

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE CRAIOVA**

**Teză de Doctorat**

**Rezumat**

**VINDECARE OSOASĂ AUGMENTATĂ CU CONCENTRATE  
TROMBOCITARE**

**Coordonator Doctorat:**

**Prof. Univ. Dr. Marius Eugen Ciurea**

**Student Doctorat:**

**Dr. Alexandru Grecu**

**CRAIOVA**

**2019**

## CUPRINS

<b>I. INTRODUCERE.....</b>	<b>3</b>
<b>II. STADIUL CUNOAȘTERII.....</b>	<b>3</b>
<b>Capitolul 1. Fracturi .....</b>	<b>3</b>
<b>Capitolul 2. Utilizarea concentratelor trombocitare în augmentarea vindecării tisulare .....</b>	<b>4</b>
<b>Capitolul 3. Utilizarea șobolanului ca animal experimental .....</b>	<b>5</b>
<b>Capitolul 4. Tomografie computerizată cu fascicul în trunchi de con (Cone-Beam Computer Tomography – CB-CT) .....</b>	<b>5</b>
<b>III. CONTRIBUȚII PROPRII .....</b>	<b>6</b>
<b>Capitolul 1. Obiectivele tezei .....</b>	<b>6</b>
<b>Capitolul 2. Material și Metodă.....</b>	<b>6</b>
<b>Capitolul 3. Rezultate .....</b>	<b>7</b>
Rezultate chirurgicale – îmbunătățirea tehnicilor existente .....	7
Cuantificarea numărului trombocitelor din cheagul de PRF .....	7
Rezultate imagistice - Cone-Beam Computer Tomography .....	8
Rezultate statistice.....	8
Rezultate histologice.....	9
<b>IV. DISCUȚII.....</b>	<b>9</b>
<b>V. CONCLUZII.....</b>	<b>10</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ.....</b>	<b>10</b>

CUVINTE CHEIE: inginerie tisulară, fibrină bogată în trombocite, vindecare osoasă, defect osos

## I. INTRODUCERE

Vindecarea țesuturilor și managementul răspunsului inflamator reprezintă un subiect de interes major pentru clinicieni și cercetători din toată lumea. Cazul particular al vindecării osoase și diferitele căi de management și dirijare a proceselor mecanice și biologice reprezintă o provocare deosebită ce stă la intersecția biologiei celulare, ortopediei și traumatologiei și imunohistochimiei. Datorită impactului major pe care îl poate avea o fractură în bunăstarea, confortul și calitatea vieții unui individ precum și datorită implicațiilor majore în viața socială a individului afectat considerăm ca cercetarea legată de vindecarea osoasă ar trebui să fie în prim plan în orice centru de cercetare.

Concentratele trombocitare reprezintă o adădire nouă în arsenalul clinicienilor în cursa pentru modularea răspunsului inflamator pentru stimularea vindecării țesuturilor. Acestea au fost folosite în domeniile chirurgiei plastice, medicinei sportive, chirurgiei ortopedice, chirurgie oro-maxilo-facială și stomatologie.

Datorită noutății relative a concentratelor trombocitare și a utilizării lor în promovarea vindecării osoase, sunt necesare studii suplimentare pentru a determina cu certitudine unde, când și cum ar trebui folosite acestea.

Vom realiza un studiu experimental pentru a evalua beneficiile folosirii tehnicii de augmentare a unui defect osos cu Platelet Rich Fibrin (PRF – fibrină bogată în trombocite).

## II. STADIUL CUNOAȘTERII

### Capitolul 1. Fracturi

Fracturile reprezintă una dintre cele mai comune leziuni traumatice legate de sistemul musculo-scheletal, fiind 41,25% din cazurile prezentate în Camera de Urgență – Ortopedie și Traumatologie a Spitalului Clinic de Urgență București într-o perioadă de 47 de ani [1].

Vindecarea osoasă se petrece, din punct de vedere histologic, fie prin vindecare primară fie prin vindecare secundară [2],[3].

