

---

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

# Influența tehnicilor anestezice asupra evoluției perioperatorii a pacienților cu cancer colorectal supuși intervențiilor chirurgicale

---

Doctorand **Tiberiu-Florin Tat**

---

Conducător de doctorat Prof.dr. **Daniela Ionescu**

---

CLUJ-NAPOCA 2019



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# CUPRINS

<b>ABREVIERI UTILIZATE ÎN TEXT</b>	11
<b>INTRODUCERE</b>	13
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	15
<b>1. Lidocaina</b>	17
1.1. Proprietăți farmacologice	17
1.2. Toxicitatea anestezicelor locale	18
<b>2. Efectele celulare și moleculare de acțiune ale lidocainei</b>	19
2.1. Inhibarea canalelor de Na voltaj dependente	20
2.2. Demetilarea ADN	22
2.3. Activarea caspazelor și reglarea activității protein kinazei activată de mitogen	23
2.4. Reglarea căilor de semnalizare Src	23
2.5. Influențarea micromediului tumoral	25
<b>3. Efectele lidocainei asupra răspunsului imun</b>	25
<b>4. Efectele clinice ale lidocainei asupra evoluției postoperatorii</b>	26
4.1. Durerea postoperatorie	26
4.2. Grețurile și vărsăturile postanestezice	29
4.3. Mobilizarea postoperatorie	29
4.4. Durata spitalizării	30
4.5. Consumul de opioide postoperator	30
4.6. Reluarea tranzitului intestinal	31
4.7. Complicațiile postoperatorii	32
4.8. Efectul asupra mediatorilor inflamatori	32
<b>5. TIVA vs anestezia inhalatorie în studiile clinice la pacienții cu cancer</b>	33
<b>6. Limfocitele T îmbunătățite genetic în terapie intensivă</b>	35
6.1. Introducere	35
6.2. Proiectarea celulelor CAR-T	36
6.3. Tratatamentul cu celule CAR-T și DLI în terapie intensivă	37
6.4. Complicațiile care necesită internarea în terapie intensivă a pacienților tratați cu celule CAR-T	38
6.5. Concluzii	39
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	41
<b>1. Ipoteza de lucru/obiective</b>	43
<b>2. Studiul 1 – Efectele antiproliferative ale propofolului și lidocainei asupra micromediului în adenocarcinomul de colon</b>	45

2.1. Introducere	45
2.2. Ipoteza de lucru/obiective	45
2.3. Material și metodă	46
2.3.1. Liniile celulare	46
2.3.2. Analiza flow citometriei în flux pentru creșterea celulelor în co-culturi	46
2.3.3. Matricea de proteine și analiza Western blot	46
2.3.4. Analiza statistică	47
2.4. Rezultate	47
2.4.1. Co-cultura și simularea nișei pentru mediul tumoral	47
2.4.2. Evaluarea căilor de acțiune dependente de proteine prin care lidocaina ar putea inhiba proliferarea celulelor canceroase	52
2.5. Discuții	56
2.6. Concluzii	58
<b>3. Studiul 2 – Efectele antiproliferative și apoptotice ale lidocainei asupra celulelor de hepatocarcinom uman</b>	59
3.1. Introducere	59
3.2. Material și metodă	59
3.2.1. Protocolul de dezvoltare a culturilor celulare	59
3.2.2. Evaluarea proliferării celulare	60
3.2.3. Evaluarea sintezei proteice folosind testul Western blot	60
3.2.4. Analiza statistică	61
3.3. Rezultate	61
3.3.1. Evaluarea proliferării celulare	61
3.3.2. Degradarea proteinei p53	65
3.4. Discuții	66
3.5. Concluzii	67
<b>4. Studiul 3 – Eficacitatea administrării intravenoase a lidocainei asupra evoluției postoperatorii imediate în chirurgia cancerului colorectal. Date preliminare privind incidența recidivelor la 1 an.</b>	69
4.1. Introducere	69
4.2. Material și metodă	71
4.3. Analiza statistică	73
4.4. Rezultate	73
4.5. Discuții	80
4.6. Concluzii	82
<b>5. Concluzii generale</b>	83
<b>6. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	85
<b>REFERINȚE</b>	87

**Cuvinte cheie:** cancer colorectal, lidocaină, propofol, recuperare postoperatorie, efect antiproliferativ, celulele de hepatocarcinom.

## Introducere

La nivel mondial, incidența cancerului este în continuă creștere, în anul 2012 estimându-se că au fost depistate aproximativ 14,1 milioane de cazuri noi și se așteaptă ca până în 2030 numărul acestora să crească la 21,7 milioane de cazuri noi. Intervenția chirurgicală rămâne cea mai bună opțiune de tratament legat de supraviețuirea pe termen lung, pentru cele mai multe cancere solide. Chirurgia crește șansele creșterii tumorale și metastazării datorită eliberării de celule tumorale în timpul rezecției chirurgicale și imposibilității sistemului imun de le neutraliza. La nivel molecular, anesteziile locale își exercită efectele antiproliferative acționând pe mai multe căi posibile: prin inhibarea canalelor de sodiu, demetilarea ADN, activarea caspazelor, reglarea activității proteinkinazei activate de mitogen sau prin inhibarea căilor de semnalizare intracelulară.

La nivel clinic, tehnica anestezică poate influența evoluția pe termen lung și riscul de a dezvolta metastaze în viitor. Administrarea lor intravenoasă continuă postoperator, reduce pragul la durere, acestea scad necesarul de opioid postoperator, determină o incidență mai mică a grețurilor și vărsăturilor postoperator, asigură o reluare mai rapidă a tranzitului intestinal pentru gaze și materii fecale, scade durata spitalizării totale dar și a spitalizării în terapie intensivă. Inclusiv pe termen lung, tehnica anestezică (inhalatorie sau intravenoasă) poate să influențeze supraviețuirea pacienților cu cancer, supraviețuirea mai lungă fiind favorizată de o tehnică anestezică intravenoasă. Lidocaina în administrare sistemică ar trebui văzută mai mult ca o opțiune de terapie analgezică. Costurile administrării ei sunt mici comparativ cu alte medicații; de asemenea, administrarea este sigură în limitele de posologie stabilite, fiind o alternativă bună pentru asigurarea unei analgezii eficiente la pacienți la care anestezia neuraxială este contraindicată.

