

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ
ΑΘΗΝΑΣ ΓΙΑΓΚΙΝΗ
ΧΗΜΙΚΟΥ

Μελέτη των ιστολογικών και βιοχημικών αλλοιώσεων του φλεβικού τοιχώματος στη φλεβική αναστόμωση των συνθετικών αρτηριοφλεβικών μοσχευμάτων

Εισαγωγή

Περίπου 800.000 νεφροπαθείς τελικού σταδίου ανά τον κόσμο αντιμετωπίζονται με αιμοκάθαρση τρεις φορές την εβδομάδα. Σε άνω του 50% των ασθενών χρησιμοποιούνται συνθετικά μοσχεύματα πολυτετραφθοροαιθυλενίου (polytetrafluoroethylene, PTFE) ως αγγειακή προσπέλαση, όμως η πλειοψηφία αυτών αποφράσσεται σε διάστημα 1-8 μηνών από την τοποθέτησή τους, λόγω κυρίως της εμφάνισης ινομυϊκής υπερπλασίας στη φλεβική αναστόμωση. Η διατήρηση της βατότητας των μοσχευμάτων αποτελεί κλινικό στόχο με μείζονα κοινωνική και οικονομική σημασία. Παρά το μεγάλο μέγεθος του προβλήματος, δεν υπάρχουν μέχρι σήμερα αποτελεσματικά μέσα για την πρόληψη και θεραπεία της ινομυϊκής υπερπλασίας. Αυτό οφείλεται εν πολλοίς στην έλλειψη επαρκούς γνώσης σχετικά με τους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς πρόκλησης και διατήρησής της, οι οποίοι επιφέρουν στένωση των αγγείων και, τελικά, απόρριψη των μοσχευμάτων.

Η πάχυνση του συνολικού αγγειακού τοιχώματος και των επιμέρους χιτώνων του (έσω, μέσου και έξω) είναι ενδεικτική της ανάπτυξης ινομυϊκής υπερπλασίας. Οι ελαστικές και κολλαγόνες ίνες αποτελούν τα βασικά δομικά συστατικά, που φέρουν τα

ασκούμενα στο αγγειακό τοίχωμα αιμοδυναμικά φορτία. Η α-ακτίνη και η δεσμίνη των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων συνιστούν σημαντικούς δείκτες κυτταρικής διαφοροποίησης, οι οποίοι σε συνδυασμό με το δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού ki-67 διαδραματίζουν μείζονα ρόλο στον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των λείων μυϊκών ινών. Κατά τη δημιουργία αρτηριοφλεβικής επικοινωνίας, λαμβάνει χώρα φλεγμονώδης αντίδραση που χαρακτηρίζεται από την αυξημένη έκφραση των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης ICAM1 και VCAM1 στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς και από την έντονη παρουσία CD68+ κυττάρων (μακροφάγα). Ένα άλλο μόριο που επίσης συμμετέχει ενεργά στη ρύθμιση της φλεγμονώδους αντίδρασης είναι το μονοξείδιο του αζώτου (NO). Ακόμη, η ενδοθηλίνη 1 (EDN1), ο παράγοντας von Willebrand (vWF), ο αυξητικός παράγοντας A του αγγειακού ενδοθηλίου (VEGFA) και ο ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας 2 (FGF2) είναι τυπικοί δείκτες της βλάβης του ενδοθηλίου. Επιπροσθέτως, οι μεταλλοπρωτεάσες και οι αναστολές τους διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στο σχηματισμό του νεοσυντιθέμενου έσω χιτώνα, στην αποδόμηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και, εν τέλει, στην ανάπτυξη ινομυϊκής υπερπλασίας. Σημαντικός για την παθοφυσιολογία της ινομυϊκής υπερπλασίας είναι τέλος και ο ρόλος της λαμινίνης, μίας δομικής πρωτεΐνης της εξωκυττάριας ουσίας.

