

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ, FARMACIE, ȘTIINȚE ȘI TEHNOLOGIE
"GEORGE EMIL PALADE" TÎRGU MUREȘ
ȘCOALA DE STUDII DOCTORALE

Cercetări de chirurgie experimentală în regenerarea tisulară a valvelor cardiace

Rezumatul tezei de doctorat

Conducător științific:

Prof.dr. KLARA BRÎNZANIUC

Doctorand:

Dr. HUSSAM AL HUSSEIN

TÎRGU MUREȘ

2020

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

OBIECTIVE:

Contribuția personală a tezei a fost structurată în 3 capitole, cercetarea experimentală realizată și prezentată în această teză de doctorat, având următoarele obiective: 1) Elaborarea unui ghid de îngrijire preoperatorie și stabilirea protocolului anestezic în chirurgia cardiacă experimentală pe cord deschis, utilizând rasa ovină ca model animal de talie mare; 2) Testarea și descrierea a două tehnici chirurgicale de implantare valvulară în poziție ortotopică la ovine: a) una de implantare valvulară pulmonară în bypass cardio-pulmonar (BCP) pe cord bătând în condiții de normotermie, utilizând ca substituent valvular allografturi decelularizate și respectiv însămânțate cu celule stem autologe derivate din țesut adipos (ADSCs); b) cea de-a doua, tehnica subcoronariană de implantare valvulară aortică în BCP pe cord oprit în condiții de hipotermie, utilizând ca substituent valvular rădăcini aortice ovine decelularizate; 3) Elaborarea unui ghid pentru urmărirea, tratamentul și îngrijirea postoperatorie la ovine; 4) Elaborarea protocolului de evaluare a funcționalității valvei prin ultrasonografie: ecocardiografie transesofagiană (TEE) pentru evaluarea intraoperatorie a valvei pulmonare native, precum și a ecocardiografiei epicardice (ECE) pentru evaluarea valvei implantate; ecocardiografie transtoracică (TTE) pentru evaluarea postoperatorie a valvei implantate și a performanței cardiace, la intervale de timp predefinite (ziua 7 post-op, iar apoi lunar până la data programată a eutanasierii); 5) Stabilirea protocolului de eutanasiere/necropsie; 6) Analiza macroscopică a explantelor valvulare, respectiv histologică (cu rezultate parțiale) pentru evaluarea integrității allograft-urilor pulmonare decelularizate și respectiv însămânțate cu ADSCs; 7) Evaluarea rezultatelor intervenției chirurgicale exprimate prin rata fatalității și rata supraviețuirii în cadrul lotului de animale studiat pe perioada de follow-up de 6 luni, timpii operatorii; 8) Analiza tipului și frecvenței complicațiilor postoperatorii precoce și tardive; 9) Evaluarea tipului de substituent valvular și a vârstei animalului la data operației ca posibili factori de influență asupra ratei de supraviețuire; 10) Evaluarea efectelor circulației extracorporeale asupra homeostaziei organismului ovin.

MATERIAL ȘI METODĂ:

Având în vedere caracterul experimental al temei de cercetare propusă, metodologia după care s-au desfășurat cele trei studii cuprinse în teza de doctorat a fost una complexă, cuprinzând două studii de chirurgie cardiacă experimentală și un studiu experimental observațional. **Studiul nr.1. - "Studiu pilot în implantarea ortotopică de rădăcini aortice decelularizate prin tehnica subcoronariană – modelul ovin"**, a fost un studiu de chirurgie cardiacă experimentală, primul de acest tip din România, în care s-au utilizat două oi de sex feminin (vârsta 25 și respectiv, 26 de luni), cu greutatea corporală de 47 kg și respectiv, 43,5 kg. Ca substituent valvular s-au utilizat rădăcini aortice ovine decelularizate prin metoda descrisă în studiul nr.2. **Prepararea rădăcinii aortice pentru implantare – simulare in vitro**: pentru alegerea celei mai potrivite tehnici chirurgicale, înainte de prima operație am efectuat o simulare *in vitro* cu două rădăcini aortice decelularizate, una dintre ele fiind considerată rădăcina aortică nativă, la care s-a excizat valva aortică, iar cealaltă bioproteza, simulând astfel o implantare de tip *valvă-în-valvă*. **Studiul nr.2. - "Implantarea ortotopică a allograft-urilor pulmonare la modelul animal ovin"**, a fost un studiu de chirurgie cardiacă experimentală care s-a desfășurat în mai multe etape: a) **Selecția și pregătirea animalelor de experiență**: pentru derularea studiului s-au utilizat nouăsprezece oi juvenile și adulte de sex feminin, din rasa "Țigăie" varietatea Ruginie, animalele fiind grupate în două loturi în funcție de substituentul valvular utilizat: Lotul DECELL - animale la care s-a implantat allograft pulmonar decelularizat; și Lotul CELL - animale la care s-a implantat allograft pulmonar decelularizat și însămânțat cu ADSCs. Preoperator animalele au fost evaluate clinic și ecocardiografic prin ultrasonografie transtoracică. Intraoperator s-a efectuat evaluarea ecocardiografică transesofagiană atât a valvei native, cât și a valvei implantate, precum și ecocardiografie epicardică a valvei implantate. Postoperator animalele au fost monitorizate clinic și paraclinic, rezultatele intervenției chirurgicale fiind apreciate prin evaluarea parametrilor clinici și prin ecocardiografie transtoracică periodică, la 7 zile post-op, apoi lunar până la data programată a eutanasierii. După aproximativ 6 luni sau la nevoie, în funcție de starea de sănătate a animalului, oile au fost eutanasiate și necropsiate, iar scaffold-urile implantate anterior au fost examinate macroscopic și histologic. Înainte de eutanasiere, valva implantată a fost evaluată prin ecocardiografie transesofagiană și epicardică. Animalele care au prezentat manifestări de decompensare cardiorespiratorie în perioada de urmărire, au fost sacrificate înainte de data programată. Rezultatele analizei macroscopice ale explantelor au fost analizate atât în funcție de tipul substituentului valvular (valve decelularizate vs. valve însămânțate cu ADSCs), cât și în funcție de vârsta animalului (oi adulte vs. oi juvenile). Având în vedere că la momentul de față încă există probe în lucru la analiza histologică, rezultatele prezentate în teza de doctorat fiind doar parțiale, această parte va fi prezentată împreună cu rezultatele finale ale proiectului, la finalizarea acestuia în primăvara anului 2021. În teză au fost prezentate doar exemple din analiza histologică a unor explante valvulare. b) **Prepararea scaffold-ului biologic**: s-au procurat corduri ovine de la un abator local, provenind de la oi cu greutatea corporală între 30-40 kg, proaspăt sacrificate. S-au disecat și extras rădăcinile pulmonare, ulterior fiind măsurate inelele valvulare pentru a fi corelate cu greutatea animalelor la care urmează a fi implantate, astfel încât să se evite mismatch-ul de valvă. Rădăcinile pulmonare au fost decelularizate printr-un procedeu de perfuzie ciclică, în cadrul unui protocol cu durată de 10 zile. [67,236]. În vederea colectării și izolării de ADSCs utilizate la