Teza de față își propune să evalueze efectele anesteziilor locale în infuzie intravenoasă atât la nivel celular (culturi de celule canceroase colonice, hepatice), cât și în studii clinice, prin administrarea acestor substanțe la pacienți operați cu cancer de colon. Teza își propune de asemenea să evalueze comparativ, efectul a două tehnici anestezice, TIVA (anestezia totală intravenoasă) versus anestezie inhalatorie cu sevofluran asupra ratei recidivelor la pacienți cu cancer colorectal supuși intervenției chirurgicale radical.

## Ipoteza de lucru

Cancerul reprezintă o problemă majoră de sănătate publică și constituie a treia cauză de mortalitate în lume. Catecolaminele, prostaglandinele și factorii angiogenici sunt secretați în timpul perioadei perioperatorii ca răspuns la stres și actul chirurgical, și s-a arătat prin studii translaționale că sunt potențiali promotori ai metastazelor tumorale. Celule tumorale circulante au fost observate în multe tipuri de cazuri de cancer, iar inflamația sistemică ce acompaniază intervenția chirurgicală poate îmbunătăți circulația capilară facilitând angiogeneza în micrometastazele dormante, proliferarea celulelor latente tumorale și însămânțarea tulpinilor cancerigene circulante, care duc în final la recidiva timpurie a bolii. Numeroase studii clinice și preclinice susțin ipoteza că anestezia influențează biologia cancerului precum și rezultatele.

Rezultatele cercetării se vor putea translața în practica clinică, în protocoale de anestezie la pacienții cu cancer de colon.

În cadrul cercetării preclinice, în primul studiu se vor evalua efectele lidocainei în concentrații clinice asupra a două linii celulare de cancer de colon diferite în sistem de co-cultură cu o linie de fibroblaste de colon. Se va evalua de asemenea efectul lidocainei asupra proteinelor implicate în apoptoza celulară. Scopul cultivării în co-cultură este acela de a mima într-o oarecare măsură mediul tumoral, știut fiind faptul că mediul joacă un rol esențial în progresia tumorală.

Cel de-al doilea studiu urmărește efectele *in vitro* ale lidocainei atunci când aceasta este incubată cu celule umane de hepatocarcinom și fibroblaste de ficat normal. Se vor urmări comparativ efectele lidocainei asupra proliferării celulare a celulelor tumorale și respectiv a fibroblastelor precum efectul acesteia asupra gradului de expresie a proteinei p53, una dintre cele mai importante proteine supresoare în cancer.

Cel de-al treilea studiu urmărește efectele clinice ale administrării lidocainei în infuzie iv continuă timp de 48 de ore postoperator, asupra evoluției perioperatorii a pacienților cu cancer colorectal, anesteziati prin două tehnici diferite: anestezie inhalatorie, respectiv anestezie totală intravenoasă.

## **Studiu 1. Efectele antiproliferative ale propofolului și lidocainei asupra mediului în adenocarcinomul de colon**

**Scop.** Studiul a urmărit să investigheze efectele antiproliferative ale propofolului și lidocainei în concentrații clinice, prin utilizarea unui sistem de co-cultură cu două linii celulare de cancer de colon diferite (HCT-116 și RKO) și o linie de fibroblaste de colon (celule CCD-18Co).

**Material și metodă.** Studiul a utilizat două linii celulare de cancer de colon: celule de adenocarcinom de colon (HCT116 și RKO) și fibroblaste normale de colon (CCD-18Co). Ambele tipuri de celule HCT-116 și RKO au exprimat proteina verde fluorescentă CFMDA, în timp ce celulele CCD-18Co au exprimat proteina roșie (DDAO). Dinamica celor două subpopulații celulare a fost analizată la 1, 3 și 8 zile. Pentru a investiga proteinele implicate în efectele antiproliferative ale lidocainei pe cele două linii celulare de cancer de colon și în sistemul de co-cultură, s-a folosit o membrană de tip human apoptosis antibody array membrane. Membranele au fost cu anticorpul primar, apoi au fost incubate cu anticorpul secundar. Imaginea a fost apoi analizată utilizând un reactiv de tip enhanced chemoilluminescence-plus reagent.

**Analiza statistică.** Analizele statistice au fost realizate utilizând programele R (R) și GraphPad Prism 5.0. Datele au fost analizate utilizând testul t-student. Pentru fiecare concentrație, s-a calculat aria de sub curbă (AUC) folosind metoda trapezoidală. Pentru a evalua tendința AUC pentru diferitele concentrații de lidocaină și pentru tipurile de linii celulare, s-a folosit testul ANOVA two-way. O valoare a lui  $p < 0,05$  a fost considerată semnificativă statistic.

**Rezultate.** Inițial a fost calculată IC50 pentru fiecare linie celulară. Rezultatele au arătat că atât lidocaina cât și propofolul au efecte antiproliferative. Pentru liniile celulare maligne, IC50 a fost mai mic în comparație cu IC50 pentru fibroblaste ( $p=0,0004$  și respectiv  $p=0,002$ ). Pentru celulele maligne HCT-116, IC50 a fost de cel puțin două ori mai mică comparativ cu cea pentru fibroblaști ( $p=0,0021$ ). Efecte antiproliferative, nu au fost atât de exprimate în celulele RKO comparativ cu celulele HCT-116, conducând la ipoteza că aceste efecte nu sunt dependente de timp și de doză, ci de tipul de celule. În etapa următoare, s-au realizat două sisteme de co-cultură:

HCT-116-CFMDA-CCD-18Co-DDAO și RKO-CFMDA-CCD-18Co-DDAO. Au fost cultivate celule canceroase verzi (CFMDA pozitive) cu fibroblaști roșii (DDAO pozitive), după care s-au numărat celulele în zilele 0, 1, 3 și 8. Populațiile totale de celule canceroase au fost semnificativ reduse în culturile celulare tratate cu lidocaină ( $p < 0,05$ ), în timp ce în fibroblaste nu s-au observat diferențe între culturile expuse la lidocaină și în cele fără lidocaină. Lidocaina a redus numărul celulelor canceroase începând cu ziua a 2-a și procesul a fost dependent de timp. Majoritatea proteinelor implicate în apoptoza celulară au fost activate de lidocaină în celulele canceroase în comparație cu fibroblastele. Au fost înregistrate diferențe semnificative între cele două linii tumorale în ceea ce privește Bax, Bcl-2, BCL-W, HSP-27, proteinele IGFB, p27 și sTNF-R1.

**Concluzii.** Studiul a arătat că atât propofolul cât și lidocaina au inhibat selectiv proliferarea celulelor de cancer de colon, fără a afecta micromediul tumoral (fibroblaste asociate celulelor canceroase). Aceste efecte antiproliferative sunt dependente de doză și de timp. Pentru lidocaină, aceste efecte pot fi explicate cel puțin parțial prin activarea căilor proteinelor apoptozei, care completează un întreg mozaic de acțiuni, în care canalele de Na au rolul principal.

## **Studiu 2. Efectele antiproliferative și apoptotice ale lidocainei asupra celulelor de hepatocarcinom uman.**

**Scop.** Studiile efectuate în vitro și în vivo au demonstrat că lidocaină și alte anestezice locale, au efecte antiproliferative, apoptotice și citotoxice asupra celulelor canceroase. Am urmărit să investigăm dacă lidocaina în concentrații clinic eficiente are aceleași efecte asupra celulelor de hepatocarcinom. Deoarece ficatul poate fi infiltrat în timpul diferitelor manevre percutane sau/și chirurgicale, se poate emite ipoteza posibilității de a reduce dimensiunea tumorilor hepatice sau riscul recurențelor după chirurgia hepatică prin infiltrare cu lidocaină sau perfuzie intravenoasă perioperatorie de lidocaină.

**Material și metodă.** Am investigat efectele lidocainei asupra a două linii celulare: o linie celulară de carcinom hepatocelular (HepG2) și o linie celulară normală de fibroblaste hepatice (LX2). Efectele antiproliferative și citotoxice ale lidocainei asupra celulelor umane normale și tumorale au fost evaluate utilizând testul cu bromură de 3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazoliu (MTT). După 24 de ore, celulele au fost tratate cu diferite concentrații de lidocaină, variind de la 0,5 până la 3  $\mu\text{M}$ . După incubare cu lidocaină timp de 24, 48 și 72 h, supernatantul a fost îndepărtat. Rezultatele au fost analizate cu programul GraphPad Prism. Celulele au fost apoi lizate în soluția tampon Laemmli. Concentrația proteică a fost măsurată folosind kitul BCA Protein Assay. Lizatele celulare au fost supuse separării electroforetice pe gel de poliacrilamidă 10–20% și transferate pe membrane ImmobilonPSQ. Membranele au fost incubate după spălare cu soluția de tip HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG și analizate utilizând chemiluminescență îmbunătățită plus reactiv.

**Analiza statistică.** Analiza statistică a fost efectuată folosind programul R și GraphPad Prism 5.0. Datele au fost analizate folosind testul t-student. Pentru fiecare concentrație, am calculat ASC (aria de sub curbă) folosind metoda trapezoidală. Am utilizat testul two-way ANOVA pentru a evalua trendul ASC în funcție de concentrația de lidocaină și tipul de linie celulară. Un  $p < 0,05$  a fost considerat semnificativ.

**Rezultate.** Proliferarea celulelor HepG2 și LX2 expuse la diferite concentrații de lidocaină a fost determinată la 24, 48 și 72 ore. Viabilitatea liniei de celule HepG2 expuse la lidocaină a fost semnificativ mai mică în comparație cu cea a grupului de control, respectiv a fibroblaștilor

( $p < 0,05$ ). Proliferarea celulară a celulelor HepG2 expuse la lidocaină a fost semnificativ mai mică în fiecare interval de timp față de celulele martor ( $p < 0,05$ ). Scăderea proliferării celulare este dependentă de timp. Procentul de viabilitate pentru liniile de celule LX2 la 24, 48 și 72 de ore a fost semnificativ mai scăzut decât cel din grupul de control ( $p < 0,05$ ). Proliferarea celulară a grupului LX2 la 24 și 72 de ore a fost semnificativ mai redusă, comparativ cu grupul de control ( $p < 0,05$ ), în timp ce la 48 h aceste diferențe nu au mai fost semnificative. Pentru celulele HepG2, efectele antiproliferative nu sunt semnificative pentru lidocaină  $0,5 \mu\text{M}$  ( $p > 0,05$ ) la orice interval de timp, comparativ cu concentrația de  $3 \mu\text{M}$ , unde efectele sunt înalt semnificative ( $p < 0,001$ ). În cazul celulelor LX2, efectele antiproliferative nu au fost semnificative pentru lidocaină  $0,5 \mu\text{M}$  ( $p > 0,05$ ) la orice interval de timp comparativ cu concentrația de lidocaină  $3 \mu\text{M}$ , unde rezultatele au fost înalt semnificative. Efectele antiproliferative ale lidocainei evaluate ca indice de proliferare celulară au fost semnificativ mai scăzute în fibroblaștii hepatici normali în comparație cu celule de hepatocarcinom, cu excepția concentrației  $0,5 \mu\text{M}$  unde nu au existat diferențe semnificative ( $p < 0,001$ ). Cantitatea totală de proteină p53 degradată în celulele canceroase HepG2 expuse la lidocaina  $1,75 \mu\text{M}$  a fost semnificativ mai mare comparativ cu cantitatea degradată în celulele LX2 expuse la aceeași concentrație de lidocaină ( $p = 0,0241$ ). Se constată o diferență semnificativă între celulele HepG2 tratate cu lidocaină și cele fără lidocaină ( $p = 0,0007$ ).

