Anexa nr. 2 la H.S. nr. 160/17740/26.07.2023

“VICTOR BABEȘ” UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY FROM TIMISOARA

FACULTY OF MEDICINE

Department V – INTERNAL MEDICINE I

GOJE IACOB-DANIEL

PHD THESIS

THE EFFECT OF SGLT2 INHIBITORS IN THE PREVENTION OF ANTHRACYCLINE-INDUCED CARDIOTOXICITY: INTEGRATIVE EXPERIMENTAL STUDY USING ANIMAL MODEL

A B S T R A C T

Scientific Coordinator:

PROF. UNIV. DR. LIGHEZAN DANIEL-FLORIN

T i m i ș o a r a

2026

A B S T R A C T

Introduction

Doxorubicin is an anthracycline with high antitumor efficacy and is widely used in hematologic malignancies, where it is part of the CHOP and R-CHOP regimens. Its use is limited, however, by a dose-dependent cardiotoxicity that may progress to dilated cardiomyopathy and heart failure. The cardioprotective agents currently available offer only partial protection and are supported by a modest level of evidence, which is why new therapeutic options are actively being sought. Sodium–glucose cotransporter 2 inhibitors (SGLT2i), in particular empagliflozin, have demonstrated cardiovascular benefits independent of glycemic control, and their mechanisms of action overlap with the pathways through which doxorubicin injures the myocardium.

The patient with a hematologic malignancy faces a twofold risk situation: on the one hand, the malignant disease, whose cure depends on the administration of full anthracycline doses; on the other, the cumulative cardiotoxicity of treatment. As oncologic survival improves, treatment-related cardiac dysfunction has become an important cause of morbidity, which has led to the development of cardio-oncology as a field dedicated to the prevention and management of these complications. In this context, the identification of an effective, well-tolerated cardioprotective agent that does not compromise oncologic control represents a real need.

The thesis aimed to evaluate, in an experimental model, the cardioprotective effect of empagliflozin against doxorubicin-induced cardiotoxicity, combining classical evaluation methods with an original method for quantifying ventricular wall kinetics through machine learning. The work is founded on three articles published as first author: MDPI Pharmaceuticals, 2025; MDPI International Journal of Molecular Sciences, 2026; MDPI Medical Sciences, 2026.

GENERAL PART — Current state of knowledge

Anthracycline-induced cardiotoxicity results from several mechanisms acting simultaneously: oxidative stress with generation of reactive oxygen species, mitochondrial dysfunction, inhibition of cardiomyocyte topoisomerase II-beta, disruption of calcium homeostasis, and NLRP3 inflammasome-mediated inflammation. The risk increases with the

cumulative dose and is influenced by cardiovascular comorbidities, concomitant cardiotoxic therapies, sex, age, and genetic factors.

Surveillance of patients treated with anthracyclines relies on biomarkers (troponins, natriuretic peptides), imaging assessment of ventricular function (ejection fraction, global longitudinal strain, cardiac magnetic resonance), and risk-stratification algorithms such as the HFA-ICOS tool. The validated cardioprotective strategies — dexrazoxane, renin–angiotensin system inhibitors, beta-blockers and statins — have partial and heterogeneous efficacy, with a class IIa recommendation in high-risk patients. These limitations justify the interest in agents with a complementary mechanism.

SGLT2 inhibitors exert pleiotropic effects: they reduce oxidative stress and inflammation, improve myocardial energy metabolism and mitochondrial biogenesis, modulate calcium homeostasis, and attenuate fibrosis. In heart failure, they hold a class I indication, regardless of ejection fraction. Preclinical studies in doxorubicin cardiotoxicity models have shown that empagliflozin and dapagliflozin reduce fibrosis, improve ventricular function, and attenuate electrocardiographic changes, and observational clinical data in cancer patients have reported reductions in mortality and in the incidence of heart failure. This evidence supports the hypothesis of using SGLT2i in cardio-oncology, but derives predominantly from observational studies and requires rigorous experimental confirmation — the objective of the special part of the thesis.

SPECIAL PART — Personal research

Objectives and working hypothesis

The central hypothesis was that empagliflozin, at a dose of 10 mg/kg/day, significantly attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity without interfering with the systemic effects of the anthracycline. The specific objectives were: (i) to establish and validate a reproducible cardiotoxicity model; (ii) to characterize the electrocardiographic, biochemical and histopathological features of the injury and the effect of empagliflozin; (iii) to directly compare concomitant administration with preconditioning; (iv) to develop a method for quantifying cardiac kinetics through machine learning and to correlate it with electrophysiology; and (v) to validate cardioprotection at the cellular and tissue level by immunofluorescence.

The research was structured in two complementary studies, articulated around the same model. The five experimental groups allowed the effect of empagliflozin monotherapy to be dissociated from that of its combination with doxorubicin, and two administration strategies

to be compared: concomitant (group III) and preconditioning, with empagliflozin initiated 14 days before doxorubicin (group V). The first study characterized cardiotoxicity and cardioprotection using classical methods, establishing the biological reference; the second study, built on the same model, introduced quantification of cardiac kinetics via artificial intelligence and validated it by immunofluorescence, extending the evaluation beyond conventional parameters.

General methodology

The research was approved by the Institutional Ethics Committee of the "Victor Babeș" University of Medicine and Pharmacy in Timișoara (approval No. 40/23.07.2025). Adult male Sprague-Dawley rats were used, randomly assigned to five groups: control (I), empagliflozin (II), empagliflozin + doxorubicin (III), doxorubicin (IV), and empagliflozin-preconditioning + doxorubicin (V). Doxorubicin was administered intraperitoneally at 2.5 mg/kg every 48 hours, up to a cumulative dose of 15 mg/kg; empagliflozin was administered orally at 10 mg/kg/day. The empagliflozin dose of 10 mg/kg/day corresponds, through body-surface-area-based allometric scaling, to the same order of magnitude as the approved clinical doses. Groups I–IV followed a 14-day protocol, and group V, with the preconditioning phase, a 28-day protocol.

Obtaining the *in vivo* data required an invasive surgical approach: under general anesthesia with isoflurane and mechanical ventilation, tracheostomy and left lateral thoracotomy with pericardiotomy were performed to directly expose the heart. The electrocardiogram was recorded in lead DII from the exposed heart, with a CONTEC CMS6000 monitor. To avoid the losses associated with classical analog-to-digital conversion, the signal was obtained through direct digital interception of the device's Ethernet output: the network traffic was captured with Wireshark and converted into a voltage-time coordinate format, then processed with the WFDB package for noise filtering, R-peak detection, and isolation of the P-QRS-T complexes. The QTc interval was calculated using the Bazett formula.

For histopathological evaluation, the heart was sectioned from base to apex, fixed in 4% formaldehyde, and paraffin-embedded; hematoxylin-eosin staining was used to assess acute lesions, and Masson's trichrome staining to evaluate fibrosis. Lesions were semi-quantitatively graded by a pathologist blinded to group assignment.

