

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA
ȘCOALA DOCTORALĂ**

**REZUMAT AL
TEZEI DE DOCTORAT**

**STUDIU REACȚIEI INFLAMATORII LA PACIENȚII CU
AVC ISCHEMICE**

**Conducător de doctorat
Prof. univ. dr. Laurențiu Mogoantă**

**Student- doctorand
Raluca Maria Păvăloiu**

**CRAIOVA
2018**

CUPRINS

A. PARTEA GENERALĂ

Introducere.....3

CAPITOLUL I

Dezvoltarea sistemului nervos central.....3

CAPITOLUL II

Vascularizația sistemului nervos central.....4

CAPITOLUL III

Histologia encefalului.....5

B. PARTEA PERSONALĂ

CAPITOLUL IV

Obiectivele tezei.....5

CAPITOLUL V

Studiul clinico-statistic al accidentelor vasculare cerebrale ischemice în perioada 2010-1046

CAPITOLUL VI

Studiul histologic al accidentelor vasculare cerebrale ischemice.....7

CAPITOLUL VII

Studiul imunohistochimic al accidentelor vasculare cerebrale ischemice.....8

CAPITOLUL VIII

Evaluare reacției inflamatorii și modificările parenchimului cerebral la șobolani tratați cu AINS și neurotrofice.....9

CONCLUZII.....11

BIBLIOGRAFIE.....11

Cuvinte cheie: accidente vasculare cerebrale ischemice, reacție inflamatorie, histologie, imunohistochimie, terapie antiinflamatoare si neuroprotectoare.

A. PARTEA GENERALĂ INTRODUCERE

Accidentul vascular cerebral (AVC) este una din cele mai importante probleme de sănătate publică, cu un puternic impact socio-economic la nivel mondial, fiind totodată și una din principalele cauze ce determină dizabilități în țările înalt dezvoltate.

Chiar dacă este a treia cauză de deces, după afecțiunile cardiace și diferitele tipuri de neoplasme, în ceea ce privește costurile sociale și invaliditatea, accidentul vascular cerebral se situează pe primul loc.

La nivel mondial, accidentele vasculare cerebrale produc decese anual, se estimează un număr de cinci milioane de vieți, iar dizabilitățile severe produse afectează alte cinci milioane de oameni [1].

În Europa, incidența accidentelor vasculare cerebrale variază de la o țară la alta, cu o estimare cuprinsă între 100 și 200 de accidente vasculare cerebrale noi la 100.000 de locuitori anual, aceasta cifră reprezentând o imensă povară pentru economie.

Statisticile demonstrează astfel faptul că incidența maximă a accidentelor vasculare cerebrale apare în 75% din cazuri după vârsta de 65 de ani [3,4], vârstă asociată și cu o recuperare mult mai dificilă post accident vascular [5,6,7]. Mortalitatea post accident vascular se încadrează astăzi între 20 și 30%.

Pacienții care supraviețuiesc unui accident vascular prezintă adesea simptome ce includ: paralizia unor funcții motorii, deficite senzoriale, deficite de percepție, de echilibru, tulburări de vorbire, depresie, demență sau alte deteriorări ale funcțiilor cognitive [5,8,9]. Aceste date sugerează că accidentele vasculare cerebrale constituie o reală problemă de sănătate, nu numai prin rata ridicată a mortalității ci și prin consecințele asupra performanțelor motorii și cognitive ale supraviețuitorilor. Sechelele accidentelor vasculare cerebrale pot afecta calitatea vieții bolnavului și a familiei acestuia datorită dizabilităților pe care le provoacă.

CAPITOLUL I DEZVOLTAREA SISTEMULUI NERVOS CENTRAL

Sistemul nervos este cel mai complex sistem fizic cunoscut la specia umană care asigură integritatea organismului și coordonarea funcțiilor organelor interne.

Sistemul nervos apare ca formă superioară conducerii neuroide, fiind alcătuit din câteva miliarde de unități interactive.

Țesutul nervos intră în constituția sistemului nervos central (măduva spinării și encefal) și a sistemului nervos periferic (nervi și ganglioni spinali).

