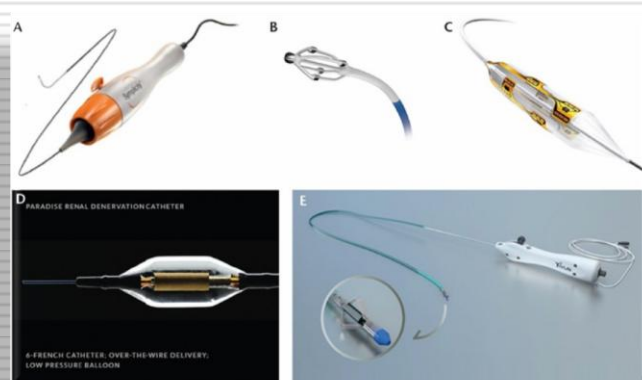


# Srovnání efektivity a bezpečnosti systémů katetrizační renální denervace v animálním modelu

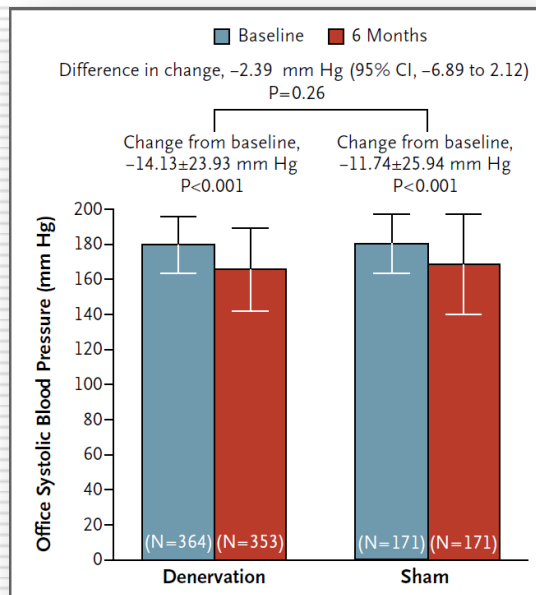
*M. Tábořský, D. Richter, A. Herman,  
L. Červenka, J. Kopkan a Z. Tonar*  
*XXIV. výroční sjezd ČKS*  
*17.5.2016*



Podpořeno grantem AZV, reg.číslo **15-34123A**

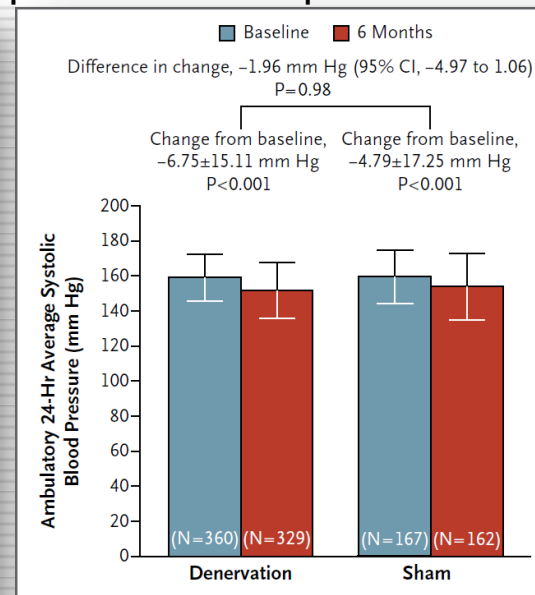
# Úvod

- Katetrizační renální denervace je deklarována jako intervenční metoda léčby hypertenze a dalších onemocnění v řadě humánních studií bez adekvátního hodnocení na základě přechozích experimentálních prací.



**Figure 1. Primary Efficacy End Point.**

A significant change from baseline to 6 months in office systolic blood pressure was observed in both study groups. The between-group difference (the primary efficacy end point) did not meet a test of superiority with a margin of 5 mm Hg. The I bars indicate standard deviations.



