

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
"VICTOR BABEȘ" TIMIȘOARA  
FACULTATEA DE MEDICINĂ  
DEPARTAMENTUL V: MEDICINĂ INTERNĂ

REDNIC ROBERT



# TEZĂ DE DOCTORAT

ASPECTE LEGATE DE PROFILUL DE SIGURANȚĂ AL  
MEDICAMENTELOR CARDIOVASCULARE CONSACRATE  
ÎN ANUMITE STĂRI PATOLOGICE SI ASOCIATE SARCINII

## REZUMAT

Conducător Științific  
PROF. UNIV. DR. TOMESCU MIRELA CLEOPATRA

Timișoara  
2023

# CUPRINS

Lista lucrărilor publicate .....	VI
Lista abrevierilor.....	VII
Indexul Figurilor .....	VIII
Indexul Tabelelor .....	XII
Mulțumiri .....	XII
INTRODUCERE.....	XV
PARTEA GENERALĂ .....	1
Capitolul 1. Hipertensiunea în sarcină. aspecte specifice și tratamente convenționale.....	1
1.1. Introducere .....	1
1.2. Clase de medicamente utilizate în tratarea hipertensiunii gestaționale .....	3
1.2.1. Beta-blocantele în tratarea hipertensiunii gestaționale.....	8
Capitolul 2. Utilizarea biocompușilor în terapeutică. resursele naturale și hipertensiunea gestațională.....	14
2.1. Introducere .....	14
2.2. Principalele clase de compuși utilizați în hipertensiunea arterială.....	15
2.3. Plante și fitocompuși utilizați în hipertensiunea asociată sarcinii .....	19
CAPITOLUL 3. ALTE PATOLOGII DE INTERES .....	23
3.1 Bolile maligne în sarcină – noțiuni introductive .....	23
3.2. Protocoale terapeutice în situații specifice .....	26
3.3. Medicamente consacrate repropuse pentru utilizarea în bolile maligne .....	28
PARTEA SPECIALĂ .....	31
Capitolul 4. Contribuții legate de acțiunea specifică a medicamentelor sintetice și naturale cardioprotectoare asupra viabilității și morfologiei celulare. ....	33
4.1. Introducere .....	33
4.2. Materiale și metode .....	38
4.2.1. Reactivi.....	38
4.2.2. Culturi celulare.....	39
4.2.3. Viabilitatea și morfologia celulară.....	39
4.2.4. Calculul indicelui de combinare.....	41
4.2.5. Analiza statistică .....	41
4.3. Acțiunea labetalolului și combinațiilor acestuia - Rezultate și discuții.....	41
4.3.1. Viabilitatea celulară.....	41
4.3.2. Morfologia celulară și confluența.....	45
4.4. Concluzii parțiale .....	52
4.5. Acțiunea digoxinei și combinațiilor acesteia – Rezultate și discuții.....	52
4.5.1. Evaluarea viabilității celulare.....	52
4.5.2. Morfologia celulară .....	55

4.5.3. Calculul indicelui de combinare.....	60
4.7. Concluzii parțiale .....	64
Capitolul 5. Evaluarea acțiunilor exercitate de labetalol si combinațiile acestuia cu folati asupra migrării celulare .....	65
5.1. Introducere .....	65
5.2. Materiale și metode .....	66
5.2.1. Reactivi.....	66
5.2.2. Culturi celulare.....	66
5.2.3. Migrarea celulară .....	67
5.2.4. Analiza statistică.....	67
5.3. Rezultate și discuții.....	67
5.4. Concluzii parțiale .....	74
Capitolul 6. Influența digoxinei și combinațiilor acesteia cu acid betulinic asupra proceselor apoptotice .....	75
6.1. Introducere .....	75
6.2. Materiale și metode .....	76
6.2.1. Reactivi.....	76
6.2.2. Culturi celulare.....	76
6.2.3. Imunofluorescență .....	76
6.3. Rezultate și discuții.....	77
6.4. Concluzii parțiale .....	82
Capitolul 7. Influența digoxinei și combinațiilor acesteia cu acid betulinic asupra vaselor de sânge.....	83
7.1. Introducere .....	83
7.2. Materiale și metode .....	84
7.2.1. Reactivi.....	84
7.2.2. Testul membranei corioalantoice (CAM/HET-CAM).....	84
7.3. Rezultate și discuții.....	85
7.4. Concluzii parțiale .....	88
Capitolul 8. Un studiu detaliat asupra efectelor antitumorale ale medicamentelor consacrate - digoxină și labetalol.....	89
8.1 Introducere .....	89
8.2 Materiale și metode .....	91
8.3 Rezultate și discuții.....	92
8.4 Concluzii .....	100
CONCLUZII GENERALE ȘI CONTRIBUȚII PARTICULARE .....	101
BIBLIOGRAFIA.....	104
ANEXE .....	I