Celulele ectodermului neural (tub neural și creste neurale) se vor diferenția în două direcții: celule nervoase primitive (neuroblaștii) și celule de susținere (spongioblaștii). Neuroblaștii sunt celule șușă pentru toate categoriile de neuroni. Spongioblaștii vor genera macroglia, în timp ce microglia se formează din celule mononucleare sanguine [20].

Sistemul nervos matur conține o gamă largă de tipuri de celule, acestea pot fi împărțite în două categorii principale: neuronii, responsabili în primul rând pentru semnalizare și celulele de sprijin, numite celule gliale.

CAPITOLUL II VASCULARIZAȚIA SISTEMULUI NERVOS CENTRAL

Creierul deși reprezintă doar 2% din greutatea corpului, primește aproximativ 20% din debitul cardiac, iar funcțiile cerebrale normale, se pot realiza numai în condițiile unui flux sanguin cerebral adecvat, depinzând de aportul fiziologic de oxigen și substanțe nutritive [53].

Fluxul sanguin cerebral total este de aproximativ 750 ml/min. Acest flux este asigurat prin cele două artere carotide și artera bazilară, fiecare contribuind cu aproximativ 250 ml/min. Volumul sanguin intracranian total este 100-150 ml în orice moment; deci volumul intracranian circulant efectuează 5-7 cicluri pe minut [54].

Vascularizația creierului provine din două surse majore: sistemul carotidian și sistemul vertebro-bazilar.

Sistemul carotidian este responsabil de vascularizația celor 3/5 anterioare ale encefalului (integral lobii frontali, parietali și parțial lobii temporali), iar cel vertebro-bazilar de vascularizația celor 2/5 posterioare (lobii temporali în profunzime, lobii occipitali, trunchiul cerebral și cerebelul).

Arterele carotide și vertebrale se găsesc în spațiul subarahnoidian, iar ramurile acestora formează un sistem anastomotic la nivelul suprafeței inferioare a encefalului. Acest sistem anastomotic constituie o rezervă funcțională, protejând țesutul cerebral în situațiile în care apar ocluzii sau stenoze ale vaselor cerebrale [53].

CAPITOLUL III

HISTOLOGIA ENCEFALULUI

Sistemul nervos este constituit din peste 100 miliarde de neuroni care asigură integrarea organismului în mediul extern și coordonarea funcțiilor organelor interne.

Unul din cele mai complexe sisteme din organismul uman, sistemul nervos este alcătuit dintr-un ansamblu de organe formate din țesut nervos, vase sanguine și țesut conjunctiv. Elementele vasculare sunt separate de țesutul nervos prin bariera hemato-encefalică, structură cu permeabilitate selectivă.

Macroscopic, SNC este alcătuit din următoarele componente: substanța cenușie, substanța albă și formațiunea reticulară [90].

Sistemul nervos este format din parenchim și stromă. Parenchimul sistemului nervos central este constituit din totalitatea celulelor nervoase. Stroma este formată din celule gliale, fine elemente conjunctive și capilare sanguine [91].

Substanța cenușie este dispusă sub formă de coloane (la nivelul măduvei spinării), insule (în interiorul trunchiului cerebral și diencefalului) sau se exprimă într-un strat continuu (la suprafața emisferelor cerebrale și cerebeloase).

Substanța albă este formată în principal din axoni mielinizați dispuși paralel, grupați în fascicule și cordoane.

Formațiunea reticulată este formată dintr-un amestec de substanță cenușie și substanță albă, fără a fi bine delimitată și este alcătuită din neuroni cu dendrite foarte ramificate și multe sinapse.

B. PARTEA PERSONALĂ

CAPITOLUL IV

OBIECTIVELE LUCRĂRII

În prezenta teză ne-am propus să efectuăm:

1. Un studiu clinico-statistic retrospectiv privind accidentele vasculare cerebrale ischemice într-o clinica universitară, care să evidențieze următoarele aspecte ale afecțiunii: stabilirea incidenței accidentelor vasculare cerebrale ischemice pe o perioadă de patru ani cu distribuție pe sexe, medii de proveniență și grupe de vârstă; analiza factorilor de risc vascular modificabili; determinarea evoluției și prognosticul accidentului vascular ischemic cu precizarea factorilor neurologici și comorbiditățile care duc la evoluția nefavorabilă; precizarea rolului explorării imagistice cerebrale precoce în

diagnosticul de urgență și în evoluția stroke-ului ischemic acut; expunerea principalelor complicații ce însoțesc accidentul vascular cerebral.

