
TEZĂ DE DOCTORAT

Efectul modulator al antioxidanților în Cardiotoxicitatea indusă de Antracicline

Doctorand: **Patricia-Lorena Cîmpan (căș. Dulf)**

Conducător de doctorat: Prof.dr. **Gabriela- Adriana Filip**



UMF
UNIVERSITATEA DE

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	19
1. Antraciclina – date generale	21
1.1. Date istorice privind antraciclinelile	21
1.2. Mecanismul de acțiune	23
1.3. Administrarea Antraciclinelor	24
1.3.1 Antraciclina: noi modalități de administrare	26
1.4. Toxicitatea Antraciclinelor	28
1.4.1. Toxicitatea hepatică	28
1.4.2. Toxicitatea renală	29
1.4.3. Mielosupresia	29
1.4.4. Toxicitatea gastro intestinală	30
1.4.5. Dezvoltarea de neoplazii secundare	30
2. Cardiotoxicitatea indusă de antraciclina	32
2.1. Factorii de risc ai cardiotoxicității	34
2.2. Clasificarea cardiotoxicității	36
2.3. Mecanismele cardiotoxicității induse de Antraciclina	37
2.3.1 Stresul oxidativ	37
2.3.2. Rolul oxid nitric sintetazei (NOS) și producția de specii reactive de oxigen în cardiotoxicitatea Indusă de Antraciclina	38
2.3.3. Efectul NADPH oxidazei asupra producției de specii reactive de oxigen	38
2.3.4. Efectul leziunilor mitocondriale asupra producției de ROS	39
2.3.5. Dereglarea homeostaziei calciului intracelular	39
2.3.6. Autofagia	39
2.3.7. Apoptoza	40
2.4. Metode de diagnostic și monitorizare	40
2.4.1. Ecocardiografia	41
2.4.2. Electrocardiograma	42
2.4.3. Rezonanța magnetică cardiacă (CMR)	42
2.4.4. Scintigrafia MUGA	43
2.4.5. Biomarkeri de leziune miocardică	43
2.5. Strategii de prevenție și management a cardiotoxicității induse de antraciclina	44
3. Rolul compușilor antioxidanți în abordarea toxicității cardiace induse	

de antracicline	46
3.1. Quercetina	48
3.1.1. Istoria Descoperirii Quercetinei	48
3.1.2. Utilizări Aprobate de FDA	48
3.1.3. Mod de Administrare și Dozaj	48
3.1.4. Mecanisme de Acțiune	48
3.1.5. Rolul Quercetinei în prevenirea efectelor secundare induse de chimioterapie	49
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	51
4. Ipoteza de lucru/obiective	53
5. Metodologie generală	55
6. Studiul 1. Cardiotoxicitatea acută indusă de doxorubicină este asociată cu creșterea stresului oxidativ, a autofagiei și a inflamației în model murin	59
6.1. Introducere	59
6.2. Ipoteza de lucru	60
6.3. Material și metoda	61
6.3.1. Modelul animal	61
6.3.2. Designul experimental	61
6.3.3. Electrocardiografie și ecocardiografie	61
6.3.4. Evaluarea stresului oxidativ	62
6.3.5. Evaluarea autofagiei și inflamației în țesutul cardiac	63
6.3.6. Analiza statistică	63
6.4. Rezultate	63
6.4.1. Efectele doxorubicinei asupra electrofiziologiei cardiace	63
6.4.2. Efectele doxorubicinei asupra funcției cardiace și remodelării cardiace	64
6.4.3. Tratamentul cu doxorubicina induce stres oxidativ și activează autofagia în miocard <i>in vivo</i>	67
6.5. Discuții	69
6.6. Concluzii	77
7. Studiul 2. Efectul protector al quercetinei în reducerea cardiotoxicității experimentale induse de Doxorubicină	79
7.1. Introducere	79
7.2. Ipoteza de lucru	81
7.3. Material și metodă	82
7.3.1. Ultrasonografia cardiaca	83
7.3.2. Determinări biochimice	83

7.3.3. Analiza western blot	83
7.3.4. Microscopia electronică de transmisie	84
7.3.5. Analiza rețelei de gene implicate	84
7.3.6. Analiza statistică	85
7.4. Rezultate	85
7.4.1. Quercetina administrată oral a îmbunătățit funcția cardiacă și parametrii ecocardiografici	85
7.4.2. Analiza farmacologică a rețelelor a identificat ținte comune ale quercetinei în cardiotoxicitate	87
7.4.3. Quercetina a atenuat stresul oxidativ indus de Doxorubicină	89
7.4.4. Quercetina a restabilit ultrastructura normală a miocardului	90
7.5. Discuții	93
7.5.1. Mecanismele efectelor cardioprotectoare ale quercetinei în cardiotoxicitatea indusă de DOX	94
7.5.2. Modificări ultrastructurale asociate cu administrarea de Quercetina în cardiotoxicitatea indusă de DOX	96
7.5.3. Limite ale studiului	98
7.6. Concluzie	98

8. Studiu 3. Impactul nanoparticulelor de aur funcționalizate cu doxorubicină asupra morfologiei și parametrilor funcționali cardiaci 101

8.1. Introducere	101
8.2. Ipoteza de lucru	102
8.3. Material și metodă	102
8.3.1. Designul experimental	102
8.3.2. Prepararea și caracterizarea nanoparticulelor de aur reduse cu citrat	103
8.3.3. Sinteza nanoparticulelor funcționalizate cu Doxorubicină	103
8.3.4. Caracterizarea nanoparticulelor de aur funcționalizate cu Doxorubicină	104
8.4. Rezultate	104
8.4.1. Formarea și caracterizarea nanoparticulelor prin spectroscopie UV-Vis	104
8.4.2. Caracterizarea nanoparticulelor DOX AuNPs prin metode de difracție ce raze X	105
8.4.3. Evaluarea morfologică a DOX AuNPs prin TEM	106
8.4.4. Analiza FTIR a DOX AuNPs	107
8.4.5. Evaluarea stabilității DOX AuNPs	108
8.4.6. Evaluarea stresului oxidativ	108
8.4.7. Ecocardiografie	110
8.5. Discuții	110
8.6. Concluzie	117