însămânțarea valvelor anterior decelularizate s-a recoltat țesut adipos autolog de la ovine, din regiunea interscapulo-vertebrala printr-o intervenție chirurgicală minim invazivă. Intervențiile s-au efectuat în condiții aseptice în sedare ușoară, urmând protocolul descris de Al Hussein și colab. [237]. ADSCs au fost izolate și cultivate *in vitro* prin metoda collagenazei, după metoda descrisă de Zuk (2001) [238] și Gimble (2003) [239]. Ulterior, celulele stem au fost tripsinizate, suspendate în mediu de cultură, și au fost injectate direct în baza cuspisului folosind o seringă cu ac 26G. Însămânțarea externă a scaffold-urilor s-a efectuat cu ajutorul unui aparat de laborator numit „rotator”. Rădăcinile valvulare recelularizate au fost condiționate mecanic în bioreactor, pe parcursul mai multor zile realizându-se expunerea treptată a componentelor valvulare la condiții dinamice, modificând gradual parametrii de funcționare ai bioreactorului, cu creșterea zilnică a presiunilor și frecvenței de perfuzie (până la frecvența de 70/min și presiune de 20/5 mmHg) [236]. Activitățile de preparare a scaffold-ului biologic au fost efectuate împreună cu echipa de cercetare biomateriale și celule stem constituita din Ionela Movileanu, Preda Terezia, Alexandru Chertes, Adrian Man, Ovidiu Cotoi. Această parte a cercetării este tema unei alte teze de doctorat, care va fi prezentată de colega mea, Ionela Movileanu, în prezenta teză, acest capitol fiind descris pe scurt.

Studiul nr.3. - "Rezultate chirurgicale pe termen scurt și mediu în înlocuirea valvulară pulmonară la ovine utilizând allograft decelularizat și însămânțat cu celule stem derivate din țesut adipos", a fost un studiu experimental observațional având ca subiecți cele 19 animale supuse implantării ortotopice de allograft-uri pulmonare decelularizate și respectiv însămânțate cu ADSCs. Numărul de animale ales și termenul de urmărire de 6 luni au fost selectate în baza experienței anterioare a grupului nostru (69 oi operate) și ținând cont de variabilitatea parametrilor principali urmăriți (supraviețuirea animalului și funcționalitatea valvei). Animalele au fost evaluate și monitorizate din punct de vedere clinic atât pre- cât și postoperator pe întreaga perioadă de urmărire. De asemenea, s-au efectuat investigații paraclinice de laborator pre- și intraoperator, precum și în perioada postoperatorie precoce (primele 7-10 zile până la suprimarea cateterului venos central). S-au înregistrat și colectat datele demografice: vârsta și greutatea corporală a animalelor la data achiziției și respectiv la data intervenției chirurgicale; timpii operatori (timpul de anestezie, timpul de BCP, timpul operator total), tipul și frecvența complicațiilor postoperatorii precoce (survenite în primele 7 zile) și respectiv tardive (survenite în primele 30 de zile postoperator); valorile parametrilor obținuți prin gazometrie sanguină intraoperator (pre-BCP, în timpul BCP, post-BCP) și respectiv postoperator (ziua 0 și ziua 7): lactat, pH, hemoglobina (Hgb), hematocrit (Hct), potasiu seric, precum și timpul de coagulare activat (TCA) pre- și post-BCP. Pentru a evalua influența tipului de substituent valvular utilizat asupra ratei de supraviețuire și a frecvenței de apariție a complicațiilor postoperatorii, animalele au fost împărțite în două loturi: a) Lotul DECELL (n=10) – animale la care s-a implantat allograft pulmonar decelularizat; Lotul CELL (n=9) – animale la care s-a implantat allograft pulmonar decelularizat și însămânțat cu ADSCs. Pentru a evalua influența vârstei animalului la data intervenției chirurgicale asupra variabilelor analizate, animalele au fost împărțite în două loturi: a) Lotul OI JUVENILE (n=10) – animale cu vârsta sub 24 de luni la data intervenției; b) Lotul OI ADULTE (n=9) – animale cu vârsta peste 24 de luni la data intervenției. **Analiza statistică:** Analiza statistică a fost efectuată folosind software-ul GraphPad Prism varianta 7.4. Testul Shapiro-Wilk a fost aplicat în vederea determinării distribuției seriilor de date analizate. Pentru comparare de medii și mediane s-a aplicat testul t-Student și testul t-Student cu corecție Welch pentru date nepereche, respectiv testul Mann Whitney. S-a aplicat testul Fisher sau Chi-Pătrat pentru determinarea asocierii între variabilele binare. Rata de supraviețuire pe perioada de follow-up a fost apreciată prin reprezentarea grafică a curbelor de supraviețuire Kaplan-Meier. Rata fatalității a fost calculată ca procentul animalelor decedate înainte de finalizarea perioadei de follow-up raportat la numărul total de animale utilizate în experiment. Pragul de semnificație statistică ales pentru valoarea p a fost de 0,05. Atât procedurile cât și îngrijirea perioperatorie a animalelor experimentale au fost efectuate în conformitate cu "Ghidul pentru îngrijirea și utilizarea animalelor de laborator" și cu Directiva 2010/63/UE a Parlamentului European privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice. Eutanasierea s-a efectuat în conformitate cu Convenția privind experimentele pe animale vertebrate vii și toate normele legale referitoare la protecția și bunăstarea animalelor: Legea nr. 9 din 11 ianuarie 2008 privind protecția animalelor și Decizia nr. 19 din 01 Iulie 2011 adoptată de Consiliul Național al Colegiului Medicilor Veterinari privind „Ghidul pentru eutanasierea animalelor.” Această lucrare face parte dintr-un proiect de cercetare, fiind realizată în conformitate cu protocolul aprobat de către Comisia de Etică din cadrul UMFST „George Emil Palade” din Tîrgu Mureș cu nr. 131/21.10.201

