

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
MEDICINĂ GENERALĂ**

**Influența micromediului asupra creșterii și dezvoltării
melanomului malign**

-REZUMAT-

**CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:
PROF. UNIV. DR. RODICA ANGHEL**

**STUDENT DOCTORAND:
ANDREI POPESCU**

BUCUREȘTI

2019

CUPRINS

1. INTRODUCERE

2. PREMIZĂ DE LUCRU ȘI OBIECTIVE

3. METODOLOGIE

4. REZULTATE

A – ETAPA EXPERIMENTALĂ

B – MODELUL CLINIC – MELANOMUL CUTANAT

C – MODELUL CLINIC – MELANOMUL UVEAL

D – MODELUL CLINIC – STUDIUL COMPARATIV AL MELANOMULUI
MALIGN CUTANAT ȘI MELANOMUL UVEAL

5. CONCLUZII

6. BIBLIOGRAFIE

LISTĂ DE ABREVIERI ȘI SIMBOLURI

CHR = chirurgie

CHT = chimioterapie

DTIC = dacarbazină

MDA = malonilaldehidă

mmc = melanom malign cutanat

mmu = melanom malign uveal

OS = supraviețuire generală

OR = odds ratio

pol = peroxizi lipidici

RFS = supraviețuire fără recidivă

RT = radioterapie

slnb = tehnica ganglionului santinela

Sn = sensibilitate

so = antioxidanti totali

Sp = specificitate

SRO/ROS = specii reactive de oxigen

ta = tioli albuminici

VEGF = factorul de creștere endotelială vasculară

VEGFR = receptorul factorului de creștere endotelială vasculară

1. INTRODUCERE

Lucrarea de față reprezintă rezumatul tezei doctorale cu titlul „Influența micromediului asupra creșterii și dezvoltării melanomului malign”. Teza prezintă rezultatele cercetării efectuate în cadrul Școlii Doctorale a Universității de Medicină și Farmacie „Carol Davila”, București, în perioada 2013 – 2019.

Melanomul malign, deși relativ puțin frecvent comparativ cu restul neoplaziilor cutanate, este responsabil de cele mai multe fatalități prin cancer de piele. Deși această boală nu impresionează neapărat prin incidență, ea pune probleme deosebite din punct de vedere medical atât pacienților afectați cât și clinicienilor nevoiți să se confrunte cu o boală cu o evoluție de multe ori dramatică și, istoric, cu puține resurse terapeutice. În România, cel mai des, fiecare medic oncolog întâlnește pacienți cu melanom în diferite stadii evolutive, punându-și mereu întrebări atât despre cel mai bun mod de abordare clinică, dar și întrebări de ordin științific, despre misterele încă neelucidate ale biologiei melanomului în general, întrebări care, de multe ori, rămân fără răspuns. Întrebări despre evoluția biologică a cancerului, despre posibilitățile de a depista cât mai precoce această boală, sau de a o preveni, despre mecanismele de acțiune ale medicamentelor disponibile, despre limitele lor, despre modul inomogen și greu previzibil al modului în care boala răspunde la tratament, de la caz la caz.

Din punct de vedere epidemiologic, cancerul cutanat reprezintă cele mai frecvente neoplazii, estimativ 9-13% din total [1, 2]. Dintre acestea, deși melanomul malign reprezintă nu mai mult de 5-7 %, el este responsabil pentru un procent de aproximativ 75% din totalul deceselor prin cancer de piele [3]. La nivel mondial, incidența melanomului malign este de aproximativ 230 000 de cazuri pe an (1,6 la suta de mii de locuitori), conform site-ului Globocan, fiind una dintre incidențele cu cea mai rapidă creștere în rândul bolilor neoplazice.

Melanomul malign își are originea în melanocite, celulele ale crestei neurale ce, pe parcursul ontogenezei, migrează în epidermă, meninge, uvee și mucoasa ectodermului. Melanocitele rezidă în stratul la nivelul joncțiunii dintre derm și epiderm (stratul bazal al epidermului) și au rol protector prin producția de melanină. Cauza acestei boli rămâne un subiect intens dezbătut la nivelul comunității științifice, unu dintre factorii de risc cei mai studiați fiind expunerea la radiații ultraviolete. [4]

Tratamentul melanomului malign cutanat în fazele incipiente este strict chirurgical, cu rate mari de vindecare, boala impresionând în schimb din cauza atât a morbidității cât și din cauza inexorabilității în fața tuturor mijloacelor terapeutice în fazele avansate sau metastatice, cu evoluții dramatice pentru pacienți și frustrante pentru clinicieni, zi de zi. Istoric, melanomul malign s-a dovedit foarte rezistent la terapia oncologică, reprezentată până de curând în principal de chimioterapia clasică. Ultimii ani au adus progrese în ce privește tratamentul sistemic al melanomului, cu speranțe în termeni de rate de răspuns și ameliorare a morbidității. Respectivii pași sunt reprezentați de două metode terapeutice: inhibitorii de tirozin-kinaza (TKI), molecule mici, destinate bolilor la care se descoperă mutație la nivelul genei BRAF, mutația V600, cu rate de răspuns crescute, până la 80%; [5] și imunoterapia modernă, mai precis manipularea răspunsului imun, prin deblocarea farmacologică a unor „frâne” la nivelul celulelor imune, cu scopul atacării directe a celulelor tumorale, concept ce s-a dovedit viabil și pentru alte neoplazii. [6] Ambele tipuri de tratamente au demonstrat prelungirea supraviețuirii generale la niveluri superioare față de soluțiile anterioare.

În mod dramatic, melanomul malign poate lua naștere și la nivel ocular. Uveea, denumită și stratul uveal sau tractul uveal, reprezintă stratul mijlociu dintre cele trei straturi concentrice care formează ochiul. Constituenții uveei sunt irisul, corpul ciliar și coroida. Din celulele pigmentare (melanocite) ale acestor componente pot lua naștere tumori maligne. Melanomul uveal (MMU) este cel mai frecvent cancer ocular al adultului, [7] cu o incidență de 10 – 20 de ori mai redusă ca melanomului cutanat și cu un vârf al incidenței în jurul vârstei de 50 – 60 de ani; cauzele producerii sale sunt necunoscute până în prezent. Melanomul uveal poate lua naștere oriunde la nivelul uveei, fiind uneori denumit tocmai în funcție de aparentul sediu primar: coroidian, al irisului sau de corp ciliar. Tumorile mari pot să invadeze mai multe structuri simultan.

Tratamentul melanomului malign uveal rămâne în mod special problematic, în condițiile în care, dacă boala pretinde resurse suplimentare metodelor clasice reprezentate de chirurgie și radioterapie, ratele de răspuns la terapia sistemică de orice fel, inclusiv terapiile moderne de relativ succes în melanomul cutanat, sunt mult mai mici.

2. IPOTEZĂ DE LUCRU ȘI OBIECTIVE

Stresul oxidativ se definește ca alterarea mecanismelor care țin în echilibru producerea de specii reactive de oxigen și eliminarea lor, respectiv a balanței între factorii pro-oxidanți și cei anti-oxidanți. Acest dezechilibru poate avea efect distructiv la nivel molecular și celular, cu răsunet la nivelul întregului organism. Stresul oxidativ poate activa o serie de factori de transcripție ce pot activa inclusiv gene implicate în procesul tumoral (factori de creștere, citokine inflamatorii, etc.). [8]

S-a demonstrat o corelație și între existența cancerului, în majoritatea tipurilor de cancer, și nivelurile crescute de specii reactive de oxigen (SRO), incriminate în mecanismele de progresie tumorală, de metastazare, de eludare a sistemului imun, de imortalizare celulară, de angiogeneză și de rezistență la tratament. În cancer sursele suplimentare de specii reactive de oxigen sunt: activitatea metabolică crescută la nivel celular, disfuncțiile mitocondriale, activitatea peroxizomică, sporirea semnalizării intracelulare, activitatea oncogenică, creșterea activității oxidazelor, lipoxigenazelor, ciclooxigenazelor și timidin-fosforilazelor și activitatea imună. Totuși s-a constatat că celulele tumorale prezintă și mecanisme reglatorii ale speciilor reactive de oxigen, fapt care sugerează ca și celula tumorală are nevoie să mențină un echilibru al acestora pentru a putea supraviețui. Acest lucru sugerează imediat potențialul terapeutic al intervențiilor asupra acestor mecanisme delicate la nivel tumoral, în speranța de a combate cancerul. [9]

Ca ipoteză de lucru, am plecat de la conceptul de micromediu, respectiv relația pe care o tumoră malignă deja constituită îl are cu mediul înconjurător, cu țesutul fiziologic în care ia naștere, cu celulele sistemului imun, vascularizația, și diferențele observabile în ce privește în primul rând metabolismul oxidativ. Am presupus că aceste diferențe pot fi analizate și descrise, în scopul ca, ulterior, să constituie markeri cu valoare în diagnosticul și monitorizarea melanomului malign și, potențial, modalități de evaluare obiectivă a răspunsului la tratament și chiar ținte terapeutice.

Obiectivele cercetării au fost următoarele:

- stabilirea viabilității unui model de cercetare experimental, pe șoareci de laborator inoculați cu celule de melanom malign, analizat din punct de vedere morfologic și al expresiei a trei markeri ai stresului oxidativ (tiolii albuminici, peroxizii lipidici și antioxidanții totali);
- extinderea cercetării către un model observațional pe subiecți umani, respectiv pacienți cu melanom malign cutanat și melanom malign uveal;

- analiza corelației între existența unei tumori/evoluția tumorală/îndepărtarea sau contracararea tumorii prin tratament și stresul oxidativ, la pacienții cu melanom malign.

3. METODOLOGIE

Metoda aleasă a fost o cercetare translațională. Primul obiectiv a fost cel al obținerii unui model experimental, pe animale de laborator (șoareci), stabil din punct de vedere morfologic și biochimic, care să permită translatarea/extinderea spre un model clinic, pe subiecți umani. Următoarea etapă a fost cea de extindere a modelului de cercetare pe un lot de pacienți umani, cu evaluarea aceluiași markeri ai stresului oxidativ (peroxizii lipidici, tiolii albuminici și antioxidanții totali). Această etapă a fost împărțită în trei sub-etape: prima sub-etapă a urmărit în dinamică evoluția markerilor la un lot de pacienți cu melanom malign cutanat; cea de a doua sub-etapă a urmărit același lucru pe un lot de pacienți cu melanom malign uveal, la care au fost aplicate și studiate comparativ trei metode terapeutice (chirurgie, radioterapie și tratament sistemic – chimioterapie); iar cea de a treia sub-etapă a fost constituită de analiza combinată a celor două loturi de pacienți umani împreună. Scopul principal al cercetării a fost o analiză descriptivă vis-a-vis de evoluția în dinamică a markerilor stresului oxidativ pe o cohortă urmărită prospectiv.

Pentru etapa pe subiecți umani au fost înrolați 45 de pacienți cu melanom malign cutanat, respectiv 19 femei și 26 de bărbați, cu vârste cuprinse între 30 (cel mai tânăr) și 84 (cel mai vârstnic) de ani (vârsta medie – 58,2 ani, mediana 59), care s-au prezentat în perioada ianuarie 2014 – martie 2018 pentru consultație în cadrul Ambulatoriului de Oncologie Medicală al Spitalului Clinic Colentina și și-au dat acordul scris pentru participare în studiul observațional. De asemenea a fost investigat și un lot de 44 de pacienți cu melanom malign uveal, pacienți aflați în baza de date a Institutului de Oncologie „Al. Trestioreanu” București; acest grup a fost constituit din 14 pacienți tratați cu radioterapie, 18 pacienți tratați chirurgical și 12 pacienți tratați atât prin enucleere dar și cu tratament sistemic. Pacienților, după obținerea acordului informat, li s-au înregistrat detaliile medicale referitoare la boală și li s-au efectuat recoltări înseriate de probe de sânge ce au fost folosite pentru determinarea nivelurilor serice ale markerilor stresului oxidativ: tiolii albuminici, peroxizii lipidici și antioxidanții totali.

Prelucrarea statistică a datelor în studiul prezent s-a realizat în programul SPSS 22.0 FOR WINDOWS.

În studiul prezent s-au utilizat parametrii epidemiologici; au fost exprimați sub forma unor variabile nominale- sex, mediu, grupe de vârstă, stadiu, recidivă. Analiza a cuprins măsurarea frecvenței, a modulului (valoarea cea mai frecventă) și a procentului. Parametrii biologici măsuțați au fost exprimați sub formă de variabile continue cantitative măsurate în diferite momente (POL, TA, SO, vârsta, Ki67). Pentru acestea s-au calculat valorile extreme, media și deviatia standard. Totodată s-a verificat ipoteza normalității atât prin aprecierea existenței unei simetrii cu ajutorul medianei, cât și prin utilizarea altor teste de normalitate (Kormogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk). Ca și prag de semnificație statistică a fost ales $p < 0.05$. Dacă această condiție nu a fost respectată, s-a testat posibilitatea existenței unui alt tip de repartiție a valorilor parametrului respectiv (repartiție exponențială, chi patrat). Ulterior s-au aplicat teste neparametrice pentru loturi independente (Kruskal- Wallis, Mann- Witney) și au fost calculați coeficienții de corelare neparametrici.

