

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

TITLUL TEZEI: STUDIUL CLINIC ȘI IN VITRO AL HEMANGIOAMELOR CUTANATE LA COPIL

Doctorand: Remus N. Vezan

Coordonator științific: Prof. Dr. Ioan Părăian

**Cluj – Napoca
2009**

CUPRINS

CUPRINS.....	1
PARTEA GENERALĂ.....	4
I.1. INTRODUCERE.....	5
I.2. PATOGENEZA	7
I.3. HISTOLOGIE.....	12
I.4. MANIFESTĂRI CLINICE.....	16
I.5. COMPLICAȚII.....	25
I.6. CLASIFICAREA HEMANGIOAMELOR.....	28
I.7. TRATAMENT.....	34
CONTRIBUȚII PROPRII.....	51
II.1. INTRODUCERE.....	52
II.2. IPOTEZA DE LUCRU.....	54
II.3. MATERIALE ȘI METODE.....	56
II.4. REZULTATE.....	59
II.5. DISCUȚII.....	69
III. MODALITĂȚI IMAGISTICE UTILIZATE ÎN DIAGNOSTICUL HEMANGIOAMELOR LA COPIL.....	77
IV. STUDIUL IN VITRO AL HEMANGIOAMELOR CUTANATE	97
IV.1. INTRODUCERE.....	97
IV.2. CONCEPT.....	99
IV.3. PROTOCOL DE LUCRU.....	101
IV.4. MATERIALE ȘI METODE.....	101
IV.5. REZULTATE.....	108
IV.6. DISCUȚII.....	118
V. VASCULOGENEZA ȘI ANGIOGENEZA.....	122
V.1. Introducere.....	122
V.2. Biologie moleculară.....	123
V.3. Markerii tumorali utilizați în studiul hemangioamelor și a angiogenezei.....	129
VI. CONCLUZII	134
VII. BIBLIOGRAFIE	140
ABREVIERI.....	151

I. PARTEA GENERALĂ

I.1. INTRODUCERE

Hemangioamele reprezintă cele mai frecvente tumori vasculare benigne ale copilăriei. Incidența actuală este estimată a fi între 1-3% din numărul nou născuților, și ea poate crește până la 10 % până la vârsta de 5 ani. Incidența hemangioamelor cutanate în primele 3 zile după naștere este raportată a fi cuprinsă între 1.1%-2,6% și tinde să crească până la 8-12% vârsta de 1 lună și 1 an de viață(1). Mulți autori raportează o incidență mult mai crescută în rândul prematurilor. La nou născuții cu greutate la naștere mai mică de 1500 grame incidența hemangioamelor cutanate este raportată în literatura actuală a fi de 15,6% și ea crește odată cu scăderea greutății la naștere, ajungând la 22,9% la nou-născuții cu greutate mai mică de 1000 grame(2). Hemangioamele sunt mult mai frecvente la sexul feminin, într-un raport fete-băieți de 3-1 până la 5-1. De asemenea par a fi mai frecvente la pacienții caucazieni decât la pacienții de culoare, la care se raportează o incidență de maxim 1%. De obicei apariția hemangioamelor în familii este sporadică, dar sunt autori (Blei&colab) (2) care raportează familii în care transmiterea hemangioamelor a fost autozomal dominantă cu o penetranță moderat- crescută a hemangioamelor. În cazul gemenilor univitelini nu există evidențe cu valoare statistică până la ora actuală, pentru a determina un risc probabil.

I.2. PATOGENEZA

Există mai multe ipoteze în lucru în literatura actuală. Cheung & al au raportat două ipoteze de bază prin care se încearcă explicarea dezvoltării hemangioamelor. Prima teorie propune faptul că hemangioamele iau naștere din *recrudescența unor angioblaste embrionice dormante*.

A doua teorie stipulează faptul că hemangioamele ar fi *tumori ale neoangiogenezei*.

Folkman susține că hemangioamele ar reprezenta o *boală non-neoplazică a angiogenezei*.

Cercetarea angiogenezei, cunoștințe îmbunătățite despre clasificarea anomaliilor vasculare la copii, progresul tehnicilor de imagistică, complicațiile recent identificate, și noile abordări terapeutice, cum este tratamentul cu interferon, laser, krioterapia, au adus modificări în înțelegerea acestei probleme a copilăriei și totodată în modul de abordare a ei.(4) Vasculogeneza se referă la procesele prin care precursorii celulelor endoteliale dau naștere la vase de sânge, în timp ce angiogeneza se referă la dezvoltarea noilor vase din vasculatura existentă. Ciclul de viață la hemangioame diferă de cele mai multe tumori prin faptul că hemangioamele au o fază de proliferare rapidă urmată de o involuție spontană. Tehnicile genetice au fost utile în a arăta că controlul angiogenezei și vasculogeneza sunt rar defectuoase în boli vasculare ereditare.(6, 8) Mai mult decât atât, nu există modele animale aplicabile de hemangioame involutive.

I.3. HISTOLOGIE

Aspectul histologic al hemangioamelor diferă în ciclul de viață al unui hemangiom, în funcție de etapele prin care trece. În faza proliferativă hemangioamele prezintă o proliferare a celulelor endoteliale. Aceste celule formează mase sincițiale ce pot forma sau nu lumene vasculare. Pe măsură ce hemangiomul se „maturizează”, apar organizări sub formă de lobuli, separați de septa fibroase, cu număr crescut de vase sangvine. La nivelul ADN-ului celulelor endoteliale în faza proliferativă are loc o fixare crescută a timidinei [H3], demonstrată prin metode imagistice. Numărul mastocitelor este crescut de la 30/camp la 40/camp, comparativ cu hemangioamele în faza de involuție, sau malformațiile vasculare sau tegumentul normal.

I.4. MANIFESTĂRI CLINICE

Hemangioamele sunt clinic heterogene, cu aspectul definit de adâncime, localizare și etapă de evoluție. La nou născut hemangioamele pot apărea ca o maculă palidă cu aspect pseudo teleangiectatic. Pe măsură ce tumora proliferază, ia forma cea mai recunoscută: roșu aprins, ușor elevat, placa necompresibilă. Clasic, hemangioamele prezintă o fază proliferativă timpurie, involuție înceată și în majoritatea cazurilor, rezoluție completă. În cazuri rare, pot să apară ca tumori crescute total la naștere, și aceste hemangioame congenitale se resorb rapid, lăsând adesea semne pronunțate atrofice pe piele. Cu toate că comportamentul secvențial al hemangioamelor este bine cunoscut, e dificil de prezis durata fazelor de creștere și involuție ale unei leziuni individuale. Diagnosticul hemangioamelor se face de obicei prin anamneză și constatările clinice. Uneori însă poate fi dificil de stabilit, mai ales la pacienții cu leziuni congenitale mari și leziuni hepatice. Studiile imagistice ajută la deosebirea malfomațiilor vasculare de hemangioame sau alte procese neoplastice mai agresive.

Ca și mod de prezentare, hemangioamele pot avea aspecte ușor diferite, astfel, pe lângă cele clasice mai pot fi deosebite 4 tipuri: (1) hemangioame profunde, acoperite de tegument normal, cunoscute și ca hemangioame cavernoase, (2) hemangioame maculare, asemănătoare cu hemangioamele în „pată de vin”, (3) hemangioame elevate, cu teleangiectazie, (4) hemangioame cu flux sangvin crescut persistent.

Din cauza că hemangioamele sunt atât de heterogene în apariție, localizare, caracteristici ale creșterii și potențial de complicații, medicii au nevoie de metode precise pentru a le stratifica în categorii de risc minim, mediu și mare. Sunt 5 factori majori care ajută la determinarea prognosticului și al planului terapeutic.

Acești factori sunt: vârsta, localizarea, numărul total de hemangioame, tipul hemangiomului, prezența și sau natura implicării dermice,

Conceptul de „hemangioame sindromice” este unul care a primit atenție crescută în ultimii ani. Anomaliile structurale asociate sunt aproape invariabil asociate mai mult cu hemangioamele structurale decât cu cele localizate.

