



MD 2930 G2 2005.12.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) 2930 (13) G2

(51) Int. Cl.: A61B 5/00 (2006.01)
A61B 5/145 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

<p>(21) Nr. depozit: a 2005 0019 (22) Data depozit: 2005.01.18</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2005.12.31, BOPI nr. 12/2005</p>
<p>(71) Solicitant: INSTITUȚIE MEDICO-SANITARĂ PUBLICĂ, INSTITUTUL DE CARDIOLOGIE AL MINISTERULUI SANATĂȚII DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD</p> <p>(72) Inventatori: IVANOV Victoria, MD; POPOVICI Mihail, MD; COSTIN Sava, MD; POPOVICI Ion, MD; COBEȚ Valeriu, MD; CIOBANU Lucia, MD</p> <p>(73) Titular: INSTITUȚIE MEDICO-SANITARĂ PUBLICĂ, INSTITUTUL DE CARDIOLOGIE AL MINISTERULUI SANATĂȚII DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD</p>	

(54) Metodă de evaluare a afecțiunilor endoteliale ale vaselor coronare și a
capacității lor de regenerare

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la medicină, în special la
cardiologia clinică și experimentală și poate fi
aplicată pentru evaluarea afecțiunilor endoteliale ale
vaselor coronare și a capacității lor de regenerare.

5
10
Esența invenției constă în determinarea numă-
rului de celule endoteliale predecesoare de origine
medulară în sânge, precum și în determinarea *in*
vitro a valorii procentuale de celule aderate la

2
substratul celular și numărului de celule vii în
cultură la a 7-ea zi și, în cazul în care valorile
respective obținute sunt mai mici de 65 celule/mL,
84% și 350 celule/mm², se constată o afectare a
unei sau două artere coronare și o capacitate scăzută
de regenerare a afecțiunilor endoteliale.

Revendicări: 1

MD 2930 G2 2005.12.31

Descriere:

Invenția se referă la medicină, în special la cardiologia clinică și experimentală și poate fi aplicată pentru evaluarea afecțiunilor endoteliale ale vaselor coronare și a capacității lor de regenerare.

5 Alterarea endotelială a vaselor coronare este cauza oportună a afecțiunilor ischemice ale cordului și insuficienței cardiace, precum și a sindromului coronar acut și a complicațiilor lui fatale: infarctul miocardic acut și tromboembolia. De asemenea afectarea endoteliului contribuie la o remodelare detrimentală a vasului, datorită activării proliferației, hiperplaziei și hipertrofiei structurilor vasculare, fenomene modulate de factorii endoteliali, ca urmare se amplifică și mai mult disabilitatea funcțională a bazinului coronar.

10 Conceptual, alterarea endotelială este determinată de procesul de ateroscleroză, și, în special, de destabilizarea plăcii ateromatoase, care la rândul său conduce la expansiunea alterărilor endoteliale.

Diagnosticul prompt și veritabil al alterărilor endoteliale ale vaselor coronare este o problemă dificilă a cardiologiei, rezolvarea căreia consemnează întreprinderea la timp a măsurilor de profilaxie primară și secundară a evenimentelor coronariene sau corecția conduitei terapeutice existente, având ca scop final ameliorarea calității vieții și a indicilor morbidității și mortalității.

15 Arsenalul actual al posibilităților de estimare directă sau indirectă a alterării endoteliale a coronarelor însumă următoarele entități.

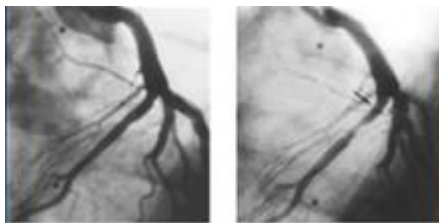
Determinarea serică a fibrinogenului și a D-dimerului, ca markeri ai tulburării hemostazei [1].