CONCLUZII:

Pe baza rezultatelor obținute în studiile experimentale prezentate în teză, se pot formula câteva concluzii importante: ① Din experiența noastră se pot sublinia câteva aspecte esențiale în practicarea tehnicii subcoronariene de implantare a valvei aortice la modelul ovin, și anume: la practicarea aortotomiei trebuie avut în vedere că incizia prea aproape de joncțiunea sinotubulară va duce la imposibilitatea de fixare a firelor de suspensie comisurale, în timp ce o incizie prea distală, va face intervenția și accesul mai dificile; este esențială excizia completă a valvei native și măsurarea inelului valvular și a joncțiunii sinotubulare, astfel încât se va alege diametrul mai mic pentru valva de implantat (diferența între cele două măsuratori să nu depășească 10%); partea musculară a rădăcinii va fi plasată la nivel non-coronar în aorta gazdă, suturile proximale vor fi plasate în plan orizontal, sutura distală trebuie să respecte ostiumurile coronare cu cel puțin 2-4 mm; atenție deosebită trebuie acordată comisurii dintre cuspa dreaptă și cea non-coronară pentru a evita leziunea fasciculului Hiss; ② Desigur,

experiența chirurgicală în implantarea subcoronariană a unei valve aortice este definitorie nu doar în practica clinică umană ci și în chirurgia experimentală pe modele animale. După atingerea platoului curbei de învățare, rezultatele în ceea ce privește gestionarea diverselor situații apărute intraoperator, a complicațiilor perioperatorii, precum și rata de supraviețuire pot fi mult îmbunătățite; ③ O atenție deosebită trebuie acordată de către personalul implicat în îngrijirea animalelor, dietei preoperatorii, care trebuie atent monitorizată și respectată, o creștere excesivă în greutate, punând în dificultate manevrarea animalelor în timpul diverselor proceduri, și conducând la o recuperare postoperatorie mai lentă. Mai mult, întrucât oile au stomac tetracameral, există riscul stazei gastrice perioperatorii chiar și în contextul dietei, tractul digestiv putând fi sever afectat de intervenția chirurgicală. În același timp, distensia abdominală poate fi prevenită prin mobilizarea corespunzătoare a animalului; ④ Predispoziția oilor la infecții respiratorii este un aspect care poate fi determinat de mediul de proveniență al acestor animale (uneori cu condiții de igienă necorespunzătoare sau chiar mediul natural care le predispune la contaminare). Prin urmare, investigațiile paraclinice preoperatorii (radiografie toracică, exudat nazal, coprocultura, coproparazitologic), precum și tratamentul profilactic antibiotic și antiparazitar pot fi benefice; ⑤ Animalul de experiență trebuie monitorizat zilnic de către o echipă multidisciplinară formată din chirurghi, anesteziști, cardiologi, medici veterinari și tehnicieni, în special în perioada precoce de convalescență. În primele 24 de ore, animalele trebuie monitorizate aproape continuu sau cel puțin până la obținerea stabilității hemodinamice și respiratorii, a stării de conștiență și absenței sângerărilor active. Mai mult, am observat că ridicarea animalului din decubit lateral în decubit ventral, precum și evitarea decubitului dorsal este importantă, mai ales atunci când oile sunt transferate în țarcul de conținție. În cazurile în care această regulă nu a fost respectată s-a observat distensie abdominală cu timpanism care cauzează dificultăți respiratorii; ⑥ Monitorizarea gazometriei arteriale, a hemoglobinei, hematocritului, ionogramei, timpului de coagulare activat, precum și a echilibrului acido-bazic este esențială în perioada perioperatorie. Dificultățile legate de efectuarea tuturor investigațiilor paraclinice perioperatorii care se efectuează în prezent în practica clinică umană fac ca experimentele de acest tip să fie extrem de provocatoare, iar echipa implicată trebuie să fie suficient de bine instruită, astfel încât să acopere întreaga patologie a organismului ovin; ⑦ Mobilizarea timpurie a animalului și reintegrarea în grupul inițial face ca perioada de convalescență să fie una scurtă, de sub