9. Concluzii generale	119
10. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	121
REFERINȚE	123

INTRODUCERE

Supraviețuirea pacienților oncologici a crescut semnificativ în ultimii ani de la mai puțin de 50% în 1971 la aprox 71 % în 2020 , ca urmare a progresului înregistrat în terapia cancerului. ¹ În acest context, la momentul actual există un interes major pentru recunoașterea și tratarea efectelor adverse asociate terapiei antineoplazice întrucât complicațiile tratamentelor anticanceroase se pot dezvolta atât precoce cât și la distanță și sunt soldate cu o morbiditate crescută în rândul pacienților oncologici. Antraciclina aparțin grupului de substanțe chimioterapice cu eficiență demonstrată într-un spectru larg de malignități precum limfoamele, leucemiile, cancerul gastric, cancerul pulmonar cu celule mici, cancerul ovarian și mamar, neuroblastomul, tumora Wilms. Toxicitatea cardiacă a antraciclinelor nu este pe deplin înțeleasă, fiind datorată unor mecanisme separate de cel antineoplazic descris pentru prima dată în 1970 și realizat prin inhibiția topoizomerazei II ².

În practica clinică, majoritatea oncologilor limitează doza cumulativă de doxorubicină, agentul cel mai utilizat din grupul antraciclinelor, la o doză totală de 400-450 mg /m². Limitarea dozei cumulative totale a determinat scăderea riscului de toxicitate cardiacă cu prețul obținerii unui răspuns terapeutic oncologic suboptimal. ¹²

Pornind de la aceste date din literatură, oarecum incomplet lămurite, realizarea unui model experimental de cardiotoxicitate prin administrarea de antraciclina ar putea conduce la înțelegerea mai largă a mecanismelor și proceselor biochimice prin care acestea generează injurie miocardică. Pe de alta parte, se observă necesitatea definirii cardiotoxicității precoce prin criterii validate prospectiv precum și optimizarea unor strategii de îmbunătățire a profilului de siguranță cardiacă a Doxorubicinei prin identificarea unor extracte naturale cu potențial cardioprotector.

Această lucrare își propune să evalueze mecanismele toxicității cardiace *in-vivo* indusă de tratamentul cu antraciclina pe model animal atât în momentul acut al administrării cât și la distanță prin studierea influenței Doxorubicinei (cea mai utilizată antraciclina în oncologie) asupra proceselor de autofagie și stres oxidativ implicate în generarea de leziuni la nivel miocardic. În al doilea rând, pentru a răspunde nevoii din practica clinică din ce în ce mai importantă de a propune noi strategii pentru diagnosticarea în stadiu reversibil a afectării structurale a miocardului, acest proiect are ca și obiectiv cercetarea eficacității mijloacelor imagistice precum ecocardiografia, dar și a biomarkerilor serici în detectarea precoce a disfuncției cardiace. De asemenea ne propunem să studiem potențialul efect cardioprotector al unor substanțe antioxidante de origine naturală și nu în ultimul rând, să limităm efectele cardiace adverse ale terapiei cu antraciclina prin administrarea unor formule de Doxorubicină încorporată în nanoparticule.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Cardiotoxicitatea indusă de antraciclone reprezintă o preocupare majoră în tratamentul pacienților oncologici, dat fiind faptul că antraciclonele, precum doxorubicina, rămân medicamente-cheie în chimioterapie datorită eficienței lor în tratarea mai multor tipuri de cancer. Cu toate acestea, utilizarea lor este limitată de toxicitatea cumulativă la nivel cardiac, care poate varia de la disfuncție ventriculară stângă asimptomatică până la insuficiență cardiacă severă. Mecanismele de toxicitate au fost intens studiate, și s-a evidențiat că un factor esențial este stresul oxidativ generat de speciile reactive de oxigen. Doxorubicina se acumulează în mitocondriile cardiomiocitelor, dezechilibrând statusul redox, lucru care afectează direct membranele celulare, proteinele și ADN-ul, inducând apoptoza celulelor musculare cardiace. Aceste leziuni oxidativ-inflamatorii stau la baza degradării funcției cardiace. Pe lângă stresul oxidativ, inflamația joacă un rol crucial în dezvoltarea cardiotoxicității. Doxorubicina stimulează secreția de citokine proinflamatorii, cum ar fi factorul de necroză tumorală alfa (TNF- α) și interleukinele (IL-1 β , IL-6), care amplifică răspunsul inflamator local și sistemic. Aceasta conduce la o deteriorare suplimentară a structurilor cardiace, inflamarea interstițiului miocardic și contribuie la declanșarea fibrozei cardiace ceea ce în timp duce la remodelarea cardiacă patologică cu apariția cardiomiopatiei dilatative și a insuficienței cardiace. În ultimele decenii, autofagia a fost identificată ca un alt mecanism implicat în cardiotoxicitate. Autofagia reprezintă procesul prin care celulele elimină componentele deteriorate sau nefuncționale. În mod paradoxal, doxorubicina poate declanșa atât inhibarea, cât și hiperactivarea autofagiei, ambele scenarii contribuind la disfuncția cardiacă. Inhibarea autofagiei poate duce la acumularea de organite celulare defecte, în timp ce o autofagie excesivă poate degrada structurile celulare necesare pentru supraviețuirea cardiomiocitelor.

O provocare majoră este diagnosticul precoce al cardiotoxicității, deoarece simptomele clinice apar, de obicei, în stadii avansate ale leziunii cardiace. Modalitățile de monitorizare includ utilizarea biomarkerilor cardiaci, cum ar fi troponina și peptida natriuretică de tip B (BNP), care indică stresul și leziunea cardiacă, dar aceste metode nu oferă întotdeauna o sensibilitate adecvată pentru detectarea leziunilor timpurii, iar la momentul actual nu există valori cut off concrete care să ghideze diagnosticul, tratamentul și urmărirea acestor pacienți.

