

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
"VICTOR BABEȘ" DIN TIMIȘOARA  
FACULTATEA DE MEDICINĂ  
DEPARTAMENTUL IX: CHIRURGIE I  
OTO-RINO-LARINGOLOGIE

MARIN AUREL



# TEZĂ DE DOCTORAT

NOI PERSPECTIVE ÎN TERAPIA  
PATOLOGIILOR INFECȚIOASE ȘI  
TUMORALE DIN SFERA ORL

– R E Z U M A T –

Conducător Științific  
PROF. UNIV. DR. MARIOARA POENARU

Timișoara  
2022







## CUPRINS

Lista lucrărilor publicate	V
Lista abrevierilor	VI
Indexul figurilor	VIII
Indexul tabelor	XI
Mulțumiri	XII
INTRODUCERE	XIII
<b>PARTEA GENERALĂ</b>	<b>1</b>
<b>CAPITOLUL 1. ASPECTE CURENTE LEGATE DE AFECȚIUNILE COMUNE DIN SFERA ORL</b>	<b>1</b>
1.1. OTITE – NOȚIUNI INTRODUCTIVE	1
1.2. OTITE – ASPECTE SPECIFICE	4
1.2.1. FACTORI DE RISC ÎN APARIȚIA INFECȚIILOR RECURENTE	5
1.2.2. PREVENȚIE ȘI MODALITĂȚI ACTUALE DE TRATAMENT	7
<b>CAPITOLUL 2. ROLUL BIOFILMULUI ÎN AFECȚIUNILE DIN SFERA ORL</b>	<b>17</b>
2.1. INTRODUCERE	17
2.2. BIOFILMUL ȘI BOLILE MALIGN	19
2.3. ABORDAREA TERAPEUTICĂ A BIOFILMULUI	24
<b>CAPITOLUL 3. AFECȚIUNI PARTICULARE DIN SFERA ORL</b>	<b>25</b>
3.1. INTRODUCERE	25
3.2. COMPLICAȚII ȘI SECHELE INTRATEMPORALE (EXTRACRANIENE)	27
<b>PARTEA SPECIALĂ</b>	<b>30</b>
<b>CAPITOLUL 4. EVALUĂRI IN VITRO LEGATE DE TERAPIA ȘI PROGNOSTICUL AFECȚIUNILOR BACTERIENE ȘI TUMORALE DIN SFERA ORL</b>	<b>31</b>
4.1. INTRODUCERE	31
4.2. MATERIALE ȘI METODE	35
4.2.1. REACTIVII	35
4.2.2. SINTEZA CHIMICĂ	36
4.2.3. CARACTERIZAREA PROBELOR	36
4.2.4. EVALUAREA IN VITRO A PROBELOR	37
4.3. REZULTATE ȘI DISCUȚII	38
4.3.1. EFICACITATEA ÎNCAPSULĂRII ȘI CINETICA DE ELIBERARE	38
4.3.2. CARACTERIZAREA PARTICULELOR	40
4.3.3. TESTE IN VITRO PE CELULE TUMORALE	41
4.4. CONCLUZII	45
<b>CAPITOLUL 5. BIOMATERIALE ACTIVE CA SOLUȚII TERAPEUTICE ÎN ABORDAREA INFECȚIILOR DIN SFERA ORL</b>	<b>46</b>
5.1. INTRODUCERE	46
5.2. COMPLICAȚII INTRACRANIENE ALE OTITEI MEDII	52
5.3. COLESTEATOMUL	56
5.4. O ABORDARE INOVATIVĂ A COLESTEATOMULUI	58

5.4.1. BACTERII, BIOFILM ȘI COLESTEATOM - PERSPECTIVE ALE ABORDĂRIILOR TERAPEUTICE INOVATOARE	58
5.4.1.1. Introducere	58
5.4.1.2. Materiale și metode	62
5.4.1.3. Rezultate și discuții	63
5.4.1.4. Concluzii	67
5.4.2. MATERIALE FINITE ȘI COLESTEATOM	67
5.4.2.1. Introducere	67
5.4.2.2. Materiale și metode	68
5.4.2.3. Rezultate și discuții	69
<b>CAPITOLUL 6. EVALUĂRI CLINICE LEGATE DE TERAPIA ȘI PROGNOSTICUL AFECȚIUNILOR PARTICULARE TUMORALE DIN SFERA ORL</b>	<b>73</b>
6.1. INTRODUCERE	73
6.2. MATERIALE ȘI METODE	74
6.3. REZULTATE ȘI DISCUȚII	75
6.4. CONCLUZII	93
<b>CONTRIBUȚII SPECIALE ȘI CONCLUZII GENERALE</b>	<b>94</b>
BIBLIOGRAFIE	97
ANEXE	I

## REZUMAT

Otitele medii, otitele supurate, otitele colesteatomatoase reprezintă o patologie extrem de frecventă în practica ORL, mai ales cea pediatrică de care mă ocup în special; o patologie cu mari provocări din punct de vedere terapeutic.