T test a fost folosit pentru a examina efectele unei variabile independente asupra uneia sau a mai multe variabile dependente. Utilizarea acestuia a fost rezervată analizei a două loturi independente sau două niveluri a unei variabile cu categoriale cu multiple niveluri. Rezultatele acestui test au ajutat pentru a vedea dacă cele două metode diferă în mod semnificativ.

Testul ANOVA este un test de comparare a mediilor. Comparativ cu testul Student, acesta permite compararea mediile mai multor eşantioane sau mai multe niveluri. Anova se poate aplica însă pentru eşantioane cu dispersii egale. În cazul mai multor niveluri a variabilei independete se utilizează analiza post hoc cu testul Bonferroni care permite compararea pe perechi.

Pragul de semnificație statistică a fost stabilit pentru $p = 0,05$. Dacă $p < 0,05$ atunci este semnificativă la pragul de semnificatie de 95%. [10]

În cadrul analizei diferențelor între diferite momente s-a utilizat Linear general model for repeated measures. Acesta reprezintă o varianta a testului ANOVA pentru măsurători repetate. Acesta presupune analiza efectului de interacțiune a două variabile independente în diferite momente.

Pentru stabilirea prezenței unei legături între variabile s-a utilizat analiza de corelație Pearson. Coeficientul r , prin semnul său \pm permite aprecierea unei relații negative sau pozitive

între parametri. Valoarea acestuia apreciază gradul de legătură: <0.3- relație slabă, 0.3-0.4 relație moderată, >0.5- relație stransă. Aceasta a fost utilizată pentru stabilirea unei legături cauzale între diferiți parametri (TA, SO, POL, vârstă, Ki67). În cazul prezenței unei variabile categoriale, stadiu, tip diagnostic a fost măsurat coeficientul neparametric Spearman'rho.

Valoarea predictivă a unor parametri (variabile independente- SO, TA, POL) asupra tipului de neoplazie sau a stadiul evolutiv al bolii (variabila dependentă), a fost analizată cu ajutorul regresiei multinominale sau a modelului de regresie logistică. Pentru a testa dacă regresia logistică este statistic semnificativă se utilizează o variantă a testului Chi pătrat pentru un singur grad de libertate. OR reprezintă raportul șansei de succes raportată la șansa de insucces. Calcularea coeficientului beta permite măsurarea efectului pe care îl are o variabilă independentă asupra variabilei dependente. O valoarea < 0 reduce efectul în timp ce o valoare > 0 îl mărește. Construirea modelului de regresie s-a făcut cu ajutorul mai multor metode (stepwise, forward sau LR- likelihood- ratio).

Regresia logistică este o metodă statistică cu ajutorul căreia se analizează dacă există sau nu o legătură funcțională între o variabilă dependentă și una sau mai multe variabile independente. Variabila dependentă este o variabilă binară (date nemăsurabile, ordinale sau nominale, de tip da/nu, bolnav/sănătos). Acestei variabile i se atribuie în mod convențional valoarea 0 (pentru valoarea de referință) fie valoarea 1. Regresia logistică permite analiza datelor prin care se poate diferenția între două grupuri, cum ar fi între două diagnostice sau între două condiții de boală. Această analiza ne ajută în intenția noastră de a face prognoze. [11]

Pentru a testa dacă regresia logistică este statistic semnificativă se utilizează o variantă special adaptată a testului Chi pătrat. În același timp se calculează și pătratul coeficientului de regresie. Acest test reprezintă o metodă în a stabili corelația dintre factorii de prognostic și evoluția pacientului, etc. [11]. Pentru a evalua semnificatia coeficienților am utilizat testul Wald care reprezintă raportul dintre pătratul coeficientului de regresie și pătratul erorii standard a coeficientului. Ulterior, pentru a evalua gradul de asociere dintre variabilele independente și variabila dependentă am calculat indicatorii Cox și Snell și Nagelkerke. Acești indicatori au rolul de a măsura gradul în care există o compatibilitate între observații și predicții și anume gradul de corectitudine a predicțiilor. [12]

Pentru analiza unui test diagnostic s-a utilizat măsurarea sensibilității și specificității. Sensibilitatea (Sn) este probabilitatea de a avea testul pozitiv, atunci când ești bolnav, sau

proporția celor cu test pozitiv printre bolnavi (bolnavii cu test pozitiv / toți bolnavii). Sensibilitatea unui test este puterea acestuia de a descoperi boala; cu cât testul este mai sensibil, riscul este mai mic să scape bolnavi nedescoperiți. Specificitatea (Sp) este probabilitatea de a avea testul negativ, atunci când ești sănătos, sau proporția celor cu test negativ, printre sănătoși (sănătoșii cu test negativ / toți sănătoșii). Un test specific este foarte util pentru a pune diagnosticul de boală, când acesta este pozitiv, pentru că specificitatea este invers proporțională cu rata fals pozitivilor. [13]

Reprezentarea grafică s-a efectuat cu ajutorul curbei ROC. Aceasta exprimă relația dintre sensibilitatea și specificitatea unui test diagnostic. Precizia globală a acestuia se cuantifică prin aria de sub curbă (AUC). [13]

Youden index permite stabilirea beneficiului utilizării unui test diagnostic. Formula este reprezentată de: $Sn(\%) + Sp(\%) - 100$. Valoarea acestuia trebuie să fie $>50\%$ pt a susține utilizarea testului diagnostic analizat.

Youden point reprezintă valoarea cut-off pentru care avem cea mai înaltă Sn și Sp pe curba ROC.

Reprezentarea grafică a variabilelor analizate în studiu a fost realizată cu ajutorul graficelor tip COLUMN, pie, scatter-plots, ROC curve, box-plots.

4. REZULTATE

A – ETAPA EXPERIMENTALĂ

După inocularea șoarecilor de laborator cu patru linii celulare de melanom (B, C, D și F), am efectuat o analiză morfologică a tumorilor și o analiză biochimică prin pasaje înseriate.

Din punct de vedere morfologic, tumorile sunt intens pigmentate, bine încapsulate, de consistență flască. Prezintă creștere locală invaziv-infiltrativă în musculatura abdominală subiacentă. S-a observat necroză avansată în cazul melanomului C – imagini nesatisfăcătoare. În toate cazurile s-au obținut aceleași aspecte macroscopice și viscerale. Efectuând inoculări în diverse momente ale anului, pe loturi diferite de animale, am obținut aceleași caracteristici ale tumorilor implantate, același tip de evoluție, aceleași manifestări clinice macroscopice. Aceste

date ne îndreptătesc să afirmăm că am obținut o tumoră experimentală stabilă, reproductibilă și care poate să reprezinte un instrument de lucru în vederea cercetărilor ulterioare.

În paralel a fost efectuată și o analiză biochimică a markerilor stresului oxidativ, la nivel seric, la nivel de omogenat tisular tumoral și omogenat tisular hepatic, în pasaje înseriate.

Peroxizii lipidici au fost evaluați prin măsurarea concentrației dialdehidei malonice, produs final al degradării hidroperoxizilor lipidici proveniți din reacțiile biochimice. Metoda se bazează pe formarea unui aduct colorat în roșu (MDA-TBA2) care prezintă un maxim de absorbție la 532nm.

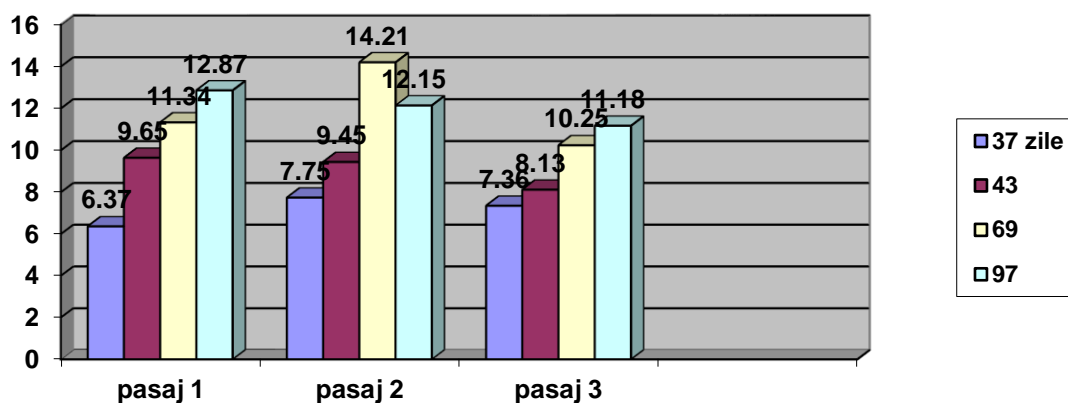


Fig. 1
Reacția de peroxidare lipidică măsurată în ser.

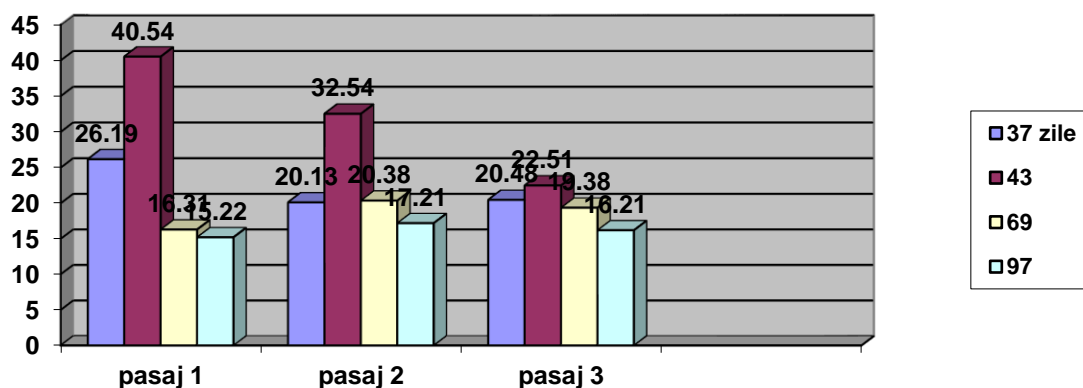


Fig. 2
Reacția de peroxidare lipidică măsurată în omogenat tisular hepatic.

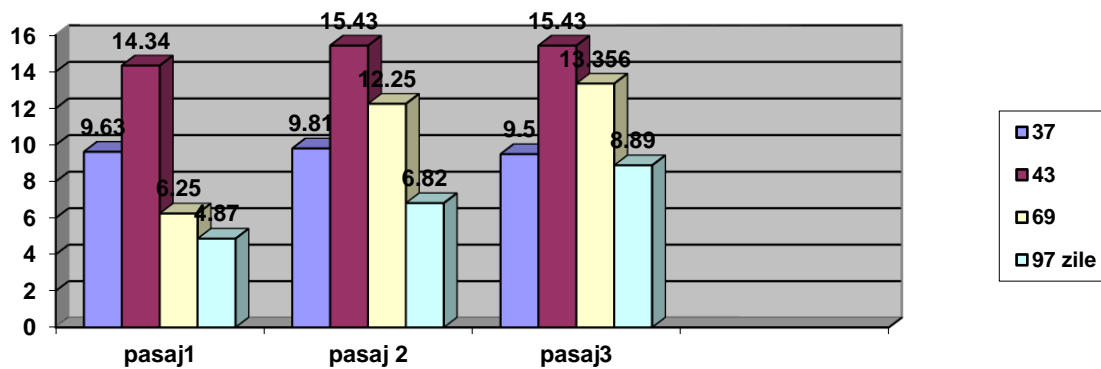


Fig. 3
Reacția de peroxidare lipidică măsurată în omogenat tisular tumoral.

Grupele tiol-albuminice SH au fost determinate prin reacția cu acidul 5,5`-ditio-bis (2-nitrobenzoic)/reactivul Ellman, notat DTNB. Reacția este cuantificabilă spectrofotometric formându-se un complex cu un maxim de absorbție la 412 nm. Intensitatea culorii este, în concordanță cu legea Lamber-Beer, direct proporțională cu concentrația grupărilor SH albuminice.

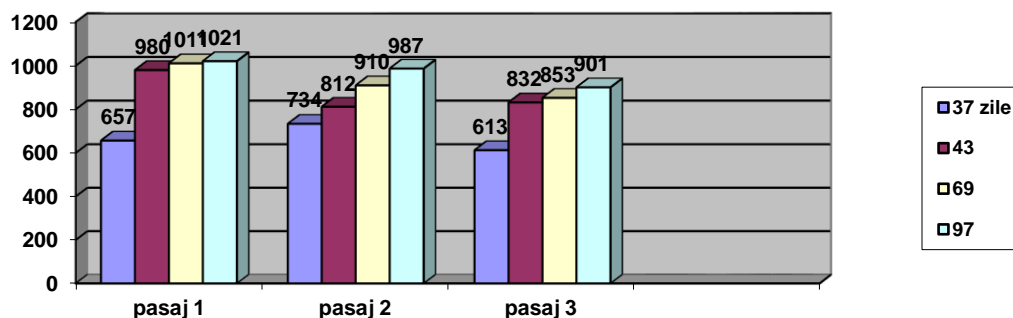


Fig. 4
Profilul oxidării proteinelor în dinamica creșterii tumorale, determinate din ser.