**Concluzii.** Studiul a arătat că, în diferite concentrații clinice eficiente, lidocaina are efecte antiproliferative asupra celulelor de hepatocarcinom. Aceste efecte pot fi explicate parțial prin influența lidocainei asupra nivelului de expresie al proteinei p53. Aceste rezultate aduc argumente suplimentare, cu potențial de aplicabilitate în practica clinică ale infiltrației cu lidocaină a parenchimului hepatic la pacienții cu hepatocarcinom supuși unei intervenții chirurgicale sau manevre minim invazive (percutanate). Același efect poate fi produs de infuzia intravenoasă perioperatorie de lidocaină la pacienți cu hepatocarcinom.

### **Studiu 3. Eficacitatea administrării intravenoase a lidocainei asupra evoluției postoperatorii imediate în chirurgia cancerului colorectal. Date preliminare privind incidența recidivelor la 1 an**

**Scop.** Scopul acestui studiu a fost de a evalua efectele clinice ale lidocainei adăugată la două tehnici anestezice diferite (anestezie inhalatorie și anestezie intravenoasă) asupra recuperării postoperatorii la pacienți operați pentru cancer colorectal.

**Material și metodă.** Am efectuat un studiu prospectiv, intervențional, randomizat, bicentric, longitudinal, în perioada martie 2016-mai 2019, în departamentul de anestezie și terapie intensivă în cadrul Institutului Oncologic și al Institutului Regional de Gastroenterologie și Hepatologie din Cluj-Napoca, în care am evaluat comparativ efectele a două tehnici anestezice diferite asupra evoluției postoperatorii imediate a pacienților cu neoplasm colo-rectal operați. Am înrolat în studiu 200 de pacienți cu riscul anestezic ASA 1, 2 sau 3, după ce au semnat consimțământul informat, și care au suferit intervenții electivă cu intenție de radicalitate pentru neoplasm colo-rectal (rezeccii sau hemicolectomii) sub anestezie generală inhalatorie cu sevofluran, sau totală intravenoasă (TIVA). Criteriile de includere în studiu au fost: pacienți cu cancer colo-rectal, cu vârsta cuprinsă între 18 și 80 de ani, supuși unei chirurgii electivă (intervenții de rezecție recto-sigmoidiană sau hemicolectomie). Criteriile de excludere au fost: pacienții cu durere cronică preexistentă, cei cu medicație cronică ce ar putea interfera cu durerea

(antiepileptice, AINS, corticoizi), cei cu contraindicații la oricare dintre medicamentele utilizate în studiu, pacienții cu afecțiuni psihiatrice (depresii, tulburări bipolare, schizofrenie), cu afectare hepatică (citoliză hepatică) sau renală (retenție azotată), cei cu afecțiuni convulsivante tratate medicamentos în ultimii 2 ani, cei cu afecțiuni autoimune sau cu astm bronșic dependent de corticoizi, cei cu terapie antiaritmică (verapamil, propafenonă, amiodaronă) ce ar putea interfera cu acțiunea antiaritmică a lidocainei.

Pacienții eligibili au fost randomizați în patru grupuri de studiu ce au inclus 50 de pacienți fiecare: grupul sevo (pacienții anezați cu sevofluran), grupul TIVA (a inclus pacienții care au primit anestezie totală intravenoasă cu propofol), grupul sevo + lidocaină (grupul care a primit anestezie inhalatorie cu sevofluran la care s-a adăugat lidocaină intravenos) și grupul TIVA + lidocaină (grupul supus TIVA și care a primit perfuzie cu lidocaină). Inducția a fost efectuată cu fentanyl 2-3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , propofol 1,5-2  $\text{mg}/\text{kg}$ , și atracurium 0,5-0,6  $\text{mg}/\text{kg}$  sau rocuronium 0,5  $\text{mg}/\text{kg}$ . La inducție, după montarea cateterului venos periferic, s-a administrat lidocaină 1% 1,5  $\text{mg}/\text{kg}$  bolus intravenos la loturile cu lidocaină. Cu 30 de minute înainte de sfârșitul intervenției chirurgicale s-a administrat paracetamol 1 g intravenos. După intubația orotraheală până la trezirea din anestezie a fost asigurată perfuzia continuă cu lidocaină 1% 2  $\text{mg}/\text{kg}/\text{oră}$ , până la un maxim de 200  $\text{mg}/\text{oră}$ . Analgezia postoperatorie a fost asigurată de morfină 0,1-0,2  $\text{mg}/\text{kg}$  administrată cu 30 de minute înaintea trezirii din anestezie. La nevoie s-au administrat bolusuri repetate iv de morfină de 0,05  $\text{mg}/\text{kg}$ , astfel încât nivelul durerii să atingă un punctaj  $<3$  pe scala răspunsului verbal la durere. S-a asociat administrarea de paracetamol 1g la 6 ore intravenos. Postoperator s-a menținut perfuzia continuă cu lidocaină 1% 1  $\text{mg}/\text{kg}/\text{oră}$  (maxim 100  $\text{mg}/\text{oră}$ ) pentru primele 48 de ore la loturile cu lidocaină. Monitorizarea intraoperatorie a inclus monitorizarea ASA. Monitorizarea postoperatorie a inclus: consumul de morfină în primele 24 de ore postoperator, scorul verbal al durerii de repaus măsurat la 4 ore în primele 24 de ore, apoi la 6 ore în următoarele 24 de ore, prezența greșurilor și a vărsăturilor postoperator (evaluate la 2, 12 și 24 de ore postoperator), reluarea tranzitului intestinal pentru gaze și materii fecale, momentul primei mobilizări postoperatorii, durata spitalizării totale și nivelul markerilor inflamatori. Preanestezic fiecare pacient a fost instruit asupra evaluării scorului verbal al durerii (0- nici o durere, 10- cea mai mare durere posibilă).

