
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Modificări patologice la nivelul peretelui aortic dilatat anevrismal

Doctorand **Vasile-Aurelian Săsărman**

Conducător de doctorat Prof.Dr. **Aurel Andercou**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Stadiul actual al cunoașterii	19
1.1 Aneurismul aortei abdominale	19
1.1.1. Aspecte generale	19
1.1.2. Semnificație istorică	20
1.1.3. Epidemiologie	20
1.1.4. Fiziopatologia aneurismului de aortă abdominală	20
1.1.5. Factori de risc	23
1.2. Histologia aortei abdominale	24
1.2.1. Structura arterelor	24
1.2.2. Matricea extracelulară	25
1.3. Diagnosticul AAA	26
1.4. Managementul AAA	26
1.4.1. Tratamente de importanță istorică	26
1.4.2. Tratamentul medicamentos	27
1.4.3. Tratamentul chirurgical clasic	27
1.4.4. Repararea aneurismului endovascular (EVAR)	28
1.4.4.1 Istoria EVAR	28
1.4.4.2. EVAR în epoca modernă	28
1.5. Screening și urmărire	29
1.6. Evoluția naturală	29
2. Rolul Metaloproteinazelor in AAA	31
2.1. Aspecte generale	31
2.2. Rolul fiziologic al MMP	31
2.3. Activarea MMP	32
2.4. Metaloproteinazele și aneurismul	32
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	37
2. Studiul 1 - Raportul neutrofile/limfocite și corelația acestuia cu modificările patologice de la nivelul aneurismelor aortei abdominale	39
2.1. Introducere	39
2.2. Ipoteza de lucru/obiective	39
2.3. Material și metodă	41

2.3.1.Participanții la studiu și conceperea studiului	41
2.3.2.Parametrii biochimici	42
2.3.3.Analiza statistică	42
2.4. Rezultate	42
2.4.1. Populația studiului	42
2.4.2. Evaluarea NLR sangvin	45
2.5. Discuții	47
2.6. Concluzii	51
3. Studiul 2 – Activitatea metaloproteinazelor de la nivelul peretelui aortic dilatat anevrismal	53
3.1. Introducere	53
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	56
3.3. Material și metodă	56
3.3.1 Participanții la studiu și conceperea studiului	56
3.3.2. Tehnica zimografică	57
3.3.3. Analiza statistică	58
3.4. Rezultate	58
3.4.1. Populația studiului	58
3.4.2. Valorile MMP2 și MMP9 cât și a zimogenilor omologi	60
3.4.3. Valorile MMP 2 și MMP9 și a zimogenilor omologi în funcție de NLR	62
3.5. Discuții	67
3.6. Concluzii	73
4. Studiul 3 - Corelația modificărilor histologice cu activitatea proteolitică prezentă la nivelul peretelui aortic dilatat anevrismal	75
4.1. Introducere	75
4.2. Ipoteza de lucru	77
4.3. Material și metodă	77
4.3.1.Participanții la studiu și conceperea studiului	77
4.3.2.Parametrii biochimici	77
4.3.3. Histologie și imunohistochimie	78
4.3.4. Analiza statistică	78
4.4. Rezultate	78
4.4.1. Populația studiului	78
4.5. Discuții	82
4.6. Concluzii	87
5. Concluzii generale	89
6. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	91
REFERINȚE	93

CUVINTE CHEIE: Anevrism al aortei abdominale, metaloproteinaze, proteoliza, raport neutrofile/limfocite, infiltrat inflamator

INTRODUCERE

În ciuda creșterii ratei diagnosticării precoce și a abordării timpurii a patologiei anevrismale aortice, incidența rupturii anevrismelor aortei abdominale (AAA) este în creștere, reprezentând a treia cauză de mortalitate cardiovasculară după infarctul miocardic și atacul vascular cerebral. Principalele modificări patologice implicate în procesul de formare și dezvoltare al anevrismelor aortei abdominale sunt reprezentate de: degradarea matricei extracelulare sub acțiunea metaloproteinazelor (MMP), prezența infiltratului inflamator local, apoptoza celulelor musculare netede vasculare și dezvoltarea neoangiogenezei murale.

Relația dintre metaloproteinazele matriceale și degradarea peretelui aortic a fost observată pentru prima dată în 1991, de către Senior și colab., care a demonstrat că MMP2 și MMP9 au capacitatea de a scinda componentele matricei extracelulare de la nivelul peretelui aortic. Aceste două gelatinaze, exprimate amplificat, atât la nivelul peretelui aortic dilatat anevrismal, cât și la nivelul trombului intra-luminal, sunt considerate a fi principalele enzime proteolitice implicate în apariția și progresia bolii anevrismale. Există o serie de factori care stimulează activitatea proteolitică de la nivelul peretelui aortic dilatat anevrismal, precum: prezența infiltratului inflamator, fluxul de sânge turbulent de la nivelul segmentului aortic anevrismal, prezența trombului intraluminal, nicotina și o serie de patologii asociate. Chiar dacă fiecare dintre acești factori induce modificări minime, suma lor poate determina accelerarea bolii anevrismale. Producția de degradare ai elastinei participă la stimularea răspunsului inflamator prin modularea citokinelor și chemokinelor proinflamatorii și activarea componentelor sistemului imunitar, rezultând degradarea matricei extracelulare și apoptoza celulelor musculare netede. Astfel, se formează un cerc vicios, în care activitatea proteolitică implicată în remodelarea vasculară, este stimulată de către celulele inflamatorii, activate la rândul lor de către producții excesivi de proteoliză. O mai bună înțelegere a infiltratului inflamator și legătura acestuia cu procesele proteolitice de la nivelul matricei extracelulare, va contribui la o mai bună înțelegere a fiziopatologiei bolii anevrismale.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Studiul 1. Raportul neutrofile/limfocite și corelația acestuia cu modificările patologice prezente la nivelul anevrismelor aortei abdominale

