

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
DEPARTMENTUL XII- OBSTRETICĂ ȘI GINECOLOGIE**

FELICIA FIAT



TEZĂ DE DOCTORAT

**PHYSICAL AND TOXICOLOGICAL EVALUATION OF
PHYSIOTHERAPEUTIC AND THERAPEUTIC INTERVENTIONS
IN PREGNANCY**

Conducător de doctorat

CONF. UNIV. DR. ELENA SILVIA BERNAD

Timișoara

2024

CUPRINS

LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE.....**Error!**

Bookmark not defined.

LISTA ABREVIERILOR ȘI SIMBOLURILOR**Error!**

Bookmark not defined.

LISTA FIGURILOR.....**Error!**

Bookmark not defined.

LISTA TABELURILOR.....**Error!**

Bookmark not defined.

DEDICAȚIE**Error! Bookmark not defined.**

INTRODUCERE**Error! Bookmark not defined.**

PARTEA GENERALĂ**Error! Bookmark not defined.**

1. MODIFICĂRI FIZIOLOGICE ȘI PATOLOGICE ÎNTÂLNITE ÎN TIMPUL SARCINII

.....**Error!**

Bookmark not defined.

1.1. Modificări fiziologice întâlnite în timpul sarcinii.....**Error!**

Bookmark not defined.

1.1.1. Modificări musculo-scheletice întâlnite în timpul sarcinii.....**Error!**

Bookmark not defined.

1.2. Modificări patologice întâlnite în timpul sarcinii**Error!**

Bookmark not defined.

2. CANCERUL ÎN TIMPUL SARCINEI.....**Error!**

Bookmark not defined.

3. INTERVENȚII TERAPEUTICE ȘI FIZIOTERAPEUTICE ÎNTÂLNITE ÎN SARCINĂ
.....**Error!**

Bookmark not defined.

3.1. Tratamentul durerii si anticoagulant in cazul gravidelor.....**Error!**

Bookmark not defined.

3.2. Terapia anticancer în timpul sarcinei.....**Error!**

Bookmark not defined.

3.3. Intervențiile kinetoterapeutice în sarcină.....**Error!**

Bookmark not defined.

PARTEA SPECIALĂ**Error! Bookmark not defined.**

4. STUDIU RETROSPECTIV AL CONSUMULUI DE HEPARINĂ ȘI DERIVAȚII ACESTEI
ÎN CAZUL FEMEILOR ÎN CĂRĂ.....**Error!**

Bookmark not defined.

4.1. Introducere.....**Error!**

Bookmark not defined.

4.2. Materiale și metode.....**Error!**

Bookmark not defined.

4.3. Rezultate și discuții.....**Error!**

Bookmark not defined.

4.4. Concluzii.....**Error!**

Bookmark not defined.

5. TESTARE IN VITRO A HEPARINELOR PE CELULELE DE CARCINOM COLORECTAL HCT 116.....	Error!
---	--------

Bookmark not defined.

5.1. Introducere.....	Error!
-----------------------	--------

Bookmark not defined.

5.2. Materiale și metode.....	Error!
-------------------------------	--------

Bookmark not defined.

5.3. Rezultate și discuții.....	Error!
---------------------------------	--------

Bookmark not defined.

5.4. Concluzii.....	Error!
---------------------	--------

Bookmark not defined.

6. CARACTERIZAREA IN VITRO A PROFILULUI CITOTOXIC AL LIDOCAINEI PE CELULELE CUTANATE DE MELANOM A-375 SI KERATINOCITELE HACAT.....	Error!
--	--------

Bookmark not defined.

6.1. Introducere.....	Error!
-----------------------	--------

Bookmark not defined.

6.2. Materiale și metode.....	Error!
-------------------------------	--------

Bookmark not defined.

6.3. Rezultate și discuții.....	Error!
---------------------------------	--------

Bookmark not defined.

6.4. Concluzii.....	Error!
---------------------	--------

Bookmark not defined.

CONCLUZII.....

.....Error! **Bookmark not defined.**

BIBLIOGRAFIE.....**Error!**

Bookmark not defined.

ARTICOLE PUBLICATE *IN* *EXTENSO*

.....**Error! Bookmark not defined.**

Introducere

Sarcina este o perioadă specială în viața femeii, care implică modificări fiziologice, psihologice și uneori patologice continue. Aceste modificări duc adesea la apariția durerii, durerile musculo-scheletice fiind cele mai frecvente. Pentru a calma durerile femeilor însărcinate, în funcție de stadiul sarcinii, pot fi utilizate medicamente precum anestezice, analgezice și antiinflamatoare. Cu toate acestea, este esențial să se evalueze cu atenție raportul risc-beneficiu. Prin urmare, se recomandă ca femeile însărcinate să utilizeze medicamente sigure pentru a trata durerile musculo-scheletice și să ia în considerare fizioterapia ca alternativă, dacă este posibil.