Vindecarea osoasă primară implică realizarea unei punți osoase între cele două fragmente (sau mai multe) fragmente fracturare prin conuri de tăiere osoase producând astfel remodelare corticală. Acest fapt presupune ca vindecarea primară este obținută în circumstanțe speciale ce implică o reducere anatomică a focarului de fractură, fixare internă rigidă și compresie

longitudinală. Aceste condiții pot fi întrunite numai prin intermediul unui gest chirurgical de reducere și fixare internă rigidă [4].

Vindecarea osoasă secundară presupune osificare encondrală și intramembranoasă ce se petrece în prezența micro-mișcărilor la nivelul focarului de fractură. Aceste fenomene locale se petrec în trei stadii [5].

Prima fază implică acumularea de sânge la nivelul focarului de fractură, ceea ce duce la formarea hematomului primar. Hematomul primar generează un răspuns inflamator local, cu eliberarea de macrofage ce conțin interleukine, neutrofile, trombocite, citokine și factor de creștere derivat din trombocite (Platelet Derived Growth Factor - PDGF) [6]. Fibroblaștii și celulele stem mezenchimale (Mesenchymal Stem Cells - MSC) migrează la nivelul focarului de fractură cu ajutorul citokinelor. Literatura tradițională descrie faptul că celulele stem mezenchimale provin din măduva osoasă expusă local precum și din țesuturile moi înconjurătoare. Studii recente arată ca MSC sunt recrutate din rezervorul circulant de celule stem [7,8]. Osteoblaștii și fibroblaștii se multiplică local și se formează țesut de granulație în jurul fragmentelor fracturare. Astfel, hematumul primar se transformă în țesut de granulație bogat în fibrină [9]. Faza următoare este cea reparativă, când se formează calusul primar. Țesutul de granulație bogat în trombocite acționează drept o matrice pentru calusul moale format din țesut cartilaginios. Cercetările arată că, la șobolani, calusul moale se formează după 7-9 zile după evenimentul traumatic [10]. Vindecarea intramembranoasă se petrece în același timp, în regiunea sub-periosteală a osului, adiacent cu cu regiunea distală și proximală a osului fracturat, generând astfel un calus dur. Puntea osoasă ce se formează în cadrul acestui proces reprezintă o structură semi-rigidă ce permite încărcarea cu greutate. Cea de-a treia fază este reprezentată de remodelarea osoasă conform legii lui Wolff de remodelare osoasă de-a lungul vectorilor de forță [11].

## Capitolul 2. Utilizarea concentratelor trombocitare în augmentarea vindecării tisulare

Datorită numeroaselor limitări și contraindicații ale adjuvantelor farmaceutice ale vindecării tisulare [12], cercetătorii au încercat să dezvolte soluții de accelerare/augmentare a vindecării tisulare compatibile biologic, formate din concentrate trombocitare. Concentratele trombocitare sunt extrase dintr-o probă de sânge integral obținut de la pacient și procesat prin

diverse tehnici, de regulă prin centrifugare [13]. Acest proces este efectuat pentru a obține separarea elementelor figurate ale sângelui conform gradientului de greutate.

Biocompatibilitatea este asigurată prin caracterul autolog al concentratelor trombocitare.

Primul pas în procesul natural de vindecare este reprezentat de formarea unui cheag de fibrină și trombocite. Urmând acest fapt, următorul pas logic a fost încercarea de a mări concentrația locală de trombocite pentru a suplimenta procesul natural de vindecare.

Precursorii concentratelor trombocitare au fost adezivul biologic pe bază de fibrină folosit în urmă cu 40 ani [14,15]. O evoluție a acestei idei a fost propusă în 1978 cu folosirea gelului cu trombocite [16].

PRF a fost dezvoltată în Franța [17] și a fost suficient de diferită de toate concentratele anterioare de trombocite încât autorii au numit acest preparat "concentrat de trombocite de a doua generație". PRF se diferențiază de toate concentratele anterioare de trombocite prin polimerizarea puternică a fibrinei ce se petrece în jurul trombocitelor concentrate ceea ce îi da caracteristici plastice deosebit de utile în anumite scenarii clinice.

