

UNIVERSITATEA "BABEȘ-BOLYAI" CLUJ-NAPOCA

Facultatea de Biologie și Geologie

Școala Doctorală Biologie Integrativă

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Investigarea cardiotoxicității induse de tratamentul cu doxorubicină:
biomarkeri circulanți, perspective moleculare și patologice**

Doctorand:

Emilia Anca

Coordonator științific:

Prof. Dr. Manuela Banciu

Cluj-Napoca

2025

Cuprins

LISTĂ DE ABREVIERI	3
SCHIȚA TEZEI	6
Scopul și obiectivele tezei	6
CAPITOLUL I. Doxorubicina – un pilon fundamental în lupta împotriva cancerului	8
1. Antracicline - introducere	8
2. Informații generale și utilizări	9
3. Mecanisme de acțiune	11
3.1. Alterarea topoizomerazei II și intercalarea ADN	11
3.2. Formarea aductelor DOX-AND și deteriorarea cromatinei	11
3.3. Deteriorarea indusă de SRO	12
3.4. Moartea celulară indusă de DOX	12
4. Reacții adverse asociate tratamentului cu doxorubicină	13
4.1. Efecte non-cardiace	14
4.2. Cardiotoxicitatea	16
Concluzii	18
Bibliografie	19
CAPITOLUL II. Biomarkeri circulanți și metode de diagnostic în cardiotoxicitatea indusă de chimioterapie	29
Abstract	29
Introducere	30
1. Cunoștințe actuale asupra disfuncției cardiace datorate tratamentelor împotriva cancerului	32
2. Biomarkeri pentru diagnosticarea DCDTC	35
2.1. Troponina	35
2.2. Peptidele natriuretice	35
2.3. Creatin kinaza izoenzima MB (CK-MB)	37

2.4. Mieloperoxidaza (MPO)	37
2.5. Metaloproteinazele matriceale (MMPs)	37
2.6. Mioglobina (MB)	38
2.7. Proteina C reactivă (CRP)	38
2.8. Factorul de creștere placentar (PIGF)	39
2.9. Galectina-3 (GAL-3)	39
2.10. Factorul solubil supresor al tumorigenității (sST2)	39
2.11. MicroRNA-uri (miRNAs)	40
3. Metode clasice de diagnostic pentru DCDTC	41
Concluzii	43
Bibliografie	43
CAPITOLUL III. Evaluarea biomarkerilor circulanți în cardiotoxicitatea indusă de doxorubicină și analiza leziunilor tisulare	57
Abstract	58
Introducere	58
1. Materiale și metode	60
1.1. Animale, tratament și prelevarea probelor	60
1.2. Analiza țesuturilor	61
1.3. Teste biochimice	61
1.4. Analiza statistică	61
2. Rezultate	62
2.1. Calciu	62
2.2. Colesterol	63
2.3. Trigliceride	64
2.4. Sideremia	66
2.5. Galectina-3	66
2.6. Prohormonul N-terminal al peptidului natriuretic cerebral (NT-proBNP)	67
2.7. Analiza histologică și ultrastructurală a inimii și aortei	69
2.7. Analiza histologică și ultrastructurală a ficatului	72
2.8. Analiza histologică a rinichiului	76
3. Discuții	77

Concluzii	82
Bibliografie	82
CAPITOLUL IV. Analiza transcriptomică a cardiotoxicității acute induse de doxorubicină	88
Abstract	88
Introducere	89
Materiale și metode	91
Cuantificare și analiza statistică	92
Rezultate	92
1. Efectele generale ale doxorubicinei asupra exprimării genelor în țesutul cardiac	92
2. Analiza căilor de semnalizare în țesutul cardiac după expunerea cumulativă la doxorubicină	93
Discuții	97
Concluzii	99
Bibliografie	100
CAPITOLUL V. Concluziile generale ale tezei, originalitatea și noutatea adusă de rezultate	105
Perspective de viitor asupra acestui subiect de cercetare	106
LISTA PUBLICAȚIILOR INCLUSE ÎN TEZĂ	108
LISTA PUBLICAȚIILOR NEINCLUSE ÎN TEZĂ	108
PARTICIPARE LA CONFERINȚE INTERNAȚIONALE	108
ANEXA PENTRU CAPITOLUL IV	109