Încercăm prin cercetarea efectuată identificarea unor scheme terapeutice care să contribuie la obținerea unor rezultate îmbunătățite în tratarea unor astfel de patologii.

În cadrul studiilor din lucrarea de față au fost propuse mai multe obiective care au vizat direcții de cercetare complementare pentru a se aduce o contribuție în domeniul afecțiunilor comune și particulare din sfera ORL care au la bază infecțiile bacteriene și/sau proliferările tumorale benigne și maligne. Lucrarea de față este structurată, conform normelor de redactare, pe două părți principale: (a) partea generală – care este alocată studiilor de literatură și care prezintă ultimele informații științifice din domeniu și (b) partea specială care redă rezultatele studiilor experimentale conduse pe parcursul anilor de doctorat, alături de talierea materialelor și metodelor aplicate, discuții pe baza datelor prezentate în literatură și concluzii particulare.

Evaluările preclinice ale unor compuși asociați cu terapia și prognosticul afecțiunilor bacteriene și tumorale din sfera ORL sunt de o reală importanță în prezent. Datorită factorilor intrinseci și extrinseci se semnalează o serie de modificări care sunt vizibile atât în viața de zi cu zi a pacienților dar și în evoluția diferitelor microorganisme. Biofilmul joacă un rol crucial în prognosticul și progresia diferitelor infecții bacteriene care sunt adesea asociate cu stări cronice și provoacă probleme pe termen lung pacienților. Mecanismele de stabilitate și rezistență ale bacteriilor din biofilm prezintă provocări unice și în evoluție atât pentru pacienți cât și pentru medici. S-a demonstrat că, infecțiile cu biofilme pot schimba reacțiile imune inflamatorii, pot modifica metabolismul celulelor imune,

afectând dezvoltarea și activarea reacțiilor imune. Agenții terapeutici inovatori în infecții sunt cruciali pentru a contracara complicațiile severe ale infecțiilor asociate cu biofilm.

**Partea generală** este structurată pe trei capitole în care s-a pus accentul pe următoarele: (a) aspecte curente legate de afecțiunile comune din sfera ORL, cu detalierea informațiilor despre otite (factori de risc în apariția infecțiilor recurente, prevenție și modalități de tratament), (b) rolul biofilmului în afecțiunile din sfera ORL (noțiuni introductive, biofilmul și bolile maligne, alături de abordarea terapeutică a biofilmului) și (c) afecțiuni particulare din sfera ORL (noțiuni introductive, complicații și sechele intratemporale).

**Partea experimentală** a avut trei direcții de cercetare principale, aflate în strânsă corelație unele cu altele. Prima direcție de cercetare este legată de evaluările *in vitro* ale unor compuși asociați cu terapia și prognosticul afecțiunilor bacteriene și tumorale din sfera ORL. S-au evaluat structuri poliuretane, încărcate cu epigallocatechin galat, în ceea ce privește activitatea biologică utilizând celule de carcinom faringian și scuamos. Compușii din surse naturale sunt o alternativă utilizată eficient în studiul medicamentelor antibacteriene și antitumorale. Între începutul anilor '80 și finalul anului 2019 au fost aprobate peste 160 de medicamente antibacteriene. Dintre acestea, doar aproximativ 22% sunt exclusiv sintetice. Medicamentele antibacteriene, de origine naturală aprobate la începutul anului 1981 sunt: netilmicin sulfat (1981), micronomicin sulfat (1982), miokamycin (1985), mupirocin (1985), carumonam (1988), fosfomicin trometamol (1988), isepamicin (1988), teicoplanin (1988), RV-11 (1989), daptomicin (2003), fidaxomicin (2011). Produse biologice au fost aprobate în număr de patru iar vaccinuri peste 30, în special ca agenți profilactici pentru copii mici. Aproximativ 48% din totalul de medicamente aprobate în perioada specificată, fac parte din categoriile de compuși naturali sau derivați din compuși naturali fiind evidențiată importanța acestora și rolul în abordările terapeutice a diferitelor patologii vechi și noi. Transportorii poliuretani, pe bază de nano și microparticule, au o capacitate foarte bună de a încapsula cantități

