
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Implicații clinice și morfologice ale intervențiilor perianestezice asupra prognosticului și evoluției pacienților neoplazici

Doctorand **Elena Drăghiciu**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Carmen Mihaela Mihu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	17
STADIUL ACTUAL AL CUNOASTERII	
1. Anestezia generală și cancerul	22
1.1. Anestezia generală inhalatorie	22
1.1.1 Substanțe utilizate în cadrul anesteziei generale	23
1.2. Anestezia totală intravenoasă	24
1.2.1. Substanțe utilizate în cadrul anesteziei totale intravenoase	25
1.3. Perioada perioperatorie	26
1.3.1. Durerea postoperatorie	26
1.3.2. Efectele durerii postoperatorii	27
1.3.3. Evaluarea durerii postoperatorii	28
1.3.4. Modalități de tratament ale durerii postoperatorii	29
1.4. Anestezicele locale. Rolul tehnicilor regionale și al lidocainei iv în perioada perioperatorie	29
2. Cancerul mamar	32
2.1. Mecanism dezvoltare/ etiopatogeneză	32
2.1.1 Factori genetici	32
2.1.2. Factori externi / de mediu	33
2.2. Clasificare	33
2.3. Mecanism metastazare	33
2.4. Principii de tratament	34
3. Efectele anesteziei asupra progresiei tumorale	36
3.1. Efectele agenților anestezici volatili	36
3.1.1. Isofluranul	36
3.1.2. Sevofluranul	36
3.2. Efectele opioidelor	37
3.3. Efectele propofolului	37
3.4. Efectele anestezicelor locale	38
3.5. Rolul analgeziei postoperatorii în progresia tumorală	38
4. Markerii angiogenezei	40
4.1. Factorul de creștere vascular endotelial – VEGF (vascular endothelial growth factor)	40
4.2. Receptorii pentru VEGF-A: VEGF-R1 și VEGF-R2	42

4.3. MMP (Metaloproteinazele): MMP-3. MMP-9	42
4.4. Netoza	43
4.4.1. MPO (Mieloperoxidaza)	44
4.4.2. H3Cit (histona H3 citrulinată)	44

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1. Ipoteza de lucru/obiective	49
2. Metodologie generală	52
3. Studiul 1 – Evaluarea capcanelor extracelulare ale neutrofilelor și a biomarkerilor angiogenezei după anestezia inhalatorie sau totală intravenoasă asociate sau nu cu infuzia continuă de lidocaină în chirurgia cancerului de sân: un trial randomizat prospectiv.	54
3.1. Introducere	54
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	55
3.3. Material și metodă	55
3.3.1. Randomizarea pacienților	56
3.3.2. Protocol clinic	56
3.3.3. Analiza markerilor NETozei și a VEGF-A	57
3.3.4. Analiza statistică a datelor	60
3.4. Rezultate	60
3.5. Discuții	72
3.6. Concluzii	75
4. Studiul 2 – Infuzia continuă de lidocaină pentru durerea postoperatorie în chirurgia neoplasmului mamar. Efecte asupra durerii acute și cronice.	78
4.1. Introducere	78
4.2. Ipoteza de lucru/ obiective	78
4.3. Metodă	79
4.3.1. Analiza statistică a datelor	86
4.3. Rezultate	86
4.4. Discuții	90
4.5. Concluzii	92
5. Studiul 3 – Rolul prognostic al receptorului VEGF-R1 în neoplasmul mamar. Este acesta o țintă posibilă pentru terapia antiangiogenică? Un trial clinic randomizat.	94
5.1. Introducere	94
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	94
5.3. Material și metodă	95
5.3.1. Analiza statistică a datelor	102
5.4. Rezultate	102
5.5. Discuții	106

5.6. Concluzii	108
6. Discuții generale	110
7. Concluzii generale	114
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	116
REFERINȚE	119

Cuvinte cheie: neoplazie, biomarkeri, anestezie totala intravenoasă (TIVA), NEToză, angiogeneză, lidocaină, durere postoperatorie, VEGF-R1

INTRODUCERE

Neoplaziile reprezintă una dintre principalele probleme de sănătate existente la nivel mondial. În încercarea de ameliorare a prognosticului pacienților neoplazici, cercetările din ultimii ani s-au îndreptat și înspre evaluarea rolului tehnicilor anestezice în favorizarea sau inhibarea procesului de metastazare. Evoluția postoperatorie neașteptată în anumite cazuri (dezvoltarea de metastaze multiple într-un timp foarte scurt sau dimpotrivă, dispariția/reducerea postoperatorie a determinărilor secundare preexistente) a determinat interesul științific pentru perioada perioperatorie.