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η διερεύνηση των ιστολογικών και βιοχημικών αλλοιώσεων στη φλεβική αναστόμωση των συνθετικών αρτηριοφλεβικών μοσχευμάτων, κατά την ανάπτυξη ινομυϊκής υπερπλασίας και της επακόλουθης απόφραξης των μοσχευμάτων. Εν προκειμένω, μελετήθηκε η χρονική και τοπογραφική έκφραση των κύριων παραγόντων που συμμετέχουν ενεργά στους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς της ινομυϊκής υπερπλασίας. Για την πληρέστερη διερεύνηση των ιστολογικών αλλοιώσεων πλησίον της αρτηριοφλεβικής επικοινωνίας, μελετήθηκε μορφομετρικά και το τοίχωμα στην αρτηριακή αναστόμωση.

Υλικά και μέθοδοι

Σε 24 υγιείς αρσενικούς χοίρους Large White×Landrace (95±3 kg) δημιουργήθηκε αρτηριοφλεβική επικοινωνία μεταξύ της κοινής καρωτίδας και της έσω σφαγίτιδας με χρήση μοσχεύματος ePTFE. Τα ζώα τυχαιοποιήθηκαν σε 3 ισάριθμες πειραματικές ομάδες και ευθανατώθηκαν τη 2η, 4η και 12η εβδομάδα ακολούθως της

χειρουργικής επέμβασης. Κατά την ευθανασία, αφαιρέθηκαν η αναστομωμένη και η ετερόπλευρη (στο ίδιο ύψος) σφαγίτιδα και καρωτίδα των ζωικών προτύπων. Κατόπιν, οι ιστοί διαιρέθηκαν σε 3 ισομεγέθη τμήματα βάσει της τοπογραφικής τους εντόπισης (εγγύς, κέντρο και άπω περιοχή της αρτηριοφλεβικής επικοινωνίας). Πραγματοποιήθηκε ιστομορφομετρική ανάλυση της ινομυϊκής υπερπλασίας και των αλλοιώσεων του αγγειακού τοιχώματος με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης. Η ανάδειξη των ελαστικών και κολλαγόνων ινών έγινε με χρώση ορσεΐνης και Sirius Red, αντίστοιχα. Ακολούθησε στο τοίχωμα της φλεβικής αναστόμωσης ανοσοϊστοχημική ανάλυση της έκφρασης της α-ακτίνης και της δεσμίνης των λείων μυϊκών κυττάρων, του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού ki-67, του δείκτη μακροφάγων CD68, του παράγοντα von Willebrand των ενδοθηλιακών κυττάρων και της λαμινίνης. Κατόπιν απομόνωσης ολικού RNA από τον ιστό της σφαγίτιδας και σύνθεσης cDNA, μελετήθηκε η έκφραση mRNA των γονιδίων *VEGFA*, *NOS3*, *EDN1*, *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1*, *TIMP2*, *ICAM1*, *VCAM1*, *FGF2*, *COL1A1* και *COL3A1* με τη μέθοδο της συμβατικής RT-PCR και της ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR).