20 Determinarea serică a homocisteinei, ca un marker al trombogenezei [2]. Conceptual este validat rolul activării sistemelor celular și umoral de inducere a perturbărilor reologice a sângelui în patogenia afecțiunilor endoteliale, inclusiv coronare. Testul respectiv posedă o informație relativă doar despre un factor de risc al afectării endoteliale determinate de dezaranjamentele hemostazei.

Determinarea serică a colesterolului (LDL, VLDL, HDL) și a proteinei C reactive, ca markeri biochimici ai aterosclerozei [3].

25 Dezavantajele constau în aceea că indicii au un caracter prolix referitor la gradul de afectare aterosclerotică a endoteliului vaselor coronare, nu corelează autentic cu gradul disabilității endoteliale și nu apreciază potențialul sistemului natural celular reparativ al endoteliului. Totodată, acești markeri au o specificitate și o sensibilitate relativ joasă, deci pot avea valori neînsemnat deviate de la normă în prezența unei ateroscleroze coronare notabile, mai ales când ultima se datorează cu precădere tulburărilor hemostazei.

30 Coronarografia este o metodă invazivă, informativă în vederea aprecierii topografice a alterărilor coronare și a gradului de stenoză, dar care nu indică despre capacitatea de regenerare a endoteliului coronar și endocardic. Totodată, este o metodă traumatică și foarte costisitoare. La pacienții cu afecțiuni endoteliale coronariene atestate prin coronarografie (**A2** – ramura arterei *coronaria sinistra* este cu elemente de obstrucție și degenerescență aterosclerotică asociată de injurii endoteliale) s-a depistat după metoda propusă diminuarea semnificativă a numărului de celule endoteliale predecesoare (progenitoare) circulante. Aceasta corelează și cu evidențele morfologice obținute la examenul ultrastructural al biopțatelor endoteliale coronariene – **B2** – endoteliocitele sunt structural dezaranjate, estropiate, cu spații interendoteliocitare majorate [4]. Dar coronarografia nu permite de a
35 de evalua capacitatea virtuală de reparare a defectelor coronariene, deci nu oferă sugestii de prognoză și de optimizare a conduitei terapeutice. Acest deziderat poate fi rezolvat prin metoda propusă, fiind la această conotație determinată abilitatea celulelor endoteliale progenitoare (predecesoare) circulante de
40 adeziune și proliferare în cultură de celule.

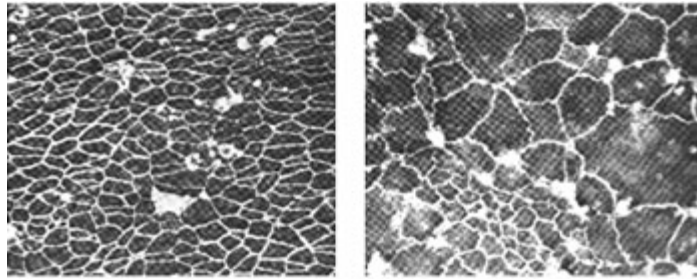


45 A1-normal

A2

MD 2930 G2 2005.12.31

4



B2-normal

B2

5 Toate aceste metode, care astăzi reprezintă eșalonul întâi în diagnosticul afecțiunilor endoteliale, nu oferă posibilitatea de apreciere a capacității sistemului celular de reparație a defectelor endoteliale, care este reprezentat în mod natural de celulele endoteliale predecesoare (CEP). Deci, nu posedă valoare pronosticativă și un sufragiu concludent pentru direcționarea conduitei terapeutice în vederea obținerii unui reviriment notabil în acest sens.

10 Problema pe care o rezolvă invenția constă în aceea că afecțiunile coronariene sunt determinate de alterarea endoteliului coronarian care facilitează remodelarea detrimentală a vaselor inimii și care anticipează evoluția simptomatică a maladiei, fiind totodată cel mai fidel predicator al prognozei ei. Evaluarea diagnostică a leziunilor coronariene este o problemă de alertă a cardiologiei, care impune necesitatea unor teste de apreciere a potențialului de regenerare a injuriilor coronariene pentru corecțiile adecvate ale măsurilor de profilaxie secundară și terțiară. Metoda propusă este o metodă
15 neinvazivă, care evidențiază afectările vaselor coronariene și totodată pronosticul afecțiunilor prin determinarea numărului de celule endoteliale predecesoare de origine medulară în sânge și a numărului de celule vii în cultură.