**Analiza statistică.** Analiza statistică a fost efectuată folosind MedCalc Statistical Software 19.0.7. Variabilele continue au fost exprimate ca mediana și percentilele 25 și 75. Variabilele calitative au fost exprimate ca frecvență și procent. Compararea între grupuri a fost efectuată cu testul Mann-Whitney, Kruskal-Wallis sau cu testul chi-pătrat. O valoare a lui  $p < 0,05$  a fost considerată semnificativă statistic.

**Rezultate.** Cele 4 grupuri au fost comparabile în ceea ce privește vârsta, sexul, IMC, abuzul de nicotină, radio și chimioterapia neoadjuvantă. Nu au existat diferențe legate de consumul de fentanyl intraanestezic între cele 4 loturi. Scorul verbal al durerii a înregistrat diferențe semnificative statistic între cele 4 loturi la momentul trezirii din anestezie, precum și la 8, 12 și 30 de ore postoperator, fiind mai mic în loturile cu lidocaină. Au existat diferențe semnificative în ceea ce privește consumul de morfină în primele 24 de ore postoperator între cele 4 loturi. Consumul de morfină a fost semnificativ mai redus în ambele grupuri cu lidocaină (sevofluran și TIVA). Nu au existat diferențe semnificative statistic între cele 4 subploturi în ceea ce privește prezența greșurilor și vărsăturilor la orice moment al evaluării. Administrarea de lidocaină continuu postoperator a redus timpul până la prima mobilizare postoperatorie, în mod semnificativ statistic. Nu au existat însă diferențe statistice legate de momentul reluării tranzitului



intestinal pentru gaze sau materii fecale. De asemenea asocierea lidocainei în perfuzie intravenoasă, a scăzut semnificativ statistic durata spitalizării totale sau a spitalizării în PACU. Nu au existat diferențe semnificative statistic între cele 4 grupuri de studiu în ceea ce privește apariția infecțiilor, a fistulelor digestive, a insuficienței respiratorii sau a insuficienței renale postoperator. Nu au existat diferențe semnificative statistic între cele 4 loturi privind nivelul seric al proteinei C reactive și al numărul de leucocite. Rezultatele studiului nostru au arătat o rată a recidivelor după cancerul colorectal care a variat între 0-22,25%, cu o diferență semnificativă între cele 4 loturi ( $p=0,042$ ), însă fără ca diferența între loturile cu sevo și cele cu TIVA să fie semnificativă statistic ( $p=0,182$ ).

**Concluzii.** Perfuzia continuă intravenoasă intra și postoperatorie în chirurgia colo-rectală, a scăzut necesarul de opioide majore în primele 24 de ore postoperator, scorul durerii la momentul trezirii din anestezie și în primele 24 de ore postoperator, a determinat o mobilizare mai rapidă postoperator și a redus durata spitalizării atât în PACU cât și a spitalizării totale. Lidocaina pare că nu reduce și incidența metastazelor în cazul anesteziei totale intravenoase.

---

PhD THESIS - ABSTRACT

# The influence of anesthetic techniques on the perioperative evolution of colorectal cancer patients undergoing surgery

PhD Student **Tiberiu-Florin Tat**

---

PhD Coordonator Prof.dr. **Daniela Ionescu**

---

---

CLUJ-NAPOCA 2019



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# TABLE OF CONTENTS

<b>ABBREVIATIONS USED IN TEXT</b>	11
<b>INTRODUCTION</b>	13
<b>STATE OF THE ART</b>	15
<b>1. Lidocaine</b>	17
1.1. Pharmacological properties	17
1.2. Toxicity of local anesthetics	18
<b>2. The cellular and molecular effects of lidocaine action</b>	19
2.1. Inhibition of voltage dependent Na channels	20
2.2. Demethylation of DNA	22
2.3. Caspase activation and regulation of mitogen-activated protein kinase activity	23
2.4. Control of signaling paths Src	23
2.5. Influence of the tumor microenvironment	25
<b>3. Effects of lidocaine on the immune response</b>	25
<b>4. Clinical effects of lidocaine on postoperative evolution</b>	26
4.1. Postoperative pain	26
4.2. Post anesthetic nausea and vomiting	29
4.3. Postoperative mobilization	29
4.4. Duration of hospitalization	30
4.5. Postoperative opioid use	30
4.6. Resumption of intestinal transit	31
4.7. Postoperative complications	32
4.8. Effect on inflammatory mediators	32
<b>5. TIVA vs inhalational anesthesia in clinical trials in cancer patients</b>	33
<b>6. Genetically enhanced T lymphocytes in intensive care</b>	35
6.1. Introduction	35
6.2. Design of CAR-T cells	36
6.3. CAR-T cells-based and DLI therapy in the intensive care unit	37
6.4. Complications that require ICU admission for the CAR-T cells-treated patient	38
6.5. Conclusions	39
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	41
<b>1. Working hypothesis / objectives</b>	43
<b>2. First Study – Antiproliferative effects of propofol and lidocaine on the colon adenocarcinoma microenvironment</b>	45

