



UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
DIN CRAIOVA
ȘCOALA DOCTORALĂ

TEZĂ DE DOCTORAT

Rezumat

GREFA DE PIELE CU GROSIME COMPLETĂ ÎMBUNĂTĂȚITĂ CU FIBRINĂ BOGATĂ ÎN TROMBOCITE

Conducător științific

Prof. Univ. Dr. Marius Eugen CIUREA

Student Doctorand

Oliviu NICA



UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
DIN CRAIOVA
ȘCOALA DOCTORALĂ

Cuprins

Introducere	3
Stadiul cunoașterii.....	3
Contribuții personale.....	7
Concluzii	10



UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA ȘCOALA DOCTORALĂ

Introducere

Tratamentul plăgilor și arsurilor reprezintă, prin incidența foarte ridicată, o problemă importantă a chirurgiei plastice.

Grefa de piele este cea mai simplă și eficientă metodă folosită în chirurgia plastică reparatorie în tratamentul defectelor tegumentare.

De multe ori, însă, complicațiile pot periclita sever evoluția pacientului ars, iar în cazul localizării leziunilor la nivel articular, acestea pot genera impotență funcțională severă.

Acest studiu și-a propus să verifice potențialul beneficiu adus de preparatele bogate în trombocite, în rata și viteza de integrare a grefelor, reducerea incidenței complicațiilor și îmbunătățirea rezultatului funcțional și estetic. Accelerarea vindecării determină diminuarea morbidității și a spitalizării, îmbunătățind astfel calitatea vieții pacienților.

Pentru efectuarea acestui studiu, s-a urmărit atât clinic cât și histologic evoluția comparativă a grefelor de piele martor, cu cele tratate cu PRF, pentru a evidenția eventualele diferențe în vindecare.

Obiectivele acestui proiect au fost reprezentate de obținerea de noi informații, utile atât în cercetarea științifică, cât și în ajustarea protocoalelor operatorii, pentru a îmbunătăți procesul de vindecare al plăgilor și managementul pacienților.

Stadiul cunoașterii

Plastia cu piele liberă este cea mai simplă și eficientă metodă folosită în chirurgia plastică reparatorie în tratamentul defectelor tegumentare. De multe ori, însă, complicațiile reprezentate de lipsa de integrare a grefelor de piele sau de apariția cicatricilor vicioase hipertrofice, pot periclita sever evoluția pacientului ars.

Platelet-rich Plasma (PRP) este un preparat cu concentrație mare de trombocite și proteine plasmatică, derivat din sânge integral. Având o concentrație mai mare de factori de creștere decât sângele circulant, a fost folosit în mai multe specialități chirurgicale pentru accelerarea vindecării.



UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA ȘCOALA DOCTORALĂ

Platelet-rich Fibrin (PRF) este un biomaterial de generația a II-a; este alcătuit dintr-o membrană resorbabilă de fibrină bogată în trombocite ce permite eliberarea treptată a citokinelor și factorilor de creștere.

Metoda este utilă, minim invazivă (necesită recoltarea unei cantități insignifiante de sânge) și cu costuri scăzute.

Utilizarea PRF-ului ar putea fi aplicabilă atât în cazul arsurilor, cât și în cazul altor plăgi cu defect tegumentar.

Studiul în cauză a vizat tratamentul chirurgical al plăgilor cu lipsă mare de substanță, prin plastic cu piele liberă în toată grosimea, augmentată cu Platelet-rich Fibrin (PRF).

Pentru realizarea acestui studiu s-au practicat plăgi cu defect tegumentar, la nivel dorsal, pe șobolani Wistar. Leziunile din grupul de test au fost acoperite cu PRF și grefe de piele în toată grosimea. A fost evaluată calitatea grefelor clinic și histologic, iar rezultatele au fost comparate cu lotul de control.

Din cauza faptului că procesul de vindecare este imperfect, cicatrizarea continuă să fie o problemă clinică majoră. Chiar dacă au fost făcute progrese semnificative în înțelegerea procesului de vindecare, multe probleme fundamentale rămân nesoluționate.

Având în vedere numărul ridicat al pacienților care necesită grefe de piele pentru tratamentul arsurilor și al altor leziuni cu lipsă de substanță, posibilitatea aducerii unor beneficii în protocolul operator pentru accelerarea și îmbunătățirea vindecării și diminuarea complicațiilor, subliniază necesitatea efectuării acestui studiu. Accesibilitatea tratamentului, implementarea rapidă și ușoară, caracterul minim invaziv și costurile reduse conturează suplimentar importanța studiului.

