

UMFVBT

FACULTATEA DE MEDICINĂ

Departamentul Chirurgie II

PĂTRUȚ M. GEORGE VALENTIN



REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**EFFECTUL ANTIHIPERPLAZIC AL
INHIBITORILOR RECEPTORILOR
FACTORILOR DE CREȘTERE VASCULARI LA
ANIMALUL DE LABORATOR**

Conducător științific

Prof. Dr. IONAC MIHAI

Timișoara

2016

CUVINTE CHEIE

hiperplazie intimală, model experimental, PDGF, bFGF

I. INTRODUCERE

Conform Organizației Mondiale a Sănătății, bolile cardiovasculare și accidentele vasculare cerebrale sunt responsabile pentru aproape o treime din decesele survenite la nivel mondial în anul 2012. Există o discrepanță marcată între țările sărace și cele bogate, prevalența bolilor cardiovasculare fiind net superioară în statele dezvoltate, unde determină aproape jumătate dintre decese. În ciuda controlului agresiv al factorilor de risc, cât și al progreselor tehnicilor endovasculare de revascularizare, mortalitatea cauzată de bolile cardiovasculare continuă să crească.

Hiperplazia intimală reprezintă modificările cronice care apar în peretele vascular, secundar unei leziuni, manifestându-se atât în cazul arterelor, cât și al venelor implantate în circulația arterială sau a protezelor sintetice folosite în operațiile de bypass arterial, la nivelul anastomozei. În acest moment, hiperplazia intimală postintervențională reprezintă principala cauză de eșec al procedurilor de revascularizare deschise și singura în cazul celor endovasculare, pe termen lung. Conform cunoștințelor actuale, fiziopatologia acestui proces poate fi considerată multifactorială, multidirecțională, proporțională cu intensitatea leziunii și slab reversibilă. Coagularea și inflamația rezultate în urma leziunii postprocedurale determină un răspuns din partea peretelui vascular, caracterizat prin replicarea celulelor musculare în medie și migrarea în intimă, unde secretă constituenți ai matricei extracelulare, determinând îngroșarea acesteia și scăderea suprafeței lumenului. Dacă în cazul revascularizărilor cu grefon autolog se poate vorbi atât de hiperplazie cât și de hipertrofie excentrică (remodelare) – arterializarea, în cazul procedurilor endovasculare stenoza post intervențională se datorează exclusiv hiperplaziei. Experimental au fost testate multiple metode de tratament, care vizează blocarea procesului la diferite nivele și care, transpuse în practica clinică, au reușit să crească rata de patență mai ales a procedurilor endovasculare, fără a elimina în totalitate stenozele postintervenționale. Acest fapt impune obligativitatea continuării cercetărilor în acest domeniu.

În acest scop, studiu prezent și-a propus să evalueze impactul pe care l-ar avea blocarea replicării și migrării celulelor musculare netede asupra gradului de hiperplazie subsecvent. Deși există mulți factori care stimulează celulele musculare netede să devină elementul central al procesului, cercetările anterioare au evidențiat rolurile extrem de importante pe care le au factorul de creștere derivat fibroblastic bazic asupra replicării și factorul de creștere derivat plachetar asupra migrării. Inactivarea acestor factori cu anticorpi monoclonali s-a dovedit a avea un efect benefic asupra gradului de hiperplazie. Cu toate acestea, trebuie ținut cont de faptul că aceste molecule nu sunt sintetizate doar la nivelul leziunii vasculare, ci sunt produși fiziologic de multiple celule din organism (fibroblaști, mioblaști, celule endoteliale, macrofage etc.) ca răspuns la stimuli variați. Astfel, această cercetare a abordat procesul patologic din perspectiva blocării receptorilor acestor factorii, ei fiind sintetizați de celulele musculare netede viabile doar la nivelul leziunii vasculare.

