



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CAGLIARI**  
*Dipartimento di Scienze Cardiovascolari e Neurologiche*

**CORSO DI DOTTORATO IN SCIENZE CARDIOVASCOLARI**

*Ciclo XX*

**Effetti cardiotossici precoci e tardivi  
del trattamento con Epirubicina**

*Valutazione con marker biochimici ed  
ecocardiografia Tissue Doppler*

Relatore:  
*Prof. Giuseppe Mercurio*

Tesi di dottorato di:  
*Christian Cadeddu*

Anno accademico 2006/2007

## **INDICE**

<b>Le antraciline: qualità e limiti</b>	<b>4</b>
<b>La cardiotossicità delle antraciline</b>	
Il meccanismo d'azione	5
Stress ossidativo e citochine: indici precoci di CTX	9
Peptide natriuretico B, indici di necrosi e CTX da ANT	10
Aspetti clinici della CTX da ANT	12
Presidi contro la CTX da ANT	13
<b>Obiettivo della presente ricerca</b>	<b>15</b>
<b>Materiali e metodi</b>	
Popolazione studiata	16
Caratteristiche cliniche dei pazienti arruolati	16
Protocollo di studio	17
<b>Ecocardiografia</b>	
Ecocardiografia standard	19
Doppler tessutale	19
<b>Markers biochimici</b>	
BNP e markers di necrosi	20
Citochine	21
ROS ematici e GPX e SOD eritrocitari	21
<b>Questionari auto-somministrati</b>	<b>22</b>
<b>Timing dello studio</b>	<b>22</b>
<b>Analisi statistica</b>	<b>23</b>

## **Risultati**

Ecocardiografia convenzionale	24
Doppler tessutale	25
BNP ed enzimi di necrosi	25
Livelli ematici di ROS e livelli eritrocitari di GPX e SOD	27
Livelli sierici di citochine	29

## **Discussione** **30**

Le ANT nella terapia antitumorale	31
Cardiotossicità da ANT	32
Gestione convenzionale della CTX da ANT	33
BNP, indici di necrosi e CTX da ANT	33
Marker di potenza ossido-riduttiva	34
L'ecocardiografia DTI	36
Limiti e prospettive future dello studio	37

## **Bibliografia** **39**

## **Le antracicline: qualità e limiti**

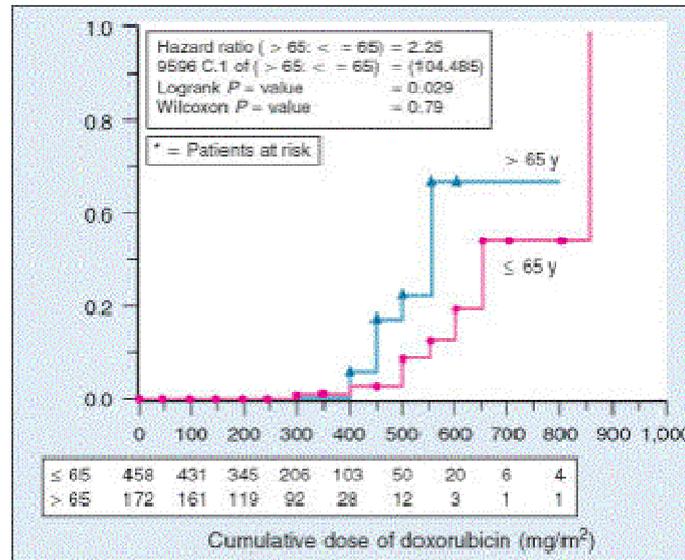
La sopravvivenza dei malati neoplastici è notevolmente aumentata negli ultimi vent'anni. Tuttavia, per ottenere questi risultati si è dovuto pagare un prezzo cospicuo in termini di effetti collaterali associati all'utilizzo di trattamenti anti-tumorali intensivi.

In particolare, la cardiotossicità cronica può compromettere l'efficacia clinica della chemioterapia, influenzando la sopravvivenza e la qualità di vita dei pazienti indipendentemente dalla prognosi oncologica.

Le Antracicline (ANT), chemioterapici appartenenti alla classe degli antibiotici antitumorali, rappresentano i farmaci antiblastici più efficaci fino ad oggi sviluppati. Un aspetto fondamentale della loro validità terapeutica consiste nell'ampissimo spettro di attività; e questo fa delle ANT gli agenti chemioterapici con il maggior numero di indicazioni cliniche. Le ANT sono largamente utilizzate così nel trattamento dei tumori solidi, risultando particolarmente attive sul carcinoma mammario, ovarico ed epatico, sul microcitoma polmonare e sui sarcomi, come nella cura dei tumori ematologici, quali la malattia di Hodgkin e le leucemie acute (Hitchcock 1986; Bonadonna 1995).

Le ANT hanno consentito il raggiungimento di risultati soddisfacenti in termini di regressione della malattia e, in molteplici casi, anche di guarigione completa. Peraltro, la diffusione clinica delle ANT è limitata dal fatto che esse sono gravate, oltre che dagli effetti tossici comuni ad altre classi di anti-neoplastici - emesi, mielotossicità, mucositi -, anche da un elevato potenziale cardiotossico (Jones 2006; Elliott 2006; Paulides 2007; Figura 1). I dati cumulativi di più studi retrospettivi (Meinardi 2000), dimostrano che il 15% dei pazienti trattati con ANT presenta una riduzione media del 25% della frazione di eiezione ventricolare sinistra (FE) entro un mese dal termine della chemioterapia; l'11% di questi soggetti sviluppa poi un'insufficienza cardiaca franca (il 20% dopo 5 anni di follow up; Figura 1) (Branwald 2005).

**Figura 1** Mortalità indotta da trattamento chemioterapici con Doxorubicina

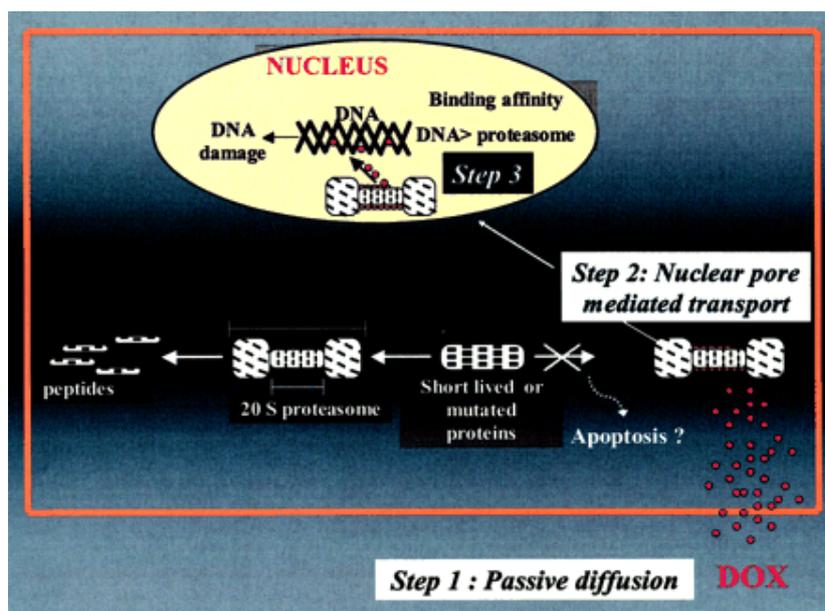


## La cardiotoxicità delle ANT

**Il meccanismo d'azione.** Le alterazioni morfologiche e funzionali cui va incontro il miocardiocita a seguito dell'esposizione ad ANT rappresentano il risultato dell'interazione tra esse ed i costituenti cellulari. Dopo sole 4 ore dal primo contatto con il farmaco è possibile riscontrare nel cardiomiocita perdita di miofibrille, dilatazione del reticolo sarcoplasmatico, vacuolizzazione citoplasmatica, riduzione dei mitocondri ed incremento del numero dei lisosomi (Akao 2003; Bristow 1978; Unverferth 1983). L'eziopatogenesi della cardiotoxicità (CTX) indotta da ANT si identifica del tutto con il meccanismo d'azione antineoplastico di questi farmaci: in una prima fase (step 1) l'ANT penetra nella cellula neoplastica mediante un meccanismo di diffusione passiva e si lega con alta affinità al proteosoma presente nel citoplasma. In una seconda fase (step 2) il complesso ANT-proteosoma transloca all'interno del nucleo attraverso la membrana nucleare. Infine (step3) l'ANT, dissociandosi dal proteosoma, si lega al DNA (Figura 2). L'anello planare poliaromatico consente l'intercalazione della molecola tra due consecutive coppie di

basi del DNA, impedendo che la molecola funga da stampo per la DNA polimerasi e la RNA polimerasi con conseguente blocco della sintesi dei due acidi nucleici (Kiyomiya 2001).

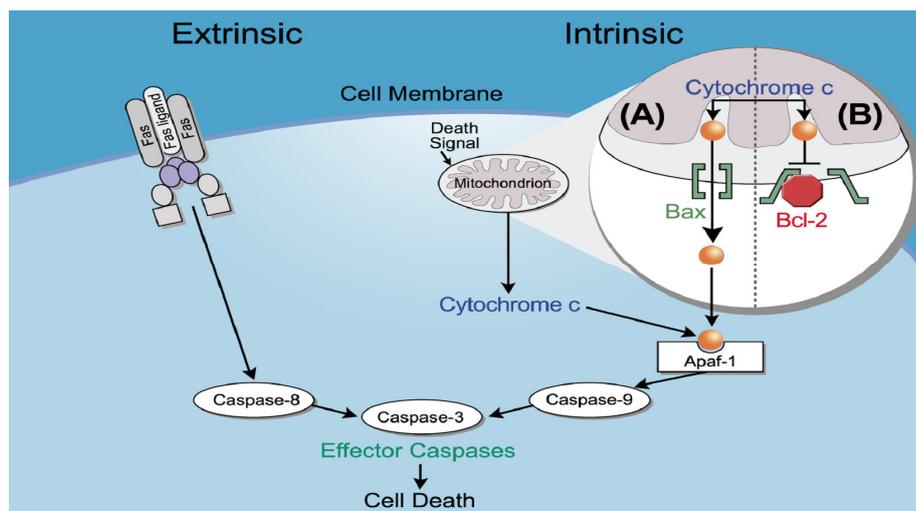
**Figura 2.** Triplice sequenza che permette il trasporto dell'ANT (mediato dal proteosoma) all'interno del nucleo



Attualmente, tra i meccanismi maggiormente responsabili della CTX, viene indicata l'apoptosi, che Narula ha descritto incrementata nei cardiomiociti di pazienti che siano già incorsi in un'insufficienza cardiaca secondaria a trattamento antitumorale (Narula 1996). Essa può attuarsi attraverso l'interazione delle ANT con recettori presenti sulla membrana citoplasmatica del cardiomiocita (meccanismo estrinseco recettore mediato: la ANT è capace di incrementare l'apoptosi indotta dal ligando Fas che interagisce con il suo recettore) o attraverso un meccanismo intrinseco mediato dal mitocondrio: la ANT, attraverso la sovraespressione del gene Bax e l'inibizione del gene Bcl-XL, induce la morte cellulare mediante liberazione del citocromo C e la conseguente formazione del complesso apoptotico (Apaf-1/citocromoC/procaspase-9). La via finale comune di entrambi i meccanismi è

rappresentata dall'attivazione del sistema enzimatico delle caspasi, responsabile dell'induzione del processo apoptotico (Figura 3) (Yamaoka 2000).