Antioxidanții totali au fost și ei determinați din aceleași probe biologice ca și parametrii mai sus menționați.

B – MODELUL CLINIC – MELANOMUL CUTANAT

Am efectuat naliza valorilor medii a markerilor stresului oxidativ în populația de pacienți cu melanom malign cutanat, pe stadii clinice.

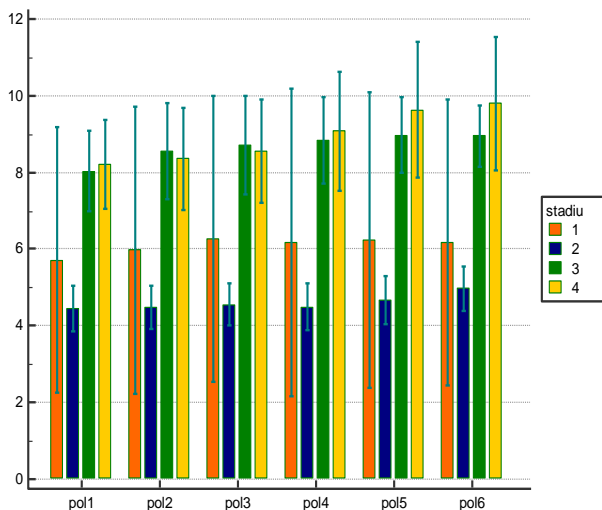


Fig. 5
Analiza valorilor medii a tuturor determinarilor POL (peroxizii lipidici) în funcție de stadiul bolii – melanom cutanat

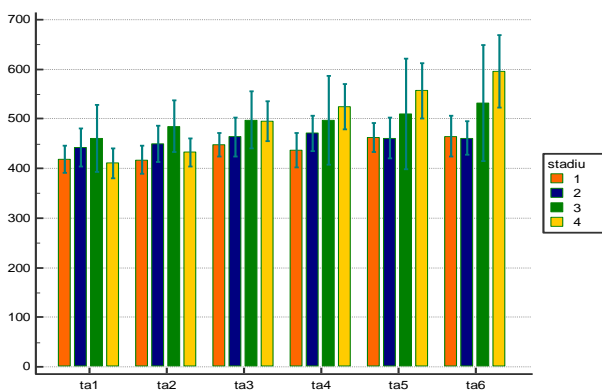


Fig. 6
Analiza valorilor medii a tuturor determinarilor TA (tioli albuminici) în funcție de stadiul bolii – melanom cutanat

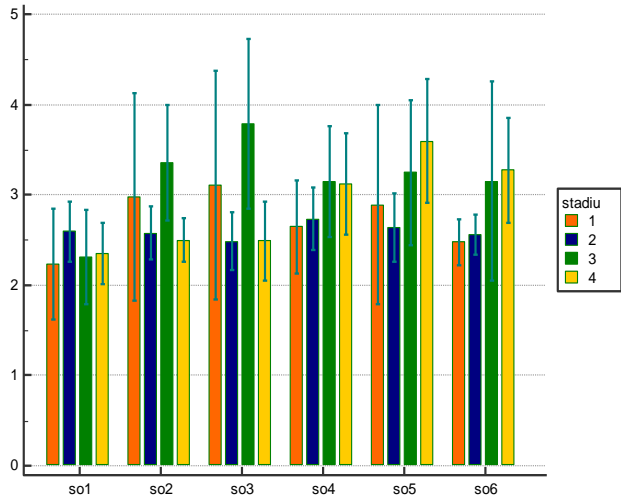


Fig. 7
 Analiza valorilor medii a tuturor
 determinarilor SO (antioxidanți
 totali) în funcție de stadiul bolii –
 melanom cutanat

C – MODELUL CLINIC – MELANOMUL UVEAL

Pacienții au fost urmăriți clinic și biologic în dinamică pe durata a doi ani de la diagnostic, respectiv înainte și după intervenția medicală inițială, și ulterior la intervale regulate de 3-6 luni. S-au obținut 7 determinări de parametri biochimici ai stresului oxidativ: markerii peroxidării lipidice prin măsurarea reacției malondialdehidei (MDA) ca produs final, - antioxidanții totali determinați prin capacitatea serului de a reduce fierul și grupările tiol-albuminice totale (prin metoda Shoshinsky), ca măsură a degradării oxidative a proteinelor circulante.

1) Valorile medii pentru lotul total de pacienți:

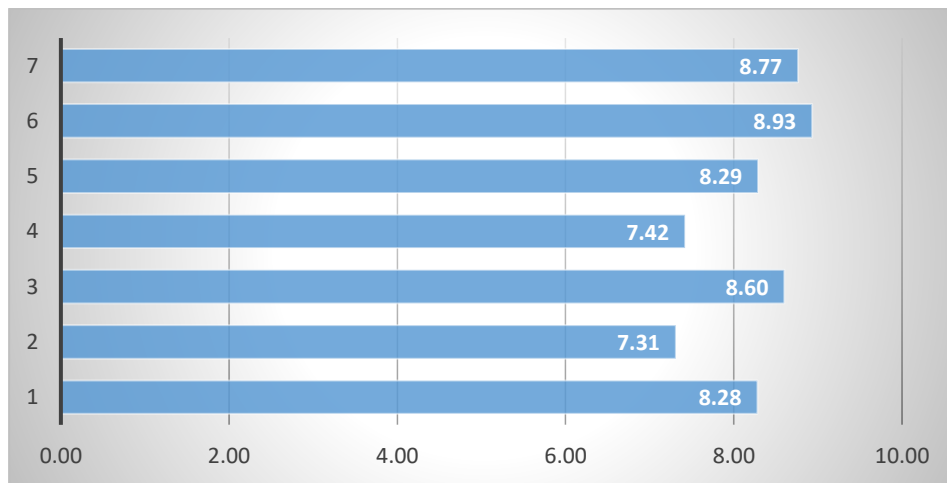


Fig. 8
 Peroxidarea lipidică (total)

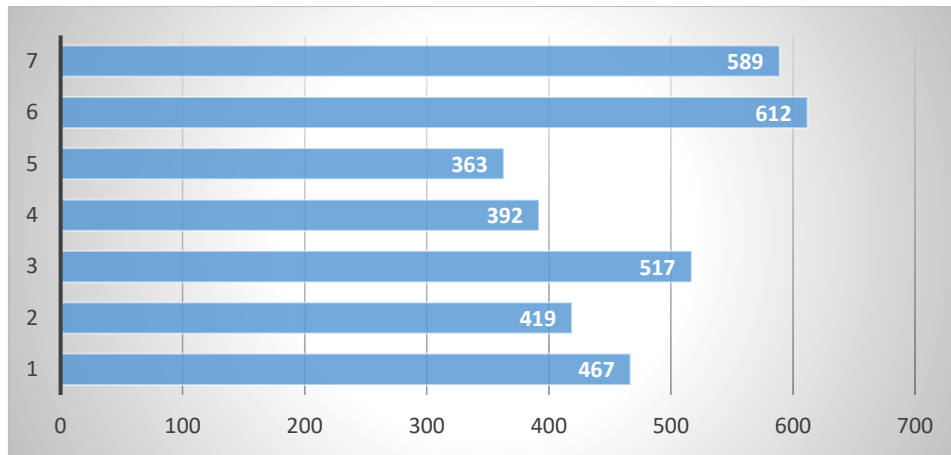


Fig. 9
Grupările tiol-albuminice (total)

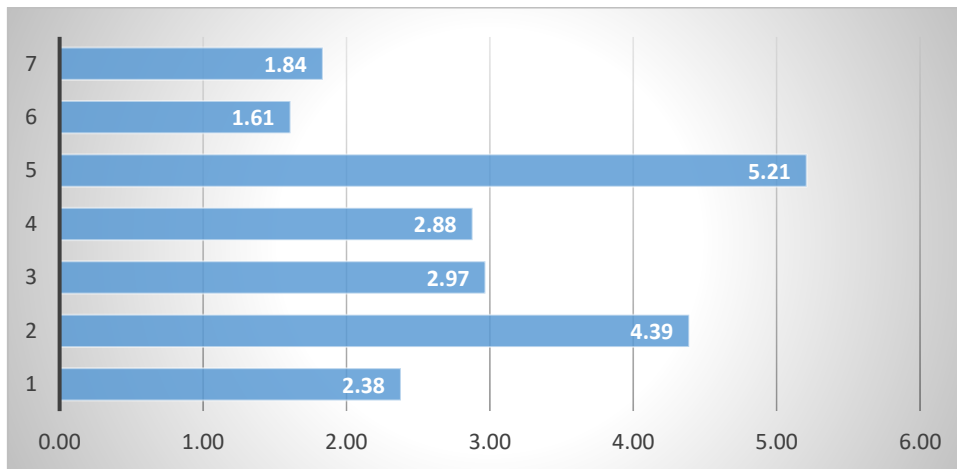


Fig. 10
Antioxidanți totali (total)

2) Valorile medii pentru lotul tratat doar prin radioterapie:

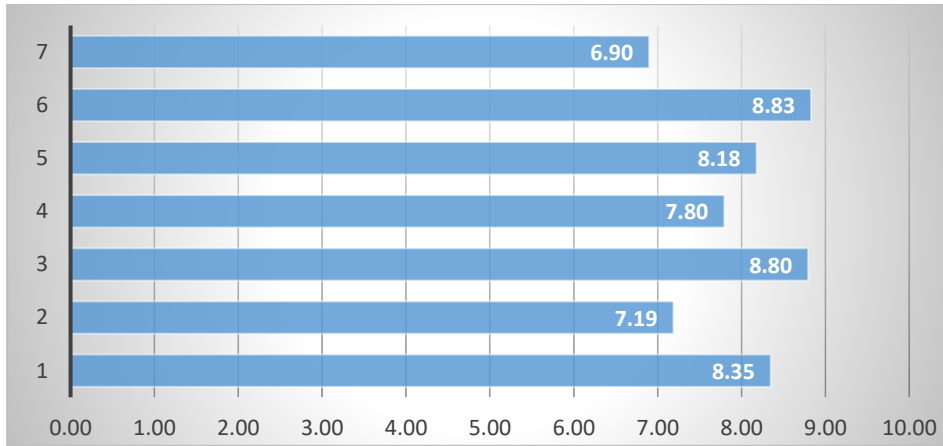


Fig. 11
Peroxidarea lipidică (RT)

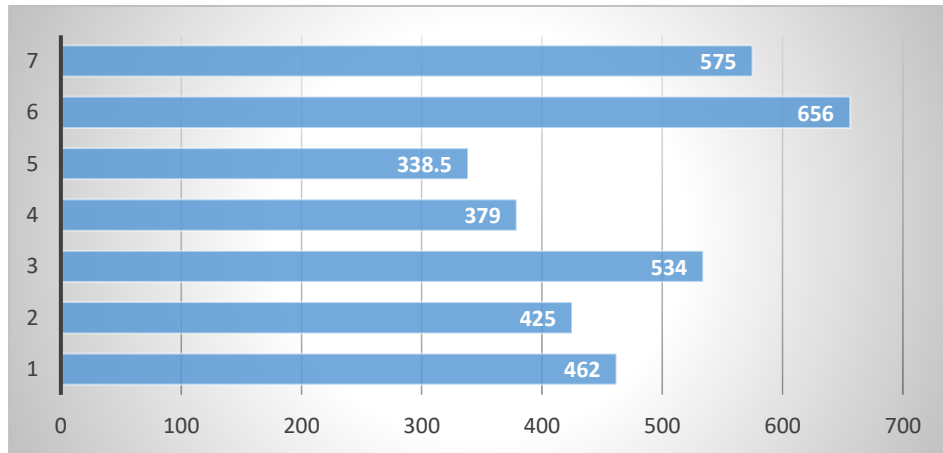


Fig. 12
Grupările tiol-albuminice (RT)