II. METODĂ

Pentru a evalua capacitatea oricăror compuși în a inhiba dezvoltarea hiperplaziei intinale postlezionale, a fost necesar un model experimental de inducere a neoformației intinale după injurie. Cel mai utilizat model în cercetarea actuală este cel descris de Clowes et al în 1983. Pornind de la observarea corelației între leziunea endotelială și hiperplazia intimală subsecventă, echipa respectivă a creat un model experimental în care arterele carotide ale șobolanului erau denudate prin introducerea unui cateter de embolectomie, care era trecut umflat de mai multe ori prin lumen. Cercetările din ultimii 30 de ani au relevat importanța atât a leziunii și necrozei mediale, cât și a distrugerii adventice în augmentarea procesului, iar modelul respectiv nu are corespondent în chirurgia vasculară umană deschisă, fiind o aproximare mult mai apropiată de manevrele din chirurgia endovasculară. Reconstrucțiile arteriale realizate pe cale clasică presupun o disecție atentă a vaselor, prin care se întrerupe rețeaua vasa vasorum, clampare, arteriotomie și anastomoze, manevre prin care sunt lezate toate cele 3 tunici. Această leziune panmurală a fost principalul aspect care a fost luat în considerație când a fost gândit un nou model experimental, utilizat în cercetarea de față. Acesta presupune disecția ambelor artere femurale

comune la șobolan, secționarea totală și reanastomoza termino-terminală a celor două capete, avantajele acestuia fiind următoarele:

- Disecția circumferențială a arterelor femurale lezează rețeaua vasa vasorum, așa cum se întâmplă și în chirurgia deschisă umană, iar întreruperea acestei rețele reprezintă un factor dovedit de accentuare a răspunsului hiperplastic.
- Secționarea transversală a vaselor are corespondent în chirurgia deschisă umană, iar leziunile produse afectează atât media cât și intima vasculară.
- Dilatarea celor două capete în vederea reanastomozei determină denudare endotelială, așa cum se întâmplă în chirurgia vasculară umană în cazul preparării venei folosite ca grefon autolog.
- Sutura transfixiantă folosită pentru realizarea anastomozei corespunde cu cea din chirurgia umană și produce atât leziuni mediale cât și intime.
- Posibilitatea de a realiza două anastomoze la același animal permite reducerea costurilor și recoltarea a cel puțin unui specimen, în caz de tromboză a unei artere.
- Redisecția în această zonă anatomică, în vederea recoltării specimenelor necesare analizei histologice, este facilă.

Proiectarea studiului a determinat crearea a 3 loturi experimentale:

- **LOTUL MARTOR** a fost compus din două animale, care nu au suferit intervenție chirurgicală și nu au primit medicamentele și de la care s-au recoltat cele 4 artere femurale.
- **LOTUL EXPERIMENTAL 1** a inclus 5 animale la care s-a intervenit chirurgical, dar care nu au primit medicamente și de la care s-au recoltat 10 artere femurale la 14 zile postoperator.
- **LOTUL EXPERIMENTAL 2** a fost alcătuit din 13 animale, care au fost operate și care au primit medicamente antihiperplazice timp de 14 zile.

Medicamentele utilizate pentru a împiedica interacțiunea factor de creștere – receptor au fost Imatinib și PD174073. Imatinib este un medicament sintetizat inițial pentru tratamentul pacienților cu leucemie mieloidă cronică Philadelphia pozitivi prin blocarea autofosforilării tirozinkinazei din componența proteinei de fuziune *Bcr-abl*. Cercetări

ulterioare au evidențiat capacitatea acestui produs de a opri activarea tirozinkinazei de la nivelul tuturor receptorilor PDGF. PD174073 reprezintă un alt produs de sinteză creat inițial pentru a fi testat în tratamentul cancerului pulmonar cu celule mici și a celui ovarian, mecanismul de acțiune fiind reprezentat de inactivarea tirozinkinazei din structura receptorilor factorilor de creștere derivați fibroblastic. Conform referințelor din literatură, dozele utilizate în cazul modelului murinic au fost de 25 mg/kgc/zi pentru Imatinib și 2 mg/kgc/zi pentru PD174073. Calea de administrare a fost gavajul gastric. La sfârșitul perioadei de tratament au fost eutanasiate și li s-au recoltat arterele femurale.

Fragmentele bioptice au fost apoi preparate folosind colorația hematoxilină-eozină, respectiv elastică van Gieson, urmând protocolul standard. Ulterior imaginile au fost digitalizate folosind un microscop și un sistem video, apoi au fost analizate folosind programul informatic AutoCAD (Autodesk, San Rafael, CA, SUA). Au fost trasate marcaje pe circumferința lumenului (prin glicocalix), limitanta elastică internă și limitanta elastică externă, programul calculând automat suprafețele delimitate de aceste marcaje.