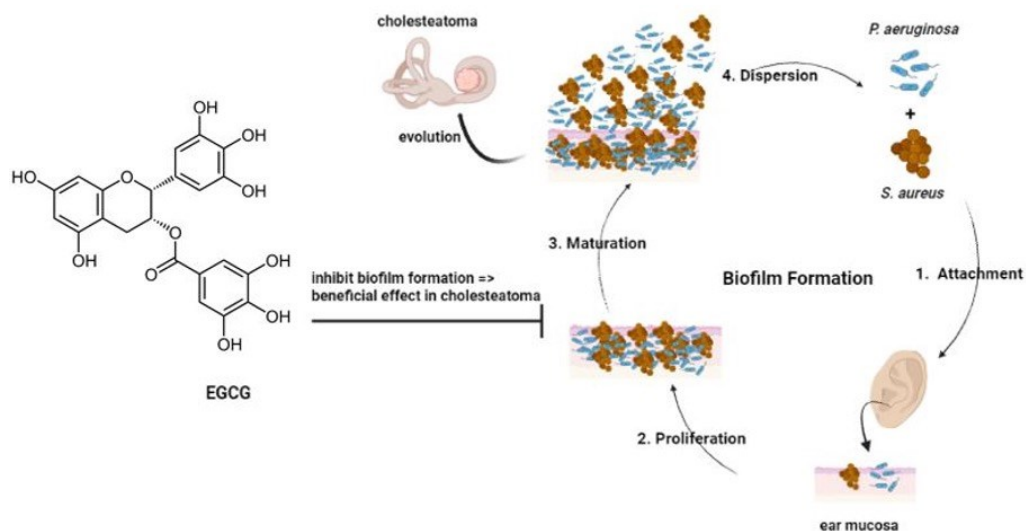


mari de substanțe active. Avantajele acestor transportori sunt multiple, printre ele regăsindu-se și un cost redus al materiilor prime, posibilitatea de a modifica perioada de degradare a lanțurilor macromoleculare prin echilibrarea raportului dintre componentele utilizate în faza apoasă și posibilitatea de modificare a mărimii particulelor prin utilizarea diferitelor cantități de extindere a lanțului. În cadru studiului de față, s-a obținut un sistem de eliberare a medicamentelor din poliuretan utilizat pentru transferul transmembranar al epigallocatechin galatului (compus de origine naturală). S-a dovedit faptul că, sistemul este format din particule aproape omogene cu o eficacitate mare de încapsulare, cu un diametru în jurul valorii de 200 nm, cu tendință medie de a forma aglomerări, foarte stabile în timpul proceselor de încălzire. Aceste caracteristici îl fac un sistem biomedical compatibil cu mediul biologic conform precizărilor din standardele specifice. Datele obținute din evaluările comportamentului celulelor luate în studiu (celule tumorale de faringe și carcinom cu celule scuamoase) au indicat faptul că sistemul transportor încărcat cu epigallocatechin galat exercită o activitate citotoxică care merită să fie studiată mai detaliat și studii *in vivo*.

Cea de-a doua direcție de cercetare, al doilea obiectiv, a vizat analiza biomaterialelor active ca soluții terapeutice în abordarea infecțiilor din sfera ORL punându-se accentul pe colesteatom. Un colesteatom poate implica urechea medie, mastoida sau ambele, invadează labirintul sau chiar se extinde dincolo de osul temporal. Un colesteatom poate fi o structură asemănătoare chistului, fără semne de infecție. Un colesteatom care este prezent în asocieră cu inflamația cronică a urechii medii (mastoidă) ar fi definit ca un colesteatom cu otită medie cronică supurativă. Ocazional copiii cu boală avansată, secundară colesteatomului, pot prezenta dureri ale mastoidei, febră și iritabilitate, mimând o mastoidită acută și rareori acest lucru poate duce la formarea unui abces mastoidian. În aceste cazuri este necesar un tratament sistemic sub formă de antibiotice intravenos. Capacitatea agenților patogeni de a forma biofilme facilitează supraviețuirea acestora în condiții nefavorabile, permițându-le să prolifereze și să colonizeze țesuturile gazdă, precum și suprafețele inerte