## REZUMAT

Sarcina induce o serie de modificări fiziologice și anatomice mai mult sau mai puțin însemnate în sistemul cardiovascular, de la început (primul trimestru) până în perioada postpartum. De la modificarea debitului cardiac până la modificări structurale, inima este supusă unor remodelări progresive adaptive în majoritatea cazurilor. Mecanismele care implică volumul sanguin crescut, semnalizarea de la progesteron și factorii de creștere a endoteliului vascular, conduc la hipertrofia miocitelor cardiace și la creșterea angiogenezei. Totodată, pe parcursul sarcinii se pot dezvolta anumite afecțiuni care pot pune în pericol viața pacientelor. Bolile cardiovasculare și majoritatea tulburărilor corelate cu acestea sunt principalele cauze ale morbidității și mortalității materne. În prezent, factorii determinanți care contribuie la această tendință sunt legați de vârsta tot mai înaintată și ratele în creștere ale obezității. Utilizarea medicamentelor cardiovasculare în timpul sarcinii a crescut simțitor în ultimii ani ținând cont de: (a) faptul că tot mai multe femei amână concepția fapt care duce la rate mai mari de tulburări hipertensive în timpul gestației, și (b) creșterea numărului de femei cu boală cardiovasculară congenitală care rămân însărcinate. Majoritatea medicamentelor nu sunt teratogene atunci când sunt utilizate în doze terapeutice. Datorită fiziologiei în continuă schimbare pe perioada sarcinii, nivelurile plasmatice ale medicamentelor pot crește conducând la efecte adverse. Prin urmare, utilizarea medicamentelor în timpul sarcinii nu este una lipsită de riscuri, iar analiza posibilelor efecte ar trebui să facă parte din consilierea femeilor cu patologii (în special boli cardiovasculare) care doresc să rămână însărcinate sau care sunt deja însărcinate.

Beta-blocantele sunt considerate terapie de linia a patra în afara sarcinii, dar datorită profilului lor de siguranță fetală și neonatală sunt frecvent prescrise, iar labetalolul este agentul de primă linie recomandat atât pentru tratamentul hipertensiunii cronice, cât și al urgențelor hipertensive acute pe tot parcursul gestației. Unele medicamente cardiovasculare, cum ar fi digoxina, necesită atenție sporită deoarece are efect redus asupra mamei în timpul sarcinii, datorită clearance-ului crescut al medicamentului și fracției nelegate crescute de digoxină. Majoritatea medicamentelor antiaritmice, inclusiv beta-blocante, blocante ale canalelor de calciu, digoxină, etc. sunt compatibile cu alăptarea deoarece au puțin transfer în laptele matern.

Importanța dietei materne pentru sănătatea fătului este una de notorietate. Starea nutrițională a fătului depinde într-un procent însemnat de aportul matern iar deficiențele de nutrienți pot conduce la malformații congenitale și afectarea stării de sănătate a mamei.