Rezultatele au fost evaluate utilizând următorii parametri:

RAPORTUL INTIMĂ/MEDIE - RIM a fost calculat ca fracția dintre suprafața delimitată de lumen și limitanta elastică internă – Si și suprafața delimitată de limitanta elastică internă și cea externă – Sm. În cazul unei artere sănătoase, acest raport este foarte mic, ținând cont de faptul că Si este reprezentat de un strat subțire de celule endoteliale împreună cu membrana bazală pe care acestea repauzează.

GRADUL DE STENOZĂ DETERMINAT DE INTIMĂ – GSI reprezintă raportul dintre suprafața lumenului – Slu și suprafața circumscrișă de limitanta elastică internă - Slel, adică suma dintre suprafețele intimei și lumenului. Acest parametru cuantifică participarea intimei la micșorarea suprafeței lumenului. Atunci când celulele musculare netede migrează în intimă și secretă constituenți ai matricei extracelulare, aceștia ocupă spațiu în lumen, astfel că în caz de hiperplazie intimală, acest raport este mai mic decât la o arteră sănătoasă.

GRADUL DE STENOZĂ DETERMINAT DE MEDIE – GSM reprezintă raportul dintre suprafața circumscrișă de limitanta elastică internă, adică

suma dintre suprafețele intimei și lumenului și suprafața circumscrisă de limitanta elastică externă – Slee, adică suma suprafețelor lumenului, intimei și mediei. Acest parametru calculează contribuția mediei la reducerea suprafeței lumenului și ține cont de faptul, pe de o parte, că limitanta elastică internă nu este o structură rigidă, nemodificabilă structural, iar, pe de altă parte, nu toate celulele musculare netede nou formate în medie migrează în intimă, determinând astfel atât o hiperplazie medială excentrică, spre adventice, cât și una concentrică, spre lumen.

GRADUL DE STENOZĂ COMBINAT – GSC reprezintă raportul dintre suprafața lumenului și aria circumscrisă de limitanta elastică externă. Acest parametru calculează contribuția combinată a mediei și intimei la reducerea suprafeței lumenului.

Pentru că, în cadrul procesului de fixare în parafină a specimenelor recoltate, suprafața lumenului se reduce prin colabarea vasului, s-a realizat calcularea suprafeței unui cerc a cărui circumferință ar fi egală cu perimetrul măsurat, după cum urmează:

$$\text{Lungimea cercului} = \text{perimetrul lumenului} = 2 \pi r$$

$$L = 2 \pi r$$

$$r = \frac{L}{2\pi}$$

$$\text{Aria cercului} = Slu = \pi r^2$$

$$Slu = \pi L^2 / 4 \pi^2$$

$$Slu = L^2 / 4 \pi$$

III. REZULTATE

LOTUL MARTOR

Au fost prelevate 4 artere femurale de la două animale neoperate. În tabelul 1 sunt prezentate valorile parametrilor calculați în funcție de suprafețele măsurate:

Numărul specimenului	RIM = Si/Sm	GSI=Slu/Slei	GSM=Slei/Slee	GSC=Slu/Slee
1	0,1022	0,9247	0,5759	0,5326
2	0,1103	0,9313	0,6163	0,5740
3	0,1006	0,9293	0,5874	0,5459
4	0,1067	0,9348	0,6210	0,5805
Valoarea medie în întregul lot	0,1049	0,9300	0,6001	0,5582

Tabelul 1. Valorile parametrilor calculați pentru lotul martor.

LOTUL EXPERIMENTAL 1

Nici unul dintre cele 5 animalele din lotul experimental 1 nu a decedat în perioada postoperatorie. La redisecție, toate arterele femurale erau patente și bine integrate în țesutul înconjurător. Valorile parametrilor calculați pentru lotul experimental 1 sunt expuse în tabelul 2.