Introducere

Primul studiu al tezei, are ca scop măsurarea valorilor raportului neutrofile/limfocite (NLR) la pacienții diagnosticați cu anevrism aortic abdominal integru (AAAi) sau rupt (AAAr), evaluarea sensibilității acestui marker inflamator ca factor de prognostic al mortalității imediate post-procedural, cât și evidențierea unei noi perspective asupra rolului inflamației și al răspunsului imun în boala anevrismală. NLR, folosit ca marker proinflamator și al stresului oxidativ, reprezintă răspunsul inflamator sistemic cronic de grad scăzut. A fost studiat inițial în oncologie, însă, ulterior, asocierea valorilor crescute ale statusului inflamator sistemic, cu dezvoltarea și progresia afecțiunilor cardiovasculare, a condus la creșterea arealului de aplicabilitate ale acestui marker. Datele din literatură indică faptul că valori mai mari de 5 ale acestuia prezintă semnificație patologică și sunt asociate cu prognostic negativ după proceduri precum bypass aorto-coronarian, intervenții percutane coronariene, disecții de aortă sau chirurgie vasculară periferică.

Materiale și metodă

În acest studiu retrospectiv de cohortă au fost selecționați pacienții diagnosticați cu anevrism al aortei abdominale integru (AAAi) și rupt (AAAr), care au fost supuși intervenției chirurgicale clasice, electiv sau în regim de urgență, în cadrul Secției de Chirurgie Cardiovasculară a Institutului Inimii „Niculae Stăncioiu” din Cluj-Napoca, în perioada 2007-2019. Criteriile de includere în studiu sunt: diametrul transversal al AAA mai mare de 5,5 cm la bărbați și 5 cm la femei, anevrismele simptomatice, rata de expansiune rapidă a anevrismului (> 5 mm în 6 luni) și ruptura anevrismului. Am exclus din studiu pacienții care aveau date clinice sau paraclinice incomplete, diagnosticul concomitent de infecție bacteriană acută/sub-acută, pacienții care au necesitat manevre de resuscitare preoperator și cei care au beneficiat de tratament endovascular. Datele clinice extrase au inclus sexul, vârsta, prezența hipertensiunii arteriale, prezența diabetului, prezența insuficienței renale cronice, dimensiunea anevrismului, durata spitalizării, rata mortalității la 30 zile. NLR a fost calculat divizând numărul absolut de neutrofile la numărul de limfocite.

Rezultate

În analiza finală au fost incluși 255 de pacienți consecutivi care au beneficiat de cura chirurgicală a anevrismului de aortă abdominală. Dintre aceștia, 148 au prezentat AAAi și 107 AAAR. Vârsta medie a pacienților a fost de 68.3 ± 7.6 ani iar 90.4% din populație a fost de sex masculin. Dimensiunea medie a diametrul transvers maxim a fost de 6.65 cm pentru categoria pacienților care prezintă anevrism integru și de 7.7 cm pentru categoria pacienților cu anevrism rupt. Dintre pacienții diagnosticați cu AAAi, un procent de 10.42% prezentau boală renală cronică, față de 19.05% din categoria pacienților cu AAAR, ($p < 0.02$). Prevalența prezenței diabetului zaharat la pacienții diagnosticați cu AAAR este semnificativ statistic mai mică decât la pacienții diagnosticați cu AAAi, ($p < 0.006$). Media valorilor NLR a fost mai mare în categoria pacienților cu anevrism rupt 9.3 (IQR: 7.55–11.39) față de 3.39 (IQR: 2.96–4.32) în categoria pacienților cu AAAi, respectiv ($p < 0.001$). În ceea ce privește prognosticul postoperator, pacienții diagnosticați cu AAAi care au prezentat preoperator o valoare NLR > 5 au înregistrat o rată a mortalității la 30 de zile de 16.6%, semnificativ statistic mai mare decât grupul la care valorile NLR au fost mai mici de 5, care a înregistrat o rată a mortalității de 6% ($p < 0.045$).

Riscul de mortalitate la 30 de zile post procedural este de aproape 3 ori mai mare în categoria pacienților care prezintă NLR > 5 preoperator. În cazul pacienților cu AAAR, chiar dacă mortalitatea la 30 zile postprocedural a fost mai mare la categoria NLR > 5 (61.44%) comparativ cu cei din categoria NLR < 5 (45.83%), diferența nu este semnificativă statistic ($p = 0.08$), probabil și din cauza distribuției inegale a pacienților în cadrul celor două categorii. Am înregistrat diferențe semnificative în ceea ce privește distribuția pacienților, în funcție de valoarea de referință a raportului, astfel: dintre pacienții cu AAAR 77.6% au prezentat, preoperator, valori ale NLR > 5, comparativ cu grupul AAAi, în care doar 32.5% au prezentat valori ale NLR > 5 (OR 5.085; 95% CI: 3.0025–8.6145, $p < 0.0001$).