În cadrul tezei de doctorat, s-a urmărit impactul pe care tipurile de anestezie generală (inhalatorie și anestezia totală intravenoasă -TIVA) o au asupra factorilor serici ce favorizează dezvoltarea metastazelor, efectul asocierii infuziei continue de lidocaină asupra acestor factori și asupra dezvoltării durerii cronice la pacienții înrolați în studiu. O altă direcție de studiu o reprezintă urmărirea existenței asocierilor dintre nivelul seric al factorilor proangiogenici și receptorii tisulari identificați prin metode imunohistochimice, al căror rol în cadrul angiogenezii nu este complet definit.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Întrucât tratamentul neoplaziilor include frecvent intervenția chirurgicală care necesită anestezie generală, cercetările în domeniul anesteziei și a perioadei perioperatorii se axează pe existența posibilității ca substanțele utilizate intraanestezic să influențeze recurența bolii, având în vedere faptul că mortalitatea pacienților neoplazici este datorată recidivei acesteia¹.

Neoplasmul mamar reprezintă a doua cauză de mortalitate prin cancer în rândul populației feminine², aflându-se printre neoplaziile cu cea mai mare incidență la nivel global¹. Există două teorii în ceea ce privește apariția cancerului de sân: teoria celulelor stem canceroase (CSC - cancer stem cells) și teoria stocastică³. Mutațiile succesive pot altera aceste celule, iar în combinație cu diverși factori de mediu, se creează premise pentru dezvoltarea procesului canceros. Mutațiile care prezintă cel mai înalt risc pentru dezvoltarea neoplasmului mamar sunt la nivelul genelor BRCA1 și BRCA2, P53 și PTEN⁴. Alți factori asociați cu un risc crescut de dezvoltare a cancerului mamar sunt: vârsta peste 40 ani⁵, menarha < 13 ani, menopauza tardivă, nuliparitatea și absența alăptării, nivelul crescut de testosteron circulant, expunerea la terapia de substituție hormonală sau contraceptive orale⁶, consumul excesiv de alcool (5-9.9 g alcool / zi), obezitatea și sedentarismul (factori responsabili de 21% din

cazurile diagnosticate)7 precum și iradierea datorată diferitelor cauze (inclusiv terapii medicale).

Forma metastatică reprezintă stadiul tardiv al bolii, metastazarea8,9 presupunând invazia locală a țesutului peritumoral, degradarea matricei extracelulare (ECM – matricea extracelulară) sub influența metaloproteinazelor (MMP) și a uPA (urokinase plasminogen activator) în acest proces eliberându-se și factori proangiogenici, angiogeneza asigurând dezvoltarea metastazelor. Dintre aceștia este cunoscut rolul VEGF (vascular endothelial growth factor – factorul de creștere vascular endotelial) cu subunitățile acestuia (A,B,C,D,E) ce stimulează proliferarea, invazia, migrarea celulelor endoteliale și creșterea permeabilității microvascularizației.

Tipurile de anestezie generală utilizate pe parcursul intervențiilor chirurgicale pentru excizia tumorală implică anestezia inhalatorie (cel mai frecvent utilizat fiind Sevofluranul) și anestezia totală intravenoasă – TIVA (ce utilizează administrarea continuă de propofol pentru menținerea hipnozei) în combinație cu utilizarea opioizilor și a blocanților neuromusculare.

În cazul Sevofluranului unele studii susțin efectul citotoxic și antiproliferativ al acestuia10 pe când altele afirmă efectele de amplificare al expresiei factorului HIF-1 α , efect asociat unui prognostic negativ. Alte efecte ale sevofluranului includ creșterea nivelului VEGF-A11, MMP-3 și MMP-912, influențarea răspunsului imun cu alterarea activității celulelor NK13.

Utilizarea propofolului indică un potențial beneficiu reducând nivelul factorilor proangiogenici14,15, având o activitate de inhibare a migrării și adeziunii celulare precum și inducerea apoptozei16 și reducerea sintezei HIF-1 α 17.

În privința opioidelor datele studiilor existente indică un efect proangiogenic și protumoral prin stimularea directă a proliferării tumorale prin activarea COX-2 (ciclooxigenaza-2), inhibarea funcției celulelor NK și interacțiunea cu sistemul VEGF2,18,19. Însă pentru fentanyl (principalul opioid utilizat intraanestezic) datele sunt încă neclare existând studii care susțin activitatea antitumorală20,21,22,23, dar și altele ce indică efectul proangiogenic și în consecință protumoral al fentanylului24,25,26.

Anestezicele locale pot fi utilizate în scopul de a optimiza controlul durerii. Acestea au un potențial de activare al apoptozei la nivelul celulelor canceroase, demetilarea AND-ului celulelor canceroase (efectul acestei demetilări fiind inhibiția creșterii tumorale), inhibare a factorilor serici cu rol în dezvoltarea tumorală și reducere a imunosupresiei consecutive intervențiilor chirurgicale27. Dintre acestea, lidocaina poate fi utilizată și în infuzie continuă în perioada perioperatorie, aceasta având un efect de inhibare asupra viabilității, migrării și invaziei în cazul liniilor celulare de carcinom gastric28, mamar29 și hepatocelular30 și îmbunătățind supraviețuirea pacienților cu neoplazii pancreatice31.