În ceea ce privește abordările terapeutice, cercetările recente s-au concentrat pe identificarea unor strategii pentru a limita sau preveni cardiotoxicitatea. Administrarea de antioxidanți precum coenzima Q10, vitamina E și N-acetilcisteină a demonstrat o anumită eficacitate în protejarea împotriva stresului oxidativ.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Ipoteza de lucru/obiective

Cardiotoxicitatea indusă de antracicline reprezintă o problemă semnificativă în tratamentul oncologic, având un impact major asupra supraviețuirii și calității vieții pacienților. Antraciclinele, cum ar fi doxorubicina, sunt agenți chimioterapeutici eficienți, folosiți pe scară largă în tratamentul diverselor tipuri de cancer, inclusiv leucemii, limfoame și tumori solide. Cu toate acestea, utilizarea lor este limitată de potențialul lor de a induce cardiotoxicitate, care poate varia de la disfuncție ventriculară subclinică la insuficiență cardiacă congestivă severă. Importanța studierii cardiotoxicității induse de antracicline derivă din necesitatea de a identifica metode eficiente de monitorizare, prevenție și tratament pentru a minimiza impactul acestei complicații asupra pacienților care primesc tratament oncologic, contribuind astfel la optimizarea strategiilor terapeutice și la îmbunătățirea supraviețuirii pe termen lung.

Până la aceasta dată în ciuda demersului internațional al oncologilor, cardiologilor și mai nou a cardio-oncologilor (o noua specialitate de graniță) nu exista strategii clare care să limiteze morbiditatea pacienților supraviețuitori unui cancer care au urmat tratamente chimioterapeutice, criteriile validate prospectiv pentru diagnosticul cardiotoxicității precoce precum nici strategii clare de prevenție a toxicității cardiace induse de antracicline, lasând loc propunerilor de identificare a unor noi molecule cu rol diagnostic precum și substantelor cu efecte cardioprotectoare. În acest sens se va urmări evaluarea efectului unei doze de Doxorubicină asupra parametrilor cardiaci de stres oxidativ, de toxicitate miocardică, de inflamație și de autofagie, la diferite intervale de timp postadministrare în corelație cu parametrii ecografici, pentru a vedea cât timp persistă fenomenele de suferință miocardică și care este amploarea acestora. Pentru a aprecia în ce măsură modificările toxice cardiace induse de administrarea subcronică a Doxorubicinei pot fi limitate de administrarea de Quercetina se vor evalua din ser și din țesutul cardiac markerii de toxicitate miocardică (NTproBNP, troponină, CKMB), cei de stres oxidativ precum și căile de semnalizare implicate în efectul Doxorubicinei asupra țesutului cardiac în paralel cu modificările ultrastructurale apărute în miocit. Pentru a asigura o cedare optimă a compusului activ și pentru a limita toxicitatea asupra miocardului, Doxorubicina a fost legată de nanoparticule metalice de aur. După preparare și caracterizare, compusul rezultat s-a administrat în 3 doze, 1 doză/săptămână iar efectul s-a evaluat prin ecografie cardiacă, prin analiza modificărilor ultrastructurale miocitare și de stres oxidativ și prin aprecierea expresiei NFR2 și NFκB în țesutul miocardic, în comparație cu nanoparticulele de aur reduse cu citrat și cu Doxorubicina singură.

Studiul 1. Cardiotoxicitatea acută indusă de doxorubicină asociată cu creșterea stresului oxidativ, autofagiei și inflamației în model murin

Introducere

Doxorubicina, un agent antineoplazic din clasa antraciclinelor, este larg utilizată în tratamentele oncologice, dar prezintă un risc major de cardiotoxicitate. Această toxicitate se manifestă sub formă de disfuncție cardiacă acută sau cronică.

Obiective primare - Evaluarea efectelor toxice cardiace acute apărute post administrare de doxorubicina

Obiective secundare

- Identificarea modificărilor electrocardiografice (ECG) și ecocardiografice care apar la 3, 7, 10 zile după administrarea doxorubicina.
- Evaluarea nivelurilor sangvine ale parametrilor biochimici de injurie cardiacă și de stres oxidativ
- Analizarea influenței doxorubicinei asupra proceselor de autofagie celulară la nivel miocardic.

Material și metodă

Modelul experimental a inclus 24 de șobolani masculi Wistar împărțiți în două grupuri: un grup tratat cu DOX (20 mg/kg) și un grup de control tratat cu soluție salină. Evaluarea a inclus electrocardiografie și ecocardiografie efectuate la 3, 7 și 10 zile post-administrare, precum și analiza nivelurilor serice de NT-proBNP, troponină I și markeri ai stresului oxidativ (MDA, GSH) precum și expresia proteinelor implicate în autofagie (LC3-II, p62) prin analiza western blot.

Rezultate

Administrarea de DOX a dus la o scădere semnificativă a fracției de ejeție a ventriculului stâng, în ziua 10. Electrocardiograma a arătat prelungirea intervalului QTc în ziua 7. Markerii serici ai stresului oxidativ au fost crescuți semnificativ, în special MDA, reflectând deteriorarea oxidativă a miocardului. În ceea ce privește autofagia, expresia proteinei LC3-II a fost crescută semnificativ în grupul tratat cu DOX ($p < 0.01$), sugerând activarea proceselor de autofagie în celulele cardiace. În același timp, acumularea p62, marker al degradării incomplete a autofagozomilor, a indicat o dereglare a fluxului autofagic, sugerând că autofagia nu a fost suficient de eficientă pentru a proteja complet celulele cardiace de deteriorare.

Concluzii

Rezultatele confirmă că doxorubicina induce cardiotoxicitate acută, manifestată prin disfuncție sistolică precoce, creșterea stresului oxidativ și alterări ecocardiografice și electrocardiografice. Aceste descoperiri subliniază necesitatea monitorizării continue a pacienților tratați cu DOX pentru a preveni afectarea cardiacă ireversibilă.

Studiul 2 - Efectul modulator al antioxidanților de origine naturală asupra cardiotoxicității induse de doxorubicină

Introducere

Doxorubicina este un agent chimioterapic eficient, dar este cunoscută pentru cardiotoxicitatea sa, care poate duce la insuficiență cardiacă pe termen lung. Quercetina, un antioxidant natural, a fost studiată pentru proprietățile sale cardioprotectoare.