2.1. Introduction	45
2.2. Objectives	45
2.3. Materials and method	46
2.3.1. Cell lines	46
2.3.2. Flow cytometry analysis of co-cultures for cell growth analysis	46
2.3.3. Protein array and Western blotting	46
2.3.4. Statistical analysis	47
2.4. Results	47
2.4.1. Co-culture and simulating the tumor environment niche	47
2.4.2. Assessment of the protein-based pathways by which lidocaine could inhibit cancer cell proliferation	52
2.5. Discussion	56
2.6. Conclusion	58
<b>3. Second Study – Antiproliferative and Apoptotic Effects of Lidocaine on Human Hepatocarcinoma Cells</b>	59
3.1. Introduction	59
3.2. Materials and method	59
3.2.1. Cell culture protocols	59
3.2.2. Cell proliferation assay	60
3.2.3. Protein synthesis assessment with Western blotting	60
3.2.4. Statistical analysis	61
3.3. Results	61
3.3.1. Cells proliferation assay	61
3.3.2. Protein p53 degradation	65
3.4. Discussion	66
3.5. Conclusion	67
<b>4. Third Study – Effectiveness of intravenous administration of lidocaine on immediate postoperative evolution in colorectal cancer surgery. Preliminary data on the incidence of relapses at 1 year</b>	69
4.1. Introduction	69
4.2. Materials and method	71
4.3. Statistical analysis	73
4.4. Results	73
4.5. Discussion	80
4.6. Conclusion	82
<b>5. General Conclusions</b>	83
<b>6. Originality and Innovative Contributions of the Thesis</b>	85
<b>REFERENCES</b>	87

**Key words:** colorectal cancer, lidocaine, propofol, postoperative recovery, antiproliferative, hepatocarcinoma cells.

## **Introduction**

Worldwide, the incidence of cancer is constantly increasing. In 2012 it is estimated that around 14.1 million new cases have been detected and by 2030 their number is expected to increase to 21.7 million new cases. Surgery remains the best treatment option for long-term survival for most solid cancers. Surgery increases the chances of tumor growth and metastasis due to the release of tumor cells during surgical resection and the inability of the immune system to neutralize them. At the molecular level, local anesthetics exert their anti-proliferative effects by acting on several possible pathways: by inhibiting sodium channels, demethylating DNA, activating caspases, regulating mitogen-activated protein kinase activity or by inhibiting intracellular signaling pathways.

At the clinical level, the anesthetic technique can influence the long-term evolution and the risk of developing metastases in the future. Their intravenous administration continues postoperatively, reduces the pain threshold, they reduce the need for postoperative opioid, it causes a lower incidence of postoperative nausea and vomiting, it ensures a faster return of intestinal transit for gas and fecal matter, decreases the total hospitalization duration but also hospitalization in intensive care. Even in the long term, the anesthetic technique (inhalation or intravenous) can influence the survival of cancer patients, the longer survival being favored by an intravenous anesthetic technique. Lidocaine in systemic administration should be seen more as an option of painkiller therapy. The costs of its administration are low compared to other medications; also, administration is safe within the established dosage limits, being a good alternative for ensuring effective analgesia in patients where neuraxial anesthesia is contraindicated.

The present thesis aims to evaluate the effects of local anesthetics in intravenous infusion both at the cellular level (colonic, hepatic cancer cell cultures) and in clinical studies, by administering these substances to patients with colon cancer. The thesis also aims to evaluate the effect of two anesthetic techniques, TIVA (total intravenous anesthesia) versus sevoflurane inhalation anesthesia on the rate of relapses in colorectal cancer patients undergoing radical surgery.

## **Working hypothesis**

Cancer is a major public health problem and is the third leading cause of mortality in the world. Catecholamines, prostaglandins and angiogenic factors are secreted during the perioperative period in response to stress and surgery, and have been shown by translational studies to be potential promoters of tumor metastases. Circulating tumor cells have been observed in many types of cancer, and systemic inflammation accompanying surgery may improve capillary circulation by facilitating angiogenesis in dormant micrometastases, proliferation of latent tumor cells, and seeding of circulating cancerous strains, which ultimately lead to recurrence. Numerous clinical and preclinical studies support the hypothesis that anesthesia influences cancer biology and outcomes. The results of the research could be translated into clinical practice, in anesthesia protocols in patients with colon cancer.

In the preclinical research, the first study will evaluate the effects of lidocaine in clinical concentrations on two different colon cancer cell lines in co-culture system with a colon fibroblast line. The effect of lidocaine on proteins involved in cell apoptosis will also be evaluated. The purpose of co-culture cultivation is to mimic the tumor microenvironment to a certain extent, knowing that the microenvironment plays an essential role in tumor progression.

The second study looks at the *in vitro* effects of lidocaine when incubated with human hepatocarcinoma cells and normal liver fibroblasts. The effects of lidocaine on the cell proliferation of tumor cells and fibroblasts in comparison with the effects on the degree of expression of p53 protein, one of the most important suppressor proteins in cancer, will be studied.

The third study looks at the clinical effects of lidocaine administration in continuous IV infusion for 48 hours postoperatively, on the postoperative evolution of colorectal cancer patients, anesthetized by two different techniques: inhalation anesthesia and total intravenous anesthesia respectively.

### **First Study. Antiproliferative effects of propofol and lidocaine on the colon adenocarcinoma microenvironment**

**Purpose.** Our study aimed to investigate the antiproliferative effects of both propofol and lidocaine in clinical concentrations by using a co-culture system with the two different colon cancer cell lines (HCT-116 and RKO) and one of colon fibroblasts (CCD-18Co cells).

**Materials and method.** Our study used two colon cancer cell lines -HCT116 and RKO colon adenocarcinoma cells- and CCD-18Co colon normal fibroblasts. Both HCT-116 and RKO cells expressed the CFMDA green fluorescent protein (GFP), while CCD-18Co cells expressed the DDAO red protein. The dynamics of the two cell sub-populations were analyzed at 1, 3 and 8 days. To investigate the proteins involved in antiproliferative effects of lidocaine in the two colon cell lines and in co-culture system, we used a human apoptosis antibody array membrane. Membranes were incubated with the primary antibody and next were incubated with the secondary antibody. The image was finally analyzed using an enhanced chemoilluminescence-plus reagent.

**Statistical analysis.** Statistical analyses were performed using R and GraphPad Prism 5.0. Data were analyzed using the t-test. For each concentration, we calculated the area under the curve (AUC) using the trapezoidal method. To evaluate the AUCs trend regarding the different concentrations of lidocaine and type of cell line, we used the two-way ANOVA test. A  $p < 0.05$  was considered significant.