Utilizarea suplimentelor alimentare pe perioada sarcinii este foarte frecventă deși cunoștințele despre siguranța și/sau eficacitatea suplimentelor nu sunt pe deplin înțelese. Totodată, pe perioada sarcinii de cele mai multe ori, viitoarele mame se concentrează adesea pe dietă utilizând frecvent suplimente alimentare. Informațiile legate de utilizarea acestora pe perioada sarcinii sunt de cele mai multe ori contradictorii în ceea ce privește siguranța și/sau eficacitatea. Recomandările în general se fac luând în considerare de datele de siguranță și de dozele tolerabile stabilite pentru femeile însărcinate. Pe perioada sarcinii pielea este și ea afectată iar cea mai de temut boală este melanomul diagnosticat în perioada fertilă cunoscut ca melanomul asociat sarcinii. Diferite mecanisme biologice sunt implicate și acestea sunt strâns legate de starea hormonală și imunitară și creșterea limfangiogenezei.

Prin urmare, s-a ales studiul detaliat al efectelor exercitate asupra anumitor celule de referință a două medicamente cardiovasculare consacrate (labetalol și digoxină) ca atare și în combinație cu molecule de origine naturală.

Lucrarea de față, este structurată conform normelor metodologice pe două părți principale: partea generală și partea specială. În partea generală sunt prezentate ultimele date din literatura de specialitate cu referire la: (a) hipertensiunea în sarcină, aspecte specifice și tratamente convenționale (clase de medicamente utilizate în tratarea hipertensiunii gestaționale, beta-blocantele în tratarea hipertensiunii gestaționale), (b) utilizarea biocompușilor în terapeutică, resursele naturale și hipertensiunea gestațională (principalele clase de compuși utilizați în hipertensiunea arterială, plante și fitocompuși utilizați în hipertensiunea asociată sarcinii) și (c) melanomul asociat sarcinii și potențialul antitumoral al medicamentelor consacrate.

Ținând cont de complexitatea corelată medicamentelor cardiovasculare, suplimentelor alimentare și bolilor care intervin în sarcină (de exemplu hipertensiune sau boli maligne ale pielii), lucrarea de față a avut trei obiective științifice specifice, și anume: (a) contribuții la completarea profilului de siguranță a labetalolului - evaluarea prin studii preclinice, *in vitro*, a efectelor exercitate de labetalol (ca atare și în asociere cu acid folic și folat) asupra mioblastelor și hepatocitelor (b) contribuții legate de efectele antitumorale ale digoxinei - evaluarea prin studii preclinice, *in vitro* și *in ovo* a efectelor exercitate de digoxină (ca atare și în asociere cu acid betulinic) asupra celulelor de melanom, (c) analiza datelor legate de efectele antitumorale exercitate de labetalol și digoxină. Partea specială este structurată pe cinci capitole, și anume: contribuții legate de acțiunea specifică a medicamentelor sintetice și naturale cardioprotectoare asupra viabilității și morfologiei celulare; evaluarea acțiunilor exercitate de labetalol și combinațiile acestuia cu folati asupra migrării celulare; influența digoxinei și combinațiilor acesteia cu acid betulinic asupra proceselor apoptotice; influența digoxinei și combinațiilor acesteia cu acid betulinic asupra

vaselor de sânge și un studiu detaliat asupra efectelor antitumorale ale medicamentelor consacrate - digoxină și labetalol. Lucrarea conține și o parte de concluzii generale și contribuțiile particulare și se încheie cu referințele bibliografice care susțin informația prezentată și rezultatele originale obținute.