Obiective primare- Evaluarea efectului cardioprotector al Quercetinei în cardiotoxicitatea subcronică indusă de doxorubicina

Obiective secundare

- Identificarea dozei optime de Quercetin asociate cu prevenirea injuriei cardiace.
- Corelarea parametrilor biochimici, ecocardiografici și ai stresului oxidativ cu aspectul miocitar evaluat prin microscopie electronică de transmisie în administrarea combinată de doxorubicina și Quercetin față de doxorubicina în monoterapie.

Material și metodă

Studiul a fost realizat pe 32 de șobolani Wistar împărțiți în patru grupuri experimentale: un grup de control tratat cu soluție salină (n=8), un grup tratat cu DOX (2,5 mg/kg, administrare intraperitoneală), un grup tratat cu DOX și quercetină (50 mg/kg/zi, administrare orală) și un grup tratat cu DOX și quercetină (100 mg/kg/zi, administrare orală). Animalele au fost monitorizate pe parcursul a 4 săptămâni, iar evaluările au inclus ecocardiografia pentru determinarea fracției de ejeție a ventriculului stâng și ultrastructura miocitară a fost analizată prin microscopie electronică de transmisie. De asemenea, au fost măsurați markerii de stres oxidativ (MDA, GSH) și nivelurile serice de troponină și NT-proBNP.

Rezultate

Administrarea de doxorubicină a cauzat o scădere semnificativă a fracției de. Grupurile tratate cu quercetină au arătat o ameliorare a funcției cardiace, Quercetina a redus semnificativ nivelurile de MDA ($p < 0.01$) și a crescut activitatea GSH comparativ cu grupul tratat doar cu DOX. Microscopie electronică de transmisie a arătat că, în grupurile tratate cu quercetină, ultrastructura miocitelor a fost mult mai puțin afectată, cu mai puține leziuni mitocondriale și o restaurare a arhitecturii normale a celulelor cardiace.

Concluzii

Quercetina a demonstrat un efect cardioprotector semnificativ în acest model experimental de cardiotoxicitate indusă de doxorubicină. A redus markerii de stres oxidativ și a îmbunătățit funcția cardiacă, ameliorând atât parametrii ecocardiografici cât și structura ultrastructurală a miocardului. Aceste rezultate susțin utilizarea quercetinei ca agent adjuvant în reducerea toxicității cardiace asociate chimioterapiei cu doxorubicină, fiind necesare mai multe studii pentru validarea.

Studiul 3 - Impactul nanoparticulelor de aur funcționalizate cu Doxorubicină asupra morfologiei și parametrilor funcționali cardiaci

Introducere

Nanoparticulele de aur (AuNPs) au fost propuse ca vehicule pentru livrarea țintită a doxorubicinei (DOX) către celulele tumorale, cu scopul de a reduce efectele adverse asupra țesuturilor sănătoase.

Obiective primare - Studierea cardiotoxicității doxorubicinei legate de nanoparticule de aur (AuNPs)

Obiective secundare

- Optimizarea metodei de sinteză a doxorubicinei legată de nanoparticulele de aur și caracterizarea compusului rezultat
- Evaluarea modificărilor cardiace induse de nanoparticulele de aur încărcate cu doxorubicina în comparație cu administrarea de doxorubicina liberă sau cu nanoparticulele de aur reduse cu citrat, prin măsurători biochimice, de microscopie electronică precum și prin dozarea parametrilor de stres oxidativ și a moleculelor implicate în efectul compusului rezultat

Material și metodă

Acest studiu in vivo a fost realizat pe 30 de șobolani Wistar, care au fost împărțiți aleatoriu în patru grupuri experimentale:

1. Grup de control, care a primit soluție salină,
2. Grup tratat cu doxorubicină (DOX) la o doză de 10 mg/kg,
3. Grup tratat cu nanoparticule de aur acoperite cu citrat (Au-NP cu citrat) la o doză de 0,3 mg/kg,
4. Grup tratat cu nanoparticule de aur acoperite cu doxorubicină (DOX Au-NP) la aceeași doză de 0,3 mg/kg.

Toate dozele au fost administrate intraperitoneal, iar tratamentul a durat 21 de zile. După această perioadă, animalele au fost supuse unor examinări ecocardiografice pentru a evalua funcția cardiacă, urmate de sacrificarea acestora pentru recoltarea probelor de sânge și țesuturi necesare analizelor biochimice și morfologice.

Rezultate

Ecocardiografia a evidențiat o reducere semnificativă a fracției de ejeție a ventriculului stâng în grupul tratat cu doxorubicină, indicând o afectare a funcției cardiace. Grupul tratat cu nanoparticule de aur funcționalizate cu doxorubicină a prezentat o reducere similară a fracției de ejeție, sugerând că nanoparticulele de aur nu au atenuat efectul cardiotoxic al doxorubicinei.

Nanoparticulele de aur nu au reușit să reducă markerii serici de stres oxidativ și inflamație. Nivelurile de stres oxidativ au fost crescute semnificativ atât în grupul tratat cu doxorubicină, cât și în grupul tratat cu nanoparticule.

Din punct de vedere ultrastructural grupul tratat cu nanoparticule de aur și doxorubicină a prezentat leziuni similare cu cele din grupul tratat doar cu

doxorubicină. Aceste leziuni au inclus subțierea peretelui ventricular și dezorganizarea miofibrilelor.

Concluzii

Nanoparticulele de aur funcționalizate cu doxorubicină nu au reușit să reducă cardiotoxicitatea indusă de doxorubicină. Efectele toxice observate asupra funcției cardiace, remodelării ventriculare și stresului oxidativ au fost similare cu cele ale doxorubicinei libere, indicând necesitatea optimizării formulărilor pe bază de nanoparticule pentru a limita efectele adverse asupra inimii.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Prezenta cercetare în domeniul cardiotoxicității induse de doxorubicină constituie un pilon esențial în avansarea acestui domeniu emergent, având implicații semnificative în dezvoltarea cardiooncologiei. Această subspecialitate nouă, situată la intersecția dintre oncologie și bolile cardiovasculare, este încă la început de drum, dar contribuie în mod direct la înțelegerea și gestionarea complicațiilor cardiovasculare asociate tratamentelor oncologice.