20 Eșența invenției constă în determinarea numărului de celule endoteliale predecesoare de origine medulară în sânge, precum și în determinarea *in vitro* a valorii procentuale de celule aderente la substratul celular și a numărului de celule vii în cultură la a 7-ea zi și, în cazul în care valorile respective obținute sunt mai mici de 65 celule/mL, 84% și 350 celule/mm², se constată o afectare a unei sau două artere coronare și o capacitate scăzută de regenerare a afecțiunilor endoteliale.

25 Rezultatul invenției constă în stabilirea numărului de celule endoteliale predecesoare de origine medulară în sânge și a numărului de celule vii în cultură, care determină un tablou mai evident al afecțiunilor vaselor coronariene și totodată este o metodă de explorare *in vitro* (este necesar doar sângele pacientului) care nu invocă careva complicații pacientului.

Ansamblul de elemente necesare pentru obținerea rezultatului garantat de invenție:

30 1. Prezența liganzilor pentru markerii hematopoietici (CD34, CD14, CD 133), cât și pentru markerii endoteliali (VEGFR2-receptorul sau Flk1/KDR, CD31- receptor pentru PECAM) pentru identificarea CEP din sângele pacientului. Acești liganzi pot fi procurați și utilizați într-o gamă foarte variată.

35 2. Echipamentul tehnic necesar în acest sens este compatibil cu posibilitățile centrelor medicale din republică.

3. Echipamentul tehnic standard de investigare a CEP identificate prin liganzii menționați în cultura de celule este de asemenea compatibil cu posibilitățile centrelor medicale din republică.

Aproximativ cu 40 ani în urmă s-a consemnat fenomenul de creștere a endoteliului sub acțiunea unor componente ale sângelui (Stump M.M., Jordan G.L., Debakey M.E., Halpe T.B. Endothelium grown from circulating blood on isolated intravascular Dacron Hub. Am J Pathology, 1963, 43, 361-367). Actualmente s-a precizat în acest context rolul CEP. Ele au origine medulară și se consideră că sunt pornite de la hemangioblastul măduvei oaselor, celula primară embrionară stocate în sinusurile capilare din măduvă. CEP, astfel, conțin atât markeri hematopoietici (CD34, CD14, CD 133), cât și markeri endoteliali (VEGFR2-receptorul sau Flk1/KDR, CD31- receptor pentru PECAM, molecula de adeziune endotelială a plachetelor, expresată pe celulele endoteliale coronare și cardiace). Sechestrarea lor în sânge se produce sub acțiunea diferitor stimuli, eliberați cu predilecție în condiții de hipoxie, ischemie, stres, activarea sistemului neuroendocrin și citokinic, printre care VEGF fiind recunoscut cel mai potent factor. Luând sediul în locul defectului endotelial coronar (mecanismele
40 acestui fenomen nu sunt încă pe deplin cunoscute) CEP diferențiază, proliferază și preiau fenotipul celulelor endoteliale mature, asigurând astfel creșterea stratului endotelial, regenerarea alterației și restabilirea funcției respective. Acest proces natural se desfășoară încontinuu, dar în diferite condiții patologice procesul de regenerare a stratului endotelial este deapreciat, fapt ce poate rezulta din:
50

- eliberarea subdenivelată a CEP din miezul osos hematopoietic;

MD 2930 G2 2005.12.31

- micșorarea capacității lor de aderare la endoteliocitele alterate în baza expresiei joase a markerilor endoteliali de pe suprafața CEP sau a moleculelor de adeziune intercelulară de pe suprafața endoteliocitelor;
- capacitatea proliferativă precară a CEP, care fiind totuși aderate și cantonate în locul alterării vasului coronar demonstrează un coeficient de diviziune celulară mic și ca urmare o creștere slabă a endoteliului. În acest context se poate prezuma și prezența unui fenotip endotelial strupiat, deci cu o abilitate joasă de sinteză a monooxidului de azot (NO), factorul endotelial oportun în modelarea proceselor de remodelare vasculară și cardiacă.