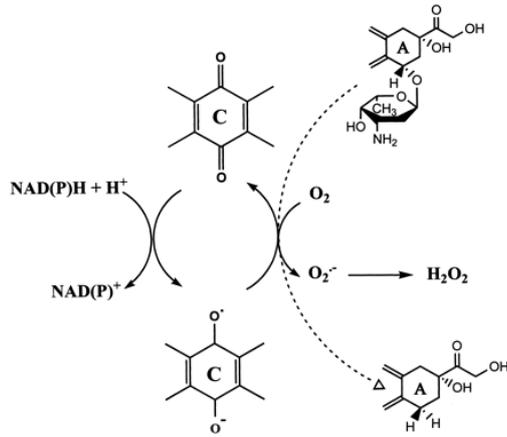
**Figura 3.** Apoptosi del miocardiocita indotta da ANT. Meccanismo molecolare estrinseco (recettore mediato), intrinseco (mitocondrio mediato) e via finale comune.



Le ANT, che appartengono alla specie degli antrachinoni, hanno una particolare tendenza a ridursi, dando origine a composti estremamente reattivi, quali i derivati semichinonici e le specie reattive dell'ossigeno (Gille 1997). È, altresì, noto che il danno miocardico da ANT trova ampia giustificazione nella produzione da esse indotta di radicali liberi, estremamente dannosi per la cellula muscolare, povera di enzimi inattivanti quali la catalasi e la glutatione-perossidasi (Doroshov 1980); quest'ultima, a sua volta, risulta ulteriormente inattivata dalle ANT.

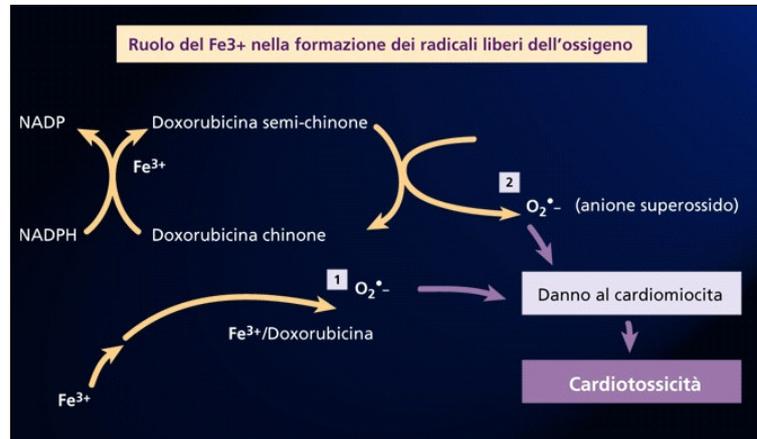
L'anello chinonico dell'ANT, in presenza di NADP(H), va incontro ad un processo di riduzione con acquisizione di un elettrone e conseguente formazione del derivato semichinonico. Questi, a sua volta in presenza di O<sub>2</sub>, si ossida dando origine all'anione superossido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) ed al perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Vasquez-Vivar 1997; Figura 4)

**Figura 4** Ciclo redox delle ANT



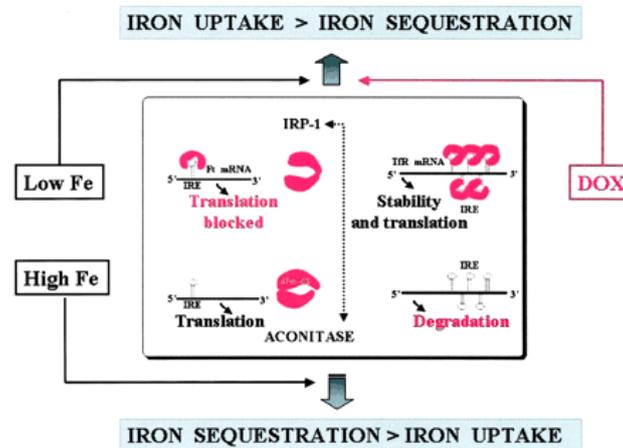
Per potenziare la formazione dei radicali liberi, le ANT incrementano il pool intracellulare di  $\text{Fe}^{3+}$  (Minotti 2004; Figura 5)

**Figura 5.** Ruolo del ferro nella formazione dei radicali liberi dell'ossigeno



L'ANT induce un incremento della concentrazione del metallo-ione a livello del citosol attraverso la conversione dell'aconitasi citoplasmatica (proteina di stoccaggio del metallo-ione) nella forma IRP-1, responsabile di un aumentato uptake del ferro extracellulare (Minotti 2004; Figura 6).

**Figura 6.** Conversione mediata dall'ANT dell'aconitasi citoplasmatica nella forma IRP-1.



### Stress ossidativo e citochine: indici precoci di CTX

In stretta correlazione con il fenomeno dell'apoptosi del miocardiocita, si osserva un aumento dei livelli plasmatici di proteine di origine cellulare, quali il tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ), il suo recettore di tipo I e II (sRTNF- $\alpha$  di tipo I o sRTNF- $\alpha$  di tipo II), il recettore Fas ed il suo ligando (Torre-Amione 1996; Drimal 2006).

Il TNF $\alpha$  è una citochina infiammatoria, in grado di esercitare un'azione inotropica negativa a livello cardiaco, la cui espressione ricopre un ruolo fondamentale nella patogenesi della cardiomiopatia dilatativa (Sato 2005). L'incremento dei livelli di TNF $\alpha$  in pazienti affetti da insufficienza cardiaca congestizia produce un effetto deleterio sul tessuto miocardico attraverso il legame con i recettori specifici, di cui si conoscono i già nominati tipi sRTNF- $\alpha$  di tipo I e II. Il livello di espressione recettoriale nel tessuto cardiaco in condizioni patologiche è tuttavia sconosciuto (Torre-Amione 1996).

Recentemente, è stato precisato in seguito a diversi studi il meccanismo con il quale il TNF $\alpha$ , espresso in corso di insufficienza cardiaca nel tessuto miocardico, è in grado di indurre disfunzione cardiaca.

Tsutamoto e coll. (Tsutamoto 2001), ad esempio, hanno dimostrato un incremento dello stress ossidativo a livello ventricolare in pazienti con cardiomiopatia dilatativa consistente nell'aumento dei livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS). In accordo con queste evidenze, Kaur e coll hanno trattato i miocardiociti di ratto con differenti concentrazioni di  $TNF\alpha$ . L'esposizione a concentrazioni della sostanza pari a 10 ng/ml ha determinato una significativa riduzione della sintesi di SOD e di catalasi, una riduzione della GPX, un incremento dello stress ossidativo, un fenomeno di lipoperossidazione ed un danno cellulare confermato dal rilascio della CPK (Kaur 2006).

Ad oggi, esiste un'ampia evidenza in letteratura in base alla quale lo stress ossidativo e l'infiammazione risultano implicati nella patogenesi dell'insufficienza cardiaca congestizia (Drimal 2006).

Altre citochine si sono dimostrate responsabili di danno cardiaco, in associazione con il  $TNF\alpha$ . Hogye e coll. hanno osservato che anche i livelli di IL-6 e del suo recettore (sRIL-6R) sono significativamente incrementati nel siero di pazienti affetti da cardiomiopatia dilatativa idiopatica e che le loro concentrazioni correlano con la gravità della disfunzione ventricolare (Hogye 2004). Quando, poi, il danno cardiaco si sia instaurato e abbia dato luogo ad una patologia clinica conclamata, si assiste ad una modificazione ampia e generalizzata dei livelli plasmatici dei markers dell'infiammazione e dello stress ossidativo.

### **Peptide natriuretico B, indici di necrosi e CTX da ANT**

Il peptide natriuretico di tipo B (BNP), anche denominato peptide natriuretico cerebrale, è stato identificato per la prima volta nel 1988. Così come l'omologo peptide di origine atriale (ANP), il BNP agisce da sistema natriuretico a due vie nella regolazione della pressione sanguigna e dell'equilibrio dei fluidi (Bonow 1996).

Il cuore è la fonte principale del BNP presente in circolo (McDowell 1995), secreto dai granuli di membrana presenti nei ventricoli in risposta ad un aumento del volume ventricolare stesso e del sovraccarico pressorio (Wilkins 1997)

Il BNP risulta un sensibile marcatore ormonale di disfunzione ventricolare sistolica e diastolica (Yamamoto 1996). Infatti la sua concentrazione è strettamente correlata alla gravità dei segni e dei sintomi dell'insufficienza cardiaca (Maeda 1998; Sagnella 1998).

La Troponina I (TnI), l'isoforma MB della Creatinfosfochinasi (CK-MB) e la Mioglobina (Myo) sono i marcatori di danno miocardico impiegati nella diagnostica differenziale del dolore toracico per la stratificazione precoce del rischio di infarto miocardico (Newby 2001), grazie alle elevate sensibilità e specificità dimostrate dal dosaggio combinato di tali markers nell'individuazione di insulti a carico del muscolo cardiaco (Lindahl 1995; Kost 1998).

Alcuni studi presenti in letteratura hanno dosato questi peptidi nei pazienti in trattamento con ANT, correlandoli specialmente con gli indici di funzione sistolica e diastolica (Nousiainen 1999; Elbl 2006). Suzuki e coll. hanno riscontrato variazioni significative dei livelli di BNP ed ANP durante e dopo chemioterapia ad alte dosi (Suzuki 1998).

Recentemente Nousiainen e coll., in un piccolo studio prospettico, hanno dimostrato che, durante l'evoluzione della disfunzione ventricolare sinistra indotta da ANT, la secrezione di BNP è maggiormente correlata con la disfunzione diastolica più che con la disfunzione sistolica (Nousiainen 2002; Aggarwal 2006).

Considerando che l'alterazione della permeabilità di membrana e la necrosi del miocardiocita, con immissione in circolo di molecole altrimenti assenti o presenti solo in tracce, costituiscono la tappa finale comune del danno cellulare, indipendentemente dalla natura della noxa che ne è alla base, il dosaggio di TnI, CK-MB e Myo potrebbe consentire di identificare la presenza di eventuali lesioni acute a carico del muscolo cardiaco indotte dal trattamento con epirubicina (EPI).

La TnI è stata dosata in precedenti studi in pazienti trattati con alte dosi di ANT e la sua positività ha messo in evidenza il sottogruppo a maggior rischio di sviluppare una disfunzione ventricolare sinistra a distanza (Cardinale 2004)

### **Aspetti clinici della CTX da ANT**

Dal punto di vista clinico la CTX deve essere distinta in acuta/subacuta e cronica progressiva.

La CTX acuta/subacuta insorge, in genere, entro una settimana dal trattamento ed è caratterizzata da anomalie elettrocardiografiche aspecifiche con riduzione dei voltaggi del QRS, prolungamento dell'intervallo QT con comparsa di aritmie sopraventricolari, ventricolari, disturbi della conduzione atrio-ventricolare, transitorio sopralivellamento del tratto ST indotto da vasospasmo coronarico (Porta 1998; Steiberg 1987; Jones 2006).

La CTX cronica è quella destinata ad assumere il significato clinico e prognostico più rilevante, evolvendo in una cardiomiopatia ed esitando con frequenza in un'insufficienza cardiaca generalmente poco sensibile al trattamento, raramente nella cardiopatia ischemica (Marino 2003). La CTX cronica può avere inizio precoce, entro un anno dal trattamento, oppure manifestarsi dopo molti anni o decenni (Singal 1998).