În plus, în timpul sarcinii, în corpul unei femei apar mai multe modificări care afectează sistemul de coagulare. În timp ce sarcina implică o stare de tendință crescută de coagulare a sângelui pentru a preveni sângerarea excesivă în timpul nașterii, poate, de asemenea, predispune unele femei la anumite tipuri de coagulopatii. Heparinele (HEP) sunt considerate medicamente de elecție în acest caz, care sunt capabile să interfereze cu procesele naturale de coagulare a sângelui.

Cancerul în timpul sarcinii este un alt subiect de interes, deși nu are o frecvență atât de mare, efectele acestor afecțiuni pot fi mult mai agresive, atât pentru mamă, cât și pentru făt. Medicația joacă un rol crucial în acest caz, dar în timpul sarcinii, utilizarea medicamentelor, în special chimioterapia și alte tratamente sistemice, necesită o atenție crescută din cauza riscurilor potențiale pentru fătul în curs de dezvoltare. Astfel, scopul este de a echilibra nevoile de sănătate ale mamei cu bunăstarea bebelușului în curs de dezvoltare, asigurând cel mai sigur rezultat posibil pentru ambii. Deciziile de tratament implică o abordare multidisciplinară, inclusiv oncologi, obstetricieni și alți specialiști. Sunt luați în considerare factori precum tipul de cancer, stadiul, vârsta gestațională și sănătatea mamei. Tratamentul poate include intervenții chirurgicale, chimioterapie, radioterapie (evitate în anumite trimestre) sau o combinație, cu ajustări făcute pentru a minimiza daunele aduse fătului. Principala preocupare în timpul tratamentului cancerului

În timpul sarcinii este impactul potențial asupra dezvoltării fetale. Chimioterapia, de exemplu, poate afecta celulele fetale care se divid rapid și poate duce la probleme de dezvoltare sau complicații ale sarcinii.

Reieșind din cele de mai sus, scopul prezentei teze este de a analiza starea de siguranță a utilizării și de a investiga profilul toxicologic al diferitelor medicamente larg acceptate în rândul femeilor însărcinate, din punct de vedere terapeutic în nișa bolilor canceroase. Pentru atingerea acestui obiectiv s-au urmărit următoarele obiective:

- analiza profilului de siguranță al heparinei în timpul/după consum în cazul gravidelor internate la Spitalul Clinic de Urgență „Pius Brînzeu” din Timișoara, Clinica de Obstetrică Ginecologie I, în perioada 01.01.2022 – 31.12.2022

- testarea heparinelor din punctul de vedere al capacității lor de a interfera cu activitatea liniei celulare de carcinom colorectal HCT 116;

- testarea lidocainei pe linia celulară de keratinocite umane imortalizate HaCaT și pe linia celulară de melanom A-375 pentru a identifica posibilele modificări induse asupra morfologiei celulare, morfologiei nucleare sau viabilității celulare.

Pentru a îndeplini aceste cerințe, teza a fost împărțită în 2 părți, fiecare dintre ele în 3 capitole. Partea generală în prima fază a abordat modificările fiziologice și patologice din timpul sarcinii, apoi s-a concentrat pe tema bolilor tumorale în cazul gravidelor și ulterior pe posibilitățile terapeutice de care dispune această nișă de subiecți.

În partea specială au fost analizate în primul rând rata consumului și profilul de siguranță al heparinei în cazul gravidelor internate în anul 2022 la Spitalul Clinic de Urgență „Pius Brînzeu” din Timișoara, Clinica de Obstetrică Ginecologie I. Capitolul al cincilea a fost axat pe testarea heparinelor pe linia celulară de carcinom colorectal uman, HCT-116. Ultimul capitol se adresează capacității lidocainei, unul dintre anestezicele considerate sigure pentru a fi utilizate în timpul sarcinii, asupra cancerului de melanom (linia celulară A-375).

Rezultate

Primul studiu a urmărit să identifice cauzele și efectul administrării HEP și a derivaților săi în cazul femeilor însărcinate. Au fost analizate 92 de fișe de externare. 51,1% dintre subiecți (n=47) aveau vârsta cuprinsă între 21 și 30 de ani, 34,78% (n=32) aveau vârsta cuprinsă între 31 și 40 de ani, 10,86% (n=10) sub 20 de ani și 9,38 (n=3) peste 41 de ani (Figura 1). Distribuția urban/rural a fost aproximativ egală (Figura 2), cu un procent nesemnificativ crescut în cazul pacienților din mediul rural.