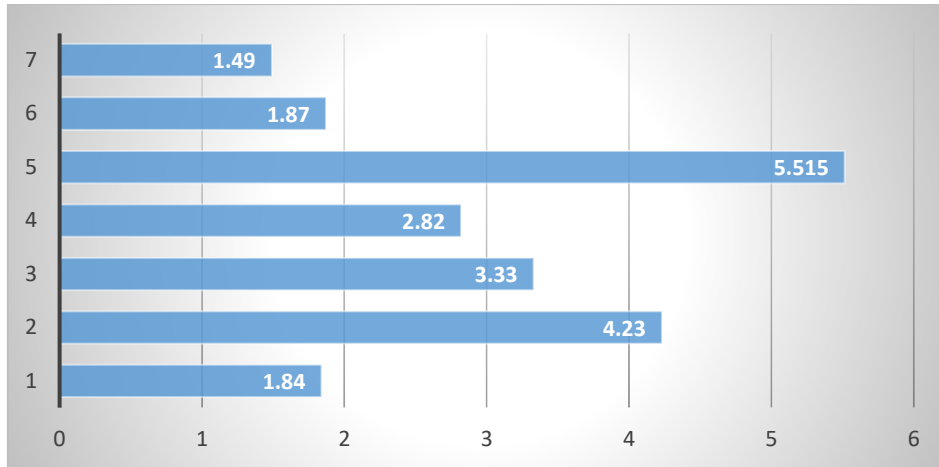


Fig. 13
Antioxidanți totali (RT)

3) Valorile medii pentru lotul tratat doar prin chirurgie/enucleere:

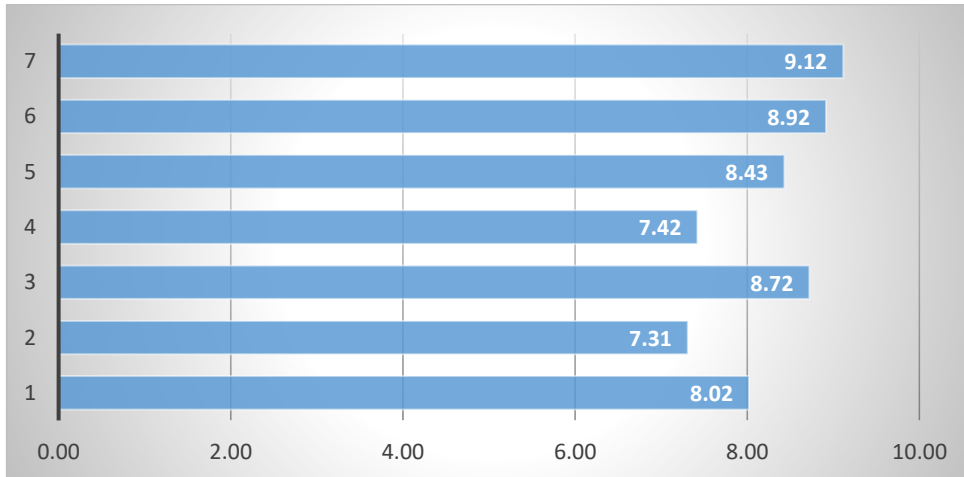


Fig. 14
Peroxidarea lipidică (chirurgie)

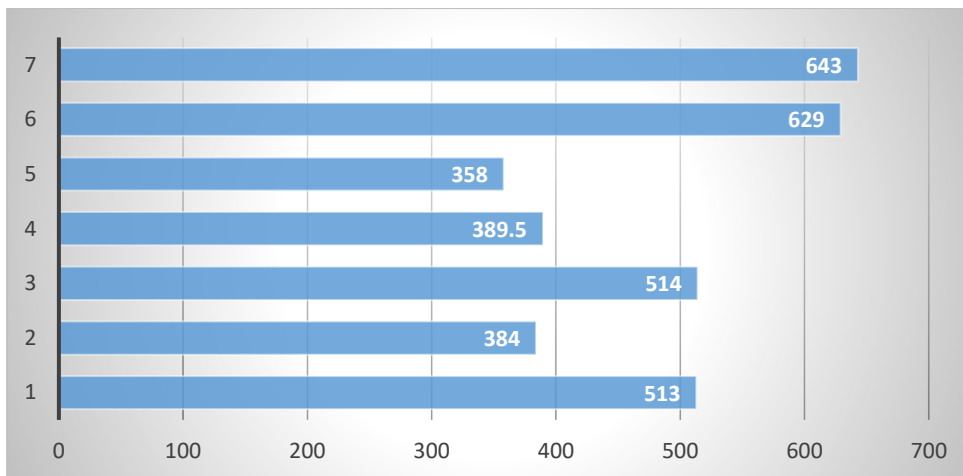


Fig. 15
Grupările tiol-albuminice (chirurgie)

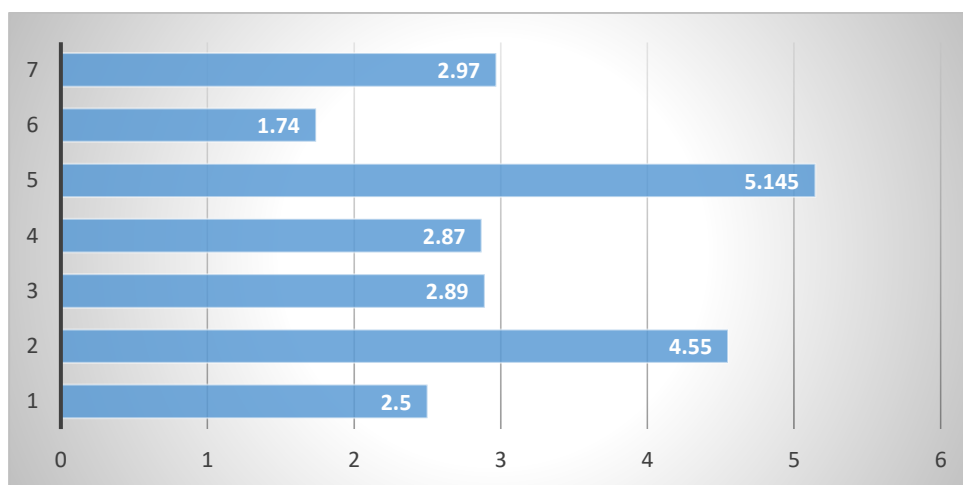


Fig. 16
Antioxidanți totali (chirurgie)

4) Valorile medii pentru lotul tratat chirurgie și terapie sistemică postoperatorie (chimioterapie):

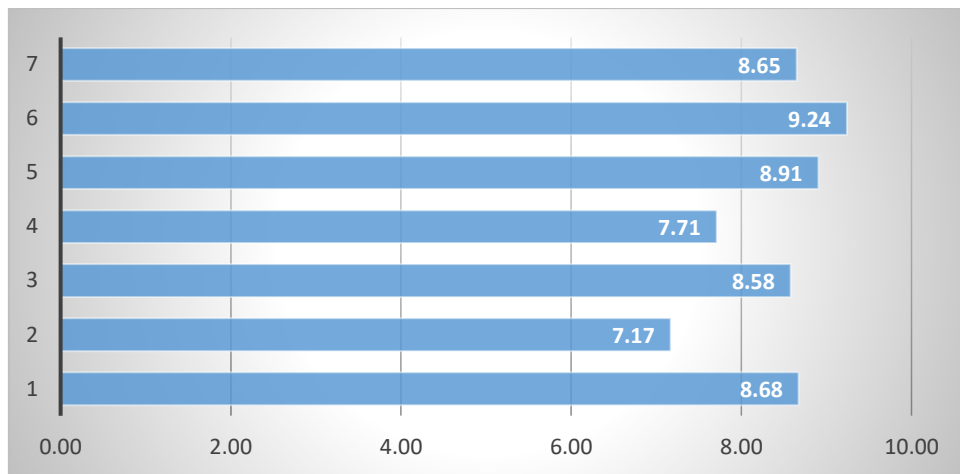


Fig. 17
Peroxidarea lipidică (chirurgie și chimioterapie)

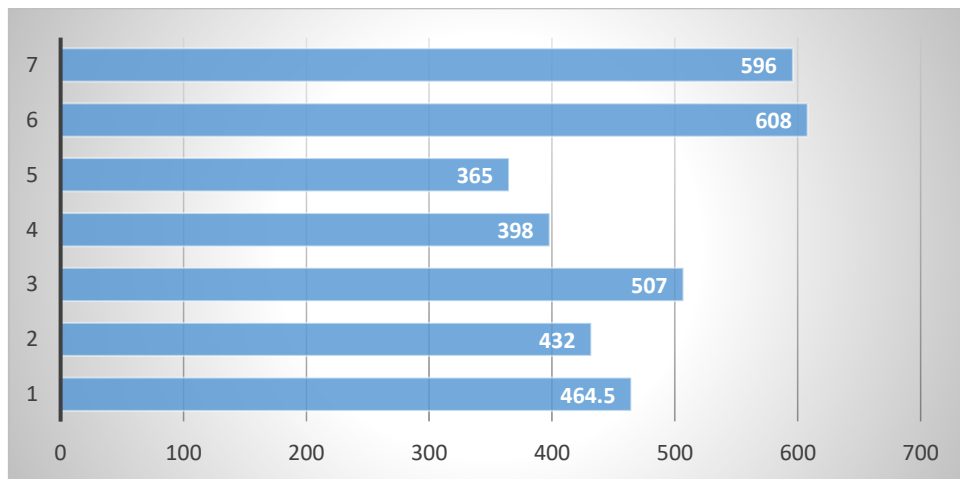


Fig. 18
Grupările tiol-albuminice (chirurgie și chimioterapie)

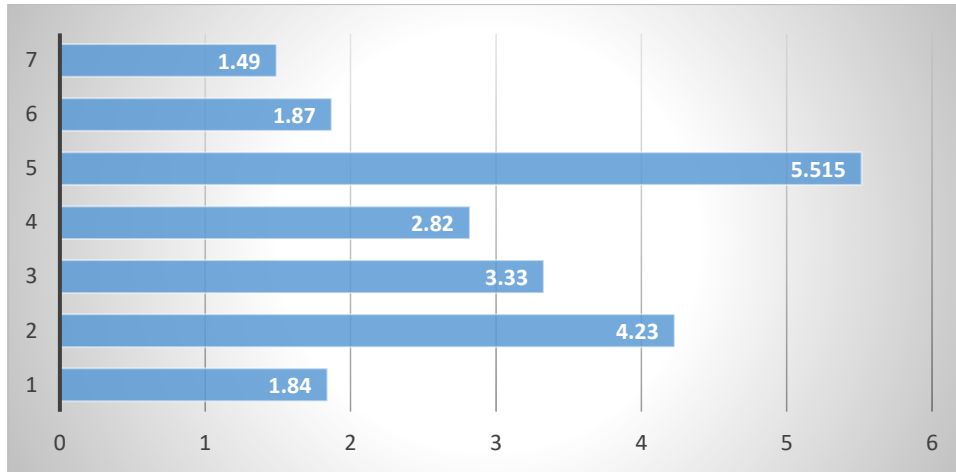


Fig. 19
Antioxidanți totali (chirurgie și chimioterapie)

D – MODELUL CLINIC – STUDIUL COMPARATIV AL MELANOMULUI MALIGN CUTANAT ȘI MELANOMUL UVEAL

Pentru identificarea unor modificări care să ducă la elucidarea diferențelor apărute în mecanismele de dezvoltare a celor două tipuri de melanom cutanat vs. uveal, întâi s-au analizat statistic cele două loturi de pacienți, urmărindu-se toți parametrii clinici și paraclinici studiați. Așa cum a fost menționat anterior, am avut în studiu două loturi de pacienți, din care au fost extrași pentru prelucrare statistică 33 cu melanom cutanat și 25 cu melanom uveal, urmăriți în dinamica tratamentului.