La mortalità dei pazienti affetti da insufficienza cardiaca, di classe NYHA III – IV, conseguente a CTX da chemioterapici è marcatamente precoce rispetto a quella dovuta a cardiomiopatia dilatativa idiopatica (Braunwald).

## **Presidi contro la CTX da ANT**

La CTX da ANT è stata considerata in passato una complicanza inevitabile del trattamento antineoplastico. Di conseguenza, l'unica modalità di protezione è stata affidata all'utilizzo di dosi cumulative massime, differenti per ogni farmaco appartenente a questa classe, da non superare anche quando il chemioterapico non avesse espresso tutta l'attività antiblastica.

Purtroppo, un comportamento terapeutico prudentiale con una stretta sorveglianza della dose nell'utilizzo delle ANT non garantisce immunità dalle conseguenze dannose e patogene e non ci esime dall'impegno di proseguire nella conoscenza dei meccanismi della CTX da ANT e nella ricerca di un efficace rimedio. Infatti, ad esempio, occorre considerare che la CTX da ANT può comparire, seppure in una percentuale limitata di casi, anche in pazienti che abbiano assunto dosi cumulative molto basse (Swain 2004). Questa evidenza sembra vanificare l'osservanza del limite superiore della dose cumulativa e testimonia una grande variabilità individuale nella tollerabilità delle ANT (VonHoff 1979).

Le prime iniziative intraprese per superare lo stato d'impasse legato alla CTX di questa classe di farmaci sono avvenute in ambito di farmacologia clinica. Sono stati approntati nuovi composti, analoghi del capostipite delle ANT, la doxorubicina, quali l'EPI, meno cardiotoxici e, pertanto, somministrabili a dosi cumulative superiori (fino a  $1000 \text{ mg/m}^2$  vs i  $450 \text{ mg/m}^2$  della doxorubicina; Nielson 1990; Ryberg 1998); tuttavia superata la dose cumulativa di  $1000 \text{ mg/m}^2$  di EPI, la cardiotoxicità può essere rilevata nel 16 - 35% dei pazienti (Gennari 1999). Inoltre, sono state allestite formulazioni liposomiali (in liposoma pegilato o non pegilato) di efficacia comparabile, ma dotate di minore CTX (Sparano 2001).

L'utilizzo di sostanze chelanti il ferro, quali il Dexrazoxane, non ha dato i risultati sperati e le valutazioni più recenti tendono a ridimensionare l'utilità di questi farmaci (Venturini 1996).

Negli ultimi anni, il problema della CTX da chemioterapici ha acquisito un rilievo crescente, per due principali motivi: *a.* il diffondersi delle ANT in fase adiuvante, cioè destinate a pazienti con aspettativa di vita lunga e *b.* la disponibilità di nuovi agenti citotossici particolarmente efficaci, specie in associazione con le ANT, ma responsabili di un incremento di CTX (Sledge 2001).

Più di recente è stata, peraltro, acquisita l'evidenza che anche basse dosi di ANT possono indurre "danni sub-clinici", consistenti in una precoce disfunzione diastolica seguita, a distanza variabile di tempo, da disfunzione sistolica asintomatica, con notevole potenzialità di tradursi nella citata e grave insufficienza cardiaca conclamata (Meinardi 2001). Questa consapevolezza ha acuito l'urgenza di poter disporre di parametri biumorali e/o strumentali, possibilmente condivisi da tutti i laboratori che vigilano sugli effetti lesivi della terapia antineoplastica, con lo scopo di riconoscerne i segni più precoci e, inoltre, di identificare il sottogruppo di pazienti a più elevata sensibilità cardiotossica.

In conclusione, a distanza di decenni dalla prima documentazione clinica della CTX da ANT, tale problema continua a rappresentare un limite di rilievo, specie nei pazienti che guariscono o che ottengono un effetto palliativo importante, nei quali la disfunzione cardiaca prefigura, oltre l'incremento di rischio cardiovascolare in prospettiva, un peggioramento permanente della qualità di vita.

Attualmente, nonostante il netto miglioramento del livello di conoscenza dei meccanismi fisiopatologici responsabili della CTX indotta da ANT, non disponiamo di un metodo codificato per riconoscerla e monitorizzarla, né di un trattamento efficace per prevenirla e curarla.

## **Obiettivo della presente ricerca**

Il nostro studio si è originato dall'ipotesi di poter fornire un contributo all'identificazione precoce del danno miocardico indotto dall'EPI mediante l'utilizzo di tecniche strumentali cardiologiche innovative, poste a confronto con metodiche convenzionali. In associazione con l'approccio ecocardiografico è stato previsto il dosaggio di markers biochimici specifici di danno miocardico, quali la TnI, nonché di markers neuromonali indicativi di disfunzione miocardica, quali il BNP, di integrità endoteliale, quali l'IL-6 ed il TNF $\alpha$  e di stress ossidativo, quali ROS e GPX. Infine, è stata studiata la relazione statistica tra i parametri strumentali ed umorali di disfunzione cardiaca e quelli con i quali lo specialista oncologo monitorizza l'efficacia e la possibile tossicità della terapia con ANT (indicatori di stress ossidativo e citochine).

Il nostro studio ha previsto, inoltre, valutazioni cardiologiche periodiche, a cadenza prestabilita (salvo complicanze in itinere), basate su visita cardiologica completa, valutazione ecocardiografica convenzionale e valutazione della funzione sistolica e diastolica ventricolare sinistra con DTI, Strain ( $\Sigma$ ) e Strain Rate (SR) imaging.

Il rispetto del timing delle valutazioni cliniche, biochimiche e strumentali è stato fondamentale per poter registrare le modificazioni elettriche e funzionali precoci, cioè sin dal primo contatto del tessuto miocardico con il chemioterapico. Le stesse sono state eseguite al tempo basale (prima dell'inizio del trattamento antineoplastico) ed al raggiungimento delle dosi cumulative di EPI (vedi materiali e metodo).

## **Materiali e metodi**

**Popolazione studiata.** Abbiamo arruolato 31 pazienti (23 donne, 8 uomini; età media [ $\pm$ DS]  $59\pm 14$  anni) affetti da tumori in diversa sede, che sarebbero stati sottoposti a terapia adiuvante con EPI in dose cumulativa massima di  $400\pm 20$  mg/m<sup>2</sup>. Le patologie neoplastiche consistevano in: 10 carcinomi della mammella, 6 carcinomi dell'endometrio, 4 carcinomi del polmone, 4 neoplasie ematologiche, 1 neoplasia delle ghiandole salivari e 6 carcinomi ovarici. Nella maggior parte dei pazienti arruolati la neoplasia era stata diagnosticata nello stadio iniziale. Specificamente, 9 erano in stadio I, 7 in stadio II, 12 in stadio III e 3 in stadio IV.

I pazienti arruolati hanno ricevuto il farmaco in regime di ricovero, ordinario o DH, della durata massima di 24 ore, con l'eccezione degli schemi chemioterapici che prevedevano infusioni prolungate per più giorni).

Sono stati adottati i seguenti criteri di esclusione: presenza di cardiopatia nota, ipertensione arteriosa, diabete mellito, una precedente esposizione ad irradiazione mediastinica, ovvero un pregresso trattamento chemioterapico, anche se con schemi non contenenti ANT.

I criteri di inclusione, a loro volta, avevano previsto *a.* un valore ecocardiografico di frazione di eiezione (FE) ventricolare  $\geq 50\%$ ; *b.* un questionario per la valutazione dello stato di validità funzionale ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) o performance status che denotasse un punteggio compreso tra 0 e 2; *c.* normali funzioni epatica (bilirubina  $\leq 1.5$  mg/dl) e renale (creatininemia  $\leq 2.0$  mg/dl); *d.* la disponibilità del paziente a proseguire i controlli di laboratorio oltre il termine del trattamento e secondo lo schema previsto dal protocollo.

**Caratteristiche cliniche dei pazienti arruolati.** Nella Tabella 1 sono riassunte le caratteristiche cliniche dei 31 pazienti, arruolati nel presente studio tra il mese di maggio 2005 ed il mese di Dicembre 2007. Il Performance status (PS) secondo ECOG era PS 0 in 20 pazienti, PS 1 in 5 pazienti e PS 2 in 6 pazienti.

**TABELLA 1.** Caratteristiche cliniche basali dei pazienti

	N°
<b>Pazienti</b>	31
<b>Sesso</b> (maschi/femmine)	8/23
<b>Età</b> , anni: media $\pm$ SD (range)	59 $\pm$ 14 (27-78)
Vivi	26
Deceduti	5
<b>Sede</b>	
Mammella	10
Endometrio	6
Linfoma non Hodgkin	4
Polmone NSCLC	4
Ovaio	6
Ghiandole salivari	1
<b>Stadio</b>	
I	9
II	7
III	12
IV	3
<b>ECOG PS</b>	
0	20
1	5
2	6

*Abbreviazioni: NSCLC, carcinoma polmonare non a piccole cellule; ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status*

**Protocollo di studio.** Il presente protocollo è stato approvato dal Comitato Etico del Policlinico Universitario di Cagliari. Tutti i pazienti lo hanno accettato con consenso

scritto, dopo essere stati dettagliatamente informati dello scopo e delle modalità con cui esso sarebbe stato espletato.

Tutti i pazienti sono stati esaminati in condizioni basali al tempo dell'arruolamento ( $t_0$ : tempo basale), prima di ricevere la somministrazione iniziale di EPI. Tutti sono stati sottoposti a visita clinica comprendente esame obiettivo, rilievo dei segni vitali (pressione arteriosa omerale, polso, temperatura), pesati e misurati in altezza.

Sono state condotte le seguenti determinazioni chimico-cliniche: emocromo con conta piastrinica, azotemia, uricemia, creatininemia, elettroliti ematici ed urinari, bilirubina diretta ed indiretta, AST, ALT,  $\gamma$ GT, fosfatasi alcalina, sideremia, ferritinemia, transferrinemia, colesterolemia (totale, HDL, LDL), trigliceridemia, marcatori tumorali (Ca 15.3, Ca 19.9, CEA, AFP, Ca 125, PSA, NSE).

I pazienti hanno poi eseguito, in ambiente tranquillo, con temperatura e grado di umidità controllati e costanti ed al quale si erano adattati per almeno 20': ECG a 12 derivazioni, ecocardiogramma M-mode, 2D e color-Doppler, studio ecocardiografico Doppler Tissutale.

## **Indagine ecocardiografica**

**Ecocardiografia standard.** E' stata eseguita una valutazione ecocardiografica completa mono- e bidimensionale e color Doppler, utilizzando un ecocardiografo Top Aplio CV, modello SSA 770A/CV (Toshiba) equipaggiato con una sonda di 2.5-MHz.

Sono stati misurati i volumi e gli spessori ventricolari ed è stata calcolata la FE utilizzando il metodo di Simpson biplano dalla proiezione apicale quattro camere e due camere. E' stato considerato anormale un valore  $\leq 50\%$ . È stata valutata la funzione diastolica (Bu'Lock 1995; Dorup 2004) registrando le velocità con il Doppler pulsato nella proiezione quattro camere apicale. Il pattern di flusso mitralico è stato misurato posizionando il volume campione tra i lembi mitralici con il PWD per misurare la velocità di picco in protodiastole (onda E), la velocità di picco della contrazione atriale (onda A) e il tempo di decelerazione. L'esame è stato eseguito sulla scorta della traccia elettrocardiografia.

