

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE



DOCTORAL SCHOOL IN LIFE AND HEALTH SCIENCE  
DOTTORATO DI RICERCA IN FISIOPATOLOGIA MEDICA  
CICLO 32°

TITOLO DELLA TESI: **ADVANCED GLYCATION END-PRODUCTS E  
INFIAMMAZIONE CRONICA IN GIOVANI ADULTI SOTTOPOSTI A  
TRAPIANTO ALLOGENICO DI CELLULE STAMINALI PER LEUCEMIA  
DELL'ETA' PEDIATRICA**

TESI PRESENTATA DA: Dottor Francesco Carlo Felicetti

TUTOR: Professoressa Emanuela Arvat

CO-TUTOR Dottor Enrico Brignardello

COORDINATORE DEL DOTTORATO: Professor Franco Veglio

ANNI ACCADEMICI: 2016-2019

SETTORE SCIENTIFICO-DISCIPLINARE DI AFFERENZA: MED13

## INDICE

	<i>Pagina</i>
<b>BACKGROUND</b>	
<i>Childhood cancer survivors</i> : una problematica sanitaria emergente.	3
Leucemia linfoblastica acuta: cenni di epidemiologia e terapia.	5
<b>RISCHIO CARDIOVASCOLARE IN CCS</b>	7
Cardiotossicità diretta: ruolo delle antracicline.	8
Cardiotossicità diretta: ruolo della radioterapia.	11
Cardiotossicità indiretta in soggetti sottoposti a trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche.	13
<b>INFIAMMAZIONE CRONICA E RISCHIO CARDIOVASCOLARE</b>	19
<b>AGE, INFIAMMAZIONE E RISCHIO CARDIOVASCOLARE</b>	26
<b>STUDIO SPERIMENTALE</b>	
Obiettivo dello studio	34
Metodi	37
Risultati	40
Discussione	46
Conclusioni e prospettive future	40
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	52

## BACKGROUND

### ***Childhood cancer survivors: una problematica sanitaria emergente***

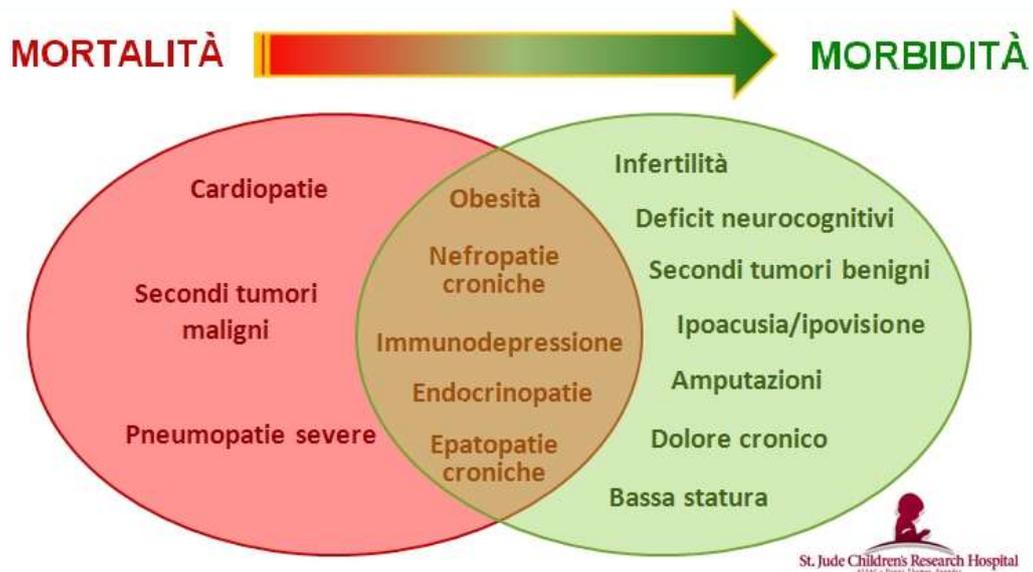
Nel corso degli ultimi 40 anni l'efficacia terapeutica dei protocolli di cura utilizzati in oncologia pediatrica è nettamente migliorata, e le percentuali di guarigione dei bambini e degli adolescenti affetti da tumore – considerando globalmente tutte le diagnosi - superano oggi all'80%. Per questo motivo, nella popolazione generale vi è un numero crescente di cosiddetti *childhood cancer survivors* (CCS) e si stima che, in Italia, nell'anno 2020 un "giovane adulto" (cioè, di età compresa fra 20 e 39 anni) ogni 400 sarà stato "guarito" da un tumore dell'età evolutiva (1).

Il concetto di guarigione fa però riferimento al tumore primitivo e non considera il rischio o la presenza dei cosiddetti *late effects*, cioè di quelle alterazioni patologiche causate dalle terapie oncologiche che, per definizione, siano insorte o persistano dopo più di 5 anni dalla guarigione del tumore (2).

Nel 2006 *Oeffinger et al.*, analizzando una coorte molto numerosa di CCS, dimostrarono che - a distanza di 30 anni dalla diagnosi oncologica - circa due terzi dei pazienti erano affetti da almeno una malattia cronica riferibile ai pregressi trattamenti antitumorali e che, in un terzo dei casi, tali malattie erano così gravi da risultare potenzialmente invalidanti o addirittura da costituire un pericolo per la vita (3).

La gestione di queste complicanze configura un bisogno sanitario nuovo, che pone una serie di problematiche inedite delle quali, tenuto conto che il numero dei CCS è in progressivo aumento, i sistemi sanitari saranno tenuti a occuparsi sempre di più nei prossimi anni.

I *late effects* delle terapie oncologiche possono interessare qualsiasi organo o apparato, sono caratterizzati da un ampio spettro di tipologia e gravità (Figura 1) e la loro prevalenza aumenta progressivamente nel tempo (4).

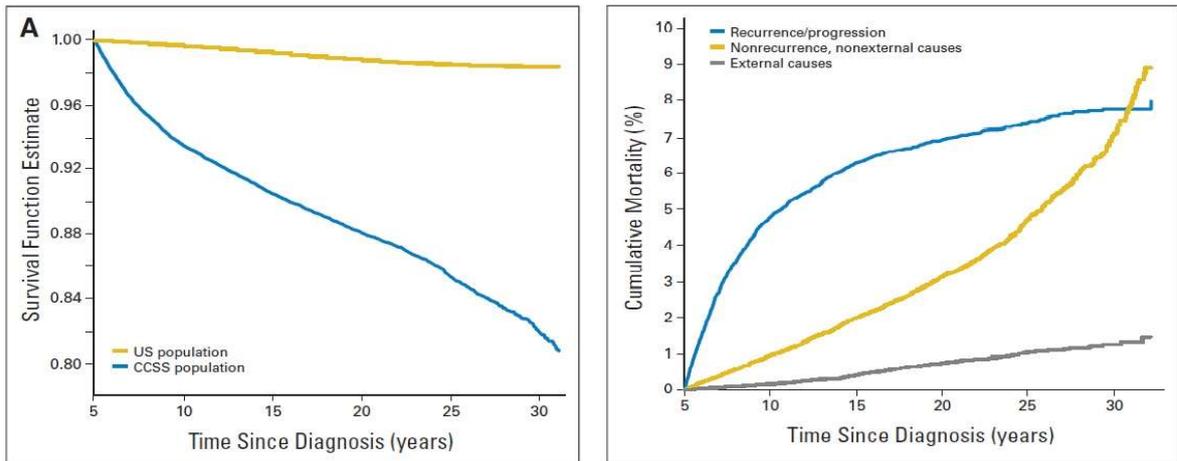


**Figura 1. Spettro dei possibili late-effects delle terapie oncologiche (4)**

Se confrontati con la popolazione generale di pari età, i CCS presentano un eccesso di mortalità che, mentre nei primi anni dopo la diagnosi è dovuto principalmente a progressione o recidive della malattia di base, con il passare del tempo diviene sempre più riferibile alla presenza di patologie inquadabili come *late effects* delle terapie antitumorali (Figura 2) (5).

I *late effects* maggiormente responsabili di questo aumento di mortalità sono rappresentati dalle malattie cardiovascolari (CV) e dai cosiddetti “secondi tumori”, la cui incidenza rimane elevata anche a distanza di molte decadi dalla fine delle terapie antitumorali (Figura 2) (5).

**Figura 2. (A) Mortalità per tutte le cause. (B) Mortalità globale causa-specifica. (5)**



### Leucemia linfoblastica acuta: cenni di epidemiologia e terapia.

La leucemia linfoblastica acuta (LLA) rappresenta la più frequente fra le neoplasie che possono colpire la popolazione pediatrica (circa il 25% del totale), con una incidenza di circa 41 casi per milione nella fascia di età 0-14 anni e di 17 casi per milione in quella fra 15 -19 anni (1).

Fino agli anni 50 del secolo scorso si trattava di una malattia incurabile, ma grazie agli attuali protocolli di terapia il 95% dei pazienti pediatrici affetti da LLA ottengono invece una remissione completa di malattia e l'80-85 % di questi possono essere considerati guariti. Un ulteriore 5% dei pazienti riesce inoltre ad ottenere la remissione completa, dopo una iniziale recidiva di malattia, attraverso terapie di salvataggio.

L'approccio terapeutico ad una LLA all'esordio prevede la valutazione di plurimi fattori, alcuni legati al paziente, altri alle caratteristiche cliniche e molecolari della malattia, che consentono di valutare la classe di rischio (e la conseguente prognosi di malattia) su cui basare l'intensità di trattamento. Successive

variazioni della iniziale condotta terapeutica sono poi dettate dalla iniziale risposta al trattamento.

La terapia iniziale prevede sempre un approccio polichemioterapico, in cui sono variabilmente presenti farmaci di varie categorie (antracicline, alchilanti, asparaginasi, vincristina e corticosteroidi). Il trattamento dura solitamente un lungo periodo di tempo (2-3 anni), prevedendo una terapia di mantenimento dopo una iniziale più intensa terapia di induzione.

In pazienti ad alto rischio, così come nei pazienti recidivi, sono stati impiegati nel tempo protocolli che hanno previsto l'uso di differenti farmaci chemioterapici e della radioterapia (RT) encefalica (inizialmente profilattica, successivamente soltanto per le forme localizzate al sistema nervoso centrale), eventualmente associati al trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche (HSCT) (6,7).

Al termine delle terapie oncologiche, nei soggetti guariti da LLA, lo spettro delle possibili complicanze tardive è molto variegato ed è strettamente dipendente dall'intensità delle cure che sono state impiegate, in termini di farmaci, RT e/o trapianto di cellule staminali ematopoietiche (8). Se i soggetti curati con sola chemioterapia (CT) sono solitamente, fra i CCS, quelli con più basso rischio di complicanze tardive, i soggetti sottoposti ad HSCT, in particolar modo quando per il regime di condizionamento è stata impiegata la *total body irradiation* (TBI), si collocano all'estremo opposto e possono manifestare nel tempo numerosi *late-effects*, comprese malattie CV (9-13).

## **RISCHIO CARDIOVASCOLARE IN CCS**

Le cardiopatie sono la terza causa di morte nei CCS, superate solo dalla recidiva del tumore primitivo e dall'insorgenza di seconde neoplasie. Rispetto alla popolazione generale, i CCS hanno una probabilità 8,2 volte superiore di morire per un evento CV, ed un maggiore rischio di sviluppare una malattia coronarica o cerebrovascolare rispetto ai loro fratelli sani (rischio relativo rispettivamente di 10,4 e di 9,6) (3).

Sia la CT, in particolar modo alcune categorie di farmaci, sia la RT hanno notevoli ripercussioni tanto sul cuore quanto sui vasi, e possono determinare, agendo sia direttamente che indirettamente su altri sistemi – primo fra tutti quello endocrino – effetti a lungo termine che concorrono ad aumentare significativamente il rischio CV dei pazienti sottoposti a tali cure (14).

Il sistema CV consiste di cellule con una ridotta capacità rigenerativa, ed è per questa ragione che vi è un'aumentata suscettibilità agli effetti negativi a lungo termine delle terapie.

Molti chemioterapici tradizionali e alcuni fra i cosiddetti nuovi farmaci (inibitori delle tirosino-kinasi, anticorpi monoclonali) possono indurre disfunzione cardiaca acuta in corso di trattamento. La cosiddetta cardiotoxicità tardiva, che si manifesta a partire da un anno dopo la fine dei trattamenti oncologici, vede invece come fattori di rischio pressoché esclusivi l'uso di chemioterapici della famiglia delle antracicline e la RT, qualora coinvolga la regione mediastinica.

Il ruolo di CT e RT nel determinare l'insorgenza di malattie CV è stato oggetto di numerosi studi negli ultimi decenni. Negli anni più recenti un crescente numero di studi ha messo inoltre in evidenza come, accanto a questi due imprescindibili

fattori di rischio, l'insorgenza o la coesistenza di alterazioni metaboliche possano giocare un ruolo altrettanto importante (14). Tuttavia, la relazione fra terapie oncologiche e insorgenza di sindrome metabolica è certamente meno diretta e numerosi sono i fattori che possono concorrere a determinarne la presenza o la severità.

### **Cardiotossicità diretta: ruolo delle antracicline.**

Le antracicline sono la classe di chemioterapici più comunemente associata agli effetti avversi cardiaci. Sono state introdotte nella pratica clinica negli anni '60 (si stima che negli anni 1990 più del 50% dei pazienti oncologici pediatrici siano stati trattati con tali farmaci), e sono tuttora ampiamente utilizzate in oncologia pediatrica e dell'adulto(15).

L'attività antitumorale delle antracicline si pensa dipenda da numerosi meccanismi: interposizione all'interno del DNA nucleare, inibizione della topoisomerasi II, generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), distruzione delle membrane cellulari e mitocondriali (16).

Dopo esposizione ad antracicline, le più precoci modifiche del miocita cardiaco osservabili al microscopio elettronico includono rigonfiamento del reticolo sarcoplasmatico, distorsione e deplezione di miofibrille, necrosi e apoptosi miocitaria. Anche i mitocondri vanno incontro ad alterazioni, con compromissione della contrattilità del miocita e della catena respiratoria e formazione di ROS (17,18). La gravità di queste modifiche correla con la dose totale di antracicline. Numerosi studi hanno identificato nello stress ossidativo indotto dalle antracicline il maggior responsabile del danno miocitario. I ROS

sono tossici per il miocita: essi interagiscono con numerose componenti cellulari, causando perossidazione lipidica, danno alle membrane ed eventualmente apoptosi (19).

I miociti raramente proliferano dopo i sei mesi di vita; perciò, virtualmente, tutta la crescita miocardica successiva ai sei mesi si realizza aumentando le dimensioni dei miociti preesistenti. Di conseguenza, la principale strategia di compensazione alla perdita di miociti, dovuta alla terapia con antracicline, consiste nell'ipertrofia dei miociti sopravvissuti, allo scopo di mantenere il normale output cardiaco. Infatti, dall'analisi di campioni bioptici miocardici prelevati da bambini trattati con antracicline, si può osservare ipertrofia miocitaria unitamente a ridotto spessore parietale e fibrosi interstiziale (20). Ciò fa supporre che lo scompenso cardiaco tardivo indotto dalle antracicline sia dovuto all'incapacità dei miociti sopravvissuti di far fronte alle aumentate richieste, in termini di funzionalità cardiaca, connesse con la normale crescita dell'individuo, o ad altri fattori di stress che possono sopraggiungere nel tempo.

Il danno cardiaco da antracicline può essere suddiviso in tre categorie: danno acuto, che insorge entro una settimana dall'infusione; danno a insorgenza precoce, ovvero una cardiotossicità cronica progressiva che si manifesta entro un anno dal completamento della terapia; danno a insorgenza tardiva, ovvero una cardiotossicità cronica progressiva, che si manifesta dopo il primo anno dal completamento della terapia (16).

Per quanto attiene alla disfunzione cardiaca a lungo termine, nei pazienti pediatrici questa si manifesta solitamente come una miocardiopatia mista, a cavallo fra la forma restrittiva e quella dilatativa, mentre gli adulti generalmente

presentano un quadro tipicamente dilatativo. La disfunzione cardiaca asintomatica è la manifestazione più comune, tuttavia alcuni pazienti possono lamentare facile faticabilità o dispnea prima della diagnosi effettiva (16).

La perdita miocitaria porta a una progressiva dilatazione ventricolare sinistra, a un assottigliamento della parete ventricolare sinistra e una diminuzione di contrattilità. Queste alterazioni contribuiscono a mantenere un innalzamento cronico del livello di stress parietale ventricolare, che predispone a ulteriori compromissioni del ventricolo sinistro, progressivamente meno in grado di compensare eventuali incrementi di domanda metabolica (21).