Prima ipoteză a avut la bază faptul că administrarea concomitentă de labetalol-acid folic sau folat în timpul sarcinii ar putea duce la reacții adverse dăunătoare, care, după cunoștințele noastre, nu au fost intens investigate până în prezent. Prin urmare, un studiu experimental actual a fost de a prezenta un profil toxicologic *in vitro* al labetalolului asociat cu acid folic și folat folosind mioblaste și hepatocite sănătoase ca modele pentru cardio- și hepatotoxicitate indusă de compus. Efectele labetalolului, acidului folic, folatului și combinațiile acestora asupra viabilității mioblastelor sănătoase au fost evaluate în urma unui tratament prelungit, la 72 ore. Labetalolul a indus o scădere dependentă de doză a viabilității mioblastelor, cel mai proeminent efect fiind înregistrat la cea mai mare concentrație, 150 nM, acidul folic a scăzut viabilitatea mioblastelor într-un mod dependent de concentrație până la ~ 82% (50 nM), folatul a determinat o creștere semnificativă a procentului de celule viabile la cea mai mică concentrație de 0.2 nM, în timp ce, la cea mai mare concentrație (50 nM), viabilitatea a fost redusă până la ~83%. O tendință similară a fost observată în celulele hepatice. Impactul combinației labetalol-folat în ceea ce privește viabilitatea mioblastelor a fost dependent de concentrație: labetalol (50 nM) împreună cu folat (25 nM și 50 nM) a exercitat un efect stimulator în timp la o concentrație de 150 nM labetalol s-a observat reducerea viabilității celulare. Impactul labetalolului combinat cu acid folic asupra viabilității mioblastelor a fost nesemnificativ. În cazul hepatocitelor, a fost observată o reducere a viabilității celulare în urma combinației dintre labetalol (50 nM și 150 nM) cu acid folic (0.2 nM) și folat (50 nM), în timp ce celelalte scheme de tratament au condus la viabilități celulare similare cu celulele netratate. Evaluarea morfologică nu a indicat modificări semnificative de confluență în cazul mioblastelor și hepatocitelor după tratamentul de 72 de ore cu combinațiile labetalol-acid folic și labetalol-folat.

*In vitro* combinațiile labetalol-acid folic și labetalol-folat nu au exercitat toxicitate (cardiacă sau hepatică) la concentrații plasmatice cunoscute. Mai mult decât atât, combinația labetalol-folat a îmbunătățit viabilitatea mioblastelor, în timp ce combinația labetalol-acid folic a demonstrat proprietăți de vindecare cardiacă, sugerând un posibil beneficiu pentru funcția cardiacă rezultat din administrarea lor concomitentă, care ar trebui explorată în studiile viitoare.

Pentru a evalua dacă labetalolul, acidul folic, folatul și combinațiile lor interferează cu migrarea mioblastelor, a fost efectuat un test de vindecare a rănilor. Rata de vindecare a rănilor celulelor netratate a atins valoarea de ~ 66% (din 100%, care indică închiderea completă a zgârieturii) după 24 de ore. În comparație cu controlul, tratamentul unic al

celulelor cu labetalol și acid folic a inhibat vindecarea rănilor la ambele concentrații testate după 24 de ore de tratament. Folatul, pe de altă parte, a exercitat un efect inhibitor la 25 nM, în timp ce a stimulat ușor regenerarea rănilor la 50 nM. Rezultatele sugerează, de asemenea, că toate combinațiile, cu excepția LB 150 nM–FA 50 nM (rata de vindecare a rănilor ~ 53%), stimulează migrarea celulelor și vindecarea rănilor după 24 de ore de tratament. Comparativ cu celulele netratate, cele mai puternice efecte stimulative au fost înregistrate atunci când labetalolul (la concentrații de 50 și 150 nM) a fost combinat cu acid folic 0.2 nM cu rate de vindecare a rănilor de ~85% și, respectiv, ~88%. Concluzia principală a studiului este că asocierea labetalol-acid folic a demonstrat proprietăți de vindecare cardiacă, sugerând un posibil beneficiu pentru funcția cardiacă rezultat din administrarea lor concomitentă, care ar trebui explorată în studiile viitoare.