The surgical approach was invasive: tracheostomy, left lateral thoracotomy, and pericardiotomy were performed under deep general anesthesia, without awakening the animal,

and euthanasia followed immediately after data acquisition was completed. The invasive nature is not an incidental limitation but an indispensable condition of the method, since only direct surgical exposure of the heart allows stereoscopic video acquisition, on which the reconstruction of contractile kinetics is based.

Study – Empagliflozin attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity – electrocardiographic, biochemical, and histopathological evidence

Method. The study included 30 rats (6 per group). ECG parameters (heart rate, PR, QRS, QT and QTc intervals, R- and T-wave amplitudes), the complete blood count, the biochemical profile and troponin I, as well as histopathological changes through hematoxylin-eosin and Masson's trichrome staining, were evaluated. Three animals died during the protocol (two in the DOX group, one in the EMPA + DOX group), the deaths being considered treatment-related.

Results. Doxorubicin induced significant electrocardiographic changes: a decrease in heart rate (276.8 ± 10.4 versus 301.0 ± 6.2 bpm in the control; p = 0.0111), prolongation of the QRS complex (29.65 versus 19.98 ms; p = 0.0004), of the PR interval (57.80 versus 42.15 ms; p = 0.0004) and of the QT interval (125.10 versus 74.98 ms; p = 0.0006), with prolongation of the QTc interval from 167.9 to 268.7 ms (p = 0.0014). The R-wave amplitude decreased (0.57 versus 0.87 mV), and the T wave became negative (−0.19 versus 0.34 mV). Empagliflozin significantly corrected these changes in both regimens, with values approaching those of the control (groups III and V). The prolongation of the conduction and repolarization intervals, together with T-wave negativization, outlines an arrhythmogenic substrate; the preservation of these parameters with empagliflozin indicates stabilization of the electrophysiological substrate, not merely an improvement in the tracing. There were no significant differences between groups III and V, confirming the equivalence of the two regimens at the electrocardiographic level.

Biochemically, doxorubicin produced severe myelosuppression, with marked leukopenia (0.57 versus 6.21 × 109/L; p = 0.002), anemia, and thrombocytopenia. Troponin I increased significantly in the DOX group (0.20 ± 0.03 versus 0.09 ± 0.02 ng/mL; p = 0.002) and was reduced by empagliflozin, both with concomitant administration (0.14 ng/mL; p = 0.037) and through preconditioning (0.13 ng/mL; p = 0.010). An important oncologic finding was that empagliflozin did not modify myelosuppression, indicating a cardio-selective effect without

interfering with anthracycline cytotoxicity. Aspartate aminotransferase (AST) was elevated in the DOX group, whereas ALT and LDH did not follow the same pattern, suggesting that AST values predominantly reflect myocardial and muscle injury. Empagliflozin did not significantly modify the hepatic enzyme profile. The cumulative dose of 15 mg/kg faithfully reproduced the cardiotoxicity phenotype reported in the literature, confirming the validity of the model.

Histopathologically, the lesions were systematized into acute reaction patterns (cardiomyocyte vacuolization and loss of transverse striations, diffuse inflammatory infiltrate, thinned and elongated cardiomyocytes) and chronic patterns (interstitial fibrosis and cardiomyocyte atrophy). The DOX group showed the most severe lesions – moderate vacuolization and atrophy, extensive fibrosis with interstitial collagen deposition, whereas in the control and empagliflozin-monotherapy groups the myocardium had a normal appearance. In the empagliflozin-treated groups, these acute and chronic lesions were visibly attenuated, with superior preservation of the myocardial architecture. There were no significant differences between concomitant administration and preconditioning at any evaluation level.

Body-weight dynamics reflected the systemic toxicity of doxorubicin: control animals gained weight (423.8 versus 451.2 g; $p = 0.004$), whereas the groups exposed to doxorubicin lost weight significantly (group III: 432 versus 392 g, $p < 0.001$; group IV: 423 versus 383 g, $p = 0.004$), and empagliflozin monotherapy did not change weight.

The three evaluation levels were concordant: the group treated exclusively with doxorubicin exhibited the most severe electrical alterations, the highest troponin values, and the most extensive structural lesions, while the empagliflozin groups (groups III and V) at each level occupied an intermediate position close to the control.

Conclusions. Empagliflozin (10 mg/kg/day) attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity at the electrocardiographic, biochemical, and histopathological levels, without influencing myelosuppression. Concomitant initiation was as effective as preconditioning, suggesting that a separate pretreatment is unnecessary.

Study – Empagliflozin as a cardioprotective agent in doxorubicin-induced cardiotoxicity – integrative assessment of cardiac kinetics using artificial intelligence and immunofluorescence.

Method. The study included 18 rats, assigned to the same five groups, in accordance with the previously validated protocol. Obtaining the *in vivo* kinetic data was possible exclusively

through the invasive surgical approach: after tracheostomy and left lateral thoracotomy with pericardiotomy, the beating heart was directly exposed, and the epicardial surface was recorded with a dual-lens stereoscopic video system (1280 × 480 px, 60 frames per second), geometrically calibrated through a checkerboard procedure. The 60-frames-per-second rate was necessary to accurately sample the rat's fast cardiac cycle, and each acquisition generated thousands of depth frames per heart, which were subsequently processed offline. The image stream was processed through an artificial-intelligence pipeline: heart segmentation with the SAM2 model, depth estimation with MiDaS, three-dimensional "point-cloud" reconstruction, and its segmentation with the DBSCAN algorithm. From five geometric per-frame descriptors, temporally aggregated and normalized, a composite cardiotoxicity score on a 1-to-10 scale was derived in a fully unsupervised manner. A composite electrocardiographic index, built by the same methodology from independent data, served as a reference. Cardioprotection was further validated by immunofluorescence, with objective quantification of fluorescence intensity, for cardiac troponin I (cTnI), connexin 43 (Cx43), vimentin, and α-SMA, on isolated cardiomyocytes and paraffin-embedded myocardial tissue.

The analysis pipeline comprised four stages. Heart segmentation was performed with SAM2, starting from a single-point prompt at the frame center, automatically propagated across all 3000 frames. Depth estimation with MiDaS allowed the three-dimensional reconstruction, in which the heart appears as a dome whose apex oscillates at the cardiac frequency (~5 Hz, approximately 300 beats per minute in control hearts); a Fourier-domain band-pass filter removed the slow perfusion-pressure drift (0.1–4.0 Hz), retaining the cardiac band. From each frame, five descriptors were extracted – cluster count, noise ratio, cluster size and compactness, and fragmentation index, temporally aggregated by mean and standard deviation into nine subject-level features. After Z-score standardization and sign harmonization (so that a higher value consistently indicated a more affected state), the nine features were averaged into a composite index and linearly rescaled to the 1–10 interval. The same procedure was applied independently to the six electrocardiographic parameters to build the composite ECG index – a methodological symmetry that enabled cross-validation between two independent data streams.