Listă de abrevieri

CK-MB – creatin kinaza izoenzima MB

CRP – proteina C reactivă

CTOX - cardiotoxicitate

DCDTC – disfuncția cardiacă datorată tratamentelor împotriva cancerului

DNA – acid dezoxiribonucleic

DOX – doxorubicină

GAL-3 – galectina-3

MB – mioglobina

miARN – micro acid ribonucleic

MMP – metaloproteinaza asociată matricii

MPO – mieloperoxidaza

NT-proBNP – prohormonul N-terminal al peptidului natriuretic cerebral

PIGF – factor de creștere placentar

SRO - specii reactive de oxigen

sST2 – supresorul solubil al tumorigenității 2

Cuvinte cheie: doxorubicină, cardiotoxicitate, biomarkeri circulanți, diagnostic timpuriu

REZUMAT

Doxorubicina (DOX) este un agent chimioterapeutic extrem de potent utilizat în tratamentul a multiple tipuri de cancer, de la tumori solide la malignități hematologice, la pacienți adulți și pediatrici. Cel mai îngrijorător efect advers al tratamentului cu DOX este cardiotoxicitatea (CTOX), numită și disfuncție cardiacă datorată tratamentului împotriva cancerului (DCDTC), ce progresează deseori la insuficiență cardiacă severă (ICS).

Simptomele CTOX induse de DOX sunt, în majoritatea cazurilor, silențioase sau nespecifice în stadiul acut ceea ce îngreunează atât diagnosticul, cât și tratamentul. În timp ce la unii pacienți simptomele apar în timpul sau imediat după tratament, majoritatea lor sunt diagnosticați la mulți ani după terminarea tratamentului.

În prezent diagnosticul CTOX se bazează pe o combinație de teste de laborator pentru funcția cardiacă nespecifice pentru CTOX și metode imagistice, cele din urmă necesitând personal medical specializat și echipamente avansate, ce nu sunt întotdeauna ușor accesibile și deseori sunt invazive, aducând astfel stres adițional pacienților oncologici.

Cea mai bună strategie pentru identificarea CTOX induse de DOX este utilizarea unor biomarkeri circulanți specifici, ce pot fi ușor accesați în orice laborator medical, mai rapid în comparație cu metodele imagistice, și cu beneficii adiționale precum cost și invazivitate reduse.

Această teză are ca scop identificarea unui set de biomarkeri circulanți plasmatici pentru identificarea CTOX induse de DOX care ar putea facilita diagnosticul timpuriu și intervențiile terapeutice. Pentru îndeplinirea acestui scop, au fost setate următoarele obiective:

- Identificarea unui set de biomarkeri circulanți din plasmă pentru identificarea CTOX induse de DOX, centrată pe potențialul de predicție timpurie a modificărilor asociate cu această boală.
- Investigarea relației biomarkerilor selectați și modificărilor induse de tratamentul cu DOX în organe-țintă.

Capitolul I conține informații generale privind utilizările DOX, mecanismul de acțiune și reacțiile adverse asociate tratamentului.

Capitolul II prezintă cunoștințe actuale privind toxicitatea farmacologică a tratamentelor împotriva cancerului, biomarkerii studiați pentru diagnosticul precoce a CTOX cât și metodele clasice utilizate curent în scopuri de diagnostic și prognostic (Figura 1). Acest

capitol a fost publicat în Farmacia 72(5): 975-986 (2024) ca Anca, E., Banciu, M., Roșioru, C.R., Dobre, C., 2024. Cardiac Surveillance in Oncology: A review of circulating biomarkers and diagnosis methods in chemotherapy-induced cardiotoxicity. <https://doi.org/10.31925/farmacia.2024.5.1>