**Doppler tessutale.** Il Doppler tessutale (DTI) è una modalità ecocardiografica che applica il principio Doppler (sia con onda pulsata che in modalità a codice di colori) per registrare le velocità tessutali. La frequenza del segnale di ritorno dell'analisi color Doppler del cuore permette di identificare due bande principali: quella proveniente dal movimento dei globuli rossi ad alta frequenza e di bassa ampiezza ("flusso", con velocità intorno ai 100 cm/s) e quella dovuta alle fibre miocardiche, di bassa frequenza ed alta ampiezza ("parete", con velocità intorno ai 10 cm/s ed ampiezza intorno a 40 dB). Tradizionalmente questa seconda componente è stata considerata "rumore" ed eliminata mediante un high-pass filter. Al contrario, poiché il contenuto informativo del DTI è presente nelle basse frequenze, per la sua visualizzazione è necessario utilizzare filtri attivi nella direzione di frequenza opposta.

Nella suddetta modalità, l'utilizzazione del Doppler pulsato permette di studiare la parete miocardica posizionando il volume campione all'interno dello spessore. Si

ottiene così una curva spettrale su cui è possibile misurare le velocità di picco di contrazione e di rilasciamento miocardico.

In base a questa tecnica, abbiamo valutato la funzione longitudinale del ventricolo sinistro analizzando le velocità di spostamento dell'anulus mitralico utilizzando il DTI imaging e registrando le velocità con il Doppler pulsato. Il pattern di velocità miocardica è stato misurato posizionando il volume campione nella porzione basale del setto interventricolare. Sono stati misurati la velocità di picco sistolico (onda S), la velocità di picco in protodiastole (onda E), la velocità di picco della contrazione atriale (onda A).

Lo studio ecocardiografico è stato eseguito estraendo i dati grezzi (RAW) ed effettuando un'analisi, oltre che DTI tradizionale, anche dello Strain ( $\epsilon$ ) e Strain Rate (SR).

Lo  $\epsilon$  rappresenta l'entità di deformazione della parete miocardica misurata tra due punti della parete stessa. La derivata nel tempo dello  $\epsilon$ , lo SR è una misura della velocità di deformazione regionale delle fibre miocardiche, ottenuta attraverso la stima del gradiente spaziale delle velocità (Li 2003). Lo SR ha dimostrato di rappresentare un indice non invasivo affidabile di contrattilità miocardica (Greenberg 2002). Abbiamo calcolato, quindi, sia il picco di  $\epsilon$  che di SR nella porzione basale del setto interventricolare che ci ha consentito di valutare la funzione longitudinale sistolica del ventricolo sinistro.

## **Markers biochimici**

***BNP e markers di necrosi.*** I dosaggi del BNP, quale indice di decadimento funzionale miocardico e della TnI, come marker biochimico di danno strutturale, nonché degli altri markers di necrosi miocardica (isoforma MB della Creatinfosfochinasi e Mioglobina) sono stati effettuati utilizzando test immunofluorimetrici non competitivi ad alta specificità. In dettaglio, sono stati usati, rispettivamente, i Kit Triage<sup>®</sup> BNP Test (Valori normali <100 pg/ml; sensibilità: 5-5000 pg/ml) e Triage<sup>®</sup> Cardiac Panel (Biosite Inc., San Diego, CA - USA) (Valori

normali: Mioglobina 170 ng/ml – sensibilità 5-500 ng/ml; CK-MB 10 ng/ml – sensibilità 1-80 ng/ml; TnI 0.1 ng/ml – sensibilità 0.05-30 ng/ml) con dosaggio quantitativo su misuratore di fluorescenza Triage MeterPlus (Biosite Inc., San Diego, CA - USA). I campioni di sangue, prelevati in provette in EDTA, sono stati immediatamente inviati al dosaggio, che è avvenuto in ambiente con temperatura e luminosità costanti e controllate. Al fine di diminuire la variabilità inter-osservazionale, tutte le misurazioni sono state effettuate dallo stesso operatore e nella rigida applicazione del protocollo operativo previsto dalla Ditta produttrice dei Kit.

***Citochine.*** Un ulteriore campione di sangue è stato prelevato e centrifugato; il siero ottenuto è stato conservato a -20°C fino al momento dell'estrazione. Sono stati determinati i livelli delle seguenti molecole: IL-6 e sIL-6R, IL-1, IL-8, TNF $\alpha$  e sTNF-RI, IL-2 e sIL-2R mediante metodica ELISA (enzime-linked immunosorbent assay; Immunotech, Marsiglia, Francia). I livelli sierici di IL-6, IL-1, TNF $\alpha$  e IL-8 sono stati espressi in pg/ml; i livelli sierici di sIL-6R e di sTNF-RI in ng/ml; quelli di sIL-2R in pM.

***ROS ematici e GPX e SOD eritrocitari.*** Un campione di sangue intero eparinizzato è stato utilizzato per la determinazione delle (ROS) e degli enzimi antiossidanti GPX e SOD.

I livelli ematici di ROS sono stati determinati utilizzando il FORT test. Esso prevede che le specie radicaliche prodotte durante la reazione e direttamente proporzionali alla quantità di lipoperossidi presenti nel campione analizzato, interagiscano con un additivo (derivato della fenilendiamina) formando una molecola radicalica valutabile allo spettrofotometro a 505 nm (Form CR 2000, Callegari SpA, Parma, Italia). I risultati sono stati espressi in Unità FORT, laddove 1 Unità corrisponde a 0.26 mg/l di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La GPX e la SOD intraeritrocitarie sono state misurate con un fotometro, utilizzando un kit del commercio (Ransod, Randox Lab, Crumlin, United Kingdom).

## **Questionari auto-somministrati**

Per la valutazione della qualità di vita (Qol) abbiamo applicato il questionario SF-12. Il questionario SF-12 è la versione breve del questionario SF-36. Attraverso 12 delle 36 domande del questionario originale permette di indagare, anziché le 8 scale originali, solo i due indici sintetici, PCS Physical Component Summary per lo Stato Fisico e MCS Mental Component Summary per lo Stato mentale. I punti di maggior forza di tale questionario, anch'esso consigliabile per auto somministrazione, sono la brevità e la relativa facilità d'uso. In Italia il questionario è stato utilizzato tra l'altro nel 2000 in una indagine ISTAT multiscopo sullo stato di salute degli italiani ed è disponibile una banca dati di riferimento con i risultati ottenuti su un campione di 61.434 soggetti rappresentativi della popolazione italiana. Anche per questa forma breve la letteratura è ricca di esperienze e studi che ne dimostrano la validità e l'affidabilità.

## **Timing dello studio**

Al termine della valutazione basale d'ingresso, i pazienti sono stati trattati con dosi cumulative di EPI. Tutti sono stati riesaminati a distanza di 24 ore e di una settimana dalla somministrazione di dosi cumulative del farmaco di 100, 200, 300 e 400 ± 20 mg/m<sup>2</sup>, rispettivamente t<sub>1</sub>, t<sub>2</sub>, t<sub>3</sub>, t<sub>4</sub>. Infine i pazienti sono stati rivalutati al follow up (FU) sino a 18 mesi dopo il termine della terapia.

riassuntivamente, le sessioni di studio sono state ripetute in corso o a seguito della terapia, con la seguente frequenza:

- dopo 24 ore dalla somministrazione del chemioterapico con ripetizione di esame obiettivo, esami cardiologici strumentali, dosaggio di T, CK-MB, BNP, ROS e GPX, esami chimico-clinici, somministrazione dei questionari;
- dopo 7 giorni da detta somministrazione (esame obiettivo, esami cardiologici strumentali, somministrazione di questionari);

- a 1, 6, 12 e 18 mesi dal termine del trattamento chemioterapico (esame obiettivo, esami cardiologici strumentali, dosaggio di T, CK-MB, BNP, ROS e GPX, esami chimico-clinici, somministrazione dei questionari).

***Analisi statistica.*** I risultati dei parametri esaminati sono stati riportati come medie  $\pm$  DS. Le differenze tra i dati ottenuti precocemente, a quarantotto ore e dopo una settimana da ogni trattamento sono state valutate utilizzando il test di Student a due code per dati appaiati (o test di Wilcoxon per ranghi se necessario). Il coefficiente di Pearson è stato usato per valutare la correlazioni tra la variazione dei parametri ecocardiografici e i markers biochimici e bioumorali. La differenza è stata considerata significativa se  $p < 0.05$ .

## **Risultati**

Tutti i pazienti hanno assunto la dose cumulativa massima prevista. Questa consisteva in 400 mg/m<sup>2</sup> per 18 di loro e in 300 mg/m<sup>2</sup> per i restanti. Cinque pazienti sono deceduti 6 mesi dopo il completamento del trattamento, per loro previsto in dose cumulativa di 300 mg/m<sup>2</sup>, per grave scadimento delle condizioni generali e progressione di malattia.

La terapia antitumorale è stata complessivamente ben tollerata dai pazienti esaminati. Tuttavia, in coincidenza con il raggiungimento delle dosi cumulative più elevate di EPI (t<sub>3</sub> e t<sub>4</sub>), 4 di loro hanno presentato neutropenia di III-IV grado, che ha richiesto la somministrazione di fattori di crescita leucocitari e la posticipazione di alcune settimane del ciclo chemioterapico successivo. Una paziente affetta da neoplasia dell'endometrio è stata colpita, al tempo t<sub>4</sub>, da embolia polmonare massiva, tempestivamente trattata con terapia anticoagulante per via endovenosa.

Il monitoraggio elettrocardiografico ha mostrato ECG nella norma in 19 pazienti lungo tutto il periodo di trattamento e nel follow-up mentre in 12 pazienti sono state riscontrate alterazioni aspecifiche della fase di ripolarizzazione ventricolare in fasi successive a t<sub>3</sub>.

## **Indagine ecocardiografica**

**Ecocardiografia convenzionale.** Durante il trattamento chemioterapico con EPI abbiamo osservato, rispetto ai valori basali, modificazioni della funzione diastolica del ventricolo sinistro in termini di riduzione del rapporto E/A misurato con PWD del flusso transmitralico. Tale differenza si è resa significativa una settimana dopo t<sub>3</sub> (0.92±0.05 vs 1.13±0.14; p<0.005; Tabella 2). D'altra parte, non è stata messa in evidenza alcuna variazione significativa della FE nei controlli eseguiti precocemente durante le varie fasi del trattamento (una settimana dopo t<sub>2</sub> 68%±6%, una settimana dopo t<sub>3</sub> 66%±5%, una settimana dopo t<sub>4</sub> 66%±5%) rispetto al valore registrato nell'esame eseguito a t<sub>0</sub> (66%±5%; Tabella 2). Non sono state messe in rilievo

variazioni significative della FE neppure in occasione dei controlli di FU, fino ai 18 mesi ( $69\% \pm 4\%$ ; Tabella 2).