At the end of the recording, the hearts were excised, cannulated at the ascending aorta, and subjected to enzymatic digestion with collagenase and trypsin to isolate cardiomyocytes, which were subsequently cultured in supplemented medium. Immunofluorescence was performed on isolated cardiomyocytes and ventricular tissue sections using anti-cTnI, anti-Cx43, anti-vimentin, and anti-α-SMA primary antibodies, with DAPI nuclear counterstaining,

under identical exposure settings across groups. Quantification was performed in ImageJ by an investigator blinded to group assignment: for each marker, eight microscopic fields per group were analyzed, and the mean fluorescence intensity was calculated as the ratio of integrated density to area. Differences were tested using one-way ANOVA with Dunnett's post hoc test against the doxorubicin group.

Statistical analysis. Normality was tested using the Shapiro-Wilk test; correlations were evaluated using Pearson and Spearman coefficients, with 95% confidence intervals obtained via Fisher's z-transformation and false discovery rate control via the Benjamini-Hochberg procedure. Immunofluorescence differences were tested by one-way ANOVA with Dunnett's post-hoc test against the doxorubicin group. Analyses were performed in Python (v3.12).

Results. The cardiotoxicity point cloud score was normally distributed (Shapiro-Wilk, $p = 0.168$), whereas five of the six individual ECG parameters were non-normal, so the Spearman coefficient was the primary statistic. The score correlated strongly with the electrocardiographic parameters: the QT interval ($\rho = +0.915$; 95% CI 0.783–0.968), QRS duration ($r = +0.941$; 95% CI 0.845–0.978), and the PR interval ($\rho = +0.866$; 95% CI 0.671–0.949), all with $p < 0.001$. Strong negative correlations were observed for R-wave amplitude ($\rho = -0.788$), heart rate ($\rho = -0.865$), and T-wave amplitude ($\rho = -0.704$). The correlation with the composite electrocardiographic index was near-complete (Spearman $\rho = +0.924$, 95% CI 0.803–0.972; Pearson $r = +0.954$, 95% CI 0.879–0.983; both $p < 0.001$), all seven comparisons remaining significant after Benjamini-Hochberg correction.

The strongest individual association was with the QT interval, a recognized marker of cardiotoxicity, indicating that the spatial fragmentation and noise in the point cloud directly reflect the electrical instability associated with abnormal repolarization. The negative correlations with R- and T-wave amplitudes and heart rate reflect the loss of viable myocardium and the bradycardia characteristic of the severe cardiotoxicity phenotype. The comparative analysis of the scores for all 18 subjects confirmed the clear separation of the groups: control and empagliflozin-treated hearts remained in the low-severity range, while doxorubicin-exposed hearts shifted toward the high-toxicity range, the algorithm thus reproducing the protection gradient conferred by empagliflozin. The score correctly staged severity: all four control hearts scored below 4.0, all five DOX hearts exceeded 7.3, and the empagliflozin-treated groups occupied the intermediate range.

The yield of isolated cardiomyocytes was lower in doxorubicin-treated hearts, suggesting fewer viable cells and greater fragility. Immunofluorescence, objectively quantified, confirmed, under empagliflozin, the preservation of the sarcomeric pattern (cTnI) and of the gap junctions (Cx43), as well as the reduction in the expression of stromal-activation markers (vimentin, α-SMA).

At the tissue level, in the doxorubicin group, cTnI was reduced and discontinuous, Cx43 showed partial loss of membrane organization, and the interstitial expression of α-SMA and vimentin increased, indicating cardiomyocyte injury and stromal activation; these changes were attenuated in the empagliflozin-treated groups. The direct comparison of the two empagliflozin regimens revealed significant differences only for vimentin (in isolated cardiomyocytes) and α-SMA (in tissue), confirming that preconditioning was not consistently superior to concomitant administration.

Conclusions. The kinetic score, derived via machine learning from epicardial surface motion obtained on the surgically exposed heart, correlates closely with electrocardiographic parameters of cardiotoxicity and detects the cardioprotective effect of empagliflozin. Quantitative immunofluorescence confirms this protection at the cellular and tissue levels.

GENERAL DISCUSSION

The results of the two studies are convergent: the electrical, biochemical, structural, kinetic, and molecular changes varied together, the group treated exclusively with doxorubicin showing the most severe alterations at every level, and the empagliflozin-treated groups occupying intermediate positions. The very high correlation between the kinetic score and the electrocardiographic index indicates that mechanical deformation of the ventricular wall and electrical instability reflect the same injury process, and that the spatial fragmentation detected by the algorithm corresponds to the structural degradation documented histopathologically and by immunofluorescence.

The cardioprotective effect of empagliflozin is explained by its action on several mechanisms of cardiotoxicity: reduction of oxidative stress, restoration of calcium homeostasis (limiting the arrhythmogenic substrate and shortening the QTc interval), attenuation of inflammation, and improvement of energy metabolism. Doxorubicin affects the sarcoplasmic reticulum, inhibits SERCA, and activates ryanodine receptors, increasing cytosolic calcium and prolonging the QT/QTc interval; empagliflozin contributes to the restoration of calcium balance

by lowering the intracellular sodium/calcium ratio, which mechanistically explains the preserved electrical stability observed. At the structural level, the attenuation of fibrosis and cardiomyocyte atrophy, together with the preservation of the sarcomeric pattern and of the gap junctions shown by immunofluorescence, corresponds to protection against the remodeling that underlies progression to heart failure. The cardio-selective nature of the protection, demonstrated by the absence of any effect on myelosuppression, is particularly relevant for the hematologic patient, in whom full anthracycline doses are needed for disease control; an agent that protects the heart without diminishing antitumor cytotoxicity meets the desired profile of an oncologic cardioprotectant.

The results are concordant with the existing preclinical data. Previous studies in doxorubicin cardiotoxicity models have reported that empagliflozin reduces fibrosis and prevents prolongation of the QT and QTc intervals, and that dapagliflozin attenuates the decline in ventricular function, suggesting a class effect of SGLT2 inhibitors on electrophysiological and structural stability. Our data extend these observations through integrated characterization – electrocardiographic, biochemical, histopathological, kinetic, and molecular – within the same model, and through the direct correlation between mechanical kinetics and electrophysiology. The bradycardia observed in the doxorubicin group, apparently paradoxical compared with the clinically described compensatory tachycardia, is consistent with recent data showing that doxorubicin can directly impair sinus node function in rodents and should not be extrapolated to the human chronotropic response.

A strength of the research is the integrated evaluation, in which each level of analysis confirms and contextualizes the others: the electrocardiographic changes are supported by the rise in troponin, explained by the histopathological lesions and correlated with the kinetic score and with the immunofluorescent expression of the markers. This overlap of several independent methods reduces the risk of error and lends the conclusions a robustness that a single parameter could not have provided. The cross-validation between the kinetic score and the electrocardiographic index, obtained from entirely independent data streams, represents, in this respect, the central methodological element of the study.