**Results.** Initially, IC<sub>50</sub> was calculated for each cell line. Our data showed that both lidocaine and propofol had antiproliferative effects. For malignant cell lines, IC<sub>50</sub> was smaller in comparison with IC<sub>50</sub> for fibroblasts ( $p=0.0004$  and  $p=0.002$ , respectively). For RCT-116 malignant cells, IC<sub>50</sub> was at least 2-fold smaller in comparison to fibroblasts ( $p=0.0021$ ). These antiproliferative effects were not so expressed in RKO cells, as compared with HCT-116 cells, leading to the hypothesis that these effects are not only time- and dose-dependent but cell-dependent. In the next step, two co-culture systems were set up: HCT-116-CFMDA-CCD-18Co-DDAO and RKO-CFMDA-CCD-18Co-DDAO. We cultured green cancer cells (CFMDA positive) with red fibroblasts (DDAO positive) and counted the cells on days 0, 1, 3 and 8. The total cancer cell

populations were significantly reduced in cell cultures treated with lidocaine whereas in fibroblasts no differences were noted in cultures exposed to lidocaine and in those without ( $p > 0.05$ ). Lidocaine reduced cancer cell count starting with day 2 and the process was time-dependent. Most of the proteins involved in cellular apoptosis were activated by lidocaine in cancer cells as compared to fibroblasts. Significant differences were recorded between the two tumor lines with respect to Bax, Bcl-2, BCL-W, HSP-27, IGFB, p27 and sTNF-R1 proteins.

**Conclusion.** Study showed that both propofol and lidocaine selectively inhibited colon cancer cells proliferation without affecting tumor microenvironment (cancer-associated fibroblasts). These antiproliferative effects are tumor- dose and time-dependent. For lidocaine these effects may be at least partially explained by activation of apoptosis protein pathways, that complete a whole mosaic of actions in which Na channels play the main role.

### **Second Study. Antiproliferative and Apoptotic Effects of Lidocaine on Human Hepatocarcinoma Cells**

**Purpose.** A few, in vitro and in vivo studies have demonstrated that lidocaine, as well as other local anesthetics, has antiproliferative, apoptotic and cytotoxic effects in cancer cells. We aimed to investigate if lidocaine in clinical concentrations has the same effects on hepatocarcinoma cells. Taking into consideration that the liver can be infiltrated during different percutaneous or/and surgical maneuvers, by finding such properties for lidocaine will raise the hypothesis of the possibility of reducing the tumor size in the liver or the risk of recurrences after hepatic surgery by lidocaine infiltration or perioperative intravenous infusion.

**Materials and method.** We investigated lidocaine effects by using two cell lines: one hepatocellular carcinoma cell line (HepG2) and one normal liver fibroblast cell line (LX2). The antiproliferative and cytotoxic effects of lidocaine in human tumor and normal cells were assessed using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. After 24 h, cells were treated with various concentrations of lidocaine, ranging from 0.5 to 3  $\mu\text{M}$ . After incubation with lidocaine for 24, 48 and 72 h, the supernatant was removed. The results were analyzed with GraphPad Prism. Cells were lysed in Laemmli sample buffer. Protein concentration was measured using BCA Protein Assay kit. Cell lysates were electrophoresed on 10–20% polyacrylamide gels and transferred to ImmobilonPSQ membranes. The membranes were incubated after washed with HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG and analyzed using enhanced chemiluminescence-plus reagent.

**Statistical analysis.** The statistical analysis was performed using R and GraphPad Prism 5.0. Data were analyzed using the t-student test. For each concentration, we calculated the AUC (area under the curve) using the trapezoidal method. In order to evaluate the AUCs trend regarding the different concentrations of lidocaine and type of cell line, we used the two-way ANOVA test. A  $p < 0.05$  was considered significant.

**Results.** Proliferation of HepG2 and LX2 cells exposed to different concentrations of lidocaine was determined at 24, 48 and 72 hours. The percentages of viability of HEP G2 cell line exposed to lidocaine were significantly lower than those in the control group ( $p < 0.05$ ). Compared to control, cell proliferation was significantly decreased in lidocaine exposed cells for every time

interval ( $p < 0.05$ ). The decrease in cells proliferation is time- concentration dependent. The percentages of viability for LXS cell lines at 24, 48 and 72 hours were significantly lower than those in the control group ( $p < 0.05$ ). Cell proliferations of the group for 24 and 72 hours were significantly decreased, compared with the control group ( $p < 0.05$ ), while at 48 h these results were not significant. For HepG2 cells, the effects are not significant at 0.5  $\mu\text{M}$  lidocaine ( $p > 0.05$ ) at every time interval as compared to 3  $\mu\text{M}$ , where effects are highly significant ( $p < 0.001$ ). In case of LX2 cells, the results were not significant for 0.5  $\mu\text{M}$  lidocaine ( $p > 0.05$ ) at every time interval as compared to 3  $\mu\text{M}$  lidocaine where results were highly significant. Lidocaine antiproliferative effects were significantly lower in normal liver fibroblasts as compared with hepatocarcinoma cells, apart from 0.5  $\mu\text{M}$  where there were no significant differences ( $p < 0.001$ ). The total amount of p53 protein degraded in HepG2 cancer cells exposed to 1.75  $\mu\text{M}$  lidocaine was significantly higher as compared with the amount degraded when LX2 cells were exposed to the same concentration of lidocaine ( $p = 0.0241$ ). There was a significant difference between the HepG2 cells treated with lidocaine and without ( $p = 0.0007$ ).

**Conclusion.** Study showed that, in different clinically effective concentrations, lidocaine has antiproliferative effects in hepatic carcinoma cells. These effects can be at least partially explained by lidocaine's influence on the expression level of protein p53. These premises lead to potential additional useful clinical effects of lidocaine infiltration of the hepatic parenchyma in patients with hepatocarcinoma undergoing surgery or minimally invasive (percutaneous) maneuvers. The same effect may be produced by perioperative i.v. lidocaine infusion in patients with hepatocarcinoma.