2. Un studiu histologic realizat pe țesut cerebral provenit de la persoane decedate prin AVC ischemice, dar și pe piese recoltate de la șobolani adulți ce au primit tratament cu neurotrofice și antiinflamatoare pentru a evidenția: procesul de ischemie neuronală (aparitia neuronilor roșii); modificările parenchimului cerebral la nivelul leziunii și perilezional; evidențierea modificărilor microcirculației cerebrale; prezența procesului inflamator; evidențierea procesului de moarte neuronală prin apariția modificărilor neuronale premergătoare morții neuronale, a fantomelor neuronale.

3. Un studiu imunohistochimic, în completarea studiului histopatologic pentru a evidenția: modificările vasculare; viabilitatea neuronilor; prezența reacției inflamatorii; reacția oligodendroglilor; calea apoptozei; sistemul monocito-macrofagic; reacția macroglilor și a microglilor; regenerarea vasculară.

CAPITOLUL V

STUDIUL CLINICO-STATISTIC AL AVC ISCHEMICE ÎN PERIOADA 2010-2014

Am realizat un **studiu clinico-statistic** epidemiologic de tip retrospectiv efectuat pe un interval de 5 ani, respectiv intervalul 2010-2014, luând în studiu toate cazurile de AVC ischemice (6931) internate în Spitalul Clinic de Neuropsihiatrie din Craiova. Au fost analizate atât foile de observație clinică cât și datele statistice oferite de biroul de Statistică al Spitalului.

În ceea ce privește distribuția AVC ischemice după sex, am remarcat că infarctele cerebrale au apărut mai frecvent la persoanele de sex masculin - 51% și mai puțin frecvent la persoanele de sex feminin - 49%.

Studiul distribuției ischemiei cerebrale în funcție de mediul de proveniență ne-a permis să remarcăm că există diferențe majore între mediul urban și cel rural - 61 % din cazuri au provenit din mediul rural și numai - 39% din cazuri din mediul urban, aspecte care ridică probleme deosebite privind asistența medicală în mediul rural, modalitatea de alimentație și măsurile de prevenție în aceste zone.

În ceea ce privește repartitia pe grupe de vârstă, incidența cea mai mare s-a înregistrat în intervalul de vârstă 65-74 ani - 33%. Repartitia anuală a AVC ischemice a fost foarte apropiată de la un an la altul.

Mortalitatea generală la pacienții internați în perioada 2010-2014 cu AVC

ischemic în Spitalul de Clinic de Neuropsihiatrie din Craiova, a fost de 3,3%; cea mai mică a fost înregistrată în anul 2013 când s-au găsit doar 0,28% decedați din totalul pacienților internați cu AVC ischemic, iar cea mai mare a fost în anul 2010 când s-a înregistrat un procent de 0,95% decese. Mortalitatea înregistrată la Spitalul Clinic de Neuropsihiatrie din Craiova este extrem de mică, nu corespunde gravității afecțiunii, deoarece majoritatea pacienților cu AVC cu prognostic nefast sunt externați la cererea familiei și decesul se înregistrează la domiciliul pacientului.

Dintre factorii etiopatogenici analizați, doctoranda a remarcat că, HTA este factorul de risc cel mai frecvent (73%), urmat de cardiopatie ischemică (62%), fumatul (38%), dislipidemie (35%), fibrilația atrială (27,2%), abuzul de alcool (26,8%), diabetul zaharat (16,8%), AIT în antecedente (11,4%), obezitate (4,8%).

Tulburările neurologice predominante la internare au fost deficitul motor - 52,5%, tulburările de limbaj și de vorbire - 31,1%, tulburările senzitive - 4,8%, tulburările sugerând afectarea teritoriului posterior - 6,5%, tulburările de câmp vizual - 2,2%, alterarea stării de conștiență a fost consemnată, la internare, la un număr relativ mic de pacienți (2,3%), explicabil prin relativa rapidă prezentare la urgență și spitalizare.