Studiile întreprinse în cadrul tezei de doctorat oferă perspective inovatoare care pot accelera progresul cardiooncologiei și pot îmbunătăți îngrijirea pacienților cu cancer supuși terapiei cu antracicline. Cele trei studii realizate aduc o nouă înțelegere asupra mecanismelor toxice și asupra posibilităților de protecție cardiacă, explorând relația dintre markerii de stres oxidativ, autofagia și modificările structurale și funcționale ale cardiomiocitelor, precum și potențialele soluții de cardioprotecție.

Studiul 1 se remarcă prin unicitatea sa, investigând toxicitatea miocardică acută indusă de doxorubicină domeniu mai puțin explorată în comparație cu toxicitatea cronică. Rezultatele au arătat că modificările markerilor de stres oxidativ și autofagie apar rapid după inițierea tratamentului, înainte de creșterea semnificativă a markerilor biochimici, precum NT-proBNP. Aceste rezultate subliniază importanța monitorizării riguroase pentru a preveni leziunile ireversibile ale cordului în fazele incipiente. Originalitatea acestui studiu constă în corelarea markerilor biologici cu datele ecocardiografice și electrocardiografice, contribuind astfel la dezvoltarea unor metode de diagnostic mai sensibile și precoce ale cardiotoxicității.

Studiul 2 aduce contribuții valoroase prin investigarea efectului cardioprotector al quercetinei, un antioxidant natural, în cadrul tratamentului cronic cu DOX. Rezultatele au demonstrat că administrarea de quercetină a redus nivelurile markerilor serici asociați cu cardiotoxicitatea indusă de doxorubicină și a ameliorat parametri ecocardiografici. Noutatea acestui studiu constă în identificarea modului în care Quercetina normalizează nivelurile de NT-proBNP și modulează stresul oxidativ, sugerând potențialul său de a proteja inima în timpul tratamentelor oncologice, deschizând noi direcții pentru prevenirea toxicității cardiace.

Studiul 3 aduce o contribuție semnificativă prin analiza comparativă a efectelor cardiotoxice ale doxorubicinei libere și doxorubicinei conjugate cu nanoparticule de aur (AuNPs). Rezultatele au arătat că nanoparticulele de aur nu au redus citotoxicitatea doxorubicinei asupra miocitelor cardiace, ci au amplificat stresul oxidativ și remodelarea cardiacă. Aceste constatări subliniază limitările utilizării nanoparticulelor de aur ca vehicule pentru doxorubicină, sugerând că, deși îmbunătățesc administrarea țintită, acestea pot agrava efectele secundare cardiotoxice, ceea ce necesită o reevaluare a profilului de siguranță.

Prin aceste studii, teza oferă o perspectivă nouă asupra mecanismelor cardiotoxicității induse de doxorubicină și explorează noi abordări pentru prevenirea și reducerea acestor efecte adverse.

PhD THESIS (Abstract)

The Modulatory Effect of Antioxidants in Anthracycline- Induced Cardiotoxicity

PhD Student : **Patricia-Lorena Cîmpan (căs. Dulf)**

PhD Supervisor : Prof.dr. **Gabriela- Adriana Filip**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CONTENT

INTRODUCTION	15
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	19
1. Anthracyclines – An overview	21
1.1. Historical data	21
1.2. Mechanism of action	23
1.3. Administration of Anthracyclines	24
1.3.1 New methods of delievery	26
1.4. Anthracycline Toxicity	28
1.4.1. Hepatic toxicity	28
1.4.2. Nephrotoxicity	29
1.4.3. Myelosuppresion	29
1.4.4. Gastrointestinal toxicity	30
1.4.5. Secondary malignancies	30
2. Anthracycline Induced Cardiotoxicity	32
2.1. Risk Factors	34
2.2. Classification	36
2.3. Mechanisms of Anthracycline-induced Cardiotoxicity	37
2.3.1 Oxidative stress	37
2.3.2.Role of Nitric Oxide Synthase and Reactive Species Production	38
2.3.3.Effect of NADPH Oxidase on Reactive Oxygen Species Production	38
2.3.4. Effect of Mitochondrial Damage on ROS Production	39
2.3.5. Dysregulation of Intracellular Calcium Homeostasis	39
2.3.6. Autophagy	39
2.3.7. Apoptosis	40
2.4. Methods of Diagnosis and Monitoring	40
2.4.1. Echocardiography	41
2.4.2. Electrocardiogram	42
2.4.3. Cardiac Magnetic Resonance Imaging (CMR)	42
2.4.4. MUGA Scintigraphy	43
2.4.5. Myocardial injury biomarker	43
2.5. Prevention and Management Strategies for Anthracycline-induced Cardiotoxicity	44
3. The Role of Antioxidant Compounds in Addressing Anthracycline-	

induced Cardiac Toxicity	46
3.1. Quercetina	48
3.1.1. History of Quercetin Discovery	48
3.1.2. FDA-Approved Uses	48
3.1.3 Administration and Dosage	48
3.1.4. Mechanisms of Action	48
3.1.5. Role of Quercetin in Preventing Chemotherapy-induced Side Effects	49
PERSONAL CONTRIBUTION	51
4. Working Hypothesis/Objectives	53
5. General Methodology	55
6. 1st Study : Acute Cardiotoxicity Induced by Doxorubicin is Associated with Increased Oxidative Stress, Autophagy, and Inflammation in a Murine Model	59
6.1. Introduction	59
6.2. Working Hypothesis	60
6.3. Materials and Methods	61
6.3.1. Animal Model	61
6.3.2. Experimental Design	61
6.3.3. Electrocardiogram and Echocardiography	61
6.3.4. Evaluation of Oxidative Stress	62
6.3.5. Evaluation of Autophagy and Inflammation in Cardiac Tissue	63
6.3.6. Statistical Analysis	63
6.4. Results	63
6.4.1. Effects of Doxorubicin on Cardiac Electrophysiology	63
6.4.2. Effects of Doxorubicin on Cardiac Function and Remodelin	64
6.4.3. Doxorubicin Treatment Induces Oxidative Stress and Activates Autophagy in the Myocardium <i>in vivo</i>	67
6.5. Discussion	69
6.6. Conclusions	77
7. 2nd Study : The Protective Effect of Quercetin in Reducing Experimental Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity	79
7.1. Introduction	79
7.2. Hypothesis	81
7.3. Materials and Methods	82
7.3.1. Cardiac Ultrasound	83
7.3.2. Biochemical Assays	83