**Figure 2. Secondary Efficacy End Point.**

A significant change from baseline to 6 months in ambulatory 24-hour average systolic blood pressure was observed in both groups. The between-group difference (the secondary efficacy end point for which the study was powered) did not meet a test of superiority with a margin of 2 mm Hg. The I bars indicate standard deviations.

# Cíl práce

---

- Srovnání bezpečnosti a efektivity katetrizační renální denervace u laboratorního zvířete různými technickými způsoby za následného imuhistochemického hodnocení poškození sympatické inervace, stěny renální arterie tak i vlastního renálního parenchymu v akutní a chronické fázi.

# Histologické vyšetření

---

1. ověřit, zda na straně označené operátorem jako **„intervence“ došlo k histologicky patrnému poškození nervů probíhajících v anatomickém okolí renální tepny** a pokud ano, v jakém rozsahu
2. posoudit míru poškození cévní stěny renální tepny na straně označené jako „intervence“,
3. ověřit, zda v ledvině došlo k nějakým mikroskopicky patrným změnám na straně označené jako „intervence“,
4. vyhodnotit stav kůry a dřeně nadledvin,
5. porovnat nálezy na straně s proběhlou intervencí vs. na straně bez intervence
6. porovnat nálezy u obou typů katetrů.

# Metodika I

---

- V rámci projektu byla provedena renální denervace s použitím 2 systémů (Symplicity™, Medtronic, INC /M/ a EnligHTN™, St. Jude Medical, INC /B/) u 2 skupin po šesti zvířatech.
- V každé skupině byla ošetřena příslušným katetrem vždy jedna renální tepna, druhostranná byla kontrolou. Výkon byl spojen s angiografií před a po denervaci. Pro hodnocení akutní fáze byla po 48 hodinách opět provedena angiografie renálních tepen a následně proveden odběr vzorku pravé i levé ledviny s renální arterií včetně adventicie pro imunohistologickou analýzu.

# Metodika II

---

- Bezprostředně po odběru byly orgány propláchnuty fyziologickým roztokem a byly z nich odebrány histologické bločky. Z každého bločku bylo barveno u tepen min. 40 řezů, u vzorků ledviny a nadledviny min. 20 řezů.
- Metody základního barvení jsou hematoxylin-eosin, Verhoeffovým hematoxylinem se zeleným trichromem, Malloryho trichrome, orcein.
- Pro imunohistochemické metody byl použit detekční systém byl pro imunohistochemii Liquid DAB + Substrate (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) s 3,3'-diaminobenzidinem, jádra byla dobarvena Gillovým hematoxylinem.

# Rozdělení zvířat podle experimentálních skupina a typu použitého katetru

## Metoda Medtronic Symplicity

Ovce č.	Pohlaví	Počet aplikací do pravé renální tepny	Datum zákroku
<b>M1</b>	samec	6 aplikací	7. 9. 2015
<b>M2</b>	samec	7 aplikací	7. 9. 2015
<b>M3</b>	samec	7 aplikací	7. 9. 2015
<b>M4</b>	samec	10 aplikací	21. 9. 2015
<b>M5</b>	samice	9 aplikací	21. 9. 2015
<b>M6</b>	samice	10 aplikací	21. 9. 2015

## Metoda EnligHTN Basket

Ovce č.	Pohlaví	Počet aplikací do renální tepny	Datum zákroku
<b>B1</b>	samec	12 aplikací v hlavní větvi	8. 9. 2015
<b>B2</b>	samec	16 aplikací	8. 9. 2015
<b>B3</b>	samice	11 aplikací	8. 9. 2015
<b>B4</b>	samec	15 aplikací	22. 9. 2015
<b>B5</b>	samice	13 aplikací	22. 9. 2015
<b>B6</b>	samice	15 aplikací	22. 9. 2015