L'incidenza della disfunzione cardiaca subclinica è stata direttamente associata con le antracicline in numerosi studi. Uno studio di *Lipshultz et al.* ha documentato un progressivo incremento nello stress di parete tele-sistolico del ventricolo sinistro o una depressione della contrattilità ventricolare nel 75% dei *survivors* curati per LLA che hanno ricevuto una dose mediana di doxorubicina di 334 mg/ m<sup>2</sup> (22).

Sebbene le antracicline non siano un fattore di rischio per l'insorgenza di infarto del miocardio, queste possono aumentare il rischio di morte in caso di cardiopatia ischemica (16). Infatti, l'incidenza di infarto del miocardio fatale è significativamente più alta nei CCS trattati con antracicline rispetto al resto della popolazione (23).

Il ruolo di altri chemioterapici nell'indurre cardiotossicità sembra essere più marginale e meno definito rispetto a quello delle antracicline.

### **Cardiotossicità diretta: ruolo della radioterapia.**

L'impatto a lungo termine della RT sul cuore è stato oggetto di studio fin dagli anni '40. Le sequele cardiache dell'irradiazione possono interessare le varie componenti anatomiche del cuore (pericardio, miocardio contrattile, tessuti di conduzione e apparati valvolari).

Per quanto gli effetti sul cuore dell'irradiazione toracica siano difficilmente separabili da quelli delle antracicline (in quanto pochi bambini sono sottoposti a irradiazione toracica senza ricevere anche antracicline), i CCS trattati con RT toracica hanno un aumentato rischio di morte per patologia CV, di malattie CV clinicamente evidenti e di disfunzioni asintomatiche (16,24).

Lo spettro di possibili alterazioni indotte dalla RT è correlato alle differenze nella dose erogata e nelle tecniche impiegate. In particolare, i determinanti del rischio includono modalità di trattamento, dosi totali e frazionamento, volumi e specifiche regioni cardiache irradiate.

A dimostrare la relazione dose-risposta che lega l'irradiazione all'insorgenza di malattie CV, in una coorte tedesca di 1032 CCS curati per linfoma di Hodgkin, l'incidenza cumulativa di malattie CV in coloro che avevano ricevuto una dose di RT mediastinica pari a 36 Gy era del 21%, mentre scendeva a 10%, 6%, 5%, 3% per irradiazione rispettivamente di 30, 25, 20 e 0 Gy (25).

Dal punto di vista istologico, le alterazioni cardiache associate alla RT sono generalmente caratterizzate da fibrosi dell'interstizio, con miociti apparentemente normali e restringimento dei capillari e dei lumi arteriosi.

In passato, la manifestazione patologica più comune era rappresentata dalla pericardite acuta (26), ma oggi, grazie alla riduzione della dose totale di radiazioni e alle nuove tecniche di trattamento, il rischio di tale patologia è stato drasticamente ridotto (27).

Il danno sul miocardio, invece, è caratterizzato da una diffusa, aspecifica fibrosi interstiziale. La dimensione delle lesioni può variare da pochi millimetri a diversi centimetri, ma generalmente queste non coinvolgono l'intero miocardio. Non si ha soltanto un aumento di collagene nel suo insieme, ma anche un aumento del collagene I in proporzione al collagene III. Queste alterazioni possono esitare in una diminuzione dell'elasticità e della *compliance* cardiaca, causando una riduzione nella frazione di eiezione e insufficienza cardiaca (16,27).

Il danno su miocardio e pericardio è originato anche dall'insulto sulle cellule endoteliali dei capillari, che causa ostruzione del lume e formazione di trombi luminali di piastrine e fibrina, con conseguente ischemia, potenziale necrosi miocitaria e fibrosi riparativa (28).

La malattia coronarica si manifesta in relazione alla distribuzione della dose di radiazioni. Nei pazienti affetti da linfoma di Hodgkin, trattati in passato con la RT cosiddetta "a mantellina", il ramo discendente anteriore e la coronaria destra risultavano quelli maggiormente colpiti. Con l'uso delle apparecchiature più moderne, che consentono di ridurre la dose a cui vengono esposte le singole porzioni cardiache, la distribuzione dei siti interessati dalla malattia coronarica si è uniformata a quella della popolazione generale, anche se il sito maggiormente interessato da aterosclerosi risulta essere quello prossimale, con frequente coinvolgimento degli osti coronarici. La morfologia delle alterazioni coronariche

non si differenzia da quella dell'aterosclerosi spontanea, eccetto che per una maggiore componente fibrotica nella tonaca media e nell'avventizia (29). Il meccanismo con cui si instaura il danno da radiazioni si pensa passi attraverso il danno intinale (da ROS, citochine e altri mediatori dell'infiammazione), con sostituzione delle cellule danneggiate da parte dei miofibroblasti, deposizione di piastrine e successiva progressione della placca ateromasica (30).

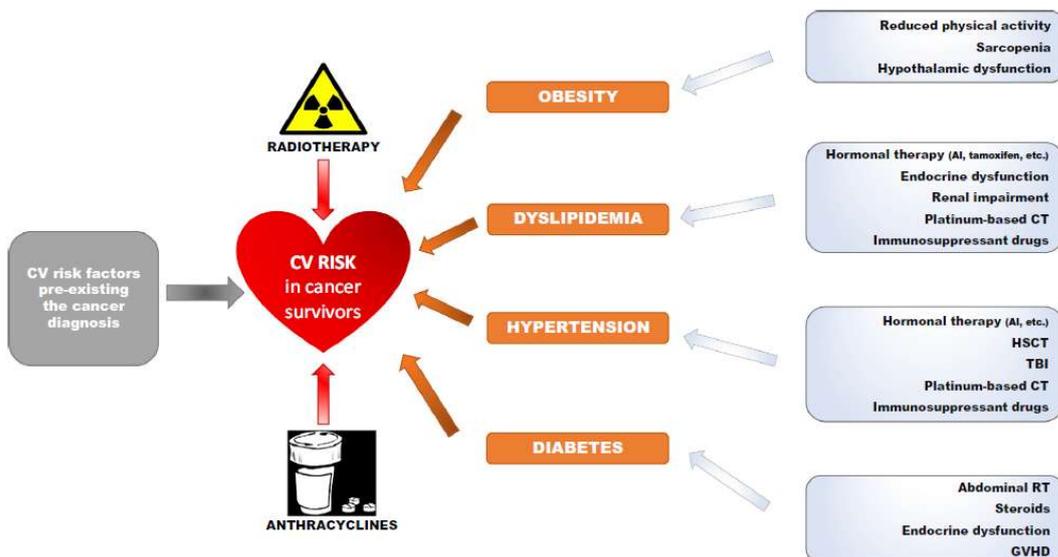
Anche le valvole cardiache possono andare incontro a modificazioni fibrotiche, con o senza calcificazione, ma il meccanismo fisiopatologico non è conosciuto. Le valvulopatie post-attiniche, descritte in passato, grazie al miglioramento delle tecniche radioterapiche sono comunque oggi assai rare (16).

### **Cardiotossicità indiretta in soggetti sottoposti a trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche.**

Il HSCT rappresenta oggi una valida opzione terapeutica in una ampia gamma di patologie, oncologiche e non, fra cui leucemie e linfomi rappresentano le più comuni. È stato stimato che nel 2013 la popolazione di lungo sopravvissuti dopo HSCT ammontasse a circa 1 milione di soggetti nel mondo, ed il loro numero è in costante aumento (31). I tassi di mortalità e morbidità nei soggetti sottoposti ad HSCT, sia autologo che allogenico, sono significativamente più elevati rispetto alla popolazione sana dei pari età (32), e come si è detto le malattie CV rappresentano una delle cause principali di questo eccesso di mortalità (33).

Uno studio condotto su una coorte di 324 sopravvissuti 10 o più anni dopo un HSCT ha dimostrato che l'incidenza cumulativa di malattie gravi o

potenzialmente mortali era di circa il 41%, e che questi soggetti avevano un rischio di sviluppare tali patologie di 5.7 volte maggiore ( $p < 0.001$ ) rispetto ai fratelli sani (34). In un altro studio, il rischio di morte dei soggetti trapiantati è stato stimato essere fra 2 e 4 volte più alto rispetto alla popolazione generale e questo rischio aumentava progressivamente nel tempo, dimostrando un ruolo chiave dei *late-effects* nel determinare questo effetto (35). A 15 anni dalla procedura, l'incidenza cumulativa di eventi CV nei soggetti sottoposti a trapianto allogenico è risultata del 7,5 % (vs 2,3 % nei soggetti sottoposti a trapianto



autologo) e la presenza di almeno 2 su 4 fattori di rischio CV classici, quali ipertensione arteriosa, dislipidemia, diabete mellito (DM) e obesità, aumentava in modo significativo questo rischio (36).

**Figura 3. Rischio cardiovascolare in CCS (14).**

Crescenti evidenze legano le terapie oncologiche effettuate in età giovanile con l'insorgenza di sindrome metabolica ed un aumento di incidenza di questa condizione è stato evidenziato in numerosi studi condotti su popolazioni di soggetti sottoposti a trapianto (9,33); tuttavia, i meccanismi fisiopatologici alla

base di questa osservazione non sono ancora del tutto chiariti. Inoltre è difficile scindere il ruolo del trapianto in sé dall'effetto combinato di precedenti trattamenti chemio-radioterapici, ma anche dei farmaci utilizzati per la gestione della procedura trapiantologica (*in primis* corticosteroidi, immunosoppressori e antimicrobici) e da condizioni legate alla malattia stessa (quale la prolungata immobilità, infezioni ricorrenti ecc) (37). (Figura 3)

L'obesità rappresenta una delle componenti peculiari della sindrome metabolica e già molti anni fa è stato descritto il legame fra *outcome* del trapianto e *body mass index* (BMI), con una evidente correlazione fra l'obesità e l'insorgenza di complicanze precoci della procedura (38,39). Inoltre, indipendentemente dal BMI pre-HSCT, i *survivors* sottoposti ad HSCT sono a rischio di sviluppare eccedenza ponderale e sbilanciamento fra massa grassa e massa magra (la cosiddetta obesità sarcopenica). Lo sviluppo di obesità sarcopenica è stato dimostrato in uno studio *cross-sectional* su una coorte di pazienti sottoposti in età pediatrica e adolescenziale ad HSCT: il 73% di questi soggetti presentava obesità viscerale (definita come una circonferenza addominale > 75th percentile per età e sesso) (40). Per quanto non esistano studi specifici su popolazioni di trapiantati, è ben noto che nella popolazione generale l'obesità sarcopenica sia associata alla insorgenza di malattie CV in modo più stretto rispetto al semplice aumento del BMI (41). L'uso prolungato di corticosteroidi (che rappresentano la terapia di prima scelta per contrastare la *graft versus host disease* [GVHD] e sono ampiamente impiegati nei pazienti con LLA fin dalla terapia di prima linea) così come la inattività fisica prolungata, sembrano essere i fattori maggiormente associati allo sviluppo di questa condizione (42,43).

Nei *survivors* di HSCT è stata riportata da numerosi studi un'aumentata incidenza di alterazioni del profilo lipidico. Il Bone Marrow Transplant Survivor Study ha stimato una prevalenza di tali alterazioni di del 12.5%, 36.6% and 45.0% (rispettivamente al tempo zero, a 1 e a 5 anni dal trapianto) in soggetti sottoposti a HSCT allogenico (36). Il rischio di dislipidemia di nuova insorgenza aumenta di circa 2 volte nei soggetti sottoposti a HSCT allogenico (44) e l'incidenza cumulativa di ipercolesterolemia e/o ipertrigliceridemia in questi soggetti è stata stimata fra il 40 e il 70% (45,46). Uno studio condotto presso il nostro centro su un campione di 340 *long term* CCS, con un follow-up mediano di 16 anni dalla fine delle terapie oncologiche, ha messo in evidenza come il regime di condizionamento con TBI sia significativamente associato all'insorgenza di ipercolesterolemia (9). Altri fattori predittivi dell'insorgenza di alterazioni del profilo lipidico in soggetti trapiantati sono l'obesità, la GVHD acuta di grado II-IV, la GVHD cronica e le alterazioni della funzione epatica. Inoltre, alcuni farmaci immunosoppressori (inibitori delle calcineurine, inibitori di mTOR) possono aumentare i livelli di colesterolo, oltre a interferire con l'azione delle statine, ed è stato evidenziato come l'effetto di questi farmaci possa permanere anche dopo la sospensione della terapia (47-49).

Inoltre, nei soggetti sottoposti ad HSCT la presenza di endocrinopatie iatrogene è tutt'altro che infrequente (50,51). In particolare, ipotiroidismo, ipogonadismo e deficit di ormone della crescita (GH) rappresentano le principali alterazioni del sistema endocrino (soprattutto nei pazienti trattati con TBI per il condizionamento in età pediatrica) e certamente possono giocare un ruolo determinante nelle alterazioni del profilo lipidico (50). Anche le alterazioni della

funzione renale, dalla insufficienza renale cronica alla sindrome nefrosica, che sono fra le possibili complicanze del trapianto, possono determinare o peggiorare le alterazioni del profilo lipidico (48).

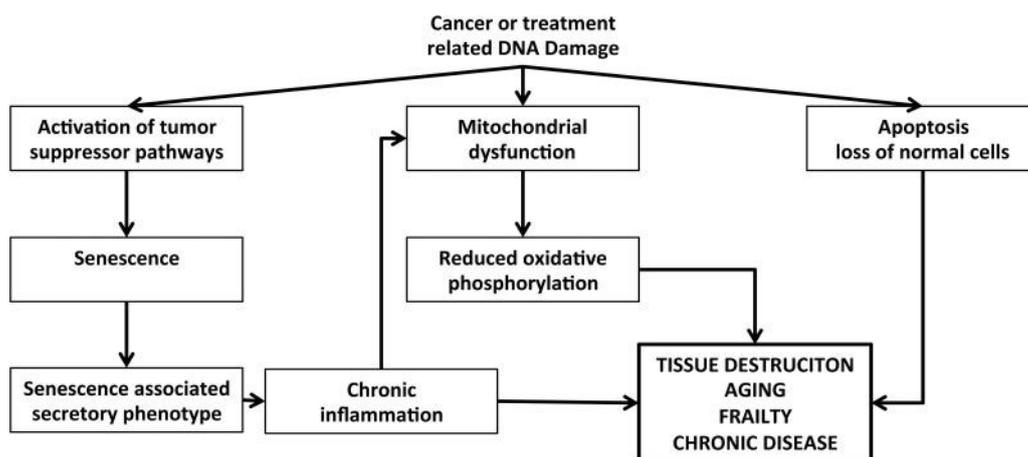
Iperglicemia, dovuta all'effetto avverso di corticosteroidi e farmaci immunosoppressori sul metabolismo glicidico, è osservata non di rado durante o subito dopo la procedura di trapianto (52). Solitamente con il passare del tempo dal trapianto l'iperglicemia si risolve (33) ma, sia pur meno frequentemente, le alterazioni del metabolismo glicidico (dall'insulino-resistenza al DM) possono persistere più a lungo o insorgere de novo nel successivo follow-up (53). Nei pazienti pediatrici sottoposti a HSCT allogenico è stata riportata una prevalenza di DM 3.6 volte maggiore rispetto a quella riscontrata nei fratelli donatori (44). In una coorte di *survivors* di LLA diagnosticata in età pediatrica, i soggetti curati con HSCT condizionato con TBI presentavano una ridotta tolleranza glicidica e una ridotta insulino-sensibilità (associate a riduzione del tessuto adiposo sottocutaneo e aumento di quello viscerale, aumentata massa grassa e ridotta massa magra), rispetto a quelli curati con sola CT (54). Nei soggetti sottoposti a condizionamento con TBI è stato riportato un ridotto volume pancreatico, con conseguente riduzione della riserva insulinica. L'insorgenza di GVHD severa e una elevata dose cumulativa di prednisone (> 0.25 mg/kg/day), così come la familiarità, le abitudini alimentari e la scarsa attività fisica, rappresentano i fattori di rischio principali per lo sviluppo di DM post-trapianto (33).

Nella valutazione del ruolo svolto dalla sindrome metabolica nello sviluppo delle malattie CV post-HSCT bisogna infine valutare l'ipertensione arteriosa, la cui

prevalenza nei soggetti trapiantati sembra essere circa doppia rispetto a quella riscontrata nella popolazione generale (44,55). L'effetto ipertensivo di alcuni farmaci immunosoppressori è ben noto (soprattutto inibitori delle calcineurine e corticosteroidi), tuttavia tale effetto si esaurisce solitamente alla loro sospensione (53). Come possibili fattori di rischio per lo sviluppo di ipertensione post-HSCT allogenico sono stati valutati la presenza di GVHD cronica (con un ruolo pro-infiammatorio e conseguente danno vascolare) e il tipo di condizionamento (TBI). Tuttavia, due studi basati su ampie popolazioni di HSCT *survivors* non hanno evidenziato differenze significative per quanto riguarda l'incidenza di ipertensione arteriosa fra soggetti affetti o non affetti da GVHD cronica (43,56).