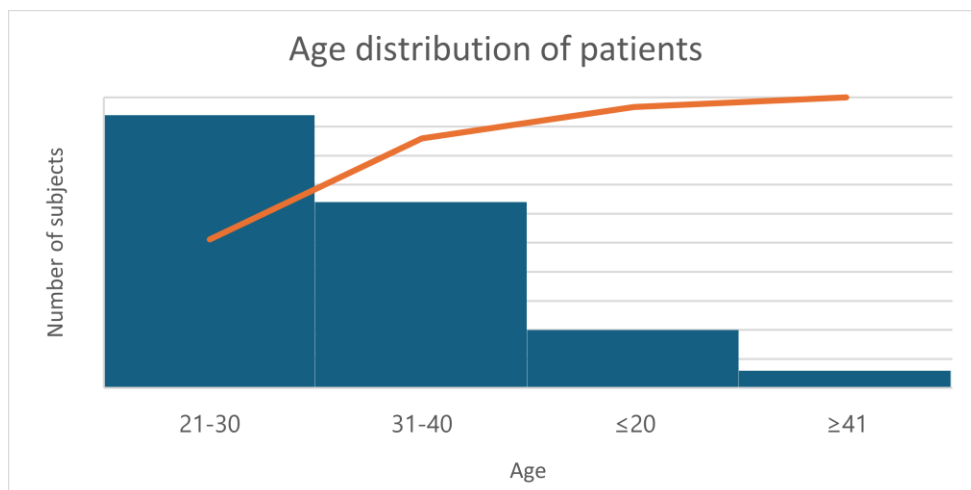


Figura 1. Distribuția pe vârstă a subiecților.

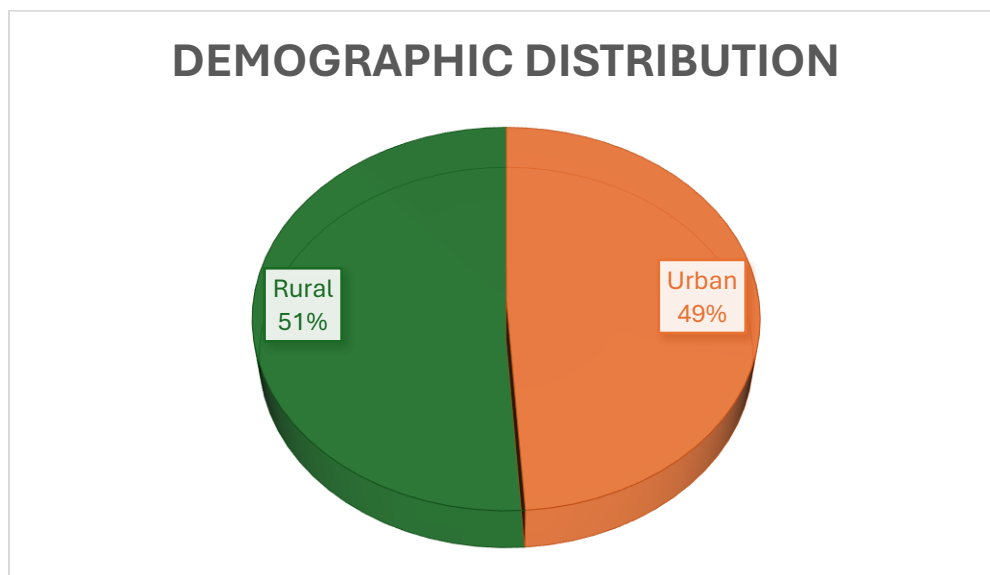


Figura 2. Distribuția subiecților pe mediu rural/urban.

Date clinice

Toți subiecții analizați reprezintă femei gravide, 15 cu o sarcină mai mică de 36 de săptămâni (16,30%), 2 sarcini extrauterine și 2 avorturi spontane, iar restul pacientelor cu sarcini între 37 și 41 de săptămâni. 44,57% au primit tratament anticoagulant cu heparină cu greutate moleculară mică (LMWHep) (Tabelul 1). Motivele abordării acestei terapii sunt precizate în Tabelul 2, cea mai frecventă fiind îngrijirea acordată mamei pentru cicatricea uterină din cauza unei intervenții chirurgicale anterioare (41,5%). 34. 78% (n=32) au născut natural și 46,74% prin cezariană. Au fost înregistrate 8 cazuri de deces de nou-născuți fără relație cauzală între

administrarea LMWHep și datele înregistrate. Cu toate acestea, majoritatea nou-născuților au prezentat un indice Apgar foarte bun (70,65%).