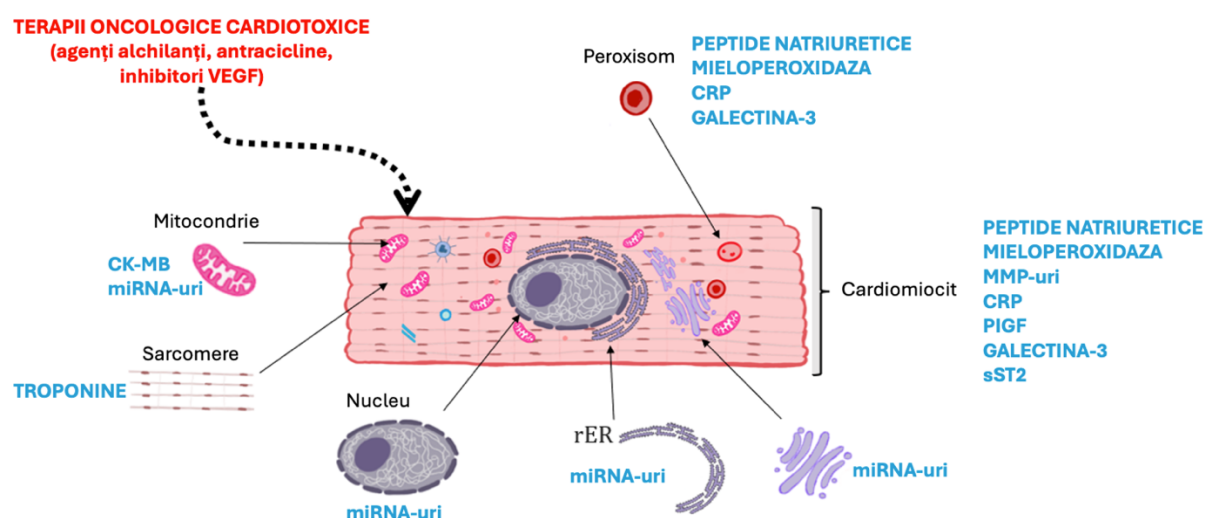


Figura 1. Privire de ansamblu pentru biomarkerii prezentați în acest capitol. Peptidele natriuretice – supraîncărcare volum/presiune; mieloperoxidaza, metaloproteinaze (MMP-uri), proteina C reactivă (CRP), factor de creștere placentar (PIGF), galectina-3, supresorul solubil al tumorigenității 2 (sST2) – stres oxidativ, inflamație, leziuni celulare și necroză, apoptoză; troponine – mecanism al contracției; microARN-uri (miARN) – proliferare, diferențiere și maturare celulară, inflamație și reprogramare metabolică; creatin kinaza izoenzima MB (CK-MB) – homeostazia energetică (image realizată în Procreate®)

Capitolul III a avut ca scop evaluarea unei baterii de biomarkeri circulanți în CTOX indusă de DOX acută și cronică, și efectuarea analizelor histologice și ultrastructurale pe principalele țesuturi vizate de toxicitatea DOX. Deoarece experimentul a fost conceput ca un studiu pe termen lung, investigarea toxicității și asupra altor țesuturi a fost considerată importantă. În cadrul experimentului, șobolanii au fost supuși unui protocol terapeutic cunoscut pentru inducerea CTOX folosind două formulări diferite de DOX, și au fost evaluați biomarkeri din recoltări săptămânale de plasmă, în timpul tratamentului pentru manifestările acute ale CTOX. Pentru investigarea CTOX cronice, un subset al grupului tratat cu DOX clasică a fost ținut în experiment fără tratament suplimentar, cu recoltarea probelor în continuare. Rezultatele au indicat că nivelurile plasmatice de fier, calciu, Gal-3 și NT-proBNP ar putea fi corelate cu gradul de afectare al miocardului pentru CTOX acută în timpul tratamentului și la scurt timp

după finalizarea acestuia. În cazul CTOX cronice, biomarkerii metabolismului lipidic – colesterolul total și trigliceridele se pot corela cu riscul cardiac pe termen lung, deoarece concentrațiile acestora continuă să crească în perioada post-tratament. În toate organele analizate, DOX a indus disfuncții tisulare progresive, manifestate sub forma proceselor apoptotice, dezorganizării miofibrilare, deteriorării vasculare și infiltrării celulelor imune în țesuturi. Acest capitol a fost parțial publicat în *Studia Universitatis Babeș-Bolyai Biologia* 69(2): 7-22 (2024) ca Anca, E., Sabău, F., Vădan, A., Marinescu, M., Licărete, E., Roșioru, C., Stoica, A.D., Dobre, C., Banciu, M., Assessment of circulating biomarkers in a rat model of doxorubicin-induced cardiotoxicity. <https://doi.org/10.24193/subbbiol.2024.2.01>