Concluzii

Principalele constatări sunt reprezentate de urmările slabe în termeni de mortalitate postoperatorie, atât în cazul pacienților cu AAAi, cât și a celor cu AAAR care au prezentat preoperator valori NLR mai mari de 5. Am evidențiat că NLR este semnificativ crescut la pacienții cu anevrism rupt, rata de ruptură a anevrismelor fiind de 5 ori mai mare la pacienții care prezintă valori crescute ale acestui marker. De asemenea, am obținut o prevalență scăzută a diabetului zaharat la pacienții diagnosticați cu AAAR comparativ cu cea înregistrată la pacienții diagnosticați cu AAAi, sugerând faptul că prezența asociată a diabetului zaharat ar putea fi considerată factor protectiv pentru ruptura AAA. Capacitatea acestui marker de a anticipa evenimente nefavorabile în termeni de mortalitate și morbiditate post intervenții chirurgicale vasculare, prezintă un interes major, în

condițiile în care, o mare parte dintre aceste proceduri invazive sunt efectuate profilactic pentru a reduce riscul apariției unui eveniment catastrofal.

Studiul 2 – Activitatea metaloproteinazelor de la nivelul peretelui aortic dilatat anevrismal

Introducere

Al doilea studiu, are ca scop evaluarea cantitativă a formelor active ale metaloproteinazelor MMP9 și MMP2 precum și a formelor inactive ale acestora, de la nivelul peretelui AAA. Valorile obținute vor fi comparate cu valorile serice ale NLR înregistrate preoperator și vor fi corelate cu analiza histopatologică a peretelui aortic, evaluând o posibilă corelație între procesul local de proteoliză și răspunsul inflamator local și sistemic al pacienților diagnosticați cu AAA.

Materiale și metodă

Studiul de față este unul monocentric, observațional, prospectiv, desfășurat în cadrul Secției de Chirurgie Cardiovasculară, a Institutului Inimii „Niculae Stăncioiu”, Cluj-Napoca, în perioada 2014-2019. Criteriile de includere și de excludere sunt similare cu cele ale studiului precedent. În momentul intervenției chirurgicale clasice, au fost recoltate eșantioane de la nivelul peretelui aortic infrarenal dilatat anevrismal, într-un mod standardizat, din partea centrală a peretelui anterior atât în cazul anevrismelor rupte cât și în cazul celor întregre.

Rezultate

În analiza finală au fost incluși 64 de pacienți diagnosticați cu AAA, care au beneficiat de cura chirurgicală a AAA, dintre care, 31 au prezentat AAAi și 33 AAAR. În urma analizei zimografice a probelor de țesut aortic uman recoltate la nivelul anevrismului, am calculat media pro-enzimei și a enzimei active, MMP2 și MMP9, mediana, cuartilele, deviația standard și modul acestora. Cantitatea proteazei MMP2 a înregistrat o medie de 469.06 Uarb/ μ g la nivelul peretelui AAAi respectiv de 565.03 Uarb/ μ g în cazul AAAR, obținând valoarea $p > 0.0756$, fără semnificație statistică. În cazul metaloproteinazei MMP9, am obținut o medie de 821.35 Uarb/ μ g la nivelul peretelui AAAi și de 1411.57 Uarb/ μ g la nivelul peretelui AAAR, activitatea crescută de MMP9 fiind corelată pozitiv cu prezența rupturii AAA.

Am divizat populația studiului în două categorii: pacienți care au prezentat preoperator valori ale $NLR < 5$ și valori ale $NLR > 5$. Activitatea MMP2 nu a prezentat diferențe statistice în cadrul celor două grupuri, $p = 0.3236$. Expresii crescute ale MMP9 sunt asociate cu valori crescute ale NLR, grupul $NLR < 5$ prezentând o medie a MMP9 de 902.41 Uarb/ μ g, semnificativ statistic mai mică decât cantitatea MMP9 obținută în cadrul grupului $NLR > 5$ de 1474 Uarb/ μ g. Similar, zimogenii MMP2 și MMP9 s-au afirmat în cantități semnificativ statistic mai mari ($p \leq 0.05$), în grupul pacienților care au prezentat preoperator $NLR > 5$.

Dintre cei 64 de pacienți incluși în studiu, 14 au prezentat asociat diabet zaharat tip 2 insulino-dependent. Am comparat valorile metaloproteinazelor și a formelor latente ale acestora în cadrul celor două categorii de pacienți și am obținut valori mai scăzute ale MMP9, Pro-MMP9 și Pro-MMP2 la pacienții diabetici, fără a observa vreo diferență statistică în ceea ce privește cantitatea de MMP2 înregistrată la nivelul peretelui aortic dilatat anevrismal.