<i>Efectul modulator al antioxidanților în cardiotoxicitatea indusă de antraciline</i>	17
7.3.3. Western Blot Analysis	83
7.3.4. Transmission Electron Microscopy	84
7.3.5 Gene Network Analysis	84
7.3.6. Statistical Analysis	85
7.4. Results	85
7.4.1. Orally Administered Quercetin Improved Cardiac Function and Echocardiographic Parameters	85
7.4.2. Pharmacological Network Analysis Identified Common Targets of Quercetin in Cardiotoxicity	87
7.4.3. Quercetin Attenuated Doxorubicin-Induced Oxidative Stress	89
7.4.4. Quercetin Restored the Normal Ultrastructure of the Myocardium	90
7.5. Discussion	93
7.5.1. Mechanisms of Quercetin's Cardioprotective Effects in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity	94
7.5.2. Ultrastructural Changes Associated with Quercetin Administration in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity	96
7.5.3. Study Limitations	98
7.6. Conclusion	98
8. 3rd Study : Impact of Gold Nanoparticles Functionalized with Doxorubicin on Cardiac Morphology and Functional Parameters	101
8.1. Introduction	101
8.2. Hypothesis	102
8.3. Materials and Methods	102
8.3.1. Experimental Design	102
8.3.2. Preparation and Characterization of Citrate-Reduced Gold Nanoparticles	103
8.3.3. Synthesis of Gold Nanoparticles Functionalized with Doxorubicin	103
8.3.4. Characterization of Gold Nanoparticles Functionalized with Doxorubicin	104
8.4. Results	104
8.4.1. Formation and Characterization of Nanoparticles by UV-Vis Spectroscopy	104
8.4.2. Characterization of DOX-AuNPs by X-ray Diffraction Methods	105
8.4.3. Morphological Evaluation of DOX-AuNPs by TEM	106
8.4.4. FTIR Analysis of DOX-AuNPs	107
8.4.5. Stability Evaluation of DOX-AuNPs	108
8.4.6. Evaluation of Oxidative Stress	108
8.4.7. Echocardiography	110
8.5. Discussion	110
8.6. Conclusion	117

9. General Conclusions	119
10. Originality and Innovative Contributions of the Thesis	121
REFERENCES	123

INTRODUCTION

The survival rate of oncology patients has significantly improved in recent years, rising from less than 50% in 1971 to approximately 71% in 2020, due to advances in cancer therapy. In this context, there is currently a major interest in recognizing and managing the adverse effects associated with antineoplastic therapy, as cancer treatment complications can develop both early and long-term, leading to increased morbidity among oncology patients. Anthracyclines belong to a group of chemotherapeutic agents with proven efficacy across a wide range of malignancies, including lymphomas, leukemias, gastric cancer, small-cell lung cancer, ovarian and breast cancer, neuroblastoma, and Wilms tumor. However, the cardiac toxicity of anthracyclines is not fully understood, as it results from mechanisms distinct from their antineoplastic effects, first described in 1970, primarily through the inhibition of topoisomerase II.

In clinical practice, most oncologists limit the cumulative dose of doxorubicin, the most commonly used anthracycline, to a total dose of 400-450 mg/m². This dose limitation has reduced the risk of cardiac toxicity but at the cost of achieving a suboptimal oncologic therapeutic response.

Based on this somewhat unclear literature, developing an experimental model of cardiotoxicity induced by anthracyclines could lead to a broader understanding of the biochemical mechanisms and processes by which these agents cause myocardial injury. Additionally, there is a need to define early cardiotoxicity using prospectively validated criteria, as well as to optimize strategies for improving the cardiac safety profile of doxorubicin by identifying natural extracts with cardioprotective potential.

This study aims to evaluate the mechanisms of *in vivo* cardiac toxicity induced by anthracycline treatment using an animal model, assessing both the acute phase of administration and the long-term effects. Specifically, the study will investigate the influence of doxorubicin (the most commonly used anthracycline in oncology) on autophagy and oxidative stress processes involved in myocardial injury. Secondly, in response to the increasing clinical need to propose new strategies for diagnosing myocardial damage at a reversible stage, this project aims to assess the efficacy of imaging methods, such as echocardiography, and serum biomarkers in the early detection of cardiac dysfunction. Additionally, we aim to investigate the potential cardioprotective effects of natural antioxidant substances and, importantly, to limit the adverse cardiac effects of anthracycline therapy through the administration of doxorubicin encapsulated in nanoparticles.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

Anthracycline-induced cardiotoxicity is a major concern in the treatment of oncology patients, as anthracyclines, such as doxorubicin, remain key drugs in chemotherapy due to their efficacy in treating various types of cancer. However, their use is limited by cumulative cardiac toxicity, which can range from asymptomatic left ventricular dysfunction to severe heart failure. The mechanisms of toxicity have been extensively studied, and oxidative stress generated by reactive oxygen species (ROS) has been identified as a key factor. Doxorubicin accumulates in the mitochondria of cardiomyocytes, disrupting the redox status, which directly affects cell membranes, proteins, and DNA, inducing apoptosis of cardiac muscle cells. These oxidative-inflammatory lesions underlie the deterioration of cardiac function.

In addition to oxidative stress, inflammation plays a crucial role in the development of cardiotoxicity. Doxorubicin stimulates the secretion of pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukins (IL-1 β , IL-6), which amplify both local and systemic inflammatory responses. This leads to further damage to cardiac structures, myocardial interstitial inflammation, and contributes to the onset of cardiac fibrosis. Over time, this process results in pathological cardiac remodeling, leading to dilated cardiomyopathy and heart failure.

In recent decades, autophagy has been identified as another mechanism involved in cardiotoxicity. Autophagy is the process by which cells eliminate damaged or dysfunctional components. Paradoxically, doxorubicin can trigger both inhibition and hyperactivation of autophagy, with both scenarios contributing to cardiac dysfunction. Inhibition of autophagy can lead to the accumulation of defective cellular organelles, while excessive autophagy can degrade cellular structures necessary for cardiomyocyte survival.