Tabelul 1. Caracteristicile subiecților în funcție de fișa de externare

	Diagnostic		Tratament LMWHep	Tipul de naștere		Apgar index		Avortați/morți
	Sarcini < 36 săptămâni	Sarcini > 36 săptămâni		N	C	0-7	8-10	
Pacienți (n)	15	73	41	32	43	17	65.00	8
Pacienți (% din total)	16.30	79.35	44.57	34.78	46.74	18.48	70.65	16.30

N-naștere naturală, C-naștere prin cezariană

Tabelul 2. Rezultate de diagnostic și de laborator conform biletului de externare

		PACIENȚI (N)	PACIENȚI (% OF TOTAL)
DIAGNOSTIC DE EXTERNARE	Îngrijirea acordată mamei pentru cicatricea uterină din cauza unei intervenții chirurgicale anterioare	17	41.46
	Inducerea medicală a insuficienței travaliului	6	14.63
	Naștere prin intervenție cezariană	2	4.88
	Alte diagnostice*	15	36.59
VALORILE HEMOGLOBINEI	Sub 12 g/dL	3	7.32
	Peste 16 g/dL	32	78.05
	Sub 35 %	13	31.71

VALORILE HEMATOCRITULUI	Peste 46%	0	0.00
VALORILE COAGULĂRII/ FIBRINOGENULUI	Sub 200 mg/dL	0	0.00
	Peste 400 mg/dL	41	100.00

Alte diagnostice includ: sarcina tubară (n=1), îngrijirea acordată mamei pentru creșterea insuficientă a fătului (n=1), detașarea prematură a placentei (n=1), hemoragie severă sau întârziată după avort ectopic și sarcina molară (n=1), ruptura prematură a membranelor, cu debutul travaliului în 24 h (n=1), îngrijire acordată mamei pentru o disproporție datorată unui fat anormal de mare (n=1), îngrijire acordată mamei pentru o prezentare pelviană (n=1), îngrijire maternă pentru leziuni fetale rezultate dintr-o boală virală (n=1), travaliu și naștere complicate de suferință fetală nespecificată (n=1), îngrijire acordată mamei pentru moartea intrauterină a fătului (n=1), hipertensiune arterială gestațională fără proteinurie specifică (n=1), lauzie fiziologică (n=1), telangiectazie hemoragică ereditară (n=1), îngrijire maternă pentru semne de hipoxie fetală (n=1), și reținerea parțială a placentei și a membranelor, fără hemoragie (n=1).*

Următorul studiu a evaluat capacitatea HEP și fraxiparinei, ca reprezentative pentru LMWHep (FRAX) de a interfera cu viabilitatea celulară a celulelor de carcinom colorectal uman (linia celulară HCT 116). Astfel, celulele au fost tratate cu 4 concentrații din fiecare substanță (10, 25, 50 și 100 UI), timp de 72 de ore, apoi testul MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-bromură difeniltetrazolium) a fost aplicat. Rezultatele obținute arată un efect ușor stimulat până la concentrația de 50 UI (până la 120%) în cazul HEP, și un efect inhibitor ușor la 100 UI (90%). În ceea ce privește FRAX, s-au obținut rezultate similare, totuși cu o tendință de liniaritate mai observabilă. Astfel, la toate concentrațiile testate, viabilitatea a fost aproximativ ca cea observată în cazul celulelor martor netratate (aproximativ 100%) (Figura 3).

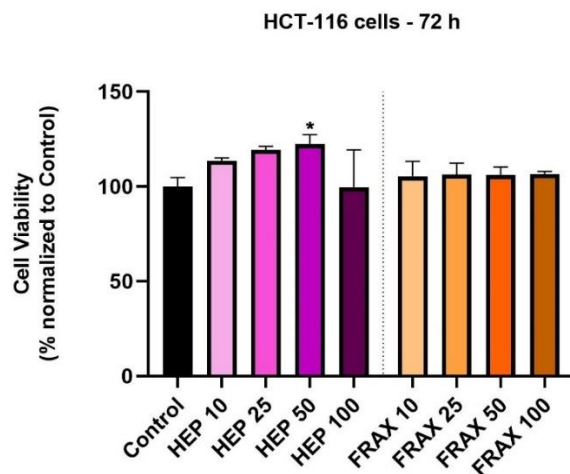
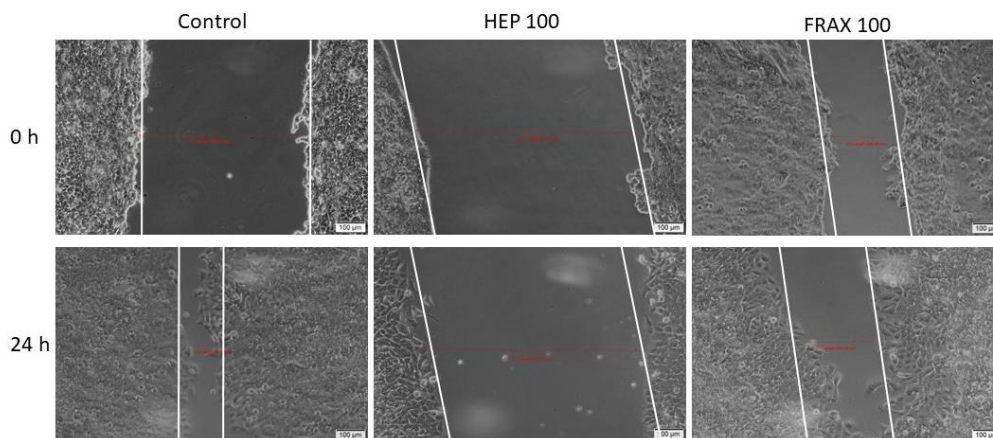


