respectiv ASAT, ALAT și GGT au fost crescuți la lotul Epi față de lotul martor. La lotul

tratată cu Epi s-au observat dilatații sinusoidale, infiltrat inflamator și steatoză hepatică. Imunohistochemic, s-a observat că expresia Bax a fost prezentă la lotul Epi, expresia Bcl-2 a fost redusă la același lot Epi, iar expresia P450 a fost puternică la lotul Epi, comparativ cu lotul martor. Silimarina a redus infiltratul inflamator și steatoza hepatică la loturile la care a fost co-administrată epirubicinei. De asemenea, a determinat o expresie mai scăzută a Bax și a P450 la loturile co-tratate, respectiv o expresie mai mare a Bcl-2, față de lotul Epi. Prin examinarea prin microscopie în câmp întunecat cu detecție hiperspectrală s-a observat o absorbție crescută în profilul spectral al țesutului din lotul Epi la lungimea de undă de aproximativ 450-550 nm și o creștere marginală în reflexie la acest lot la aproximativ 625-800 nm, precum și profile spectrale unice pentru fiecare dintre loturile Epi, Epi+50Si și Epi+100Si.

CONCLUZII

Epirubicina produce toxicitate hepatică manifestată prin creșterea markerilor serologici hepatici, cu modificări structurale de tip dilatații de sinusoidale hepatice. Apoptoza hepatocitelor este demonstrată prin imunohistochemie. La nivelul țesutului hepatic se observă infiltrat inflamator iar hepatocitele prezintă steatoză. Epirubicina este prezentă la nivel de țesut hepatic, dar curbele spectrale ale loturilor cotate sunt diferite, probabil prin accelerarea procesului de detoxifiere hepatică, aspect reliefat și prin expresia P450.

3.CORELAREA TOXICITĂȚII GASTROINTESTINALE ȘI HEPATICE CU TOXICITATEA HEMATOLOGICĂ LA ȘOARECI, CONSECUTIV TRATAMENTULUI CU EPIRUBICINĂ

OBIECTIVE

Evaluarea modificărilor hematologice la loturile de șoareci luate în studiu, prin determinarea parametrilor hemoleucogramei: evaluarea efectelor epirubicinei asupra parametrilor hematologici, evaluarea protecției oferite prin administrarea silimarinei împotriva toxicității hematologice, evidențiată prin modificarea parametrilor hematologici.

MATERIAL ȘI METODE

Substanțele chimice

Pentru efectuarea hemoleucogramei s-au folosit reactivi Urit 2900 VetPlus, China

Animalele de experiență

Pentru experiment au fost folosiți șoareci CD 1 din coloniile de creștere ale Institutului de Științe ale Vieții, Universitatea de Vest "Vasile Goldiș" din Arad, în aceleași condiții ca la experimentele anterioare.

Modelul experimental

Șoarecii au fost împărțiți randomizat în 6 loturi, identice cu cele folosite în experimentul 1 și 2. După sacrificare s-a prelevat sânge din vena cavă pentru determinarea hemoleucogramei.

Analiza hemoleucogramei

Pentru determinarea parametrilor hematologici s-a folosit un echipament automat digital (Urit 2900 VetPlus, China). Pentru efectuarea hemoleucogramei s-a folosit sânge heparinat. Au fost determinate: numărul de leucocite, numărul de eritrocite, concentrația de hemoglobină, valoarea hematocritului și numărul de trombocite.

Statistica

Toate rezultatele au fost exprimate ca media \pm DS (deviația standard). Datele au fost analizate pentru semnificație statistică prin „one-way” ANOVA. Valoarea lui $p < 0.05$ a fost considerată ca prag pentru semnificația statistică.