De menționat că injecția CEP la animale cu diferite modele de ischemie cardiacă a crescut neovascularizația (Carmen Urbich, Stefanie Dimmeler. Endothelial progenitor cells. Functional characterization. // Trends Cardiovasc Med, 2004, 14, 2-318).

Așadar, este evident că determinarea indicelui numeric al CEP circulante în sânge la pacienții suspecți la afecțiuni endoteliale coronare poate fi o metodă originală și de mare considerație în plan de evaluare a gradului de afectare endotelială a coronarelor, dacă în realitate se consenmează o corelație semnificativă a modificărilor lui cu alterările structurale coronare atestate prin cea mai informativă metodă actualmente de diagnostic în acest sens, coronarografia. Tot atât de importantă este și evaluarea indicelui funcțional al CEP circulante (*i.e.* capacitatea lor de aderare și proliferare) de asemenea în corelație cu profunzimea alterărilor coronariene în examenul de coronarografie, dat fiind că perturbările acestui indice aduc la apel capacitatea diminuată a regenerării endoteliale, chiar dacă indicele numeric nu suportă devieri considerabile.

Aceste opțiuni conceptuale au consemnat esența metodei propuse. Interesul față de studiul indicilor cantitativ și funcțional al CEP a fost inițial determinat de creșterea numerică marcată a acestor celule în sânge la pacienții cu tumori, ce conduce la o angiogeneză sporită, producere exagerată de NO și hiperemie arterială regională marcată, rezultantă într-o aprovizionare elevată cu oxigen a creșterii necontrolate a celulelor tumorale (Vajkoczy P., Blum S., Lamparter M., et al. Multistep nature of microvascular recruitment of ex vivo-expanded embryonic endothelial progenitor cells during tumor angiogenesis. J Exp Med, 2003, 197, 1755-1765).

Exemplu de realizare.

La 24 pacienți (bărbați, vârsta cuprinsă între 42...54 ani; 49±4) cu alterare endotelială coronară documentată prin coronarografie s-a estimat indicele numeric al CEP după metoda acceptată (Quirici N., Soligo D., Caneva L. et al. Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133⁺ cells. Br J Haematol, 2001, 115, 186-94).

Indicele funcțional al CEP s-a estimat în cultură de celule, fiind la această conotație apreciată capacitatea de aderare după procentul CEP atașate de substratul cultural, precum și capacitatea de proliferare după numărul CEP la ziua a 7-ua de cultură în 1 mm².

Lotul de referință l-au constituit 15 persoane sănătoase, bărbați, aproximativ de aceeași vârstă (48±5 ani), la care în aceeași manieră s-au determinat indicii numeric și funcțional ai CEP.

Rezultatele obținute.

1. Caracteristica indicelui cantitativ (tabelul 1).

Numărul de celule endoteliale predecesoare circulante în sânge la persoane sănătoase și la pacienții cu afecțiuni endoteliale coronare și corelarea acestuia cu numărul de artere coronare alterate

Tabelul 1

Indice	Persoane sănătoase n=15	Pacienți cu afecțiuni endoteliale coronare n=24	Coeficientul de corelare cu numărul de artere coronare alterate
Numărul CEP (CD34+/VEGF2+) în 1 ml sânge	86,67±21,72	35,76±24,13 p<0,006	r= -0,602 p<0,05

La pacienții cu afecțiuni coronare numărul de CEP este concludent redus (mai mult de 2 ori, p<0,006) în sânge față de persoanele sănătoase. Important de menționat că declinul lor cantitativ este în corelație semnificativă (r = -0,602, p<0,05) cu numărul arterelor alterate decelate în angiografie.