Explorarea imagistică cerebrală de bază, în urgență și în cursul spitalizării, a fost CT, efectuată la toți cei 6931 de pacienți. În ceea ce privește topografia vasculară a leziunilor tomografice, cele mai frecvente au fost în teritoriul ACM - 88,5% din totalul infarctelor cerebrale.

Principalii factori de prognostic nefavorabil în lotul studiat: vârsta peste 75 de ani și comorbiditățile majore (diabetul zaharat, hipertensiunea arterială necontrolată); localizările „strategice” ale AVC și coma la debut; complicațiile neurologice majore ale stroke-ului ischemic (transformarea hemoragică, efectul de masă și recurența AVC); complicațiile cardiace (sindromul coronarian acut și insuficiența cardiacă).

CAPITOLUL VI

STUDIUL HISTOLOGIC AL ACCIDENTELOR VASCULARE CEREBRALE ISCHEMICE

Pentru **studiul histopatologic** s-au utilizat fragmente de encefal recoltate cu ocazia efectuării necropsiei de la un număr de 43 de pacienți, diagnosticați clinic și imagistic cu accident vascular cerebral ischemic, internați în Spitalul Clinic de Neuropsihiatrie din Craiova în perioada 2010-2014. Preparatele histologice au fost colorate cu hematoxină-eozină, cea mai utilizată metodă de evidențiere a țesuturilor.

Pornind de la ideea că modificările țesutului nervos sunt extrem de diferite de la o zonă la alta, în funcție de mărimea focarului ischemic, de vasele interesate de procesul fiziopatologic ischemic, de circulația colaterală și de prezența eventualelor anastomoze, precum și de starea generală a sistemului vascular cerebral, de eventualele comorbidități, doctoranda a evaluat procesul de ischemie neuronală, modificările parenchimului cerebral la nivelul leziunii și perilezional (în zona de penumbră ischemică), evidențierea modificărilor microcirculației cerebrale, prezența procesului inflamator, evidențierea procesului de moarte neuronală prin apariția modificărilor neuronale premergătoare morții neuronale.

S-a evidențiat că în zona lezională marea majoritate a neuronilor, cât și celulele gliale au suferit un proces de necroză. În zonele de la periferia miezului focarului de infarct (penumbra ischemică), s-a evidențiat prezența neuronilor caracteristici "neuroni roșii" sau neuroni ischemici, fantome neuronale și neuroni condensați. Infiltratul inflamator a fost unul moderat, fiind reprezentat de limfocite, plasmocite, granulocite și rare macrofage. Ischemia cerebrală a dus la necroze celulare masive care a atras leucocitele din vasele sanguine indemne ceea ce denota ca infiltratul inflamator a fost mai bine reprezentat perivascular.

În ceea ce privește leziunile parenchimului cerebral s-au evidențiat necroza tisulară cu dispariția corpilor neuronali, dar și aspectul spongios al scoartei cerebrale ca urmare a degenerescentei prelungirilor nervoase; neuronii roșii, hipertrofiați cu citoplasma acidofilă, ca urmare a paraliziei mecanismelor care mențin homeostazia membranei neuronale.

La nivelul vaselor meningocerebrale cele mai importante modificări au fost cele de arterioscleroză și hialinoază vasculară, cu leziuni intraparietale, ceea ce a condus la dezorganizarea peretelui arterial cu variate aspecte: perete îngroșat uniform sau neuniform, cu numeroase fibre de colagen dispuse concentric în tunica medie, cu dispariția aproape totală a fibrelor musculare netede din structura peretelui vascular sau perete destructurat cu aspect telescopat.

CAPITOLUL VII

STUDIUL IMUNOHISTOCHIMIC AL ACCIDENTELOR VASCULARE CEREBRALE ISCHEMICE

În completarea datelor de microscopie, am efectuat și un **studiu imuno-histochimic**, prin utilizarea următorilor imunomarkeri: CD34 – folosit pentru

evidențierea modificărilor vasculare; NeuN – pentru evidențierea modificărilor neuronale; Olig2 – pentru a vedea reacția oligodendroglilor; Caspaza-3 – pentru studiul apoptozei neuronale; CD3 – pentru evidențierea limfocitelor T; CD20 – pentru evidențierea limfocitelor B; CD68 – pune în evidență sistemul monocito-macrofagic; IBA1 – pentru a pune în evidență microgliile; GFAP – pentru evidențierea astrocitelor.