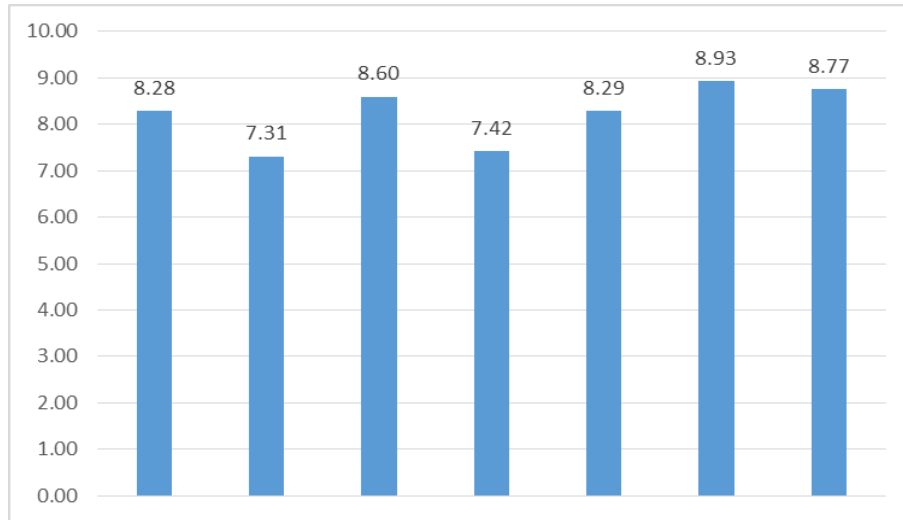


Fig. 20
 Peroxizi lipidici – cutanat

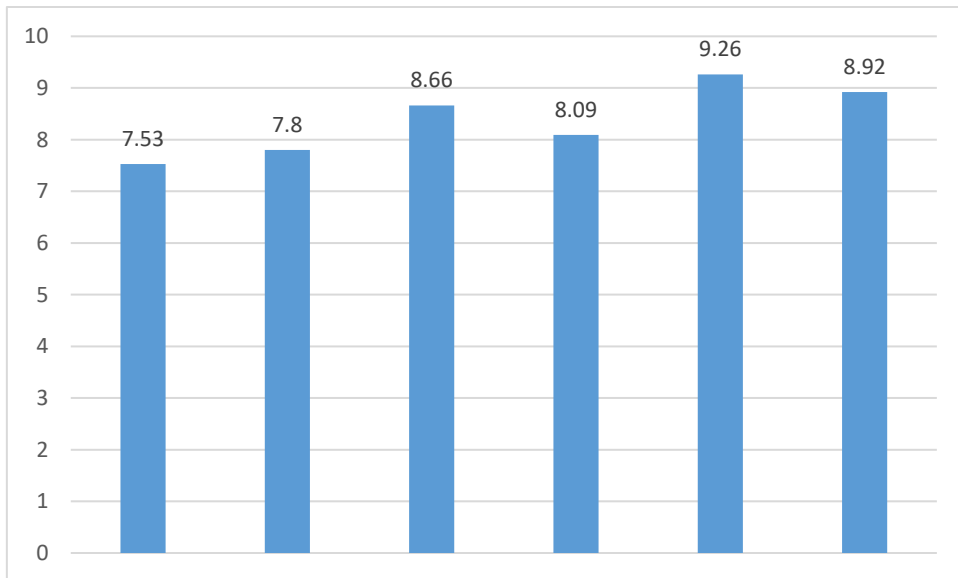


Fig. 21
 Peroxizi lipidici – uveal

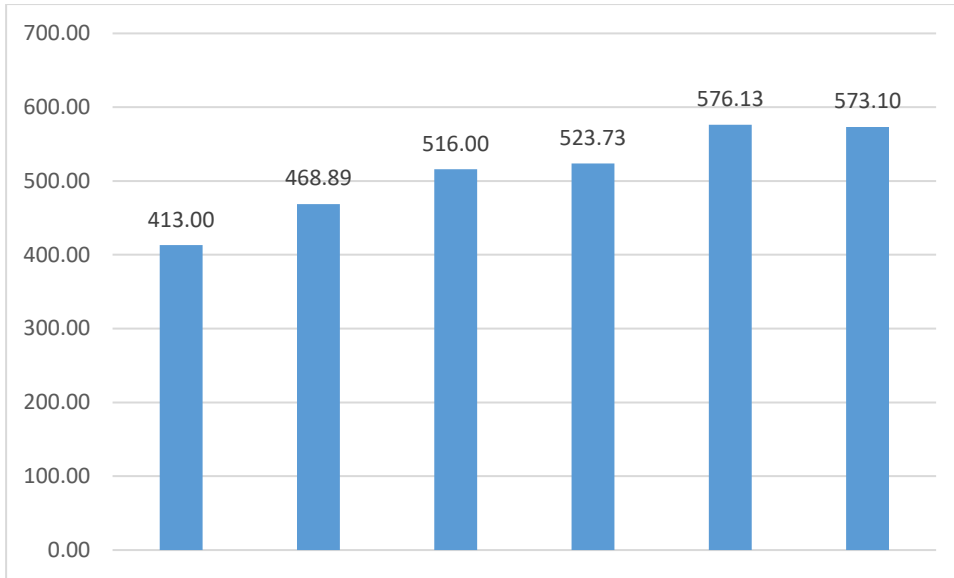


Fig. 22
Tioli albuminici - cutanat

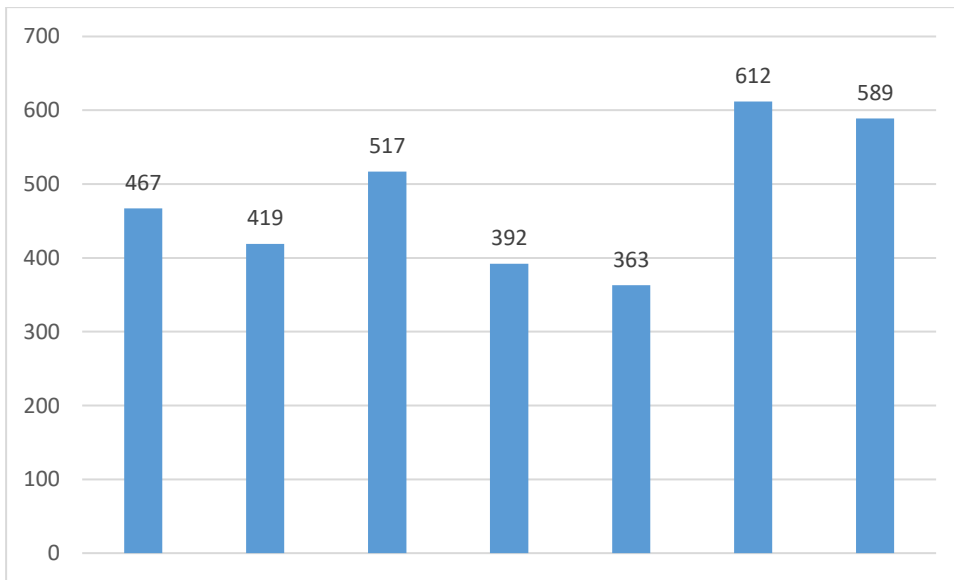


Fig. 23
Tioli albuminici - uveal

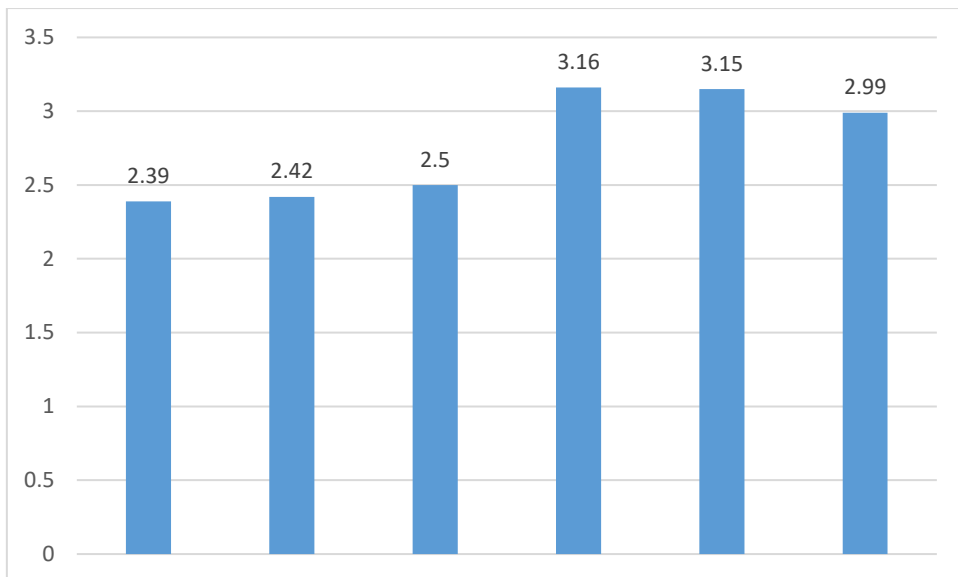


Fig. 24
Antioxidanți totali - cutanat

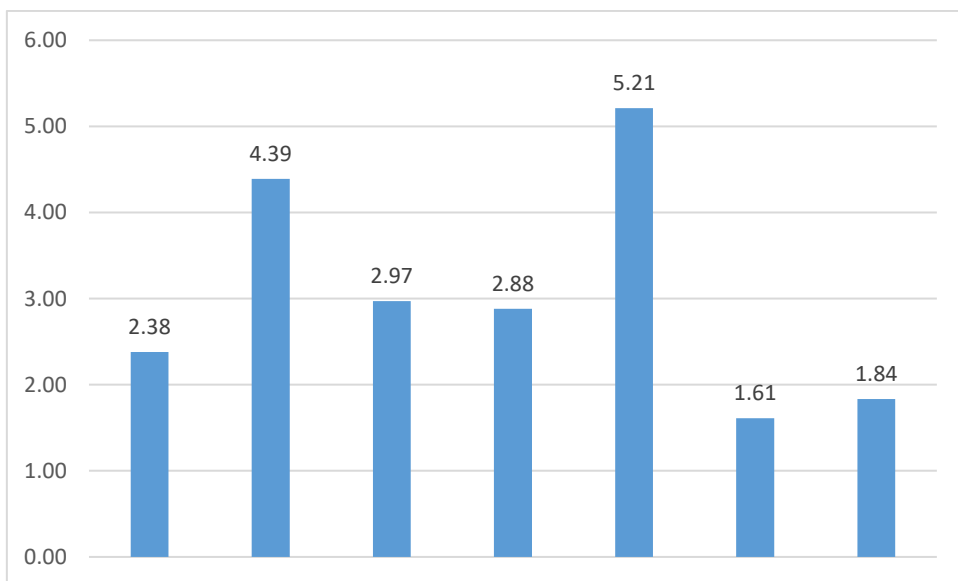


Fig. 25
Antioxidanți totali - uveal

Pentru toți pacienții investigați s-au efectuat o serie de teste biochimice care urmăreau metabolizarea oxigenului și instalarea stresului oxidativ în dinamica tratamentului. Trebuie să menționăm că indiferent de tratamentul administrat, scopul acestuia este de a reduce dimensiunea tumorală, a îmbunătăți starea de sănătate relativă și calitatea vieții pacientului. Drept urmare, având în vedere omogenitatea loturilor analizate statistic, am urmărit reacția de peroxidare lipidică, comparativ la cele două loturi, înregistrată la începutul, la înjumătățirea și la sfârșitul tratamentului chimioterapic administrat pacienților. Valorile medii obținute prin măsurarea concentrației finale de MDA, produs al degradării lipidelor sub acțiunea speciilor reactive de oxigen sunt redate în graficul de mai jos.

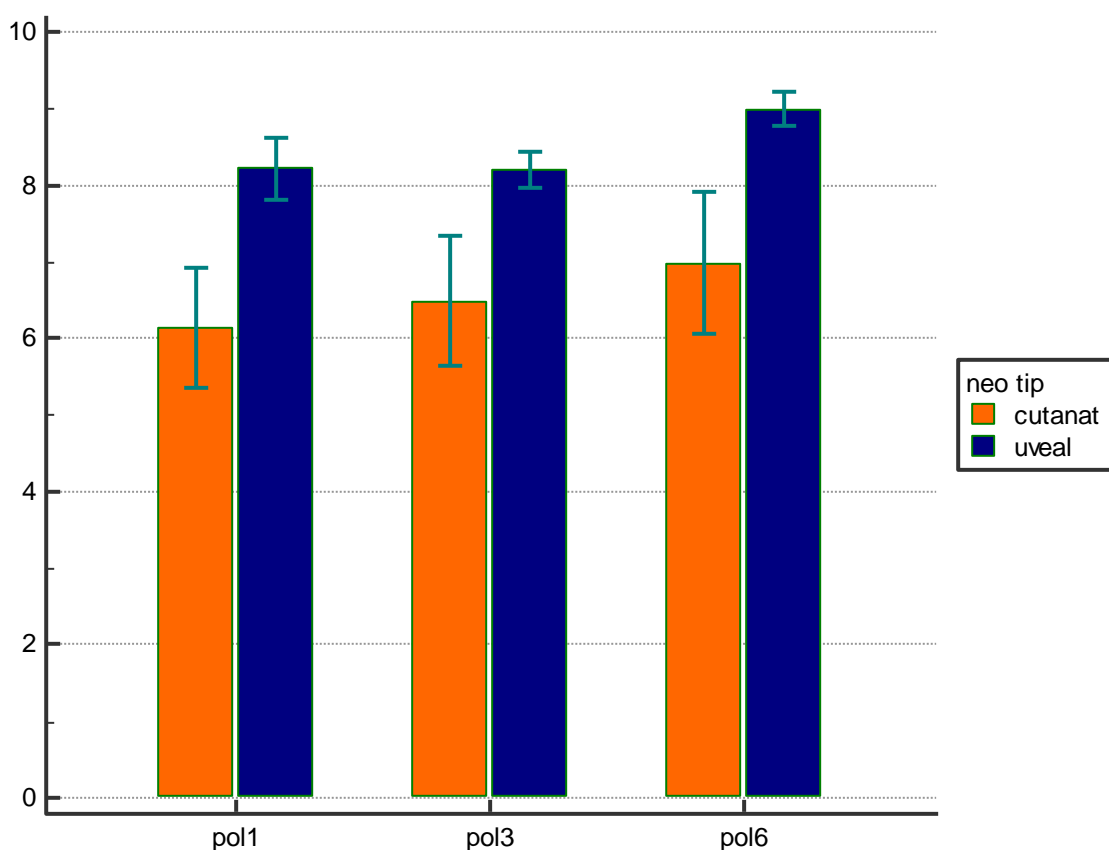


Fig. 26

Evoluția comparativă între valorile medii ale POL (peroxizii lipidici) pe cele două grupuri de studiu (melanoma cutanat și melanoma uveal)

Din punct de vedere statistic, nu s-a înregistrat o diferență semnificativă între cele două grupuri în diferite momente ale măsurătorilor, momente care corespund dinamicii tratamentului administrat.