# Odběrové schéma pro vzorkování u každého jedince v experimentu

Strany u každého jedince	Orgán	Tkáňové bločky
<b>strana po intervenci</b>	renální tepna	proximodistálním směrem od aorty až k větvení segmentálních renálních tepen bylo s odstupem cca 3 mm odebráno 8 bloček pro příčný řez renální tepnou
	ledvina	bylo odebráno 8 tkáňových bloček s celou tloušťkou ledviny z následujících míst:
		1. kraniální pól ventrálně
		2. střední část ventrálně
		3. kaudální pól ventrálně
		4. kraniální pól dorzálně
		5. střední část dorzálně
		6. kaudální pól dorzálně
		7. mediální část u hilu
	8. laterální konvexita	
nadledvina	cca polovina orgánu (zbytek po části odebrané pro biochemickou analýzu)	
<b>strana bez intervence</b>	renální tepna	proximodistálním směrem od aorty až k větvení segmentálních renálních tepen bylo s odstupem cca 3 mm odebráno 9 bloček pro příčný řez renální tepnou
	ledvina	bylo odebráno 8 tkáňových bloček s celou tloušťkou ledviny z následujících míst:
		1. kraniální pól ventrálně
		2. střední část ventrálně
		3. kaudální pól ventrálně
		4. kraniální pól dorzálně
		5. střední část dorzálně
		6. kaudální pól dorzálně
		7. mediální část u hilu
	8. laterální konvexita	
nadledvina	cca polovina orgánu (zbytek po části odebrané pro biochemickou analýzu)	



# Metody barvení

Metoda	Vyhodnocení
hematoxylin-eosin	celkový přehled, síla stěny a jejích jednotlivých vrstev, zánětlivá infiltrace
Verhoeffovým hematoxylinem se zeleným trichromem (Kočová 1970) a Malloryho trichrom	celkový přehled, síla stěny a jejích jednotlivých vrstev, svalovina a vazivo cévní stěny, elastin, cévní stěny, fibrotizace nervi vasorum
orcein	elastin cévní stěny
imunohistochemický průkaz hladkosvalového aktinu, primární protilátka Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin, Clone 1A4 (Dako), ředění 1:100, pretreatment Target Retrieval Solution (DakoCytomation S1700), pH 9.0, 96°C, 20 min	specifický průkaz kontraktálního fenotypu hladkých svalových buněk stěny renální tepny
imunohistochemický průkaz neurofilament proteinu, primární protilátka Monoclonal Mouse Anti-Human Neurofilament Protein, Clone 2F11 (DakoCytomation), ředění 1:75, pretreatment Target Retrieval Solution (DakoCytomation S1700), pH 6.0, 96°C, 20 min	specifický průkaz intermediárního filamenta výběžků neuronů (Yuan et al., 2012)
imunohistochemický průkaz tyrosinhydroxylázy, primární protilátka Polyclonal Rabbit Anti-Tyrosine Hydroxylase (Dako Cytomation), pretreatment Target Retrieval Solution (DakoCytomation S1700), pH 9.0, 96°C, 20 min	specifický průkaz tyrosinhydroxylázy v adrenergních neuronech (Nascimento et al., 2015)
imunohistochemický průkaz endotelu, primární protilátka Polyclonal Rabbit Anti-Human Von Willebrand Factor (DakoCytomation), ředění 1:200, pretreatment 10 min chlazeným acetonem a Proteinase K	posouzení přítomnosti a průchodnosti vasa vasorum ve stěně tepny a nervi vasorum v nervech

# Kvantifikace histologické analýzy

---

- 7860 řezů renálními tepnami
  - 3840 řezů ledvinami
  - 3840 řezů nadledvinami
- 
- Zkušenost týmu: v humánní aplikaci RDN 123 pacientů 3 technickými systémy

# Technická charakteristika intervencí

---

Průměrný počet intervenovaných bodů tepny byl:

- $12 \pm 4$  (Symplicity, Medtronic)
- $14 \pm 5$  (EnligHTN, SJM),  $p=0,584$
- Pokles impedance během aplikace  $89 \pm 14$  x  $98 \pm 17$ ,  $p=0.047$
- Angiografické nálezy uloženy v PACS