Un alt obiectiv major a fost de a evalua efectele digoxinei, acidului betulinic și ale combinației celor două substanțe asupra celulelor melanomului uman (SK-Mel- 28 și RPMI-7951). Pentru a determina potențialul citotoxic al celor doi compuși și combinația lor, viabilitatea a fost determinată la 24 de ore după stimularea cu digoxină (5, 10, 25 și 50 nM), acid betulinic (1, 5, 10 și 25  $\mu$ M) și combinația digoxină (5, 10, 25 și 50 nM) + acid betulinic 10  $\mu$ M. Digoxina s-a observat că determină o ușoară reducere a viabilității celulare, în cazul celulelor de melanom SK-Mel-28: la o concentrație de 5 nM, viabilitatea celulară s-a dovedit a fi situată în jurul unui procent de aproximativ 99%, în timp ce la concentrații de 10, 25 și 50 nM, viabilitatea a rămas relativ constantă, în jurul unui procent de aproximativ 81%. Tot asupra acestui tip de celule de melanom, acidul betulinic a prezentat un efect citotoxic dependent de concentrație: la o concentrație de 1  $\mu$ M, procentul de celule viabile a scăzut la aproximativ 63%. Ca urmare a combinării digoxinei cu acidul betulinic, s-a observat că cele mai mari concentrații de digoxină testate (25 și 50 nM) împreună cu o concentrație de 10  $\mu$ M acid betulinic au produs un efect citotoxic mai pronunțat decât cei doi compuși testați individual. Un efect similar a fost observat și în celulele de melanom RPMI-7951. Digoxina a redus procentul de viabilitate al celulelor într-o manieră dependentă de concentrație: la concentrații de 5 și 10 nM, viabilitatea celulară a fost similară cu celulele martor, dar la concentrații de 25 și 50 nM, viabilitatea a scăzut la aproximativ 88% și 82%, respectiv. Acidul betulinic a produs scăderea numărului de celule viabile tot într-o manieră dependentă de doză cu mențiunea că efectul acidului betulinic asupra viabilității celulelor a fost mult mai puțin pronunțat în cazul acestui tip de celule de melanom. Combinația, dintre digoxină și acid betulinic a avut un efect citotoxic mai pronunțat decât fiecare compus utilizat individual. Astfel, chiar și la cea mai mică concentrație testată, procentul de celule viabile a scăzut la o valoare de aproximativ 74%, în timp ce la cea mai mare concentrație testată, procentul de viabilitate a celulelor a scăzut la o valoare de aproximativ 23%. Modificările morfologice observate au inclus: un aspect rotund al formei celulare, detașarea celulelor de pe placă și o

scădere a confluenței celulelor, date care sunt în concordanță cu rezultatele obținute în cazul testului de viabilitate. La concentrații scăzute de digoxină (5 și 10 nM), valorile indicelui de combinare obținute au indicat un efect antagonist, în schimb la concentrații mai mari (25 și 50 nM), valorile indicelui de combinare au indicat un efect synergic. Pentru linia celulară de melanom uman valorile indicelui de combinare au fost toate sub 1, indicând un efect synergic puternic.

Datele din acest studiu au relevat că o combinație digoxină+acid betulinic (50 nM+10  $\mu$ M) a prezentat un efect citotoxic mai pronunțat decât cel al compușilor testați individual la nivelul ambelor tipuri de celule tumorale, rezultând o scădere a viabilității celulare și modificări morfologice. Aceste rezultate oferă o bază pentru viitoare studii farmaco-toxicologice pentru a aprofunda efectul synergic exercitat asupra celulelor melanomului și pentru a stabili mecanismele biologice implicate.