Cele mai frecvente sindroame ce includ apariția hemangioamelor sau malfomațiilor vasculare sunt: Fenomenul Kasabach-Merritt, Sindromul Parkes-Weber, Sindromul Proteus, Sindromul Sturge-Weber (SWS), Sindromul Maffucci, Sindromul Blue Rubber (Blue rubber bleb naevus syndrome), Teleangiectazia ereditară hemoragică- Osler-Weber-Rendu

I.5. COMPLICAȚII

Majoritatea hemangioamelor regresează treptat și complet fără complicații sau sechele, dar sunt și cazuri ce prezintă complicații asociate, mai ales în faza proliferativă. Aproximativ 10-20% din hemangioame prezintă semne alarmante pentru anumite complicații. (25) Cele mai importante complicații ce pot interveni în timpul „vieții” unui hemangiom sunt ulcerarea, hemoragia, infecția, obstrucția (axului vizual, canalului auditiv, căilor aeriene), insuficiența cardiacă congestivă, deformări scheletale, deformități estetice și cicatrici permanente.

I.6. CLASIFICAREA HEMANGIOAMELOR

În 1996 Societatea Internațională pentru Studiul Anomaliilor Vasculare a adoptat o clasificare care corelează manifestările clinice ale hemangioamelor cu aspectul histologic. Astfel semnele vasculare sunt împărțite în două mari grupe distincte: tumori vasculare și malfomații vasculare. Malfomațiile vasculare pot fi clasificate după fluxul sangvin și tipul vaselor din cadrul tumorii. Este descrisă pe larg clasificarea actuala.

Hemangioamele infantile tipice, apar postnatal, cresc repede și regresează lent. Aproximativ o treime din aceste hemangioame sunt native; majoritatea apar în primele 2 săptămâni, cu toate că tumorile profunde s-ar putea să nu fie observate decât la 2-4 luni de viață. Există cel puțin două mari subgrupe : **RICH** (hemangioame congenitale cu involuție rapidă) și **NICH** (hemangioame congenitale ce nu involuează).

I.7. TRATAMENT

Gestionarea hemangioamelor continuă să fie un subiect considerat controversat. Dacă tratamentul hemangioamelor cutanate mici, superficiale și fără complicații nu ridică probleme, gestionarea hemangioamelor care pot cauza desfigurare permanentă sau pun viața în pericol este mai problematică. În tratamentul acestor tumori, trebuie luați în considerare toți factorii implicați, data apariției, număr, dimensiuni, localizare, alte afecțiuni, sex, prognostic, evoluție, complicații, caracteristici estetice, etc.

Obiective în tratamentul hemangioamelor

- ✓ Prevenirea complicațiilor ce pot pune viața în pericol
- ✓ Prevenirea desfigurărilor permanente și cicatrizările survenite în locul hemangioamelor involuate
- ✓ Minimizarea stresului psihosocial datorat prezenței hemangioamelor, atât la copil cât și la părinți
- ✓ Evitarea terapiei agresive, cu risc cicatrizant, sau toxic la acele hemangioame ce pot avea regresie spontană
- ✓ Prevenirea și tratarea corespunzătoare a hemangioamelor ulcerate, astfel ca cicatrizarea, infecțiile și durerea să fie minime

Modalitățile terapeutice în cazul hemangioamelor cutanate ale copiilor sunt: Corticoterapia, Interferonul, bleomicina, radioterapia, laser terapia, crioterapia, tratamentul local, electrochimioterapie, electrocauterizarea, tratamentul chirurgical.

II. CONTRIBUȚII PROPRII

II.1. INTRODUCERE

II.2. IPOTEZA DE LUCRU

În acest studiu ne-am propus să cuprindem mai multe aspecte ale acestui subiect, și anume hemangioamele cutanate la copil. Astfel, având în vedere că incidența hemangioamelor cutanate în decursul timpului a rămas aceeași, chiar dacă modalitățile de investigație și de tratament s-au îmbunătățit mult în ultimii ani, ne-am propus să realizăm două studii retrospective identice ca structură, în care să urmărim aceeași parametrii legați de hemangioamele cutanate la copil, în centre medicale diferite ca localizare și posibilități terapeutice și să comparăm rezultatele obținute în aceste studii. Astfel ne-am propus să realizăm un studiu retrospectiv în Spitalul Clinic de Copii Cluj-Napoca, Clinica de Chirurgie Pediatrică și un studiu retrospectiv în Departamentul de Chirurgie Pediatrică al Inselspital, Berna, Elveția, studii care să rezume informații adunate în cele două centre pe o perioadă de 5 ani. Am inițiat acest studiu comparativ pentru a înțelege mai detaliat corelațiile clinice între diversele subtipuri de hemangioame, localizarile lor, rata complicațiilor, nevoia de tratament și modalitățile de tratament aplicate. În majoritatea cazurilor diagnosticul hemangioamelor cutanate este relativ facil și ușor de pus. Există însă și situații în care hemangioamele sunt mai

profunde sau cele cutanate sunt însoțite de alte leziuni tumorale profunde, situații în care avem nevoie de mai multe instrumente în vederea realizării unui diagnostic cât mai precis. Asemenea cazuri nu sunt puține și pot pune medicul curant într-o situație mai dificilă. Astfel ne-am propus să realizăm asociat și un studiu al modalităților imagistice de diagnostic, utilizate în diagnosticarea leziunilor tumorale de tip hemangiom în cazul acestor studii retrospective, dar și cele descrise în literatura de specialitate actuală.

Ne-am propus de asemenea să realizăm un studiu *IN VITRO* al hemangioamelor. Împreună cu Domnul Profesor Dr. Zacharias Zachariou, Șeful Departamentului de Chirurgie Pediatrică al Inselspital, Berna, Elveția, ne-am propus să realizăm un model de cultură *in vitro* și să cultivăm țesuturi de hemangiom recoltate de la pacienți tratați în Departamentul de Chirurgie Pediatrică Berna. Pe aceste culturi de celule, putem studia modul de creștere al celulelor *in vitro*, să facem corelații între viteza de creștere a celulelor și faza clinică în care se află hemangiomul (proliferare, involuție) din care s-a recoltat țesutul cultivat.

De asemenea ne-am propus să studiem influența diferiților factori asupra celulelor cultivate, și anume corticosteroizi utilizați la ora actuală ca mijloace terapeutice, factori de creștere. Hemangioamele cultivate pe medii de cultură oferă o bună oportunitate și un foarte bun mijloc de studiu al angiogenezei. Ne-am propus prin acest studiu să studiem factorii care intervin în angiogeneză și eventual să urmărim influența acestor factori de creștere vasculari asupra celulelor endoteliale cultivate pe mediu de cultură, *in vitro*.

II.3. MATERIALE ȘI METODE

Fiecare pacient inclus în acest studiu a fost diagnosticat, tratat sau urmărit în cadrul acestor clinici, examinat de un chirurg pediatru. Au fost incluse doar hemangioamele nou născuților și ai copiilor la prima apariție a hemangiomului, folosind pentru diagnostic toate instrumentele clinice și imagistice necesare și disponibile. S-a folosit baza de date a Departamentului de Chirurgie Pediatrică a Spitalului Insel din Berna. Am alcătuit o listă cu toți pacienții sub 18 ani diagnosticați cu hemangioame cutanate în perioada Ianuarie 2002 – Decembrie 2006. Am folosit de asemenea baza de date a Clinicii de Chirurgie și Ortopedie Pediatrică Cluj-Napoca, Spitalul Clinic de Copii Cluj. Am luat în studiu toți pacienții internați sau tratați în această clinică cu diagnosticul de hemangiom cutanat pe perioada ianuarie 2003 – decembrie 2007. S-au urmărit: localizarea și mărimea leziunilor, vârsta apariției, anomalii asociate, tratament, vârsta gestațională, sexul, mediul din care provine pacientul (rural sau urban), morfologia leziunilor.

II.4. REZULTATE

4.1. REZULTATELE OBȚINUTE DIN ANALIZA FIȘELOR DIN BAZA DE DATE A SPITALULUI INSEL BERNA, ELVEȚIA

Datele care stau la baza acestui studiu au fost luate din dosarele medicale a 131 de pacienți, cu un total de 182 de leziuni. Au fost 86 fete (65,1%) și 45 băieți (34,9%). Din numărul de leziuni, 134 (75,8%) au fost găsite la fete și 48 (24,2%) la băieți. Din 66 de pacienți ale căror dosare medicale conțineau informații despre vârsta gestațională, 21 (31,8%) au fost născuți înainte de 37 săptămâni, (5 mai repede de 30 săptămâni) și media vârstei gestaționale pentru acești pacienți a fost 36,4 săptămâni (mediu 39; între 26 3/7 – 42 săptămâni). Un total de 62,49% din pacienți au prezentat leziuni la naștere în timp ce unui

procent 6,1% le-au apărut leziunile în primele 2 luni de viață. Vârsta medie a primei apariții a unei leziuni este 11,5 luni situându-se în intervalul 2 zile – 60 luni.