Figura 3. Evaluarea celulelor HCT 116 in vitro după 72 de ore de incubare cu HEP și FRAX (10, 25, 50 și 100 UI) prin efectuarea testului MTT. Datele sunt prezentate ca % de viabilitate normalizat la celulele netratate (exprimate ca valori medii \pm SD a trei experimente independente). Analiza ANOVA unidirecțională și post-testul Dunett pentru comparații multiple au fost efectuate pentru a identifica diferențele statistice dintre datele obținute (* $p < 0,1$).

Pentru a evalua impactul HEP și FRAX asupra proprietăților migratoare ale celulelor de carcinom colorectal, a fost aplicat un test de vindecare a rănilor. Celulele HCT 116 au fost tratate cu cea mai mare concentrație (100 UI) din fiecare substanță (Figura 4). Rezultatele au fost dependente de HEP testat, cel mai puternic efect fiind observat în cazul HEP 100, cu rate de vindecare a rănilor de 2,6%, semnificativ mai puternice decât în cazul controlului, unde rata de vindecare a rănilor a fost de 85,9%. În ceea ce privește LMWHep, acestea au manifestat și o bună proprietate inhibitorie a migrației celulare, cu o rată de vindecare a rănilor de 14,52%.

A)



B)

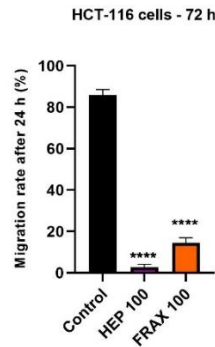


Figure 4. A) Imagini care ilustrează capacitatea de migrare a celulelor HCT 116 după tratamentul cu HEP 100UI și FRAX 100UI timp de 24 de ore. Barele de scară reprezintă 50 μ m. B) Reprezentare grafică a potențialului migrator al celulelor HCT 116 după tratamentul cu HEP 100UI și FRAX 100UI. Graficele cu bare sunt expuse ca % din închiderea plăgii după 24 de ore în comparație cu distanța inițială la t0. Rezultatele sunt exprimate ca medii \pm SD a 3 experimente independente. Analiza ANOVA unidirecțională și post-testul Dunett pentru comparații multiple au fost aplicate pentru a urmări diferențele statistice dintre rezultatele obținute (** $p < 0,0001$).**

Ultimul pas al studiului in vitro a fost analiza morfologiei nucleare, pentru a identifica dacă moartea celulară a avut loc prin necroză sau apoptoză. Pentru acest experiment, au fost testate două concentrații: 10 și 100 UI din fiecare tip de HEP. Reactivul Hoechst a fost utilizat pentru a contracolora nucleeele celulare, iar celulele tratate au fost comparate cu celulele nestimulate (de control). În cazul celei mai scăzute concentrații nu s-au observat modificări semnificative, nucleeele prezintă o formă rotundă și regulată, fără semne de fragmentare. În schimb, în cazul celei mai mari concentrații, s-au observat semne de apoptoză. HEP 100 a indus suflarea membranei, condensarea nucleară și fragmentarea (evidențiate cu săgețile galbene din Figura 5). FRAX 100 a indus, de asemenea, condensarea cromatinei și fragmentarea nucleelor (Figura 5).