Deci, la pacienții cu alterare coronariană numărul micșorat al CEP circulante poate fi o cauză concludentă a remodelării detrimentale a vaselor coronare, cel puțin în temeiul unui substrat celular redus de reparație a endoteliului, iar depistarea acestui fenomen este o opțiune diagnostică autentică a profunzimii alterărilor vasculare în bazinul coronarian.

MD 2930 G2 2005.12.31

2. Caracteristica indicelui funcțional (tabelul 2) este foarte importantă, deoarece, după cum s-a menționat mai sus decrementul numeric poate fi compensat printr-o capacitate de adeziune și proliferare potentă.

5 Valori ale indicelui funcțional al celulelor endoteliale predecesoare în cultură la persoane sănătoase și la pacienți cu afecțiuni endoteliale coronare și corelarea celor din urmă cu numărul de artere coronare alterate.

Tabelul 2

Indice	Persoane sănătoase n=15	Pacienți cu afecțiuni endoteliale coronare n=24	Coefficientul de corelare cu numărul de artere coronare alterate
Procentul CEP atașate de substratul celular	92,07±8,1	52,72±25,8 p<0,00142	r=- 0,695 p<0,05
Numărul CEP în cultură/1 mm ² la ziua a 7-ea	496,66±146,99	94,88±35,53 p<0,0009	r=- 0,716 p<0,05

10 2.A. Capacitatea de adeziune a CEP la pacienții cu afecțiuni coronare este semnificativ diminuată, procentul celulelor aderente fiind cu 43% depreciat față de indicele de referință. Acest indice de asemenea corelează semnificativ cu numărul de artere coronare afectate (r=-0,695, p<0,05).

2.B. Capacitatea proliferativă a CEP la pacienții cu afecțiuni coronare este de circa 4 ori mai slabă (p<0,0009) și corelează semnificativ cu numărul de artere coronare alterate (r=- 0,716, p<0,05).

15 Deci, la pacienții cu alterare coronariană micșorarea numărului CEP circulante este asociat de abilitatea lor notabil redusă *vis-a-vis* de aderarea la sediul în regiunile alterative ale coronarelor (în mod natural anume aici crește expresia diferitor molecule de adeziune intercelulară de captare a CEP circulante), precum și de proliferare, necesară pentru asigurarea creșterii ulterioare a endoteliului structural afectat. Astfel valoarea joasă a indicelui funcțional indubitabil indică despre o capacitate subminată de regenerare a endoteliului coronar despre ce elocvent consemnează și corelarea semnificativă cu numărul arterelor coronare afectate. Această evidență fortifică valoarea diagnostică a indicelui cantitativ și oferă informație autentică despre regenerarea virtuală a endoteliului, fapt ce constituie avantajul oportun față de metoda de aur de diagnostic a injuriilor coronare și însumă
20 sufragii argumentate referitor la corecția terapeutică *imprimis* prin administrarea remediilor ce
25 augmentează aderarea și proliferarea ECP, e.g. statine și estrogeni. Cu toate acestea metoda propusă este incomparabil mai ieftină față de coronarografie (costul unei probe fiind estimat la circa 1500 lei) și poate fi efectuată la o instruire rapidă în acest sens a specialiștilor.

Opțiuni de interpretare a datelor obținute prin metoda propusă

1. Gradul de micșorare a indicelui numeric al EPC în sânge față de valoarea lui normală acceptată de noi prin această metodă (circa 90 celule/ml) indică în proporții directe gradul de afectare endotelială a coronarelor, *i.e.* numărul de artere coronare alterate.
2. Dacă la aceasta se asociază și diminuarea capacității de adeziune a CEP în cultură se semnifică tulburarea în condiții naturale a sediului CEP circulante și cantonarea lor în zona alterării endoteliale a coronarelor și ca repercusiune se evidențiază o posibilitate virtuală redusă de regenerare a endoteliului.
3. Dacă în cultura celulară se decelează capacitatea proliferativă scăzută a CEP se concluzionează despre un randament mic de diviziune celulară în sens reparativ și se evidențiază de asemenea o posibilitate virtuală redusă de regenerare a endoteliului.
4. Evaluarea indicelui cantitativ, și în special a indicelui funcțional, merită a fi o măsură de pronosticare ultimativă în estimarea riscului sechelelor coronare dezvoltate după Bypass coronarian, *imprimis* restenozarea.
5. Metoda propusă poate fi utilizată în diagnosticul și prognozarea acțiunilor dărmtoare ale factorilor de risc a afecțiunilor cardiovasculare: diabetul zaharat, dislipidemiile, fumatul, sindromul metabolic X, hipodinia.