## INFIAMMAZIONE E RISCHIO CARDIOVASCOLARE

La recente letteratura in tema di *late-effects* delle terapie oncologiche in età pediatrica ha concentrato gli sforzi sul definire meglio dal punto di vista fisiopatologico i meccanismi che stanno alla base di molte delle patologie che possono colpire i CCS. È stato recentemente osservato come la gran parte di questi *late effects* siano costituiti da patologie che solitamente colpiscono la popolazione anziana. Da queste osservazione nasce l'ipotesi che, semplificando e generalizzando, le terapie oncologiche effettuate in età pediatrica possano innescare precocemente processi biologici tipici dell'invecchiamento (57,58). I trattamenti oncologici indurrebbero nelle cellule sane (in particolare, neuroni, cardiomiociti, cellule muscolari e mesenchimali) alterazioni nella struttura e nella funzione del DNA tali da tradursi nella riduzione delle capacità di riparazione a livello cellulare e ad una conseguente maggiore suscettibilità ad ogni successivo insulto esterno, analogamente a quanto avviene nell'invecchiamento fisiologico (Figura 4).



**Figura 4. Possibile ruolo fisiopatologico delle terapie oncologiche nel determinare invecchiamento precoce e fragilità. (58)**

*Ness et al* hanno ipotizzato che uno dei meccanismi chiave in questi processi di *premature aging* sia rappresentato dalla persistenza di uno stato infiammatorio cronico di basso grado (58, 59).

Aumentati livelli plasmatici di citochine pro-infiammatorie sono stati riportati recentemente da studi condotti su piccole coorti di soggetti guariti da LLA o sottoposti a trapianto autologo di cellule staminali (60).

La presenza di elevati livelli di citochine infiammatorie indica la presenza di uno stato pro-infiammatorio, recentemente definito come *inflammageing* (61), caratterizzato da elevati livelli circolanti di marcatori pro-infiammatori, fra i quali proteina C-reattiva (PCR), interleukina (IL)-6, IL-1, IL-17, IL-18, *tumor necrosis factor* (TNF) ed i suoi recettori solubili, *transforming growth-factor beta* (TGF- $\beta$ ). Anche in assenza di malattie clinicamente manifeste, elevati livelli di tali marcatori sono tipicamente riscontrati nella popolazione anziana (62-64). Studi epidemiologici hanno associato la presenza di *inflammageing* con molte patologie quali malattie CV, tumori, demenza, insufficienza renale cronica e depressione, così come anche con condizioni di pluripatologia, sarcopenia, fragilità e mortalità precoce (65-73).

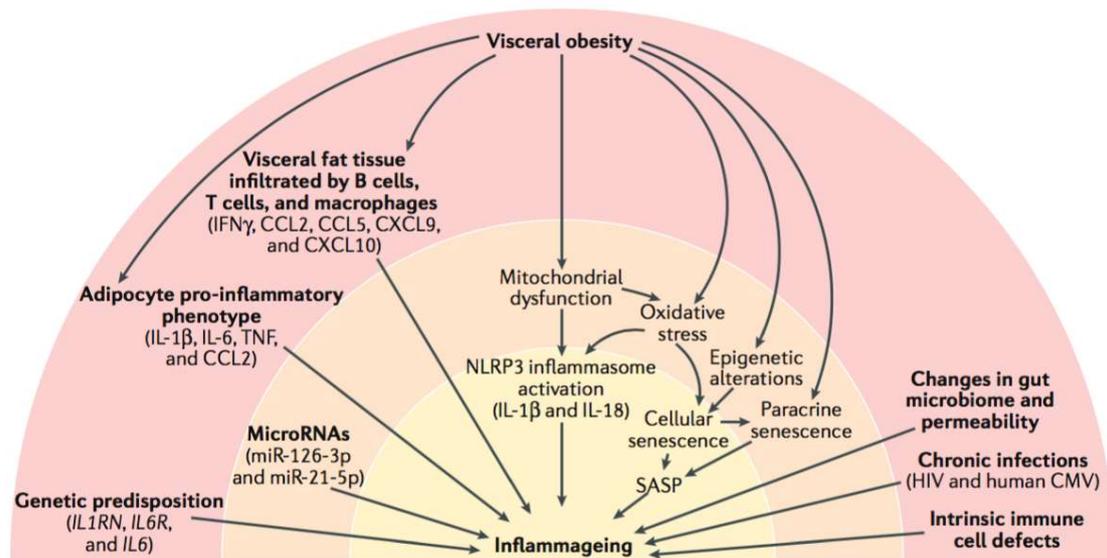
Le cause di uno stato infiammatorio cronico possono essere molteplici, come riassunto in Figura 5.

Ruolo centrale nello sviluppo di *inflammageing* svolge l'obesità centrale. Infatti il tessuto adiposo viscerale viene infiltrato da cellule T, macrofagi e monociti. Le cellule T secernono Interferon  $\gamma$ , che stimola la produzione di diverse chemochine da parte degli adipociti, tra cui chemochina 2 (CCL2), CCL5, C-X-C chemochina 9 (CXCL9) e CXCL10, che amplificano ulteriormente l'infiltrazione

delle cellule T dei tessuti. Anche il numero di cellule B e macrofagi nel tessuto adiposo viscerale di soggetti obesi è aumentato ed è correlato al BMI (75). Le citochine rilasciate dalle cellule B contribuiscono al cambiamento fenotipico degli adipociti nella cavità viscerale, inducendoli a rilasciare adipochine, altri fattori pro-infiammatori e detriti cellulari (76). I monociti attivati che danno origine ai macrofagi M1 e M2 producono ancora più composti infiammatori (77). Inoltre, infiammazione può essere generata dall'accumulo di mitocondri e altri detriti cellulari che, prodotti in grande quantità durante processi patologici (e.g. infezioni, ischemia) portano alla necrosi cellulare, non riescono ad essere prontamente eliminati e finiscono per innescare la via dell'inflammasoma NLRP3, portando alla produzione di IL-1 $\beta$  e IL-18 (74, 78-81). Lo stress ossidativo è uno dei possibili fattori scatenanti della senescenza cellulare e può essere indotto da numerosi altri fattori, tra cui alterazioni epigenetiche. Le cellule senescenti, attraverso il fenotipo secretorio associato alla senescenza (SASP), secernono grandi quantità di citochine, chemochine e altre molecole, innescando localmente più senescenza cellulare (senescenza paracrina) e contribuendo all'infiammazione.

Anche i cambiamenti nel microbioma legati all'età e gli aumenti della permeabilità della mucosa intestinale, che portano al rilascio di prodotti batterici nel sangue, stimolano una risposta infiammatoria, in parte attraverso l'inflammasoma NLRP3, e possono contribuire a generare e mantenere lo stato infiammatorio (74). Inoltre, parte dell'infiammazione di basso grado nell'anziano è probabilmente causata da infezioni croniche (ad esempio, virus dell'immunodeficienza umana o infezione da citomegalovirus umano) e da

meccanismi intrinseci difettosi nelle cellule immunitarie, che potrebbero comportare stress metabolico e cambiamenti legati all'età trascrizione microRNA. Infine, numerose varianti genetiche sono state associate ad elevati livelli di marker infiammatori o ad una aumentata risposta agli stimoli infiammatori (74).



**Figura 5. Possibili cause di inflammaging (74)**

Indipendentemente da quali siano le cause che lo hanno determinato, uno stato infiammatorio cronico è stato associato da numerosi studi ad una maggiore suscettibilità della parete arteriosa all'insorgenza dell'aterosclerosi e delle malattie CV (82). Tuttora è controverso se lo stato infiammatorio eserciti un ruolo causale nello sviluppo di malattie CV o se rappresenti solamente un epifenomeno. Queste due ipotesi non sono probabilmente mutuamente esclusive: infatti se da un lato il danno infiammatorio al livello delle cellule endoteliali partecipa alla genesi della placca aterosclerotica, l'aterosclerosi stessa può produrre antigeni che innescano e sostengono la risposta

infiammatoria, e cellule senescenti sono spesso riscontrate all'interno della placca. A livello endoteliale vi è accumulo di colesterolo contenente lipoproteine a bassa densità (LDL), che tendono a essere ossidate, generando così uno stimolo infiammatorio. L'attivazione della risposta infiammatoria ha un ruolo iniziante e promuovente la progressione dell'aterosclerosi, dalla iniziale disfunzione endoteliale fino allo sviluppo della trombosi acuta della placca stessa (65, 83-86). All'interno del *core* lipidico dell'ateroma, i monociti migrati attraverso la parete endoteliale e divenuti macrofagi si trasformano in cellule schiumose. I cristalli di colesterolo e altri detriti cellulari attivano meccanismi patogenetici correlati alla famiglia degli inflammasomi (82,87), portando alla liberazione di IL-1 $\beta$  e di altre citochine pro-infiammatorie che, a loro volta, esercitano un ruolo chemotattico per altre cellule infiammatorie fra cui linfociti T e linfociti B (88). I processi successivi sono caratterizzati da apoptosi massiva e dall'accumulo di cellule senescenti, che vanno a costituire il *core* necrotico della placca, da cui originerà la fragilità e la possibile futura rottura della stessa.

Le cellule all'interno della placca aterosclerotica in fase avanzata esprimono un fenotipo secretorio associato alla senescenza che da un lato potenzia l'infiammazione e dall'altro induce la produzione di metalloproteasi le quali degradano la matrice extracellulare, destabilizzando ulteriormente la placca (89). A sua volta, la degradazione della matrice induce la proliferazione delle cellule muscolari lisce che sintetizzano nuova matrice e vanno a formare il cosiddetto cappuccio fibroso, che stabilizza la lesione aterosclerotica. Tuttavia, inserite all'interno di un ambiente pro-infiammatorio, le stesse cellule muscolari lisce finiscono per sviluppare caratteristiche tipiche delle cellule senescenti

(danni al DNA ed eccessivo accorciamento dei telomeri) e perdere così la capacità di proliferare (90). Il bilancio fra regressione e progressione della placca costituisce il punto cruciale per arrivare alla rottura della stessa e alla successiva trombosi con occlusione del vaso interessato.

È evidente come l'infiammazione sia coinvolta in buona parte dei processi che influenzano questo bilancio. A dimostrazione di ciò, numerosi studi clinici hanno evidenziato come i livelli circolanti di PCR predicano il rischio di malattie CV in modo indipendente dalla presenza di altri fattori di rischio CV (91-93). Inoltre è stato riportato come la terapia con rosuvastatina, esercitando un effetto di tipo anti-infiammatorio, quando utilizzata in soggetti non dislipidemici riduca comunque l'incidenza di eventi CV in quei pazienti con elevati livelli di PCR (84,94).

La PCR è prodotta a livello epatico in modo direttamente correlato ai livelli ematici di IL-6; a differenza di altre proteine di fase acuta, la sua concentrazione permane stabile per un lungo periodo di tempo, anche in assenza di nuovi stimoli, facilitandone l'impiego come marcatore nella pratica clinica (95). È tuttavia ancora oggetto di dibattito se la PCR abbia un ruolo causale nella genesi dei processi infiammatori o se ne rappresenti soltanto un buon marcatore periferico (74). Certamente, oltre al valore predittivo, un ruolo causale è stato dimostrato per IL-6 ed IL-1 $\beta$ , sulle quali è stata recentemente posta attenzione anche come target di interventi terapeutici finalizzati a ridurre il rischio CV (96,97). In particolare, l'utilizzo di canakimumab (anticorpo monoclonale anti IL-1 $\beta$ ) si è dimostrato efficace nel ridurre il rischio di recidiva di eventi CV in pazienti già colpiti da infarto del miocardio e con elevati livelli di

infiammazione, indipendentemente dai livelli di colesterolo (96). Inoltre, il ruolo causale esercitato dall'infiammazione cronica nella patogenesi delle malattie CV è stato dimostrato indirettamente da alcuni trial finalizzati a trattare con antiinfiammatori malattie non CV, quali l'artrite reumatoide o la psoriasi, che hanno evidenziato una ridotta incidenza di eventi CV nei pazienti trattati rispetto ai controlli (74).

## **AGE, INFIAMMAZIONE E RISCHIO CARDIOVASCOLARE**

I prodotti finali di glicazione avanzata (AGE) sono una classe eterogenea di proteine e lipoproteine glicate, di origine endogena o esogena. La produzione endogena di AGE avviene attraverso la complessa reazione di Maillard, in cui gli zuccheri riducenti subiscono una serie di reazioni non enzimatiche che portano allo sviluppo di composti carbonilici reattivi e alla successiva glicosidazione di proteine, lipidi e acidi nucleici. La formazione di AGE avviene non soltanto in condizioni di iperglicemia ed aumentata glicolisi, ma anche nell'invecchiamento fisiologico e in presenza di stati infiammatori e stress ossidativo (98,99).

Il metabolismo del glucosio durante la glicolisi porta alla produzione di metilgliossale, un intermedio carbonilico nella produzione di alcune classi di AGE. In condizioni di stress ossidativo, zuccheri, aminoacidi e lipidi subiscono processi di autoossidazione che generano composti carbonilici reattivi ed aumentare la produzione di AGE con progressivo accumulo di questi all'interno dei tessuti (100-103).

Anche l'emoglobina può subire il processo di glicazione, generando quello che è certamente il più conosciuto fra gli AGE, l'emoglobina glicata.

La produzione di AGE è ubiquitaria nell'organismo umano, e gli AGE possono accumularsi maggiormente in tessuti a basso *turn-over* come pelle, cristallino e membrana basale glomerulare (99). L'entità della formazione di AGE in vivo è proporzionale alla disponibilità di substrato (in particolare monosaccaridi) nonché al tasso di turnover proteico. Le proteine con lunga emivita, con un

significativo contenuto di lisina e arginina (ad esempio collagene ed elastina), sono particolarmente sensibili alla glicazione.

Gli AGE possono anche avere origine esogena ed essere introdotti nell'organismo attraverso la dieta. Tra quelli che più frequentemente si formano nei processi di glicazione esogena e sono presenti negli alimenti possiamo ricordare l'*N*- $\epsilon$ -carbossimetil-lisina (CML) o l'*N*- $\epsilon$ -carbossietil-lisina (CEL) (104). Molto spesso i metodi di lavorazione degli alimenti portano a produzione di elevate quantità di AGE e questo può contribuire agli alti livelli di tali composti evidenziati nel sangue della popolazione occidentale (105).

Indipendentemente dall'origine, gli AGE possono agire da ligandi per differenti recettori cellulari. Fra questi, un ruolo chiave è ricoperto dal recettore per gli AGE (RAGE). RAGE è una proteina altamente conservata tra le specie ed espressa in un'ampia varietà di tessuti (106). In condizioni di stress, quando si accumulano stimoli infiammatori, l'espressione di RAGE è aumentata (107).

L'espressione basale di RAGE aumenta anche nell'età avanzata, condizione nella quale è stata riscontrata, oltre a elevati livelli di AGE, anche la persistenza di uno stato infiammatorio sistemico di basso grado (108). Nell'uomo, il recettore è codificato dal gene *AGER* che si trova all'interno della regione di classe III del complesso maggiore di istocompatibilità, sul cromosoma 6. Inizialmente gli AGE sono stati descritti come i principali ligandi attivanti, ma sono stati successivamente identificati altri ligandi per questo recettore (109). Fra questi possiamo citare HMGB1 e proteine del gruppo S100, che portano alla attivazione di numerose vie di segnale (PI3K/AKT, JAK-STAT, NF $\kappa$ B, Ras-MAPK, Rac1/cdc42, p44/p42, p38 e SAP/JNK MAPK), nonché all'attivazione di

fattori di trascrizione quali NF- $\kappa$ B, STAT3, HIF-1 $\alpha$ , AP-1 e CREB. Una volta attivati, questi fattori migrano all'interno del nucleo, interagiscono con il DNA e portano ad una aumentata espressione di citochine pro-infiammatorie (110).

Inoltre, RAGE coopera anche con i membri della famiglia dei *Toll-like receptor* (TLR), in particolare con TLR4 e TLR2, implicati nello sviluppo dell'immunità innata (111).