Pentru controlul durerii postoperatorii, opioidele sunt frecvent utilizate, un control suboptimal al durerii putând diminua activitatea celulelor NK32 (natural killer), însă și utilizarea predominantă a opioidelor poate avea un efect favorizant asupra progresiei tumorale. Pentru un control eficient al durerii se recomandă tehnici de analgezie multimodală ce au scopul de a, limitând efectele adverse ale opioidelor. Utilizarea tramadolului poate fi de asemenea benefică, acesta având un efect de stimulare al activității celulelor NK pe modele animale și umane33.

Mortalitatea pacienților oncologici este datorată avansării bolii în stadiul metastatic – proces dependent de cascada metastatică și angiogeneză34. Factorii ce contribuie la aceasta includ: VEGF, VEGF-R (receptorii pentru VEGF), MMP (3 și 9), MPO (mieloperoxidaza), H3Cit (histona 3 citrulinată).

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Ipoteză de lucru/obiective

Perioada perioperatorie reprezintă un moment în care progresia tumorală, metastazarea și prognosticul pacienților neoplazici poate fi influențat prin intervenții farmacaologice cu efect asupra celulelor canceroase dispersate în circulație prin manipularea masei tumorale și asupra supresiei imunității mediate celular și concentrației crescute de citokine/molecule cu rol proangiogenic (VEGF, MMP, MPO, H3Cit). Deoarece substanțele utilizate în cadrul anesteziei generale pot modifica concentrațiile de citokine ce influențează procesul de metastazare, au fost comparate două tehnici anestezice (cea inhalatorie cu TIVA), pentru a studia efectul propofolului asupra factorilor proangiogenici. Pentru a studia efectul anestezicelor locale asupra aceluși factori și asupra durerii postoperatorii s-a asociat tehnicilor anestezice o infuzie continuă de lidocaină timp de 24h. Cel de-al treilea studiu a avut ca scop investigarea rolului VEGF-R1 ca și potențial marker histologic în prognosticul pacientelor cu cancer mamar precum și posibilă țintă a terapiei anti-angiogenice.

Metodologie generală

În cadrul studiului au fost înrolați 120 pacienți diagnosticați cu tumoră mamară programați pentru excizia chirurgicală a tumorii. Aceștia au fost împărțiți în 4 loturi egale, care au beneficiat de: anestezie generală pe pivot volatil (60 pacienți) sau TIVA (60 pacienți), asociată sau nu cu o infuzie continuă de lidocaină 1% (câte 30 pacienți din fiecare categorie). Fiecărui pacient i s-a recoltat înainte de începerea intervenției chirurgicale și la 24h postintervențional câte o probă de sânge care a fost centrifugat iar serul rezultat a fost stocat pentru determinarea ulterioară a factorilor serici proangiogenici. Participanților la studiu le-au fost urmărite scorul de durere la 4h și cantitatea totală de analgezice utilizată în primele 24h, iar ulterior a fost aplicat telefonic chestionarul McGill pentru evaluarea apariției durerii cronice. Pentru investigarea receptorilor VEGF-R1 am colaborat cu serviciul de anatomie patologică din cadrul Institutului Oncologic „Prof. Dr. I Chiricuță”, care a determinat densitatea acestor receptori pe piesele tumorale excizate intraoperator.

Studiul 1. Evaluarea capcanelor extracelulare ale neutrofilelor și a biomarkerilor angiogenezei după anestezia inhalatorie sau totală intravenoasă asociate sau nu cu infuzia continuă de lidocaină în chirurgia cancerului de sân: un trial randomizat prospectiv.

Deoarece substanțele utilizate în cadrul anesteziei au efect asupra proceselor de angiogeneză, există posibilitatea ca anestezia generală să influențeze procesul de metastazare și prognosticul pacienților neoplazici, TIVA putând fi benefică pentru această categorie de pacienți.

Ipoteza de lucru

Prin utilizarea unei tehnici anestezice care să includă administrarea de propofol și lidocaină în infuzie continuă pot fi influențați markerii procesului de NEToză (posibil indicatori ai prognosticului pacienților) precum și angiogeneza, cu efect asupra biomarkerilor acesteia.

Material și metodă

Pentru evaluarea markerilor serici ai NETozei și ai angiogenezei s-au recoltat probe sanguine înainte de intervenția chirurgicală și la 24h postoperator la 120 participanți la studiu diagnosticați cu neoplazie mamară, aceștia fiind împărțiți în 4 loturi prezentate la metodologia generală. Sângele recoltat a fost centrifugat iar serul rezultat a fost depozitat în vederea determinării markerilor de NEToză (MOP și H3Cit) și a celor specifici angiogenezei (VEGF-A, MMP-3, MMP-9) prin metoda ELISA. Datele obținute au fost analizate cu ajutorul programului GraphPad Prism TM V8 în conformitate cu legislația europeană a regulilor de protecție generală a datelor.