REZULTATE

La lotul Epi s-au observat următoarele modificări: creșterea numărului de leucocite, scăderea numărului de eritrocite, a hematocritului și a concentrației de hemoglobină, creșterea numărului de trombocite față de lotul martor. Silimarina a avut următoarele efecte: lotul Epi+100Si a avut un număr de leucocite scăzut față de lotul Epi, ambele loturi co-tratate au avut număr crescut de eritrocite față de lotul Epi, iar loturile tratate doar cu silimarină au avut numărul de eritrocite crescut față de lotul martor. De asemenea, hematocritul a fost crescut față de lotul Epi la lotul Epi+50Si, și hematocritul și hemoglobina față de lotul martor pentru loturile tratate doar cu silimarină. Numărul de trombocite nu s-a modificat semnificativ statistic față de lotul Epi la loturile care au primit silimarină.

CONCLUZII

Epirubicina produce toxicitate hematologică la șoareci, prin modificarea parametrilor celor trei serii sanguine, toxicitate care se corelează cu cea digestivă (numărul de leucocite este crescut în contextul inflamației digestive postchimioterapie). Silimarina are efecte protectoare asupra seriei eritrocitare.

4.EVALUAREA TOXICITĂȚII INDUSE DE EPIRUBICINĂ LA NIVELUL MUCOASEI COLONULUI PACIENȚILOR ONCOHEMATOLOGICI

OBIECTIVE

Obiectivele acestui experiment urmăresc dovedirea toxicității digestive asupra colonului la pacienți prin: examinarea histologică în microscopie optică a preparatelor tisulare din mucoasă de colon, în colorație HE și Abastru Alcian P.A.S., examinarea prin tehnici de imunohistochimie a expresiei tisulare pentru NFkB, TNF

alfa, caspaza 3, caspaza 8, Bcl-2, Bax, mucina-2 și claudina-1, examinarea în microscopie electronică a preparatelor tisulare din mucoasa de colon.

MATERIAL ȘI METODE

Pacienți

Toți pacienții incluși în acest studiu au fost pacienți în evidența Clinicii de Hematologie a Spitalului Clinic Județean de Urgență Arad, internați în perioada iunie 2015-septembrie 2016. Pacienții selectați au fost cu patologie oncohematologică (n=9), limfom non-Hodgkin, limfom Hodgkin și lot martor, fără patologie oncohematologică sau chimioterapie. Toți pacienții au semnat consimțământul informat.

Substanțele chimice

Autoanticorpii NFκB, TNFalfa, caspaza 3, caspaza 8, Bcl-2, Bax, mucina-2, claudina-1 au fost achiziționați de la Santa Cruz (Darmstadt, Germania), și toți ceilalți reactivi histologici au fost achiziționați de la Bio-optica (Milano, Italia).

Reactivii și substanțele folosite pentru tehnica de microscopie electronică au fost cumpărate de la Electron Microscopy Sciences (Formvar), Sigma-Aldrich (fosfat de sodium monobasic monohidrat, accelerator), Fenka Analytica (fosfat de sodium dibazic, epon), Agar Scientific (glutaraldehida, filmele).

Modelul experimental

Cei 9 pacienți au fost divizați în trei loturi (n=9): lotul martor, lotul pacienților biopsiați la 48 de ore (CHT48ore) (limfom non-Hodgkin, limfom Hodgkin) și CHT3săpt, care a cuprins pacienți care au fost biopsiați în medie la 3 săptămâni postchimioterapie cu epirubicină (limfom non-Hodgkin, limfom Hodgkin). Biopsiile au fost prelevate de la două nivele, de 20 cm și 40 cm de anus. Terapia antineoplazică standard pe care pacienții au primit-o a

fost de tip CHOP, R-CHOP și ABVD, regimuri care includ epirubicina. Pacienții au fost biopsiați după cumularea a 6 cicluri de chimioterapie pentru limfomul Hodgkin și 8 cicluri de chimioterapie pentru limfomul non-Hodgkin. S-a efectuat colonoscopie cu biopsie de mucoasă colică, cu prepararea pieselor pentru microscopie optică și microscopie electronică.

Examinarea histologică

Secțiunile au fost colorate Hematoxilină&Eozină și Albastru Alcian P.A.S.