Αποτελέσματα

Η δημιουργία αρτηριοφλεβικής επικοινωνίας επέφερε σημαντικές ιστομορφομετρικές αλλοιώσεις στη σφαγίτιδα, ειδικότερα πάχυνση του συνολικού τοιχώματος και των επιμέρους χιτώνων της, η οποία ήταν πλέον έντονη στο κέντρο της αρτηριοφλεβικής επικοινωνίας, σε σχέση με τις άλλες δύο τοπογραφικές περιοχές, και επαυξανόταν σταδιακά κατά τη διάρκεια του πειράματος. Σημειώθηκε ακόμη μείωση της περιεκτικότητας των χιτώνων του φλεβικού τοιχώματος σε ελαστίνη, καθώς και αποδόμηση των ινών. Συναρτήσει του χρόνου, βρέθηκε προοδευτική ελάττωση του ποσοστού ελαστίνης στο νεοσυντιθέμενο έσω χιτώνα, όπως και μείωσή του κεντρικά, συγκριτικά με τις άλλες περιοχές της αρτηριοφλεβικής επικοινωνίας σε όλες τις χρονικές φάσεις της μελέτης. Το ποσοστό κολλαγόνου τόσο στο συνολικό τοίχωμα όσο και στους επιμέρους χιτώνες του ήταν αυξημένο, ενώ καταγράφηκε και αποδόμηση των ινών. Αύξηση στο κολλαγόνο των τριών χιτώνων και του συνολικού τοιχώματος σημειώθηκε στην άπω αλλά και στην εγγύς περιοχή συν το χρόνο. Σε όλες τις χρονικές περιόδους που μελετήθηκαν, παρατηρήθηκε αύξηση της περιεκτικότητας στο κέντρο του φλεβικού σκέλους, σε σύγκριση με τις άλλες περιοχές. Επιπρόσθετα, το ποσοστό λείων μυϊκών

κυττάρων του έσω χιτώνα ήταν μειωμένο, ενώ αύξηση του ποσοστού αυτού σημειώθηκε στο μέσο και έξω χιτώνα, και στο συνολικό τοίχωμα. Με την πάροδο του χρόνου, μετρήθηκε μειωμένο ποσοστό κυττάρων στην κεντρική και άπω περιοχή του φλεβικού σκέλους. Μειωμένο ήταν και το ποσοστό κυττάρων της κεντρικής περιοχής, συγκριτικά με εκείνο των άλλων τοπογραφικών θέσεων. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η ινομυϊκή υπερπλασία ήταν εντονότερη στο κεντρικό τμήμα της φλεβικής αναστόμωσης, απέναντι από το μόσχευμα και στο όριο μεταξύ μοσχεύματος και φλέβας.

Αναφορικά με τις μορφομετρικές μεταβολές του αρτηριακού σκέλους, σημειώθηκαν σημαντικές μεταβολές στο πάχος του μέσου και του έξω χιτώνα και του συνολικού τοιχώματος και στις τρεις περιοχές της αναστομωμένης συγκριτικά με την ετερόπλευρη καρωτίδα. Συν τοις άλλοις, η περιεκτικότητα του μέσου και του έξω χιτώνα σε ελαστίνη ελαττώθηκε σημαντικά, ενώ εκείνη του συνολικού τοιχώματος αυξήθηκε, με ταυτόχρονη αποδόμηση των ελαστικών ινών. Βρέθηκε εξάλλου αυξημένη περιεκτικότητα τόσο των επιμέρους χιτώνων όσο και του συνολικού τοιχώματος σε κολλαγόνο, καθώς και αποδόμηση των ινών, ενώ το ποσοστό των λείων μυϊκών κυττάρων ήταν ελαττωμένο στο συνολικό τοίχωμα και τους επιμέρους χιτώνες. Η παρατήρηση παρασκευασμάτων καρωτίδας σε συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με λέιζερ, μέσω του αυτοφθορισμού των ελαστικών ινών, φανέρωσε εκτεταμένη αποδιοργάνωση και θρυμματισμό της έσω ελαστικής μεμβράνης του έσω χιτώνα. Μικρότερου βαθμού ήταν η αποδόμηση των ινών του μέσου και έξω χιτώνα.