The studies in this thesis are also complementary in their applicability. The first study provides efficacy data obtained through classical methods, directly comparable with the existing preclinical literature and therefore easy to integrate into the body of evidence on SGLT2 inhibitors in anthracycline cardiotoxicity. The second study proposes a new methodological tool that, once standardized and validated in larger cohorts, could standardize and validate the assessment of cardiotoxicity in future preclinical research, offering a sensitive

functional endpoint for testing other cardioprotective agents. Together, they address both the immediate need for evidence of efficacy and the longer-term need for more precise and objective measurement methods.

The kinetic quantification method introduces, unlike the current applications of artificial intelligence in cardio-oncology (centered on risk prediction from clinical data), a direct and objective measurement of the mechanical phenomenon of contraction. The study also has limitations: the small size of some groups, the preclinical nature of the model, the absence of dedicated molecular mechanistic assays, and the exclusive use of non-diabetic males. The kinetic method relies on an invasive surgical approach (thoracotomy) and, at this stage, is an experimental phenotyping tool rather than a clinical monitoring technique.

Future directions include the validation of the kinetic method in larger cohorts, with assessment of reproducibility, the molecular mechanistic investigation of the pathways involved (oxidative stress, mitochondrial biogenesis, inflammasome signaling), extension to both sexes and to models with metabolic comorbidities, as well as the initiation of prospective, randomized clinical trials dedicated to cancer patients treated with anthracyclines. In patients with a hematologic malignancy, in whom CHOP and R-CHOP regimens require full anthracycline doses, the integration of a cardio-selective, well-tolerated cardioprotective agent with demonstrated cardiovascular benefits, such as empagliflozin, could complement the current armamentarium, with the added advantage of initiation concomitant with the first chemotherapy cycle.

FINAL CONCLUSIONS AND PERSONAL CONTRIBUTIONS

The research demonstrates that empagliflozin confers significant and quantifiable cardioprotection against doxorubicin-induced cardiotoxicity. The main conclusions are: (i) the cardiotoxicity model with a cumulative dose of 15 mg/kg was established and reproducibly validated; (ii) empagliflozin attenuates electrocardiographic alterations, reduces troponin I and diminishes acute and chronic histopathological lesions; (iii) the protection is cardio-selective, without interference with myelosuppression; (iv) preconditioning brings no benefit superior to concomitant administration; (v) the kinetic score derived through machine learning correlates highly significantly with electrophysiology and detects the cardioprotective effect; and (vi) quantitative immunofluorescence confirms the protection at the cellular and tissue level.

The main personal contributions are: (i) the development of an original method for quantifying cardiac kinetics through unsupervised machine learning, applied to the surgically

exposed heart; (ii) the internal validation of the score by correlation with a composite electrocardiographic index; (iii) the direct comparison of two empagliflozin administration strategies; (iv) the integrated multimodal characterization of injury and cardioprotection; (v) the use of a multimarker immunofluorescence panel, objectively quantified, simultaneously on isolated cardiomyocytes and on tissue; (vi) and the demonstration of the cardio-selective nature of SGLT2i. Through these results, the thesis provides solid preclinical arguments for the evaluation of SGLT2 inhibitors as cardioprotective agents in patients treated with anthracyclines and proposes a new, objective tool for assessing myocardial injury and protection, with relevance for the patient with a hematologic malignancy.

Overall, the present doctoral thesis provides a coherent and convergent characterization of the cardioprotection conferred by empagliflozin, obtained through independent methods that corroborate one another – from electrocardiogram and troponin to histopathology, to the kinetic score derived through artificial intelligence, and to quantitative immunofluorescence. This integrated framework, together with the original method for quantifying cardiac kinetics, constitutes the thesis's main contribution to experimental cardio-oncology research and supports continued investigation of SGLT2 inhibitors in this indication.

The results obtained are preclinical and must be confirmed through additional mechanistic studies and, subsequently, through prospective, randomized clinical trials in cancer patients exposed to anthracyclines before a therapeutic recommendation can be based on them. Through the experimental evidence provided and the proposed methodological tool, the thesis offers a solid basis for these stages and contributes to efforts to integrate empagliflozin into anthracycline-cardiotoxicity prevention strategies, with potential benefit for patients with hematologic malignancies.

Anexa nr. 2 la H.S. nr. 160/17740/26.07.2023

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ŞI FARMACIE

“VICTOR BABEȘ” DIN TIMISOARA

FACULTATEA DE MEDICINĂ

Departamentul V – MEDICINĂ INTERNĂ I

GOJE IACOB-DANIEL

TEZĂ DE DOCTORAT

EFECTUL INHIBITORILOR DE SGLT2 ÎN PREVENȚIA CARDIOTOXICITĂȚII INDUSE DE ANTRACICLINE: STUDIU EXPERIMENTAL INTEGRATIV PE MODEL ANIMAL

R E Z U M A T

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. LIGHEZAN DANIEL-FLORIN

T i m i ș o a r a

2026

R E Z U M A T

Introducere

Doxorubicina este o antraciclină cu eficacitate antitumorală ridicată, folosită pe scară largă în neoplaziile hematologice, unde intră în componența schemelor CHOP și R-CHOP. Utilizarea ei este însă limitată de o cardiotoxicitate dependentă de doză, care poate evolua spre cardiomiopatie dilatativă și insuficiență cardiacă. Agenții cardioprotectori disponibili în prezent oferă o protecție parțială, cu un nivel de evidență modest, motiv pentru care se caută activ noi opțiuni terapeutice. Inhibitorii cotransportorului sodiu-glucoză de tip 2 (iSGLT2) au demonstrat beneficii cardiovasculare independente de controlul glicemic, iar mecanismele lor de acțiune se suprapun cu căile prin care doxorubicina lezează miocardul.

Pacientul cu neoplazie hematologică se află într-o dublă situație de risc: pe de o parte, boala malignă, a cărei vindecare depinde de administrarea dozelor complete de antraciclină; pe de altă parte, cardiotoxicitatea cumulativă a tratamentului. Pe măsură ce supraviețuirea oncologică se ameliorează, disfuncția cardiacă asociată terapiei devine o cauză importantă de morbiditate, ceea ce a dus la dezvoltarea cardio-oncologiei ca domeniu dedicat prevenirii și gestionării acestor complicații. În acest context, identificarea unui agent cardioprotector eficient, bine tolerat și care să nu compromită controlul oncologic reprezintă o nevoie reală.

Teza a urmărit să evalueze, pe un model experimental, efectul cardioprotector al empagliflozinei (iSGLT2) împotriva cardiotoxicității induse de doxorubicină, combinând metodele clasice de evaluare cu o metodă originală de cuantificare a cineticii peretelui ventricular, bazată pe învățare automată (ML). Lucrarea de față este fundamentată pe trei articole publicate în calitate de prim autor: MDPI Pharmaceuticals, 2025; MDPI International Journal of Molecular Sciences, 2026; MDPI Medical Sciences, 2026.