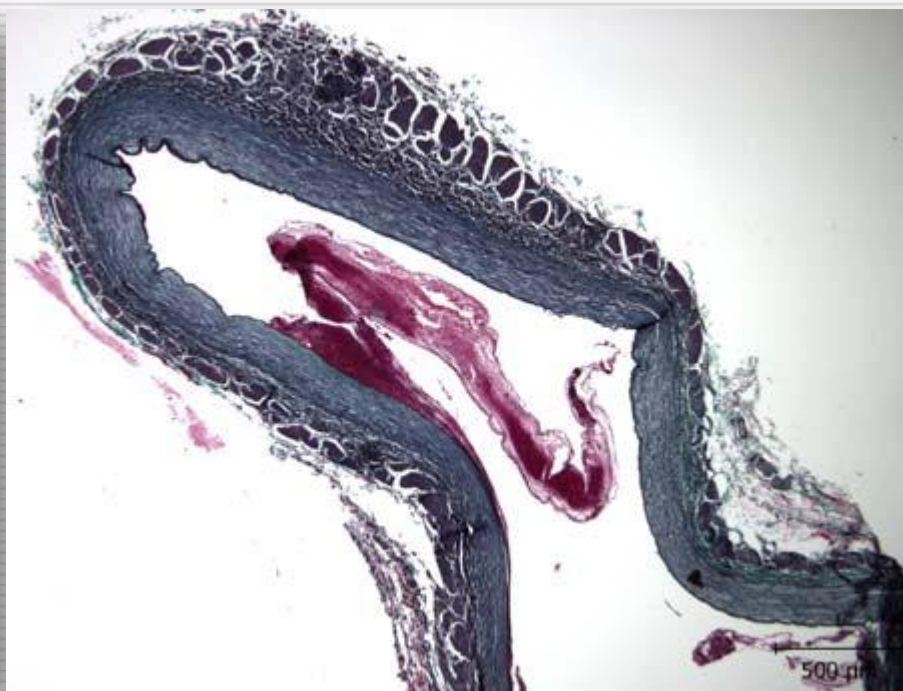
# Realizace experimentu



# Histologické nálezy I



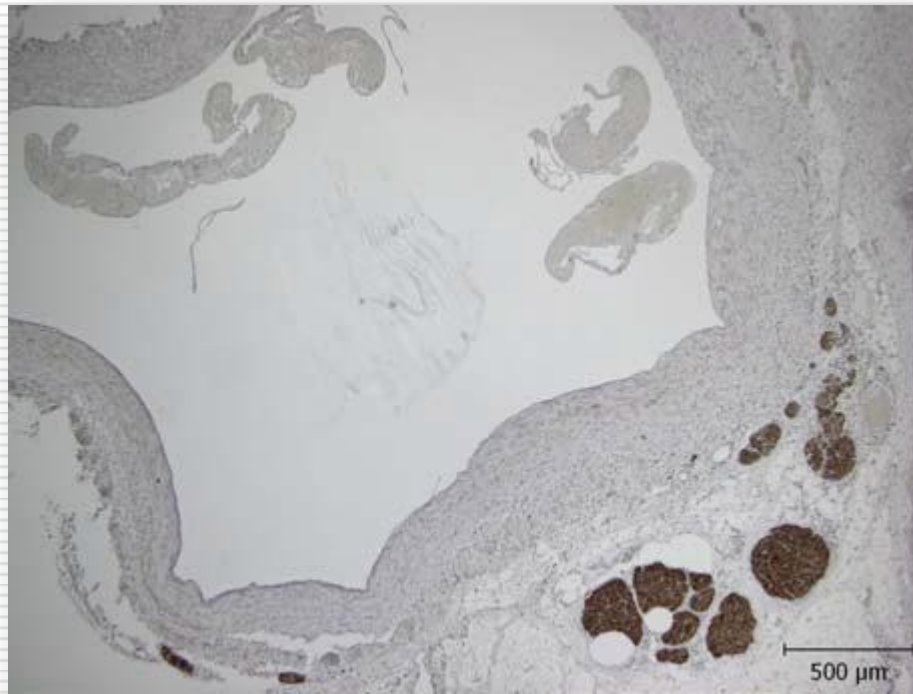
Proximální úsek tepny, uvnitř trombus, **stěna mírně stlačená (nahore)**. Vpravo dole nervy normálního vzhledu. Hematoxylin-eozin.