Concluzii

Rezultatul raportului MMP9/MMP2 la categoria AAAR este de 2,498, semnificativ mai mare comparativ cu categoria AAAi, unde am obținut valoare de 1.751, ($p < 0.05$). Acest fapt s-a datorat creșterii semnificative a activității MMP9 în cadrul AAAR și a cantității relativ constante a MMP2 la

nivelul celor două grupuri. MMP2 este exprimat în mod constitutiv de către celule rezidente ale peretelui aortic, și spre deosebire de MMP9, sinteza acestuia este doar într-o mică măsură stimulată de către celulele inflamatorii. Activitatea enzimatică a MMP9 măsurată la nivelul peretelui AAAr a fost semnificativ mai mare decât în cazul AAAs, expresiile crescute ale acestei proteaze fiind corelate pozitiv cu riscul de ruptură al anevrismului. Similar, pacienții care au prezentat preoperator valori ale NLR > 5, au exprimat activitate proteolitică locală exacerbată prin supraexpresia MMP9. Astfel demonstrăm că activitatea inflamatorie sistemică reflectă severitatea procesului proteolitic local. Sensibilitatea și fiabilitatea NLR ca marker de prognostic, este confirmată, prin asocierea directă a acestuia cu activitatea proteolitică locală, implicată în evoluția bolii anevrismale. Pacienții diagnosticați cu AAA care prezintă concomitent diabet zaharat, au prezentat activitate proteolitică locală scăzută, valorile MMP9 fiind semnificativ mai mici decât la pacienții non-diabetici. Inhibiția MMP9, metaloproteinaza sintetizată majoritar de către celulele inflamatorii, se poate datora medicației utilizate pentru controlul bolii metabolice.

Studiul 3 - Corelația modificărilor histologice cu activitatea proteolitică prezentă la nivelul peretelui aortic dilatat anevrismal

Introducere

Cel de-al treilea studiu are ca scop analiza histologică a peretelui aortic dilatat anevrismal și evaluarea cantitativă și calitativă a infiltratului inflamator prezent la acest nivel. Valorile obținute vor fi comparate cu valorile serice ale NLR înregistrate preoperator și vor fi corelate cu activitatea metaloproteinazelor matriceale, evaluând o posibilă corelație între activitatea inflamatorie sistemică, gradul de infiltrare inflamatorie de la nivelul peretelui aortic dilatat anevrismal și procesul local de proteoliză.

Material și metodă

Studiul de față este unul monocentric, observațional, prospectiv, desfășurat în cadrul Secției de Chirurgie Cardiovasculară, a Institutului Inimii „Niculae Stăncioiu”, Cluj-Napoca, în perioada 2014-2019. Criteriile de includere și de excludere sunt similare cu cele ale studiului precedent. În momentul intervenției chirurgicale clasice, au fost recoltate eșantioane de la nivelul peretelui aortic dilatat anevrismal, într-un mod standardizat, din partea centrală a peretelui anterior, atât în cazul anevrismelor rupte cât și în cazul celor întegre, fiind ulterior analizate din punct de vedere histologic, conform protocolului clinicii. Histologic am clasificat prezența locală a infiltratului inflamator în patru grade: absent, ușor, moderat, sever, în funcție de numărul de celule inflamatorii prezente.

Rezultate

În analiza finală au fost incluși 59 de pacienți diagnosticați cu AAA, care au beneficiat de cura chirurgicală a AAA. Dintre aceștia, 30 au prezentat AAAs și 29 AAAs. Cele două categorii de pacienți au fost divizate separat, în patru subunități, în funcție de prezența infiltratului inflamator: absent, ușor, moderat și sever. Media, deviația standard, mediana, modul, valoarea NLR, activitatea MMP2 și MMP9 au fost reprezentate la fiecare categorie. Majoritatea pacienților diagnosticați cu AAAs au prezentat infiltrat inflamator ușor și moderat, spre deosebire de categoria AAAs unde analiza histopatologică a decelat preponderent infiltrat inflamator mediu și sever.

La categoria pacienților cu AAAs, cea mai scăzută valoare a NLR a înregistrat-o grupul care prezenta infiltrat inflamator ușor, 2.36, valoare semnificativ statistic mai mică decât media NLR înregistrată la pacienții care prezentau infiltrat inflamator moderat, 3.92. Similar, categoria pacienților care prezentau AAAs au înregistrat valori ale NLR proportionale cu severitatea infiltratului inflamator local.

Activitatea enzimatică a MMP2 nu a înregistrat diferențe semnificative statistic la categoria pacienților diagnosticați cu AAAi sau AAAr, distribuția valorilor obținute, fiind relativ similară în cadrul celor patru grade de infiltrare inflamatorie, ($p < 0.20$). La pacienții diagnosticați cu AAAi, metaloproteinaza MMP9, prezintă valorile cele mai scăzute în lipsa infiltratului inflamator, 590 Uarb/ μ g, valoare semnificativ statistic mai mică decât media de 873 Uarb/ μ g, înregistrată la pacienții la care histologic, s-a evidențiat infiltrat inflamator moderat. În grupul pacienților diagnosticați cu AAAr, valorile MMP9 sunt direct proporționale cu cantitatea infiltratului inflamator regăsit la nivelul peretelui aortic, valorile cele mai scăzute înregistrându-se în absența inflamației locale, 1215 Uarb/ μ g, semnificativ mai mici decât cele înregistrate la pacienții care prezentau infiltrat inflamator sever, 1871 Uarb/ μ g.