Procesul de vindecare al plăgilor a fost intens studiat în ultimul secol, fiind bine înțeles și caracterizat din punct de vedere fiziologic și histologic.

Pielea este cel mai mare organ al corpului și îndeplinește multe funcții. Vindecarea plăgilor etalează un mecanism extraordinar de funcționare în cascadă, care este unic în natură. Este



UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA ȘCOALA DOCTORALĂ

desfășurat în mai multe etape esențiale, pentru a reface integritatea pielii și a restabili funcția de barieră de protecție.

Orice modificare a semnalelor chemotactice normale, în oricare stadiu, poate produce o vindecare vicioasă a rănilor.

Vindecarea plăgilor este un proces fiziologic fundamental complex, important pentru menținerea homeostaziei și combaterea infecțiilor. În cadrul acesta, este necesară colaborarea multor tipuri de celule și a produșilor acestora.

Procesul de vindecare poate fi împărțit în patru etape predictibile, care se suprapun parțial și se succed: hemostază, inflamație, proliferare și remodelare tisulară.

Pentru ca o rană să se vindece cu succes, toate cele patru faze trebuie să apară în succesiunea și intervalul de timp adecvat. Mulți factori pot interfera cu una sau mai multe faze ale acestui proces, determinând astfel vindecarea vicioasă.

Trombocitele produc hemostaza primară, prin aderarea și agregarea la nivelul leziunii și declanșează hemostaza secundară prin activarea cascadei coagulării.

Contribuția trombocitelor la funcționarea normală a sistemului vascular și rolul acestora în procesul de reparare al vascularizației sunt bine cunoscute și amplu descrise în literatură. Cu toate acestea, trombocitele sunt mult mai mult decât o simplă componentă a sistemului hemostatic.

Noi studii au detaliat rolul acestora ca parte a sistemelor de reparare tisulară, având rol important în declanșarea procesului inflamator și stimularea sistemului imun.

Pentru realizarea acestor roluri, plachetele trebuie să acționeze ca parte integrată a sistemului imun, sincronizându-se cu leucocitele și cu alte elemente.

În mod normal plachetele se găsesc într-o stare de repaus atunci când se află în torentul circulator. Această stare este menținută cu ajutorul oxidului nitric și a PGI₂ secretate de către



UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA ȘCOALA DOCTORALĂ

țesutul endotelial indemn. În cazul în care aceste celulele endoteliale sunt lezate, se inițiază procesul de activare al trombocitelor și recrutare a acestora în răspunsul inflamator.

Activarea trombocitelor începe la câteva secunde după producerea aderenței și este fundamentală pentru inițierea și susținerea hemostazei. Este declanșată atunci când colagenul de sub țesutul endotelial este expus și se leagă de receptori de la nivelul trombocitelor.

Activarea permite trombocitelor să degranuleze și să elibereze factori chemotactici, factori de creștere, proteaze și agenți vasoactivi (serotonină, histamină).

Chemokinele eliberate prin activarea trombocitelor atrag celulele inflamatorii în zonă, ceea ce produce tranziția la următoarea fază a procesului de vindecare – etapa inflamatorie.

Ca parte a răspunsului inflamator, acestea au, printre altele, și rolul de a elibera un număr mare de factori de creștere – PDGF, FGF- β , TGF- β , PDAF, VEGF, EGF, IGF, IL-8 și fibronectină. Dintre acești factori PDGF este considerat ca fiind cel mai important în realizarea procesului de reparare tisulară, atât prin impactul său asupra angiogenezei, cât și asupra proliferării fibroblaștilor. Există numeroase studii care au evaluat aplicarea de biomateriale cu conținut bogat de trombocite pentru a promova vindecarea leziunilor.

După activarea trombocitelor care sunt prinse în matricea de fibrină, numeroși factori de creștere sunt eliberați. Aceștia, la rândul lor, stimulează o multitudine de elemente implicate în vindecarea tisulară. În ultimele două decenii, mai buna înțelegere a proprietăților fiziologice ale trombocitelor în vindecarea rănilor, a dus la dezvoltarea mai multor preparate trombocitare pentru aplicații terapeutice diverse.