### Capitolul 3. Utilizarea șobolanului ca animal experimental

Literatura descrie producerea defectelor intra-osoase [18] la șobolani și observarea ratei de vindecare ca fiind cea mai bună metodă științifică de determinare a efectelor diferitelor materiale și biomateriale ce pot fi studiate în scopul cercetării vindecării osoase. De-a lungul timpului au existat diferite modele de defecte osoase disponibile. Acestea includ defecte ale osoaselor lungi, defectul unui segment al mandibulei sau, după cum studiază această teză, defectele ale calvariei.

### Capitolul 4. Tomografie computerizată cu fascicul în trunchi de con (Cone-Beam Computer Tomography – CB-CT)

Tomografia computerizată cu fascicul de conuri (Cb-CT) reprezintă o achiziție relativ nouă în arsenalul radiologilor care se bazează pe un fascicul cu formă conică de raze X care se proiectează pe o suprafață de primire plană. Sursa de emisie cu raze X și planul receptor de razele X efectuează o circum rotație completă în jurul obiectului scanat, producând o serie de imagini bidimensionale pe traseu. Aceste imagini sunt transferate către un dispozitiv special care, folosind un algoritm [19], realizează o reconstrucție tridimensională a zonei inspectate. unul dintre

principalele motive pentru care clinicienii aleg să folosească această metodă de investigare radiologică este să urmeze principiul ALARA (As Low As Reasonably Acceptable – *Cea mai mică doză posibilă*) al Comisiei Internaționale de Protecție Radiologică [20] (International Commission on Radiological Protection - ICRP).

Evoluția defectelor osoase induse în calvarie la șobolan poate fi evaluată radiologic, prin vizualizare CB-CT, cu ajutorul scorului Patel [21].

### III. CONTRIBUȚII PROPRII

#### Capitolul 1. Obiectivele tezei

Obiectivele acestui studiu au constat în încercarea de a obține o mai bună înțelegere a impactului unui implant autolog de PRF în vindecarea defectelor/fracturilor osoase într-un cadru standardizat, care a constat în defecte de dimensiuni critice efectuate în calvaria de șobolan. Pentru a elabora un plan de cercetare, obiectivele distincte ale acestei teze au fost stabilite în conformitate cu aceste orientări:

1. Obținerea unei estimări a capacităților bazale de vindecare osoasă, fără influențe exterioare;

2. Asigurarea unui cadru de vindecare identic pentru defectul îmbunătățit cu PRF. Orice avantaj al ratelor de vindecare/calitatea osului dezvoltat în defectul îmbunătățit cu PRF rezultă astfel din avantajele inerente ale augmentării cu PRF;

3. Să furnizeze un protocol ușor de obținere a PRF de la șobolan, care să poată fi reprodus cu consecvență și ușurință;

4. Toate studiile noastre pe animale au fost efectuate cu acceptul Comisiei pentru bunăstarea animalelor a Universității de Farmacie și Medicină din Craiova.

#### Capitolul 2. Material și Metodă

Pentru scopurile acestui experiment am folosit 35 șobolani masculi rasa Wistar, în vârstă de 6 luni sau mai mult (6-10 luni, Media = 7,2 luni), oferiți de către Biobaza Universității de Medicină și Farmacie Craiova.

Șobolanii au fost găzduiți individual în cuști pentru durata experimentului, la o temperatură și luminozitate controlată. Apa și hrana au fost furnizate *ad libitum*.

Câmpul operator a respectat rigorile sterilității chirurgicale.

Necesitățile particulare ale studiului nostru au necesitat stabilirea unui protocol de obținere a PRF-ului de la șobolan precum și o nouă metodologie de inducere a defectelor calvariei.

Cantitatea mare de sânge necesară pentru prepararea unei grefe de PRF (8-10 ml sânge) coroborată cu lipsa antigenicității specifice a șobolanilor Wistar, tehnica [22] aleasă pentru a obține sângele a fost puncție cardiacă terminală [23]. Astfel am putut obține material PRF dintr-o singură puncție pentru a efectua 4-5 experimente.

Centrifugarea sângelui s-a efectuat conform protocolului lui Choukroun.

S-a efectuat evaluare radiologică și histologică la 45 zile post-experiment.