Concluzii

La nivelul peretelui aortic dilatat anevrismal, cele mai numeroase celule inflamatorii evidențiate prin examenul histopatologic au fost macrofagele și limfocitele, iar în cantități ceva mai discrete, mastocitele și neutrofilele. Activitatea enzimatică locală a metaloproteinazei MMP2 a fost constantă, nefiind influențată de către gradul de infiltrare inflamatorie de la nivelul peretelui. În schimb, cantitatea MMP9 a înregistrat valori direct proporționale cu gradul de infiltrare inflamatorie, interdependența acestora fiind evidentă. De asemenea, valorile crescute ale NLR seric sunt asociate cu prezența unui infiltrat inflamator local moderat sau sever atât în cazul AAAi cât și AAAr. Nu am observat expresii crescute ale neutrofilelor la nivelul peretelui aortic, însă cantități crescute ale acestor celulele inflamatorii sunt prezente la nivelul trombului intraluminal cvasiprezent în patologia anevrismală aortică abdominală. Expresiile crescute ale NLR pot să fie explicate și prin scăderea fracției numărătorului, reprezentat în acest caz de limfocite, elemente care infiltrează intens peretele anevrismal.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Teza abordează un subiect important, implicat în fiziopatologia anevrismelor aortei abdominale și anume corelația dintre inflamația sistemică, infiltratul inflamator local și activitatea proteolitică de la nivelul peretelui aortic dilatat anevrismal.

Evaluarea statusului inflamator sistemic, la pacienții diagnosticați cu AAA integru sau rupt, compararea directă a valorilor NLR seric și evaluarea acestui marker inflamator ca și factor de prognostic, reprezintă o premieră în literatura de specialitate. Împletirea celor trei studii prin corelarea activității metaloproteinazelor de la nivelul peretelui aortic dilatat anevrismal, cu gradul de infiltrare inflamatorie de la acest nivel și cu activitatea inflamatorie sistemică atât la anevrismele necomplicate cât și la cele rupte, reprezintă o abordare originală a evidențierii relației celor două mărci patognomonice prezente în boală anevrismală: proteoliza și inflamația.

Rezultatele celor 3 studii, indica faptul ca NLR reprezintă un predictor independent al mortalității cardiovasculare, valorile acestuia reflectand activitatea inflamatorie si proteolitica de la nivelul peretelui aortic dilatat anevrismal. In mod ciudat, contrar numeroaselor studii care susțin acest lucru, nici NLR, nici un alt marker al inflamației nu este inclus în formulele modelelor predictive ale riscului AAA. Putem folosi acest marker cost eficient, disponibil, ușor determinabil, fie individual, fie integrat într-un sistem de stratificare al riscului la pacienții cu AAA, pentru a identifica pacienții cu risc înalt de mortalitate preoperatorie, ca și o abordare pragmatică de alegere a managementului terapeutic, incluzând evitarea chirurgiei deschise atunci când riscul este prohibitiv, optând dacă este posibil pentru varianta endovasculară.

SUMMARY OF PhD THESIS

Pathological changes at the aneurysmally dilated aortic wall

PhD Student **Vasile-Aurelian Săsărman**

Scientific supervisor Prof.Dr. **Aurel Andercou**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CONTENT

INTRODUCTION	13
STATE OF THE ART	
1. State of the art	19
1.1. Abdominal aortic aneurysm	19
1.1.1. General aspects	19
1.1.2. Historical significance	20
1.1.3. Epidemiology	20
1.1.4. Abdominal aortic aneurysm physiopathology	20
1.1.5. Risk factors	23
1.2. Abdominal aorta histology	24
1.2.1. Artery structure	24
1.2.2. Extracellular matrix	25
1.3. Abdominal aortic aneurysm diagnosis	26
1.4. Abdominal aortic aneurysm management	26
1.4.1. Treatments with historical importance	26
1.4.2. Pharmacologic treatment	27
1.4.3. Classic surgery treatment	27
1.4.4. Endovascular aneurysmal repair (EVAR)	28
1.4.4.1 Endovascular aneurysmal repair history	28
1.4.4.2. Endovascular aneurysmal repair in modern times	28
1.5. Screening and follow-up	29
1.6. Natural evolution	29
2. Metalloproteinases role in abdominal aortic aneurysms	31
2.1. General aspects	31
2.2. Physiologic role of metalloproteinases	31
2.3. Activation of metalloproteinases	32
2.4. Metalloproteinases and aneurysms	32
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Working hypothesis/Objectives	37
2. Study 1 - Neutrophil/lymphocyte ratio and its correlation with pathological changes present in the aneurysmal aortic wall	39
2.1. Introduction	39
2.2. Working hypothesis/Objectives	39
2.3. Materials and methods	41
2.3.1. Study participants and design	41