Evaluarea imunoreactivității pentru NFκB, TNFalfa, caspaza 3, caspaza 8, Bcl-2, Bax, mucina-2, claudina-1

Analiza imunohistochimică a fost efectuată pe secțiuni tisulare parafinate din colon folosind anticorpi monoclonali de șoarece împotriva NFκB diluat 1:100, TNFalfa diluat 1:100, caspaza 3 diluat 1:100, caspaza 8 diluat 1:100, Bcl-2 diluat 1:100, Bax diluat 1:100, mucina-2 diluat 1:100, claudina-1 diluat 1:100 (San Francisco, Santa-Cruz, SUA). Pentru detecția anticorpilor a fost folosit kitul de colorare Novocastra (Leica Microsystems, Germania)

Examinarea electron-microscopică

Pregătirea probelor s-a făcut conform protocolului folosit în Institutul de Științe ale Vieții, UVVG Arad, iar examinarea s-a făcut la Microscopul electronic tip FEI Tecnai G2 Spirit BioTwin.

Analiza simptomelor precoce de mucozită la pacienții oncohematologici tratați cu epirubicină

Din foile de observație ale pacienților s-au extras date privind prezența următoarelor simptome apărute după administrarea epirubicinei, până la 5 zile postchimioterapie: greață, vărsături, diaree. Acestea s-au regăsit la rubrica "Evoluția zilnică a pacientului". Datele au fost înregistrate într-o bază de date, și ulterior prelucrate

statistic. Au fost evaluate un număr de 182 de înregistrări de aplicare a chimioterapiei tip CHOP (n=7), R-CHOP (n=139) și ABVD (n=36), de la un număr de 30 de pacienți aflați în evidența Clinicii de Hematologie a Spitalului Clinic Județean de Urgență Arad. Datele s-au extras din foile de observație ale pacienților, retrospectiv, în perioada iunie 2015-septembrie 2016.

REZULTATE

Din punct de vedere clinic, pacienții observați au prezentat simptome de toxicitate digestivă precoce, respectiv în 61% aplicații de chimioterapie (greață), la 10% dintre aplicații pacienți au avut diaree și pacienții tratați cu ABVD au avut greață la fiecare aplicație, de grad 1-2. Morfologic, nu s-au observat diferențe în lungimea criptelor între cele trei loturi, respectiv cele două nivele de biopsie. La lotul CHT48ore s-au observat glande cu lumen și col largi, cu celule mucoase balonizate, cu secreție crescută de mucus, comparativ cu lotul martor. Colorația Albastru Alcian P.A.S. a pus în evidență secreție crescută de mucus la loturile chimiotratate față de lotul martor, în ambele nivele de biopsie. Calitatea mucusului este alterată, expresia mucinei-2 fiind complet absentă la lotul CHT48ore, expresia acesteia refăcându-se la lotul CHT3săptămâni. În microscopie optică s-a observat infiltrat inflamator la ambele loturi chimiotratate, la ambele nivele de biopsie. Inflamația a fost pusă în evidență și prin imunohistochimie, care a arătat creșterea puternică a expresiei pentru NFκB la lotul CHT48ore, și mai puțin exprimată la lotul CHT3săpt, dar absentă la lotul martor. Expresia TNFalfa a fost prezentă la lotul CHT48ore, la ambele nivele de biopsie. Expresia NFκB a fost exprimată preponderent la nivelul nucleilor, iar TNFalfa la nivelul citoplasmei. Ambele nivele de biopsie au prezentat acest model de expresie. În microscopie