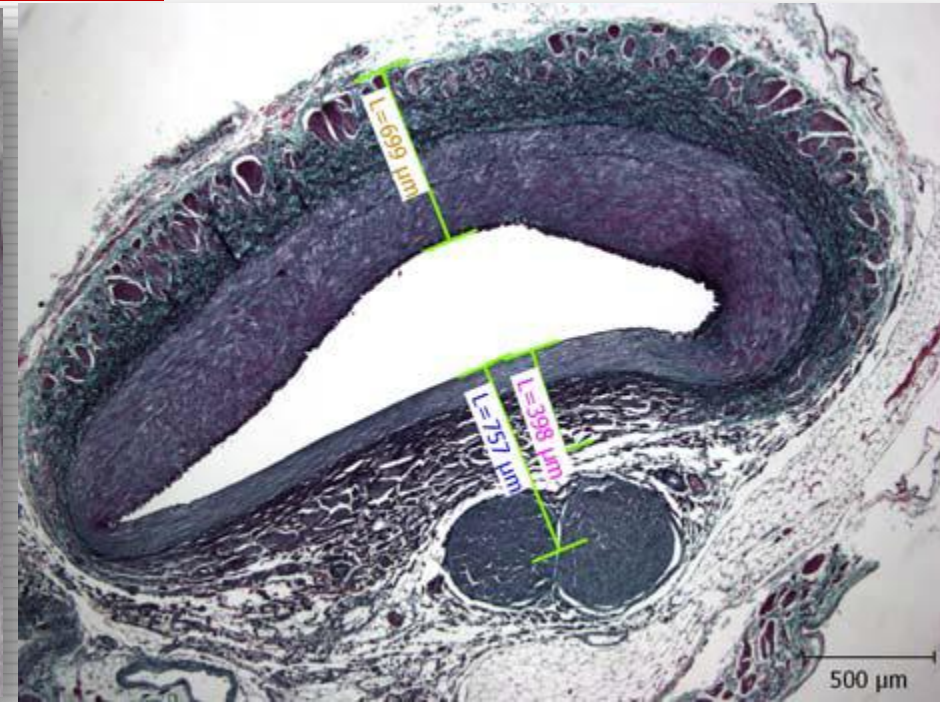
Střední úsek tepny s **patrnou mírnou kompresí a s nasedajícím trombem**. Zelený trichrom.