Capitolul IV conține investigarea peisajului transcriptomic al țesutului cardiac în CTOX acute, cu scopul înțelegerii mai profunde a mecanismelor afectate de tratamentul cu DOX și pentru asocierea acestora cu modificările observate în studiul descris de capitolul III. Rezumatul studiului este prezent în Figura 2. Rezultatele prezentate în acest capitol indică o corelație directă între efectele cunoscute ale DOX, biomarkerii circulanți și modificările transcriptomului. Pe scurt, acest tratament a indus o modificări semnificative ale căilor de semnalizare implicate în inflamație, reglare hormonală și ale ritmului circadian, despre care se cunoaște că are o contribuție majoră la CTOX.

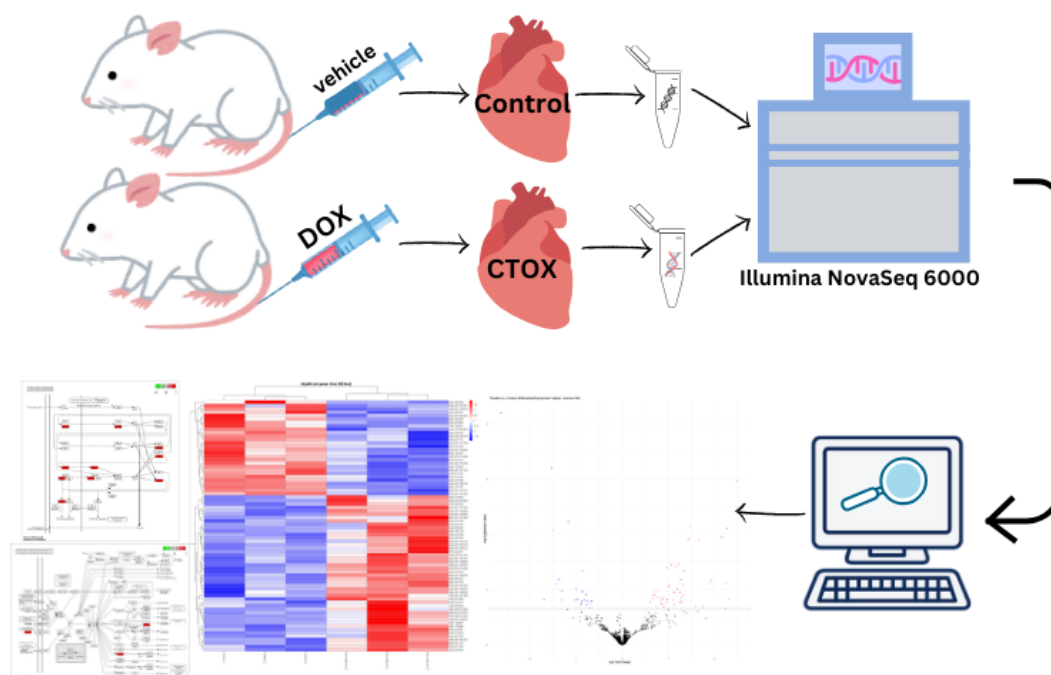


Figura 2. Rezumatul experimentului. Șobolani masculi adulți au fost tratați cu doxorubicină (DOX) sau vehicul (Control) i.v timp de 4 săptămâni. La finalul tratamentului,

animalele au fost sacrificate și ARN-ul a fost extras din țesutul cardiac pentru analiza transcriptomică. Imagine creată în Canva (<https://www.canva.com/>)

Cel mai important rezultat al acestui studiu este legat de hipercolesterolemia observată în analiza biomarkerilor și alterarea transcriptomică a ritmului circadian, deoarece afectarea ritmului somn-veghe poate contribui la dereglarea metabolismului lipidic și la susținerea unui mediu care menține toxicitatea DOX la nivel cardiac, prevenind sau întârziind procesele de reparare tisulară a miocardului. Acest capitol a fost publicat *preprint* ca Anca, E., Pavel, I.O., Licarete, E., Rosioru, C., Dobre, C., Banciu, M., Transcriptomic insights into early diagnosis of doxorubicin-induced cardiotoxicity in a rat model, 2025, *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2025.04.01.646673>

Capitolul V prezintă principalele constatări ale studiilor efectuate și concluziile finale ale tezei, împreună cu perspective viitoare ale cercetării, deoarece rezultatele pot fi un punct de plecare pentru investigarea ulterioară a biomarkerilor circulanți care ar putea facilita diagnosticarea precoce și dezvoltarea unor intervenții terapeutice eficiente pentru CTOX indusă de DOX.