PARTEA GENERALĂ – Stadiul actual al cunoașterii

Cardiotoxicitatea indusă de antracicline rezultă din mai multe mecanisme care acționează concomitent: stresul oxidativ, cu generarea de specii reactive de oxigen, disfuncția mitocondrială, inhibarea topoizomerazei II beta cardiomiocitare, perturbarea homeostaziei calciului și inflamația mediată de inflamazomul NLRP3. Riscul crește odată cu doza cumulativă

și este influențat de comorbiditățile cardiovasculare, de terapiile cardiotoxice asociate, de sex, de vârstă și de factori genetici.

Supravegherea pacientului tratat cu antracicline se bazează pe biomarkeri (troponine, peptide natriuretice), pe evaluarea imagistică a funcției ventriculare (fracția de ejecție, deformarea longitudinală globală, rezonanța magnetică cardiacă) și pe algoritmi de stratificare a riscului precum instrumentul HFA-ICOS. Strategiile cardioprotectoare validate – dexrazoxanul, inhibitorii sistemului renină-angiotensină, betablocantele și statinele – au o eficacitate parțială și eterogenă, cu recomandare de clasă IIa la pacienții cu risc înalt. Aceste limite justifică interesul pentru agenți cu un mecanism complementar.

Inhibitorii SGLT2 exercită efecte pleiotrope: reduc stresul oxidativ și inflamația, ameliorează metabolismul energetic miocardic și biogeneza mitocondrială, modulează homeostazia calciului și atenuează fibroza. În insuficiența cardiacă, au indicație de clasă I, indiferent de fracția de ejecție. Studiile preclinice pe modele de cardiotoxicitate indusă de doxorubicină au arătat că iSGLT2 reduc fibroza, ameliorează funcția ventriculară și atenuează modificările electrocardiografice, iar datele clinice observaționale la pacienți oncologici au raportat reduceri ale mortalității și ale incidenței insuficienței cardiace. Aceste dovezi susțin ipoteza utilizării iSGLT2 în cardio-oncologie, dar provin predominant din studii observaționale și necesită confirmare experimentală riguroasă – obiectivul părții speciale a tezei.

PARTEA SPECIALĂ – Cercetări personale

Obiective și ipoteză de lucru

Ipoteza centrală a fost aceea că empagliflozina, în doză de 10 mg/kg/zi, atenuează semnificativ cardiotoxicitatea indusă de doxorubicină, fără a interfera cu efectele sistemice ale antraciclinei. Obiectivele specifice au fost: (i) stabilirea și validarea unui model reproductibil de cardiotoxicitate; (ii) caracterizarea electrocardiografică, biochimică și histopatologică a leziunii și a efectului empagliflozinei; (iii) compararea directă a administrării concomitente cu precondiționarea; (iv) dezvoltarea unei metode de cuantificare a cineticii cardiace prin învățare automată și corelarea acesteia cu electrofiziologia; și (v) validarea celulară și tisulară a cardioprotecției prin imunofluorescență.

Cercetarea a fost structurată în două studii complementare, articulate în jurul aceluiași model. Cele cinci grupuri experimentale au permis disocierea efectului empagliflozinei în monoterapie de cel al asocierii cu doxorubicina și compararea a două strategii de administrare: concomitentă (grupul III) și precondiționare, cu inițierea empagliflozinei cu 14 zile

înainte de doxorubicina (grupul V). Primul studiu a caracterizat cardiotoxicitatea și cardioprotecția prin metode clasice, stabilind adevărul biologic de referință. Al doilea studiu, construit pe același model, a introdus cuantificarea cineticii cardiace prin inteligență artificială și validarea prin imunofluorescență, extinzând evaluarea dincolo de parametrii convenționali.

Metodologia generală

Cercetarea a fost aprobată de Comitetul de Etică Instituțional al UMF „Victor Babeș" din Timișoara (aviz nr. 40/23.07.2025). S-au utilizat șobolani Sprague-Dawley adulți, masculi, repartizați randomizat în cinci grupuri: control (I), empagliflozină (II), empagliflozină + doxorubicină (III), doxorubicină (IV) și empagliflozină-precondiționare + doxorubicină (V).

Doxorubicina s-a administrat intraperitoneal, 2,5 mg/kg la 48 de ore, până la o doză cumulativă de 15 mg/kg; empagliflozina, oral, 10 mg/kg/zi. Doza de empagliflozină de 10 mg/kg/zi corespunde, prin scalare alometrică bazată pe suprafața corporală, aceluiași ordin de mărime cu dozele clinice aprobate. Grupurile I–IV au urmat un protocol de 14 zile, iar grupul V, cu fază de precondiționare, a urmat un protocol de 28 de zile.

Obținerea datelor *in vivo* a necesitat un abord chirurgical invaziv: sub anestezie generală cu izofluran și ventilație mecanică, s-au efectuat traheostomia și toracotomia laterală stângă cu pericardiotomie, pentru expunerea directă a inimii. Electrocardiograma a fost înregistrată în derivația DII pe cordul expus, cu un monitor CONTEC CMS6000. Pentru a evita pierderile asociate conversiei analog-digitale clasice, semnalul a fost obținut prin interceptarea digitală directă a ieșirii Ethernet a aparatului: traficul de rețea a fost capturat cu Wireshark și convertit într-un format de coordonate tensiune-timp, apoi prelucrat cu pachetul WFDB pentru filtrarea zgomotului, detectarea vârfurilor R și izolarea complexelor P-QRS-T. Intervalul QTc a fost calculat folosind formula Bazett.

Pentru evaluarea histopatologică, cordul a fost secționat de la bază spre apex, fixat în formaldehidă 4% și inclus în parafină; colorația hematoxilină-eozină a servit la aprecierea leziunilor acute, iar colorația tricromă Masson a fost utilizată pentru evaluarea fibrozei. Leziunile au fost gradate semicantitativ de un anatomopatolog fără cunoașterea apartenenței de grup.

Abordul chirurgical a fost unul invaziv: traheostomia, toracotomia laterală stângă și pericardiotomia au fost efectuate sub anestezie generală profundă, fără trezirea animalului, iar eutanasierea a urmat imediat după finalizarea colectării datelor. Caracterul invaziv nu reprezintă o limitare accidentală, ci o condiție indispensabilă a metodei, întrucât numai

expunerea chirurgicală directă a cordului permite obținerea imaginii video stereoscopice pe care se bazează reconstrucția cineticii cardiace.

Studiul – Empagliflozina atenuează cardiotoxicitatea indusă de doxorubicină – dovezi electrocardiografice, biochimice și histopatologice

Metodă. Studiul a inclus 30 de șobolani (câte 6 per grup). S-au evaluat parametrii electrocardiografici (frecvența cardiacă, intervalele PR, QRS, QT și QTc, amplitudinea undelor R și T), hemoleucograma, profilul biochimic și troponina I, precum și modificările histopatologice prin colorații cu hematoxilină-eozină și tricromă Masson. Trei animale au decedat pe parcursul protocolului (două în grupul DOX, unul în grupul EMPA + DOX), decesele fiind considerate legate de tratament.