Rezultate

Indiferent de tehnica anestezică adoptată, administrarea de lidocaină în infuzie continuă a reușit să reducă concentrațiile serice postoperatorii ale H3Cit ($P=0.007$), MPO ($P=0.002$), MMP-3 ($P=0.001$). Pentru MMP-9 s-a observat o creștere a concentrațiilor în perioada postoperatorie. Pentru VEGF-A s-a observat o reducere a concentrațiilor pentru pacienții supuși TIVA, iar în cazul asocierii de lidocaină s-a observat atenuarea acestei scăderi însă fără a atinge pragul semnificației statistice.

Concluzii

Rezultatele acestui trial clinic indică faptul că administrarea intravenoasă de lidocaină asociată anesteziei generale cu propofol sau sevofluran reduce expresia markerilor NETozei (H3Cit și MPO) și a MMP-3, aceștia având semnificația unor markeri de risc metastatic și influențează markeri ai angiogenezei precum VEGF-A.

Studiul 2. Infuzia continuă de lidocaină pentru durerea postoperatorie în chirurgia neoplasmului mamar. Efecte asupra durerii acute și cronice.

Gestionarea durerii postoperatorii în cazul pacienților cu mastectomie include tehnici de analgezie regională și multimodală cu scopul de a reduce utilizarea opioidelor și evitării efectelor detrimentale ale acestora.

Ipoteză de lucru

Studiul și-a propus investigarea rolului administrării continue de lidocaină în diminuarea durerii postoperatorii și asupra dezvoltării durerii cronice precum și capacitatea acesteia de a reduce cantitatea de analgezice utilizate în perioada postintervențională.

Material și metodă

În studiu au fost înrolați 120 pacienți, distribuiți în 4 loturi conform metodologiei generale. În perioada postoperatorie s-au urmărit scorurile de durere (prin utilizarea salei VAS) la interval de 4h, cantitatea de analgezice administrată iar la 1 an postintervențional s-a evaluat prin aplicarea chestionarului McGill apariția durerii cronice. Analiza statistică a fost efectuată utilizând programul MedCalc Statistical Software, aplicându-se testul chi-square sau Kruskal-Wallis iar pentru măsurătorile repetate s-a folosit testul two-way ANOVA (după logaritmarele datelor).

Rezultate

Evaluarea durerii utilizând scala VAS la fiecare 4h nu a reușit să identifice diferențe semnificative între grupurile studiului. În privința dozelor de analgezice primite în perioada postoperatorie s-a observat o scădere semnificativă statistic a cantității administrate în cazul pacienților care au beneficiat de administrare continuă de lidocaină ($p=0.003$). În ceea ce privește apariția durerii cronice, nu s-au înregistrat diferențe în apariția acesteia între grupurile de studiu la 1 an postintervențional.

Concluzii

Asocierea infuziei continue de lidocaină poate reduce cantitatea de opioide administrată postintervențional.

Studiul 3. Rolul prognostic al receptorului VEGF-R1 în neoplasmul mamar. Este acesta o țintă posibilă pentru terapia antiangiogenică? Un trial clinic randomizat.

Decesele cauzate de neoplazii survin datorită recidivării bolii, iar oprirea sau blocarea procesului angiogenic cu rol în promovarea proliferării tumorale are o importanță fundamentală. VEGF-A are un rol important în procesul de angiogeneză, exercitându-și efectele prin intermediul receptorilor săi (VEGF-R1 și VEGF-R2). Ipoteza de lucru

Acest studiu vizează analizarea existenței unei corelații între densitatea receptorilor VEGF-R1 prezenți la nivelul țesutului tumoral cu un nivel seric mai crescut de factori proangiogenici (VEGF-A, MMP-3 și MMP-9) și cu un prognostic mai puțin favorabil (evaluat cu ajutorul scorului Nottingham) precum și investigarea prezenței unei corelații între densitatea acestor receptori și rata recidivelor la 1 an postoperator.

Material și metodă

În studiu au fost înrolați 120 pacienți distribuiți în 4 loturi, conform metodologiei generale. Din probele sanguine recoltate preoperator au fost determinate prin metoda ELISA concentrațiile de VEGF-A, MMP-3 și MMP-9. Determinarea densității VEGF-R1 a fost realizată imunohistochimic din țesutul tumoral excizat intraoperator și cu ajutorul programului ImageJ. Analiza statistică a datelor a fost efectuată utilizând programul MedCalc Statistical Software version 19.2.1 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2020) utilizând testul non-parametric Spearman Rho.

Rezultate

Nu a fost identificată o corelație între pozitivitatea pentru receptorii VEGF-R1 și factorii proangiogenici determinați. S-a identificat o diferență în expresia slab-pozitivă a VEGF-R1 între gradele 2 și 3 Nottingham ($p=0.016$), valorile slab pozitive fiind mai redus reprezentate la nivelul gradului Nottingham II. Pentru expresia negativă a VEGF-R1 a țesutului tumoral, a existat o diferență semnificativă statistic la compararea gradelor 3 și 2 Nottingham ($p=0.022$), negativitatea pentru acești receptori fiind cel mai mult exprimată în cadrul gradului Nottingham II. În cazul evaluării existenței unei corelații între expresia receptorilor VEGF-R1 și apariția recidivei la 1 an postoperator), nu s-a identificat o asociere între cele două variabile analizate.