# Histologické nálezy II

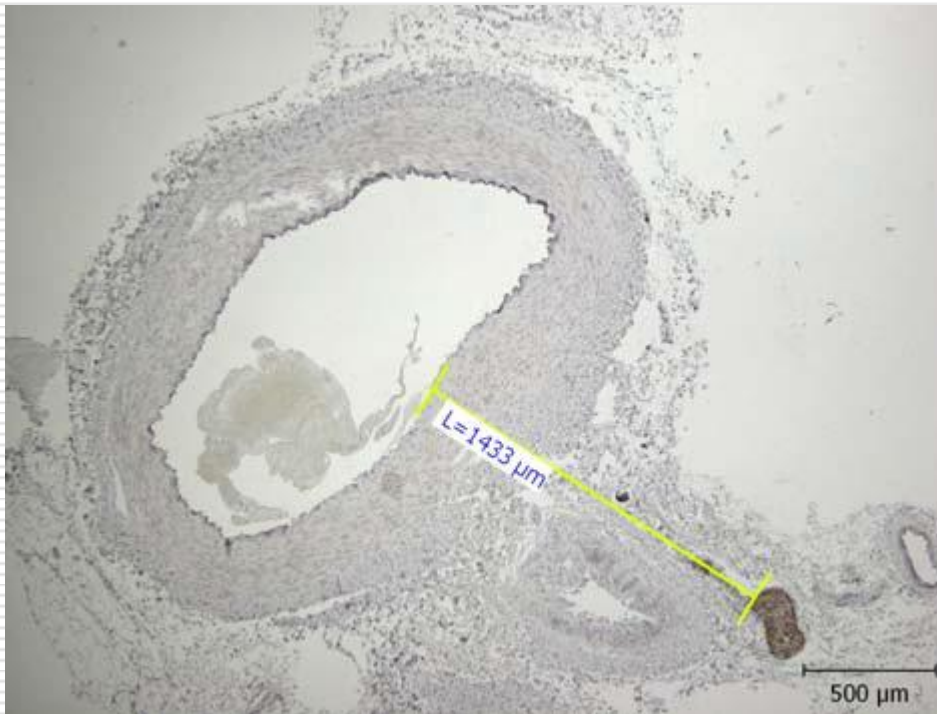


Imunohistochemický průkaz neurofilament proteinu ve středním úseku tepny ukazuje četné nervy zachovalé v jiném směru, než v němž je **stěna tepny ztenčená katetrizačním zákrokem.**

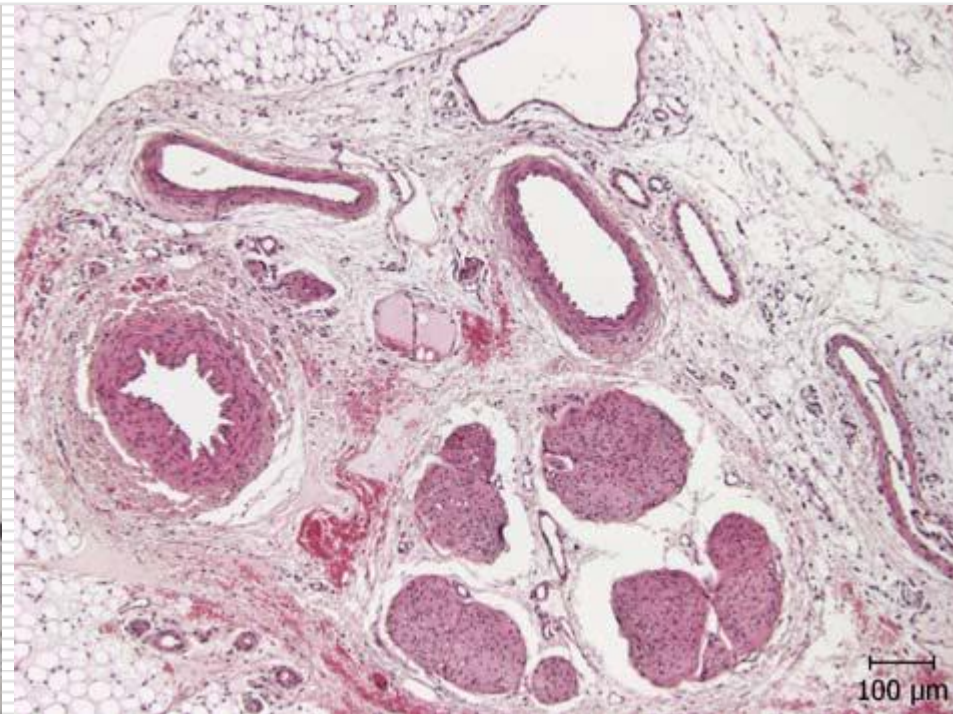


Stejný úsek, zelený trichrom. **Srovnání mezi normální silou stěny a zeslabenou stěnu v místě stlačení.** Nervy vzdálené 700-800 μm od místa působení katetru nejsou zničeny, ani významně poškozeny.