precum implanturile, producând reacții negative asupra sănătății umane și rezistență la medicamentele antimicrobiene. Mai controversată este situația în care biofilmele sunt polimicrobiene. Un exemplu comun de coinfecție este cel dintre *Pseudomonas aeruginosa* și *Staphylococcus aureus*, care poate agrava boala și poate împiedica alegerea terapiei cu antibiotice, recuperarea persoanei fiind mai lentă. Formarea biofilmului poate fi considerată una dintre principalele cauze prin care bacteriile dezvoltă rezistență la mai multe medicamente. Utilizarea nerezonabilă a antibioticelor a dus la dezvoltarea microorganismelor multirezistente. Produsele naturale derivate din plante dar și microorganismele și speciile marine reprezintă o sursă neprețuită de agenți anti-biofilm. Compuși izolați din plante, precum și extractele s-au dovedit a avea efecte antimicrobiene și anti-biofilm importante. Proprietățile anti-biofilm ale produselor naturale se referă la inhibarea formării matricei polimerice, reducerea producției de factori de virulență și suprimarea aderenței celulare, blocând astfel comunicarea dintre celulele bacteriene și dezvoltarea biofilmului. În studiul de față, s-a analizat efectul epigallocatechinului în asociere cu ciprofloxacină pentru a vedea posibilul efect sinergic împotriva speciilor bacteriene cu rol definitoriu în apariția biofilmului corelat colesteatomului (bacterii, biofilm și colesteatom - perspective ale abordărilor terapeutice inovatoare) și totodată s-a analizat rolul materialelor finite în abordarea colesteatomului. Există produse aprobate în doză unică pentru tratament (asociere dintre ciprofloxacină și un poloxamer) iar cercetările sunt plină desfășurare pe diferite direcții. Plantele și compușii naturali extrași din plante au un rol antibacterian semnificativ și reprezintă o alternativă la rezistența la antibiotice. Au fost efectuate mai multe studii pentru a evalua dacă ceaiul verde și principalul său fitocompus, epigallocatechin-3-galatul, au proprietăți antimicrobiene. Datele obținute au arătat că atât extractele apoase, cât și alcoolice și ECGC sunt eficiente împotriva *S. aureus* și *P. aeruginosa*. Datorită accelerării masive a dezvoltării rezistenței bacteriene la nivel global și a lipsei de noi substanțe antimicrobiene, sunt necesare noi strategii de eradicare a bolilor infecțioase. O alternativă ar fi combinarea antibioticelor între ele sau a

antibioticelor cu compuși naturali pentru a extrage potențiale efecte sinergice, știind că plantele sunt cunoscute pentru efectele lor antimicrobiene.



#### Efectul inhibitor al epigallocatechin-3-galat (EGCG) împotriva formării biofilmului și dezvoltării colesteatomului

Studiul nostru a evidențiat efectul antibacterian al epigallocatechin-3-galat (EGCG) la concentrații cuprinse între 25-100  $\mu\text{g/mL}$  comparativ cu o fluorochinolonă, ciprofloxacina, împotriva tulpinilor bacteriene *S. aureus* și *P. aeruginosa*. Asocierea EGCG cu ciprofloxacina a condus la un efect mai puternic, în special împotriva *S. aureus*, care a punctat efectul sinergic al celor două molecule. În literatura de specialitate a fost studiat și efectul antibacterian al EGCG în asociere cu alte antibiotice și s-a observat și sinergismul, evidențînd faptul că, un antibiotic din clasa cefalosporinelor, precum cefepima, asociat cu 3-galatul de epicatechină de origine naturală, a indus un efect de eradicare sinergică împotriva izolatului rezistent de *P. aeruginosa*. Astfel, combinarea antibioticului cu EGCG a permis utilizarea unor concentrații mai mici de EGCG și cefepime decât atunci când fiecare substanță ar fi administrată singură. Concentrația minimă inhibitoare pentru compusul natural a fost redusă în prezența antibioticului la diferite concentrații (0.5-4  $\mu\text{g/mL}$ ). Asocierea

compușilor naturali, în acest caz EGCG, cu antibiotice potențează efectul antibacterian datorită sinergiei rezultate; această combinație poate fi o opțiune eficientă pentru combaterea infecțiilor și chiar a infecțiilor urechii și a colesteatomului, patologie care poate afecta grav populația. Colesteatomul reprezintă un proces de keratinizare a despicăturii sau mastoidei urechii medii. Cauzele dezvoltării colesteatomului nu sunt pe deplin cunoscute, dar o serie de factori sunt responsabili pentru formarea acestei afecțiuni medicale. Printre acești factori regăsim infecția microbiană care duce la inflamație cronică, colectarea de resturi celulare și creșterea vâscozității secrețiilor, disfuncția trompei lui Eustachio, invazia celulelor sistemului imunitar și hiperplazia epitelială. Această patologie se manifestă în general prin durere și prezența unui lichid mirositor la nivelul urechii infectate și până la pierderea auzului. Din punct de vedere histologic, această leziune necanceroasă conține resturi de keratină acoperite cu epiteliu scuamos keratinizat. S-a realizat un dispozitiv prototip iar parametrii de proiectare au fost determinați pe baza măsurărilor efectuate de personalul medical în timpul operațiilor de mastoidectomie. Cerințele biomaterialelor utilizate pentru reconstrucția urechii medii, cum ar fi biocompatibilitatea, energia de suprafață, rezistența la degradare și infecție, rigiditatea mecanică, greutatea, depunerea osoasă, designul corespunzător funcției, ușor de croit și de poziționat, artefact imagistic, au fost toate luate în considerare și au fost evaluate în consecință.