Din totalul leziunilor, 47,35% au fost localizate la cap și gât, 35,50% la nivelul feței. Segmentul anatomic cel mai afectat a fost obrazul anterior (8,87%), urmat în ordine descrescătoare a frecvenței de alte părți anatomice: brațe – 14,20%, picioare 12,43%, toracele anterior (9,46%) și cel posterior (4,14%), regiunea lombară și gluteală (7,70%), regiunea genitală și perianală 4,72%.

Din totalul de 131 pacienți cu 182 leziuni, 80 (32 băieți și 48 fete) au beneficiat de o formă de tratament.

4.2. REZULTATELE OBTINUTE DIN ANALIZA FIȘELOR DIN BAZA DE DATE A CLINICII DE CHIRURGIE ȘI ORTOPEDIE PEDIATRICĂ CLUJ-NAPOCA

În perioada ianuarie 2003 – decembrie 2007, în Clinica de Chirurgie și Ortopedie Pediatrică Cluj Napoca au fost internați 242 pacienți cu diagnosticul de hemangiom cutanat. În total cei 242 pacienți au prezentat 253 leziuni tumorale tegumentare. 150 de pacienți au fost de sex feminin, cu un număr de 159 de leziuni tumorale cutanate (hemangioame cutanate) și 92 de pacienți au fost de sex masculin, cu un număr de 94 hemangioame cutanate.

Distribuția leziunilor în funcție de localizare a fost următoarea:

-cel mai afectat segment a fost capul și gâtul, împreună însumând 44,8 % din totalul hemangioamelor cutanate

-toracele a prezentat 15,2 % din totalul leziunilor, în timp ce la nivelul membrelor am regăsit 24,5 % din numărul total de hemangioame cutanate (12,9 % la nivelul membrelor inferioare și 11,6 % la nivelul membrelor superioare)

- în regiunea lombară au fost decrișe 9,7 % din numărul hemangioamelor cutanate

- 5,8 % din hemangioame au fost localizate în regiunea genitală și perianală

Din totalul de 242 de pacienți, în cazul a 221 s-a decis intervenția în cursul evoluției hemangiomului cutanat printr-un mijloc terapeutic, iar în cazul a 21 pacienți s-a decis așteptarea și urmărirea leziunii în vederea involuției spontane. Din cei 221 de pacienți, 165 pacienți au suferit excizia chirurgicală a hemangiomului cutanat, iar la 56 ce cazuri s-a efectuat electrocauterizarea pe ansă metalică, cu regresie lentă a leziunii.

Cele mai des asociate boli la naștere în cele două grupuri au fost prematuritatea, anomaliile cardio-vasculare (defect atrioventricular, suflu sistolic, bradicardie etc), malformații digestive, sindroame genetice.

II.5. DISCUȚII

Gestionarea hemangioamelor rămâne un subiect în dezbatere, planul de tratament trebuie individualizat pentru fiecare pacient și leziune. Am luat în evidență astfel și am analizat fișele a 373 pacienți cu hemangioame cutanate. Am luat în considerare date privind pacientul cum sunt sexul, vârsta gestațională, greutatea la naștere, distribuția și mărimea leziunilor, momentul apariției lor, aspecte morfopatologice, anomalii asociate prezente la naștere și tratamentul administrat sau regresia spontană. Conform cu literatura internațională de specialitate, preponderența sexului feminin este evidentă, respectiv 65,1% (75,8% din numărul de leziuni, raportul leziunilor băieți:fete – 3:1) în studiul retrospectiv efectuat în Berna, și 61,9% (62,8 % din totalul hemangioamelor cutanate) în studiul retrospectiv efectuat în Cluj-Napoca. În același timp am observat că un număr mare de fete nu au necesitat nici o

forma de tratament, regresia spontană fiind raportată la 38 de fete. Putem concluziona că pentru sexul feminin există un risc mai crescut să dezvolte hemangioame cutanate, dar în același timp, șansa regresiei spontane este mai mare la fete.

Din 66 de pacienți majoritatea au fost născuți înainte de termen, 31,8% înainte de 37 săptămâni, și 5 pacienți au fost născuți mai repede de 30 săptămâni. 65% din pacienții ale căror dosare medicale conțineau informații despre greutatea la naștere, aveau greutatea mai mică decât cea normală, 8 pacienți cântărind mai puțin de 1500 g. Nu am găsit un raport proporțional între greutatea la naștere și extinderea leziunilor (cu cât greutatea este mai mică la naștere, cu atât este mai mare numărul de hemangioame cutanate).

Așa cum se descrie și în literatura de specialitate hemangioamele prezintă o predilecție pentru regiunea capului și gâtului, în special aria trigeminală. O cauză ar putea fi persistența arterei trigeminale primitive, care constituie o anastomoză carotido-bazilară. Capul și gâtul au fost cele mai implicate părți, adunând 47,35% din totalul leziunilor.

Rezultatele obținute în studiul retrospectiv efectuat în Clinica de Chirurgie și Ortopedie Pediatrică Cluj-Napoca ne arată că 59,6% din pacienți au provenit din mediul urban și 40,4 % din mediul rural. Preponderența mai mare s-a înregistrat de asemenea în rândul pacienților de sex feminin. 60,74 % din hemangioamele cutanate au fost prezente la naștere, 9,91 % au apărut în primele 2 luni de viață și 29,35 % au apărut până la vârsta de 2 ani. Regiunea anatomică cea mai afectată se dovedește a fi regiunea cefalică, capul și gâtul însumând aproape jumătate (44.8 %) din numărul total de hemangioame cutanate. Pentru 221 de pacienți s-a practicat o formă de tratament, în 56 din cazuri s-a practicat electrocauterizarea hemangiomului cutanat, în una sau mai multe ședințe, iar în 165 de cazuri s-a practicat excizia chirurgicală, în una sau mai multe intervenții în funcție de mărimea leziunii cutanate și localizare. Tratamentul chirurgical rămâne deocamdată cea mai sigură metodă de tratament și opțiunea părinților, deoarece mulți părinți își pierd încrederea în metodele mai puțin invazive care duc la regresia treptată a hemangioamelor cutanate.

III. MODALITĂȚI IMAGISTICE UTILIZATE ÎN DIAGNOSTICUL HEMANGIOAMELOR LA COPIL

III.1. INTRODUCERE

Aplicarea tehnicilor de imagistică moderne au o contribuție majoră la înțelegerea comportamentului acestor leziuni, și realizarea unui diagnostic cât mai precis și precoce.

Investigații radiologice precum radiografia plană (proiectionată), ultrasunete, Doppler eco, sau rezonanță magnetică, precum și investigații convenționale ca venografia sau arteriografia, pot îmbunătăți diagnosticul și realiza o integrare corectă în clasificarea actuală a leziunilor vasculare.

IV. STUDIUL IN VITRO AL HEMANGIOAMELOR CUTANATE

IV.1. INTRODUCERE

Acest studiu s-a desfășurat în cadrul Spitalului de Copii Insel, Berna, Elveția, având ca și Coordonatori Științifici pe domnul Prof.Dr. Ioan Părăian și domnul Prof.Dr. Zacharias Zachariou.

IV.2. CONCEPT

Prin acest studiu ne-am propus să identificăm formațiuni tumorale în diferite stadii de evoluție (proliferare, involuție), să obținem fragmente tumorale prin biopsiere sau excizie, și să cultivăm aceste fragmente tumorale pe medii de cultură in vitro după un model cunoscut.

Astfel putem realiza un studiu amănunțit al comportamentului hemangioamelor, al modului de creștere in vitro și putem face corelații între fazele clinice și gradul de creștere pe mediul de cultură. De asemenea dorim să realizăm un studiu asupra influenței anumitor factori chimici sau fizici asupra celulelor cultivate pe mediul de cultură.

Hemangioamele oferă un model unic de studiu al angiogenezei întrucât sunt tumori vasculare în care angiogeneza este inițial excesiva, urmată de inhibiție și regresie a noilor vase formate. Ne propunem să urmărim această angieneză, și să detectăm anumite aspecte specifice fazelor de proliferare sau involuție și să identificăm factorii implicați în angieneză.

IV.3. PROTOCOL DE LUCRU

Din rândul pacienților care au fost internați și tratați pentru hemangioame cutanate în cadrul Departamentului de Chirurgie Pediatrică al Inselspital Berna, și care au necesitat excizie chirurgicală pentru formațiunea cutanată, din fragmentul excizat am prelevat fragmente tumorale pentru a le utiliza în studiul nostru.