A major challenge is the early diagnosis of cardiotoxicity, as clinical symptoms typically appear in the advanced stages of cardiac damage. Monitoring methods include the use of cardiac biomarkers such as troponin and B-type natriuretic peptide (BNP), which indicate cardiac stress and injury. However, these methods do not always offer sufficient sensitivity for detecting early damage, and there are currently no well-defined cutoff values to guide diagnosis, treatment, and follow-up of these patients.

Regarding therapeutic approaches, recent research has focused on identifying strategies to limit or prevent cardiotoxicity. The administration of antioxidants such as coenzyme Q10, vitamin E, and N-acetylcysteine has shown some efficacy in protecting against oxidative stress.

PERSONAL CONTRIBUTION**WorkingHypothesis/Objectives**

Anthracycline-induced cardiotoxicity is a significant issue in oncologic treatment, having a major impact on patient survival and quality of life. Anthracyclines, such as doxorubicin, are effective chemotherapeutic agents widely used in the treatment of various types of cancer, including leukemias, lymphomas, and solid tumors. However, their use is limited by their potential to induce cardiotoxicity, which can range from subclinical ventricular dysfunction to severe congestive heart failure. The importance of studying anthracycline-induced cardiotoxicity stems from the need to identify effective methods for monitoring, prevention, and treatment, in order to minimize the impact of this complication on patients receiving oncologic treatment, thus contributing to the optimization of therapeutic strategies and improving long-term survival.

To date, despite the efforts of oncologists, cardiologists, and more recently cardio-oncologists (a new border specialty), there are no clear strategies that limit the morbidity of cancer survivors who have undergone chemotherapy, nor are there prospectively validated criteria for the diagnosis of early cardiotoxicity, or clear prevention strategies for anthracycline-induced cardiac toxicity. This leaves room for proposals to identify new diagnostic molecules and substances with cardioprotective effects. In this regard, this study will evaluate the effect of a dose of doxorubicin on oxidative stress parameters, myocardial toxicity, inflammation, and autophagy at different time intervals post-administration, correlated with echocardiographic parameters, to determine how long myocardial injury persists and its extent.

To assess the extent to which the toxic cardiac changes induced by subchronic administration of doxorubicin can be limited by the administration of quercetin, myocardial toxicity markers (NTproBNP, troponin, CKMB), oxidative stress markers, as well as the signaling pathways involved in doxorubicin's effect on cardiac tissue, will be evaluated in serum and cardiac tissue. These evaluations will be performed in parallel with ultrastructural changes observed in the cardiomyocytes. To optimize the delivery of the active compound and limit its toxicity on the myocardium, doxorubicin was conjugated with gold metallic nanoparticles. After preparation and characterization, the resulting compound was administered in 3 doses (one dose per week), and the effect was evaluated through cardiac ultrasound, analysis of myocardial ultrastructural changes and oxidative stress, and assessment of NFR2 and NFkB expression in myocardial tissue, compared with citrate-reduced gold nanoparticles and free doxorubicin.

1st Study - Increased Oxidative Stress, Autophagy, and Inflammation in a Murine Model

Introduction

Doxorubicin, an antineoplastic agent from the anthracycline class, is widely used in oncological treatments but presents a major risk of cardiotoxicity. This toxicity manifests as acute or chronic cardiac dysfunction.

Primary Objectives

- To evaluate the acute cardiac toxic effects following doxorubicin administration.

Secondary Objectives

- To identify electrocardiographic (ECG) and echocardiographic changes occurring 3, 7, and 10 days after doxorubicin administration.
- To evaluate blood levels of biochemical markers of cardiac injury and oxidative stress.
- To analyze the influence of doxorubicin on cellular autophagy processes in myocardial tissue.

Materials

and

Methods

The experimental model included 24 male Wistar rats divided into two groups: a group treated with DOX (20 mg/kg) and a control group treated with saline solution. Evaluations included electrocardiography and echocardiography performed at 3, 7, and 10 days post-administration, as well as the analysis of serum levels of NT-proBNP, troponin I, and oxidative stress markers (MDA, GSH), along with the expression of proteins involved in autophagy (LC3-II, p62) by western blot analysis.

Results

DOX administration led to a significant reduction in left ventricular ejection fraction by day 10. Electrocardiography showed QTc interval prolongation on day 7. Serum markers of oxidative stress were significantly elevated, particularly MDA, reflecting oxidative damage to the myocardium. Regarding autophagy, the expression of LC3-II protein was significantly increased in the DOX-treated group ($p < 0.01$), suggesting the activation of autophagy processes in cardiac cells. Simultaneously, the accumulation of p62, a marker of incomplete autophagosome degradation, indicated a dysregulation of the autophagic flux, suggesting that autophagy was not sufficiently effective in fully protecting cardiac cells from damage.

Conclusions

The results confirm that doxorubicin induces acute cardiotoxicity, manifested by early systolic dysfunction, increased oxidative stress, and electrocardiographic and echocardiographic alterations. These findings underscore the need for continuous monitoring of patients treated with DOX to prevent irreversible cardiac damage.

2nd Study - The Modulatory Effect of Natural Antioxidants on Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity

Introduction

Doxorubicin is an effective chemotherapeutic agent, but it is known for its cardiotoxicity, which can lead to long-term heart failure. Quercetin, a natural antioxidant, has been studied for its cardioprotective properties.

Primary Objectives

- To evaluate the cardioprotective effect of quercetin in subchronic doxorubicin-induced cardiotoxicity.

Secondary Objectives

- To identify the optimal dose of quercetin associated with the prevention of cardiac injury.
- To correlate biochemical, echocardiographic, and oxidative stress parameters with myocardial structure, evaluated by transmission electron microscopy, in the combined administration of doxorubicin and quercetin versus doxorubicin monotherapy.

Materials

and

Methods

The study was conducted on 32 Wistar rats, divided into four experimental groups: a control group treated with saline solution (n=8), a group treated with DOX (2.5 mg/kg, intraperitoneal administration), a group treated with DOX and quercetin (50 mg/kg/day, oral administration), and a group treated with DOX and quercetin (100 mg/kg/day, oral administration). The animals were monitored for 4 weeks, and evaluations included echocardiography to assess left ventricular ejection fraction, while the myocardial ultrastructure was analyzed by transmission electron microscopy. Additionally, oxidative stress markers (MDA, GSH) and serum levels of troponin and NT-proBNP were measured.