Aceleași calcule statistice au fost efectuate și asupra datelor obținute prin măsurarea nivelului antioxidanților. Graficul de mai jos prezintă valorile medii obținute la pacienții grupați în funcție de localizarea tumorii melanice.

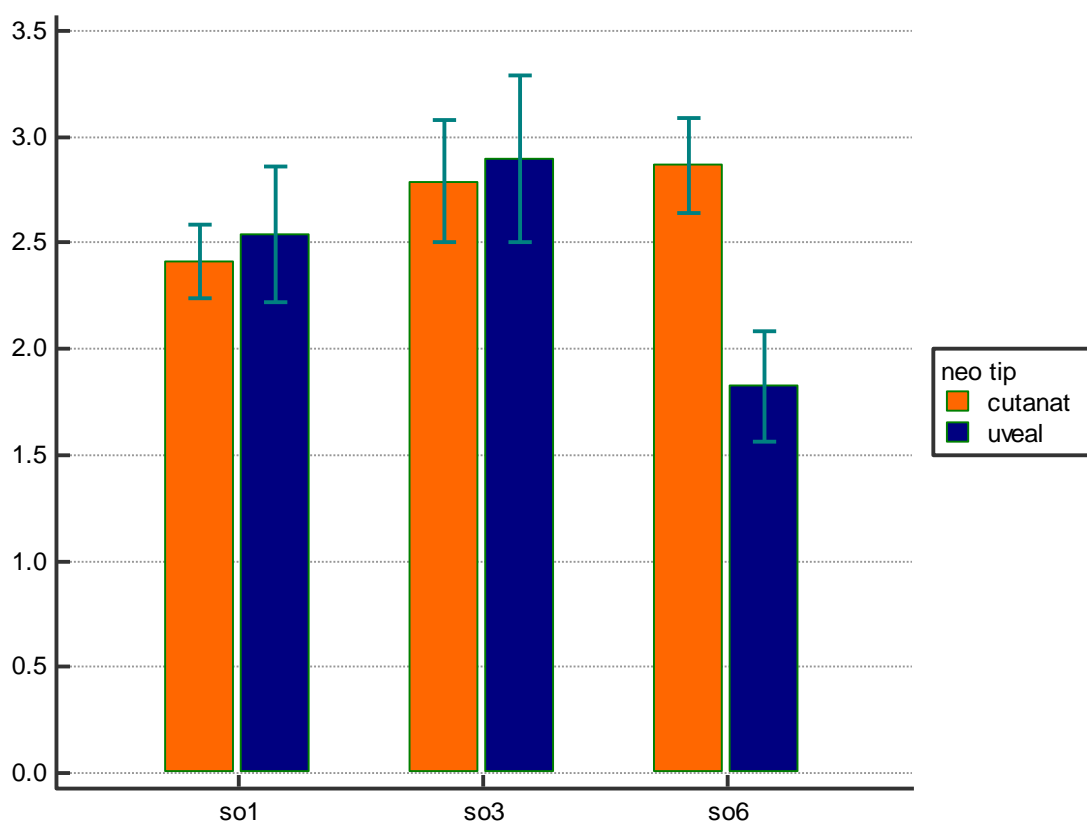


Fig. 27
Evoluția comparativă între valorile medii ale AO (antioxidanții totali) pe cele două grupuri de studiu (melanoma cutanat și melanoma uveal)

Pentru măsurătorile de antioxidanți totali, între loturi s-au înregistrat diferențe semnificative statistic în dinamica determinărilor ($p < 0.001$). Antioxidanții totali apar ca urmare

a instalării unui stress oxidativ care reprezintă o debalansare a echilibrului homeostatic între producerea speciilor reactive de oxigen și abilitatea organismului de a capta aceste specii prin sistemele de luptă antioxidante endogene. În cancer, prezența tumorală în sine este inductoare de stress oxidativ; însă și tratamentele anti-tumorale au capacitatea de a induce un stress oxidativ, cu scopul de a distruge celulele tumorale prin procese degradative inițiate la nivel molecular.

Modificările semnificative statistic între cele două loturi indică mecanisme moleculare diferite de semnalizare a activității antioxidante endogene. Ele sunt în creștere continuă în melanomul cutanat, iar în cel uveal, la sfârșitul tratamentului, se înregistrează o scădere a nivelurilor măsurate. Se sugerează astfel instalarea unui stress oxidativ mai pronunțat în melanomul uveal față de cel cutanat, o intensificare a metabolismului oxigenului și o capacitate mai scăzută de răspuns al organismului, o agresivitate crescută a acestui tip celular.

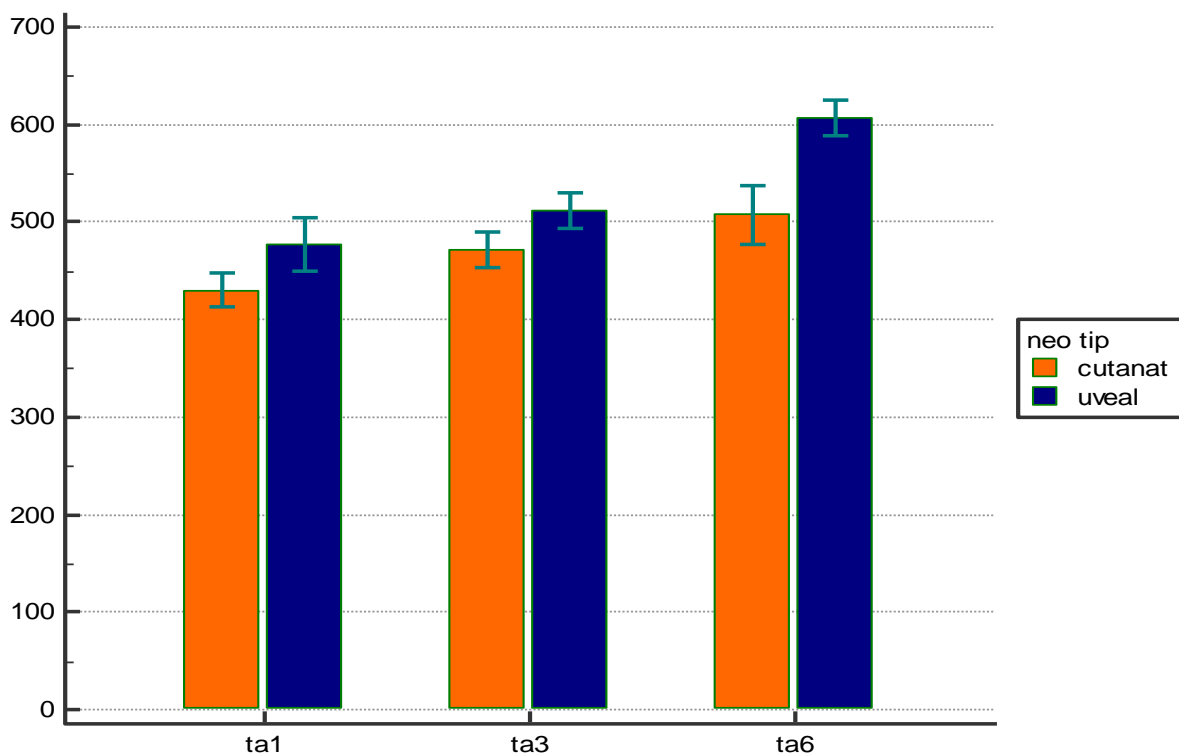


Fig. 28
Evoluția comparativă între valorile medii ale TA (tioli albuminici) pe cele două grupuri de studiu (melanoma cutanat și melanoma uveal)

Comparând și cel de-al treilea parametru de stres oxidativ investigat, care se referă la distrugerea oxidativă a proteinelor, măsurându-se tot un produs final și anume tiolii albuminici, se observă modificări semnificative între cele două loturi. Valorile sunt mai mari în cazul pacienților cu melanom uveal, confirmând încă odată ipoteza anterioară, prin care am afirmat că în melanomul uveal există un stress oxidativ mai mare decât cel care apare în urma tratamentului melanomului cutanat.

În etapa următoare a calculelor statistice s-au urmarit analize de regresie pentru parametrii investigați. Pentru început s-a efectuat o analiză de corelație în vederea identificării legăturilor dintre variabilele (mai precis determinările biochimice) efectuate. Această analiză are rolul de a urmări modul în care legăturile între variabile pot influența valoarea lor de markeri predictivi.

În analizele de regresie a markerilor stresului oxidativ luați câte doi, s-a observat corelație pozitivă doar între antioxidanții totali și peroxizii lipidici la prima determinare.

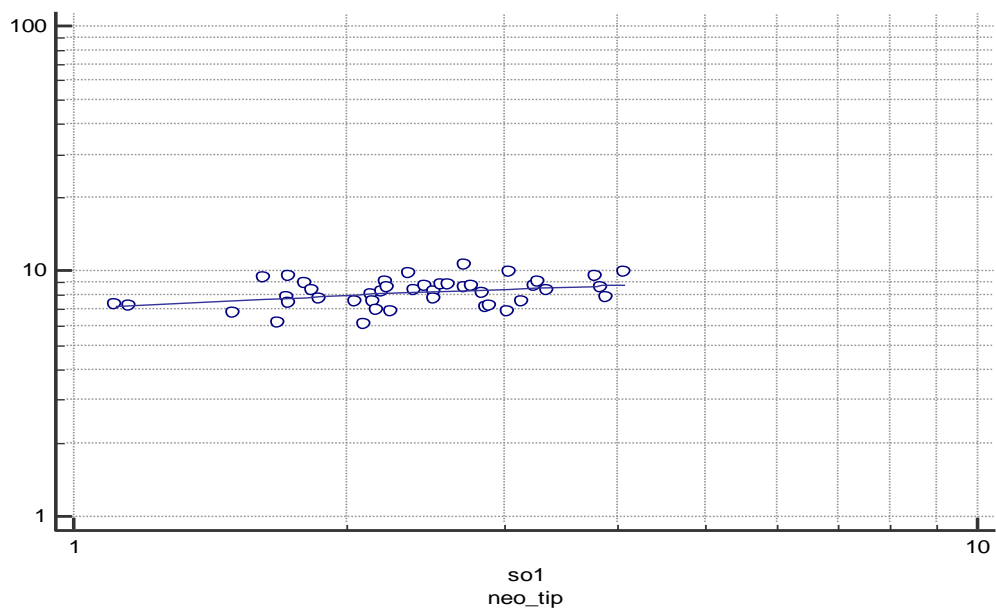


Fig. 29

Dreapta de corelație între SO1 (antioxidanții totali) și POL1 (peroxizii lipidici) în funcție de tipul de cancer. Observăm o corelație pozitivă medie între cei doi factori ($R=0.352$ $P=0.02$).

Interpretarea statistică efectuată în continuare analizează cazurile de melanom malign cutanat și uveal comparativ, rezultatele obținute indicând faptul că modelul ales în studiu este sustenabil. Drept urmare, în continuare au fost analizați parametrii biochimici de stres oxidativ. Valorile sunt redate în graficele următoare:

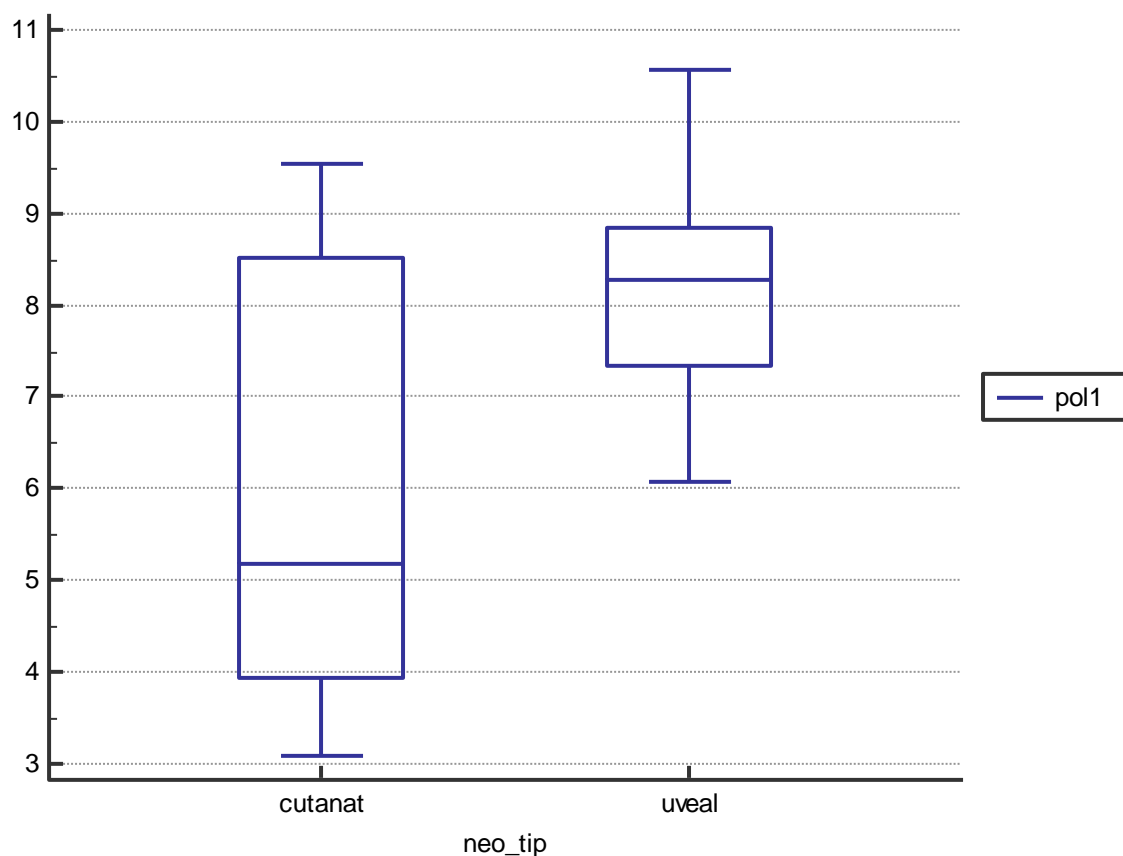


Fig. 30

Analiza comparativă a mediilor peroxidizilor lipidici pentru cele 2 populații de studiu (cutanat și uveal).