### **Third Study. Effectiveness of intravenous administration of lidocaine on immediate postoperative evolution in colorectal cancer surgery. Preliminary data on the incidence of relapses at 1 year.**

**Purpose.** The purpose of this study was to evaluate the clinical effects of lidocaine added to two different anesthetic techniques (inhalation anesthesia and intravenous anesthesia) on postoperative recovery in colorectal cancer patients.

**Materials and method.** A prospective, interventional, placebo-controlled, single-blind, randomized, bicentric, longitudinal study, was performed (March 2016-May 2019), in the Oncological Institute "Ion Chiricuță" and Regional Institute of Gastroenterology and Hepatology in Cluj-Napoca, in which we compared comparatively the effects of two different anesthetic techniques on the immediate postoperative evolution of patients with colo-rectal neoplasm operated. We enrolled in the study 200 patients with ASA 1, 2 or 3 anesthetic risk, after they had signed the informed consent, and who underwent elective interventions with the intention of radicalization for colo-rectal neoplasm (resections or hemicolectomies) under general inhalational anesthesia with sevoflurane, or total intravenous (TIVA). Inclusion criteria were: age of 18 and 80, elective surgery for tumor removal, cancer stage (AJCC) I-II, no metastasis. Exclusion criteria from the study were: patients with pre-existing chronic pain, those with chronic medication that could interfere with pain (antiepileptics, NSAIDs, corticosteroids), contraindications to any of the drugs used in the study, psychiatric disorders (depression, bipolar disorder, schizophrenia), liver disease or renal disease, convulsive disorders under treatment, autoimmune disorders, corticosteroid-dependent asthma, and antiarrhythmic therapy (verapamil,



propafenone, amiodarone) that could interfere with the anti-arrhythmic effects of lidocaine. Patients were randomized into four study groups 50 patients each: the sevoflurane group (patients undergoing sevo anesthesia), TIVA group (patients undergoing total intravenous anesthesia), sevoflurane + lidocaine group (sevo anesthesia + intravenous lidocaine infusion) and TIVA + lidocaine group (TIVA + intravenous lidocaine infusion). During induction, fentanyl 2-3  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , followed by propofol 1.5-2  $\text{mg kg}^{-1}$ , and atracurium 0.5-0.6  $\text{mg kg}^{-1}$  were administered. During induction, after inserting the peripheral venous catheter, 1% lidocaine 1.5  $\text{mg kg}^{-1}$  intravenous bolus was given. Paracetamol 1 g intravenously was administered 30 minutes before the end of the surgery. In lidocaine groups following orotracheal intubation until recovery from anesthesia, a continuous infusion of lidocaine 1% 2  $\text{mg kg}^{-1} \text{ hour}^{-1}$ , up to a maximum of 200  $\text{mg hour}^{-1}$ . Postoperative analgesia was provided by morphine 0.1-0.2  $\text{mg kg}^{-1}$  administered 30 minutes before recovery. If necessary, additional morphine boluses of 0.05  $\text{mg kg}^{-1}$  were administered, so that the pain level reached a score  $\leq 4$  on the verbal pain response scale. Paracetamol 1g at 6 hours interval intravenously was administered postoperatively. Lidocaine infusion 1  $\text{mg kg}^{-1} \text{ hour}^{-1}$  (maximum 100  $\text{mg hour}^{-1}$ ) was maintained for the first 48 hours. Intraoperative monitoring included ASA recommended monitoring. Postoperative monitoring included: morphine consumption in the first 24 hours postoperatively, the verbal pain score (VPS) at rest measured at 4 hours in the first 24 hours, then at 6 hours in the next 24 hours, the presence of postoperative nausea and vomiting (evaluated at 2, 12 and 24 hours postoperatively), resumption of intestinal transit bowel movements and time to first flatus, time to postoperative mobilization, length of hospital stay and level of inflammatory markers. Prior to surgery, each patient was trained on the assessment of the verbal pain score (0- no pain, 10- the greatest possible pain).

**Statistical analysis.** Statistical analysis was performed using the MedCalc Statistical Software version 19.0.7. Continuous data was expressed as median and 25, 75 percentiles. Qualitative variables were expressed as frequency and percent. Comparisons between groups were performed with the MannWhitney, Kruskal-Wallis or chi-square test, whenever appropriate. A p value  $< 0.05$  was considered statistically significant.

**Results.** The 4 groups were comparable in terms of age, sex, BMI, nicotine abuse, radiotherapy and neoadjuvant chemotherapy. There were no differences related to intravenous anesthetic fentanyl consumption between the 4 groups. There were significant differences in VPS between the 4 groups recovery from anesthesia end, at 8, 12 and 30 hours postoperatively, at this time, VPS was lower in lidocaine groups. There were also differences related to morphine consumption in the first 24 hours postoperatively between the 4 groups. Morphine consumption was significantly reduced in lidocaine groups, in both, inhalation anesthesia and TIVA. There was no significant difference between the 4 study groups in the incidence of nausea and vomiting for all time intervals of assessment. However, there were no significant differences regarding time interval to the first flatus. Lidocaine infusion significantly reduced the duration of total hospital stay. There were no statistically significant differences between the study groups regarding the postoperative infection, fistulas, respiratory failure or postoperative renal failure. There were no statistically significant differences between the study groups regarding the serum C-reactive protein level and the number of leukocytes. The results of our study showed a recurrence rate after colorectal cancer which ranged from 0-22.25%, with a significant difference between the 4

groups ( $p = 0.042$ ), but without the difference between the sevo and TIVA groups, either statistically significant ( $p = 0.182$ ).

**Conclusion.** In our study, continuous postoperative infusion of lidocaine in colorectal surgery decreased the need for opioids within the first 24 hours postoperatively, decreased the postoperative pain score determined faster postoperative mobilization and reduced the length of hospital stay in. Lidocaine does not seem to reduce the incidence of metastases in the case of total intravenous anesthesia.