# Histologické nálezy III



Střední úsek tepny, stěna normálního vzhledu, nervy se však nacházejí až 1,5 mm od lumina. Trhliny ve stěně jsou artefakty. Imunohistochemie, neurofilament protein.



Nervy beze známek poškození jsou vzdálené 1,5 mm od lumina tepny mimo směr, v němž stěna tepny vykazuje poškození. Hematoxylin-eozin.

# Výsledky I

---

- ❑ **Ani u jedné ze skupin nebylo u žádného zvířete dosaženo úplného zničení sympatické inervace.**
- ❑ I přes poškození jednotlivých nervů v proximálním a středním úseku renální tepny u některých zvířat byly u všech zvířat nalezeny jiné zcela normální nervy, a to včetně distálního úseku tepny.
- ❑ Poškození nervů tedy bylo omezeno pouze na oblast intervence a během dvou dnů od intervence nedocházelo k odumření distálních částí nervů, alespoň ne ve větším měřítku.
- ❑ Experimentem tedy nebylo prokázáno histologické přerušení inervace ledvin (či nadledvin) u žádné ze skupin.



# Výsledky II

---

- Nejzávažnějším nalezeným poškozením nervů (zejména u skupiny B) byl rozpad vnitřní struktury nervu s lokálním rozkladem neurofilament (což jsou intermediární filamenta nutná pro oporu a axonální transport nervovými výběžky), se zánikem trofických vasa nervorum, s rozpadem jader Schwannových gliových buněk, s vymizením hranic Schwannových a myelinových pochev a s poškozením endoneuria.
  
- Toto poškození však u žádného zvířete nepostihovalo všechny přítomné nervy, ani většinu nervů.

# Výsledky III

---

- U skupiny B bylo možné nalézt ojedinělé nervy poškozené ve větší vzdálenosti od cévního lumina, zatímco u skupiny M byly poškozeny pouze nervy bezprostředně naléhající na poškozenou stěnu.
- Mezi jedinci jsou značné rozdíly v množství a hustotě nervů tvořících pleteň kolem renální tepny. U některých jedinců se tato pleteň brzy rozpadá, u jiných silnější svazky nervových vláken různě anastomozují.
- Samotná nervová pleteň se konstituuje z adventicie aorty a z retroperitoneálního vaziva v různé vzdálenosti od odstupu renální tepny z aorty.

# Závěr

---

- ❑ Histologická analýza experimentu s porovnáním dvou metod radiofrekvenční ablace nervů provádějících renální tepnu u ovce byla založena na zhotovení a vyšetření více než 11 500 řezů renálními tepnami, ledvinami a nadledvinami, které jsou ve zprávě ilustrovány na 240 snímcích s popsány nálezy.
- ❑ U orgánů na straně bez intervence nebyly nalezeny žádné známky poškození. U orgánů na straně po provedené intervenci byly u všech zvířat byly nalezeny akutní známky poškození cévní stěny.
- ❑ Zatímco intenzita změn cévní stěny byla u obou skupin srovnatelná, v poněkud větším rozsahu byla nalézána u vzorků skupiny B nežli u skupiny M.
- ❑ **Rozrušení mikrostruktury nervů či jejich lokální překrvení bylo u obou skupin omezeno na nervy přiléhající k místu poškození cévní stěny a bylo častěji pozorováno u skupiny B nežli u skupiny M.**
- ❑ U žádného zvířete v žádné ze skupin však nedošlo k úplnému zničení nervových pletení kolem renální tepny a v obou skupinách bylo nalezeno množství nervů bez mikroskopických známek poškození.
- ❑ Ledviny ani nadledviny nebyly během experimentu významně poškozeny.



M.T: Brno, Černopolní 45, 30.4.2016



Komplexní  
kardiiovaskulární  
centrum



Lékařská fakulta  
Univerzity Palackého  
v Olomouci



I. INTERNÍ KLINIKA  
KARDIOLOGICKÁ  
FAKULTNÍ NEMOCNICE OLOMOUC