o săptămână, permițând animalului să-și recapete comportamentul unui animal neoperat, cu creștere somatică fiziologică. Deoarece oile trăiesc de obicei în turmă, izolarea lor poate conduce la creșterea stresului și a anxietății perioperatorii; ⑧ Deoarece am avut un grup de animalele destul de diversificat ca vârstă, atât tehnica chirurgicală de înlocuire valvulară pulmonară/aortică, cât și protocolul anestezic au fost ajustate în consecință. Protocolul anestezic propus pentru înlocuirea valvulară pulmonară sau aortică în BCP pe cord bătând și respectiv pe cord oprit în condiții de hipotermie la ovine, dar și protocolul de sedare ușoară pentru intervenții minim invazive de recoltare de țesut adipos, este sigur și eficient, asigurând atât sedarea și analgezia adecvată, cât și recuperarea rapidă din anestezie, fără complicații semnificative; ⑨ Tehnica chirurgicală de înlocuire valvulară pulmonară în BCP pe cord bătând la ovine, propusă în studiul nostru, este o tehnică fezabilă, cu complicații chirurgicale minime, mortalitate perioperatorie redusă și rată de supraviețuire satisfăcătoare pe termen scurt și mediu; ⑩ Friabilitatea crescută a țesuturilor și aorta ascendentă scurtă pot conduce la complicații tehnice intraoperatorii și implicit creșterea timpilor operatori. Oile juvenile au prezentat țesuturi de calitate bună, dar incidență mai mare a complicațiilor postoperatorii. Spre deosebire de practica clinică umană, la aceste animale s-a observat o reacție de tip psihotic post-bypass cardiopulmonar, necesitând sedare postoperatorie prelungită și supraveghere mai atentă. În schimb, animalele mai vârstnice au prezentat țesuturi cu friabilitate crescută, precum și comorbidități preoperatorii (pneumopatie, anemie, disbioză intestinală), care au influențat evoluția postoperatorie. Complicațiile postoperatorii trebuie identificate și tratate prompt, deoarece disfuncția oricărui organ poate compromite întregul experiment; ⑪ Intervenția chirurgicală de scurtă durată și implicit timpul redus de bypass cardio-pulmonar, pierderi sanguine minime, precum și extubarea cât mai rapidă sunt variabile care pot fi controlate de echipa chirurgicală. Utilizarea MUF după BCP reduce efectele sindromului inflamator sistemic. Suprimarea canulei arteriale cu hemostaza adecvată la acest nivel, administrarea de protamină și returnul sanguin din circuitul aparatului de circulație extracorporeală prin intermediul canulei venoase, pot minimaliza pierderile sanguine; ⑫ Oile adulte prezintă tendință mai mare spre acidoză metabolică secundară expunerii la circulația extracorporeală (CEC), cu creșterea semnificativă a lactatului sanguin în timpul și imediat după BCP, oile juvenile fiind mai rezistente și mai compliante la CEC, cel mai probabil datorită rezervelor biologice crescute ale organismului ovin tânăr, asemănător comportamentului la rasa umană în aceste situații; ⑬ Sindromul anemic secundar CEC este mult mai exprimat la oile adulte față de cele juvenile, datorită adaptabilității crescute și a capacității mari de regenerare hematogenă a organismului ovin tânăr; ⑭ Regimul de heparinizare propus a asigurat prevenția trombozei în circuitul CEC, iar dozele de protamină utilizate au asigurat antagonizarea eficientă a efectelor heparinei fără sângerări semnificative, raportul heparină:protamină utilizat fiind unul eficient; ⑮ Oile juvenile au un răspuns tardiv mai accentuat la efectele negative ale CEC, fiind mai susceptibile la diferite complicații cardiace și non-cardiace, complicații la care oile adulte sunt mai rezistente. Din acest punct de vedere, oile juvenile reprezintă o alegere mai potrivită pentru studii experimentale acute cu perioadă de urmărire scurtă, spre deosebire de cele adulte care prezintă potențial de supraviețuire mai îndelungată, fiind utile în studii experimentale cronice, după astfel de intervenții chirurgicale; ⑯ Însămânțarea allograft-ului valvular pulmonar cu ADSCs nu influențează semnificativ nici tipul și nici frecvența de apariție a complicațiilor postoperatorii, atât