**Doppler tessutale.** Al DTI abbiamo osservato cambiamenti statisticamente significativi nella funzione diastolica del ventricolo sinistro già una settimana dopo  $t_2$ , rappresentati dalla riduzione del rapporto Em/Am misurato con tecnica TDI nella porzione basale del SIV ( $0.81 \pm 0.35$  vs  $1.10 \pm 0.25$ ,  $p < 0.05$ ; Tabella 2). Tale riduzione si è conservata, sempre in grado significativo, nei successivi controlli (una settimana dopo  $t_3$   $0.72 \pm 0.30$ ,  $p < 0.05$ , una settimana dopo  $t_4$   $0.75 \pm 0.32$ ,  $p < 0.05$ ) sino al FU a 6 mesi ( $0.88 \pm 0.08$  vs  $1.13 \pm 0.26$ ,  $p < 0.05$ ), per poi migliorare lievemente nei successivi controlli al FU (Tabella 2).

Il picco dell'onda Sm ha manifestato una lenta e progressiva riduzione, divenuta significativa rispetto al basale solo tardivamente, all'epoca del controllo eseguito a 18 mesi dalla fine dei cicli di chemioterapia ( $6.18 \pm 0.56$  vs  $7.15 \pm 0.65$ ,  $p < 0.05$ ; Tabella 2)

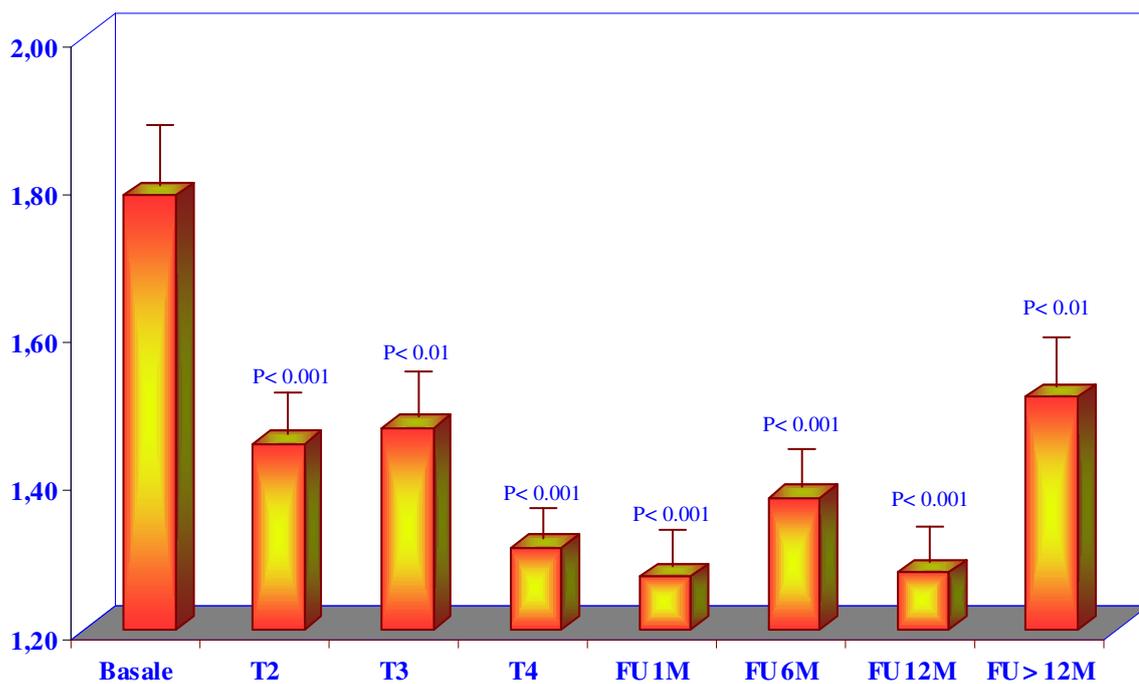
Dall'analisi dei dati grezzi è stata, inoltre, evidenziata una assai precoce riduzione del valore di picco di SR, significativa 1 settimana dopo il raggiungimento della dose  $t_2$  ( $1.45 \pm 0.15$  s<sup>-1</sup> vs  $1.78 \pm 0.06$  s<sup>-1</sup>;  $p < 0.001$ ; Figura 7). Tale riduzione si è mantenuta significativa nei successivi controlli, ad 1 settimana dopo  $t_3$  ( $1.47 \pm 0.09$ ,  $p < 0.001$ ), ad 1 settimana dopo  $t_4$  ( $1.31 \pm 0.04$ ,  $p < 0.001$ ), nonché nell'occasione di tutti i controlli al follow up, fino ai 18 mesi ( $1.54 \pm 0.05$  vs  $1.78 \pm 0.06$ ,  $p = 0.001$ ; Figura 7).

Viceversa, per quanto attiene lo  $\epsilon$ , nessuna variazione significativa è stata messa in evidenza nei controlli eseguiti precocemente, durante la fase di trattamento (1 settimana dopo  $t_2$ ,  $20,75 \pm 12,4$ ; 1 settimana dopo  $t_3$ ,  $18 \pm 6,8$ , 1 settimana dopo  $t_4$ ,  $21,05 \pm 6,44$ ) rispetto al valore registrato nell'esame eseguito a  $t_0$  ( $20,89 \pm 4,13$ ; Figura 8). Egualmente, nessuna variazione significativa dello  $\epsilon$  è risultata in occasione dei controlli al FU, fino ai 18 mesi ( $17,5 \pm 9,3$ ,  $p = 0,07$ ; Figura 8).

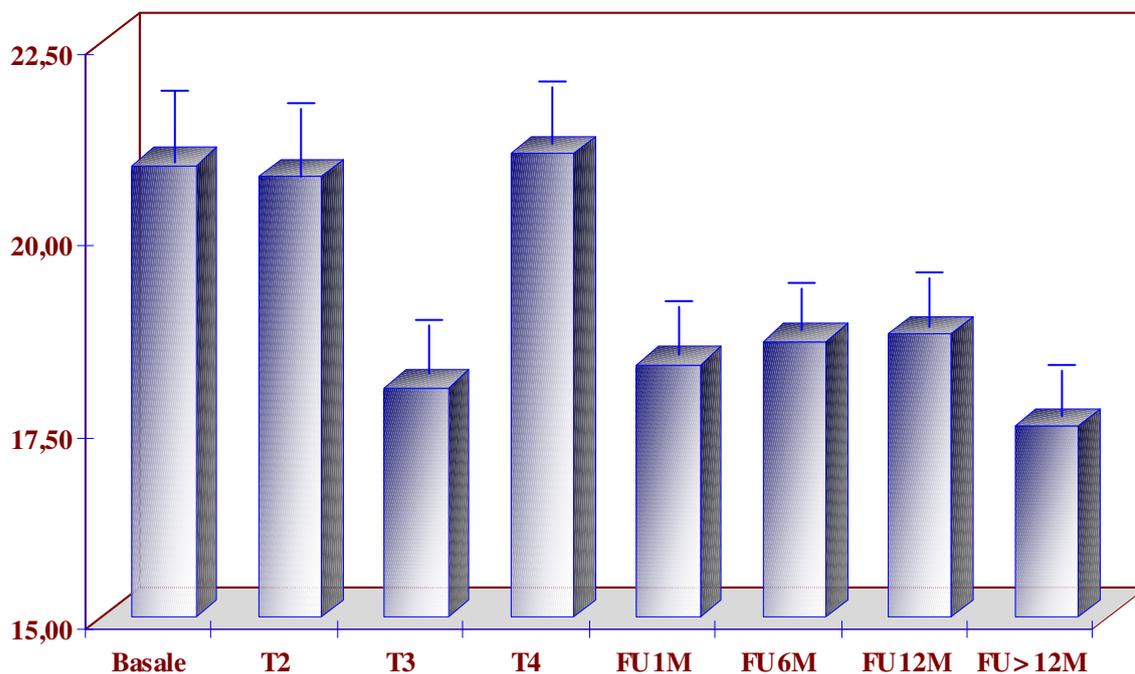
**BNP ed enzimi di necrosi.** I dosaggi di BNP, TnI, CK-MB e Myo sono risultati sempre compresi nell'ambito del range di normalità e non hanno mostrato differenze

statisticamente significative tra le medie delle rilevazioni seriate effettuate in concomitanza con ciascuna somministrazione di dosi crescenti di EPI.

**Figura 7.** Variazione nel tempo del picco dello SR

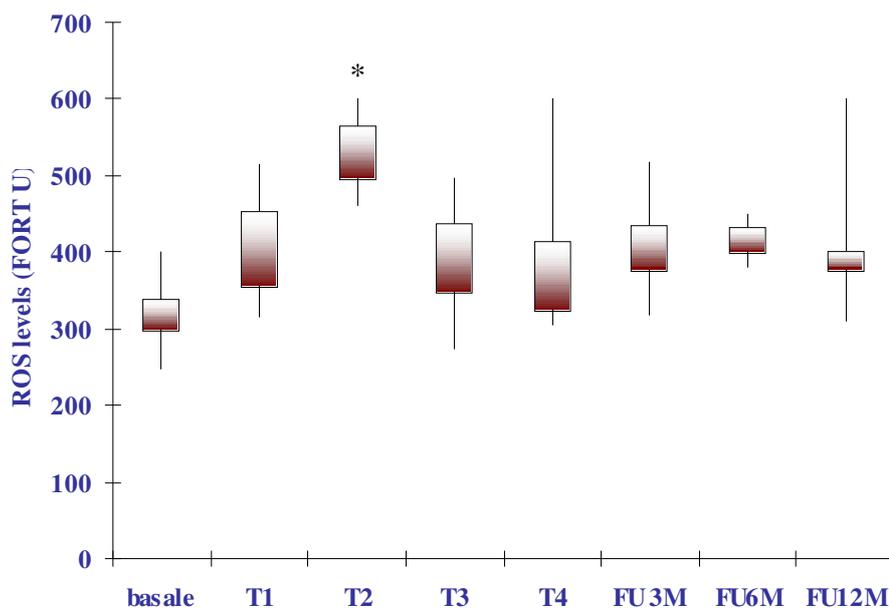


**Figura 8** Variazione nel tempo del picco dello  $\epsilon$



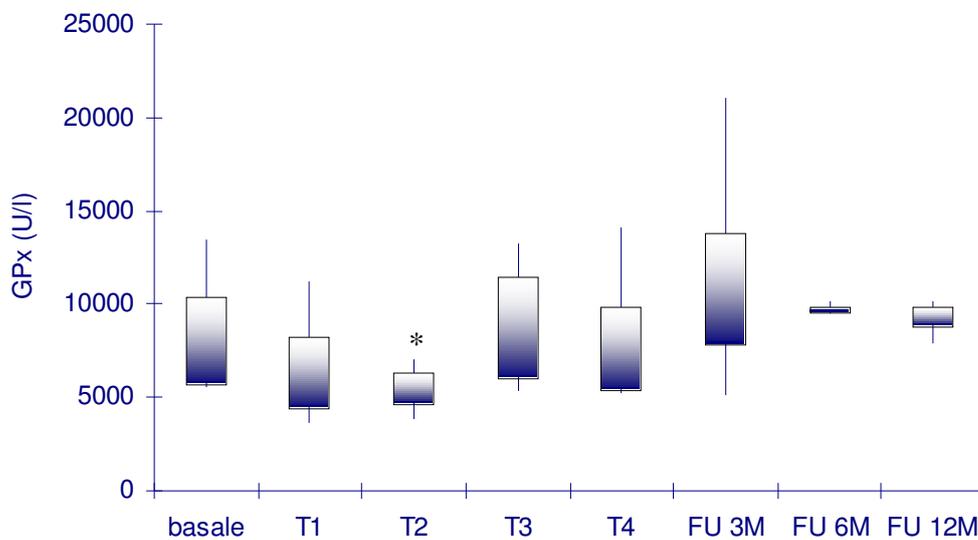
settimana dalla somministrazione della dose cumulativa di 200 mg/m<sup>2</sup>, rispetto ai valori basali (p<0.0001; Figura 9). Nel corso del FU è stata messa in evidenza una lenta riduzione dei ROS, i cui valori, tuttavia, non sono ritornati ai valori basali (413±110 vs 358,9±100,6; NS)

**Figura 9** Livelli ematici delle ROS durante il trattamento: incremento significativo al tempo t<sub>2</sub> (p< 0.0001)



I livelli di GPX sono diminuiti significativamente ( $p < 0.0001$ ; Figura 10) in corrispondenza del controllo eseguito 1 una settimana da  $t_2$ .