Restaurarea țesutului deteriorat începe foarte devreme cu o secvență reglementată de evenimente biochimice puse în mișcare pentru a repara zona lezată. Deși imperfecte, aceste procese își realizează de obicei programarea biologică și determină închiderea și remodelarea plăgilor.

Așa cum am menționat anterior procesul de vindecare este de obicei împărțit în patru faze predictibile, care se pot suprapune: hemostază, inflamație, proliferare și remodelare tisulară. În



UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA ȘCOALA DOCTORALĂ

timp ce înțelegerea acestui întreg proces este încă incompletă, s-a stabilit că trombocitele joacă un rol decisiv nu numai în hemostază, ci și în procesul de vindecare a rănilor, printr-o abundență de factori de creștere și alte citokine de semnalizare care modulează răspunsul inflamator. Istoric, s-a dovedit că fibrina joacă un rol esențial în aderarea pansamentelor biologice și a autogrefelor, prezența fibrinei fiind asociată cu o rată mai mare de aderare a grefei.

În acest scop, am evaluat rolul unui biomaterial bogat în trombocite – fibrină bogată în trombocite – Platelet Rich Fibrin (PRF) – în augmentarea grefelor de piele cu grosimea completă.

Prin prisma asemănărilor histologice dintre pielea de șobolan și pielea umană, am selectat șobolanul Wistar ca model animal experimental, deoarece ar produce rezultate științifice precise și utilizabile clinic. Condițiile adecvate de trai au fost furnizate șobolanilor Wistar de către personalul laboratorului.

Contribuții personale

Studiul a cuprins 40 de șobolani masculi Wistar furnizați de Universitatea de Medicină și Farmacie Craiova.

Șobolanii au fost aneșteziați prin intermediul unei injecții intraperitoneale a unei soluții de Ketamină și Xilazină. Am optat pentru practicarea unei leziuni dorsale dreptunghiulare de 3×2 centimetri.

S-au efectuat incizii pe marcajele preoperatorii, iar pielea s-a detașat de la nivelul fasciei musculare profunde și a fost apoi recoltată.

De la nivelul grefei de piele în grosime completă, s-au îndepărtat toate țesuturile subiacente. Mușchiul subcutanat panniculus carnosus a fost și el disecat din derm pentru a simula o grefă de piele în grosime completă.

Grefa de piele a fost apoi fixată pe loc folosind o sutură chirurgicală simplă, întreruptă, cu fir 4-0 din polipropilenă.



UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
DIN CRAIOVA
ȘCOALA DOCTORALĂ

Aceeași procedură chirurgicală a fost efectuată pe grupul de test, cu diferența de aplicare a preparatului trombocitar PRF pe fascia musculară profundă.

Procesul de vindecare a fost evaluat zilnic, iar în ziua 21 postoperatorie, șobolanii au fost eutanasiați, iar grefele de piele în grosime completă au fost recoltate pentru analiză histologică și imunohistohimică.

Grefele de piele au fost evaluate macroscopic folosind planimetrie. Evaluarea grefei a fost efectuată prin calcularea raportului dintre suprafața zonei care prezintă necroza dermică și țesutul sănătos.

A fost comparată rata de necroză dermică a grefei de piele cu grosime completă, între grupul de control și grupul de test.

Procentul mediu de necroză cutanată la grefele de piele cu grosime completă, augmentate cu PRF (14,9%, SD=5,1) a fost semnificativ mai mic decât în cazul grefelor de control (28,5%, SD=9,2) – $p < 0,01$.

Examinarea histologică a urmărit modificări ale epidermului, prezența fibroblaștilor și numărul vaselor de sânge.

Grosimea medie a epidermului grefelor de piele în grosime completă a fost comparată între grupele de control și test. Diferența procentuală de 35% dintre grosimile medii ale stratului epidermic (fără a include stratul cornos) a fost elocvent de mare – $p < 0,01$. De asemenea, a fost observată o diferență semnificativă în deviația standard a grupului martor, spre deosebire de grupul de testare, obiectivând diferențele vaste de grosime epidermică identificate în probele histologice din grupul de control.

Densitatea medie a fibroblaștilor și fibrocitelor situate la nivelul stratului dermic în grefele de piele cu grosime completă augmentate cu PRF (grupul de test) a fost semnificativ mai mare decât în cazul grefelor din grupul de control – $p < 0,01$. Diferența procentuală de 41% s-a tradus și într-un număr mai mare de miofibroblaști în grupul de test.