Concluzii

Deși nu am identificat o valoare prognostică a expresiei imunohistochimice a VEGF-R1 în cazul cancerului de sân, există necesitatea elaborării unor studii de amploare mai mare.

ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI

Niciun studiu nu a comparat până acum efectul anesteziei asupra factorilor proangiogenici. Rezultatele obținute în cadrul studiului, confirmă beneficiul adus de TIVA în cazul managementului anestezic al pacienților neoplazici: reducerea VEGF-A alături de beneficiile deja cunoscute ale acesteia- o recuperare mai rapidă, efectul antiinflamator, de reducere al episoadelor de grețuri și vărsături în perioada postanestezică, creșterea satisfacției pacienților în legătură cu actul medical etc.

În momentul publicării cercetării asupra markerilor de NEToză (reprezențați de H3Cit și MPO) nu cunoaștem să fi existat un studiu similar care să aibă această direcție. În cadrul studiului am demonstrat reducerea nivelului acestor factori prin asocierea la regimul de anestezie generală a unei infuzii continue de lidocaină. Astfel, aplicabilitatea cercetării este de imediată utilitate, această intervenție farmacologică fiind accesibilă oricărui serviciu de anestezie, existând posibilitatea ca pacienții neoplazici să aibă un beneficiu crescut prin asocierea ei în perioada perioperatorie.

În ceea ce privește efectul infuziei continue de lidocaină asupra durerii acute, consumului de analgezice în perioada imediat postoperatorie și asupra cronice, consecința asocierii lidocainei s-a tradus prin administrarea unei cantități semnificativ mai reduse de analgezice, dar fără influență asupra dezvoltării durerii cronice.

Referitor la VEGF-R1 nu am reușit stabilirea de corelații între densitatea acestui receptor, markerii serici proangiogenici și riscul de recurență al bolii. Noutatea cercetării în această direcție este dată de investigarea asocierii dintre expresia imunohistochimică a VEGF-R1 la nivelul țesutului tumoral și gradul histologic Nottingham, cunoscut a fi un element predictiv al prognosticului pacienților cu neoplasm mamar, nereușind să identificăm alte studii care să fie direcționate în acest sens.

SUMMARY OF DOCTORAL THESIS

Clinical and morphological implications of perianesthetic interventions on the evolution and prognosis of cancer patients

Doctoral candidate **Elena Drăghiciu**

Doctoral supervisor Prof.dr. **Carmen Mihaela Mihu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	17
THE CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. General anesthesia and cancer	22
1.1. Inhalation general anesthesia	22
1.1.1 Substances used during general anesthesia	23
1.2. Total intravenous anesthesia	24
1.2.1. Substances used during total intravenous anesthesia	25
1.3. Perioperative period	26
1.3.1. Postoperative pain	26
1.3.2. Effects of postoperative pain	27
1.3.3. Evaluation of postoperative pain	28
1.3.4. Modalities for treating postoperative pain	29
1.4. Local anesthetics. The role of regional anesthetic techniques and intravenous lidocaine in the perioperative period	29
2. Breast cancer	32
2.1. Development mechanism/ etiopathogenesis	32
2.1.1 Genetic factors	32
2.1.2. External and environmental factors	33
2.2. Classification	33
2.3. Metastasizing mechanism	33
2.4. Treatment principles	34
3. The effects of anesthesia on tumoral progression	36
3.1. Effects of volatile anesthetic agents	36
3.1.1. Isoflurane	36
3.1.2. Sevoflurane	36
3.2. Effects of opioids	37
3.3. Effects of propofol	37
3.4. Effects of local anesthetics	38
3.5. The role of postoperative analgesia in tumoral progression	38
4. Angiogenesis markers	40
4.1. VEGF - vascular endothelial growth factor	40
4.2. VEGF-A receptors: VEGF-R1 și VEGF-R2	42
4.3. MMP (Metalloproteinases): MMP-3. MMP-9	42
4.4. Netosis	43

4.4.1. MPO (Mieloperoxidase)	44
4.4.2. H3Cit (citrullinated histone H3)	44
Personal contribution	
1. Research hypothesis/Purpose	49
2. General working methodology	52
3. 1st study – Neutrophil extracellular trapping and angiogenesis biomarkers after intravenous or inhalation anaesthesia with or without intravenous lidocaine for breast cancer surgery: a prospective, randomised trial	54
3.1. Introduction	54
3.2. Research hypothesis/ purpose	55
3.3. Methods	55
3.3.1. Patient randomisation	56
3.3.2. Clinical protocol	56
3.3.3. Neutrophil extracellular traps/NETosis and VEGF assays	57
3.3.4. Data management and statistics	60
3.4. Results	60
3.5. Discussion	72
3.6. Conclusions	75
4. 2nd study – Continuous intravenous infusion of lidocaine for postoperative pain in breast cancer surgery patients. Effect on acute and chronic pain	78
4.1. Introduction	78
4.2. Research hypothesis/ purpose	78
4.3. Methods	79
4.3.1. Data management and statistics	86
4.3. Results	86
4.4. Discussions	90
4.5. Conclusions	92
5. 3rd study – VEGF-R1 prognostic role in breast cancer. A possible target for anti- angiogenic therapy? A randomized controlled trial	94
5.1. Introduction	94
5.2. Research hypothesis/ purpose	94
5.3. Methods	95
5.3.1. Data management and statistics	102
5.4. Results	102
5.5. Discussions	106
5.6. Conclusions	108
6. General discussions	110