Numărul specimenului	RIM = Si/Sm	GSI=Slu/Slei	GSM=Slei/Slee	GSC=Slu/Slee
1	0,2626	0,8435	0,6267	0,5286
2	0,2878	0,7987	0,5885	0,4700
3	0,1376	0,8598	0,4955	0,4260
4	0,2170	0,8002	0,5238	0,4204
5	0,2939	0,8177	0,6173	0,5048
6	0,2105	0,8382	0,5655	0,4770
7	0,1613	0,8508	0,5196	0,4421
8	0,3956	0,7299	0,5942	0,4337
9	0,4114	0,8118	0,6862	0,5571
10	0,2293	0,7990	0,5329	0,4258
Valoarea medie în întregul lot	0,2607	0,8149	0,575	0,4685

Tabelul 2. Valorile parametrilor calculați pentru lotul experimental 1

LOTUL EXPERIMENTAL 2

Două animale au decedat pe parcursul experimentului, ambele în urma gavajului gastric, primul în ziua a 3-a și al doilea în ziua a 8-a. La examenul histopatologic s-a decelat tromboză totală sau parțială pentru 5 dintre cele 22 artere recoltate. Acestea au fost excluse din studiu. Valorile parametrilor calculați pentru lotul experimental 2 sunt expuse în tabelul 3. Valorile medii ale acestor parametri pentru toate cele 3 loturi sunt expuse în tabelul 4.

Numărul specimenului	RIM = Si/Sm	GSI=Slu/Slei	GSM=Slei/Slee	GSC=Slu/Slee
1	0.0591	0.9255	0.4427	0.4097
2	0.1108	0.8896	0.5010	0.4457
3	0.0938	0.9405	0.6122	0.5758
4	0.1353	0.9266	0.6484	0.6009
5	0.2554	0.8623	0.6499	0.5604
6	0.0735	0.8855	0.4565	0.4042
7	0.1081	0.9180	0.5688	0.5221
8	0.0872	0.8993	0.4641	0.4173
9	0.1374	0.9394	0.6943	0.6523
10	0.0727	0.9234	0.4871	0.4498
11	0.1200	0.9191	0.5975	0.5492
12	0.0796	0.9373	0.5596	0.5245
13	0.0686	0.9194	0.4599	0.4229
14	0.0651	0.9117	0.4247	0.3872
15	0.2226	0.8522	0.6011	0.5123
16	0.1236	0.9366	0.6613	0.6195
17	0.1277	0.9018	0.5654	0.5099
Valoarea medie în întregul lot	0.1141	0.9110	0.5526	0.5037

Tabelul 3. Valorile parametrilor calculați pentru lotul experimental 2.

	RIM = Si/Sm	GSI=Slu/Slei	GSM=Slei/Slee	GSC=Slu/Slee
Valoarea medie în lotul martor	0,1049	0,9300	0,6001	0,5582
Valoarea medie în lotul exp. 1	0,2607	0,8149	0,5750	0,4685
Valoarea medie în lotul exp. 2	0.1141	0.9110	0.5526	0.5037

Tabelul 4. Valorile medii ale parametrilor calculați pentru cele 3 loturi.

ANALIZA STATISTICĂ

Diferența statistică pentru variabilele calculate, între lotul martor și lotul experimental 1, respectiv lotul experimental 1 și lotul experimental 2, s-a efectuat utilizând testul t nepereche (Turkey – Kramer). O valoare a $p < 0.05$ a fost considerată semnificativă statistic. Analiza variației (ANOVA) parametrilor între cele 3 loturi s-a realizat utilizând programul informatic JMP® Statistical Software (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, SUA