**Figura 10.** Livelli eritrocitari di GPX durante il trattamento: incremento significativo al tempo  $t_2$  ( $p < 0.0001$ )



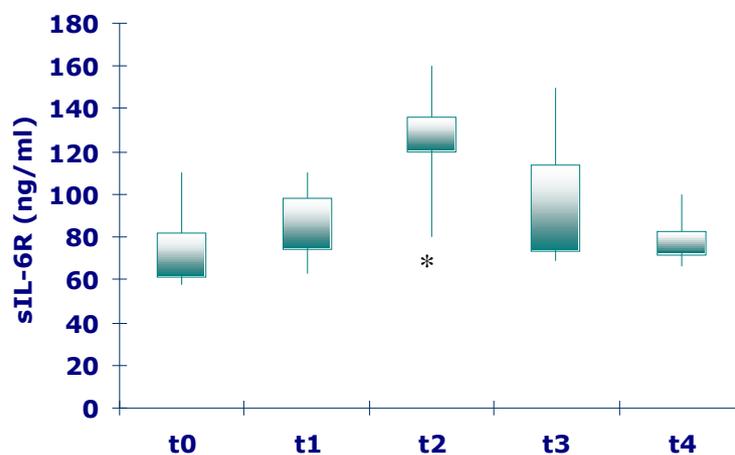
Questi ultimi hanno mostrato un progressivo e significativo aumento al FU rispetto al picco minimo del controllo a  $t_2$  ( $9197 \pm 1147$  vs  $5431 \pm 2317$ ,  $p < 0,05$ ; Tabella 3) legato ad un probabile effetto “rebound” conseguente all’interruzione del trattamento con ANT.

I livelli di SOD si sono ridotti in maniera non statisticamente significativa.

**Livelli sierici di citochine.** L'analisi delle citochine ha dimostrato in corrispondenza di una settimana da  $t_2$ , un aumento significativo dei livelli sierici di sIL-6 ( $10 \pm 4,9$  vs  $83,7 \pm 20,4$ ;  $p < 0,05$ ) ritornati alla normalità nel FU (Tabella 3), e del suo recettore (Figura 11).

Abbiamo inoltre messo in evidenza un aumento dei livelli sierici di  $\text{TNF-}\alpha$ , sTNF-RI, sIL-2R e IL-8 ma non in maniera statisticamente significativa rispetto ai valori basali.

**Figura 11.** Livelli del recettore dell' Interleuchina 6 durante il trattamento: incremento significativo al tempo  $t_2$  ( $p=0.0259$ )



## Discussione

Questo studio è stato condotto su pazienti di entrambi i sessi, portatori di neoplasie maligne localizzate in sedi diverse, definite con diagnosi istologica e, nella maggioranza dei casi, non ancora evolute oltre lo stadio iniziale.

I pazienti arruolati sono risultati esenti da cardiopatia in atto e immuni da fattori di rischio cardiovascolare e sono stati selezionati per intraprendere un trattamento chemioterapico che contemplava l'utilizzo di EPI.

Il protocollo di studio ha previsto, oltre una dettagliata indagine cardiologica clinica e strumentale convenzionale, l'utilizzo del DTI, un metodo ultrasonografico di misurazione della wall motion-velocity per la quantificazione della dinamica del ciclo cardiaco. Sono, inoltre, state compiute indagini di laboratorio indirizzate a valutare l'integrità miocardica funzionale (BNP) e strutturale (TnI, CK-MB e Myo), nonché il grado dell'attivazione infiammatoria (TNF $\alpha$ , sTNF- $\alpha$  I e II, IL-6 ed sRIL6R, IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-2, sIL-2R) e dei livelli dei ROS e delle difese antiossidanti (SOD e GPX).

I risultati ottenuti hanno dimostrato la presenza di una alterazione della funzione ventricolare sinistra, verosimilmente da ricondurre alla somministrazione in atto di ANT. Tali modificazioni, il cui significato fisiopatologico l'esperienza futura ci aiuterà ad interpretare a fondo, si sono prodotte in tempi imprevedibilmente precoci, in quanto già evidenti all'epoca di t<sub>2</sub>. Tale riscontro rappresenta la descrizione più anticipata, al momento disponibile, di un'interferenza prodotta dall'EPI, il potente chemioterapico utilizzato come presidio ad ampio raggio verso le neoplasie maligne. Inoltre queste alterazioni si sono mantenute durante tutto il FU confermandosi e rafforzandosi con la comparsa tardiva di una significativa alterazione di un ulteriore parametro di funzione sistolica (l'onda Sm).

In maggior dettaglio, lo studio ha rivelato che: *a.* un parametro DTI di funzione ventricolare sinistra, quale l'Em/Am, si è ridotto in coincidenza con t<sub>2</sub> (dosi di EPI pari a 200 $\pm$ 20 mg/m<sup>2</sup>). A quel tempo, i parametri dell'ecocardiogramma color

Doppler permanevano immutati rispetto a  $t_0$ . Contemporaneamente, è stata osservata una riduzione significativa del picco di SR; *b.* le manifestazioni più precoci di alterata funzione documentabili con ecocardiografia convenzionale hanno riguardato il ciclo diastolico e si sono manifestate al tempo  $t_3$ , in termini di riduzione di E/A. Esse si sono accompagnate ad equivalenti anomalie diastoliche del DTI, consistenti nella significativa riduzione dell'onda  $E_m$  più tardivamente al tempo  $t_4$ . All'epoca, la FE permaneva inalterata rispetto al controllo di pre-trattamento; *c.* non sono state osservate modificazioni dei livelli circolanti di BNP e TnI, in confronto con i rispettivi valori di base, in coincidenza con le evidenziate anomalie strumentali di funzione miocardica; *d.* le modificazioni ecografiche cardiologiche si sono, viceversa, accompagnate con un aumento significativo dei livelli sierici di IL-6 e dei livelli di ROS e con una diminuzione, altrettanto significativa, delle concentrazioni di GPX rispetto ai valori basali; *e.* tali parametri di funzione sisto-diastolica sono rimasti significativamente alterati per tutto il follow up sino ai 18 mesi con la comparsa solo tardivamente di una significativa riduzione di un parametro di funzione sistolica meno sensibile come l'onda  $S_m$  tale da suggerire una progressione del danno.

## **Le ANT nella terapia antitumorale**

Le ANT rappresentano i farmaci antitumorali più efficaci fino ad oggi disponibili. Il loro utilizzo in chemioterapia ha notevolmente modificato la prognosi e la sopravvivenza del malato neoplastico. L'aspetto principale della loro validità terapeutica consiste nell'ampissimo spettro di attività ed efficacia. Infatti, le ANT risultano gli agenti chemioterapici con il maggior numero di indicazioni cliniche, essendo largamente utilizzabili nel trattamento dei tumori solidi - particolarmente attive sul carcinoma mammario, ovarico ed epatico, sul microcitoma polmonare e sui sarcomi, ma anche nella cura dei tumori ematologici, quali la malattia di Hodgkin e le leucemie acute (Hitchcock 1986; Bonadonna 1995). Le ANT hanno consentito il raggiungimento di risultati soddisfacenti in termini di regressione della malattia e, in molteplici casi, anche di guarigione completa (Bonadonna 1995).

## **Cardiotossicità da ANT**

Nonostante le qualità descritte delle ANT, non si possono trascurare le complicanze a lungo termine correlate al loro uso. La cardiomiopatia possibilmente indotta da queste ultime determina nel ventricolo sinistro alterazioni strutturali e funzionali simili a quelle riscontrabili nella cardiomiopatia dilatativa idiopatica. Tuttavia, la mortalità dei pazienti affetti da insufficienza cardiaca (classe NYHA III-IV) conseguente a cardiomiopatia da chemioterapici è marcatamente precoce rispetto a quella dovuta ad insufficienza cardiaca nella forma idiopatica.

La metanalisi di più studi retrospettivi aggregati ha dimostrato che il 15% dei pazienti trattati con ANT presenta una riduzione media del 25% della FE ventricolare sinistra entro un mese dal termine della chemioterapia e che fino all'11% di questi soggetti sviluppa poi un'insufficienza cardiaca franca (Meinardi 2000).

L'eziopatogenesi della CTX indotta da ANT si identifica sostanzialmente con il meccanismo d'azione antineoplastico di questi farmaci e già dopo poche ore dal primo contatto con il farmaco è possibile riscontrare danno cellulare con perdita di miofibrille, dilatazione sarcoplasmatica, vacuolizzazione citoplasmatica, riduzione dei mitocondri ed incremento dei lisosomi (Bristow 1978; Unverferth 1983; Akao 2003).

Nonostante queste evidenze, tuttora non si conosce con certezza l'esatto meccanismo del grave danno funzionale del miocardiocita indotto dalle ANT, anche se molti degli studi sperimentali eseguiti in proposito riconoscono un ruolo chiave, in tal senso, svolto dai radicali liberi che si generano dalle reazioni di questi farmaci con i normali costituenti cellulari umani. Le ANT ostacolano infatti la catena mitocondriale di trasporto degli elettroni e ciò potrebbe spiegare la tendenza del miocardio all'intossicazione da parte delle ANT.

Il cuore è un organo ricco di mitocondri e difficilmente può adattarsi a contrastare il danno ossidativo dei radicali liberi, data la sua carenza di enzimi antiossidanti.

L'apoptosi sembra dunque essere il meccanismo principale dello sviluppo della cardiomiopatia e dell'insufficienza cardiaca causate dal chemioterapico.

### **Gestione convenzionale della CTX da ANT**

L'American College of Cardiology e l'American Heart Association suggeriscono, per il monitoraggio della CTX chemio-indotta l'integrazione di strategie convenzionali (quali ECG a 12 derivazioni, FE del ventricolo sinistro misurata con ecocardiogramma o con radionuclide) e strategie innovative, quali la variabilità della frequenza cardiaca (HRV), il dosaggio dei markers biochimici specifici di danno cardiaco e dei markers neuroormonali di disfunzione cardiaca.

***BNP, indici di necrosi e CTX da ANT.*** Le concentrazioni del BNP, un sensibile marcatore ormonale di disfunzione ventricolare sistolica e diastolica (Yamamoto 1996), risultano strettamente correlate alla gravità dei segni e dei sintomi dell'insufficienza cardiaca (Maeda 1998; Sagnella 1998).