Στους τρεις χιτώνες του τοιχώματος του φλεβικού σκέλους παρατηρήθηκε αυξημένο ποσοστό θετικών κυττάρων σε α-ακτίνη συγκριτικά με την ετερόπλευρη σφαγίτιδα. Αυξημένο ήταν επίσης το ποσοστό κυττάρων στον έσω και στο μέσο χιτώνα της εγγύς και της άπω περιοχής, αντίστοιχα, καθώς και στο συνολικό τοίχωμα της κεντρικής περιοχής, σε σχέση πάντοτε με τις λοιπές περιοχές της αναστομωμένης σφαγίτιδας. Με την πάροδο του χρόνου, βρέθηκε αυξημένη πρωτεϊνική έκφραση της α-ακτίνης στον έσω και στον έξω χιτώνα του φλεβικού σκέλους στην εγγύς και στην κεντρική περιοχή, καθώς και στον έσω χιτώνα της άπω περιοχής. Ταυτόχρονα, μετρήθηκε αυξημένη ανοσοϊστοχημική έκφραση της δεσμίνης των λείων μυϊκών κυττάρων στον έσω και στον έξω χιτώνα του φλεβικού τοιχώματος, αλλά μείωσή της στο μέσο χιτώνα, σε σύγκριση με το ετερόπλευρο αγγείο. Σημειώθηκε επιπλέον μειωμένη έκφραση της

δεσμίνης αυξανόμενου του χρόνου, στο κέντρο έναντι των άλλων περιοχών. Ο κυτταρικός δείκτης πολλαπλασιασμού ki-67 βρέθηκε αυξημένος και στους τρεις χιτώνες του φλεβικού σκέλους της αρτηριοφλεβικής επικοινωνίας, με τις μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις να συμβαίνουν στον έσω και στον έξω χιτώνα, ως προς την ετερόπλευρη φλέβα. Τοπογραφικές διαφορές εντοπίστηκαν στους τρεις χιτώνες μεταξύ του κέντρου και των άλλων τμημάτων. Προϊόντος του χρόνου, σημειώθηκε αύξηση του δείκτη ki-67 στον έσω χιτώνα, ενώ μείωσή του παρατηρήθηκε στον έξω χιτώνα της φλεβικής αναστόμωσης.

Η μελέτη της φλεγμονώδους αντίδρασης με χρήση ειδικού αντισώματος έναντι του επιφανειακού δείκτη CD68 αποκάλυψε αυξημένη παρουσία μακροφάγων και στους τρεις χιτώνες του φλεβικού τοιχώματος, με μέγιστη συγκέντρωση αυτών στην κεντρική περιοχή. Ο πληθυσμός των μακροφάγων στους τρεις χιτώνες της εγγύς περιοχής, στο μέσο χιτώνα της κεντρικής περιοχής και στον έσω και στο μέσο χιτώνα της άπω περιοχής ελαττώθηκε από τις 2 στις 12 εβδομάδες. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο σχηματισμός μιας μονοστοιβάδας που αποτελείται από ανοσοθετικά για το δείκτη CD68 κύτταρα κατά μήκος του μοσχεύματος. Η έκφραση mRNA του γονιδίου *NOS3* βρέθηκε μειωμένη συγκριτικά με την έκφραση του ίδιου γονιδίου στην ετερόπλευρη σφαγίτιδα σε όλες σχεδόν τις περιοχές, με μοναδική εξαίρεση την άπω περιοχή. Σημαντικά υψηλότερα ήταν τα επίπεδα mRNA των γονιδίων *ICAM1* και *VCAM1* στην αναστομωμένη από ότι στην ετερόπλευρη φλέβα.

Με την ανοσοϊστοχημική ανάλυση του παράγοντα von Willebrand και τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης mRNA των γονιδίων *EDNI*, *VEGFA* και *FGF2* διερευνήθηκε η βλάβη του ενδοθηλίου και βρέθηκε αυξημένο ποσοστό ανοσοθετικών κυττάρων για τον εν λόγω παράγοντα στον έσω και στον έξω χιτώνα του φλεβικού τοιχώματος. Σημειώθηκε δε αύξηση του ποσοστού αυτού στην κεντρική περιοχή του φλεβικού σκέλους, σε σχέση με τις άλλες περιοχές, συναρτήσει του χρόνου, καθώς και νεοαγγείωση σε αμφότερους τον έσω και τον έξω χιτώνα της αναστομωμένης σφαγίτιδας. Όσον αφορά στα επίπεδα mRNA της ενδοθηλίνης 1 (*EDNI*), αυτά βρέθηκαν αυξημένα στο κέντρο του φλεβικού σκέλους της αρτηριοφλεβικής επικοινωνίας, ως προς τις άλλες περιοχές, με τις διαφορές να διευρύνονται προοδευτικά με την πάροδο του χρόνου. Αξιοσημείωτες μεταβολές παρατηρήθηκαν και στα επίπεδα έκφρασης mRNA του