2.3.2. Biochemical parameters	42
2.3.3. Statistical analysis	42
2.4. Results	42
2.4.1. Study population	42
2.4.2. Evaluating blood neutrophil/lymphocyte ratio	45
2.5. Discussions	47
2.6. Conclusions	51
3. Study 2 – Metalloproteinase (MMP) activity at the level of dilated abdominal aneurysmal aortic wall	53
3.1. Introduction	53
3.2. Working hypothesis/Objectives	56
3.3. Materials and methods	56
3.3.1 Study participants and design	56
3.3.2. Zymographic technique	57
3.3.3. Statistical analysis	58
3.4. Results	58
3.4.1. Study population	58
3.4.2. MMP2, MMP9 and their homologue pro-enzymes values	60
3.4.3. MMP2, MMP9 and their pro-enzymes values related to NLR	62
3.5. Discussions	67
3.6. Conclusions	73
4. Study 3 - Correlation of histological changes with proteolytic activity seen at the dilated AAA wall	75
4.1. Introduction	75
4.2. Working hypothesis/Objectives	77
4.3. Materials and methods	77
4.3.1. Study participants and design	77
4.3.2. Biochemical parameters	77
4.3.3. Histology and immunohistochemistry	78
4.3.4. Statistical analysis	78
4.4. Results	78
4.4.1. Study population	78
4.5. Discussions	82
4.6. Conclusions	87
5. General conclusions	89
6. Originality and innovative contributions of the thesis	91
REFERENCES	93

KEY WORDS: abdominal aortic aneurysm, metalloproteinases, proteolysis, neutrophil/lymphocyte ratio, inflammatory infiltrate

INTRODUCTION

Despite the increasing rate of early diagnosis and early management of aortic aneurysm, the incidence of ruptured abdominal aortic aneurysms is rising, making it the third most common cause of cardiovascular death after myocardial infarction and stroke. The main pathological changes involved in the formation and development process of abdominal aortic aneurysm are: degradation of the extracellular matrix caused by metalloproteinases (MMP), local presence of inflammatory infiltrate, vascular smooth muscle cells apoptosis and mural neoangiogenesis.

The relationship between MMP and the degradation of the aortic wall was first observed in 1991 by Senior et al. who proved that MMP2 and MMP9 have the ability to break extracellular matrix components of the aortic wall. These two gelatinases, greatly expressed, both at the aneurysmally dilated aortic wall site as well as the intraluminal thrombus, are considered to be the primary proteolytic enzymes involved in the development and progression of aneurysmal disease. There are a series of factors that stimulate proteolytic activity at the aneurysmally dilated aortic wall site, such as: presence of inflammatory infiltrate, turbulent blood flow, presence of intraluminal thrombus, nicotine as well as a series of associated pathologies. Even if each of these factors induce minimal changes, their summation can lead to faster progression of aneurysmal disease. Elastin degradation products stimulate the inflammatory response through the modulation of cytokines and proinflammatory chemokines and activating immune system components which result in extracellular matrix degradation and vascular smooth muscle apoptosis. This way, a vicious cycle is formed in which the proteolytic activity involved in vascular remodelling is stimulated by inflammatory cells, stimulated in turn by excessive proteolytic products. A better understanding of the inflammatory infiltrate and its connection to proteolytic processes taking place at extracellular matrix level will contribute to a better understanding of aneurysmal disease pathology.

PERSONAL CONTRIBUTION

Study 1. Neutrophil/lymphocyte ratio and its correlation with pathological changes present at aneurysmal aortic wall level

Introduction

The first study of the thesis focuses on measuring neutrophil/lymphocyte ratio (NLR) in patients diagnosed with unruptured (uAAA) or ruptured (rAAA) dilated abdominal aortic aneurysm, evaluating this inflammatory markers' sensibility as a prognostic factor for immediate postoperative mortality, as well as underlining a new perspective regarding the role of inflammation and the immune response in aneurysmal disease. NLR, used as a proinflammatory and oxidative stress marker, shows a low level chronic systemic inflammatory response. It's been studied initially in oncology, but because high values were associated with systemic inflammatory status, it's use was broadened. Literature data show that NLR values >5 are significant for the pathology and are associated with negative outcomes after procedures such as aorto-coronarian bypass, percutaneous coronarian interventions, aortic dissection or peripheral vascular surgery.

Materials and metodă

The patients selected in this retrospective cohort study were diagnosed with rAAA and uAAA and underwent classic surgery, either electively or as an emergency, in the Cardiovascular Surgery Ward of the 'Niculae Stanicioiu' Heart Institute from Cluj-Napoca, from 2007 to 2019. Inclusion criteria for the study are: transverse diameter of AAA more than 5.5 cm in men and 5 cm in women, symptomatic aneurysms, fast aneurysm expansion rate (more than 5 mm in 6 months) and aneurysm

rupture. We excluded patients with incomplete clinical or paraclinical data, concurrent acute/subacute bacterial infection, patients who required resuscitation maneuvers preoperatively and those who received endovascular treatment. The clinical data that used included sex, age, presence of hypertension, diabetes mellitus or chronic kidney disease, size of the aneurysm, length of hospital stay and mortality rate at 30 days. NLR was calculated by dividing the absolute number of neutrophils to that of lymphocytes.