Rezultate. Doxorubicina a determinat modificări electrocardiografice semnificative: scăderea frecvenței cardiace (276,8 ± 10,4 față de 301,0 ± 6,2 bpm în control; p = 0,0111), prelungirea complexului QRS (29,65 față de 19,98 ms; p = 0,0004), a intervalului PR (57,80 față de 42,15 ms; p = 0,0004) și a intervalului QT (125,10 față de 74,98 ms; p = 0,0006), cu prelungirea intervalului QTc (de la 167,9 la 268,7 ms; p = 0,0014). Amplitudinea undei R a scăzut (0,57 față de 0,87 mV), iar unda T s-a negativat (−0,19 față de 0,34 mV). Empagliflozina a corectat semnificativ aceste modificări în ambele regimuri (grup III și V), iar valorile s-au apropiat de cele ale grupului de control (grup I). Prelungirea intervalelor de conducere și de repolarizare, împreună cu negativarea undei T, conturează un substrat aritmogen; conservarea acestor parametri sub tratament cu empagliflozină indică o stabilizare a substratului electrofiziologic, nu doar o ameliorare a traseului. Nu au existat diferențe semnificative între grupurile III și V, ceea ce confirmă echivalența celor două regimuri și la nivel electrocardiografic.

Biochimic, doxorubicina a produs o mielosupresie severă, cu leucopenie marcată (0,57 față de 6,21 × 109/L; p = 0,002), anemie și trombocitopenie. Troponina I a crescut semnificativ în grupul DOX (0,20 ± 0,03 față de 0,09 ± 0,02 ng/mL; p = 0,002) și a fost redusă de empagliflozină, atât concomitent (0,14 ng/mL; p = 0,037), cât și prin precondiționare (0,13 ng/mL; p = 0,010). Un rezultat important pentru relevanța oncologică a fost acela că empagliflozina nu a modificat mielosupresia, ceea ce indică un efect cardio-selectiv, fără interferență cu citotoxicitatea antraciclinei. Aspartat-aminotransferaza (AST) a fost crescută în grupul DOX, în timp ce ALT și LDH nu au urmat același tipar, sugerând că valorile AST reflectă predominant leziunea miocardică și musculară. Empagliflozina nu a modificat

semnificativ profilul enzimatic hepatic. Doza cumulativă de 15 mg/kg a reprodus fidel fenotipul de cardiotoxicitate raportat în literatură, confirmând validitatea modelului.

Histopatologic, leziunile au fost sistematizate în tipare de reacție acută (vacuolizarea cardiomiocitelor și pierderea striațiilor transversale, infiltrat inflamator difuz, cardiomiocite subțiate și alungite) și tipare de reacție cronică (fibroză interstițială și atrofie cardiomiocitară). Grupul DOX a prezentat leziunile cele mai severe – vacuolizare și atrofie moderate, fibroză extinsă cu depunere interstițială de colagen, în timp ce în grupurile de control (grup I) și în cel cu empagliflozină în monoterapie (grup II) miocardul a avut aspect normal. În grupurile tratate cu DOX și EMPA (grup III și V), aceste leziuni acute și cronice au fost vizibil atenuate, cu o conservare superioară a arhitecturii miocardice. Nu au existat diferențe semnificative între administrarea concomitentă și precondiționarea la niciunul dintre nivelurile de evaluare.

Dinamica ponderală a reflectat toxicitatea sistemică a doxorubicinei: animalele de control au câștigat în greutate (423,8 față de 451,2 g; p = 0,004), în timp ce grupurile expuse la doxorubicină au pierdut semnificativ în greutate (ex. grup IV: 423 față de 383 g, p = 0,004), iar empagliflozina în monoterapie nu a modificat greutatea.

Cele trei niveluri de evaluare au fost concordante: grupul tratat exclusiv cu doxorubicină a prezentat simultan cele mai severe alterări electrice, cele mai mari valori ale troponinei și cele mai extinse leziuni structurale, în timp ce grupurile cu empagliflozină (grupurile III și V) au ocupat, la fiecare nivel, o poziție intermediară, apropiată de cea a controlului.

Concluzii. Empagliflozina (10 mg/kg/zi) atenuează cardiotoxicitatea indusă de doxorubicină la nivel electrocardiografic, biochimic și histopatologic, fără a influența mielosupresia. Inițierea concomitentă a fost la fel de eficientă ca precondiționarea, ceea ce sugerează că un pretratament separat nu este necesar.

Studiul – Empagliflozina ca agent cardioprotector în cardiotoxicitatea indusă de doxorubicină – evaluare integrativă a cineticii cardiace utilizând inteligența artificială și imunofluorescența

Metodă. Studiul a inclus 18 șobolani, repartizați în aceleași cinci grupuri, conform protocolului validat anterior. Obținerea datelor de cinetică *in vivo* a fost posibilă exclusiv prin abordul chirurgical invaziv: după traheostomie și toracotomie laterală stângă cu pericardiotomie, inima a fost expusă direct, iar suprafața epicardică a fost înregistrată cu un sistem video stereoscopic cu dublă lentilă (1280 × 480 px, 60 de cadre pe secundă), calibrat geometric

printr-o procedură cu tablă de șah. Frecvența de 60 de cadre pe secundă a fost necesară pentru a eșantiona corect ciclul cardiac rapid al șobolanului, iar fiecare achiziție a generat mii de cadre de adâncime per cord, prelucrate ulterior offline. Fluxul de imagini a fost prelucrat printr-un pipeline de inteligență artificială: segmentarea cordului cu modelul SAM2, estimarea adâncimii cu MiDaS, reconstrucția tridimensională de tip „nor de puncte" și segmentarea acestuia cu algoritmul DBSCAN. Din cinci descriptori geometrici per cadru, agregați temporal și normalizați, s-a derivat, în mod complet nesupervizat, un scor compozit de cardiotoxicitate pe o scală de la 1 la 10. Un index electrocardiografic compozit, construit prin aceeași metodologie din date independente, a servit drept referință. Cardioprotecția a fost validată suplimentar prin imunofluorescență, cu cuantificare obiectivă a intensității fluorescenței, pentru troponina I cardiacă (cTnI), conexina 43 (Cx43), vimentină și α-SMA, pe cardiomiocite izolate și pe țesut miocardic inclus în parafină.

Pipeline-ul de analiză a cuprins 4 etape. Segmentarea cordului s-a realizat cu SAM2, pornind de la o singură sugestie punctuală în centrul cadrului, propagată automat pe toate cele 3000 de cadre. Estimarea adâncimii cu MiDaS a permis reconstrucția tridimensională, în care cordul apare ca un dom al cărui apex oscilează la frecvența cardiacă (~5 Hz, aproximativ 300 de bătăi pe minut la cordurile de control); un filtru bandpass în domeniul Fourier a eliminat deriva lentă a presiunii de perfuzie (0,1–4,0 Hz), păstrând banda cardiacă. Din fiecare cadru s-au extras cinci descriptori – numărul de clustere, raportul de zgomot, dimensiunea și compactitatea clusterelor și indicele de fragmentare –, agregați temporal prin medie și deviație standard, în nouă trăsături per subiect. După standardizarea Z-score și armonizarea semnului (astfel încât o valoare mai mare să indice constant o stare mai afectată), cele nouă trăsături au fost mediate într-un index compozit, rescalat liniar pe intervalul 1,0–10,00. Aceeași procedură a fost aplicată, independent, celor șase parametri electrocardiografici, pentru a construi indexul ECG compozit – o simetrie metodologică care a permis validarea încrucișată între două fluxuri de date independente.

