

Ilek. Milena Michalska

**Wpływ wewnątrznaczyniowego leczenia tętniaków aorty
na zewnątrzkomórkowe sieci neutrofilowe i ich korelacja
z wybranymi parametrami stanu zapalnego i układu krzepnięcia**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: prof. dr hab. n. med. Tadeusz Grochowiecki

Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej, Naczyniowej, Endokrynologicznej
i Transplantacyjnej

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2023

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Wstęp

Zewnątrzkomórkowe sieci neutrofilowe (NETs) oraz proces ich tworzenia, czyli netozy (NETosis), stanowi istotny element w patogenezie rozwoju tętniaka aorty. Jednakże, mimo znaczenia tych procesów, dotychczas nie zbadano roli netozy u chorych z tętniakiem aorty piersiowo-brzusznym oraz nie określono dynamiki tego procesu w czasie okołoperacyjnym po leczeniu wewnątrznaczyniowym. Okres okołoperacyjny po interwencji wewnątrznaczyniowej z użyciem stentgraftu, charakteryzuje się szeregiem zmian w układzie krzepnięcia i układzie białokrwinkowym i w parametrach zapalnych, co ma związek między innymi z powstawaniem skrzepliny między stentem a tętniakiem. Implantacja stentgraftu może prowadzić do aktywacji procesów zapalnych, co może zwiększać ryzyko wystąpienia powikłań pooperacyjnych. Jednym z czynników wpływających na te proces jest aktywacja neutrofilów i uwolnienie zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych. Wobec tego, istotne znaczenie ma ocena netozy, układu białokrwinkowego, stanu zapalnego i układu krzepnięcia w okresie okołoperacyjnym oraz ich potencjalnego związku z ryzykiem powikłań po operacji.

Założenia i cele

W niniejszej pracy przeprowadzono badania dotyczące markerów netozy (NETs) oraz wybranych parametrów układu białokrwinkowego, stanu zapalnego i układu krzepnięcia u chorych z tętniakiem aorty piersiowo-brzuszej, przed i po implantacji stentgraftu typu t-Branch. Celem pracy było określenie aktywności formowania NETs u pacjentów przed i po wewnątrznaczyniowym leczeniu tętniaków aorty piersiowo-brzuszej oraz ich związku z wybranymi parametrami procesu zapalnego, układu krzepnięcia i układu białokrwinkowego. Zbadano rolę ssDNA jako markera NETs. Wszystkie parametry przeanalizowano w aspekcie oceny ryzyka zgonu i ponownej hospitalizacji chorych z tętniakiem aorty piersiowo-brzusznym poddanych operacji wewnątrznaczyniowej.

Material i Metody

Przeprowadzono prospektywne, jednośrodkowe obserwacyjne badanie, do którego włączono 20 chorych ze wskazaniami do leczenia tętniaka aorty piersiowo-brzuszej za pomocą stentu typu t-Branch w okresie od kwietnia 2021 do sierpnia 2021. Do badania włączono 85% mężczyzn i 15% kobiet, średni wiek pacjentów wynosił 70,65 lat. Najczęściej zgłaszanymi chorobami współistniejącymi były nadciśnienie i inne choroby układu sercowo-naczyniowego. Wszyscy chorzy przeszli skuteczną operację wewnątrznaczyniową przy użyciu stentu typu t-Branch z poczwórnym szkieletem naczyniowym. Wskazaniem do wszczęcia stentgraftu była maksymalna średnica aorty ≥ 55 mm lub szybki wzrost średnicy tętniaka (≥ 10 mm w ciągu 12 miesięcy). Zbadano parametry NETozy, układu białokrwinkowego, stanu zapalnego, układu krzepnięcia w okresie przedoperacyjnym (w ciągu 24 godzin przed operacją) oraz pooperacyjnym (w III i V dobie pooperacyjnej). Z krwi wyizolowano wolno krążące DNA (cfDNA) przy użyciu zestawu do izolacji DNA MagMAX™ Cell-Free. Następnie oznaczono ilościowo dwuniciowy DNA (dsDNA) i jednoniciowy DNA (ssDNA) przy użyciu zestawu Qubit dsDNA HS Assay Kit i zestawu Qubit ssDNA Assay Kit. Oznaczono stężenie Cit-H3 za pomocą enzymatycznego testu immunologicznego metodą ELISA(Cayman). Poddano analizie w zautomatyzowanych analizatorach hematologicznych parametry układu białokrwinkowego (w tym neutrofile, limfocyty, monocyty, bazofile i eozynofile), stanu zapalnego (CRP i prokalcytonina), układu krzepnięcia (w tym stężenie płytek i parametry płytkowe, czas protrombinowy, INR, fibrynogen i D-dimery). Rok po operacji przeprowadzono kontrolę, aby ocenić stan zdrowia badanych chorych. Analizę statystyczną przeprowadzono metodami nieparametrycznymi przy użyciu programu Statistica. Za pomocą analizy regresji hazardu Coxa zidentyfikowano niezależne czynniki wpływające na wystąpienie punktu końcowego, czyli zgonu i ponownej hospitalizacji. Istotność statystyczną zdefiniowano przy $p < 0,05$.