### Capitolul 3. Rezultate

#### Rezultate chirurgicale – îmbunătățirea tehnicilor existente

Cele două defecte calvariale s-au realizat consecutiv, realizând incizia aferentă defectului stânga-control centrat pe aria viitorului defect. După realizarea defectului utilizând o trefină de 3 mm, cu irigare continuă pentru răcire, s-a suturat periostul, restabilind astfel continuitatea planului periosteal. S-a efectuat o incizie centrată pe aria viitorului defect dreapta-test. După efectuarea defectului într-o manieră identică, s-a introdus grefa PRF și s-a suturat periostul. S-au luat precauții ca decolarea periostului de pe planul osos să fie minimă, astfel încât să păstrăm izolarea celor două defecte. Decolarea minimă fost esențială și pentru conținerea grefei PRF. Această tehnică reprezintă o îmbunătățire a tehnicilor curente, care presupun o singură incizie longitudinală, generând lambouri periosteale ce se mobilizează în momentul suturii, generând un risc de mobilizare a grefei PRF din situl defectului osos. De asemenea, tehnicile deja stabilite permit comunicarea sub-periosteală a celor două defecte, scăzând precizia rezultatelor obținute.

#### Cuantificarea numărului trombocitelor din cheagul de PRF

Am elaborat o metodă inovativă de cuantificare [24] a numărului și a concentrației de trombocite dintr-un cheag de PRF. Tehnica presupune obținerea de PRP dintr-o cantitate

echivalentă de sânge. Măsurătorile noastre au determinat o concentrație de trombocite de  $4,155,553/\text{mm}^3$ , corespunzând unei creșteri a concentrației 489% în cheagul de PRF.

#### Rezultate imagistice - Cone-Beam Computer Tomography

Fiecare șobolan implicat în experiment a fost evaluat CBCT la 45 zile, cu determinarea scorului Patel pentru fiecare defect în parte. După obținerea imaginilor, animalele au fost sacrificate.

Defectul stânga-control a prezentat următoarele scoruri de vindecare:

- 9 defecte → scor 0;
- 19 defecte → scor 1;
- 5 defecte → scor 2;
- 2 defecte → scoruri 3&4.

Defectul dreapta-test a prezentat următoarele scoruri de vindecare:

- 3 defecte → scor 0;
- 6 defecte → scor 1;
- 17 defecte → scor 2;
- 9 defecte → scor 3&4.

Rezultatele arată un efect favorabil cert indus de către adiția de PRF în defectul dreapta-test, fapt evidențiat de către rezultatele aferente scorurilor 2 și scorurile 3&4, 5 vs. 17 și 2 vs. 9, stânga-control vs. dreapta-test respectiv.

#### Rezultate statistice

Am aplicat un calcul statistic asupra datelor conținute utilizând scorul t-test și calculul aferent al valorii  $p$ .

Astfel, analiza datelor rezultate în urma investigațiilor radiologice generat o valoare  $t = -4.19921$ , generând astfel o valoare statistică  $p = .00004$ .

Astfel, am demonstrat relevanța statistică a ipotezei de demonstrat cu un nivel ridicat al de încredere, cu un prag stabilit la  $p < 0.001$ , generând astfel o certitudine de 99.9 % că modelul statistic determinat în cadrul acestui calcul poate fi luat în considerare [25]. Astfel, considerând



circumstanțele de vindecare ale celor două defecte ca fiind identice, am demonstrat din punct de vedere statistic faptul că vindecarea mai rapidă a defectului dreapta-test se datorează singurei diferențe, respectiv a augmentării acestuia cu PRF.

Calcularea valorii scorului t-test și a valorii de semnificație statistică  $p$  s-a efectuat cu ajutorul unui software specializat.

De asemenea, s-a calculat și valoarea statistică a scorului  $d$  – Cohen [26] în vederea stabilirii magnitudinii efectului produs prin adăugarea PRF-ului în defectul dreapta-test. Astfel, calculul scorului  $d$  – Cohen aplicat scorurilor de vindecare relevate radiologic generează o valoare de 1.002692.

Utilizând tabelul de conversie procentuală al lui Coe [27], putem converti scorul  $d$  – Cohen într-o valoare procentuală, putând astfel stabili magnitudinea procentuală a efectului PRF-ului. Astfel, valoarea este egală cu 84%.