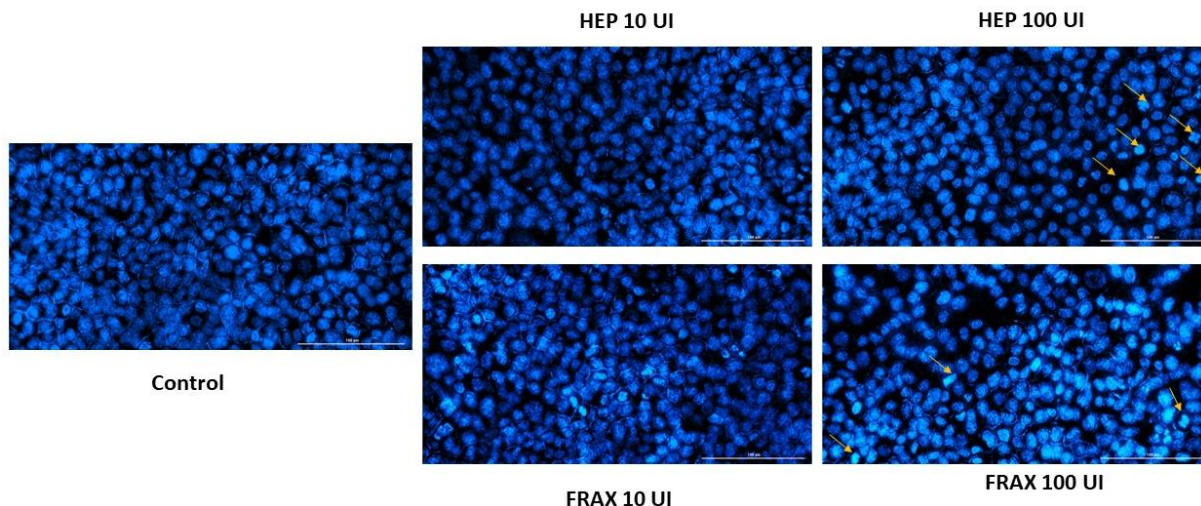


Figura 5. Imagini ale nucleelor celulare HCT 116 contracolorate cu reactiv Hoechst 33342 după 72 de ore de tratament cu HEP și FRAX 10 și 100UI. Săgețile galbene atribuie nuclee cu semne apoptotice. Barele de scară reprezintă 100 μ m.

Ultimul studiu a urmărit profilul citotoxic al lidocainei (LID) pe celulele melanomului cutanat A-375. Deoarece LID este de obicei folosit ca anestezic local, pentru a testa substanța pe celulele melanomului, a fost testat preliminar pe keratinocite umane imortalizate. În urma metodei MTT, s-a observat că la toate concentrațiile (0,025%, 0,05%, 0,125% și 0,2%), cu excepția celei mai mari (0,25%), viabilitatea s-a menținut peste 90% (Figura 6). La 0,25%, procentul de celule viabile a fost redus semnificativ la 13,5%, evidențiind potențialul citotoxic al LID la această concentrație.

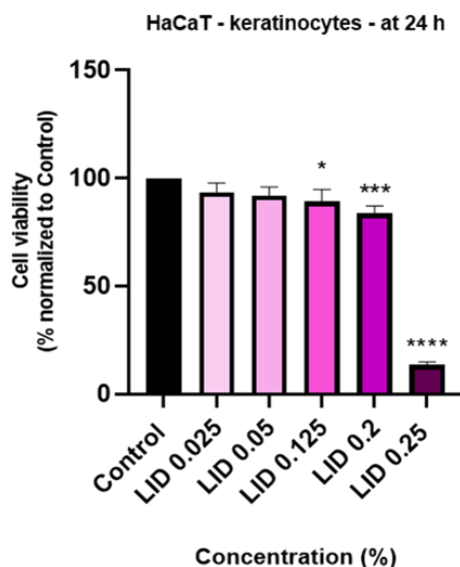


Figura 6. Evaluarea in vitro a efectului pe care LID (0,025, 0,05, 0,125, 0,2 și 0,25 %) îl exercită asupra viabilității celulelor HaCaT după 24 de ore de tratament prin aplicarea testului MTT. Datele sunt prezentate ca procente de viabilitate (%)

normalizate la control (celule netratate) și exprimat ca medie \pm SD a trei experimente independente efectuate în trei exemplare. Diferențele statistice dintre grupurile de control și cele tratate cu LID au fost identificate prin aplicarea analizei ANOVA unidirecțională urmată de comparațiile multiple ale Dunett post-test (* $p < 0,1$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

La analizarea viabilității celulelor melanomului A-375 în urma tratamentului de 24 de ore (Figura 7), s-a observat că la 0,025%, 0,05% și 0,125% LID nu a exercitat efect citotoxic, viabilitatea menținându-se peste 95%. S-a obținut însă o scădere semnificativă a viabilității la concentrații mai mari (0,2% și 0,25%), când procentul de celule viabile a fost redus la 24,33% și, respectiv, 20,90%.