Results

In the final analysis, 255 consecutive patients were included, who benefited from surgical treatment of the AAA. Of these, 148 presented with uAAA and 107 with rAAA. Mean age was 68.3 +/- 7.6 years and 90.4% were male. Mean maximum transverse diameter was 6.65 cm for the patients with uAAA and 7.7 cm for those with rAAA. 10.42% of the patients with uAAA had chronic kidney disease, compared to 19.05% of those with rAAA ($p < 0.02$). Diabetes mellitus prevalence in the patients with rAAA was significantly lower from those with uAAA ($p < 0.006$). Mean NLR value was higher for patients with rAAA 9.3 (IQR: 7.55-11.39) compared to 3.39 (IQR: 2.96-4.32) for those with uAAA ($p < 0.001$). Regarding postoperative prognostic, patients diagnosed with uAAA that had preoperative NLR value > 5 recorded a mortality rate at 30 days of 16.6%, significantly higher than the group with NLR < 5 , which recorded a mortality rate of 6% ($p < 0.045$).

Postoperative mortality rate at 30 days is approximately 3 times higher for the patients with preoperative NLR > 5 . For the patients with rAAA, even if mortality was higher at 30 days after surgery if NLR > 5 (61.44%) compared to NLR < 5 (45.83%), the difference is not statistically significant ($p = 0.08$), probably because of the uneven patient distribution between the two groups. We recorded significant differences regarding patient distribution, depending on the reference value for the ratio: 77.6% of patients with rAAA had preoperative NLR > 5 , compared to patients with uAAA where only 32.5% had NLR > 5 (OR 5.085; 95 CI: 3.0025-8.6145, $p < 0.001$).

Conclusions

The main observations are poor outcomes in terms of postoperative mortality, both for the rAAA group and the uAAA one, with preoperative NLR > 5 . We underlined that NLR is significantly higher in patients with rAAA, the rupture rate being 5 times higher in patients with high NLR values. Also, we found a low prevalence of diabetes mellitus in patients with rAAA compared to uAAA, suggesting that the associated presence of diabetes could be considered a protective factor against AAA rupture. The ability of this marker to anticipate unfavourable events in terms of postoperative mortality and morbidity is of major interest, taking into account that a large part of these invasive procedures are done with prophylactic intent, to reduce the risk of a catastrophic event occurring.

Study 2 - Metalloproteinase activity at aneurysmally dilated abdominal aortic wall

Introduction

The second study means to quantitatively evaluate the active forms of MMP, MMP9 and MMP2, as well as their inactive forms at AAA wall site. Values obtained will be compared to NLR serum values recorded preoperative and will be correlated with the histopathologic analysis of the aortic wall, evaluating a possible correlation between the local proteolysis process and the local and systemic inflammatory response of patients diagnosed with AAA.

Materials și method

The current study is monocentric, observational, prospective, taking place at the Cardiovascular Surgery Ward of the 'Niculae Stanicioiu' Heart Institute, Cluj-Napoca, between 2014 and 2019. Inclusion and exclusion criteria are similar to the previous study. At the time of classic surgery, samples from the aneurysmally dilated infrarenal abdominal aortic wall were collected in a standardized manner, from the central part of the anterior wall of ruptured and unruptured aneurysms.

Results

In the final analysis 64 patients diagnosed with AAA, 31 with rAAA and 33 with uAAA, who benefited from surgical treatment of the AAA. Following the zymographic analysis of the human aortic tissue samples collected, we calculated the means of the proenzymes and active enzymes, MMP2 and MMP9, median, quartiles, standard deviation and their mode. MMP2 protease had a mean of 469.06 Uarb/ μ g at the uAAA wall, 563.03 Uarb/ μ g at the rAAA wall respectively, leading to a $p > 0.0756$, without statistical significance. In the MMP9 case, we obtained a mean of 821.35 Uarb/ μ g at the uAAA wall and 1311.57 Uarb/ μ g at the rAAA wall, higher activity of MMP9 being positively correlated with the rupture of AAA.

We split the study population in two categories: patients who presented with preoperative NLR values < 5 and > 5 . MMP2 activity did not show statistical differences between the two groups ($p = 0.3236$). Higher MMP9 values are associated with higher NLR values, the NLR < 5 group having a mean MMP9 of 902.41 Uarb/ μ g, significantly lower than the MMP9 mean of 1474 Uarb/ μ g in the NLR > 5 group. Similarly, MMP2 and MMP9 zymogens presented in significantly higher values ($p < / = 0.05$) in the NLR > 5 group.

Of the 64 patients included in this study, 14 had diabetes mellitus and depended on insulin treatment. We compared the MMP enzyme values to MMP proenzyme values between the two groups and found lower MMP9, pro-MMP2 and pro-MMP9 values in diabetic patients, without any statistical difference regarding the MMP2 value recorded and the dilated AAA.

Conclusions

The MMP9/MMP2 ratio in the rAAA category is 2.498, significantly higher compared to the uAAA category, where it reached a value of 1.751 ($p < 0.05$). This was due to significant increase of MMP9 activity in rAAA and the relatively stable MMP2 values in the two groups. MMP2 is constitutively expressed by resident cells of the aortic wall and, unlike MMP9, its synthesis is influenced only in a small degree by inflammatory cells. Enzymatic activity of MMP9 measured at rAAA was significantly greater than that registered from uAAA, higher quantities of this protease being positively correlated with the risk of aneurysm rupture. Similarly, patients who presented preoperative NLR values > 5 expressed exaggerated local proteolytic activity by MMP9 overexpression. Thus, we demonstrate that systemic inflammatory activity reflects the local proteolytic process severity. Sensibility and reliability of NLR as a prognostic marker is confirmed, by its direct association with local proteolytic activity involved in aneurysmal disease evolution. Patients diagnosed with AAA and concurrent diabetes mellitus showed low local proteolytic activity, MMP9 values being significantly lower for non-diabetic patients. MMP9 inhibition, metalloproteinase mainly synthesised by inflammatory cells, can be due to medication used to control metabolic disease.