La finalul înregistrării, inimile au fost excizate, canulate la nivelul aortei ascendente și supuse digestiei enzimatice cu colagenază și tripsină pentru izolarea cardiomiocitelor, cultivate ulterior în mediu suplimentat. Imunofluorescența a fost realizată pe cardiomiocite izolate și pe secțiuni de țesut ventricular, cu anticorpi primari anti-cTnI, anti-Cx43, anti-vimentină și anti-α-SMA, precum și cu colorație nucleară cu DAPI. Cuantificarea s-a efectuat în ImageJ de un investigator fără cunoașterea apartenenței de grup: pentru fiecare marker s-au analizat câte opt câmpuri microscopice per grup, iar intensitatea medie de fluorescență a fost calculată ca

raportul dintre densitatea integrată și aria câmpului. Diferențele au fost testate prin ANOVA unifactorială cu test post-hoc Dunnett față de grupul DOX (grup IV).

Analiză statistică. Normalitatea a fost testată prin Shapiro-Wilk; corelațiile au fost evaluate prin coeficienții Pearson și Spearman, cu intervale de încredere de 95% obținute prin transformarea z a lui Fisher și cu controlul ratei de descoperiri fals pozitive prin procedura Benjamini-Hochberg. Diferențele imunofluorescente au fost testate prin ANOVA unifactorială cu test post-hoc Dunnett față de grupul DOX. Analizele s-au efectuat în Python (v3.12).

Rezultate. Scorul de cardiotoxicitate “point cloud” s-a corelat puternic cu parametrii electrocardiografici: intervalul QT (ρ = +0,915; IC 95% 0,783–0,968), durata QRS (r = +0,941; IC 95% 0,845–0,978) și intervalul PR (ρ = +0,866; IC 95% 0,671–0,949), toate cu $p < 0,001$. Corelații negative puternice au fost observate pentru amplitudinea undei R (ρ = −0,788), frecvența cardiacă (ρ = −0,865) și amplitudinea undei T (ρ = −0,704). Corelația cu indexul electrocardiografic compozit a fost aproape completă (Spearman ρ = +0,924, IC 95% 0,803–0,972; Pearson r = +0,954, IC 95% 0,879–0,983; ambele $p < 0,001$), toate cele șapte comparații rămânând semnificative după corecția Benjamini-Hochberg.

Cea mai puternică asociere individuală a fost cu intervalul QT, un marker recunoscut al cardiotoxicității, ceea ce indică faptul că fragmentarea spațială și zgomotul din norul de puncte reflectă direct instabilitatea electrică asociată cu repolarizarea anormală. Corelațiile negative cu amplitudinile undelor R și T și cu frecvența cardiacă corespund pierderii de miocard viabil și bradicardiei caracteristice fenotipului de cardiotoxicitate severă. Analiza comparativă a scorurilor pentru toți cei 18 subiecți a confirmat separarea clară a grupurilor: inimile de control și cele tratate cu empagliflozină s-au menținut în domeniul de severitate scăzută, iar inimile expuse doxorubicinei s-au deplasat spre domeniul de toxicitate înaltă, algoritmul reproducând astfel gradientul de protecție conferit de empagliflozină. Scorul a stadializat corect severitatea: toate cele patru corduri de control au obținut valori sub 4,0; toate cele cinci inimi DOX au depășit 7,3, iar grupurile tratate cu empagliflozină au ocupat intervalul intermediar.

Randamentul de cardiomiocite izolate a fost mai scăzut în inimile tratate cu doxorubicină, sugerând un număr mai mic de celule viabile și o fragilitate mai mare. Imunofluorescența, cuantificată obiectiv, a confirmat, sub tratament cu empagliflozină, conservarea tiparului sarcomeric (cTnI) și a joncțiunilor gap (Cx43), precum și reducerea expresiei markerilor de activare stromală (vimentină, α-SMA).

La nivel tisular, în grupul DOX, cTnI a fost redusă și discontinuă, Cx43 și-a pierdut parțial organizarea membranară, iar expresia interstițială a α-SMA și a vimentinei a crescut, indicând o injurie cardiomiocitară și o activare stromală. Aceste modificări au fost atenuate în grupurile tratate cu empagliflozină (grupurile III și V). Compararea directă a celor două regimuri de empagliflozină a evidențiat diferențe semnificative doar pentru vimentină (în cardiomiocitele izolate) și α-SMA (în țesut), confirmând că precondiționarea nu a fost constant superioară administrării concomitente.

Concluzii. Scorul cinetic derivat prin învățare automată din mișcarea suprafeței epicardice, obținut pe inima expusă chirurgical, se corelează strâns cu parametrii electrocardiografici ai cardiotoxicității și detectează efectul cardioprotector al empagliflozinei. Imunofluorescența pe culturi de cardiomiocite și pe țesut cardiac confirmă această cardioprotecție.

DISCUȚII GENERALE

Rezultatele celor două studii sunt convergente: modificările electrice, biochimice, structurale, cinetice și moleculare au variat împreună, grupul tratat exclusiv cu doxorubicină prezentând cele mai severe alterări la fiecare nivel, iar grupurile tratate cu empagliflozină și doxorubicină ocupând poziții intermediare. Corelația foarte înaltă dintre scorul cinetic și indexul electrocardiografic arată că deformarea mecanică a peretelui ventricular și instabilitatea electrică reflectă același proces de injurie, iar fragmentarea spațială detectată de algoritm corespunde degradării structurale documentate histopatologic și prin imunofluorescență.

Efectul cardioprotector al empagliflozinei se explică prin acțiunea sa asupra mai multor mecanisme ale cardiotoxicității: reducerea stresului oxidativ, refacerea homeostaziei calciului (prin limitarea substratului aritmogen și scurtarea intervalului QTc), atenuarea inflamației și îmbunătățirea metabolismului energetic. Doxorubicina afectează reticulul sarcoplasmic, inhibă SERCA și activează receptorii de ryanodină, cu creșterea calciului citosolic și prelungirea intervalului QT/QTc. Empagliflozina contribuie la restabilirea echilibrului calciului prin scăderea raportului intracelular sodiu/calciu, ceea ce explică, la nivel mecanistic, conservarea stabilității electrice observate. La nivel structural, atenuarea fibrozei și a atrofiei cardiomiocitare, împreună cu conservarea tiparului sarcomeric și a joncțiunilor gap, evidențiate imunofluorescent, corespund unei protecții împotriva remodelării care stă la baza progresiei către insuficiență cardiacă. Caracterul cardio-selectiv al protecției, demonstrat prin absența oricărui efect asupra mielosupresiei, este deosebit de relevant pentru pacientul hematologic, la

care dozele complete de antraciclină sunt necesare pentru controlul bolii; un agent care protejează cordul fără a diminua citotoxicitatea antitumorală întrunește profilul dorit al unui cardioprotector oncologic.