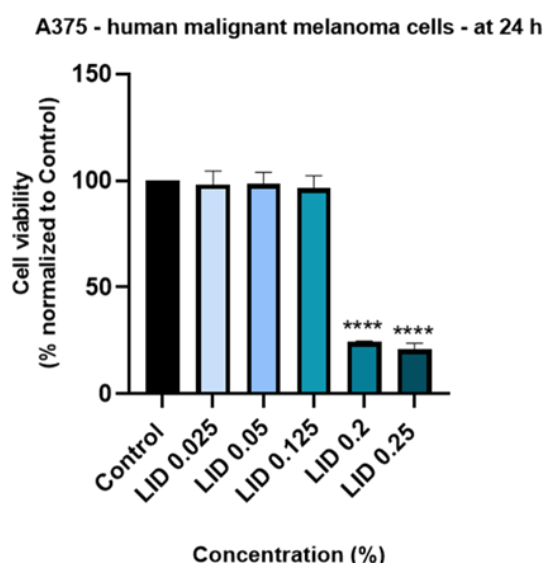


Figura 7. Evaluarea in vitro a efectului pe care LID (0,025, 0,05, 0,125, 0,2 și 0,25 %) îl exercită asupra viabilității celulelor A-375 după 24 de ore de tratament prin aplicarea testului MTT. Datele sunt prezentate ca procente de viabilitate (%) normalizate la martor (celule netratate) și exprimat ca medie \pm SD a trei experimente independente efectuate în trei exemplare. Diferențele statistice dintre grupurile de control și cele tratate cu LID au fost identificate prin aplicarea analizei ANOVA unidirecțională urmată de comparațiile multiple ale Dunett după testul (**** $p < 0,0001$).

Ultimul pas în studiul de față a fost evaluarea mecanismelor potențiale de moarte celulară care stau la baza efectului citotoxic al LID prin examinarea morfologiei nucleelor celulelor HaCaT și A375 care au fost colorate folosind colorantul Hoechst 33342. După cum se observă în Figura 8, tratamentul de 24 de ore al celulelor HaCaT cu LID la concentrații de până la 0,2% nu a indus nicio modificare a aspectului nuclear, forma acestora rămânând similară martorului - regulată și rotundă, fără semne de fragmentare sau condensare.

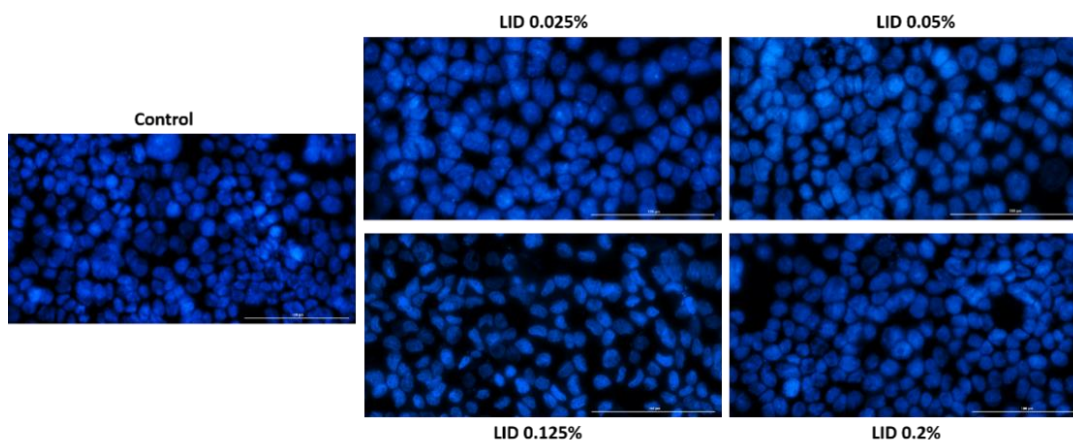


Figura 8. Imagini ale nucleelor celulare colorate folosind reactiv Hoechst 33342 în celule HaCaT după tratamentul de 24 de ore cu LID 0,025, 0,05, 0,125 și 0,2%. Barele de scară reprezintă 100 μ m.

Cu toate acestea, în urma tratamentului de 24 de ore cu LID pe celulele melanomului (A-375), s-au observat câteva modificări ale aspectului nucleilor celulari doar la cea mai mare concentrație evaluată - 0,2% (Figura 9). LID a indus fragmentarea nucleară, condensarea cromatinei și blebbing membrana, modificări indicate de săgețile albe.