Oltre alla forma di RAGE a lunghezza intera, o RAGE di membrana (mRAGE), sono state descritte diverse forme troncate di RAGE (112), generate attraverso meccanismi di splicing alternativo a carico del gene AGER. Inoltre, nella specie umana sono stati descritti un certo numero di polimorfismi di RAGE. Le isoforme di RAGE comprendono il RAGE a lunghezza intera, la forma negativa dominante (DN-RAGE), la forma troncata N-terminale (N-RAGE) e quella troncata C-terminale (o RAGE solubile) (110).

La soppressione di porzioni dei domini transmembrana e citosolici determina la formazione della forma solubile di RAGE (esRAGE o RAGE v1) (113).

Inoltre, l'mRAGE umano può inoltre essere soggetto alla scissione proteolitica da parte di altre proteine, che rilasciano il dominio extracellulare come variante solubile chiamata sRAGE (114,115). Non è chiaro se le funzioni patofisiologiche di esRAGE e sRAGE siano distinte.

È stato dimostrato in vitro un ruolo *scavenger* da parte di sRAGE, che antagonizzerebbe mRAGE e altri recettori sottraendo ad essi i ligandi (116). È dubbio tuttavia che livelli endogeni possano svolgere questa funzione poiché le concentrazioni di sRAGE nel plasma sono circa 1000 volte inferiori a quelle degli AGE (109).

Per ottenerne la rimozione, gli AGE di origine proteica devono prima essere modificati in peptidi grazie a un processo operato a livello intracellulare dal sistema lisosomiale (Catepsine D e L) (117). Le proteine glicate sono generalmente denaturate e mal ripiegate, e possono essere degradate dal proteasoma 20S del sistema ubiquitina-proteasoma. Tuttavia, a causa della loro struttura voluminosa, gli AGE possono bloccare l'ingresso di proteine nel nucleo proteasomico portandone così all'accumulo. Anche i processi di autofagia svolgono un ruolo nella eliminazione degli AGE. Indipendentemente dal percorso, i peptidi derivati dalla degradazione degli AGE vengono infine eliminati dai reni. Tuttavia, poiché la funzione renale diminuisce lentamente con l'età ed è influenzata da una serie di condizioni infiammatorie croniche, la ridotta escrezione di AGE in eccesso contribuisce ad aumentare i livelli circolanti nell'invecchiamento e nelle malattie associate alla compromissione della funzionalità renale (118). Accanto alla rimozione delle proteine glicate, fisiologicamente un ruolo importante è svolto dalla degradazione enzimatica dei precursori degli AGE. Il sistema della gliossalasi decompone i composti carbonilici reattivi come il gliossale e il metilgliossale (119). Il glutathione ridotto è un cofattore importante per l'azione delle gliossalasi, ed i suoi livelli sono influenzati negativamente nell'invecchiamento e in condizioni di infiammazione cronica e stress ossidativo, compromettendo quindi il sistema di degradazione. L'accumulo di AGE nei tessuti dipende quindi da diversi fattori, tra cui il bilancio ossido-riduttivo, i livelli di zuccheri, l'attività dei sistemi di degradazione e, in minima parte, dalla piccola frazione di AGE assorbiti con la dieta (99).

È stato descritto che, con l'avanzare dell'età, l'accumulo di AGE sulle proteine della matrice è associato ad una maggiore rigidità ed a perdita di elasticità delle arterie. L'accumulo non è tuttavia limitato alle sole proteina a lunga emivita. Alterazioni nella struttura proteica dovute alla glicazione possono infatti rendere le proteine più resistenti alla degradazione, portando all'accumulo di proteine ossidate e danneggiate nelle cellule e negli organi (120).

Rispetto ai giovani sani, i livelli di AGE negli individui più anziani e negli individui con malattie infiammatorie croniche, subcliniche o manifeste, sono significativamente aumentati (121-123).

Molti studi clinici hanno dimostrato un'associazione tra livelli elevati di AGE e malattie CV nei pazienti con DM (99). Più recentemente, gli AGE sono stati implicati nel contribuire alla mortalità CV indipendentemente dalla presenza di DM (124). *Yozgatli et al.* hanno riportato una correlazione tra aumento dei livelli di AGE nei tessuti, misurata mediante autofluorescenza cutanea, ed incidenza di eventi vascolari (inclusi cardiopatia ischemica, malattia vascolare periferica e malattia cerebrovascolare), indipendentemente dai livelli dell'emoglobina glicosilata in una coorte di 563 soggetti con DM di tipo 2 (125). In un piccolo studio su pazienti con tolleranza al glucosio normale e sottoposti a coronarografia, le concentrazioni circolanti di AGE erano significativamente più elevate negli individui con malattia trivasale rispetto agli individui con malattia non ostruttiva o monovasale (126). Questo dato è stata confermato da uno studio successivo su 101 pazienti sottoposti a coronarografia, in cui un aumento dei livelli circolanti di pentosidina era associato a malattia coronarica ostruttiva

ed era correlato con la gravità angiografica della cardiopatia ischemica, indipendentemente dallo stato del DM (127).

Numerose evidenze legano l'accumulo di AGE e l'attivazione dell'asse AGE-RAGE alla persistenza di uno stato infiammatorio cronico. Riferendosi alle malattie CV sono stati evidenziati numerosi punti di contatto fra la presenza di un eccesso di AGE e l'attivazione di mediatori dei processi di infiammazione. (128).

In primo luogo, come si è detto la modificazione delle proteine della matrice extracellulare (collegene, elastina, laminina) indotta dagli AGE le rende meno suscettibili di degradazione proteolitica, con conseguente riduzione della elasticità dei tessuti e incremento della *stiffness* delle pareti vascolari. Anche a livello del miocardio, la glicazione delle proteine extracellulari strutturali nella matrice induce rigidità del tessuto, contribuendo ad un alterato rilasciamento e alla progressiva disfunzione diastolica (129). Oltre al collagene glicato, la glicazione dell'elastina e della laminina nella membrana basale compromettono l'adesione e la migrazione delle cellule endoteliali e portano ad una riduzione della produzione stress-indotta di ossido nitrico da parte delle cellule endoteliali, quindi a una ridotta vasodilatazione (130).

Anche la glicazione di fattori circolanti contribuisce alla trombogenesi, all'ipercoagulabilità e alla riduzione della fibrinolisi. Il fibrinogeno glicato è significativamente più resistente alla degradazione (131); analogamente l'annessina II e il cofattore II dell'eparina, quando modificate dagli AGE, risultano disfunzionali, con conseguente compromissione dei sistemi fibrinolitici (131). Le LDL glicate (132) possono migliorare la sensibilità piastrinica agli

agenti aggreganti, favorendo la trombogenesi; inoltre, è stato dimostrato che queste riducono la produzione di attivatore del plasminogeno tissutale nelle cellule endoteliali (133). La glicazione delle proteine extracellulari può anche promuovere direttamente l'aterosclerosi. Infatti, la glicazione delle LDL ne inibisce l'assorbimento da parte dei recettori per le LDL, riducendone la clearance. Ciò consente un maggiore assorbimento da parte di monociti e macrofagi e promuove la generazione di cellule schiumose (134,135).

A livello intracellulare, l'accumulo di AGE porta alla compromissione dei normali processi di ripiegamento delle proteine (136). Gli AGE intracellulari possono legarsi alle proteine mitocondriali coinvolte nel trasporto di elettroni, riducendo la sintesi di ATP e aumentando la produzione di superossido e altri ROS. Inoltre, la glutazione perossidasi e la glutazione reduttasi, enzimi del sistema antiossidante, possono essere modificati dagli AGE che ne determinano una ridotta attività enzimatica (137). La Figura 6 riassume la cascata di segnale che coinvolge gli AGE e la loro possibile relazione con la genesi delle malattie CV.

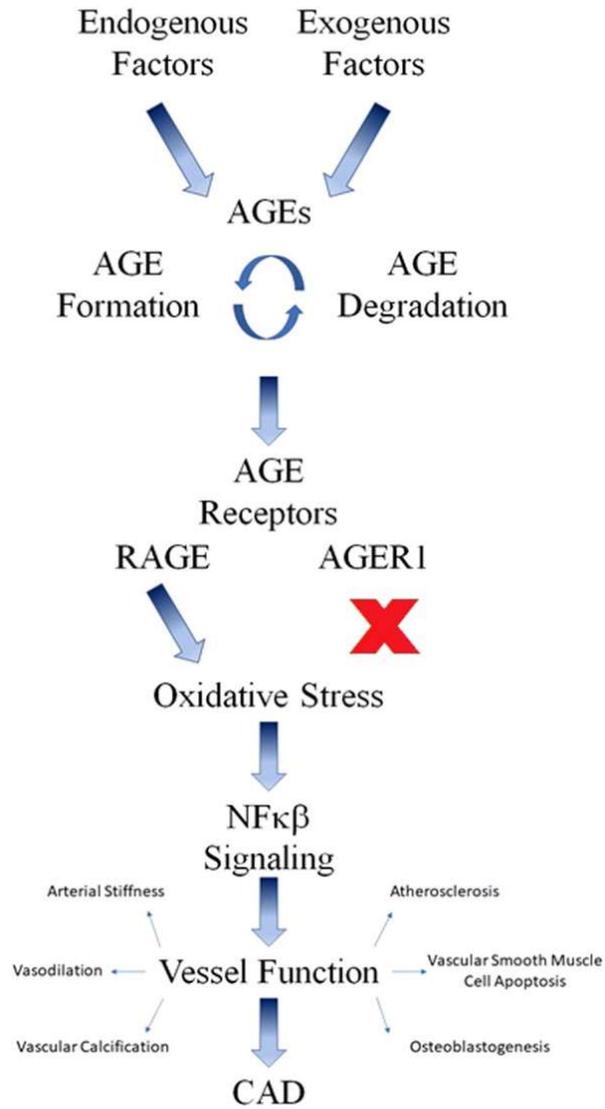


Figura 6. Relazione fra AGE e sviluppo di malattie CV (fishman 2018).

## STUDIO SPERIMENTALE

## **OBIETTIVO DELLO STUDIO**

Rispetto ai fratelli sani o alla popolazione generale, i CCS mostrano un elevato rischio di sviluppare malattie conseguenti alle precedenti terapie antitumorali (138,139). Tuttavia, è stato ben documentato come il rischio di effetti tardivi delle cure non sia lo stesso per ogni CCS e che questo dipenda in larga misura dall'intensità dei trattamenti ricevuti, fra i quali il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche (HSCT) riveste certamente un ruolo determinante (8). All'interno dell'eterogeneo gruppo dei CCS, i pazienti curati per LLA che hanno ricevuto HSCT condizionato con TBI a scopo mieloablativo mostrano un elevato rischio di complicanze tardive, comprese le malattie CV (9-13).

Numerosi studi hanno, negli ultimi decenni, esplorato l'epidemiologia e i fattori di rischio per lo sviluppo di malattie CV nei CCS, ed in particolare negli LLA *survivors* (140,141), tuttavia si sa ancora poco sui meccanismi biologici e molecolari che portano allo sviluppo di queste patologie in questa specifica tipologia di soggetti. Sono state ampiamente descritte la cardiotoxicità diretta di alcuni trattamenti antitumorali e le disfunzioni endocrine indotte da trattamenti antitumorali, che contribuiscono certamente allo sviluppo della sindrome metabolica (142). Tuttavia, la cardiotoxicità diretta e il coinvolgimento del sistema endocrino sembrano insufficienti a spiegare completamente l'aumento del rischio di malattie CV che caratterizza questa popolazione.

Partendo dall'osservazione che la maggior parte degli effetti tardivi che colpiscono i CCS sono malattie associate all'età avanzata (in particolare, i secondi tumori e le malattie CV), recentemente l'invecchiamento precoce è

stato proposto come paradigma per spiegare molti fra questi *late-effects* (58,59).

In contesti differenti da quello dei CCS, la glicazione proteica è stata dimostrata come uno dei principali fattori che contribuiscono all'invecchiamento (143,144). Inoltre, è stato dimostrato che gli AGE sono coinvolti nella patogenesi dell'aterosclerosi, della disfunzione miocardica e di altre malattie CV, attraverso la stimolazione delle vie proliferative e fibrotiche che inducono l'infiammazione vascolare (99,145).

La formazione di AGE quindi è in grado di indurre infiammazione cronica di basso grado (126,146-149), e questa è stata chiamata in causa da alcuni studi sulla patogenesi delle complicanze tardive dei trattamenti antitumorali (58,60,150-152). Recentemente, sono stati infatti riportati aumentati livelli di citochine infiammatorie in pazienti sottoposti ad HSCT (153).

Il presente studio ha quindi l'obiettivo di valutare i livelli plasmatici di AGE in una coorte di LLA *survivors* trattati con HSCT condizionato mediante TBI. In tutti i pazienti sono stati misurati inoltre i livelli plasmatici di PCR ad alta sensibilità (hs-PCR), IL-1 $\beta$  e IL-17 (marcatori di infiammazione di basso grado), il rapporto glutatione ossidato/ glutatione ridotto (GSSG / GSH) (espressione della riserva antiossidante) e il profilo lipidico.

La hs-PCR è ben nota come biomarcatore di infiammazione di basso grado, nonché come predittore di malattie CV (154). Mentre la PCR rappresenta un marcatore a valle, essendo prodotta dal fegato come risultato finale della attivazione della cascata infiammatoria, IL-1 $\beta$  può essere considerata la citochina pro-infiammatoria "apicale" ed è capace di indurre sia la propria

iperproduzione, sia la sintesi di altri mediatori infiammatori (154), tra cui IL-17 (155). È stato dimostrato che IL-17 ha effetti sul sistema CV, sia in vitro che in vivo. L'IL-17 infatti agisce su vasi e cellule cardiache, causando infiammazione, favorendo la coagulazione e la trombosi del vaso. Studi clinici hanno dimostrato il suo coinvolgimento nella patogenesi delle malattie CV, compresa l'aterosclerosi prematura e l'infarto del miocardio (155,156).

L'espressione di IL-1 $\beta$  e IL-17 può essere inoltre mediata dall'attivazione di RAGE, dimostrando il legame tra l'accumulo di AGE e l'espressione di queste citochine (157).

I risultati ottenuti sono stati quindi comparati con quelli ottenuti in una popolazione di controllo composta da soggetti sani. **METODI**

### *Soggetti*

Lo studio è stato condotto, fra il novembre 2016 e il marzo 2018, presso l'Unità di Transizione per Neoplasie Curate in Età Pediatrica dell'AOU Città della Salute e della Scienza, una *long-term follow-up clinic* specializzata nella presa in carico e nella gestione multidisciplinare dei giovani adulti curati per neoplasie dell'età evolutiva.

Sono stati invitati a partecipare allo studio tutti i pazienti che soddisfacevano i seguenti criteri: a) precedente diagnosi di LLA a età <18 anni, trattata con HSCT condizionato con TBI a scopo mieloablativo, b) età > 18 anni al momento dell'arruolamento; c) *off-therapy* da almeno 5 anni. I pazienti che avevano ricevuto trattamenti RT ulteriori rispetto alla TBI (i.e. RT encefalica e/o testicolare) sono stati esclusi dallo studio. Inoltre, sono stati osservati i seguenti criteri di esclusione: anamnesi patologica positiva per malattia CV attiva o pregressa (cardiopatía ischemica o valvolare, malattia cerebrovascolari, cardiopatie di altra eziologia), alterazione del metabolismo glicidico (DM o alterata glicemia a digiuno), BMI > 25 kg/m<sup>2</sup>, GVHD cronica attiva, fumo, storia familiare positiva per dislipidemia (158) o trattamento in atto con farmaci ipolipemizzanti, e presenza di gravi malattie croniche concomitanti.

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico competente per l'AOU Città della Salute e della Scienza di Torino (n.153 / 2015).

I dati demografici e clinici dei CCS seguiti presso la struttura - inclusi il tipo di tumore, i trattamenti ricevuti e la storia clinica - vengono regolarmente raccolti in

un database appositamente progettato. Tutti i pazienti sono stati arruolati durante le loro visite di follow-up e un consenso informato scritto è stato ottenuto da tutti loro. Inoltre, 30 soggetti sani, di pari età e che soddisfacevano gli stessi criteri di esclusione, sono stati utilizzati come gruppo di controllo.