Testul t între lotul martor și lotul experimental 1

Pentru RIM: $p = 0.0056$

Pentru GSI: $p = 0.0002$

Pentru GSM: $p = 0.9456$

Pentru GSC: $p = 0.0042$

Testul t între lotul experimental 1 și lotul experimental 2

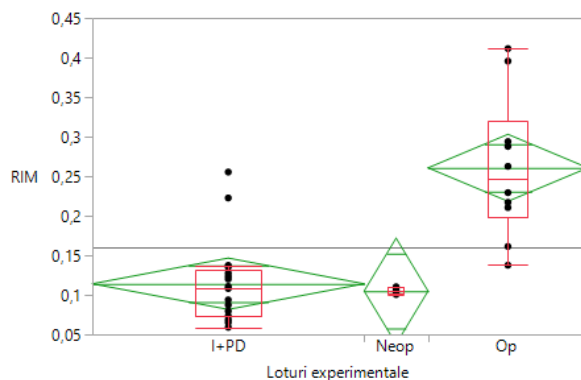
Pentru RIM: $p = 0.0001$

Pentru GSI: $p = 0.0001$

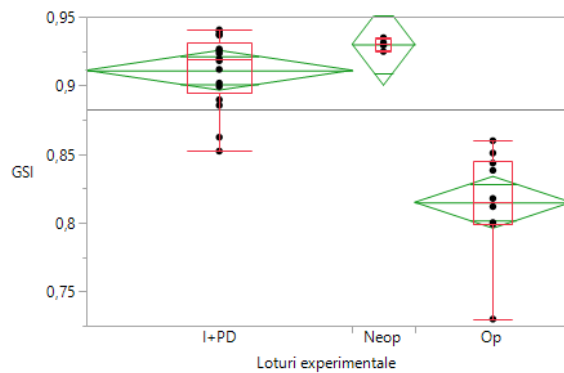
Pentru GSM: $p = 0.4766$

Pentru GSC: $p = 0.2314$

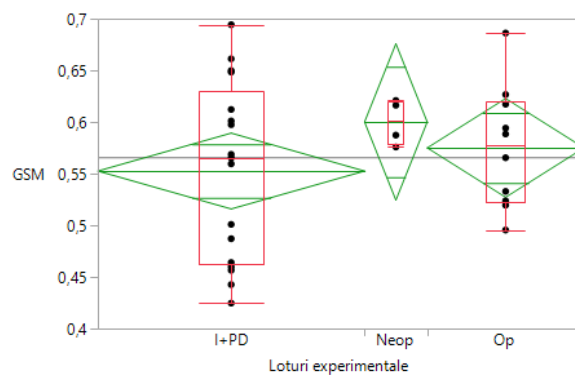
Analiza variației pentru raportul intimă/medie între cele 3 loturi



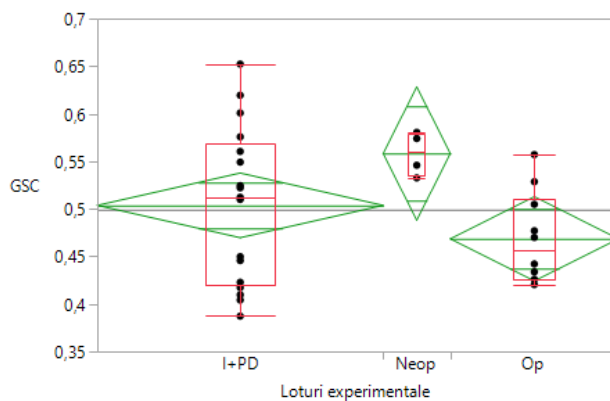
Analiza variației pentru GSI între cele 3 loturi



Analiza variației pentru GSM între cele 3 loturi



Analiza variației pentru GSC între cele 3 loturi



IV. DISCUȚII

MODELUL EXPERIMENTAL

S-au efectuat 36 incizii, 3 (8,33%) prezentând dehiscență, necesitând reintervenție și resutură. Nu s-au observat semne de infecție la nivelul suturilor. În momentul recoltării fragmentelor bioptice, toate plăgile erau vindecate. 5 (15,62%) dintre cele 32 de fragmente arteriale recoltate prezentau tromboză totală, toate din lotul experimental 2. Calculele statistice au arătat că raportul intimă/medie a crescut cu 250% între vasul normal și vasul operat, de la 0,1049 la 0,2607, valoare semnificativă statistic, cu un $p = 0,0056$. Ținând cont de faptul că modificările suprafeței mediei între lotul martor și lotul experimental 1 nu au fost semnificative statistic (p pentru GSM = 0,9456), putem considera că această creștere a raportului se datorează doar creșterii suprafeței intimei. Suprafața lumenului a scăzut, de la 93% din suprafața delimitată de limitanta elastică internă, pentru lotul martor, la 81,5% pentru lotul experimental 1 (p GSI = 0,0002) și de la 55,82% din întreaga suprafață de secțiune a vasului, pentru lotul martor, la 46,85% pentru lotul experimental 1, de asemenea semnificativ statistic, p GSC = 0,0046. Modificarea nesemnificativă statistic a suprafeței mediei între cele două loturi, p GSM = 0,9456, confirmă multiple alte studii potrivit cărora majoritatea celulelor musculare netede nou-formate în medie migrează în intimă, unde secretă componentele matricei extracelulare, care ajunge să reprezinte peste 80% din neointimă. Datorită ușurinței în efectuare, ratei scăzute de complicații, similitudinii cu intervențiile deschise din chirurgia umană și capacității de dezvoltare a hiperplaziei intinale, modelul experimental dezvoltat în cadrul acestui proiect poate fi implementat și utilizat cu succes în cercetări ulterioare.