electronică au fost descrise celule mastocitare, atât la nivel de epiteliu cât și de corion. Apoptoza a fost pusă în evidență prin prezența de celule cu citoplasma contractată în microscopia electronică, celule cu citoplasma rarefiată și organite modificate, prin expresia crescută a Bax la nivel de epiteliu la lotul CHT48ore, expresia puternică a caspazei 3 la același lot și expresia caspazei 8 la lotul biopsiat la 48 de ore, comparativ cu lotul martor. De asemenea, s-a observat expresia scăzută a Bcl-2 la lotul CHT48ore, față de lotul martor. Și lotul CHT3săptămâni a prezentat expresie pentru caspaza 3, dar mult redusă față de lotul CHT48ore. Epirubicina a produs și pierderea integrității barierei mucoase prin distrugerea joncțiunilor strânse apicale și bazale și lărgirea spațiilor intercelulare între celulele epiteliale, observate electronmicroscopic la lotul CHT48ore. La lotul CHT3săptămâni au persistat spațiile intercelulare lărgite, dar joncțiunile strânse au fost integre. Expresia claudinei-1, ca parte a joncțiunilor strânse, a fost puternic exprimată la lotul martor și la lotul CHT3săptămâni, și mai puțin exprimată la lotul CHT48ore. Mecanismele patogenice în mucozită se dovedesc a fi mari consumatoare de energie, în microscopie electronică putându-se observa mitocondrii alterate, balonizate, cu cristele alterate, atât de la nivel de celulă epitelială, cât și de celule caliciforme și de celule ale muscularei mucoasei. În submucoasă a fost observată proliferarea de fibre de colagen, care pledează pentru afectarea matricii extracelulare în mucozită.

CONCLUZII

Regimurile de chimioterapie care includ epirubicina produc la doze standard mucozită la nivel de mucoasă colică, chiar în absența simptomelor sau a modificărilor histologice severe. Mecanismele implicate în mucozită au fost dovedite în experimentul acesta: apoptoza, inflamația,

chiar prezența de celule mastocitare la nivel de epitelii, pierderea integrității barierei mucoase, modificarea cantității și calității mucusului secretat.

CONCLUZII GENERALE

Studiul asupra toxicității digestive și hepatice în urma terapiei cu epirubicină la șoareci și la pacienți a condus la următoarele concluzii:

- Terapia cu epirubicină la șoareci produce modificări morfologice la nivel de intestin subțire și de colon
- Terapia cu epirubicină la șoareci produce scăderea numărului de celule caliciforme și creșterea cantității de mucus secretată la nivel de intestin subțire și de colon
- Terapia cu epirubicină la șoareci produce apoptoza celulelor din vilozități / cripte în intestinul subțire și colon și creșterea degradării ADN la nivel de țesut epitelial al tubului digestiv
- Co-administrarea de silimarină, în doze de 50mg respectiv 100mg/kg, ameliorează anomaliile morfologice produse la nivel de tub digestiv la șoareci post administrare de epirubicină, ameliorează numărul celulelor caliciforme din intestinul subțire și colon la șoareci post administrare de epirubicină, ameliorează modificările apoptotice și degradarea ADN celular la nivel de țesut epitelial al tubului digestiv la șoareci, post administrare de epirubicină.
- Terapia cu epirubicină la șoareci produce creșterea concentrației serice a enzimelor hepatice ASAT, ALAT, GGT
- Terapia cu epirubicină la șoareci produce modificări morfologice la nivel hepatic
- Co-administrarea de silimarină reduce modificările structurale produse prin epirubicină, și anume

inflamația, hepatosteatoza și dilatațiile sinusoidale, precum și apoptoza la nivel de hepatocite, față de lotul Epi

- Co-administrarea de silimarină reduce expresia P450 la nivel de hepatocite, față de lotul Epi
- Conform analizei spectrale din microscopia hiperspectrală, epirubicina se regăsește în ficatul șoarecilor tratați cu epirubicină și silimarină, curbele loturilor co-tratate sugerând potențarea eliminării metaboliților toxici ai epirubicinei prin silimarină
- Terapia cu epirubicină la șoareci produce creșterea numărului de leucocite, scăderea parametrilor eritrocitari și creșterea numărului de trombocite
- Co-administrarea de silimarină reduce numărul leucocitelor și a trombocitelor, crește numărul eritrocitelor, valoarea hematocritului și concentrația de hemoglobină față de lotul tratat doar cu epirubicină, în doze de 50mg respectiv 100mg/kg
- Administrarea doar de silimarină, în doze de 50mg respectiv 100mg/kg, crește numărul de eritrocite, crește valoarea hematocritului și concentrația de hemoglobină față de lotul martor, la șoareci
- La pacienți, terapia combinată cu epirubicină produce modificări morfologice minime în mucoasa colică față de lotul martor, la loturile biopsiate la 48 ore și 3 săptămâni, la 20 cm și 40 cm de anus
- La pacienți, terapia combinată cu epirubicină duce la creșterea secreției de mucus față de lotul martor, la loturile biopsiate la 48 ore și 3 săptămâni, la 20 cm și 40 cm de anus
- La pacienți este modificată calitatea mucusului secretat de celulele caliciforme în colon, prin expresia absentă a mucinei-2 la la lotul biopsiat la 48 ore, la 20 cm și 40 cm de anus