Din reprezentarea grafică a valorilor medii pe cele două grupe de pacienți investigați se observă că reacția de peroxidare lipidică este mai intensă în melanomul uveal față de cei cu melanom cutanat. Creșterea semnificativă aproximativ de trei ori poate fi dată de particularitățile metabolismului aerob în cele două organe diferite (ochi vs. piele). Deoarece pacienții cu melanom uveal au, în medie, valori mai mari decât cei cu melanom cutanat, putem afirma că stresul oxidativ, măsurat prin oxidarea lipidelor, este mai intens în melanomul uveal.

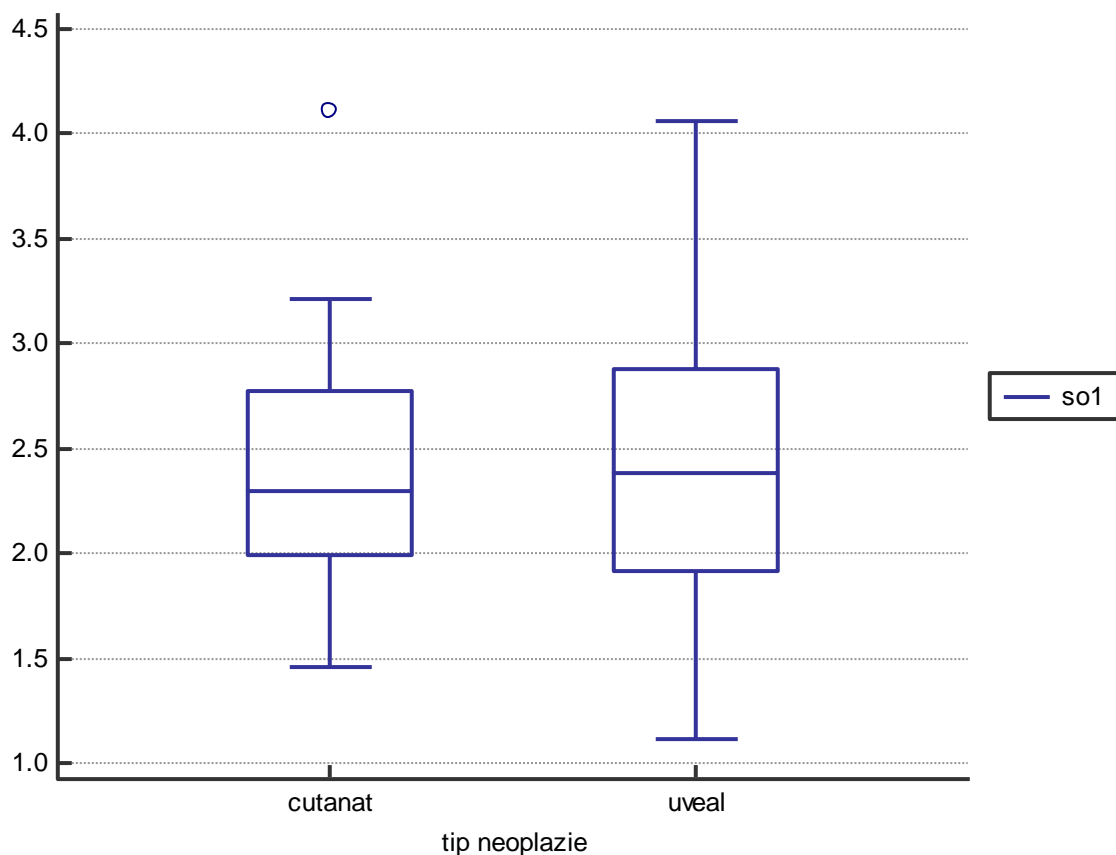


Fig. 31
 Analiza comparativa a mediilor antioxidanții totali (SO1) pentru cele 2
 populații de studiu (cutanat și uveal).

Comparând și valorile medii ale nivelurilor serice ale antioxidanților totali, ne așteptăm ca acestea să fie în același profil ca și peroxizii lipidici, adică să existe o creștere la pacienții cu localizare uveală față de cei cu localizarea cutanată. Valorile înregistrate nu confirmă supozițiile noastre, arătând că rezultatele sunt comparabile între cele două tipuri de cancer. Nivelurile antioxidanților cresc odată cu intensificarea reacțiilor de oxidare, ca urmare a încercării la nivel celular de a păstra balanța oxidare/reducere în relativ echilibru. Faptul că nu există diferențe semnificative între cele două loturi, chiar dacă în melanomul uveal nivelul oxidativ este mult crescut, ne îndreptățește să afirmăm că în aceasta localizare se instalează un stress oxidativ pronunțat, mai intens, cu o capacitate scăzută a sistemelor antioxidante endogene de a diminua

acest dezechilibru. Metabolismul aerob în melanomul uveal este pronunțat, distructiv, cu producere în exces de specii reactive de oxigen și cu o capacitate de homeostazie minima.

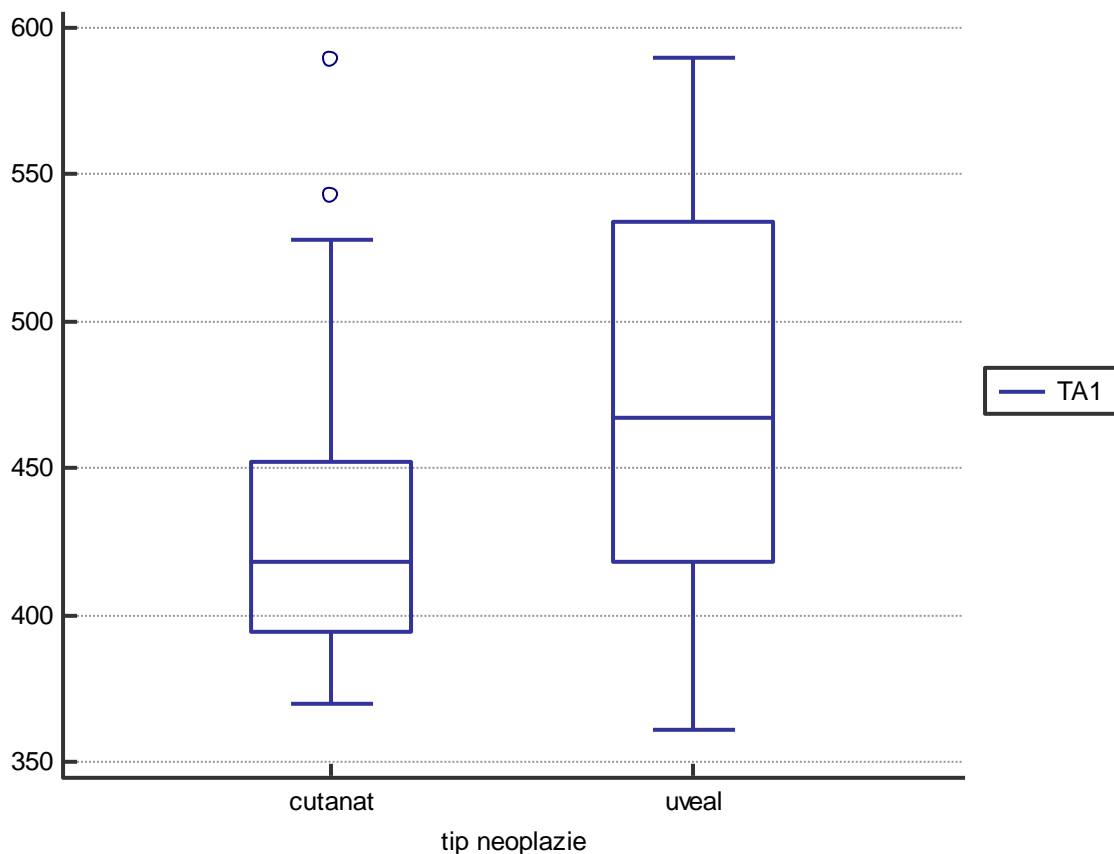


Fig. 32
Analiza comparative a valorilor medii tioli albuminici pentru cele 2 populații de studiu (cutanat si uveal).

Dacă în reacțiile de peroxidare lipidică valorile sunt semnificativ crescute pentru lotul cu melanom uveal, atacul speciilor reactive asupra proteinelor are drept rezultat creșterea tiolilor albuminici. Această creștere este de asemenea mai mare la pacienții cu melanom uveal. Astfel putem afirma cu certitudine că există modificări legate de metabolismul oxigenului în melanomul uveal față de cel cutanat. Stresul oxidativ instalat este mai mare la nivelul ochiului.

5. CONCLUZII

În prima etapă a cercetării am reușit crearea unui model experimental, pe șoareci de laborator, de melanom malign cutant care s-a dovedit stabil, fiabil și util pentru cercetare translațională, atât din punct de vedere morfologic cât și din punct de vedere biochimic.

Pentru această etapă nu am înregistrat modificări semnificative între tumorile induse din linii celulare diferite. In vivo celulele au reacționat probabil în alt mod decât reacționează ele în cultură, rezultând un pattern de creștere diferit. În urma inoculărilor de celule tumorale la animalele de experiență s-a obținut o tumoră experimentală, pentru care evoluția tumorală este dată de o creștere evolutivă funcție de timp. Tumora se caracterizează și printr-o perioadă de lag de până la 20 zile după care se înregistrează o creștere rapidă a volumului tumoral. Se observă o evoluție diferită dată de indivizi diferiți. În acest caz inocularea s-a efectuat cu un număr mai mare de celule, ceea ce a dus la o evoluție explozivă a tumorii care a crescut din primele momente ale inoculării, dar a determinat și moartea rapidă a animalului. Se poate sublinia încă o dată importanța numărului corect de celule care se grefează pentru a obține un model experimental fiabil și util.

Pentru tumorile experimentale obținute s-a observat că sunt tumori intens pigmentate, bine încapsulate, cu o consistență flască. Creșterea locală este invaziv infiltrativă în musculatura abdominală subiacentă. După o perioadă de timp toate prezintă necroză avansată.

În urma necropsiei animalelor purtătoare de tumori se observă ficat mărit, decolorat, friabil; splină mărită; rinichi decolorați, friabili; pulmonii cu aspect infiltrativ, limfonoduli traheobronșici măriți, cenușii; metastaze pulmonare nedecelabile macroscopic.

Tumorile au crescut după o perioadă de lag de 10 zile. Creșterea tumorală a fost înregistrată prin măsurarea diametrelor tumorale și calcularea volumului tumoral. Valorile obținute nu modifică aspectul curbei evolutive.

Stresul oxidativ poate afecta toate moleculele organice ale celulei, care devin ținta leziunilor : ADN, proteine, lipide, carbohidrați. Perspectivele pentru o intervenție terapeutică eficace pot eșua, dacă nu se cunoaște ținta inițială a stresului oxidativ. De exemplu, se știe că ADN este ținta inițială a leziunilor produse de adăugarea H_2O_2 în culturi celulare de mamifer, astfel încât rupturile lanțului de ADN apar înaintea peroxidilor lipidici „detectabili” sau a proteinelor oxidate „detectabile”. Metoda de detectare a leziunilor produse asupra unor

molecule țintă poate da informații incomplete; astfel, evidențierea lezării proteinelor prin detectarea radicalilor carbonil în stadii inițiale ale leziunilor poate fi negativă, dar determinarea oxidării gupărilor – SH, care se produce mai precoce, este pozitivă.