Wyniki

Po operacji wewnątrznaczyniowej tętniaka aorty piersiowo-brzuszej zaobserwowano znamienny wzrost parametrów NETs. Stwierdzono znamienny wzrost wszystkich trzech markerów NETs w III dobie pooperacyjnej, w porównaniu z okresem sprzed operacji. Dla dwuniciowego DNA (dsDNA), dla jednoniciowego DNA (ssDNA) oraz cytrulinowanych histonów H3 (Cit-H3), wzrost ten wynosił odpowiednio $1347,93\text{ng/ml} \pm 1551,65$ do $5289,75\text{ng/ml} \pm 2815,52$ ($p < 0,05$); $6551,00\text{ng/ml} \pm 7987,49$ do $26151,75\text{ng/ml} + 14182,07$ ($p < 0,05$); $16,20\text{ng/ml} + 9,92$ do $66,57\text{ng/ml} + 54,10$ ($p < 0,05$). Poziom histonów przed operacją i w V dobie pooperacyjnej nie różnił się znamienne i wynosił odpowiednio $16,20\text{ng/ml} + 9,92$ i $26,97\text{ng/ml} \pm 17,48$ (ns). Natomiast stężenia dsDNA i ssDNA w V dobie pooperacyjnej były znamienne wyższe niż przed operacją i wynosiły odpowiednio: $1347,93\text{ng/ml} \pm 1551,6$ i $5340,50\text{ng/ml} \pm 3767,26$ ($p < 0,05$); oraz $6551,00\text{ng/ml} + 7987,49$ i $27426,75\text{ng/ml} \pm 18367,58$ ($p < 0,05$). Na podstawie wyników korelacji rang Spearmana, można stwierdzić, że wystąpiła silna korelacja między ssDNA i dsDNA. W okresie przedoperacyjnym wynosił $r=0,975555$ ($p < 0,05$), w trzeciej dobie pooperacyjnej $r=0,908271$ ($p < 0,05$), a w piątej dobie $r=0,863158$ ($p < 0,05$). Nie zaobserwowano korelacji między parametrami netozy a parametrami stanu zapalnego, układu krzepnięcia i układu białokrwinkowego.

W okresie okołoperacyjnym zaobserwowano znaczące zmiany we frakcji układu białokrwinkowego. Stwierdzono znamienny wzrost liczby neutrofilii z $4,31 \times 10^3 / \mu\text{l} \pm 1,63$ przed operacją na $7,84 \times 10^3 / \mu\text{l} \pm 3,06$ w III dobie ($p < 0,05$) oraz $6,91 \times 10^3 / \mu\text{l} \pm 6,91$ w V dobie ($p < 0,05$) pooperacyjnej. W okresie przed i pooperacyjnym stwierdzono za pomocą wskaźników określających dynamikę wydzielania NETs z neutrofilii, że wzrost netozy nie był związany ze wzrostem liczby neutrofilii. Zaobserwowano spadek liczby limfocytów z $2,48 \times 10^3 / \mu\text{l} \pm 1,42$ przed operacją do $1,64 \times 10^3 / \mu\text{l} \pm 1,64$ w III dobie ($p < 0,05$) i $1,98 \times 10^3 / \mu\text{l} \pm 1,42$ w V dobie pooperacyjnej ($p < 0,05$). Obliczony wskaźnik neutrofilii do limfocytów przed operacją, w III i V dobie pooperacyjnej wynosił odpowiednio $2,15 \pm 1,49$; $6,89 \pm 4,92$; $4,92 \pm 5,14$ (I vs III doba $p < 0,05$, I vs V doba $p < 0,05$).

Zaobserwowano znamienny wzrost parametrów zapalnych prokalcytoniny i CRP. Wartości prokalcytoniny dla okresu sprzed operacji, w III dobie i V dobie operacyjnej wynosiły odpowiednio: $0,05\text{ng/ml} \pm 0,03$; $1,03\text{ng/ml} \pm 3,51$; $0,45\text{ng/ml} \pm 1,08$ (I vs III doba $p < 0,05$; I vs V doba $p < 0,05$). Wartości CRP dla okresu sprzed operacji, w III dobie i V dobie

operacyjnej wynosiły odpowiednio: 21,86 mg/l \pm 31,19; 143,58mg/l \pm 54,35; 141,28mg/l \pm 52,07 (I vs III doba p<0,05; I vs V doba p<0,05).

Czas obserwacji chorych wynosił 314,68 dni \pm 30,24 po operacji. Dwóch chorych zmarło w wyniku powikłań pooperacyjnych. Pierwszy pacjent zmarł w wyniku udaru krwotocznego, drugi pacjent zmarł z powodu nagłego zatrzymania krążenia. W ciągu jednego roku obserwacji doszło również do hospitalizacji u pięciu pacjentów.

Wykazano że czynnikami ryzyka wystąpienia punktu końcowego są: stężenie dsDNA i ssDNA w III dobie (odpowiednio HR=1,000259 [PU 1,000029-1,000488] p<0,05; HR=1,000060 [PU 1,00009-1,000111] p<0,05); stężenie neutrofilii w III i V dobie pooperacyjnej (odpowiednio HR=1,327054 [PU 1,030406-1,709107] p<0,05; HR=1,259972 [PU 1,005217- 1,579291] p<0,05); wartość NLR w III i V dobie pooperacyjnej (odpowiednio HR=1,225678 [PU 1,043126-1,440176] p<0,05; HR=1,178757 [PU 1,031318-1,347274] p<0,05).

Wnioski

Po leczeniu wewnątrznaczyniowym tętniaków aorty piersiowo-brzusznym dochodzi do aktywacji neutrofilii oraz uwolnienia NETs. Wzrost powstawania NET w okresie pooperacyjnym był niezależny od wzrostu liczby neutrofilii. Stwierdzono że jednoniciowe DNA (ssDNA) jest jednym z markerów NETs i koreluje z dsDNA. Analiza hazardu Coxa wykazała, że czynnikami ryzyka wystąpienia punktu końcowego są stężenie dsDNA i ssDNA, neutrofile i NLR.