#### *Analisi di laboratorio*

I campioni di sangue sono stati raccolti dopo un periodo di digiuno di almeno 6 ore. In tutti i soggetti, il colesterolo totale (Col) e i trigliceridi (Tg) sono stati misurati con un metodo enzimatico-colorimetrico di Trinder (Sentinel CH, Milano, Italia), il colesterolo HDL e LDL con metodo diretto (Sentinel CH, Milano, Italia). I livelli di colesterolo HDL2 e HDL3 sono stati determinati secondo *Gidez et al.* (159): le lipoproteine HDL2 e HDL3 sono state separate dopo precipitazione delle lipoproteine contenenti Apo B con eparina e cloruro di manganese e HDL2 sono state ulteriormente precipitate con destrano solfato. La lipoproteina (a), l'apolipoproteina (Apo) A-1 e l'Apo B sono state misurate con un metodo immunoturbidimetrico diretto (Sentinel CH, Milano, Italia). La hs-PCR è stata misurata con un metodo nefelometrico, seguendo le istruzioni del produttore.

IL-1 $\beta$  è stato misurato su plasma attraverso Quantikine ELISA Kit Human IL-1 $\beta$  (R&D Systems Inc, Minneapolis, MN, Canada), seguendo le istruzioni del produttore per la lettura dell'assorbanza. IL-17 è stata misurata su plasma con Quantikine ELISA Kit Human IL-17 (R&D Systems Inc, Minneapolis, MN, Canada), seguendo le istruzioni del produttore per la lettura dell'assorbanza.

Gli AGE sono stati quantificati su plasma attraverso il kit ELISA competitivo Oxiselect (Cell Biolabs Inc, San Diego, CA, USA), seguendo le istruzioni del

produttore per la lettura dell'assorbanza. Il rapporto GSSG / GSH è stato quantificato nel plasma con il kit di dosaggio Oxiselect Total Glutathione (Cell Biolabs Inc, San Diego, California, USA), seguendo le istruzioni del produttore per la lettura cinetica.

#### *Metodi statistici*

Le variabili categoriche sono riportate come conteggio e percentuali, mentre le variabili continue come media e deviazione standard. La distribuzione gaussiana o non gaussiana è stata valutata mediante il test di Kolmogorov-Smirnoff. Il test  $t$  è stato utilizzato per valutare le differenze tra variabili parametriche continue, test U Man-Whitney per variabili non parametriche, test chi-quadro per variabili categoriali e test esatto di Fisher per tabelle 2x2. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite con STATA 12.0 (StataCorp, 2011) e le differenze sono state considerate significative per  $p < 0,05$ .

## RISULTATI

I dati demografici e le caratteristiche del trattamento sono riassunti nella Tabella 1. Sono stati inclusi 18 pazienti e 30 controlli sani. I due gruppi erano simili per BMI ed età al momento dello studio.

**TABELLA 1. Caratteristiche cliniche e demografiche della popolazione in studio.**

	Controlli (n=30)		HSCT (n=18)	
	n.	%	n.	%
<b>Sesso</b>				
Femmine	16	53.3	11	61.1
Maschi	14	46.7	7	38.9
<b>Età (anni) alla diagnosi oncologica [media ± ds]</b>	-	-	7.92	4.44
<b>Età (anni) al momento dello studio [media ± ds]</b>	26.7	3.2	27.5	4.8
<b>Epoca di diagnosi oncologica</b>				
< 1990	-	-	2	11.1
1990-1994	-	-	3	16.7
1995-1999	-	-	6	43.4
2000-2004	-	-	5	27.7
> 2005	-	-	2	11.1
<b>BMI [media ± ds]</b>	21.9	2.1	21.6	2.6
<b>Chemioterapia*</b>				
<i>Alchilanti</i>				
No	-	-	1	5.5
Si	-	-	17	94.5
<i>Alcaloidi della vinca</i>				
No	-	-	1	5.5
Si	-	-	17	94.5
<i>Inibitori della topoisomerasi</i>				
No	-	-	7	38.9
Si	-	-	11	61.1
<b>Pregressa GVHD acuta</b>				
No	-	-	4	22.2
Si	-	-	14	77.8
<b>Pregressa GVHD cronica</b>				
No	-	-	12	66.7
Si	-	-	6	33.3
<b>Ipogonadismo</b>				
No	30	100	11	61.1
Si	0	0	7	38.9
<b>Ipotiroidismo</b>				

	Controlli (n=30)		HSCT (n=18)	
	n.	%	n.	%
No	30	100	9	50.0
Si	0	0	9	50.0
<b>GHD</b>				
No	30	100	14	77.8
Si	0	0	4	22.2
<b>Ipertensione arteriosa</b>				
No	30	100	15	83.3
Si	0	0	3	16.7

\* Tutti i pazienti inclusi sono stati sottoposti a CT con asparaginasi, antracicline, antimetaboliti; nessuno ha ricevuto bleomicina o actinomicina.

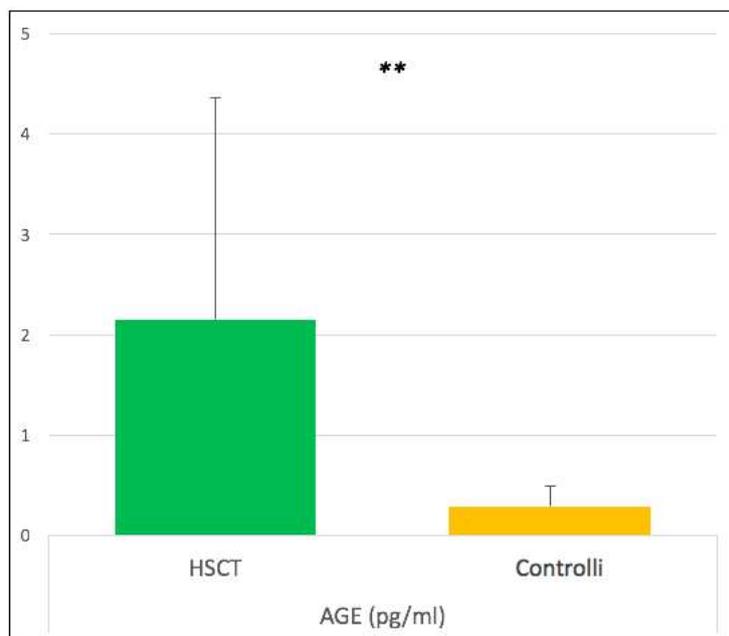
La maggior parte dei pazienti è stata diagnosticata tra il 1990 e il 2004. L'età media alla diagnosi era di  $7,9 \pm 4,4$  anni; l'età media al momento dello studio era di  $27,5 \pm 4,8$  anni per i pazienti e  $26,7 \pm 3,2$  anni per controlli. Per quanto riguarda le pregresse CT, tutti erano stati trattati con antracicline, antimetaboliti e asparaginasi; la maggior parte di loro aveva anche ricevuto agenti alchilanti e alcaloidi della vinca.

Tutti i pazienti presentavano anamnesi familiare negativa per dislipidemia familiare e normale funzionalità renale ed epatica. Al momento dello studio, tutti i pazienti con ipogonadismo o ipotiroidismo erano in terapia ormonale sostitutiva con adeguato compenso, mentre nessuno dei pazienti affetti da deficit dell'ormone della crescita (GHD) era in trattamento con GH. I pazienti con ipertensione erano in trattamento con farmaci antiipertensivi (ACE-inibitori e/o beta-bloccanti), con un controllo ottimale della pressione arteriosa.

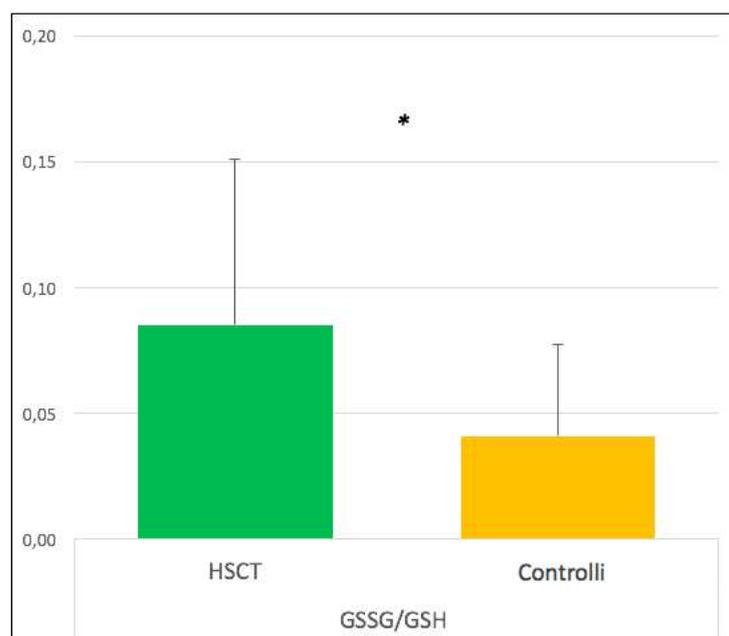
#### *Misurazione di laboratorio.*

I livelli plasmatici di AGE nei pazienti che avevano ricevuto HSCT + TBI erano notevolmente più alti di quelli trovati nei controlli ( $2,15 \pm 2,21$  vs  $0,29 \pm 0,15$  pg /

mL,  $p < 0,01$ ; Figura 7). I pazienti avevano anche un rapporto GSSG / GSH più elevato rispetto ai controlli ( $0,085 \pm 0,07$  vs  $0,041 \pm 0,036$ ,  $p < 0,05$ ) (Figura 8).

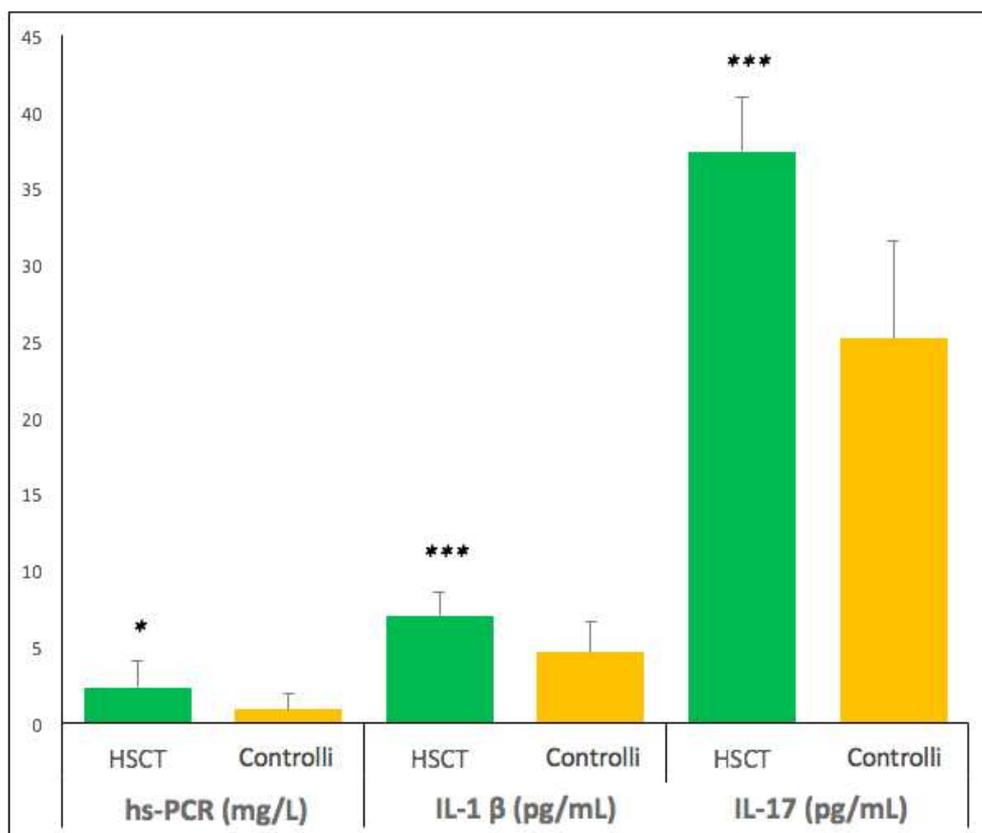


**Figura 7. Livelli plasmatici di AGE in HSCT survivors e controlli (media ± DS). \*\***  
 $p < 0,01$



**Figura 8. Rapporto GSSG/GSH in HSCT survivors e controlli. \*  $p < 0,05$**

I pazienti presentavano anche livelli sierici significativamente più elevati dei marcatori di infiammazione considerati. Infatti, i livelli di hs-PCR (HSCT  $2,32 \pm 1,70$  mg/dL; controlli  $0,88 \pm 1,09$  mg/dL,  $p < 0,05$ ), IL-1 $\beta$  (HSCT  $7,04 \pm 1,52$  pg/mL; controlli  $4,6 \pm 2,02$  pg/mL,  $p < 0,001$ ) e IL-17 (HSCT  $37,44 \pm 3,51$  pg/mL; i controlli  $25,19 \pm 6,34$  pg/mL,  $p < 0,001$ ) erano più alti rispetto al gruppo di controllo (Figura 9).



**Figura 9. Livelli plasmatici dei markers di infiammazione in HSCT survivors e controlli (media  $\pm$  SD). \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$**

Per quanto riguarda il profilo lipidico, le differenze fra pazienti e controlli sono risultate meno marcate. Infatti, rispetto al gruppo di controllo gli HSCT survivors avevano unicamente livelli significativamente più alti di Tg (HSCT

189,38 ± 147,40 mg/dL; controlli 84,97 ± 37,28 mg/dL, p <0,01) e Apo B (HSCT 105,80 ± 20,47 mg/dL; controlli 80,81 ± 13,54 mg/dL, p <0,005). Per quanto riguarda i livelli di HDL questi erano modicamente più elevati nei controlli rispetto ai casi, con significato statistico solo per le HDL2. Inoltre, il rapporto colesterolo totale / HDL (4,25 ± 1,09 vs 3,17 ± 0,45, p <0,02) e i rapporti Apo B / Apo A-1 (0,73 ± 0,15 vs 0,48 ± 0,09, p <0,001) erano più elevati nei *survivors* rispetto ai controlli (Tabella 2). I restanti parametri del profilo lipidico hanno mostrato una distribuzione più variabile, senza una chiara differenza tra i due gruppi. Valutando separatamente ciascuno dei due gruppi, non sono state inoltre rilevate associazioni significative fra i livelli di AGE e il profilo lipidico.

**Tabella 2. Profilo lipidico.**

		Media	Deviazion e Standard	95% IC		p value
<b>Col. totale (mg/dL)</b>	HSCT	193,50	38,22	173,13	213,87	0,757
	Controlli	177,10	22,43	168,72	185,48	
<b>Col. HDL (mg/dL)</b>	HSCT	47,69	12,22	41,18	54,20	0,478
	Controlli	56,95	11,69	51,48	62,42	
<b>Col. HDL2 (mg/dL)</b>	HSCT	15,31	8,60	10,73	19,90	0,006
	Controlli	23,91	8,28	18,35	29,47	
<b>Col. HDL3 (mg/dL)</b>	HSCT	32,31	7,76	28,18	36,45	0,252
	Controlli	38,09	5,36	34,49	41,69	
<b>Col. LDL (mg/dL)</b>	HSCT	117,56	34,37	99,25	135,88	0,252
	Controlli	99,30	22,32	90,97	107,63	
<b>Trigliceridi (mg/dL)</b>	HSCT	189,38	147,40	110,83	267,92	0,005
	Controlli	84,97	37,28	71,05	98,89	
<b>Lipoproteina (a) (mg/dL)</b>	HSCT	26,53	29,36	10,88	42,17	0,353
	Controlli	36,70	38,36	22,38	51,03	
<b>Apo A-1 (mg/dL)</b>	HSCT	142,75	20,01	132,09	153,41	0,182
	Controlli	172,73	25,10	163,36	182,11	
<b>Apo B (mg/dL)</b>	HSCT	105,80	20,47	94,47	117,13	0,001
	Controlli	80,81	13,54	75,76	85,87	
<b>Apo B/Apo A-1</b>	HSCT	0,73	0,15	0,65	0,81	<0,001

	Controlli	0,48	0,09	0,44	0,51	
<b>Col Tot/HDL</b>	HSCT	4,25	1,09	3,67	4,83	<i>0,019</i>
	Controlli	3,17	0,45	2,95	3,38	

## DISCUSSIONE

I nostri dati mostrano che, 5 o più anni dopo la fine delle terapie antitumorali, i giovani adulti affetti da LLA e sottoposti ad HSCT condizionato con TBI arruolati in questo studio presentano livelli di AGE circa sette volte più elevati rispetto ai controlli sani. I livelli più elevati di hs-PCR, IL-1 $\beta$  e IL-17 riscontrati nei soggetti trapiantati suggeriscono la presenza di stato infiammatorio cronico, in accordo con quanto recentemente dimostrato su una coorte di LLA *survivors* non sottoposti a trapianto (151). Uno sbilanciamento dell'equilibrio ossido-riduttivo è inoltre suggerito dall'elevato rapporto GSSG/GSH riscontrato nei pazienti sottoposti ad HSCT.