Exemplul 1

Pacientul N., 47 ani, suspectat la afecțiune endotelială coronară.

50 Estimări: 1. Examenul de coronarografie indică despre afectarea a 2 artere coronare ale arterei descendente stângă. 2. Nivelul colesterolului total sanguin la limita de sus admisibilă (5,45 mmol), iar proteina C-reactivă în valori normale. 3. Nivelul homocisteinei și al fibrinogenului - normal. 4a. Numărul de celule endoteliale predecesoare de origine medulară în 1 ml de sânge se estimează la 21. 4b. Procentul lor de aderare la substratul celular este de 29%, iar numărul lor în cultură la ziua a 7-ea se estimează la 69.

MD 2930 G2 2005.12.31

7

Exemplul 2

Pacientul N., 50 ani, suspectat la afecțiune endotelială coronară.

5 Estimări: 1. Examenul de coronarografie indică despre afectarea unei artere coronare din bazinul arterei diagonale. 2. Nivelul colesterolului total sanguin și proteina C-reactivă în valori normale. 3. Nivelul homocisteinei și al fibrinogenului - normal. 4a. Numărul de celule endoteliale predecesoare de origine medulară în 1 ml de sânge se estimează la 31. 4b. Procentul lor de aderență la substratul celular este de 44%, iar numărul lor în cultură la ziua a 7-ea se estimează la 85.

10 La ambii pacienți cu afecțiuni endoteliale coronare documentate prin coronarografie valorile marcherilor standardului diagnostic (colesterolul, proteina C-reactivă, homocisteina, fibrinogen) nu sunt deviate. Prin metoda propusă s-au apreciat valori diminuate ale numărului de celule endoteliale predecesoare de origine medulară în sânge sub 86 celule/ml (medie normală) și a indicelui funcțional: capacitatea de aderență sub 92% (medie normală) și capacitatea proliferativă sub 490 (medie normală).

15 Indicii cantitativ și funcțional corelează autentic cu numărul de artere coronare alterate decelate în coronarografie.

57) Revendicare:

20 Metodă de evaluare a afecțiunilor endoteliale ale vaselor coronare și a capacității lor de regenerare, care constă în determinarea numărului de celule endoteliale predecesoare de origine medulară în sânge, precum și în determinarea *in vitro* a valorii procentuale de celule aderate la substratul celular și a numărului de celule vii în cultură la a 7-ea zi și, în cazul în care valorile respective obținute sunt mai mici de 65 celule/mL, 84% și 350 celule/mm², se constată o afectare a unei sau două artere coronare și o capacitate scăzută de regenerare a afecțiunilor endoteliale.

(56) Referințe bibliografice:

1. Greenhalgh RM. D-dimer and platelet aggregation and peripheral arterial disease. Eur Heart J, 2002, 23, 1241-1242
2. Majors A., Sengupta S. Homocysteine binds to human plasma fibronectin and inhibits its interaction with fibrin. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002, № 22, p. 1354-1359
3. Ridker P., Rifai N., Rose L. et al. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. N Engl J Med. 2002, p. 347, 1557-1565
4. Kapp A., Kuttner M., Trabold T. et al. Multislice CT in cardiac and coronary angiography. British Journal of Radiology. 2004, p. 77, 87-97

Șef Secție:

GUȘAN Ala

Examinator:

GROSU Petru

Redactor:

LOZOVANU Maria