γονιδίου *VEGFA* στην κεντρική περιοχή σε σχέση με τη θέση και το χρόνο, ενώ μικρότερη ήταν η έκφραση του *FGF2*.

Αναφορικά με τη μελέτη της αποδόμησης της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας στο φλεβικό σκέλος της αρτηριοφλεβικής επικοινωνίας, παρατηρήθηκαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα mRNA των μεταλλοπρωτεασών *MMP2* και *MMP9* και των φυσικών αναστολέων τους, *TIMP1* και *TIMP2*, στην αναστομωμένη έναντι της ετερόπλευρης σφαγίτιδας. Επιπλέον, σημειώθηκε σημαντική αύξηση του mRNA του γονιδίου *MMP2* στην κεντρική περιοχή της φλεβικής αναστόμωσης ως προς τις άλλες περιοχές, η οποία συνοδευόταν από αντίστοιχη μείωση του *TIMP1*, όπως επίσης και αύξηση των επιπέδων έκφρασης του *MMP9* mRNA με παράλληλη μείωση του *TIMP2* mRNA, συναρτήσει του χρόνου. Επίσης, η ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της λαμινίνης έδειξε αυξημένη έκφραση αυτής και στους τρεις χιτώνες του φλεβικού σκέλους, συγκριτικά με την ετερόπλευρη σφαγίτιδα. Η έκφραση της δομικής αυτής πρωτεΐνης βρέθηκε να αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου στον έσω χιτώνα της κεντρικής και στον έξω χιτώνα της άπω περιοχής του φλεβικού σκέλους.

Επιπρόσθετα, διαπιστώθηκε ότι η κατασκευή αρτηριοφλεβικής επικοινωνίας συνοδεύεται από υψηλά επίπεδα έκφρασης mRNA του γονιδίου *COL1A1* και χαμηλή έκφραση mRNA του *COL3A1*. Επίσης, ο λόγος *COL1A1/COL3A1* βρέθηκε αυξημένος στην κεντρική σε σχέση με τις άλλες περιοχές, 2 και 4 εβδομάδες μετά από την τοποθέτηση του μοσχεύματος, ενώ στις 12 εβδομάδες σημειώθηκε αύξηση του λόγου *COL1A1/COL3A1* στην εγγύς περιοχή του φλεβικού σκέλους.

Συμπεράσματα

Η δημιουργία αρτηριοφλεβικής επικοινωνίας με χρήση συνθετικού μοσχεύματος επάγει εκτεταμένη αγγειακή ανακατασκευή, μετανάστευση και πολλαπλασιασμό κυττάρων, νεοαγγείωση, αποδόμηση εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, βλάβη του ενδοθηλίου, ίνωση και ανάπτυξη ινομυϊκής υπερπλασίας με δυσμενείς επιπτώσεις στη βατότητα και λειτουργικότητα του μοσχεύματος. Οι ιστολογικές και βιοχημικές αλλοιώσεις του τοιχώματος στη φλεβική αναστόμωση των συνθετικών αρτηριοφλεβικών μοσχευμάτων λαμβάνουν χώρα καθ' όλη τη διάρκεια των 12 εβδομάδων μετά την τοποθέτηση του μοσχεύματος, ενώ εντοπίζονται πιο έντονες στην κεντρική περιοχή,

αρκετά έντονες στην εγγύς περιοχή, και λιγότερο έντονες στην άπω περιοχή. Οι προκείμενες αλλοιώσεις αυξάνονται με την πάροδο του χρόνου.