Rezultatele sunt concordante cu datele preclinice existente. Studii anterioare au raportat, pe modele de cardiotoxicitate la doxorubicină, că empagliflozina reduce fibroza și previne prelungirea intervalelor QT și QTc, iar dapagliflozina atenuează declinul funcției ventriculare, ceea ce sugerează un efect de clasă al inhibitorilor SGLT2 asupra stabilității electrofiziologice și structurale. Datele noastre extind aceste observații prin caracterizarea integrată – electrocardiografică, biochimică, histopatologică, cinetică și moleculară – în cadrul aceluiași model. Bradicardia observată în grupul DOX, aparent paradoxală față de tahicardia compensatorie descrisă clinic, este concordantă cu date recente care arată că doxorubicina poate afecta direct funcția nodului sinusal la rozătoare și că rezultatele nu trebuie extrapolate la răspunsul cronotrop uman.

Un punct forte al cercetării îl constituie evaluarea integrată, în care fiecare nivel de analiză confirmă și contextualizează celelalte: modificările electrocardiografice sunt susținute de creșterea troponinei, explicate de leziunile histopatologice și corelate cu scorul cinetic și cu expresia imunofluorescentă a markerilor. Această suprapunere a mai multor metode independente reduce riscul de eroare și conferă concluziilor o robustețe pe care un singur parametru nu ar fi putut-o oferi. Validarea încrucișată dintre scorul cinetic și indexul electrocardiografic, obținute din fluxuri de date complet independente, reprezintă, în acest sens, elementul metodologic central al studiului.

Studiile din cadrul prezentei teze de doctorat sunt complementare. Primul studiu furnizează date de eficacitate obținute prin metode clasice, direct comparabile cu literatura preclinică existentă și, prin urmare, ușor de integrat în corpul de dovezi privind iSGLT2 și cardioprotecția în contextul tratamentului cu antracicline. Al doilea studiu propune un instrument metodologic nou, care, odată standardizat și validat pe cohorte mai mari, ar putea obiectiva evaluarea cardiotoxicității în cercetarea preclinică viitoare, oferind un obiectiv funcțional sensibil pentru testarea altor agenți cardioprotectori. Împreună, ele acoperă atât nevoia imediată de dovezi de eficacitate, cât și nevoia, pe termen mai lung, de metode de măsurare mai precise și mai obiective.

Metoda de cuantificare a cineticii cardiace introduce, spre deosebire de aplicațiile actuale ale inteligenței artificiale în cardio-oncologie (centrate pe predicția riscului pe baza datelor clinice), o măsurare directă și obiectivă a fenomenului mecanic al contracției. Studiul are și limite: dimensiunile reduse ale unor loturi, natura preclinică a modelului, absența unor

teste mecanistice moleculare dedicate și utilizarea exclusivă a masculilor non-diabetici. Metoda cinetică depinde de un abord chirurgical invaziv (toracotomie) și reprezintă, în acest stadiu, un instrument de fenotipare experimentală, nu o tehnică de monitorizare clinică.

Direcțiile viitoare includ validarea metodei cinetice pe cohorte mai mari, cu evaluarea reproductibilității, investigarea mecanismului molecular al căilor implicate (stres oxidativ, biogeneză mitocondrială, semnalizarea inflamazomului), extinderea la ambele sexe și la modele cu comorbidități metabolice, precum și inițierea unor studii clinice prospective, randomizate, dedicate pacienților oncologici tratați cu antracicline. La pacientul cu neoplazie hematologică, la care schemele CHOP și R-CHOP impun doze complete de antraciclină, integrarea unui agent cardioprotector cardio-selectiv, bine tolerat și cu beneficii cardiovasculare deja demonstrate, precum empagliflozina, ar putea completa arsenalul actual, cu avantajul suplimentar al inițierii concomitente cu prima cură de chimioterapie.

CONCLUZII FINALE ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE

Cercetarea demonstrează că empagliflozina conferă o cardioprotecție semnificativă și cuantificabilă împotriva cardiotoxicității induse de doxorubicină. Principalele concluzii sunt: (i) modelul de cardiotoxicitate cu doză cumulativă de 15 mg/kg a fost stabilit și validat reproductibil; (ii) empagliflozina atenuează alterările electrocardiografice, reduce troponina I și diminuează leziunile histopatologice acute și cronice; (iii) protecția este cardio-selectivă, fără interferență cu mielosupresia; (iv) precondiționarea nu aduce un beneficiu superior administrării concomitente; (v) scorul cinetic derivat prin învățare automată se corelează înalt semnificativ cu electrofiziologia și detectează efectul cardioprotector; și (vi) imunofluorescența confirmă protecția dată de iSGLT2 la nivel celular și tisular.

Contribuțiile personale principale sunt: (i) dezvoltarea unei metode originale de cuantificare a cineticii cardiace prin învățare automată nesupervizată, aplicată pe cordul expus chirurgical; (ii) validarea internă a scorului prin corelare cu un index electrocardiografic compozit; (iii) compararea directă a două strategii de administrare a empagliflozinei; (iv) caracterizarea multimodală integrată a leziunii și a cardioprotecției; (v) utilizarea unui panel imunofluorescent multimarker, cuantificat obiectiv, simultan pe cardiomiocite izolate și pe țesut; și (vi) demonstrarea caracterului cardio-selectiv al iSGLT2. Prin aceste rezultate, teza oferă argumente preclinice solide pentru evaluarea iSGLT2 ca agenți cardioprotectori la pacienții tratați cu antracicline și propune un instrument nou, obiectiv, de evaluare a injuriei și a protecției miocardice, cu relevanță pentru pacientul cu neoplazie hematologică.

În ansamblu, prezenta teză de doctorat oferă o caracterizare coerentă și convergentă a cardioprotecției conferite de empagliflozină, obținută prin metode independente care se confirmă reciproc – de la electrocardiogramă și troponină la histopatologie, la scorul cinetic derivat prin inteligență artificială și la imunofluorescența cantitativă. Acest cadru integrat, alături de metoda originală de cuantificare a cineticii cardiace, constituie principala contribuție a tezei la cercetarea experimentală din cardio-oncologie și susține continuarea investigării iSGLT2 în acest context.

Rezultatele obținute au un caracter preclinic și trebuie confirmate prin studii mecanistice suplimentare și, ulterior, prin studii clinice prospective, randomizate, dedicate pacienților oncologici expuși la antracicline, înainte de a putea fundamenta o recomandare terapeutică. Prin dovezile experimentale furnizate și prin instrumentul metodologic propus, teza oferă o bază solidă pentru aceste etape și contribuie la efortul de a integra empagliflozina în strategiile de prevenție a cardiotoxicității secundare tratamentului cu antracicline.