IV.4. MATERIALE SI METODE- Sunt descrise metoda de preparare a mediului de cultură și cultura de celule.

IV.5. REZULTATE

Am obținut rezultate de la 16 pacienți. În cazul pacienților cu hemangiom cutanat caracterizat clinic ca fiind în faza de proliferare, având o creștere marcată în perioada premergătoare exciziei chirurgicale, am constatat că fragmentul recoltat și cultivat in vitro a avut o dezvoltare accentuată, cu proliferare rapidă de celule peritumorale în mediul de cultură, și realizarea unei rețele celulare evidente. La tumorile documentate ca fiind în fază proliferativă, proliferarea celulară s-a observat în medie începând cu ziua a doua de incubație, și a continuat prin realizarea unei rețele celulare peritumorale, până la scoaterea din urmărire.

În cazul tumorilor caracterizate clinic ca fiind în stadiul involutiv sau staționar, care nu au manifestat schimbări în aspect sau dimensiune, sau care au avut o regresie lentă în perioada premergătoare exciziei chirurgicale, am observat o dezvoltare scăzută, și întârziată a celulelor pe mediul de cultură. În unele cazuri creșterea celulară a apărut după 4-5 zile de incubație, iar în alte cazuri nu a avut loc creștere celulară.

IV.5.1. EFECTUL GLUCOCORTICOIZILOR ASUPRA DEZVOLTĂRII HEMANGIOAMELOR IN VITRO

Efectul glucocorticoizilor asupra hemangioamelor *in vitro*. Triamcinolonul și Dexametazona exercită efect inhibitor constant. Metilprednisolonul a avut un efect inhibitor de scurtă durată, după care proliferarea celulară s-a reluat. Betametazona a manifestat un efect variat asupra culturilor celulare, în unele având un efect ușor inhibitor al creșterii celulare, iar în altele nu s-a observat nici o schimbare după aplicarea betametazonei.

IV.5.2. EFECTUL ESTROGENULUI ȘI VEGF ASUPRA PROLIFERĂRII CELULELOR ENDOTELIALE

IV.6. DISCUTII

Prin acest studiu am demonstrat că se poate face o corelație între diagnosticul clinic al hemangioamelor cutanate și dezvoltarea celulelor vasculare *in vitro* pe mediul de cultură. Hemangioamele aflate în faza proliferativă au realizat o dezvoltare accentuată și continuă în mediul de cultură, pe când hemangioamele aflate clinic în faza involutivă au realizat o creștere întârziată, lentă sau absența *in vitro* în mediul nostru de cultură. Formațiunile diagnosticate morfologic ca malformații arterio-venoase, nu s-au dezvoltat pe mediul de cultură utilizat de noi.

Prin acest studiu am reușit să demonstrăm că țesuturile tumorilor vasculare de tip hemangiom pot fi cultivate *in vitro* pe medii de cultură specifice, iar creșterea celulară este relaționată direct de stadiul evolutiv în care se află hemangiomul în momentul recoltării. Hemangioamele proliferative au o activitate celulară intensă, cu expansiunea celulelor endoteliale, și cu tendința de a forma noi vase. În aceste tumori vasculare angiogeneza este activă, reprezentând astfel un model pentru studiul angiogenezei. De asemenea culturile *in vitro* ne permit observarea efectului direct al anumitor factori chimici asupra țesuturilor de hemangiom.

Tratamentul în cazul hemangioamelor cutanate ale copilului rămâne un subiect deschis, iar cercetările în acest domeniu pot aduce în continuare multe beneficii pacienților.

V. VASCULOGENEZA ȘI ANGIOGENEZA

V.1. INTRODUCERE

Dezvoltarea embriologică vasculară implică o serie de evenimente complexe, în timpul cărora celulele endoteliale se diferențiază, proliferază, migrează și se maturează într-o rețea organizată de vase.

V.2. BIOLOGIE MOLECULARĂ

Angiogeneza este rezultatul balanței între factorii care controlează proliferarea și migrarea celulară endotelială și cei responsabili de inhibarea formării vasculare. Factorii de creștere, care stimulează angiogeneza sunt: bFGF- factor de creștere fibroblastic bazic, VEGF- factor de creștere endotelială vasculară, factorul de creștere insulenic 2, TNF- α - factorul de necroză tumorală, interleukina opt -IL-8. Factorii de creștere angiogenetici mai includ inhibitorii tisular metaloproteinaze-TIMP-1, factor de transformare a creșterii- β (TGF- β), interferonul- α , factorul trombocitar-4.

V.3. MARKERI TUMORALI UTILIZAȚI ÎN STUDIUL HEMANGIOAMELOR ȘI ANGIOGENEZEI

- ✓ V.3.1. Asimetric dimetil arginina
- ✓ V.3.2. Expresia p57^{kip2} în hemangioamele infantile
- ✓ V.3.3. TNP-470
- ✓ V.3.4. Integrina $\alpha v\beta 3$ și integrina $\alpha 5\beta 1$

VI. CONCLUZII GENERALE

VII. BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. JACOBS AH, STRAWBERRY H: Hemangiomas: the natural history of the untreated lesion. Calif Med 1957, 8-14.
2. MORORZ B: The course of hemangiomas in children. In Vascular birthmarks: pathogenesis and management Edited by: Ryan TJ, Cheery GW. New York, Oxford University Press, 1987, 141-182.
3. MULLIKEN JB, YOUNG AE: Hemangiomas and Malformations Edited by: Ryan TJ, Cherry GW. Vascular birthmarks: pathogenesis and management, New York, Oxford University Press, 1988, 220-284.
4. CHILLER KG, PASSARO D, FRIEDEN IJ. Hemangiomas of infancy: clinical characteristics, morphologic subtypes, and their relationship to race, ethnicity, and sex. Arch Dermatol 2002, 138, 1567-76.
5. MULLIKEN JB, Diagnosis and natural history of hemangiomas. In: Mulliken JB, Young AE, eds. Vascular birthmarks: hemangiomas and malformations. Philadelphia: WB Saunders, 1988, 41-62.
6. CAVALLOTTI C, D'ANDREA V, MALINOVSKY L, BARTOLO M, TODINI A, MALINOVSKA V, DI MATTEO G: Venous wall ultra-structure in generalized venomegaly. Cor Vasa 1992, 263-272.
7. GOZUACIK D, KIMCHI A, Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. Oncogene 2004, 2891-2906.
8. O'DONNELL J, MILLE-BAKER B, LAFFAN M, Human umbilical vein endothelial cells differ from other endothelial cells in failing to express ABO blood group antigens. J Vasc Res 2000, 540-547.
9. VIKKULA M, BOON LM, CARRAWAY KL, et al. Vascular dysmorphogenesis caused by an activating mutation in the receptor tyrosine kinase TIE2, 1996, 1181-1190.
10. OPITZ JM, GILBERT EF. CNS anomalies and the midline as a "developmental field." Am J Med Genet 1982, 443-455.

CURRICULUM VITAE

NUME: VEZAN V. REMUS NICOLAE

ADRESA: STR. BUCUREȘTI NR. 53 ALBA-IULIA, JUD. ALBA

TEL: 0720 054 541

TEL/FAX: 0364 414 911

E-MAIL: remus_vezan@yahoo.com

DATA NASTERII: 29 OCTOMBRIE 1977, NECASATORIT

NATIONALITATE: ROMANA

STUDII

- 1992-1996** Colegiul National “Horea Closca si Crisan”, Alba Iulia, sectia chimie-biologie
- 1996-2002** Absolvent al Facultatii de Madicina Generala, Universitatea de Medicina si Farmacie “Iuliu Hatieganu” Cluj-Napoca, 9,74

Studii postuniversitare

- 2002-** Absolvent al modulului de Psihopedagogie Medicala, Facultatea de Medicina Cluj-Napoca
- 2004-** Absolvent al Cursului postuniversitar de Chirurgie Vasculara, desfasurat in cadrul Clinicii Chirurgie II, Cluj-Napoca
- 2004-** Absolvent al Cursului postuniversitarde Stomii digestive-Chirurgie si nursing, desfasurat in cadrul Clinicii Chirurgie I, Cluj-Napoca
- 2005-** Absolvent al Cursului postuniversitar “Chirurgia laparoscopica la sugar si copilul mic” desfasurat in cadrul clinicii de Chirurgie Pediatrica Cluj
- 2005-** Absolvent al cursului postuniversitar “Atitudini actuale in tratamentul chirurgical al melformatiilor ano-rectale” , Spitalul “Maria Sklodowska Curie”, Bucuresti
- 2005-** Certificat de participare-Curs postuniversitar “Aspecte in tratamentul fracturilor la copil”, Departamentul de Ortopedie Pediatrica, Spitalul Clinic de Recuperare Cluj-Napoca
- 2006-** Certificat de participare-Curs postuniversitar “Actualitati in chirurgia hipospadiasului”, Clinica de Chirurgie Pediatrica Cluj-Napoca
- 2006-2007** Inmatriculat la Universitatea Berna Elvetia-studii doctorale
- 2007-** Certificat participare- Pediatric Endoscopic Surgery Basic Workshop, Torino, Italia
- 2008-** Absolvent Curs postuniversitar Reflux Vezicoureteral, Istanbul, Turcia
- 2008-** Participant curs Management of Undescended Testis in 2008, Istanbul Turcia