Teza prezintă, în măsura în care indică literatura de specialitate, primul studiu care implică o abordare multimetodică pentru investigarea CTOX induse de DOX folosind un protocol terapeutic care imită un curs clinic al chimioterapiei, precum și implicațiile pe termen lung ale tratamentului cu DOX. Această investigație cuprinzătoare a CTOX integrează biomarkeri circulanți, analize histologice și ultrastructurale ale țesuturilor și profilarea transcriptomică. Aceasta aduce perspective asupra progresiei dinamice a CTOX prin examinarea biomarkerilor plasmatici pe tot parcursul tratamentului și în etapa post-tratament, iar împreună cu analiza tisulară reduce decalajul dintre efectele structurale și moleculare, ceea ce a permis o caracterizare detaliată a efectelor acute și cronice ale DOX.

În plus, abordarea integrativă a lucrării oferă corelații între evaluarea longitudinală a biomarkerilor și modificările tisulare, împreună cu investigarea transcriptomului miocardic. Acesta este primul studiu longitudinal preclinic *in vivo* care conectează aceste metode.

Studiile viitoare ar putea fi centrate pe mecanismele-cheie prezentate în această teză. În primul rând, disfuncția mitocondrială indusă de DOX trebuie investigată pentru a evalua dacă fuziunea mitocondrială observată post-tratament este un mecanism compensator sau un răspuns dezadaptativ la leziunile produse de DOX ce ar putea sugera homeostazia mitocondrială drept potențial punct de investigație pentru dezvoltarea intervențiilor terapeutice eficiente. În al doilea rând, dereglarea metabolismului lipidic servește ca o direcție

suplimentară de cercetare, ce ar putea dezvălui strategii protectoare bazate pe terapii țintite pentru scăderea lipidemiei.

Împreună, aceste descoperiri avansează înțelegerea patofiziologiei CTOX induse de DOX și evidențiază necesitatea studiilor pe termen lung pentru determinarea cronologiei toxicității DOX.

LISTA PUBLICAȚIILOR INCLUSE ÎN TEZĂ

Capitolul II

Anca, E., Banciu, M., Roșioru, C.R., Dobre, C., 2024. Cardiac Surveillance in Oncology: A review of circulating biomarkers and diagnosis methods in chemotherapy-induced cardiotoxicity. *Farmacia*, 72(5): 975–986. <https://doi.org/10.31925/farmacia.2024.5.1>

Capitolul III

Anca, E., Sabău, F., Vădan, A., Marinescu, M., Licărete, E., Roșioru, C., Stoica, A. D., Dobre, C., Banciu, M., 2024. Assessment of circulating biomarkers in a rat model of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Studia Universitatis Babeș-Bolyai Biologia*, 69(2), pp. 7–22. <https://doi.org/10.24193/subbbiol.2024.2.01>

LISTA PUBLICAȚIILOR NEINCLUSE ÎN TEZĂ

Lang, C., **Anca, E.**, Vlad, C., Factori de risc comuni pentru cancer și bolile cardiovasculare, în: Vlad, C., Rădulescu, D., Drăgan, S., Burz, C. (Eds.), *Manual de Cardio-Oncologie*, Editura Medicală Universitară “Iuliu Hațieganu,” Cluj-Napoca, 2020, ISBN 978-973-693-990-7: pp. 31–51

PARTICIPARE LA CONFERINȚE INTERNAȚIONALE

Poster presentation: **Anca, E.**, Vădan, A., Marinescu, M., Sabău, F., Roșioru, C., Dobre, C., Banciu, M., Circulating biomarkers in a rat model of doxorubicin-induced cardiotoxicity. Clinical Diagnostics & Research Virtual Event Series 2024, Nov. 13, 2024, <https://www.labroots.com/file/view/PosterSubmission-Emilia%20Anca-54c6279e5ab6fc2c2ff5f6816119e0d6-2024-10-21%2010:54:48-preview.pdf>