Ultima direcție de cercetare s-a concentrat pe evidențierea importanței diagnosticului prompt al condrosarcomului de gradul 1 în stadiu incipient, pe baza caracteristicilor clinice, aspectelor radiologice și descrierilor histopatologice, ținând cont de faptul că acest grad histologic are o evoluție favorabilă. Condrosarcomul (CHS) este o tumoare malignă a țesuturilor moi cu diferențiere cartilaginoasă care reprezintă o zecime din toate proliferările maligne dezvoltate din țesuturile osoase. Există două subtipuri principale de condrosarcom, convențional și neconvențional. CHS convențional reprezintă peste 85% din toate cazurile și este subdivizat în subgrupuri centrale, periferice

și periostale. CHS neconvențional include trei tipuri: mezenchimal, cu celule clare și dediferențiate. CHS sunt prezente preponderant la pacienții cu vârste cuprinse între 40 și 60 de ani. Simptomele CHS dezvoltate într-un os preexistent sunt nespecifice și includ umflarea și durerea locală pentru o perioadă lungă de timp. Dispneea, respirația șuierătoare, tusea, hemoptizia, răgușeala sunt prezente în localizarea traheală. CHS se prezintă de obicei ca o leziune solitară. În mare, CHS sunt tumori ferme cu aspect lobulat, cu suprafață alunecoasă, sticloasă, tăiată cenușie. Examenul microscopic relevă condrocite ușor pleomorfe încorporate într-o matrice cartilaginoasă. Uneori pot apărea modificări mixoide, calcifiere sau necroză. De obicei, condrocitele atipice prezintă nuclee întunecate, hiper cromatice. Cel mai important în tratamentul CHS și factorii săi de prognostic este sistemul de gradare pronunțat pe criterii histologice. Caracteristicile utile pentru gradare sunt celularitatea, pleomorfismul, multinuclearea și mitozele. Cele mai frecvente sunt tumorile de gradul 1 (sarcomul de grad scăzut), cu un prognostic favorabil și o creștere lent progresivă, deși rata de recidivă locală este relativ ridicată. În general, reacțiile imunohistochemice (IHC) joacă un rol limitat în diagnosticul CHS, care se bazează pe caracteristicile morfologice, clinice și radiologice. Singura constatare consistentă a IHC este pozitivitatea proteinei S100. CHS sunt rezistente la chimioterapie și radioterapie. Rezecția mare a tumorii cu margini libere crește ratele de supraviețuire la 5 ani la peste 75%. Tratamentul de elecție pentru CHS traheale și laringiene este chirurgia conservatoare, chirurgia de conservare a funcției, inclusiv terapia cu laser.

Studiul de față a redat două cazuri de condrosarcom convenționale, care au fost diagnosticate în Secția de Chirurgie Toracică și Secția de Otorinolaringologie a Spitalului Municipal de Urgență, Timișoara, România, în perioada februarie-iunie 2021. Cazurile maligne au fost de condrosarcoame periferice, unul de scapulă și celălalt avea o localizare traheală extrem de rară, cu caracteristici microscopice ale tumorilor convenționale de grad scăzut (gradul 1).

**Studiile viitoare** care ar trebui realizate necesită a face referire la detalierea mecanismelor de acțiune a tipologiilor de tratament alternative, bazate pe formulări inovatoare, cu rol benefic atât în abordarea biofilmelor microbiene (a căror rezistență la tratamentele curente este de notorietate) dar și în combaterea proceselor maligne pentru a căror acțiune curativă implică aplicarea de tratamente cu efecte adverse semnificative. Totodată, conștientizarea importanței diagnosticului specific și rapid în cazul patologiilor maligne din sfera ORL trebuie accentuată prin derularea de programe de sănătate specifice.