EXPERIENTA PROFESIONALA

- 2008** Doctorand cu frecventa, al Universitatii de Medicina si Farmacie “Iuliu Hatieganu” Cluj, titlul lucrarii “STUDIUL CLINIC SI IN VITRO AL HEMANGIOAMELOR CUTANATE LA COPIL” Conducator stiintific, Prof.Dr.Ioan Paraian
- 2006-2007** Bursa guvernamentala de cercetare cu titlul “Studiul clinic si in Vitro al hemangioamelor cutanate la copil” la Inselspital, Berna, Elvetia
- 2003-2006** Doctorand cu frecventa, al Universitatii de Medicina si Farmacie “Iuliu Hatieganu” Cluj, titlul lucrarii “STUDIUL CLINIC SI IN VITRO AL

HEMANGIOAMELOR CUTANATE LA COPIL” Conducator stiintific,
Prof.Dr.Ioan Paraian

2002-2003 Medic stagiar, in cadrul Clinicii Chirurgie II Cluj Napoca si Clinica Medicala I, Cluj Napoca

2001-2002 Studiu clinic in Cadrul Clinicii Pediatrie II, pentru elaborarea Diplomei de Licenta cu titlul, “Hepatitele cronice cu etiologie dubla la copil”,
Conducator stiintific, Prof.Dr.Nicolae Miu

1997-2002 Stagii clinice anuale in cadrul Spitalului Judetean Alba, Sectia Chirurgie Generala

PUBLICATII

Prim autor:

- **Remus N. Vezan**, Ioan Paraian, Z. Zachariou, Studiul in vitro al hemangioamelor cutanate ale copilariei, Clujul Medical, Vol. LXXXII - nr 1, 2009
- **Remus N. Vezan**, Ioan Paraian, Z. Zachariou –Hemangioamele cutanate la copil- Studiu retrospectiv, Sibiul Medical, Vol. XIX – nr.4, 2008

Co-autor:

- I. Paraian, C. Ordeanu, A. Budusan, **R.Vezan**, Acute Appendicitis in Children: Standard Treatment or Laparoscopic Surgery, 14th Biennial Congress of the Assian Surgical association, 4-6 December 2003, Malaysia, 119.
- I.Paraian, C. Ordeanu, A. Budusan, **R.Vezan**, Laparoscopic Treatment of Hydatid Liver Disease in Children, World Congress of Gastroenterology, 10-14 September 2005, Montreal, Canada, 223
- I. Paraian, Anca Budusan, C. Ordeanu, **R. Vezan**, Difficulties in preoperative diagnosis of Meckel diverticulum: 5 years experience in children, 7th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association, 3-7 September, 2006, Edinburgh, Scotland
- Pediatric Surgery Digest Book, Editor Zacharias Zachariou, Springer 2009, Capitole 44, 45, 46.

CONGRESE INTERNATIONALE

- 8th European Congress of Paediatric Surgery, Torino, Italia, 16-19 Mai 2007
- International Workshop on Hypospadias Surgery, Mannheim, Germania, 13-14 iunie, 2007
- International Congress on Long Esophageal gaps and Short bowel syndrome, Mannheim, Germania, 15-16 iunie, 2007
- XXth International Symposium on Paediatric Surgical Research, Berna Elvetia, 5-6 octombrie 2007

- 9th European Congress of Paediatric Surgery, Istanbul, Turcia, 18-21, 2008

APARTENENTE

- **2009-** Organizatia Non Guvernamentala As2000 Alba Iulia, Proiect: Reintegrarea sociala a copiilor cu handicap.
- **2006-** Membru EUPSA – European Pediatric Surgery Association
- **2004-** Membru al Societatii Romane de Ortopedie si Traumatologie Pediatrica (SOROP)

LIMBI STAINE

Romana	limba materna
Engleza	nivel excelent
Maghiara	nivel excelent
Franceza	nivel mediu
Germana	nivel mediu

HOBBY

Muzica clasica
 Filozofie
 Literatura
 Sah

DOCTORAL THESIS

SUMMARY

**TITLE: CLINICAL AND IN VITRO STUDY OF
CUTANEOUS HEMANGIOMAS IN CHILDREN**

Ph. D. student: Remus N. Vezan
Supervisor: Prof. Dr. Ioan Părăian

Cluj Napoca
2009

CONTENTS	
OVERVIEW	1
GENERAL PART	4
I.1 INTRODUCTION.....	5
I.2 PATHOGENESIS.....	7
I.3 HISTHOLOGY.....	12
I.4 CLINICAL MANIFESTATIONS	16
I.5 COMPLICATIONS	25
I.6 CLASSIFICATION	28
I.7 TREATMENT	33
PERSONAL CONTRIBUTIONS	51
II.1 INTRODUCTION	52
II.2 IPOTHESIS	54
II.3 MATERIAL AND METHODS	56
II.4 RESULTS	59
II.5 DISCUSSIONS	69
III. IMAGISTIC MODALITIES USED IN DIAGNOSIS OF THE CUTANEOUS HEMANGIOMAS IN CHILDREN	77
IV. IN VITRO STUDY OF CUTANEOUS HEMANGIOMAS IN CHILDREN.....	97
IV.1 INTRODUCTION	97
IV.2 CONCEPT	99
IV.3 PROTHOCOL	101
IV.4 MATERIALS AND METHODS	101
IV.5 RESULTS	108
IV.6 DISCUSSIONS	118
V. VASCULOGENESIS AND ANGIOGENESIS	122
V.1 Introduction	122
V.2 Molecular biology	123
V.3 Tumoral markers used in angiogenesis and hemangioma studies	129
IV. CONCLUSIONS	134
VII. BIBLIOGRAPHY	140
ABREVIATIONS	151

I. GENERAL PART

I.1. INTRODUCTION

Hemangiomas represent the most frequent benign vascular tumors in childhood. Actual incidence is estimated to be between 1-3% in newborns and it can grow to 10% until the age of 5. The incidence of cutaneous hemangiomas in the first 3 days after birth is reported in literature between 1.1%-2.6% and it rises to 8-12% in the interval 1 month - 1 year of age. Many authors report an increase in incidence in the pre-terms, and in newborns with the birth weight lower than 1500 g, the incidence is reported to be 15,6 %, and the percent is rising with lowering the birth weight, until 22.9% in newborns with weight 1000 g. Hemangiomas are more frequent in girls, the report girls-boys is 3-1 to 5-1. Hemangiomas are more frequent in Caucasian patients. Usually the hemangiomas have no genetic transmission, but there are authors who report an autosomal dominant transmission with a moderate-high penetrance. In the univitelin twins there is no evidence for a probable risk.

I.2. PATHOGENESIS

There are more hypotheses in actual literature. Cheung & colab. reported two hypotheses that try to explain the pathogenesis of the hemangiomas. First theory presumes that hemangiomas are formed from dormant embryonic angioblasts recrudescence. According to the second theory, hemangiomas are tumors of neoangiogenesis. Folkman and colab says that hemangiomas are non neoplastic tumors of angiogenesis. Angiogenesis research, better classification of the vascular anomalies, imaging techniques improvements, new therapeutic approach like interferon, laser, kriotherapy, all have as result a better understanding of the behavior of the cutaneous hemangiomas of childhood. Vasculogenesis involves all the processes that new blood vessels are formed from endothelial cells precursors, while angiogenesis involves the process of forming the new blood vessels from the existent vascular network. The hemangiomas life cycle is different from other tumors, presenting one rapid, proliferating period, followed by a slow spontaneous involution period. Genetic techniques have been useful in showing that the regulation of angiogenesis and vasculogenesis is defective in rare hereditary vascular disorders. Moreover, there are no applicable animal models of involuting hemangiomas.