Leziunile vasculare au apărut în special în partea superficială a scoarței cerebrale, mai ales la nivelul vaselor subpiale, peretele acestora apărând deteriorat și frecvent cu edem perivascular mare și chiar cu infiltrate hemoragice, am întâlnit și o depleție neuronală, cu deformarea corpurilor neuronali și condensarea materialului nuclear, practic în această zonă foarte puțini neuroni au mai fost reactivi la NeuN. Oligodendrocitele au fost și ele la fel de sensibile la ischemie ca și neuroni, evidențiindu-se o reacție negativă a acestora în zona ischemică.

Pentru evaluarea procesului de apoptoză neuronală am ales pentru studiu zonele cerebrale din apropierea focarului ischemic. Deși procesul de moarte celulară prin necroză, autofagie sau prin autoliză este prezent, în zonele adiacente focarului ischemic, neuronii au murit de asemenea și prin apoptoză, prezentă în zonele perilezionale și pusă în evidență prin prezența unei reacții pozitive la caspaza-3.

Atât la nivelul focarului necrotic, dar și în restul parenchimului cerebral reacția macrofagelor a fost una foarte intensă.

Elemente caracteristice în evaluarea răspunsului imun pe care le-am pus în evidență au fost prezența de infiltrate cu celule inflamatorii, predominant cu celule T, răspândite cu preponderență perivasculară, pe când limfocitele B au fost în număr redus, ceea ce demonstrează reactivitatea fiecărui individ.

Celulele gliale, respectiv microgliile, au reacționat rapid la ischemia cerebrală, constatându-se apariția unui număr mare de celule microgliale la nivelul focarului de necroză, iar astrocitele au reacționat mai mult în zona de penumbră ischemică.

CAPITOLUL VIII

EVALUAREA REACȚIEI INFLAMATORII ȘI MODIFICĂRILE PARENCHIMULUI CEREBRAL LA ȘOBOLANII TRATAȚI CU ANTIINFLAMATOARE ȘI/SAU NEUROTROFICE

Studiul s-a desfășurat în perioada ianuarie 2016-februarie 2018, în Biobaza Universității de Medicină și Farmacie din Craiova, pe șobolani albi din rasa Wistar, cu vârsta cuprinsă între 3 și 6 luni. Modelul experimental de infarct cerebral s-a realizat

prin cauterizarea ACM.

Șobolanii au fost împărțiți în trei grupuri mari de studiu, fiecare grup având un total de 8 șobolani și grupul control având un număr de 4 șobolani astfel: primul grup tratat cu AINS, al doilea grup tratat cu neurotrofice, al treilea grup tratat cu AINS+neurotrofice și al patrulea grup la care s-a administrat ser fiziologic. Subgrupurile au avut perioadă de supraviețuire până la recoltarea encefalului de: 7,14,21 și 28 zile

La fel ca și în cazul encefalului uman și pe cel recoltat de la șobolan, am realizat un studiu histologic și imunohistochimic pentru a determina impactul agenților de neuroprotecție asupra parenchimului cerebral după producerea ischemiei.

Studiul histologic realizat la ambele loturi de șobolani, tratați și cel martor, a arătat modificări similare cu cel produs pe materialul uman, cu precizarea că pe măsura evoluției în timp, reacția inflamatorie scade în intensitate, se accentuează pierderile neuronale asociate cu modificări vasculare diverse, de la congestie vasculară până la edem perivascular. O altă constatare a fost că ritmul de degradare a țesutului cerebral a încetinit ușor la o lună de la producerea ischemiei față de degradarea accentuată sesizată la intervalele de timp precedente, ceea ce denotă că neuronii care au rămas rezistenți (viabili) au început să se adapteze la condițiile de hipoxie cerebrală.

Pentru o înțelegere cât mai exactă a modificărilor ce au loc la nivel cerebral, după producerea ischemiei am realizat și un studiu imunohistochimic, markeri utilizați de această dată au fost reprezentativi de: NeuN - pentru viabilitatea neuronală, GFAP - pentru reacția astrocitelor, Caspaza-3 - pentru apoptoza neuronală și alfa SMA - pentru celulele mioepiteliale din structura pereților vasculari.