Study 3 - Correlation of histological changes with proteolytic activity seen at the dilated AAA wall

Introduction

The third study looks at the histological analysis of the aneurysmally dilated aortic wall and quantitatively and qualitatively evaluates the inflammatory infiltrate from the tissue. Values obtained will be compared to preoperative seric values of NLR and correlated with MMP activity, evaluating a possible correlation between systemic inflammatory activity, inflammatory infiltrate degree and local proteolysis process.

Materials and method

This study is monocentric, observational, prospective, taking place at the Cardiovascular Surgery Ward of the 'Niculae Stanicioiu' Heart Institute, Cluj-Napoca, between 2014 and 2019. Inclusion and exclusion criteria are similar to the previous study. At the time of classic surgery, samples from the aneurysmally dilated infrarenal abdominal aortic wall were collected in a standardized manner, both uAAA and rAAA, samples later analyzed histologically according to the clinics' protocol. We classified the local presence of inflammatory infiltrate in four stages: absence, low, moderate, severe, depending on the number of inflammatory cells.

Results

59 patients diagnosed with AAA were included in the final analysis, who benefited surgical treatment. Of these, 30 had uAAA and 29 rAAA. The two categories were divided each in four subunits depending on the number of inflammatory cells: absence, low, moderate and severe. Mean, standard deviation, median, mode, NLR value, MMP2 and MMP9 activity were presented for each category. Most patients diagnosed with uAAA had low and moderate inflammatory infiltrate, compared to the rAAA group where the histopathological analysis found mostly moderate and severe inflammatory infiltrate.

In the uAAA group, the lowest NLR value found was for the subgroup with low inflammatory infiltrate, 2.36, significantly lower than the mean NLR for the subgroup with moderate inflammatory infiltrate, 3.92. Similarly, those in the rAAA group recorded NLR values proportional to the severity of local inflammatory infiltrate.

Enzymatic activity of MMP2 did not show statistically significant differences in patients with uAAA and rAAA, the value distribution obtained being relatively similar across the 4 stages of inflammatory infiltrate ($p < 0.20$). For patients with uAAA, MMP9 values were lowest when there was no inflammatory infiltrate, 590 Uarb/ μ g, significantly lower than the mean of 873 Uarb/ μ g recorded for patients with moderate inflammatory infiltrate. In the rAAA group, MMP9 values are directly proportional to the inflammatory infiltrate quantity found in the aortic wall, lowest values being found when no inflammatory infiltrate was detected, 1215 Uarb/ μ g, significantly lower than those recorded in patients with severe inflammatory infiltrate, 1871 Uarb/ μ g.

Conclusions

In the dilated aneurysmal aortic wall, the most numerous inflammatory cells found by histopathologic exam were macrophages and lymphocytes, but also mastocytes and neutrophils in a more discreet quantity. Local enzymatic activity of MMP2 was constant, uninfluenced by the degree of inflammatory infiltrate. In turn, MMP9 values were directly proportional with the degree of inflammatory infiltrate, their interdependence being obvious. Also, high NLR values are associated with moderate and severe inflammatory infiltrate for uAAA as well as rAAA. We did not observe

increased expression for neutrophils at the aortic wall, but high quantities of this inflammatory cells are present at the level of intraluminal thrombus, quasipresent in abdominal aortic aneurysm pathology. High NLR values can also be explained by a lower lymphocyte value, cells that greatly infiltrate the aneurysmal wall.

Originality and innovative contributions of the thesis

This thesis approaches an important subject, involved in the abdominal aortic aneurysm pathology which is the correlation between systemic inflammation, local inflammatory infiltrate and proteolytic activity at the dilated aneurysmal aortic wall.

Evaluation of the systemic inflammatory status in patients with rAAA and uAAA, direct comparison of NLR values and evaluation of this marker as a prognostic factor are a premiere in specialty literature. The intertwining of the three studies by correlating MMP activity at the dilated aneurysmal aortic wall with the degree of inflammatory infiltrate at this level and with the systemic inflammatory activity for uAAA and rAAA are an original approach for underlining the relationship between the two pathognomonic marks of aneurysmal disease: proteolysis and inflammation.

The results from the three studies indicate that NLR is an independent predictor of cardiovascular death, its values reflecting inflammatory and proteolytic activity at the dilated aneurysmal aortic wall. Strangely, against numerous studies that support this, not NLR nor other inflammatory markers are included in predictive model formulas for calculating the risk of AAA. We can use this marker cost efficiently, easily available and detectable, either individually or integrated in a risk stratification system for patients with AAA to identify patients with high preoperative mortality rate, as a pragmatic approach for therapeutic management which includes avoiding open surgery when the risk prohibits it, opting for the endovascular approach, if possible.