I.3. HISTOLOGY

Histological aspect of hemangiomas differs according to the life stage. In the proliferative phase, hemangiomas present an endothelial cells proliferation. Endothelial cells form syncytial masses which can take vascular shape. As the hemangioma matures, there is an organizing in lobular masses, separated by fibrous septa with a high number of blood vessels. At endothelial cells DNA level, in proliferative phase there is a high thymidine fixation, demonstrated with imaging methods. Mastocyte number is from 30-40/field, comparing with involuting hemangiomas or vascular malformations.

3.1 Mesenchymal stem cells and adipogenesis in hemangiomas involution

I.4. CLINICAL MANIFESTATIONS

Hemangiomas are clinically heterogeneous, with their appearance dictated by the depth, location, and stage of evolution. In the newborn, hemangiomas may originate as a pale spot with thread-like telangiectases. As the tumour proliferates, it assumes its most recognizable form: a bright red, slightly elevated, noncompressible plaque. Hemangiomas that

lie deeper in the skin are soft, warm masses with a slightly bluish color. Frequently, hemangiomas have both superficial and deep components. They are usually solitary, but as many as 20 percent of affected infants have multiple lesions. In rare cases hemangiomas can show as a completely grown tumour at birth, tumours which will show a rapid involution in the months following the birth, but having important landmarks. Even the sequential action is well known, the period of growing or involution phases are difficult to predict. The diagnosis is usually made by anamnesis and clinical aspects. Imaging studies usually help to differentiate the hemangiomas tumours and the vascular malformations, or other neoplastic processes. There are usually four type of hemangima presentation: 1. Profound hemangiomas, covered by more or less norm al skin, also known as cavernous hemangiomas, 2. Macular hemangiomas, or wine-stain 3. Elevated hemangiomas, with teleangiectasia, 4. Hemangiomas with persistent high flow. Because hemangiomas are very heterogenous in appearance, localisation, characteristics and complications, often doctors need precise methods for classification in different categories with minimal, medium of high risk. There are five major factors that help to determine the prognostic and therapeutic plan: age, localisation, number of tumours, hemangiomas type, dermal implication.

The syndromic hemangioma concept became more important in the last years. Structural anomalies are almost always associated with segmental hemangiomas.

The moust frequent syndromes that include cutaneous hemangiomas of vascular malformations are: Kasabach-Merritt Syndrome, Proteus Syndrome, Parkes-Weber Syndrome, Sturge-Weber Syndrome, Maffucci Syndrome, Blue Rubber bleb naevus Syndrome and Osler-Weber-Rendu teleangiectasia.

I.5. COMPLICATIONS

Majority of hemangiomas involuate slow but complete widout any complication or important landmark, but there are a small percent of hemangiomas, especially in proliferative phase, which can develop few unwanted complications. A rate of 10-20% hemangiomas can be alarming for serious complications. Most important complications that can develop in a hemangioma life time are: ulceration, bleeding, infection, visual or airways obstruction, cardiac failure, skeletal deformities, esthetic deformities or permanent scars.

I.6. HEMANGIOMAS CLASSIFICATION

In 1996, International Society for the Study of Vascular Anomalies, enact a new classification, in which correlations between clinical manifestations and histologycal aspects are made. Vascular anomalies are divided in two distinct groups: vascular tumours and vascular malformations. Vascular malformations can be classified, using the blood flow and the blood vessels type. The actual classification is described.

The classic infantile hemangioma appears as a vascular stain or small vascular papule at birth or during the first two weeks of life. Following its growth phase it reaches its peak size at 10-14 months of age and a than slow involution phase occurs over many months to years. There are hemangiomas than can't be seen until 2-4 months after birth. Ther are two main groups of congenital hemangiomas: RICH (rapidly involuting congenital hemangiomas) and NICH (non involuting congenital hemangiomas).

I.7. TREATMENT

Hemangiomas treatment is still an open subject. If small, superficial hemangiomas management is usually without complications, there are an important number of cases in

which hemangiomas can be life threatening or with some important complications, and the treatment and management is still controversial. The most important factors in hemangioma treatment are: date of first appearance, number of lesions, dimension, localization, associated anomalies.

The objectives of hemangioma's treatment

- ✓ To prevent the complications that may be life threatening
- ✓ Prevention of permanent disfigurement and the scarrings that occur in the places of the involuted hemangiomas
- ✓ Minimizing the psychosocial stress of children and their parents which is present due to the existence of the hemangiomas
- ✓ Avoidance of the aggressive therapy with scarring or toxic risk, at the hemangiomas that can have a spontaneous regression
- ✓ The prevention and proper treatment of the ulcerated hemangiomas, in order to minimize the scarring, infections and pain.

Therapeutic methods for the treatment of children's hemangimas are: Corticotherapy, Intherperon, Bleomycine, Radiotherapy, Laser therapy, Cryotherapy, Local treatment Electrochimiotherapy, Electrocauterisation, Surgical treatment

II. OWN CONTRIBUTIONS

II.1. INTRODUCTION

II.2. WORK HYPOTHESIS

In this study we want to cover as many aspects of the cutaneous hemangiomas in children, as possible. Considering that the incidence of the hemangiomas remained the same over time, even if the investigation and treatment methods have improved a lot in the late years, we decided to effectuate two retrospective studies, gathering informations from the last 5 years. The studies are identical as structure, but are conducted in two clinics different as location, with different therapeutical possibilities. One of the clinics is the Children's Hospital, Pediatric Surgery Department Cluj Napoca, Romania and the other is Children's Hospital, Pediatric Surgery Department Bern, Switzerland.

We have initiated this comparative study in order to better understand the clinical correlations between different subtypes of hemangiomas, their localization, complications rate, the need and methods of treatment used and the outcome of each type of treatment used.

In most of the cases, the diagnosis of cutaneous hemangiomas is easy to establish. There are also situations when the hemangiomas are deeper or when the cutaneous hemangiomas are accompanied by other deep tumoral lesions, and this is the case when we need more intruments in order to establish the precise diagnosis. These cases are not isolated, and they can be a challenge for the doctor.

We will analyze in the same time the imagistic methods of diagnosis, used in the diagnose of the hemangiomas from our retrospective study, but also the methods mentioned in the specialty literature and latest articles.

Together with Proffesor Dr. Zacharias Zachariou, the Head of the Pediatric Surgery Department at Inselspital Bern we have also realized an IN VITRO study of the hemangiomas, and to grow tissues of hemangiomas that were surgically removed from the children treated at Inselspital in Bern. On this cultures of cells we can observe and analyze the

way they grow, in order to make correlations between the growing speed of the cells and the clinical phase of the hemangioma from which the cells were taken (proliferation, involution).

We also want to analyze the influence of different factors on the cultivated cells, more exactly the action of the corticosteroids used now as a therapeutical mean. The hemangiomas cultivated *in vitro* offer a good opportunity and a very good mean of studying the angiogenesis. Conducting this study we want to analyze the factors that intervene in angiogenesis and eventually to follow their influence, as vascular growing factors, on the endothelial cells cultivated *in vitro*.

II.3. MATERIALS AND METHODS

Using the Inselspital Bern, Pediatric Surgery Departments medical record database for the period between January 2002 and December 2006, and Pediatric Surgery Department in Cluj Napoca medical records for the period January 2003 December 2007, we compiled a list with all the patients under 18 years admitted or diagnosed with cutaneous hemangioma. All available charts were retrieved and reviewed. Information regarding birth, sex, gestation age (reported full-term births were analyzed as being of 40 weeks' gestation), weight, associated anomalies, morphology of lesions, therapy was obtained. Each patient included in this study was admitted or diagnosed in our clinic, examined by pediatric surgeon. Only hemangiomas of infancy were included, using clinical and imagistic criteria when necessary. Photographs of individual lesions or written descriptions were used to map each lesion. Treatments, either alone or in combination, included observation, systemic or local therapies with steroids, oral antibiotics, laser treatments, embolisation, kryotherapy, surgical excision.