Vasele de sânge au fost identificate prin microscopie de putere mică. Zonele vasculare proeminente au fost apoi studiate în câmpuri cu putere mai mare; vasele individuale au fost



UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA ȘCOALA DOCTORALĂ

marcate și numărate. Densitatea vasculară a fost calculată folosind plugin-ul Vascular Density al programului ImageJ Fiji. Ulterior a fost calculată media numărului de vase de sânge pentru fiecare grefă. Am descoperit o creștere a numărului vaselor de sânge și a densității vasculare în lamelele grupului de testare, dar care au oferit dovezi slabe împotriva ipotezei nule: diferență procentuală de 6,74% în numărul vaselor de sânge, în favoarea grupului test și 24,8% diferență procentuală în măsurătorile densității vasculare – $p > 0,05$.

Stratul epidermic din grupul de test a fost mai gros și mai uniform față de pielea grupului de control, și a avut coeziune completă cu dermul. Acest lucru ar putea fi explicat prin aderarea îmbunătățită a grefei, furnizată de fibrină, care ar putea limita necroza în straturile superficiale dermice, în timpul stadiului de imbițiție plasmatică, precum și furnizarea unei schele care promovează creșterea capilară în matricea fibrinei.

Studii recente au confirmat că o creștere a numărului de fibroblaști a fost asociată cu vindecarea accelerată a rănilor.

Sursa fibroblaștilor din grefele de piele rămâne ambiguă. Unii autori au emis ipoteza că aceste celule migrează din sânge, în timp ce alte surse teoretizează că provin din celule mezenchimale perivasculare locale. Oricare ar fi cazul, majoritatea autorilor sugerează că fibroblaștii din grefele de piele nu sunt indigeni și migrează din țesutul sănătos înconjurător în urma semnalelor chemotactice.

Anterior a fost demonstrat efectul chemotactic puternic al PDGF asupra fibroblaștilor, determinându-i să migreze la locul plăgii și să inducă proliferarea. Afluența factorilor de creștere ar putea explica numărul mai mare de fibroblaști și miofibroblaști din grupul de testare, care, la rândul său, ar susține procesul de vindecare accelerată observat.

Deși analiza densității microvasculare a arătat o creștere a numărului de vase de sânge și a calibrului acestora în dermul grefelor augmentate cu PRF, ea oferă dovezi insuficiente pentru a respinge cu încredere ipoteza nulă. Cu toate acestea, a fost demonstrat anterior de alți autori, că bine-cunoscutele proprietăți angiogene și vasculogene ale VEGF s-ar putea să nu aibă un efect mare asupra numărului real de vase. Mai mult, VEGF influențează, permeabilitatea vasculară, lucru care ar putea explica suplimentar procentajul mai mic de necroză dermică și



UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA ȘCOALA DOCTORALĂ

epitelizarea mai rapidă a grefelor tratate cu PRF. Rezultatele ar putea fi, de asemenea, atribuite creșterii calibrului vaselor de sânge și creșterii vaselor de sânge nou formate în patul rănilor, pe lângă țesutul transplantat. Deși nu am putut demonstra capacitățile angiogene ale PRF, s-a observat un grad de necroză dermică redusă la șobolanii tratați cu PRF.

Activitatea biologică a fibrinei, produsă prin polimerizarea lentă a fibrinogenului, este stabilită ca fiind un factor de stimulare extrem de important pentru procesul de vindecare, oferind schela necesară pentru aderența și migrarea celulelor.

Concluzii

Cu componenta sa celulară bogată și eliberarea factorilor de creștere, biomaterialul prezintă toate atributele necesare pentru a demonstra capacitatea semnificativă de vindecare, certificată în studiile anterioare și susținută de acesta.

Datele noastre limitate susțin teoria că adăugarea de PRF la paturile de plagă destinate grefelor, are potențialul de a accelera rata vindecării rănilor, prin capacitatea sa de a îmbunătăți aderența grefei și de a regla proliferarea unui strat epidermic mai gros și mai uniform, reducând totodată durata procesului de epitelizare și necroza dermică.

Deși sunt necesare studii viitoare pentru a releva potențialul incomplet dezvăluit al PRF-ului și pentru a îmbunătăți utilizarea sa, strategiile pentru accelerarea cercetării translaționale fac ca schelele biologice, îmbunătățite cu trombocite, să aibă o din ce în ce mai mare penetranță în practica medicală.