Key words: neoplasia, biomarkers, TIVA (total intravenous anesthesia), NETosis, angiogenesis, lidocaine, postoperative pain, VEGF-R1

INTRODUCTION

In the attempt to improve the prognosis of cancer patients - cancer being one of the world's main health issues - the direction of many research studies in the last years was directed towards evaluating the role of anesthetic techniques in favorising or inhibiting the metastasis process. The interest for the perioperative period was determined by the unexpected postoperative evolution in certain cases: development of multiple metastases in a very short interval of time or the reduction of pre-existent metastasis.

The aim of the thesis was to investigate the impact of different types of general anesthesia (inhalational and TIVA - total intravenous anesthesia) on the seric factors that favour the development of metastasis, the effect of adding a continuous lidocaine infusion intra- and postoperatively on those factors, and on the development of postoperative chronic pain. The research also pursued the investigation of possible associations between the seric level of proangiogenic factors and tissue receptors identified by immunohistochemical methods, whose role in angiogenesis is not completely defined.

THE CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

Surgery requiring general anesthesia is often a part of cancer therapy. The research in the field of general anesthesia and the perioperative period investigates the possibility that substances used during the anesthetic procedure may influence the recurrence of the disease, given that the mortality of neoplastic patients is due to its recurrence.

Breast cancer is the second leading cause of mortality among women suffering from cancer and is among the neoplasms with the highest global incidence. There are two theories regarding the onset of breast cancer: the cancer stem cell theory (CSC - cancer stem cells) and the stochastic theory. Successive mutations can alter these cells, and in combination with various environmental factors, they create conditions for the development of the cancerous process. Mutations presenting the highest risk for the development of breast neoplasm occur at the level of the BRCA1 and BRCA2 genes, P53, and PTEN4. Other factors associated with an increased risk of breast cancer development include: age over 40 years⁵, menarche <13 years, late menopause, nulliparity, and lack of breastfeeding, elevated level of circulating testosterone, exposure to hormonal replacement therapy or oral contraceptives⁶, excessive alcohol consumption (5-9.9 g alcohol / day), obesity, and sedentary lifestyle (factors responsible for 21% of diagnosed cases)⁷, as well as radiation due to various causes (including medical therapies).

The presence of metastasis represents the late stage of the disease, this stage involving the local invasion of peritumoral tissue, degradation of the extracellular matrix (ECM) under the influence of metalloproteinases (MMP), and uPA (urokinase

plasminogen activator) and the release of pro-angiogenic factors in order to ensure angiogenesis and the development of metastases. Among these, the role of VEGF (vascular endothelial growth factor) is well-known, with its subunits (A, B, C, D, E) stimulating the proliferation, invasion, migration of endothelial cells, and increased permeability of microvascularization.

The types of general anesthesia used during surgical interventions for tumor excision involve inhalation anesthesia (commonly using Sevoflurane) and total intravenous anesthesia (TIVA) that utilizes the continuous administration of propofol to maintain hypnosis, in combination with the use of opioids and neuromuscular blockers.

For Sevoflurane, some studies support its cytotoxic and antiproliferative effects, while others affirm its effects on enhancing the expression of the HIF-1 α factor, an effect associated with a negative prognosis. Other effects of Sevoflurane include an increase in the level of VEGF-A, MMP-3, and MMP-9, as well as influencing the immune response with alterations in the activity of NK cells.

Propofol use indicates a potential benefit by reducing the levels of proangiogenic factors. It exhibits inhibitory activity on cell migration and adhesion, induces apoptosis, and reduces the synthesis of HIF-1 α .

Regarding opioids, existing study data indicate a proangiogenic and protumoral effect through the direct stimulation of tumor proliferation by activating COX-2 (cyclooxygenase-2), inhibiting the function of NK cells, and interacting with the VEGF2 system. However, for fentanyl (the primary opioid used intraoperatively), the data are still unclear. There are studies supporting its antitumoral activity, but others indicate the proangiogenic and consequently protumoral effect of fentanyl.

Local anesthetics can be used to optimize pain control. They have the potential to activate apoptosis in cancer cells, demethylate the DNA of cancer cells (with the resulting effect being the inhibition of tumoral growth), inhibit serum factors involved in tumor development, and reduce the immunosuppression following surgical interventions. Among these, lidocaine can be used in continuous infusion during the perioperative period. It has an inhibitory effect on the viability, migration, and invasion of gastric, breast, and hepatocellular carcinoma cell lines, and it improves the survival of patients with pancreatic neoplasms.