II.4.1. RESULTS FROM INSELSPITAL BERN MEDICAL RECORDS

Our data were drawn from the records of 131 patients, with a total of 182 lesions. There were 86 girls (65,1%) and 45 boys (34,9%). From the number of lesions, 134 (75,8%) were found at girls and 48 (24,2 %) at boys. Of 66 patients whose charts revealed information about gestational age, 21 (31,8%) were born before 37 weeks,(5 earlier than 30 weeks) and the overall mean gestational age for these patients was 36,4 weeks (median 39; range 26 3/7 – 42 weeks). From the total of lesions, 47,35% were localized at head and neck, 35,50% at face level. The most commonly involved anatomic segment was anterior cheek (8,87%), followed in order of decreasing frequency by another anatomic parts : arms – 14,20%, legs 12,43%, anterior (9,46%) and posterior (4,14%) thorax, lumbar and gluteal 7,70%, genital and perianal region 4,72%. From the total of 131 patients with 182 lesions, 80 (32 boys and 48 girls) received some form of treatment. Systemic therapy (steroids) was used in 2 patients, laser treatment was applied at a number of 23 patients, kryotherapy was used at 38 patients, surgical excision 43 patients, embolization 2, coagulation 1 patient. 19 patients needed associated therapy, steroids followed by surgical excision in 2 cases, kryotherapy and surgical excision, laser and surgical excision or kryo+laser+surgical excision. 51 of patients didn't need any kind of treatment, they were followed up until totally spontaneous regression. 32,8% from patients required surgical excision for at least one of the hemangiomas, 17,55% from the patients needed one or more sessions of laser therapy and 21,37% needed at least one session of kryotherapy.

II.4.2. RESULTS FROM PEDIATRIC SURGERY DEPARTMENT CLUJ NAPOCA MEDICAL RECORDS

Our data were drawn from the records of 242 patients, with a total of 253 lesions. From the number of lesions, 150 were found at girls and 92 at boys. The most commonly involved anatomic segment was head and neck (44,8%), followed in order of decreasing frequency by another anatomic parts : thorax 15,2%, legs 12,9%, arms 11,6%, lumbar region 9,7%, genital and perianal region – 5,8%. From the total number of cases, 221 received some form of treatment and in 21 patients spontaneous involution occurred. For 165 patients surgical excision was made, and in 56 patients electrotherapy was applied for cutaneous lesions. Most associated disease at birth where prematurity, cardio-vascular anomalies (atrioventricular defect, systolic suflu, bradycardly etc), digestive malformations, genetic syndromes.

II.5. DISCUSSIONS

The management of hemangiomas remains a subject of controversy, treatment plan needs to be individualized for each patient and each lesion. Our study, which retrospectively gathered information on 373 infants with 182 hemangiomas affirms previously reported information regarding sex, age of onset, gestational age, birth weight distribution, lesions size, morphologic aspects, associated abnormalities to birth and treatment applied or spontaneous regression. Without being a criteria of inclusion in our study, all of the 131 patients were Caucasians. The age range was 0-14 years. According with the actual international literature, the preponderance of the feminine sex was much higher, respectively 65,1% (75,8% from lesions, lesional raport girls:boys-3 :1). In the same time we observed that a higher percent of girls did not need any kind of treatment, the spontaneous regression being observed in a number of 38 girls. We can conclude that the feminine sex has a higher risk to develop a cutaneous hemangioma, but in the same time, the chance of spontaneous regressions is higher at girls. The gestational age plays an important role in the history of the patient with cutaneous hemangioma. From 66 patients most of them were born before term, 31,8% before 37 weeks, and 5 patients were born earlier than 30 weeks. 65 % from the patients whose charts revealed information about birth weight had a birth weight lower than normal, 8 patients with a weight lower than 1500 g. We did not find a proportionality raport between birth weight and lesional extension (lower the birth weight, bigger number of cutaneous lesions). According to the literature hemangioma show a relative predilection for the head and neck region, especially the trigeminal area. A cause of this could be the persistence of the primitive trigeminal artery, which constitutes a carotide-basilar anastomosis. The head and neck were the most involved body parts, gathering 47,35 from the total of lesions. Most affected anatomic segment is anterior cheek. Hemangiomas on the face can be disfiguring and may interfere with visual development or cause obstruction of the airways reason for what its need a special attention, and a focused treatment on each lesion the risks and benefits of treatment should be weighed carefully. From the charts revealed from Pediatric Surgery Department in Cluj Napoca, we conclude that 59,6% of patients were city side, and 40,4% were country side. 60,74% of hemangiomas were present at birth, 9,91% occurred in first 2 months of life and 29,35% occurred until the age of two. Most affected anatomic segment is head and neck, summing almost half of the total number of cases.

Surgical treatment is the most effective way of treatment for cutaneous hemangiomas, and the first choice of parents, if all the options are not well understood by the parents, or explained well by the doctor. Laser therapy is very useful for superficial and also for the deeper cavernous or mixed hemangiomas.

III. IMAGING MODALITIES USED IN HEMANGIOMA DIAGNOSIS IN CHILDREN.

III.1. INTRODUCTION

The application of modern imaging techniques has a major contribution to the understanding and accurate diagnosis of hemangioma lesions. The radiological techniques like projectional radiography, ultrasound, Doppler, magnetic resonance imaging, computed tomography, venography and arteriography are all described. Accurate diagnosis and classification of hemangiomas and vascular malformations is essential for prediction of outcome and rational therapeutic intervention.

IV. IN VITRO STUDY OF CUTANEOUS HEMANGIOMAS

IV.1. INTRODUCTION

This study took place in Inselspital Bern, having as supervisors Prof. dr. Zacharias Zachariou and Prof. dr. Ioan Paraiian.

IV. CONCEPT AND METHODS

This study aims to perform a new approach for the medical therapeutics applied in child cutaneous hemangioma. From the patients treated in the Clinic of Pediatric Surgery in Inselspital Bern, we will choose certain representative cases according to a settled protocol. We will make serial biopsies of the removed tumoral vessel fragments that will be cultivated in vitro, on special culture medium. The study follows:

- the development and evolution of the hemangiomas tissue in vitro
- the angiogenesis and the process of neovascularization formation
- the influence of different chemical and physical factors upon the hemangioma evolution

possibilities of angiogenesis influencing and control and the possibility to apply it in other affection.

The medium preparation method and cells culture method are described.

IV.5. RESULTS

There are presented the results obtained after using hemangioma biopsies from 16 patients. At the patients with proliferating hemangioma, the in vitro cells has showed a accentuated growth in culture. The tissue obtained from a tumour, clinically characterized as involuting hemangioma, has showed a poor growth in vitro culture, or no cell has grown in our culture model. The proliferating hemangiomas start growing in vitro from the second day, and continued until the tissue was removed from the study.

IV.5.1. GLUCOCORTICOIDS EFFECT ON IN VITRO HEMANGIOMA TISSUE

Glucocorticoids as Triamcinolon and dexametasone exert a constant inhibitory effect on hemangioma tissue in vitro. Methylprednisolone has a short inhibitory effect, followed by normal proliferation. Bethametasone exert a various effect on culture cells, some of them having a short period of involution, while others didn't change their behavior.

IV.5.2. ESTROGEN AND VEGF EFFECT ON IN VITRO HEMANGIOMA TISSUE

The vasculogenetic effect of VEGF and Estrogen is described.

IV.6. DISCUSSIONS

In this study we demonstrated that correlation between clinical stage and in vitro behavior can be made. Clinical diagnosis correlates to in vitro vessel proliferation. Proliferating hemangioma tissue has a accentuated growth in vitro on the culture model used by us. Involuting hemangioma tissue had a slow or didn't show vessel proliferation in vitro. Lesions diagnosed as arterio-venous malformations, have no vessel proliferation in vitro. We have showed with this study that tissues like hemangiomas can be cultivated in vitro on a specific medium, and cellular growth is directly correlate with the clinical stage. Proliferative hemangiomas have a intensive cell activity, with endothelial cells expansion and tendency of forming new vessels. These tumours have an active angiogenetic process, being a good model for the study of angiogenesis. In vitro studies give us the opportunity to study the influence of different chemical and physical factors on hemangioma cells.

V. VASCULOGENESIS AND ANGIOGENESIS

V.1. INTRODUCTION

Vascular embryologic development imply a sum of some complex events, and the differentiation, proliferation, migration and maturation of endothelial cells, which will form a organized vascular network.

V.2. MOLECULAR BIOLOGY

Angiogenesis is the result of the balance between growing factors, and factors responsible for endothelial cell migration, and vascular inhibition. The growing factors which have an important function in angiogenesis are b-FGF - basic fibroblastic factor, VEGF- vascular endothelial growing factor, IGF-II - insulinic growing factor 2, TNF- α , tumoral necrotic factor, IL-8. Growing factors also include tissue metalloproteinase inhibitors – TIMP-1, TGF- β , transforming growing factor- β , α -interpherone, and platelet factor 4.