EFICIENȚA MEDICAMENTELOR UTILIZATE ÎN STUDIU

Am testat eficiența combinată a inhibitorului receptorului factorului de creștere fibroblastic bazic și al factorului de creștere derivat plachetar în scăderea formării neointimei. Administrarea acestor medicamente a determinat scăderea raportului intimă/medie la 0,1141, față de 0,2607 la animalele din lotul experimental 1, valoare apropiată de cea a arterei sănătoase, de 0,1049, scădere semnificativă statistic cu un p RIM = 0,0001. Această blocare a formării neointimei s-a reflectat în gradul de

stenoză determinat de intimă, procentul suprafeței lumenului din suprafața delimitată de limitanta elastică internă crescând de la 81,49% în lotul experimental 1 la 91,10% în lotul experimental 2, de asemenea o valoare apropiată de cea a vasului normal, de 93%, cu un p GSI = 0,0001. Niciunul dintre animalele din lotul experimental 2 nu a decedat în urma administrării medicamentelor. Cele două decese înregistrate s-au datorat gavajului gastric. Recoltarea specimenelor și examinarea histologică au relevat prezența trombozei la 5 (22,72%) dintre cele 22 artere în lotul experimental 2. De asemenea, s-au decelat pe lamele de analiză prezența a mici decolări intimale în cazul a 6 specimene (27,27%), tot din lotul experimental 2. Niciunul dintre aceste aspecte nu au fost observate în cazul lotului experimental 1. Ținând cont de faptul că toate anastomozele au fost realizate de autor, explicația cea mai rezonabilă a acestor observații este că au fost cauzate de medicamentele utilizate în studiu. În acest sens, se poate specula existența unei reendotelizări deficitare. Inhibitorul receptorului factorului de creștere derivat plachetar are efecte inhibitoare și asupra factorului de creștere vascular endotelial (VEGF), la concentrații mari. O scădere a activității acestui factor la concentrațiile medicamentoase utilizate în studiu poate determina o întârziere a reendotelizării zonei lezate, ceea ce predispune la disecții intimale și tromboză.

V. CONCLUZII

Această cercetare s-a axat pe două direcții principale:

1. Realizarea unui model experimental de inducere a hiperplaziei intimale, apropiat de leziunile produse în chirurgia vasculară umană deschisă;
2. Evaluarea eficacității inhibitorilor receptorilor bFGF și PDGF în blocarea dezvoltării neointimei postlezionale.

Modelul experimental realizat pe șobolanul de laborator determină o hiperplazie importantă, raportul intimă/medie crescând cu 250% față de vasul normal, iar suprafața ocupată de lumen din suprafața circumscrisă de limitanta elastică internă scăzând de la 93% la 81%. Acest model este ușor de realizat, determină leziuni la nivelul tuturor tunicilor peretelui vascular și are un impact fiziologic minim asupra animalului, putând fi utilizat cu succes în cercetări ulterioare.

Inhibitorii receptorilor factorilor de creștere derivat fibroblastic și plachetar au determinat scăderea proliferației neointimale până la valori apropiate de vasul normal. Raportul intimă/medie obținut în urma administrării acestor medicamente este asemănător cu cel calculat pentru o arteră nelezată, iar suprafața luminală ocupă un procent din suprafața circumscrisă de limitanta elastică internă foarte apropiat de cel de al vasului normal.

Singurul mod de a combate hiperplazia intimală în chirurgia deschisă rămâne dezvoltarea unui medicament sau a unei combinații de medicamente care să poată fi administrate pe cale sistemică. Rezultatele acestui experiment, ținut pe cei doi factori cu rol major în această patologie, pot reprezenta un punct de plecare, în acest sens.