Opioids are commonly used for postoperative pain control. Suboptimal pain control can diminish the activity of natural killer (NK) cells. However, the predominant use of opioids can also have a promoting effect on tumor progression. For effective pain control, multimodal analgesia techniques are recommended to limit the adverse effects of opioids. The use of tramadol can also be beneficial, as it has a stimulating effect on NK cell activity in animal and human models.

The mortality of cancer patients is attributed to the advancement of the disease to the metastatic stage – a process dependent on the metastatic cascade and angiogenesis. Contributing factors to this include VEGF (vascular endothelial growth factor), VEGF-R (receptors for VEGF), MMP (matrix metalloproteinases) 3 and 9, MPO (myeloperoxidase), and H3Cit (citrullinated histone 3).

PERSONAL CONTRIBUTION

Working Hypothesis and Objectives:

The perioperative period represents a critical time during which tumor progression, metastasis, and the prognosis of patients with neoplasms can be

positively influenced by pharmacological interventions that can impact circulating cancer cells, modulate immune cell suppression, and control elevated concentrations of proangiogenic cytokines/molecules, such as VEGF, MMP, MPO, H3Cit. Since substances used in general anesthesia can alter cytokine concentrations that influence the metastatic process, two anesthesia techniques (inhalation anesthesia and Total Intravenous Anesthesia - TIVA) were compared to study the effect of propofol on proangiogenic factors. To investigate the effect of local anesthetics on the same factors and postoperative pain, a continuous infusion of lidocaine for 24 hours was associated with anesthesia techniques. The third study aimed to investigate the role of VEGF-R1 as a potential histological marker in the prognosis of breast cancer patients, as well as a possible target for anti-angiogenic therapy.

General methodology

The study enrolled 120 patients diagnosed with breast tumors scheduled for surgical excision which were allocated to four equal groups: volatile anesthesia (60 patients), Total Intravenous Anesthesia (TIVA) (60 patients), volatile anesthesia associated with a continuous infusion of 1% lidocaine (30 patients from each category of anesthesia), TIVA plus a continuous infusion of 1% lidocaine (30 from each category of anesthesia).

Each patient had a blood sample drawn before the surgical intervention and afterwards, which was centrifuged and the resulting serum was stored for subsequent determination of proangiogenic serum factors. Pain scores and the doses of analgesics were tracked in the first 24h and afterwards a telephonic McGill Pain Questionnaire was administered to assess the presence and characteristics of chronic pain in the study participants.

In order to investigate VEGF-R1 receptors a collaboration was established with the Pathology Department at the "Prof. Dr. I Chiricuță" Oncological Institute. The process involved the determination of receptor density on intraoperatively excised tumor specimens.

1st study. Neutrophil extracellular trapping and angiogenesis biomarkers after intravenous or inhalation anaesthesia with or without intravenous lidocaine for breast cancer surgery: a prospective, randomised trial

The substances used in anesthesia have an effect on angiogenesis processes, suggesting the possibility that general anesthesia could influence the metastatic process and prognosis in cancer patients. Total Intravenous Anesthesia (TIVA) could potentially be beneficial for this patient category.

Working hypothesis. The use of an anesthetic technique involving the continuous infusion of propofol and lidocaine has the potential to influence NETosis markers (possible indicators of patient prognosis) as well as angiogenesis, impacting the biomarkers associated with these processes.

Material and method. To assess serum markers of NETosis and angiogenesis, blood samples were collected from 120 study participants diagnosed with breast neoplasia. Samples were obtained both before the surgical intervention and at 24 hours postoperatively. The participants were divided into four groups, as outlined in the general methodology. The collected blood was centrifuged, and the resulting serum was stored for the determination of NETosis markers (MPO and H3Cit) and specific angiogenesis markers (VEGF-A, MMP-3, MMP-9) using the ELISA method. The obtained

data was analysed with GraphPad Prism TM V8 programme in accordance with European legislation on general data protection rules.

Results. Regardless of the adopted anesthetic technique, continuous lidocaine infusion succeeded in reducing postoperative serum concentrations of H3Cit ($P=0.007$), MPO ($P=0.002$), and MMP-3 ($P=0.001$). However, there was an observed increase in postoperative concentrations of MMP-9. As for VEGF-A, a reduction in concentrations was noted for patients undergoing TIVA, and the addition of lidocaine was observed to attenuate this decrease, although statistical significance was not reached.

Conclusions. The results of this clinical trial indicate that intravenous lidocaine administration, in conjunction with general anesthesia using propofol or sevoflurane, reduces the expression of NETosis markers (H3Cit and MPO) and MMP-3. These markers hold significance as indicators of metastatic risk. Additionally, the administration of lidocaine influences markers associated with angiogenesis, such as VEGF-A.

2nd study. Continuous intravenous infusion of lidocaine for postoperative pain in breast cancer surgery patients. Effect on acute and chronic pain.