V.3. TUMORAL MARKERS USED IN HEMANGIOMAS AND ANGIOGENESIS STUDY

- ✓ V.3.1. Asimetric dimetil arginine
- ✓ V.3.2. Expression of p57^{kip2} in infantile hemangiomas
- ✓ V.3.3. TNP-470
- ✓ V.3.4. α v β 3 α 5 β 1 Integrins

VI. GENERAL CONCLUSIONS

VII. SELECTIVE BIBLIOGRAPHY

1. JACOBS AH, STRAWBERRY H: Hemangiomas: the natural history of the untreated lesion. Calif Med 1957, 8-14.
2. MORORZ B: The course of hemangiomas in children. In Vascular birthmarks: pathogenesis and management Edited by: Ryan TJ, Cheery GW. New York, Oxford University Press, 1987, 141-182.
3. MULLIKEN JB, YOUNG AE: Hemangiomas and Malformations Edited by: Ryan TJ, Cherry GW. Vascular birthmarks: pathogenesis and management, New York, Oxford University Press, 1988, 220-284.
4. CHILLER KG, PASSARO D, FRIEDEN IJ. Hemangiomas of infancy: clinical characteristics, morphologic subtypes, and their relationship to race, ethnicity, and sex. Arch Dermatol 2002, 138, 1567-76.

5. MULLIKEN JB, Diagnosis and natural history of hemangiomas. In: Mulliken JB, Young AE, eds. Vascular birthmarks: hemangiomas and malformations. Philadelphia: WB Saunders, 1988, 41-62.
6. CAVALLOTTI C, D'ANDREA V, MALINOVSKY L, BARTOLO M, TODINI A, MALINOVSKA V, DI MATTEO G: Venous wall ultra-structure in generalized venomegaly. Cor Vasa 1992, 263-272.
7. GOZUACIK D, KIMCHI A, Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. Oncogene 2004, 2891-2906.
8. O'DONNELL J, MILLE-BAKER B, LAFFAN M, Human umbilical vein endothelial cells differ from other endothelial cells in failing to express ABO blood group antigens. J Vasc Res 2000, 540-547.
9. VIKKULA M, BOON LM, CARRAWAY KL, et al. Vascular dysmorphogenesis caused by an activating mutation in the receptor tyrosine kinase TIE2, 1996, 1181-1190.
10. OPITZ JM, GILBERT EF. CNS anomalies and the midline as a "developmental field." Am J Med Genet 1982, 443-455.

KEY WORDS: HEMANGIOMAS, PEDIATRIC SURGERY, IN VITRO, RETROSPECTIV STUDY

CURRICULUM VITAE

FIRST AND LAST NAME: REMUS NICOLAE V. VEZAN

PERMANENT ADDRESS: 53TH BUCHAREST STREET, ALBA-IULIA, JUD. ALBA, 510118

TELEPHONE NO: 0720 054 541

TELEPHONE/FAX: 0364 414 911

E-MAIL: remus_vezan@yahoo.com

BIRTHDAY: 29 OCTOBER 1977

NATIONALITY: ROMANIAN

STUDIES

1992-1996 “Horea Closca si Crisan” National High School of Alba Iulia, major: Chemistry - Biology

1996-2002 Graduate of the Faculty of General Medicine, “Iuliu Hatieganu” University of Medicine and Pharmacy of Cluj-Napoca, graduation average grade: 9,74

Postuniversity studies

2002- Graduate of the Department of Medical Psychopedagogy, Faculty of Medicine of Cluj-Napoca

- 2004-** Graduate of the Post-Graduate Training Course of Vascular Surgery, held by the Clinic of Surgery No. 2 of Cluj-Napoca
- 2004-** Graduate of the Post Graduate Training Course of Digestive Stoma - Surgery and nursing, held in the Clinic of Surgery I, Cluj-Napoca
- 2005-** Graduate of the Post Graduate Course “Laparoscopic surgery in infant and small child” held in the Clinic of Paediatric Surgery of Cluj
- 2005-** Graduate of the Post Graduate Course “Current approaches in the surgical treatment of anal-rectal malformations”, “Maria Sklodowska Curie” Hospital of Bucuresti
- 2005-** Attendance Certificate in the Post Graduate Course “Aspects in the fractures treatment on child”, Department of Paediatric Orthopaedics, Clinical Hospital for Recovery of Cluj-Napoca
- 2006-** Attendance Certificate in the Post Graduate Course “News in the hypospadias surgery”, Clinic of Paediatric Surgery of Cluj-Napoca
- 2006-2007** Matriculated in University of Bern, Switzerland, doctoral studies
- 2007-** Attendance Certificate - Pediatric Endoscopic Surgery Basic Workshop, Turin, Italy
- 2008-** Attendance Certificate Reflux Vezicoureteral, Istanbul, Turkey
- 2008-** Attendance Certificate Management of Undescended Testis in 2008, Istanbul, Turkey

WORK EXPERIENCE

- 2008** Full time doctoral student, at the “Iuliu Hatieganu” University of Medicine and Pharmacy of Cluj, thesis title: “CLINICAL AND IN VITRO STUDIES OF THE CUTANEOUS HAEMANGIOMA ON CHILD”
Scientific Co-ordinator, Prof. Ioan Paraian, M.D
- 2006-2007** Governmental research scholarship (10 monts), Inselspital, Bern Switzerland, doctoral research, Thesis title: “Clinical and in vitro studies of the cutaneous hemangiomas on child”
- 2003-2006** Full time doctoral student, at the “Iuliu Hatieganu” University of Medicine and Pharmacy of Cluj, thesis title: “CLINICAL AND IN VITRO STUDIES OF THE CUTANEOUS HAEMANGIOMA ON CHILD”
Scientific Co-ordinator, Prof. Ioan Paraian, M.D
- 2004-** Member of the Romanian Association of Orthopaedics and Paediatric Traumatology (SOROP)
- 2002-2003** Physician in the apprentice period within the Hospital of Surgery No. 2 of Cluj Napoca and Medical Hospital No.1 of Cluj Napoca
- 2001-2002** Clinical internship within the Hospital of Paediatrics No. 2, for the university graduation project entitled: “Chronic hepatitis with double etiology on child”, Scientific co-ordinator: Prof.Nicolae Miu, M .D.

1997-2002 Annual clinical internship performed in the County Hospital of Alba,
Department: General Surgery

PUBLICATIONS

Prim autor:

- **Remus N. Vezan**, Ioan Paraian, Z. Zachariou, In vitro study of cutaneous hemangiomas of infancy, Clujul Medical, Vol. LXXXII - nr 1, 2009
- **Remus N. Vezan**, Ioan Paraian, Z. Zachariou – Cutaneous hemangiomas of infancy-retrospectiv study, Sibiul Medical, Vol. XIX – nr.4, 2008

Co-autor:

- I. Paraian, C. Ordeanu, A. Budusan, **R.Vezan**, Acute Appendicitis in Children: Standard Treatment or Laparoscopic Surgery, 14th Biennale Congress of the Asian Surgical association, 4-6 December 2003, Malaysia, 119.
- I.Paraian, C.Ordeanu, A.Budusan, **R.Vezan**, Laparoscopic Treatment of Hydatid Liver Disease in Children, World Congress of Gastroenterology, 10-14 September 2005, Montreal, Canada, 223
- I. Paraian, Anca Budusan, C. Ordeanu, **R. Vezan**, Difficulties in preoperative diagnosis of Meckel diverticulum: 5 years experience in children, 7th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association, 3-7 September, 2006, Edinburgh, Scotland
- Pediatric Surgery Digest Book, Editor Zacharias Zachariou, Springer 2009, Chapters 44, 45, 46.

INTERNATIONAL CONGRESSES

- 8th European Congress of Paediatric Surgery, Torino, Italia, 16-19 May 2007
- International Workshop on Hypospadias Surgery, Mannheim, Germany, 13-14 iunie, 2007
- International Congress on Long esophageal gaps short bowel syndrome, Mannheim, Germany, 15-16 iunie, 2007
- XXth International Symposium on Paediatric Surgical Research, Berne, Switzerland, 5-6 octombrie 2007
- 9th European Congress of Paediatric Surgery, Istanbul, Turkey, 18-21, 2008

AFFILIATION

- **2009**-Non Government Organization As2000 Alba Iulia, voluntary, Project: Social reintegration of mentally retarded children
- **2006**- EUPSA Member - European Pediatric Surgery Association

- **2004-** SOROP Member – Romanian Paediatric Surgery and Orthopedic Association

FOREIGN LANGUAGES

Romanian	maternal language
Hungarian	proficiency
English	proficiency
French	intermediate
German	beginner

HOBBY

Classical music
Philosophy
Literature
Chess