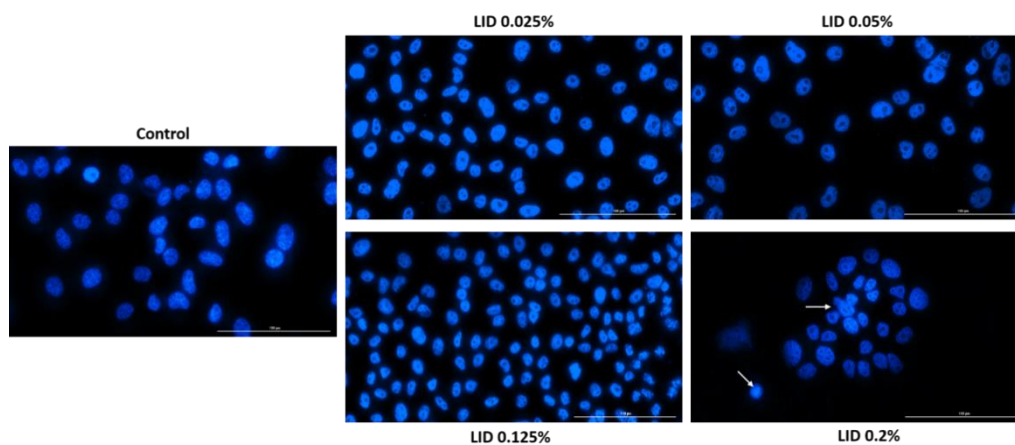


Figura 9. Imagini ale nucleelor celulare colorate folosind reactiv Hoechst 33342 în celule A-375 după tratamentul de 24 de ore cu LID 0,025, 0,05, 0,125 și 0,2%. Săgețile indică nucleele care exprimă caracteristici apoptotice. Barele de scară reprezintă 100 μ m.

Concluzii

În primul studiu, HEP și LMWHep au fost analizate din punct de vedere al siguranței în cazul administrării la gravide. Aceste medicamente sunt frecvent utilizate pentru această categorie de pacienți, din cauza scăderii fiziologice a sistemului hemostatic într-o stare de hipercoagulare, prezentând un potențial ridicat de a dezvolta probleme de coagulare, care trebuie gestionate. În studiul retrospectiv au fost investigate 92 de bilete de externare ale gravidelor internate la spitalul „Pius Brînzeu” din Timișoara. Rezultatele analizei au evidențiat faptul că aproape jumătate dintre paciente au fost tratate cu medicamente anticoagulante, iar cea mai frecventă cauză de administrare a fost îngrijirea acordată mamei pentru cicatricea uterină din cauza unei intervenții chirurgicale anterioare, fără efecte secundare, și cu un indice Apgar bun observat la nou-născuți.

În al doilea studiu, heparina și derivații săi au fost testați pe linia celulară HCT-116. S-a ales o linie celulară de carcinom colorectal datorită faptului că această formă de malignitate prezintă interes mai ales în cazul femeilor însărcinate datorită simptomelor care pot fi ușor confundate cu simptomele fiziologice întâlnite în timpul sarcinii, a complexității diagnosticului și identificării soluțiilor de tratament atât pentru mamă, cât și pentru făt. Astfel, s-a observat că HEP și LMWHep au manifestat un efect anti-migrator semnificativ și un bun potențial pro-apoptotic, sugerând posibila utilizare potențială în cazul cancerului colorectal, mai ales în segmentul de gravide, pentru care medicația actuală este limitată.

Scopul ultimului studiu in vitro a fost acela de a caracteriza profilul citotoxic al lidocainei asupra pielii sănătoase și celulelor canceroase, ca bază pentru investigații ulterioare privind potențiala eficiență a acestuia pentru managementul melanomului cutanat în cazul pacienților cu restricții stricte la tratamentul clasic, cum ar fi cazul femeii însărcinate. Constatările primare ale studiului demonstrează siguranța anestezicului asupra keratinocitelor pielii (HaCaT) la concentrații de până la 0,2% atunci când este aplicat timp de 24 de ore. Valorile viabilității celulare au fost în mod constant peste 90% și nu au existat modificări morfologice observabile sau caracteristici nucleare asemănătoare apoptozei. Cu toate acestea, la concentrația de 0,2%, LID

a prezentat o citotoxicitate crescută împotriva celulelor A-375. Acest lucru a fost evident printr-o reducere semnificativă a viabilității celulare, modificări ale formei și confluenței celulelor și prezența caracteristicilor nucleare specifice apoptozei. Aceste constatări oferă o bază pentru cercetări ulterioare pentru a investiga mecanismul specific de acțiune responsabil pentru efectul anti-melanom al LID. În plus, deschide posibilități de reutilizare a LID în practica clinică pentru terapia cancerului de piele.

În concluzie, rezultatele obținute evidențiază faptul că medicamentele considerate sigure în timpul sarcinii și utilizate pentru diferite afecțiuni actuale, pot prezenta efecte importante asupra altor probleme de sănătate, mai puțin frecvente, dar cu impact impunător, precum bolile canceroase, pentru care schemele de tratament în cazul femeilor însărcinate nu sunt destul de strălucitoare. Sunt necesare investigații suplimentare pentru a consolida constatările și pentru a identifica mecanismele exacte de acțiune.