The management of postoperative pain in mastectomy patients involves regional and multimodal analgesia techniques with the aim of reducing opioid use and avoiding the detrimental effects associated with them.

Working hypothesis. The study aimed to investigate the role of continuous lidocaine administration in reducing postoperative pain and its impact on the development of chronic pain. Additionally, the study aimed to assess its ability to decrease the quantity of analgesics used in the postoperative period.

Material and method. A total of 120 patients were enrolled in the study, distributed across four groups according to the general methodology. Postoperatively, pain scores were monitored at 4-hour intervals using the Visual Analog Scale (VAS), along with the quantity of administered analgesics. Additionally, one year post-intervention, the occurrence of chronic pain was evaluated through the administration of the McGill Pain Questionnaire. Statistical analysis was conducted using the MedCalc Statistical Software. The chi-square or Kruskal-Wallis test was applied, and for repeated measurements, the two-way ANOVA test was used (following data logarithmization).

Results. The assessment of pain using the VAS scale every 4 hours failed to identify significant differences between the study groups. Regarding postoperative analgesic doses, a statistically significant decrease in the administered quantity was observed in patients who received continuous lidocaine administration ($p=0.003$). As for the occurrence of chronic pain, no differences were recorded in its appearance between the study groups at 1 year post-intervention.

Conclusions. The continuous infusion of lidocaine is associated with a reduction in the quantity of opioids administered in the postoperative period.

3rd study. VEGF-R1 prognostic role in breast cancer. A possible target for anti-angiogenic therapy? A randomized controlled trial

Cancer caused deaths often result from disease recurrence, and the cessation or inhibition of the angiogenic process, which promotes tumor proliferation, holds fundamental importance. Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A) plays a

crucial role in angiogenesis, exerting its effects through its receptors, namely VEGF-R1 and VEGF-R2.

Working hypothesis. This study aims to analyze the correlation between the density of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 (VEGF-R1) present in tumor tissue, higher serum levels of proangiogenic factors (VEGF-A, MMP-3, and MMP-9), and a less favorable prognosis (assessed using the Nottingham score). Additionally, the study seeks to investigate the correlation between the density of these receptors and the recurrence rate at 1 year postoperatively.

Material and method. A total of 120 patients were enrolled in the study, distributed across four groups according to the general methodology. From preoperative blood samples, concentrations of Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A), Matrix Metalloproteinase-3 (MMP-3), and Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) were determined using the ELISA method. The determination of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 (VEGF-R1) density was conducted immunohistochemically using intraoperatively excised tumor tissue. Image analysis was performed with the assistance of the ImageJ program. Statistical data analysis was conducted using MedCalc Statistical Software version 19.2.1 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2020). The non-parametric Spearman Rho test was employed for the analysis.

Results. No correlation was identified between positivity for Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 (VEGF-R1) and the determined proangiogenic factors. However, a difference in weak-positive expression of VEGF-R1 was identified between Nottingham grades 2 and 3 ($p=0.016$), with weak-positive values being less represented in Nottingham grade II. In terms of the negative expression of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 (VEGF-R1) in tumor tissue, there was a statistically significant difference when comparing Nottingham grades 3 and 2 ($p=0.022$). Negativity for these receptors was most prominently expressed within Nottingham grade II. Regarding the assessment of a correlation between the expression of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 (VEGF-R1) and the occurrence of recurrence at 1 year postoperatively, no association was identified between the two analyzed variables.

Conclusions. Although a prognostic value of the immunohistochemical expression of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 (VEGF-R1) in breast cancer was not identified in this study, there is a need for larger-scale studies to further explore this aspect.

ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF THE THESIS

Until now no study has compared the effect of anesthesia on proangiogenic factors. The results obtained in this study confirm the benefits of TIVA in the anesthetic management of cancer patients: reduction in VEGF-A along with its already known advantages - faster recovery, anti-inflammatory effect, reduction in post-anesthetic nausea and vomiting episodes, increased patient satisfaction with the medical procedure.

We are not aware that at the time of publication of the research on NETosis markers (represented by H3Cit and MPO) that similar studies existed. Within the study, the reduction in the level of these factors was demonstrated by adding continuous lidocaine infusion to the general anesthesia regimen. Thus, the applicability of the research is immediately useful, as this pharmacological intervention is

accessible to any anesthesia service. There is a possibility that cancer patients may benefit significantly from its association in the perioperative period.

Regarding the impact of continuous lidocaine infusion on acute pain, analgesic consumption in the immediate postoperative period, and chronic pain development, the association with lidocaine resulted in the administration of a significantly reduced amount of analgesics. However, there was no influence on the development of chronic pain.

Regarding VEGF-R1, no correlations were established between the density of this receptor, serum proangiogenic markers, and the risk of disease recurrence. The novelty of the research in this direction lies in the investigation of the association between the immunohistochemical expression of VEGF-R1 in tumoral tissue and the Nottingham histological grade, known to be a predictive element of the prognosis for patients with breast cancer. We were unable to identify other studies directed in this specific direction.