Results

Doxorubicin administration caused a significant reduction in ejection fraction. The groups treated with quercetin showed improved cardiac function. Quercetin significantly reduced MDA levels ($p < 0.01$) and increased GSH activity compared to the group treated with DOX alone. Transmission electron microscopy showed that the ultrastructure of cardiomyocytes in the quercetin-treated groups was much less affected, with fewer mitochondrial lesions and a restoration of the normal architecture of cardiac cells.

Conclusions

Quercetin demonstrated a significant cardioprotective effect in this experimental model of doxorubicin-induced cardiotoxicity. It reduced oxidative stress markers and improved cardiac function, ameliorating both echocardiographic parameters and myocardial ultrastructure. These results support the use of quercetin as an adjuvant agent in reducing cardiac toxicity associated with doxorubicin chemotherapy, although further studies are needed for validation.

3rd Study - Impact of Gold Nanoparticles Functionalized with Doxorubicin on Cardiac Morphology and Functional Parameters

Introduction

Gold nanoparticles (AuNPs) have been proposed as vehicles for the targeted delivery of doxorubicin (DOX) to tumor cells, aiming to reduce adverse effects on healthy tissues.

Primary Objectives

- To study the cardiotoxicity of doxorubicin conjugated to gold nanoparticles (AuNPs).

Secondary Objectives

- To optimize the synthesis method for doxorubicin conjugated to gold nanoparticles and to characterize the resulting compound.
- To evaluate the cardiac changes induced by doxorubicin-loaded gold nanoparticles compared to free doxorubicin or citrate-reduced gold nanoparticles, through biochemical measurements, electron microscopy, and the assessment of oxidative stress markers and molecules involved in the compound's effect.

Materials

and

Methods

This in vivo study was conducted on 30 Wistar rats, which were randomly divided into four experimental groups:

1. Control group, which received saline solution,
2. Group treated with doxorubicin (DOX) at a dose of 10 mg/kg,
3. Group treated with citrate-coated gold nanoparticles (Au-NP with citrate) at a dose of 0.3 mg/kg,
4. Group treated with doxorubicin-loaded gold nanoparticles (DOX Au-NP) at the same dose of 0.3 mg/kg.

All doses were administered intraperitoneally, and the treatment lasted 21 days. After this period, the animals underwent echocardiographic examinations to assess cardiac function, followed by euthanasia to collect blood and tissue samples for biochemical and morphological analyses.

Results

Echocardiography revealed a significant reduction in left ventricular ejection fraction in the group treated with doxorubicin, indicating impaired cardiac function. The group treated with doxorubicin-functionalized gold nanoparticles showed a similar reduction in ejection fraction, suggesting that gold nanoparticles did not mitigate the cardiotoxic effect of doxorubicin.

Gold nanoparticles failed to reduce serum markers of oxidative stress and inflammation. Oxidative stress levels were significantly elevated in both the doxorubicin-treated group and the nanoparticle-treated group. From an ultrastructural perspective, the group treated with gold nanoparticles and doxorubicin showed lesions similar to those in the group treated with doxorubicin alone. These lesions included ventricular wall thinning and disorganization of myofibrils.

Conclusions

Gold nanoparticles functionalized with doxorubicin did not reduce doxorubicin-induced cardiotoxicity. The toxic effects observed on cardiac function, ventricular remodeling, and oxidative stress were similar to those of free doxorubicin, indicating the need for further optimization of nanoparticle-based formulations to limit adverse effects on the heart.

Originality and Innovative Contributions of the Thesis

The present research in the field of doxorubicin-induced cardiotoxicity constitutes a crucial pillar in advancing this emerging field, with significant implications for the development of cardio-oncology. This new subspecialty, situated at the intersection of oncology and cardiovascular diseases, is still in its infancy but directly contributes to the understanding and management of cardiovascular complications associated with oncological treatments.

The studies undertaken within this doctoral thesis provide innovative perspectives that can accelerate the progress of cardio-oncology and improve the care of cancer patients undergoing anthracycline therapy. The three studies conducted offer new insights into the toxic mechanisms and possibilities for cardiac protection, exploring the relationship between oxidative stress markers, autophagy, and structural and functional changes in cardiomyocytes, as well as potential cardioprotective solutions.

Study 1 stands out for its uniqueness, investigating the acute myocardial toxicity induced by doxorubicin, a less-explored area compared to chronic toxicity. The results demonstrated that changes in oxidative stress and autophagy markers occur rapidly after treatment initiation, before the significant increase of biochemical markers, such as NT-proBNP. These findings underscore the importance of rigorous monitoring to prevent irreversible heart damage in the early phases. The originality of this study lies in correlating biological markers with echocardiographic and electrocardiographic data, thereby contributing to the development of more sensitive and early diagnostic methods for cardiotoxicity.

Study 2 makes valuable contributions by investigating the cardioprotective effect of quercetin, a natural antioxidant, in the context of chronic DOX treatment. The results demonstrated that quercetin administration reduced serum levels of markers associated with doxorubicin-induced cardiotoxicity and improved echocardiographic parameters. The novelty of this study lies in identifying how quercetin normalizes NT-proBNP levels and modulates oxidative stress, suggesting its potential to protect the heart during oncological treatments, opening new directions for preventing cardiac toxicity.

Study 3 provides a significant contribution by comparatively analyzing the cardiotoxic effects of free doxorubicin and doxorubicin conjugated with gold nanoparticles (AuNPs). The results showed that gold nanoparticles did not reduce the cytotoxicity of doxorubicin on cardiomyocytes but rather amplified oxidative stress and

cardiac remodeling. These findings highlight the limitations of using gold nanoparticles as vehicles for doxorubicin, suggesting that while they improve targeted delivery, they may exacerbate cardiotoxic side effects, necessitating a reevaluation of their safety profile.

Through these studies, the thesis offers a new perspective on the mechanisms of doxorubicin-induced cardiotoxicity and explores new approaches for preventing and mitigating these adverse effects.