imEDIATE, cât și tardive; ⑰ Ca și primă constatare din analiza macroscopică a explantelor valvulare, studiul nostru sugerează că efortul de a crea valve regenerate cu celule prin inginerie tisulară *in vitro* poate fi limitat de problemele majore de a menține sterilitatea pe parcursul întregii proceduri, ceea ce ar explica cele trei cazuri de endocardită semnalate. De asemenea, în unele cazuri s-au observat subțieri ale valvulelor chiar în absența endocarditei, ceea ce sugerează că probabil, stabilizarea chimică ar putea conduce la o creștere a rezistenței scaffold-ului; ⑱ Oile adulte au prezentat rezultate superioare față de oile juvenile în ceea ce privește integritatea valvei explantate, indiferent de tipul substituentului valvular utilizat (acelular sau însămânțat cu ADSCs). Rezultatele analizei macroscopice, mai ales în coroborare cu manifestările clinice și frecvența complicațiilor postoperatorii, ar putea sugera că alegerea oilor adulte pentru studii cronice de urmărire este mai potrivită decât utilizarea oilor juvenile.

Până în prezent, tehnicile chirurgicale de înlocuire valvulară pulmonară și aortică practicate pe modelul ovin și descrise în teza de doctorat, au fost primele de acest tip din România, reprezentând un pas important în domeniul regenerării tisulare a valvelor cardiace din țara noastră. Rezultatele noastre sugerează că Ghidul stabilit pentru îngrijirea postoperatorie, urmărirea și tratamentul la ovine după intervențiile chirurgicale pe cord deschis în bypass cardio-pulmonar, precum și protocoalele anestezice și chirurgicale descrise în teza de doctorat, pot ajuta alte echipe de cercetare care lucrează în domeniul regenerării tisulare a valvelor cardiace.