În cazul lotului martor netratat cu AINS și neurotrofice, numărul de neuroni NeuN pozitivi a fost mult mai redus. La nivelul focarului de necroză, neuronii au fost în totalitate distruși, iar zona de penumbră ischemică a avut o întindere mai mare comparativ cu cei tratați. La lotul martor, unde zona de ischemie s-a extins considerabil, reacția astrocitelor a fost absentă, iar în zona de penumbră ischemică, s-a remarcat o reacție moderată a acestora.

Zonele alese pentru studiul procesului de apoptoza neuronală au fost din apropierea focarului ischemic, din zona de penumbră ischemică, pentru că necroza ischemică a dus la moarte neuronală inclusiv a neuronilor care erau în diferite faze ale apoptozei, rezultatele fiind caspazo-negative în zona de focar. Procesul de apoptoză a afectat în aceeași măsură ambele loturi, nefiind influențat de acțiunea moleculelor utilizate.

CONCLUZII

Coroborând rezultatele celor patru studii, s-au stabilit următoarele corelații clinico-histologice:

- reacția inflamatorie și degradarea țesutului cerebral au fost intense, în faza acută, scăzând în intensitate pe măsura evoluției în timp;
- agenții antiinflamatori și neurotofici folosiți au avut ca efect limitarea zonei de penumbră ischemică;
- întreaga microcirculație cerebrală a prezentat modificări microscopice în AVC ischemic, indiferent de timpul scurs de la producerea leziunii până la examinarea histologică;
- complicațiile neurologice majore ale stroke-ului ischemic - fenomenul de transformare hemoragică, edemul cerebral (surprins histologic sub forma edemului perivascular și perineuronal) au fost obiectivate microscopic, indiferent de timpul scurs de la producerea leziunii până la examinarea histologică.

BIBLIOGRAFIE

1. **Lopez AD**, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJ. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet* 2006; 367: 1747-1757.
2. **Rothwell PM**, Giles MF, Flossman E. et al. A simple score to identify individuals at high early risk of stroke after a transient ischemic attack. *Lancet* 2005 Jul 2-8; 366(9479):29-36..
3. **Barnett HJ**. Stroke prevention in the elderly. *Clin Exp Hypertens*. 2002 Oct-Nov; 24(7-8):563-71 .
4. **Brown AW**, Marlowe KJ, Bjelke B. Age effect on motor recovery in a postacute animal stroke model. *Neurobiol Aging*. 2003 Jul-Aug; 24(4):607-14.
5. **Badan I**, Platt D, Kessler C. et al. Temporal dynamics of degenerative and regenerative events associated with cerebral ischemia in aged rats. *Gerontology*,.2003 Nov-Dec; 49(6):356-65
6. **Markus TM**, Tsai SY, Bollnow MR et al. Recovery and brain reorganization after stroke in adult and aged rats, *Ann Neurol* 2005 Dec; 58(6):950-3.
7. **Asplund K**, Stegmayr B, Peltonen M. From the twentieth to the twenty-first century: A public health perspective on stroke. In: Ginsberg MD, Bogousslavsky J. (eds.)

Cerebrovascular Disease: Pathophysiology, Diagnosis, and Management. Blackwell Science, Malden, MA, 1998: 901-918;

8. **Zhu L**, Fratiglioni L, Guo Z, Aguero-Torres H, Winblad B, Viitanen M. Association of stroke with dementia, cognitive impairment, and functional disability in the very old: a population-based study. *Stroke*, 1998 Oct; 29(10):2094-9.
9. **Craioiu S**. Histologie – Curs pentru studenti anul II, Editura Sitech, 1999
10. **Choi BH**. Radial glia of developing human fetal spinal cord: Golgi, immunohistochemical and electron microscopic study, *Brain Res Dev Brain Res* 1981,1:249–267.
11. **Bajenaru O, Popescu O. Bogdan**. Elemente esentiale de neurologie clinica, Editura Medicala Amaltea, 2009.
12. **Hopkins J et al**. Human Biology and Health, Prentice Hall, 1993, 132–144.
13. **Hickey WF**. Basic principles of immunological surveillance of normal central nervous system. *Glia* 2001, 36: 118.