Am constatat existența a trei profile diferite în ce privește reacțiile de peroxidare lipidică, în funcție de fiecare țesut în parte: s-a observat o creștere continuă a nivelurilor de malondialdehidă (MDA); în ficat am observat o scădere a producerii MDA, ca urmare a supresiei a sistemului monooxigenazei; la nivel tumoral, reacția descrește ca urmare a modificării structurale a lipidelor (scăderea cantității de acizi grași polinesaturați de la nivel membranar).

Pe durata progresiei tumorale a avut loc o intensificare a metabolismului proteic, demonstrată prin rezultatele obținute de la nivelul tuturor țesuturilor investigate. Ficatul este, desigur, sediul sintezei proteice iar speciile reactive de oxigen au ca ținte preferențiale metalotioneinele și glutatationul. Se poate concluziona, deci, că tumora își dezvoltă propriile mecanisme de protecție, prin creșterea propriei sinteze de glutatation.

La finalizarea reacțiilor antioxidante, am obținut instalarea stresului oxidativ, ceea ce înseamnă un dezechilibru între producerea de specii reactive de oxigen, în detrimentul sistemelor naturale de antioxidanți care au capacitatea de a le reduce.

Aceste rezultate au demonstrat, ca atare, posibilitatea obținerii de tumori maligne in vivo prin inocularea la animalul de laborator de celule transformate. Mai mult, creșterea/progresia tumorală s-a dovedit fi asociată cu un stres oxidativ ce poate fi incriminat a fi implicat în activarea mecanismelor de angiogeneză (prin concentrații mici de specii reactive de oxigen).

Melanomul experimental obținut poate fi un instrument de lucru viabil pentru cercetările ulterioare. Modelul este reproductibil, caracteristicile anatomice, biochimice, agresivitatea, specificul evoluției tumorii nu se modifică, ceea ce ne îndreptățește să afirmăm că am obținut un tip tumoral - unealtă utilă în cercetările translaționale, adică de la experimentele realizate pe culturi celulare, furnizoare de material pentru determinările in vivo, se poate trece la etapa următoare, de cercetare clinică.

Până în prezent medicina/cercetarea translațională a fost mai mult un concept linear integrat în abordările tradiționale (academice) de a oferi terapii specifice diferitelor afecțiuni (din cercetare în clinică), fără a se acorda atenția cuvenită cercetării orientate spre pacient care implică înțelegerea cauzei primare a bolii și tratamentele ei (din clinică în cercetare). De

asemenea, nu s-a acordat suficientă atenție mai multor aspecte socio-economice care sunt asociate cu cercetarea sau medicina. De aceea au fost propuse noi definiții bazate pe înțelegerea bi- sau multidirecțională a cercetării/medicinii translaționale, care ar presupune în final transferarea progreselor obținute din cercetarea experimentală în stadiul clinic.

Mai departe, încercând a aplica rezultatele din modelul experimental (din laborator) la pacienții înrolați în studiu, am investigat în dinamica tratamentului aplicat parametrii biochimici de stres oxidativ, considerând ca aceștia pot furniza date suplimentare legate de metabolismul celulei transformate malign, date care să se coreleze cu procesul de angiogeneză și nu în ultimul rând date legate de evoluția distructivă a celulelor maligne, urmărindu-se în egală măsură și eficiența tratamentului. Urmărindu-se în dinamică, se observă la toți pacienții investigați creșterea intensității reacției măsurate, sugerându-se, așa cum sunt prezentate datele și în literatura de specialitate, că **prezența tumorală se asociază cu o creștere a stresului oxidativ**, dar exereza chirurgicală poate induce scăderea acestuia. Este de remarcat că reacția de peroxidare lipidică este o reacție cu mecanism înlanțuit, efectele măsurate sunt totale, chiar și cele la distanță, sugerând astfel creșterea concentrației produsului final măsurat. Deoarece acest parametru singur nu poate să ofere un tablou complet, s-au măsurat și tiolii albuminici, măsură a intensității degradării proteinelor sub atacul speciilor reactive radicalice ale oxigenului. Se poate afirma că **proteinele nu reprezintă ținta primară a atacului oxidativ**. Valorile antioxidanților totali urmăriți în dinamică cresc individual, sugerându-se activarea sistemelor naturale de protecție antioxidantă, ca răspuns la un stres oxidativ instalat, dat de starea de boală. Este greu a se afirma dacă această creștere este dată numai de antioxidanții endogeni, deoarece nu s-a făcut un studiu – chestionar asupra aportului de antioxidanți exogeni. Considerăm ca fiecare pacient este propriul său martor și valorile înregistrate sunt raportate la valoarea inițială, bănuim că nu au intervenit modificări esențiale ale stilului de viață pe parcursul perioadei de investigații. Se poate afirma cu certitudine că **tumora este un factor de stres oxidativ** la care organismul reacționează la nivel celular. Parametrii investigați prezintă valori concordante cu starea de sănătate și pot fi utilizați în monitorizarea pacienților.

În ce privește pacienții cu melanom uveal, creșterea grupărilor tiol-albuminice totale față de normal (valori normale considerate: peroxidii lipidici – 0-4 micromoli/100mililitri de ser; grupările tiol-albuminice - 350-450 micromoli/100ml; nivelul antioxidanților totali - 0,9-1,6 micrograme/litru) sugerează scindare a proteinelor, ulterior cu eliberare a grupărilor tiol și

creșterea concentrației plasmatice, dacă ținta principală a atacului oxidativ sunt lipidele. Ca atare, se observă că și proteinele sunt afectate prin creșterea grupărilor tiol circulante, fiind sugerată **intensificarea stresului oxidativ relativ la metoda terapeutică aplicată.**

Prin creșterea nivelului antioxidanților totali (exces al speciilor reactive de oxigen/SRO) se deduce incapacitatea/depășirea sistemelor de captare și contracarare a acestora, în special în ultimele determinări, global vorbind, în condițiile cele mai probabile ale progresiei bolii neoplazice

Radioterapia este în sine inductoare de stres oxidativ. Există o particularitate a acestui tip de tratament, care afectează în mare număr și celule normale ale organismului, asociată cu un nivel de radicali liberi în exces față de cel indus de prezența tumorii; după oprirea mecanismului atribuit terapiei, se epuizează substratul, iar principala sursă de radicali liberi rămân lipidele celulelor tumorale.

Cu privire la grupul tratat strict prin enucleere, se observă creșterea nivelului radicalilor liberi încă după prima determinare; se conturează două ipoteze: prima ipoteză este cea a declanșării unei reacții în cascadă de producere a radicalilor liberi circulanți, care continuă după îndepărtarea chirurgicală a tumorii (cel puțin a celei primare, detectabilă clinic); a doua ipoteză este că stresul oxidativ și nivelul radicalilor liberi, cel puțin la primele determinări, este crescut prin trauma chirurgicală în sine.

Rolul speciilor reactive de oxigen la nivel celular este unul dual. Când SRO sunt în concentrație mică, ele au un rol în semnalizarea celulară, convertind fenotipul celular la angieneză și neovascularizație, care contribuie la creșterea și proliferarea tumorii. Pe de altă parte, când producția de SRO este în exces, aceasta devine distructivă și lezează celulele tumorale. Generarea stresului oxidativ în cursul procesului de creștere și dezvoltare tumorală este evidențiată în special prin stimularea peroxidării lipidice, proces în urma căruia sunt generate numeroase aldehide cu caracter electrofil, compuși stabili care pot difuza în interiorul celulei exercitând mai multe efecte citotoxice. În plus, produșii de peroxidare lipidică ar putea fi responsabili de blocarea ciclului celular și/sau a mecanismelor apoptotice, ducând la scăderea eficacității terapeutice și instalarea rezistenței la tratament. Excesul de produși de peroxidare lipidică poate inhiba progresia ciclului celular prin blocarea kinazelor dependente de ciclone, menținând celulele tumorale în faza G0, prelungirea fazei G1 și întârzierea intrării în faza S, reducându-se rata de proliferare a celulelor tumorale. Deși stresul oxidativ intens ar putea fi

eficient în inducerea citotoxicității tumorale, stresul oxidativ moderat indus ar putea avea efecte contrare, contribuind la dezvoltarea mecanismelor de rezistență, scăzând eficacitatea terapeutică. Mai mult, numeroase studii in vivo și in vitro susțin că celulele și țesuturile tumorale suferă un stres oxidativ intens, cronic, subletal, comparativ cu celulele normale, chiar și în lipsa unor stimulări exogene prealabile, fiind absolut necesară pentru viabilitatea și creșterea tumorală. **Stresul oxidativ intens intratumoral poate juca un rol important în procesul de invazie tumorală și metastazare.**

Acțiunea metaboliților activi ai oxigenului la nivelul proteinelor structurale sau enzimatiche determină denaturarea acestora. Un factor hotărâtor în aceasta reacție de oxidare a grupărilor –SH proteice de către SRO este cel steric. Expunerea grupărilor tiolice din proteine este esențială. Așa se explică creșterea sensibilității la oxidare a proteinelor denaturate (această proprietate este utilizată ca o metodă eficientă de identificare a conținutului în grupări tiolice, precum și pentru identificarea structurii secundare și terțiare a proteinelor). Prin degradarea oxidativă se inhibă activitatea enzimatică, ca urmare a modificării centrului catalitic activ (datorită oxidării grupărilor tiolice sau hemului, dar și prin degradări oxidative ale ciclurilor aromatice din structura unor aminoacizi). Proteinele structurale se inactivează din cauza modificărilor induse de reacțiile de polimerizare, ramificare sau scindare indusă lanțurilor polipeptidice de către SRO.

În foarte multe afecțiuni umane, stresul oxidativ este doar o consecință, nu o cauză, a procesului patologic al bolii. Lezarea țesuturilor de către agenți agresori ca: infecții, traumatisme, toxine, temperaturi extreme, etc., duce la supraproducția unor „mediatori ai leziunilor” ca: *prostaglandine, leucotriene, interleukine și citokine* (ca *factorul tumoral al necrozei – TNFs*), care joacă un rol important în producerea leziunilor tisulare. În celula neoplazică însă, instalarea dezechilibrului dintre producția de specii reactive de oxigen și eliminarea radicalilor liberi conduce la o stare de stres oxidativ și la distrugerea unor componente esențiale ale celulei. Mai multe studii atestă faptul că stresul oxidativ rezultat din acest dezechilibru, are un rol cauzator dar este și o consecință a carcinogenezei, interferând cu toate fazele acestui proces, cum ar fi inițierea, promovarea, progresia, invazia și metastazarea.

Sunt necesare studii suplimentare pentru a stabili dacă acești biomarkeri sunt prognostici sau dacă pot fi utilizați pentru a monitoriza răspunsul și eficiența tratamentului oncologic, de o manieră relevantă pentru practica medicală curentă.

6. BIBLIOGRAFIE

1. 4. Gloster HM Jr, Brodland DG. *The epidemiology of skin cancer*. Dermatol Surg 1996; 22:217.
2. 5. Jerant AF, Johnson JT, Sheridan CD, Caffrey TJ "Early detection and treatment of skin cancer". Am Fam Physician 2000 **62** (2): 357–68, 375–6, 381–2.
3. Geisler J, Bachmann IM, Nyakas M, Helsing P, Fjøsne HE, Mæhle LO, et al. *Malignant melanom-diagnostikk, behandling og oppfølging i Norge* 2154-8.
4. Kanavy HE, Gerstenblith MR. *Ultraviolet radiation and melanoma*. Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery. 2011. p. 222–8.
5. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. *Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation*. N Engl J Med. Jun 30 2011;364(26):2507-16.
6. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: *Melanoma* v.2. Disponibil la adresa http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/melanoma.pdf. Accesat pe 15 august 2014.
7. Kumar, Vinay. "Uvea: Neoplasms". Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Professional Edition (8th ed.). 2009 Philadelphia, PA: Elsevier.
8. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. *Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?*. Free Radic Biol Med. 2010;49(11):1603–1616. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006.
9. Liou GY, Storz P. *Reactive oxygen species in cancer*. Free Radic Res. 2010;44(5):479–496. doi:10.3109/10715761003667554.
10. Opariuc-Dan, C., *Statistică aplicată în științele socio-umane. Noțiuni de bază. Statistici univariate*. Cluj-Napoca, Edit. ASCR, 2009.
11. Poulsen, J. and A. French, *Discriminant function analysis*. Retrieved from, 2008.
12. Colton, T., *Regression and correlation*. Statistics in medicine, 1974. 189.
13. Baicus C. *Dicționar de epidemiologie clinică și medicină bazată pe dovezi*. Editura Medicală, București 2002, p.54-55.
14. **Popescu A., Haidar A., Anghel R. "Treating malignant melanoma when a rare BRAF V600M mutation is present: case report and literature review". ROM. J. INTERN. MED., 2018, 56, 2, 122–126.**
15. **Popescu A, Anghel R. Tyrosine-kinase Inhibitors Treatment in Advanced Malignant Melanoma. MAEDICA – a Journal of Clinical Medicine 2017; 12(4): 293-296.**