- La pacienți, terapia combinată cu epirubicină produce inflamație tisulară, dovedită prin prezența infiltratului inflamator în microscopie optică și a mastocitelor în microscopie electronică, respectiv prin exprimarea NFκB și TNFalfa la nivel de epiteliu față de lotul martor, la loturile biopsiate la 48 ore (expresie puternică) și 3 săptămâni (expresie mai slabă), la 20 cm și 40 cm de anus
- La pacienți, terapia combinată cu epirubicină produce apoptoza celulelor epiteliale, cu modificări ultrastructurale, respectiv modificarea exprimării markerilor pro-apoptotici sau anti-apoptotici față de lotul martor: expresia Bcl-2 scade, a Bax crește, a caspazei 3 crește, a caspazei 8 crește, față de lotul martor, la lotul biopsiat la 48 ore, la 20 cm și 40 cm de anus
- La pacienți, terapia combinată cu epirubicină produce consum marcat de energie la nivel celular, cu degradarea mitocondriilor în celula epitelială, caliciformă și în fibrele musculare netede, la lotul biopsiat la 48 ore, la 20 cm și 40 cm de anus
- La pacienți, terapia combinată cu epirubicină produce fibroză la nivel de submucoasă, la lotul biopsiat la 48 ore, la 20 cm și 40 cm de anus

BIBLIOGRAFIE

1. Keefe, D.M.; Brealey, J.; Goland, G.J.; Cummins, A.G. Chemotherapy for cancer causes apoptosis that precedes hypoplasia in crypts of the small intestine in humans. *Gut* **2000**, *47*(5), p. 632-7
2. Gibson, R.J.; Keefe, D.M.K.; Thompson, F.M.; Clarke, J.M.; Goland, G.J.; Cummins, A.G. Effect of Interleukin-11 on Ameliorating Intestinal Damage After Methotrexate Treatment of Breast Cancer in Rats. *Digestive Diseases and Sciences* **2002**, *47*(12), p. 2751-2757
3. Boussios, S.; Pentheroudakisa, G.; Katsanosb, K.; Pavlidisa, N. Systemic treatment-induced gastrointestinal toxicity: incidence, clinical

presentation and management. *Annals of Gastroenterology* **2012**, *25*, p. 106-118

4. Al-Dasooqi, N.; Bowen, J.; Gibson, R.; Stringer, A.; Logan, R.; Keefe, D. Irinotecan-induced mucositis encompasses changes in intestinal and colonic cell kinetics and this is associated with altered extracellular matrix component expression, *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **2010**, *25*, A2-A2

5. Keefe, D.M.K. Gastrointestinal mucositis: a new biological model. Supportive Care in *Cancer* **2004**, *12(1)*, p. 6–9, DOI: 10.1007/s00520-003-0550-9

6. Gibson, R.J.; Bowen, J.M.; Inglis, M.R.; Cummins, A.G.; Keefe, D.M.K. Irinotecan causes severe small intestinal damage, as well as colonic damage, in the rat with implanted breast cancer. *JGHF* **2003**, *18(9)*, p. 1095–1100, DOI: 10.1046/j.1440-1746.2003.03136.x

Număr total de referințe în text 305