Per quanto riguarda il profilo lipidico, i livelli di Tg e Apo-B - così come il rapporto Colesterolo totale / HDL-Col e quello Apo-B / Apo-A1 - sono più elevati nei *survivors*, che mostrano anche livelli più bassi di HDL2. Questi risultati concordano con numerosi studi precedentemente pubblicati (160,161), che hanno mostrato un'aumentata incidenza di alterazioni del profilo lipidico in pazienti sottoposti ad HSCT in età pediatrica.

Precedenti studi hanno suggerito che la concentrazione sierica di AGE può predire la gravità della malattia CV nei pazienti non diabetici (99,126). Gli AGE possono contribuire allo sviluppo di lesioni vascolari, attirando i monociti da legare alla superficie del vaso, seguiti dalla loro migrazione nella parete del vaso e dalla successiva attivazione delle cellule endoteliali e dalla produzione di mediatori (162). Inoltre, gli AGE hanno un ruolo centrale nella glicosidazione delle lipoproteine e nella formazione delle cellule schiumose che sono fondamentali nella progressione del danno aterosclerotico (163,164). La

formazione di AGE è stata documentata in numerosi studi su coorti di pazienti affetti da DM, tuttavia essa si verifica non soltanto in condizioni di iperglicemia, ma anche in presenza di stress ossidativo (98). Ed è altrettanto noto che l'esposizione alle radiazioni ionizzanti o ad alcuni agenti chemioterapici, come le antracicline, provoca un aumento immediato della produzione di ROS, generando stress ossidativo (165,166).

Pertanto, si può ipotizzare che lo stress ossidativo indotto dalle terapie oncologiche (CT e/o RT) possa portare alla formazione e all'accumulo di AGE che a loro volta possono indurre infiammazione, ridurre le difese antiossidanti e aumentare la produzione di ROS. Attraverso questo meccanismo sostenuto dalla presenza di AGE, lo stress ossidativo generato dalle terapie oncologiche (protratte per molti mesi) potrebbe perpetuarsi anche dopo la fine delle stesse. Pertanto gli AGE, funzionando come una sorta di "memoria metabolica", potrebbero rappresentare un punto chiave di questo circolo vizioso insieme alla formazione di ROS, allo stress ossidativo e all'infiammazione (99,109,167,168). Lo stato infiammatorio persistente dopo la fine delle terapie oncologiche potrebbe quindi contribuire in modo rilevante al rischio CV degli HSCCT *survivors*. Infatti, un'ampia serie di evidenze collega l'infiammazione cronica al rischio CV. È ben noto ad esempio che i livelli plasmatici di hs-PCR sono predittivi sia dell'insorgenza delle malattie CV che dell'efficacia della terapia con statine nella prevenzione di tali patologie (154). Per quanto riguarda IL-1 $\beta$ , questa può indurre l'adesione dei leucociti sulle cellule endoteliali vascolari, esercitare un'attività pro-coagulante e agire come mitogeno per le cellule lisce vascolari umane (169,170). Inoltre, più recentemente, studi in vivo e clinici

hanno dimostrato il coinvolgimento dell'IL-17 nella patogenesi dell'aterosclerosi e dell'infarto del miocardio, che sono più frequenti e si verificano prematuramente in pazienti con malattie infiammatorie croniche (155,171), nonché nei CCS (172,173).

L'evidenza di un cospicuo aumento dei livelli plasmatici di AGE può avere una particolare rilevanza nel contesto della *cancer survivorship*, non soltanto confinata al rischio CV ma potenzialmente rilevante anche per comprendere la genesi di molti altri *late-effects* delle terapie oncologiche, primi fra tutti i secondi tumori. Questa osservazione troverebbe un razionale fisiopatologico partendo da quanto recentemente suggerito da alcuni studi che hanno documentato come l'esposizione ai trattamenti antitumorali durante l'infanzia induca l'attivazione prematura di vie molecolari legate all'invecchiamento (59) e tenuto conto che il danno da glicazione è stato proposto come un possibile *hub* per molte malattie croniche, oltre che per l'invecchiamento fisiologico (144). Anche se questa osservazione va oltre l'argomento principale di questo studio, va sottolineato che i CCS sono ad alto rischio di secondi tumori maligni e che - negli ultimi anni - gli AGE hanno acquisito interesse anche come possibili determinanti dell'insorgenza e della progressione del cancro (98,174-177).

La bassa numerosità della coorte oggetto di questo studio rappresenta certamente il principale limite a queste osservazioni. Tuttavia, i pazienti inclusi erano omogenei per storia di malattia, precedenti trattamenti antitumorali e caratteristiche cliniche al momento dell'arruolamento, e i soggetti affetti da patologie che potevano influenzare l'accumulo di AGE e lo stato infiammatorio

(ad esempio DM, ma anche GvHD attiva, malattie epatiche o renali) sono stati accuratamente esclusi.

Inoltre, per quanto l'aumentato rischio CV che caratterizza i CCS sottoposti ad HSCT sia ben noto, i soggetti inclusi nel nostro studio erano tutti al momento della valutazione privi di manifestazioni cliniche di cardiopatia pertanto, solo la prosecuzione del follow-up consentirà di valutare la reale associazione fra le alterazioni dei parametri valutati e la comparsa di eventi CV.

## CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

In conclusione i nostri dati dimostrano che, molti anni dopo il completamento delle terapie oncologiche, i giovani adulti sottoposti ad HSCT condizionato con TBI mostrano livelli sierici elevati di AGE e di alcuni marcatori di infiammazione cronica.

Questa osservazione si inserisce in continuità con alcuni recenti studi che vedono nella cosiddetta *inflammaging* e nella senescenza precoce possibili paradigmi per comprendere la fisiopatologia dei *late-effects* delle terapie oncologiche effettuate in età pediatrica.

Certamente si tratta di uno studio pilota, che necessita di conferme su coorti più ampie di pazienti, tuttavia esso apre la strada a sviluppi di ricerca futuri. In primo luogo, la possibilità di studiare questi stessi parametri su CCS guariti da neoplasie diverse dalla LLA, con lo scopo non soltanto di confermare l'osservazione ma anche di chiarire il ruolo delle singole componenti della terapia oncologica (CT, RT e HSCT) nel promuovere e mantenere le alterazioni dei parametri analizzati. Inoltre, attraverso studi prospettici, potrebbe essere studiata la cinetica con cui le alterazioni oggetto dello studio si instaurano ed eventualmente si perpetuano, a partire dall'esposizione alle terapie oncologiche e successivamente nel tempo.

La caratterizzazione dal punto di vista biochimico degli AGE interessati in questo contesto, partendo dalle osservazioni presenti in letteratura sul ruolo dei vari sottogruppi di AGE nella eziopatogenesi di molte malattie croniche (non solo CV), e lo studio a livello cellulare delle cascate di segnale infiammatorie coinvolte in questi processi (i.e. NFkB e inflammasoma NLRP3), oltre ai livelli di

espressione dei recettori RAGE e di enzimi pro- e anti-ossidanti, potrebbero inoltre contribuire a definire con maggiore certezza il legame fra terapie oncologiche e lo sviluppo delle alterazioni evidenziate in questo studio.

Mediante studi di comparazione fra CCS affetti o non affetti da malattie cardiovascolari, potrebbe essere dimostrata l'associazione fra gli elevati livelli di AGE e le malattie CV, mentre attraverso studi longitudinali sarebbe possibile valutare il valore degli aumentati livelli di AGE e *markers* di infiammazione cronica come predittori dell'insorgenza, più o meno precoce, delle manifestazioni cliniche delle malattie CV.

Infine, ottenuta la conferma di queste osservazioni, si aprirebbe la strada alla valutazione di strategie terapeutiche finalizzate a ridurre l'accumulo di AGE e l'infiammazione cronica come un possibile strumento attraverso il quale contrastare il rischio di *late-effects* nei CCS.

## BIBLIOGRAFIA

1. Howlader N, Noone AM, Krapcho M: SEER Cancer Statistics Review (CSR) 1975-2013. Bethesda, Md: National Cancer Institute, 2015. Available online. Last accessed October 18, 2019
2. Bell K, Ristovski-Slijepcevic S. Cancer survivorship: why labels metter. *J Clin Oncol.* 2013; 31(4):409-411.
3. Oeffinger KC1, Mertens AC, Sklar CA, Kawashima T, Hudson MM, Meadows AT, Friedman DL, Marina N, Hobbie W, Kadan-Lottick NS, Schwartz CL, Leisenring W, Robison LL; Childhood Cancer Survivor Study. Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer. *N Engl J Med* 2006; 355:1572-1582.
4. Felicetti F, Fortunati N, Biasin E, Corrias A, Brignardello E. Complicanze endocrine a lungo temine nei cancer survivors. *L'Endocrinologo* 2014; 15(3):123-129.
5. Armstrong GT, Liu Q, Yasui Y et al Late Mortality Among 5-Year Survivors of Childhood Cancer: A Summary From the Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Oncol* 2009; 27:2328-2338.
6. Silverman LB. Balancing cure and long-term risks in acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2014;2014(1):190-197.
7. PDQ Pediatric Treatment Editorial Board. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment (PDQ®): Health Professional Version. 2019 Oct 22. In: PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65763/>
8. Bhakta N, Liu Q, Ness KK, Baassiri M, Eissa H, Yeo F, Chemaitilly W, Ehrhardt MJ, Bass J, Bishop MW, Shelton K, Lu L, Huang S, Li Z, Caron E, Lanctot J, Howell C, Folse T, Joshi V, Green DM, Mulrooney DA, Armstrong GT, Krull KR, Brinkman TM, Khan RB, Srivastava DK, Hudson MM, Yasui Y, Robison LL. The cumulative burden of surviving childhood cancer: an initial report from the St Jude Lifetime Cohort Study (SJLIFE). *Lancet* 2017;390:2569-2582.
9. Felicetti F, D'Ascenzo F, Moretti C, Corrias A, Omedè P, Marra WG, Arvat E, Fagioli F, Brignardello E, Gaita F. Prevalence of cardiovascular risk factors in long-term survivors of childhood cancer: 16 years follow up from a perspective registry. *European Journal of Preventive Cardiology* 2015;22:762-770.
10. Saultier P, Auquier P, Bertrand Y, Vercasson C, Oudin C, Contet A, Plantaz D, Poirée M, Ducassou S, Kanold J, Tabone MD, Dalle JH, Lutz P, Gandemer V, Sirvent N, Thouvenin S, Berbis J, Chambost H, Baruchel A, Leverger G, Michel G.. Metabolic syndrome in long-term survivors of childhood acute leukemia treated without hematopoietic stem cell transplantation: An L.E.A. study. *Haematologica* 2016;101:1603-1610.
11. Keegan THM, Kushi LH, Li Q, Brunson A, Chawla X, Chew HK, Malogolowkin M, Wun T. Cardiovascular disease incidence in adolescent and

- young adult cancer survivors: a retrospective cohort study. *J Cancer Surviv* 2018;12:388-397.
12. Pommier P, Sunyach MP, Pasteuris C, Frappaz D, Carrie C. Second cancer after total-body irradiation (TBI) in childhood. *Strahlenther Onkol* 2009;185(Suppl 2):13-16.
  13. Ferry C, Gemayel G, Rocha V, Labopin M, Esperou H, Robin M, de Latour RP, Ribaud P, Devergie A, Leblanc T, Gluckman E, Baruchel A, Socié G. Long-term outcomes after allogeneic stem cell transplantation for children with hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant* 2007;40:219-224.
  14. Felicetti F, Fortunati N, Brignardello E. Cancer survivors: An expanding population with an increased cardiometabolic risk. *Diabetes Res Clin Pract*. 2018;143:432-442.
  15. Krischer JP, Epstein S, Cuthbertson DD, Goorin AM, Epstein ML, Lipshultz SE. Clinical cardiotoxicity following anthracycline treatment for childhood cancer: the Pediatric Oncology Group experience. *Journal of Clinical Oncology* 1997;15:1544-1552
  16. Lipshultz SE, Cochran TR, Franco VI, Miller TL. Treatment-related cardiotoxicity in survivors of childhood cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013;10:697-710.
  17. Dowd NP, Scully M, Adderley SR, Cunningham AJ, Fitzgerald DJ. Inhibition of cyclooxygenase-2 aggravates doxorubicin-mediated cardiac injury in vivo. *J Clin Invest*. 2001;108(4):585-590.
  18. Goormaghtigh E, Huart P, Praet M, Brasseur R, Ruyschaert JM. Structure of the adriamycin-cardiolipin complex. Role in mitochondrial toxicity. *Biophys Chem*. 1990;35:247-257.
  19. Tokarska-Schlattner M1, Zaugg M, Zuppinger C, Wallimann T, Schlattner U. New insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: the critical role of cellular energetics. *J Mol Cell Cardiol*. 2006;41:389-405.
  20. Lipshultz SE, Colan SD, Gelber RD, Perez-Atayde AR, Sallan SE, Sanders SP. Late cardiac effects of doxorubicin therapy for acute lymphoblastic leukemia in childhood. *N Engl J Med*. 1991;324:808-815.
  21. Grenier MA, Lipshultz SE. Epidemiology of anthracycline cardiotoxicity in children and adults. *Semin Oncol* 1998;25:72-85.
  22. Lipshultz SE, Lipsitz SR, Sallan SE, Dalton VM, Mone SM, Gelber RD, Colan SD. Chronic Progressive Cardiac Dysfunction Years After Doxorubicin Therapy for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 2005;23:2629-2636.
  23. Swerdlow AJ, Higgins CD, Smith P, Cunningham D, Hancock BW, Horwich A, Hoskin PJ, Lister A, Radford JA, Rohatiner AZ, Linch DC. Myocardial infarction mortality risk after treatment for Hodgkin disease: a collaborative British cohort study. *J Natl Cancer Inst*. 2007;99:206-214.
  24. Adams MJ, Lipsitz SR, Colan SD, Tarbell NJ, Treves ST, Diller L, Greenbaum N, Mauch P, Lipshultz SE. Cardiovascular status in long-term survivors of

- Hodgkin's disease treated with chest radiotherapy. *J Clin Oncol.* 2004;22:3139-3148.
25. Schellong G, Riepenhausen M, Bruch C, Kotthoff S, Vogt J, Bölling T, Dieckmann K, Pötter R, Heinecke A, Brämswig J, Dörffel W. Late valvular and other cardiac diseases after different doses of mediastinal radiotherapy for Hodgkin disease in children and adolescents: report from the longitudinal GPOH follow-up project of the German-Austrian DAL-HD studies. *Pediatr Blood Cancer.* 2010;55:1145-1152.
  26. Stewart JR, Fajardo LF, Gillette SM, Constine LS. Radiation injury to the heart. *International Journal of Radiation Oncology, Biology Physics* 1995;31:1205-1211
  27. Madan R, Benson R, Sharma DN, Julka PK, Rath GK. Radiation induced heart disease: Pathogenesis, management and review literature. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2015;27:187-193.
  28. Hardenbergh PH, Munley MT, Bentel GC, Kedem R, Borges-Neto S, Hollis D, Prosnitz LR, Marks LB. Cardiac perfusion changes in patients treated for breast cancer with radiation therapy and doxorubicin: preliminary results. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001;49:1023-1028.
  29. Veinot JP, Edwards WD. Pathology of radiation-induced heart disease: a surgical and autopsy study of 27 cases. *Hum Pathol.* 1996;27:766-773.
  30. Yusuf SW, Sami S, Daher IN. Radiation-induced heart disease: a clinical update. *Cardiol Res Pract* 2011::317659.
  31. Majhail NS, Tao L, Bredeson C, Davies S, Dehn J, Gajewski JL et al. Prevalence of hematopoietic cell transplant survivors in the United States. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013;19:1498-501.
  32. Bhatia S, Francisco L, Carter A, Sun CL, Baker KS, Gurney JG et al. Late mortality after allogeneic hematopoietic cell transplantation and functional status of long-term survivors: report from the Bone Marrow Transplant Survivor Study. *Blood* 2007;110:3784-92.
  33. Armenian SH, Chemaitilly W, Chen M, Chow EJ, Duncan CN, Jones LW et al. National Institutes of Health Hematopoietic Cell Transplantation Late Effects Initiative: the Cardiovascular Disease and Associated Risk Factors Working Group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2017;23:201-10.
  34. Sun CL, Kersey JH, Francisco L, Armenian SH, Baker KS, Weisdorf DJ et al. Burden of Morbidity in 10+ Year Survivors of Hematopoietic Cell Transplantation: Report from the Bone Marrow Transplantation Study *Biol Blood Marrow Transplant* 2013;19:1073-80.
  35. Chow EJ, Mueller BA, Baker KS, Cushing-Haugen KL, Flowers ME, Martin PJ et al. Cardiovascular hospitalizations and mortality among recipients of hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Intern Med* 2011;155:21-32.
  36. Tichelli A, Bucher C, Rovó A, Stussi G, Stern M, Paulussen M, Halter J, Meyer-Monard S, Heim D, Tsakiris DA, Biedermann B, Passweg JR, Gratwohl A. Premature cardiovascular disease after allogeneic hematopoietic stem-cell