Alcuni studi hanno dosato questi peptidi nei pazienti in trattamento con ANT, correlandoli specialmente con gli indici di funzione sistolica e diastolica (Nousiainen 1999; Elbl 2006). Suzuki et coll. hanno riscontrato variazioni significative dei livelli di BNP durante e dopo chemioterapia ad alte dosi (Suzuki 1998). In un recente studio prospettico, è stato dimostrato che, durante l'evoluzione della disfunzione ventricolare sinistra indotta da ANT, la secrezione di BNP è correlata con la disfunzione diastolica più che con la quella sistolica (Nousiainen 2002).

La TnI, la CK-MB e la Myo sono i marcatori di danno miocardico impiegati nell'individuazione di insulti a carico del muscolo cardiaco (Lindahl 1995; Kost 1998). Anche la TnI è stata dosata in precedenti studi per stratificare il rischio di sviluppare una disfunzione ventricolare sinistra a distanza nei pazienti trattati con alte dosi di ANT (Cardinale 2004)

Nel presente studio, abbiamo dosato a tutti i tempi d'indagine le concentrazioni circolanti del BNP e degli enzimi di necrosi miocardica, sulla base delle evidenze riportate e nella convinzione che l'alterazione della permeabilità, nonché un certo grado di lesione del miocardiocita, con immissione in circolo di molecole altrimenti assenti o presenti solo in tracce, potessero rappresentare la tappa finale del danno cellulare, indipendentemente dalla natura della noxa in causa e, dunque, possibilmente in grado di denotare la presenza di lesioni a carico del muscolo cardiaco indotte dal trattamento con EPI.

I dati riscontrati non hanno dimostrato variazioni apprezzabili di tali marker, almeno sino al tempo fin qui completato di monitoraggio dei pazienti in terapia antineoplastica. Da queste evidenze e dal loro confronto con le non molte esperienze riferite in letteratura possiamo concludere che: *a.* un trattamento con EPI a basse dosi, in soggetti in buone condizioni generali e senza patologia cardiaca in atto non determina alterazione dell'integrità cellulare e neppure evidenze di importante rimodellamento cardiaco che BNP ed enzimi di necrosi possano rivelare; *b.* l'utilizzo di tali marker non consente il monitoraggio precoce della CTX da ANT a basse dosi e, comunque, non ha utilità confrontabile con quella di metodiche strumentali ecografiche avanzate quali quelle utilizzate in questo studio. Non è escluso che i parametri umorali qui considerati abbiano ad alterarsi nel proseguimento del follow-up dei nostri pazienti; ma è evidente che una loro patologica modificazione a tale distanza di tempo dalla sospensione del ciclo chemioterapico potrebbe significare non più solo un effetto della CTX del farmaco, quanto un deterioramento della funzione d'organo, ormai autonomo ed indirizzato ad un quadro clinico di cardiomiopatia dilatativa con insufficienza cardiaca clinicamente manifesta.

***Marker di infiammazione e di potenza ossido-riduttiva.*** Dati desunti dallo studio delle basi biochimiche dell'insufficienza cardiaca, sperimentale ed umana, rivelano una stretta connessione, temporale ed anche causale tra l'aumento dell'apoptosi del cardiomiocita e l'incremento dei livelli plasmatici di proteine di origine cellulare, quali la citochina infiammatoria TNF $\alpha$ , i suoi recettori, sRTNF- $\alpha$  di tipo I e II, il

recettore Fas ed il suo ligando (Torre-Amione 1996). Il TNF $\alpha$ , in particolare, in grado di esercitare un'azione inotropica negativa a livello cardiaco, ricopre un ruolo fondamentale nella patogenesi della cardiomiopatia dilatativa (Sato 2005).

Recentemente è stato dimostrato che l'esposizione dei miocardiociti di ratto a differenti concentrazioni di TNF $\alpha$  può determinare una significativa riduzione della sintesi di SOD e di catalasi, una riduzione della GPX, un incremento dello stress ossidativo, un fenomeno di lipo-perossidazione ed un danno cellulare confermato dal rilascio della CPK (Kaur 2006).

Altre citochine si sono dimostrate responsabili di danno cardiaco, in associazione con il TNF $\alpha$ . Pertanto, anche i livelli di IL-6 e di sRIL-6R sono risultati significativamente incrementati nel siero di pazienti affetti da cardiomiopatia dilatativa idiopatica, nonché correlati con la gravità della disfunzione ventricolare (Hogye 2004).

I livelli di IL-6 e di sRIL-6R nei nostri pazienti si sono dimostrati precocemente incrementati ed associati ai livelli di ROS, anche loro aumentati sensibilmente a distanza di 1 settimana dalla dose cumulativa somministrata a  $t_2$ , in stretta coincidenza con i riscontri DTI e SR.

Considerando che i pazienti arruolati in questo studio presentavano una malattia neoplastica mediamente non evoluta e clinicamente stabile e che essi erano esenti da patologia cardiovascolare, possiamo argomentare che le modificazioni dei livelli sierici delle citochine, delle specie reattive dell'ossigeno e delle difese antiossidanti, nel loro insieme, debbano essere ricondotte in modo diretto al trattamento chemioterapico.

Inoltre abbiamo osservato che al FU i livelli dei ROS si sono ridotti lentamente senza però ritornare mai ai valori basali e le difese antiossidanti (GPX) hanno mostrato un progressivo aumento legato ad un probabile effetto "rebound" conseguente all'interruzione del trattamento con ANT.

I risultati possono essere così commentati: *a.* in sintonia con la crescente evidenza presente in letteratura, i marker dell'infiammazione, così come la misura delle ROS e

degli enzimi antiossidanti, risultano parametri specifici e sensibili di sofferenza miocardiocitica (che dimostra una certa persistenza anche all'interruzione del trattamento); *b.* la loro affidabilità è comparabile con quella degli indici ecocardiografici avanzati che il cardiologo oggi utilizza per apprezzare i gradi minimi di disfunzione ventricolare, anche a livello preclinico (Drimal 2006); *c.* se l'utilità di tali marker verrà confermata e si dimostrerà conservata anche in periodi lunghi di osservazione, si potrà disporre di uno strumento utile e versatile nella tipizzazione dei pazienti, per la loro tolleranza alle ANT e la personalizzazione della dose cumulativa del farmaco.

***L'ecocardiografia DTI.*** In considerazione della sempre maggiore rilevanza assunta dall'ecocardiografia con tecnica DTI nella valutazione della disfunzione cardiaca applicata alla cardiopatia ischemica, abbiamo progettato di impiegare tale tecnica nello studio delle alterazioni miocardiche in corso o subito dopo trattamento chemioterapico, cercando spunti favorevoli ad un approccio innovativo alla valutazione della CTX, quando questa sia ancora in fase pre-clinica.

Alcuni autori avevano evidenziato, in corso di trattamento con ANT, alterazioni significative di alcuni indici di funzione diastolica (rapporto E/A ed IVRT) più precoci nel comparire di quelli sistolici (Dorup 2004; Tassan Mangina 2006). Più recentemente Ganame e coll hanno messo in evidenza come anche in pazienti trattati con basse dosi di ANT siano evidenti alterazioni della funzione sistolica valutabili con lo SR anche a cinque anni di distanza dall'interruzione del trattamento (Ganame 2007).

Anche nel nostro studio è stata messa in evidenza, oltre la precoce alterazione del picco di SR dopo trattamento con EPI, la persistenza di tali alterazioni a distanza, evidenziate anche a 18 mesi dall'interruzione del trattamento. Questo dato è stato rafforzato dalla comparsa tardiva di una significativa riduzione anche dell'onda Sm al TDI evidenziano una lenta probabile progressione del danno miocardico.

Le risultanze ottenute rispondono in modo positivo all'ipotesi di lavoro dello studio e si dimostrano promettenti per la sua prosecuzione e per ulteriori approfondimenti. L'interpretazione dei dati presentati suggerisce le seguenti considerazioni: *a.* il DTI e le sue applicazioni si sono dimostrate utili nel riconoscimento precoce dei segni di CTX da ANT, un problema attuale e assai grave perché condiziona l'utilizzo di una classe di farmaci di prima linea nella terapia delle neoplasie maligne, ma limitata dalla sua tossicità, in alcuni casi anche a dosaggi relativamente bassi; *b.* l'utilizzo esteso della metodica DTI potrebbe guidare le scelte terapeutiche in ogni singolo paziente, dopo averne apprezzata sensibilità e/o intolleranza individuale; *c.* il monitoraggio dei pazienti attraverso i parametri utilizzati in questo studio o con altri, sempre afferenti a metodiche di DTI, potranno sorvegliare nel tempo i pazienti, anche dopo la sospensione del ciclo chemioterapico, segnalando l'eventuale passaggio ad una fase cronica di insufficienza cardiaca globale, con ciò accelerando i tempi di una terapia adeguata; *d.* l'integrazione dei parametri DTI con quelli umorali nella valutazione e gestione dei pazienti in terapia con ANT potrebbe dimostrare la sua possibile utilità pratica in seguito alla raccolta di un maggior numero di dati, proseguita in tempi più lunghi.

***Limiti e prospettive future dello studio.*** Una limitazione dei risultati presentati è certamente rappresentata dalla ancora ridotta numerosità del campione esaminato. Non ci sembra, viceversa, un limite la riproduzione dei dati strumentali e di laboratorio da noi ottenuti, per la vasta e crescente disponibilità degli uni e degli altri presso i Centri cardiologici e nei Laboratori oncologici specializzati annessi alle Unità internistiche.

Più rilevante appare la possibilità di utilizzare le tecniche qui adottate in una prospettiva di protezione futura dei pazienti dalla CTX da ANT, alla quale ancora si guarda con una certa rassegnazione, come ad una conseguenza inevitabile del trattamento antineoplastico, nonostante i recenti progressi riportati in letteratura inerenti la possibilità di prevenire tale danno mediante la somministrazione di

farmaci già noti per la loro capacità di indurre protezione d'organo in altre patologie cardiache (Kalay 2006).

Alla luce dei risultati ottenuti, nutriamo la speranza di poter proporre una metodologia in futuro codificabile per riconoscere i segni premonitori o precoci di CTX e per poterli monitorizzare. Inoltre, migliorando il livello di conoscenza dei meccanismi fisiopatologici responsabili della CTX indotta da ANT, potremmo ipotizzare un trattamento efficace per prevenirla o contenerla, superando il paradosso in base al quale pazienti che guariscono o che ottengono un effetto palliativo importante, vadano incontro a disfunzione cardiaca e ad un peggioramento della qualità di vita, inaccettabile per chi sopravvive al cancro.