Investigarea modificărilor care apar în nucleii și fibrele de actină după stimularea cu acid betulinic (10  $\mu$ M), digoxină (50 nM) și combinația acestora s-a realizat pentru a obține o înțelegere mai profundă a mecanismelor prin care acești compuși acționează asupra celulelor melanomului. În celulele SK-Mel-28, acidul betulinic și digoxina provoacă doar o ușoară condensare a fibrelor de cromatină și actină în timp ce la combinarea acestora numărul de nucleii scade și au loc condensări masive ale nucleilor și fibrelor de actină, indicând debutul unui proces asemănător apoptozei. În ceea ce privește efectul acidului betulinic asupra nucleilor și fibrelor de actină ale celulelor RPMI-7951, la o concentrație de 10  $\mu$ M determină o ușoară condensare a nucleelor și fibrelor de actină. În cazul digoxinei, s-a observat un impact relativ scăzut asupra nucleelor și fibrelor de actină dar combinația celor doi compuși s-a dovedit a avea un efect puternic asupra condensării nucleilor și a fibrelor de actină, determinând totodată și formarea de corpuri apoptotice. Datele din acest studiu au relevat că o combinație digoxină+acid betulinic (50 nM+10  $\mu$ M) a prezentat un efect citotoxic mai pronunțat decât cel al compușilor testați individual și modificări la nivelul nucleilor și fibrelor de actină, indicând un efect asemănător apoptotic. Aceste date oferă o bază pentru viitoare studii farmaco-toxicologice pentru a aprofunda efectul synergic exercitat asupra celulelor melanomului și pentru a stabili mecanismele biologice implicate.

Membrana corioalantoică a oului de găină a fost folosită ca model biologic pentru evaluarea potențialului toxic al acidului betulinic (10  $\mu$ M), digoxinei (50 nM) și combinației acestora la nivelul vaselor de sânge. În ceea ce privește probele de testat, acidul betulinic a avut un scor de iritare de 0.75, digoxina a avut un scor de 1.09 și combinația a avut un scor de 0.52. La nivelul plexului vascular s-a observat o ușoară coagulare intravasculară, urmată de o ușoară liză vasculară în urma administrării de acid betulinic, digoxina a prezentat un efect iritant mai puternic asupra sistemului vascular în comparație cu acidul betulinic. Coagularea vasculară și liza vasculară au fost identificate a fi mai pronunțate în acest caz.



Combinăția dintre cei doi compuși nu a dus însă la modificări semnificative, singurul efect notabil fiind o ușoară coagulare intravasculară. În ciuda acestui fapt, niciunul dintre compuși și nici combinația lor nu au prezentat efecte iritative semnificative la nivel vascular, iar viabilitatea embrionilor de pui nu a fost afectată nici după 24 de ore de la aplicare. Datele din acest studiu au relevat că nu au fost observate efecte toxice asupra vaselor de sânge. Aceste date oferă o bază pentru viitoare studii farmaco-toxicologice pentru a aprofunda efectul sinergic exercitat și pentru a stabili mecanismele biologice implicate.

În ultimii ani, studiile de cercetare s-au concentrat pe investigarea potențialului anticancer al mai multor molecule utilizate în terapie pentru tratarea diferitelor patologii. Astfel, au ieșit în prim-plan glicozidele cardiotonice și în special digoxina, ca molecule promițătoare în tratamentul cancerelor, efectul lor ținut fiind investigat la nivel molecular. Mai mult, există dovezi că beta-blocantele, atât cele neselective (labetalol, propranolol, carvedilol), cât și cele selective (nebivolol, atenolol), prezintă activitate în tratamentul cancerului. Prin urmare, ultimul studiu a presupus analiza datelor legate de efectele antitumorale exercitate de labetalol și digoxină iar principalele concluzii care se pot desprinde sunt redată în continuare. Glicozidele cardiotonice și beta-blocantele sunt clase de medicamente intens cunoscute pentru beneficiile lor în bolile cardiovasculare, având utilitate terapeutică în anumite afecțiuni și la femeile însărcinate. Datorită acțiunilor lor consacrate, în ultimii ani atenția s-a îndreptat către efectul antitumoral al glicozidelor cardiotonice și al beta-blocantelor neselective. Astfel, scopul prezentului studiu a fost de a evidenția activitatea anticanceroasă a digoxinei și a labetalolului, atât *in vitro*, cât și *in vivo*, pentru a continua evaluarea efectelor acestora și a studia mai detaliat mecanismele lor de acțiune antitumorală. Analizând datele din literatura de specialitate și rezultatele originale obținute, se poate spune că digoxina deține o serie de efecte antitumorale pe un spectru mai larg de afecțiuni maligne, în timp ce labetalolul a fost mult mai puțin studiat pentru aceste efecte.