- transplantation. *Blood* 2007;110:3463-71.
37. Oudin C, Simeoni MC, Sirvent N, Contet A, Begu-Le Coroller A, Bordigoni P et al. Prevalence and risk factors of the metabolic syndrome in adult survivors of childhood leukemia. *Blood* 2011;117:4442-8.
  38. Fuji S, Kim SW, Yoshimura K, Akiyama H, Okamoto S, Sao H et al. Japan Marrow Donor Program. Possible association between obesity and posttransplantation complications including infectious diseases and acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009;15: 73-82.
  39. Fuji S, Takano K, Mori T, Eto T, Taniguchi S, Ohashi K et al. Impact of pretransplant body mass index on the clinical outcome after allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2014;49:1505-12.
  40. Mostoufi-Moab S, Ginsberg JP, Bunin N, Zemel BS, Shults J, Thayu M et al. Body composition abnormalities in long-term survivors of pediatric hematopoietic stem cell transplantation. *J Pediatr* 2012;16: 122-8.
  41. Lu CW, Yang KC, Chang HH, Lee LT, Chen CY, Huang KC. Sarcopenic obesity is closely associated with metabolic syndrome. *Obes Res Clin Pract* 2013;7:e301-e7.
  42. Baker KS, Chow E, Steinberger J. Metabolic syndrome and cardiovascular risk in survivors after hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2012;47:619-25.
  43. Greenfield DM, Boland E, Ezaydi Y, Ross RJ, Ahmedzai SH, Snowden JA. Late Effects Group. Endocrine, metabolic, nutritional and body composition abnormalities are common in advanced intensively-treated (transplanted) multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant* 2014;49:907-12.
  44. Baker KS, Ness KK, Steinberger J, Carter A, Francisco L, Burns LJ et al. Diabetes, hypertension, and cardiovascular events in survivors of hematopoietic cell transplantation: a report from the Bone Marrow Transplantation Survivor Study. *Blood* 2007;109:1765-72.
  45. Blaser BW, Kim HT, Alyea EP 3rd, Ho VT, Cutler C, Armand P et al. Hyperlipidemia and statin use after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012;18:575-83.
  46. Majhail NS, Flowers ME, Ness KK, Jagasia M, Carpenter PA, Arora M et al. High prevalence of metabolic syndrome after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2009;43:49-54.
  47. Chow EJ, Baker KS, Lee SJ, Flowers ME, Cushing-Haugen KL, Inamoto Y et al. Influence of conventional cardiovascular risk factors and lifestyle characteristics on cardiovascular disease after hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol* 2014;32:191-8.
  48. Griffith ML, Savani BN, Boord JB. Dyslipidemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: evaluation and management. *Blood* 2010;116:1197-204.
  49. Marini BL, Choi SW, Byersdorfer CA, Cronin S, Frame DG. Treatment of dyslipidemia in allogeneic hematopoietic stem cell transplant patients. *Biol*

- Blood Marrow Transplant 2015;21:809-20.
50. Brignardello E, Felicetti F, Castiglione A, Chiabotto P, Corrias A, Fagioli F, Ciccone G, Boccuzzi G. Endocrine health conditions in adult survivors of childhood cancer: the need for specialized adult-focused follow-up clinics. *Eur J Endocrinol* 2013;168:465-472.
  51. Felicetti F, Manicone R, Corrias A, Manieri C, Biasin E, Bini I, Boccuzzi G, Brignardello E. Endocrine late effects after total body irradiation in patients who received hematopoietic cell transplantation during childhood: a retrospective study from a single institution. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011;137:1343-1348.
  52. Fuji S, Rovó A, Ohashi K, Griffith M, Einsele H, Kapp M et al. How do I manage hyperglycemia/post-transplant diabetes mellitus after allogeneic HSCT. *Bone Marrow Transplant* 2016;51:1041-9.
  53. Majhail NS, Challa TR, Mulrooney DA, Baker KS, Burns LJ. Hypertension and diabetes mellitus in adult and pediatric survivors of allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant* 2009;15:1100-7.
  54. Wei C, Thyagarajan MS, Hunt LP, Shield SP, Stevens MC, Crowne EC. Reduced insulin sensitivity in childhood survivors of haematopoietic stem cell transplantation is associated with lipodystrophic and sarcopenic phenotypes. *Pediatr. Blood Cancer* 2015;62:1992-9.
  55. Kagoya Y, Seo S, Nannya Y, Kurokawa M. Hyperlipidemia after allogeneic stem cell transplantation: prevalence, risk factors, and impact on prognosis. *Clin Transplant* 2012;26:e168-75.
  56. Pophali PA, Klotz JK, Ito S, Jain NA, Koklanaris E, Le RQ, Hourigan CS, Savani BN, Chawla K, Shanbhag S, Barrett AJ, Battiwalla M. Male survivors of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation have a long term persisting risk of cardiovascular events. *Exp Hematol.* 2014;42:83-89.
  57. Armenian SH, Gibson CJ, Rockne RC, Ness KK. Premature Aging in Young Cancer Survivors. *J Natl Cancer Inst* 2019;111:226-232.
  58. Ness KK, Armstrong GT, Kundu M, Wilson CL, Tchkonja T, Kirkland JL. Frailty in childhood cancer survivors. *Cancer* 2015;121:1540-1547.
  59. Ness KK, Kirkland JL, Gramatges MM, Wang Z, Kundu M, McCastlain K, Li-Harms X, Zhang J, Tchkonja T, Pluijm SMF, Armstrong GT. Premature Physiologic Aging as a Paradigm for Understanding Increased Risk of Adverse Health Across the Lifespan of Survivors of Childhood Cancer. *J Clin Oncol* 2018;36:2206-2215.
  60. Sulicka J, Surdacki A, Mikołajczyk T, Strach M, Gryglewska B, Ćwiklińska M, Balwierz W, Guzik T, Grodzicki TK. Elevated markers of inflammation and endothelial activation and increased counts of intermediate monocytes in adult survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Immunobiology* 2013;218:810-816.
  61. Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* 2000;908:244-254.

62. Ferrucci L, Semba RD, Guralnik JM, Ershler WB, Bandinelli S, Patel KV, Sun K, Woodman RC, Andrews NC, Cotter RJ, Ganz T, Nemeth E, Longo DL. Proinflammatory state, hepcidin, and anemia in older persons. *Blood* 2010;115:3810-3816.
63. Cohen HJ, Pieper CF, Harris T, Rao KM, Currie MS. The association of plasma IL-6 levels with functional disability in community-dwelling elderly. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1997;52:M201-208.
64. Gerli R, Monti D, Bistoni O, Mazzone AM, Peri G, Cossarizza A, Di Gioacchino M, Cesarotti ME, Doni A, Mantovani A, Franceschi C, Paganelli R. Chemokines, sTNF-Rs and sCD30 serum levels in healthy aged people and centenarians. *Mech Ageing Dev* 2000; 121:37-46.
65. Ruparelia N, Chai JT, Fisher EA & Choudhury RP. Inflammatory processes in cardiovascular disease: a route to targeted therapies. *Nat Rev Cardiol* 2017;14:133–144
66. Leonardi GC, Accardi G, Monastero R, Nicoletti F & Libra M. Ageing: from inflammation to cancer. *Immun Ageing* 2018;15:1
67. Gorelick PB. Role of inflammation in cognitive impairment: results of observational epidemiological studies and clinical trials. *Ann NY Acad Sci* 2010;1207:155–162.
68. Miller AH, Raison CL. The role of inflammation in depression: From evolutionary imperative to modern treatment target. *Nat Rev Immunol* 2016;16:22–34.
69. Ferrucci L, Harris TB, Guralnik JM, Tracy RP, Corti MC, Cohen HJ, Penninx B, Pahor M, Wallace R, Havlik RJ. Serum IL-6 level and the development of disability in older persons. *J Am Geriatr Soc* 1999;47:639–646.
70. Kuo H, Bean JF, Yen C, Leveille SG. Linking C-reactive protein to late-life disability in the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999–2002. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2006;61:380–387.
71. Schaap LA, Pluijm SM, Deeg DJ, Harris TB, Kritchevsky SB, Newman AB, Colbert LH, Pahor M, Rubin SM, Tylavsky FA, Visser M; Health ABC Study. Higher inflammatory marker levels in older persons: associations with 5-year change in muscle mass and muscle strength. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2009;64:1183–1189.
72. Soysal P, Stubbs B, Lucato P, Luchini C, Solmi M, Peluso R, Sergi G, Isik AT, Manzato E, Maggi S, Maggio M, Prina AM, Cosco TD, Wu YT, Veronese N. Inflammation and frailty in the elderly: a systematic review and meta-analysis. *Ageing Res Rev* 2016;31:1–8.
73. Volpato S, Guralnik JM, Ferrucci L, Balfour J, Chaves P, Fried LP, Harris TB. Cardiovascular disease, interleukin-6, and risk of mortality in older women: the women's health and aging study. *Circulation* 2001;103:947–953.
74. Ferrucci L, Fabbri E. Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nat Rev Cardiol* 2018;15:505–522.
75. Frasca D, Blomberg BB. Adipose Tissue Inflammation Induces B Cell

- Inflammation and Decreases B Cell Function in Aging. *Front Immunol* 2017;8:1003.
76. Frasca D, Blomberg BB, Paganelli R Aging, obesity, and inflammatory age-related diseases. *Front Immunol* 2017;8:1–10.
  77. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003;112:1796-808.
  78. Medina CB, Ravichandran KS. Do not let death do us part: 'find-me' signals in communication between dying cells and the phagocytes. *Cell Death Differ* 2016;23:979-989.
  79. Medzhitov R, Janeway CA Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 2002; 296:298-300.
  80. Franceschi C, Garagnani P, Vitale G, Capri M, Salvioli S. Inflammaging and 'Garb-aging'. *Trends Endocrinol Metab* 2017;28:199-212.
  81. Youm YH, Grant RW, McCabe LR, Albarado DC, Nguyen KY, Ravussin A, Pistell P, Newman S, Carter R, Laque A, Münzberg H, Rosen CJ, Ingram DK, Salbaum JM, Dixit VD. Canonical Nlrp3 inflammasome links systemic low-grade inflammation to functional decline in aging. *Cell Metab* 2013;18:519–532.
  82. Golia E, Limongelli G, Natale F, Fimiani F, Maddaloni V, Pariggiano I, Bianchi R, Crisci M, D'Acierno L, Giordano R, Di Palma G, Conte M, Golino P, Russo MG, Calabrò R, Calabrò P. Inflammation and cardiovascular disease: from pathogenesis to therapeutic target. *Curr Atheroscler Rep* 2014;16:435.
  83. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352:1685–1695.
  84. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Inflammation in atherosclerosis. from pathophysiology to practice. *Am J Coll Cardiol* 2009;54:2129–2138.
  85. De Caterina R, D'Ugo E, Libby P. Inflammation and thrombosis – Testing the hypothesis with anti-inflammatory drug trials. *Thromb Haemost* 2016;116:1012–1021.
  86. Libby P, Okamoto Y, Rocha VZ, Folco E. Inflammation in atherosclerosis. *Circ J* 2010;74: 213–220.
  87. Rajamäki K, Lappalainen J, Oörni K, Välimäki E, Matikainen S, Kovanen PT, Eklund KK. Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation. *PLoS One* 2010;5:e1175.
  88. Warnatsch A, Ioannou M, Wang Q, Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science* 2015;349:316–320.
  89. Wang M, Kim SH, Monticone RE & Lakatta EG. Matrix metalloproteinases promote arterial remodeling in aging, hypertension, and atherosclerosis. *Hypertension* 2015;65:698–703 (2015).
  90. Matthews C1, Gorenne I, Scott S, Figg N, Kirkpatrick P, Ritchie A, Goddard M,

- Bennett M. Vascular smooth muscle cells undergo telomere-based senescence in human atherosclerosis: effects of telomerase and oxidative stress. *Circ Res* 2006;99:156-164.
91. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1997;336:973–979.
  92. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2000;342: 836–843.
  93. Cushman M, Arnold AM, Psaty BM, Manolio TA, Kuller LH, Burke GL, Polak JF, Tracy RP. C-reactive protein and the 10-year incidence of coronary heart disease in older men and women: the cardiovascular health study. *Circulation* 2005;112:25-31.
  94. Levinson SS Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C.-reactive protein – an analysis. *Clin J Ligand Assay* 2008;31:25–28.
  95. Ishikawa H1, Tsuyama N, Abroun S, Liu S, Li FJ, Otsuyama K, Zheng X, Kawano MM. Interleukin-6, CD45 and the src-kinases in myeloma cell proliferation. *Leuk Lymphoma* 2003;44:1477-1481.
  96. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, Fonseca F, Nicolau J, Koenig W, Anker SD, Kastelein JJP, Cornel JH, Pais P, Pella D, Genest J, Cifkova R, Lorenzatti A, Forster T, Kobalava Z, Vida-Simiti L, Flather M, Shimokawa H, Ogawa H, Dellborg M, Rossi PRF, Troquay RPT, Libby P, Glynn RJ; CANTOS Trial Group. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med* 2017;377:1119-1131.
  97. Everett BM, Pradhan AD, Solomon DH, Paynter N, Macfadyen J, Zaharris E, Gupta M, Clearfield M, Libby P, Hasan AA, Glynn RJ, Ridker PM. Rationale and design of the Cardiovascular Inflammation Reduction Trial: a test of the inflammatory hypothesis of atherothrombosis. *Am Heart J* 2013;166:199-207.
  98. Palanissami G, Paul SFD. RAGE and Its Ligands: Molecular Interplay Between Glycation, Inflammation, and Hallmarks of Cancer-a Review. *Horm Cancer* 2018;9:295-325.
  99. Fishman SL, Sonmez H, Basman C, Singh V, Poretsky L. The role of advanced glycation end-products in the development of coronary artery disease in patients with and without diabetes mellitus: a review. *Mol Med* 2018;24:59.
  100. Chappay O, Dosquet C, Wautier MP, Wautier JL. Advanced glycation end products, oxidant stress and vascular lesions. *Eur J Clin Invest* 1997;27:97-108.
  101. Bunn HF, Higgins PJ. Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance. *Science*. 1981;213:222–224.
  102. Ott C, Jacobs K, Haucke E, Navarrete Santos A, Grune T, Simm A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol* 2014;2:411-429.
  103. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 2001;44:129-46.

104. Birlouez-Aragon I, Saavedra G, Tessier FJ, Galinier A, Ait-Ameur L, Lacoste F, Niamba CN, Alt N, Somoza V, Lecerf JM. A diet based on high-heat-treated foods promotes risk factors for diabetes mellitus and cardiovascular diseases. *Am J Clin Nutr* 2010;91:1220-1226.
105. Vlassara H, Uribarri J, Cai W, Goodman S, Pyzik R, Post J, Grosjean F, Woodward M, Striker GE. Effects of sevelamer on HbA1c, inflammation, and advanced glycation end products in diabetic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2012;7:934-942.
106. Gonzalez I, Romero J, Rodriguez BL, Perez-Castro R, Rojas A. The immunobiology of the receptor of advanced glycation end-products: trends and challenges. *Immunobiology* 2013;218:790-797.
107. Bierhaus A, Stern DM, Nawroth PP. RAGE in inflammation: a new therapeutic target? *Curr Opin Investig Drugs* 2006;7:985-991.
108. Xie J, Mendez JD, Mendez-Valenzuela V, Aguilar-Hernandez MM. Cellular signalling of the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *Cell Signal* 2013;25:2185-2197.
109. Reynaert NL, Gopal P, Rutten EPA, Wouters EFM, Schalkwijk CG. Advanced glycation end products and their receptor in age-related, non-communicable chronic inflammatory diseases; Overview of clinical evidence and potential contributions to disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2016;81:403-418.
110. Bongarzone S, Savickas V, Luzi F, Gee AD. Targeting the Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE): A Medicinal Chemistry Perspective. *J Med Chem* 2017;60:7213-7232.
111. Ibrahim ZA, Armour CL, Phipps S, Sukkar MB. RAGE and TLRs: relatives, friends or neighbours? *Molecular immunology* 2013;56:739-744.
112. Hudson B, Carter AM, Harja E, Kalea AZ, Arriero M, Yang H, Grant PJ, Schmidt AM: Identification, classification, and expression of RAGE gene splice variants. *FASEB journal* 2008;22:1572-1580.
113. Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, Petrova RG, Abedin MJ, Li H, Yasui K, Takeuchi M, Makita Z, Takasawa S, Okamoto H, Watanabe T, Yamamoto H. Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *The Biochemical Journal* 2003;370:1097-1109.
114. Raucci A, Cugusi S, Antonelli A, Barabino SM, Monti L, Bierhaus A, Reiss K, Saftig P, Bianchi ME. A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *FASEB journal* 2008;22:3716-3727.
115. Zhang L, Bukulin M, Kojro E, Roth A, Metz VV, Fahrenholz F, Nawroth PP, Bierhaus A, Postina R. Receptor for advanced glycation end products is subjected to protein ectodomain shedding by metalloproteinases. *J Biol Chem* 2008;283:35507-35516.

116. Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, Stern DM, Nawroth PP. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *Journal of Molecular Medicine* 2005;83:876-886.
117. Grimm S, Horlacher M, Catalgol B, Hoehn A, Reinheckel T, Grune T. Cathepsins D and L reduce the toxicity of advanced glycation end products. *Free Radic Biol Med* 2012;52:1011-1023.
118. Vlassara H, Uribarri J, Cai W, Striker G. Advanced glycation end product homeostasis: exogenous oxidants and innate defenses. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1126:46-52.
119. Maessen DE, Stehouwer CD, Schalkwijk CG. The role of methylglyoxal and the glyoxalase system in diabetes and other age-related diseases. *Clin Sci* 2015;128:839-861.
120. Nowotny K, Jung T, Grune T, Hohn A. Accumulation of modified proteins and aggregate formation in aging. *Experimental gerontology* 2014;57:122-131.
121. Ahmed MU, Brinkmann Frye E, Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW. N-epsilon-(carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins. *The Biochemical Journal* 1997;324:565-570
122. Horie K, Miyata T, Yasuda T, Takeda A, Yasuda Y, Maeda K, Sobue G, Kurokawa K. Immunohistochemical localization of advanced glycation end products, pentosidine, and carboxymethyllysine in lipofuscin pigments of Alzheimer's disease and aged neurons. *Biochemical and biophysical research communications* 1997;236:327-332.
123. Herold K, Moser B, Chen Y, Zeng S, Yan SF, Ramasamy R, Emond J, Clynes R, Schmidt AM: Receptor for advanced glycation end products (RAGE) in a dash to the rescue: inflammatory signals gone awry in the primal response to stress. *J Leukoc Biol* 2007; 82:204-212.
124. Semba RD, Ferrucci L, Sun K, Beck J, Dalal M, Varadhan R, Walston J, Guralnik JM, Fried LP. Advanced glycation end products and their circulating receptors predict cardiovascular disease mortality in older community-dwelling women. *Aging Clin Exp Res* 2009;21:182-190.
125. Yozgatli K, Lefrandt JD, Noordzij MJ, Oomen PHN, Brouwer T, Jager J, Castro Cabezas M, Smit AJ. Accumulation of advanced glycation end products is associated with macrovascular events and glycaemic control with microvascular complications in Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 2018 Apr 23. doi: 10.1111/dme.13651. [Epub ahead of print]
126. Kanauchi M, Tsujimoto N, Hashimoto T. Advanced glycation end products in nondiabetic patients with coronary artery disease. *Diabetes Care* 2001;24:1620-1623.
127. Kerkeni M, Weiss IS, Jaisson S, Dandana A, Addad F, Gillery P, Hammami M. Increased serum concentrations of pentosidine are related to presence and severity of coronary artery disease. *Thromb Res* 2014; 134:633-

- 638.
128. Franceschi C, Campisi J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2014;69:S4-S9.
  129. Candido R, Forbes JM, Thomas MC, Thallas V, Dean RG, Burns WC, Tikellis C, Ritchie RH, Twigg SM, Cooper ME, Burrell LM. A breaker of advanced glycation end products attenuates diabetes-induced myocardial structural changes. *Circ Res* 2003;92:785-792.
  130. Haitoglou CS, Tsilibary EC, Brownlee M, Charonis AS. Altered cellular interactions between endothelial cells and nonenzymatically glycosylated laminin/type IV collagen. *J Biol Chem* 1992; 267:12404-12407.
  131. Takenaka K, Yamagishi S, Matsui T, Nakamura K, Imaizumi T. Role of advanced glycation end products (AGEs) in thrombogenic abnormalities in diabetes. *Curr Neurovasc Res* 2006;3:73-77.
  132. Zoltowska M, Delvin E, Ziv E, Peretti N, Chartré M, Levy E. Impact of in vivo glycation of LDL on platelet aggregation and monocyte chemotaxis in diabetic psammomys obesus. *Lipids* 2004; 39:81-85.
  133. Zhang J, Ren S, Sun D, Shen GX. Influence of glycation on LDL-induced generation of fibrinolytic regulators in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:1140-1418.
  134. Cai W, He JC, Zhu L, Peppas M, Lu C, Uribarri J, Vlassara H. High levels of dietary advanced glycation end products transform low-density lipoprotein into a potent redox-sensitive mitogen-activated protein kinase stimulant in diabetic patients. *Circulation* 2004;110:285-291
  135. Sobal G, Menzel EJ, Sinzinger H. Calcium antagonists as inhibitors of in vitro low density lipoprotein oxidation and glycation. *Biochem Pharmacol* 2001; 61:373-379.
  136. Adamopoulos C, Farmaki E, Spilioti E, Kiaris H, Piperi C, Papavassiliou AG. Advanced glycation end-products induce endoplasmic reticulum stress in human aortic endothelial cells. *Clin Chem Lab Med* 2014; 52:151-160.
  137. Prasad A, Bekker P, Tsimikas S. Advanced glycation end products and diabetic cardiovascular disease. *Cardiol Rev* 2012; 20:177-183.
  138. Essig S, Li Q, Chen Y, Hitzler J, Leisenring W, Greenberg M, Sklar C, Hudson MM, Armstrong GT, Krull KR, Neglia JP, Oeffinger KC, Robison LL, Kuehni CE, Yasui Y, Nathan PC. Risk of late effects of treatment in children newly diagnosed with standard-risk acute lymphoblastic leukaemia: a report from the Childhood Cancer Survivor Study cohort. *Lancet Oncol* 2014;15:841-851.
  139. Armstrong GT, Chen Y, Yasui Y, Leisenring W, Gibson TM, Mertens AC, Stovall M, Oeffinger KC, Bhatia S, Krull KR, Nathan PC, Neglia JP, Green DM, Hudson MM, Robison LL. Reduction in Late Mortality among 5-Year Survivors of Childhood Cancer. *N Engl J Med* 2016;374:833-842.
  140. Armstrong GT, Kawashima T, Leisenring W, Stratton K, Stovall M,

- Hudson MM, Sklar CA, Robison LL, Oeffinger KC. Aging and risk of severe, disabling, life-threatening, and fatal events in the childhood cancer survivor study. *J Clin Oncol* 2014;32:1218-1227.
141. Hudson MM. Clinical ascertainment of health outcomes among adults treated for childhood cancer. *JAMA* 2013;309:2371-2381.
  142. de Haas EC, Oosting SF, Lefrandt JD, Wolffenbuttel BH, Sleijfer DT, Gietema JA. The metabolic syndrome in cancer survivors. *Lancet Oncology* 2010;11:193-203.
  143. Sadowska-Bartosz I, Bartosz G. Effect of glycation inhibitors on aging and age-related diseases. *Mech Ageing Dev* 2016;160:1-18.
  144. Fournet M, Bonté F, Desmoulière A. Glycation Damage: A Possible Hub for Major Pathophysiological Disorders and Aging. *Aging Dis* 2018;9:880-900.
  145. Collotta D, Lucarini L, Chiazza F, Cento AS, Durante M, Sgambellone S, Chini J, Baratta F, Aragno M, Mastrocola R, Masini E, Collino M. Reduced Susceptibility to Sugar-Induced Metabolic Derangements and Impairments of Myocardial Redox Signaling in Mice Chronically Fed with D-Tagatose when Compared to Fructose. *Oxid Med Cell Longev* 2018;5042428.
  146. Mastrocola R, Nigro D, Chiazza F, Medana C, Dal Bello F, Boccuzzi G, Collino M, Aragno M. Fructose-derived advanced glycation end-products drive lipogenesis and skeletal muscle reprogramming via SREBP-1c dysregulation in mice. *Free Radic Biol Med* 2016;91:224-235.
  147. Brignardello E, Runzo C, Aragno M, Catalano MG, Cassader M, Perin PC, Boccuzzi G. Dehydroepiandrosterone administration counteracts oxidative imbalance and advanced glycation end product formation in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2007;30:2922-2927.
  148. Aragno M, Mastrocola R. Dietary Sugars and Endogenous Formation of Advanced Glycation Endproducts: Emerging Mechanisms of Disease. *Nutrients* 2017;9(4):pii E385. doi: 10.3390/nu9040385.
  149. Mastrocola R, Nigro D, Cento AS, Chiazza F, Collino M, Aragno M. High-fructose intake as risk factor for neurodegeneration: Key role for carboxy methyllysine accumulation in mice hippocampal neurons. *Neurobiol Dis* 2016;89:65-75.
  150. Vatanen A, Hou M, Huang T, Söder O, Jahnukainen T, Kurimo M, Ojala TH, Sarkola T, Turanlahti M, Saarinen-Pihkala UM, Jahnukainen K. Clinical and biological markers of premature aging after autologous SCT in childhood cancer. *Bone Marrow Transplant* 2017;52:600-605.
  151. Ariffin H, Azanan MS, Abd Ghafar SS, Oh L, Lau KH, Thirunavakarasu T, Sedan A, Ibrahim K, Chan A, Chin TF, Liew FF, Jeyamogan S, Rosli ES, Baharudin R, Yap TY, Skinner R, Lum SH, Hainaut P. Young adult survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia show evidence of chronic inflammation and cellular aging. *Cancer* 2017;123:4207-4214.
  152. Rosen GP, Nguyen HT, Shaibi GQ. Metabolic syndrome in pediatric cancer survivors: a mechanistic review. *Pediatr Blood Cancer* 2013;60:1922-

- 1928.
153. Ketterl TG, Chow EJ, Leisenring WM, Goodman P, Koves IH, Petryk A, Steinberger J, Baker KS. Adipokines, Inflammation, and Adiposity in Hematopoietic Cell Transplantation Survivors. *Biol Blood Marrow Transplant* 2018;24:622-626.
  154. Ridker PM. From C-Reactive Protein to Interleukin-6 to Interleukin-1: Moving Upstream to Identify Novel Targets for Atheroprotection. *Circ Res* 2016;118:145-156.
  155. Robert M, Miossec P. Effects of Interleukin 17 on the cardiovascular system. *Autoimmun Rev* 2017;16:984-991.
  156. Zielinski CE, Mele F, Aschenbrenner D, Jarrossay D, Ronchi F, Gattorno M, Monticelli S, Lanzavecchia A, Sallusto F. Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN- $\gamma$  or IL-10 and are regulated by IL-1 $\beta$ . *Nature* 2012; 484:514-518.
  157. Lee S, Piao C, Kim G, Kim JY, Choi E, Lee M. Production and application of HMGB1 derived recombinant RAGE-antagonist peptide for anti-inflammatory therapy in acute lung injury. *Eur J Pharm Sci* 2018;114:275-284.
  158. Stone NJ, Robinson JG, Lichtenstein AH, Bairey Merz CN, Blum CB, Eckel RH, Goldberg AC, Gordon D, Levy D, Lloyd-Jones DM, McBride P, Schwartz JS, Shero ST, Smith SC Jr, Watson K, Wilson PW, Eddleman KM, Jarrett NM, LaBresh K, Nevo L, Wnek J, Anderson JL, Halperin JL, Albert NM, Bozkurt B, Brindis RG, Curtis LH, DeMets D, Hochman JS, Kovacs RJ, Ohman EM, Pressler SJ, Sellke FW, Shen WK, Smith SC Jr, Tomaselli GF; American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* 2014;129:S1-45.
  159. Gidez LI, Miller GJ, Burnstein M, Slagle S, Eder HA. Separation and quantitation of subclasses of human plasma HDL by a single precipitation procedure. *J Lipid Res* 1982;23:1206-1216.
  160. Leahy J, Spahis S, Bonneil E, Garofalo C, Grimard G, Morel S, Laverdière C, Krajinovic M, Drouin S, Delvin E, Sinnett D, Marcil V, Levy E. Insight from mitochondrial functions and proteomics to understand cardiometabolic disorders in survivors of acute lymphoblastic leukemia. *Metabolism* 2018;85:151-160.
  161. Friedman DN, Hilden P, Moskowitz CS, Suzuki M, Boulad F, Kernan NA, Wolden SL, Oeffinger KC, Sklar CA. Cardiovascular Risk Factors in Survivors of Childhood Hematopoietic Cell Transplantation Treated with Total Body Irradiation: A Longitudinal Analysis. *Biol Blood Marrow Transplant* 2017;23:475-482
  162. Schmidt AM, Hori O, Chen JX, Li JF, Crandall J, Zhang J, Cao R, Yan SD, Brett J, Stern D. Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1

- (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J Clin Invest* 1995;96:1395-1403.
163. Lyons TJ, Jenkins AJ. Lipoprotein glycation and its metabolic consequences. *Curr Opin Lipidol* 1997;8:174-180.
  164. Rojas A, Mercadal E, Figueroa H, Morales MA. Advanced Glycation and ROS: a link between diabetes and heart failure. *Curr Vasc Pharmacol* 2008;6:44-51.
  165. Azzam EI, Jay-Gerin JP, Pain D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett* 2012;327:48-60.
  166. Cappetta D, De Angelis A, Sapio L, Prezioso L, Illiano M, Quaini F, Rossi F, Berrino L, Naviglio S, Urbanek K. Oxidative Stress and Cellular Response to Doxorubicin: A Common Factor in the Complex Milieu of Anthracycline Cardiotoxicity. *Oxid Med Cell Longev* 2017;1521020. doi: 10.1155/2017/1521020.
  167. Ramasamy R, Vannucci SJ, Yan SS, Herold K, Yan SF, Schmidt AM. Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. *Glycobiology* 2005;15;16R-28R.
  168. Ceriello A. Hypothesis: the “metabolic memory”, the new challenge of diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2009;86:S2-S6.
  169. Bevilacqua MP, Pober JS, Wheeler ME, Cotran RS, Gimbrone MA Jr. Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines. *J Clin Invest* 1985;76:2003–2011.
  170. Libby P, Warner SJ, Friedman GB. Interleukin 1: a mitogen for human vascular smooth muscle cells that induces the release of growth-inhibitory prostanoids. *J Clin Invest* 1988;81:487–498.
  171. Arida A, Protogerou AD, Kitas GD, Sfrikakis PP. Systemic Inflammatory Response and Atherosclerosis: The Paradigm of Chronic Inflammatory Rheumatic Diseases. *Int J Mol Sci* 2018;19(7):E1890.
  172. Chow EJ, Wong K, Lee SJ, Cushing-Haugen KL, Flowers ME, Friedman DL, Leisenring WM, Martin PJ, Mueller BA, Baker KS. Late cardiovascular complications after hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;20:794-800.
  173. Duncan CN, Brazauskas R, Huang J, Shaw BE, Majhail NS, Savani BN, Flowers MED, Battiwalla M, Beebe K, Dietz AC, Dvorak CC, Giller R, Jacobsohn DA, Kletzel M, Martin PL, Nemecek ER, Nuechterlein B, Talano JA, Pulsipher MA, Baker KS. Late cardiovascular morbidity and mortality following pediatric allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2018;53:1278-1287.
  174. Abe R, Yamagishi S. AGE-RAGE system and carcinogenesis. *Curr Pharm Des* 2008;14:940-945.

175. Lin JA, Wu CH, Lu CC, Hsia SM, Yen GC. Glycative stress from advanced glycation end products (AGEs) and dicarbonyls: An emerging biological factor in cancer onset and progression. *Mol Nutr Food Res* 2016;60:1850-1864.
176. Ahmad S, Khan H, Siddiqui Z, Khan MY, Rehman S, Shahab U, Godovikova T, Silnikov V, Moinuddin. AGEs, RAGEs and s-RAGE; friend or foe for cancer. *Semin Cancer Biol* 2018;49:44-55.
177. Niall D K, Des C W. Advanced Glycation End Products and Tumorigenesis. *J Tumor Med Prev* 2017;1:555558. doi: 10.19080/JTMP.2017.01.555558