## **Bibliografia**

Aggarwal S, Pettersen MD, Bhambhani K, Gurczynski J, Thomas R, L'ecuyer T. B-type natriuretic peptide as a marker for cardiac dysfunction in anthracycline-treated children. *Pediatr Blood Cancer*. 2006 Dec 14 [Epub ahead of print]

Akao M, O'Rourke B, Teshima Y, Seharaseyon J. Mechanistically distinct steps in the mitochondrial death pathway triggered by oxidative stress in cardiac myocytes. *Circ Res* 2003; 92: 186-194

Bu'Lock FA, Mott MG, Oakhill A, Martin RP. Left ventricular diastolic function after anthracycline chemotherapy in childhood: relation with systolic function, symptoms, and pathophysiology. *Br Heart J* 1995;73:340-50

Bonadonna G, Zambetti M, Valagussa P. Sequential or alternating doxorubicin and CMF regimens in breast cancer with more than three positive nodes. Ten-year results. *JAMA* 1995; 273: 542-7

Bonow RO. New insights into the cardiac natriuretic peptides. *Circulation* 1996;93:1946-50

Braunwald E, Zipes D.P., Libby P. *Malattie Neoplastiche ematologiche e malattia cardiovascolare in Heart Disease*, 6° edizione. Elsevier 2005

Bristow MR, Mason J, Billingham M and Daniels J. Doxorubicin cardiomyopathy. Evaluation by phonocardiography, endomyocardial biopsy, and cardiac catheterization. *Ann Intern Med* 1978; 88: 168

Cardinale D, Sandri MT, Colombo A, Colombo N, Boeri M, Lamantia G et al. Prognostic value of troponin I in cardiac risk stratification of cancer patients undergoing high-dose chemotherapy. *Circulation* 2004; 109(22):2749-2754

Doroshov JH, Locker GY, and Myers CE Enzymatic defences of the mouse heart against reactive oxygen metabolites. *J Clin Investig* 1980;65: 128-135

Dorup I, Levitt G, Sullivan I, Sorensen K. Prospective longitudinal assessment of late anthracycline cardiotoxicity after childhood cancer: the role of diastolic function. *Heart* 2004;90:1214-6

Drimal J, Zurova-Nedelcevova J, Knezl V, Sotnikova R, Navarova J. Cardiovascular toxicity of the first line cancer chemotherapeutic agents: doxorubicin, cyclophosphamide, streptozotocin and bevacizumab. *Neuro Endocrinol Lett.* 2006;27 Suppl 2:176-9.

Elbl L, Vasova I, Navratil M, Vorlicek J, Malaskova L, Spinar J. Comparison of plasmatic levels of B-natriuretic peptide with echocardiographic indicators of left ventricle function after doxorubicin therapy. *Vnitr Lek.* 2006 Jun;52(6):563-70

Elliott P. Pathogenesis of cardiotoxicity induced by anthracyclines. *Semin Oncol.* 2006;33(3 Suppl 8):S2-7.

Ganame J, Claus P, Uyttebroeck A, Renard M, D'hooge J, Bijmens B, Sutherland GR, Eyskens B, Mertens L. Myocardial Dysfunction Late After Low-Dose Anthracycline Treatment in Asymptomatic Pediatric Patients. *J Am Soc Echocardiogr.* 2007; [Epub ahead of print]

Gennari A, Salvadori B, Donati S, Bengala C, Orlandini C, Danesi R, Del Tacca M, Bruzzi P, Conte PF. Cardiotoxicity of Epirubicin/Paclitaxel containing regimens. Role of cardiac risk factors. *J Clin Oncol* 1999;17: 3596-3602.

Gille L and Nohl H. Analyses of the molecular mechanism of adriamycin-induced cardiotoxicity. *Free Radic Biol Med* 1997;23: 775-782

Greenberg NL, Firstenberg MS, Castro PL, Main M, Travaglini A, Odabashian JA, Drinko JK, Rodriguez LL, Thomas JD, Garcia MJ. Doppler-derived myocardial systolic strain rate is a strong index of left ventricular contractility. *Circulation.* 2002;105:99-105

Hitchcock Bryan S, Gelber R, Cassady JR, Sallan SE. The impact of induction anthracycline on long-term failure-free survival in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol* 1986;14: 211-5.

Hogye M, Mandi Y, Csanady M, Sepp R, Buzas K. Comparison of circulating levels of interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in hypertrophic cardiomyopathy and in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 2004;94:249-51

Kalay N, Basar E, Ozdogru I, Er O, Cetinkaya Y, Dogan A, Inanc T, Oguzhan A, Eryol NK, Topsakal R, Ergin A. Protective effects of carvedilol against anthracycline-induced cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48:2258-62

Kaur K, Sharma AK, Dhingra S, Singal PK. Interplay of TNF  $\alpha$  and IL-10 in regulating oxidative stress in isolated adult cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2006;Oct 10: pub ahead of print

Kiyomiya K, Matsuo S, and Kurebe M. Mechanism of specific nuclear transport of adriamycin: the mode of nuclear translocation of adriamycin-proteasome complex. *Cancer Res* 2001;61: 2467-2471

Kost GK, Kirk JD, Omand K. A strategy for the use of cardiac injury markers (troponin I and T, creatine kinase-MB Mass and isoforms and myoglobin) in the diagnosis of acute myocardial infarction. *Arc Pathology Laboratory Medicine* 1998; 122

Jones RL, Swanton C, Ewer MS. Anthracycline cardiotoxicity. *Expert Opin Drug Saf*. 2006;5:791-809

Li X, Jones M, Wang HF, Davies CH, Swanson JC, Hashimoto I, Rusk RA, Schindera ST, Barber BJ, Sahn DJ. Strain rate acceleration yields a better index for evaluating left ventricular contractile function as compared with tissue velocity acceleration during isovolumic contraction time: an in vivo study. *J Am Soc Echocardiogr*. 2003;16:1211-6

Lindahl B, Venge P, Wallentin L. Early diagnosis and exclusion of acute myocardial infarction using biochemical monitoring. *Coron Artery Dis* 1995;6:321-8

Maeda K, Tsutamoto T, Wada A, Hisanaga T, Kinoshita M. Plasma brain natriuretic peptide as a biochemical marker of high left ventricular end-diastolic pressure in patients with symptomatic left ventricular dysfunction. *Am Heart J* 1998;135:825-32

Marino G, Benvenuto, Ometto R, Fontanelli A, Fortunato A. Chemotherapy-related cardiotoxicity: new diagnostic and preventive strategies. *Ital Heart J* 2003; 4: 655-67

McDowell G, Shaw C, Buchanan K, Nicholls D. The natriuretic peptide family. *Eur J Clin Invest* 1995;25:291-8

Meinardi MT, Gietema JA, Van Veldhuisen DJ. Long term chemotherapy-related cardiovascular morbidity. *Cancer Treat Rev* 2000; 26: 429-77

Meinardi MT, van Veldhuisen DJ, Gietema JA, Dolsma WV, Boomsma F, van den Berg MP, Volkers C, Haaksma J, de Vries EG, Sleijfer DT, van der Graaf WT. Prospective evaluation of early cardiac damage induced by epirubicin-containing adjuvant chemotherapy and locoregional radiotherapy in breast cancer patients. *J Clin Oncol.* 2001;19:2746-53

Minotti G, Recalcati S, Menna p, Salvatorelli E, Corna G, Cairo G. Doxorubicin cardiotoxicity and the control of iron metabolism: quinone dependent and independent mechanism. *Methods Enzymol* 2004;378: 340-61

Narula J, Haider N, Virmani R. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failiure. *N Engl J Med* 1996;335:1182-9

Newby LK, Storrow AB, Gibler WB. Bedside multimarker testing for risk stratification in chest pain units. The Chest Pain Evaluation by Creatine Kinase-MB, Myoglobin, and Troponin I (CHECKMATE) Study. *Circulation* 2001;103:1832-7.

Nielson D, Jensen JB, Dombernowsky P et al. Epirubicin cadriotoxicity: a study of 135 patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1990;3:1806-1810

Nousiainen T, Vanninen E, Jantunen E. Natriuretic peptides during the development of doxorubicin-induced left ventricular diastolic dysfunction. *J Intern Med* 2002; 251: 228-34

Nousiainen T, Jantunen E, Vanninen E, Remes J. Natriuretic peptides as markers of cardiotoxicity during doxorubicin treatment for non-Hodgkin's Lymphoma. *Eur J Haematol* 1999; 62: 135-41

Paulides M, Wojnowski L. Chemotherapeutics-induced heart failure. *Med Klin (Munich)*. 2007; 102: 574-8

Porta C, Moroni M, Ferrar S, Nastsasi G. Endothelin-1 and 5-fluorouracil-induced cardiotoxicity. *Neoplasma* 1998; 45: 81-2

Ryberg M, Nielsen D, Skowsgaard T et al. Epirubicin cardiotoxicity: an analysis of 469 patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1998;16: 3502-3508

Sagnella GA. Measurement and significance of circulating natriuretic peptides in cardiovascular disease. *Clin Sci* 1998;95:519-29

Satoh M, Nakamura M, Akatsu T, Shimoda Y, Sagawa I, Hiramori K. C-reactive protein co-expresses with tumor necrosis factor- $\alpha$  in the myocardium in human dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 2005;7:748-54

Singal PK, Iliskovic N. Doxorubin-induced cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1998; 339: 900-5

Sledge WS. The continuing problem of cardiac toxicity. *Semin Oncol* 2001;28: 4

Sparano JA, Winer EP. Liposomal anthracyclines for breast cancer. *Semin Oncol* 2001;28: 32-34

Steiberg JS, Cohen A, Wasserman AG, Cohen P, Ross AM. Acute arrhythmogenicity of doxorubicin administration. *Cancer* 1987; 60: 1213-8

Suzuki T, Hayashi D. Elevated B-type Natriuretic peptide levels after anthracycline administration. *Am Heart J* 1998; 136: 362-3

Swain SM, Vici P. The current and future role of Dexrazoxane as a cardioprotectant in antracycline treatment: expert panel review. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004;130: 1-7

Tassan-Mangina S, Codorean D, Metivier M, Costa B, Hemberlin C, Jouannaud C, Blaise AM, Elaerts J, Nazeyrollas P. Tissue Doppler imaging and conventional echocardiography after anthracycline treatment in adults: early and late alterations of left ventricular function during a prospective study. *Eur J Echocardiogr* 2006;7:141-6. Epub 2005 Jun 6

Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Durand JB, Bies RD, Young JB, Mann DL. Tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. *Circulation* 1996;93:704-11

Tsutamoto T, Wada A, Matsumoto T, Maeda K, Mabuchi N, Hayashi M, Tsutsui T. Relationship between tumor necrosis factor – alpha production and oxidative stress in the failing hearts of patients with dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:2086-92

Unverferth BJ, Magorien R, Balcerzak SP. Early changes in human myocardial nuclei after doxorubicin. *Cancer* 1983; 52: 215

Vasquez-Vivar J, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Pritchard KA Jr, and Kalyanaraman B Endothelial nitric oxide synthase-dependent superoxide generation from adriamycin. *Biochemistry* 1997;36: 11293-11297

Venturini M, Michelotti A, Del Mastro L et al. Multicenter randomized controlled clinical trial to evaluate cardioprotection of dexrazoxane versus no cardioprotection in women receiving epirubicin chemotherapy for advanced breast cancer. *J Clin Oncol*. 1996;14:3112-20

Von Hoff DD, Layard MW, Basa P, Davis HL Jr, Von Hoff AL, Rozenzweig M, Muggia FM. Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. *Ann Intern Med.* 1979;91:710-7

Wilkins M, Redondo J, Brown L. The natriuretic-peptide family. *Lancet* 1997;349:1307-10

Yamamoto K, Burnett JC Jr, Jougasaki M. Superiority of brain natriuretic peptide as a hormonal marker of ventricular systolic and diastolic dysfunction and ventricular hypertrophy. *Hypertension* 1996;28:988-94

Yamaoka M, Yamaguchi S, Suzuki T, Okuyama M, Nitobe J, Nakamura N, Mitsui Y, and Tomoike H Apoptosis in rat cardiac myocytes induced by Fas ligand: priming for Fas-mediated apoptosis with doxorubicin. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32: 881-889