#### Rezultate histologice

În comparație cu defectul dreapta-test, defectul stânga-control a prezentat consistent pe toate lamele histologice semne de vindecare osoasă întârziată, fie cu lipsa zonelor de densificare osoasă în masa țesutului fibro-conjunctiv, fie cu existența unei singure zone de osificare, fără excrescențe osoase tipice unui proces de vindecare în desfășurare. Astfel, putem concluziona că defectul stânga-control nu a prezentat procese de vindecare osoasă rapidă/în curs de desfășurare.

## IV. DISCUȚII

Pe parcursul acestei teze am demonstrat că PRF-ul are un efect pozitiv asupra vindecării osoase. Singurul aspect care trebuie luat în considerare în momentul unei eventuale decizii de utilizare într-un scenariu clinic a acestui material este reprezentat de riscul de infecție asociat cu scoaterea probei de sânge din câmpul chirurgical steril și prepararea efectivă a PRF-ului într-o centrifugă ne-sterilă. Manipularea cheagului PRF necesită o grijă deosebită pentru a conserva statutul steril al acesteia.

Un aspect deosebit de important în alegerea șobolanului ca animal experimental [28] a constat în posibilitatea de a induce două defecte identice în calvaria acestuia [29]. Acest fapt ne-a

dat posibilitatea de a asigura condiții identice de vindecare pentru cele două defecte. De asemenea, faptul că am putut realiza un sistem de sine-referențial la același individ, ne-a dat posibilitatea de a reduce drastic numărul total de animale necesare bunei desfășurări a experimentului, precum și creșterea acurateții rezultatelor.

## V. CONCLUZII

Studiul prezent a demonstrat cu succes faptul că adăugarea de PRF într-un defect osos a îmbunătățit capacitatea naturală a corpului de vindecare.

## VI. BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

---

1. Nicolae Gorun. Traumatologie osteoarticulară generală. Capitolul 3, Morbiditatea prin traumatisme ale aparatului locomotor. Studiu statistic personal: pg. 90 București, Curtea Veche 2011. ISBN 978-973-1983-63-9
2. McKibbin B. The biology of fracture healing in long bones. J Bone Joint Surg Br, 1978, 60-B(2):150-162.
3. Webb J, Tricker J. A review of fracture healing. Curr Orthop, 2000, 14:457-63.
4. Ferreira N, Marais LC, Aldous C. The pathogenesis of tibial non-union. SA Orthop J, 2016, 15(1):51-59.
5. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. Injury, 2011, 42(6):551-5.
- 6 Bolander ME. Regulation of fracture repair by growth factors. Proc Soc Exp Biol Med. 1992;200:165–70.
- 7 Granero-Molto F, Weis JA, Miga MI, et al. Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing. Stem Cells. 2009; 27(8):1887–98. [PubMed: 19544445]

- 
- 8 Kitaori T, Ito H, Schwarz EM, et al. Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for the recruitment of mesenchymal stem cells to the fracture site during skeletal repair in a mouse model. *Arthritis & Rheumatism*. 2009; 60(3):813–23. [PubMed: 19248097]
- 9 Rahn, BA. Bone healing: histologic and physiologic concepts. In: Fackelman, GE., editor. *Bone in clinical orthopedics*. Thieme; Stuttgart, NY: 2002. p. 287-326.
- 10 Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clinical Orthopaedics & Related Research*. 1998; 355(Suppl):S7–21. [PubMed: 9917622]
- 11 Wolff, Julius. *The Law of Bone Remodelling*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1986. ISBN 978-3-642-71033-9 (translation of the German 1892 edition)
- 12 Whittam AJ, Maan ZN, Duscher D, et al. Challenges and Opportunities in Drug Delivery for Wound Healing. *Advances in Wound Care*. 2016;5(2):79-88. doi:10.1089/wound.2014.0600.
- 13 Dhurat R, Sukesh M. Principles and Methods of Preparation of Platelet-Rich Plasma: A Review and Author's Perspective. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*. 2014;7(4):189-197. doi:10.4103/0974-2077.150734.
14. Gible JW, Ness PM. Fibrin glue: the perfect operative sealant? *Transfusion* 1990;30:741-747.
15. Matras H. Die Wirkungen verschiedener Fibrinpräparate auf Kontinuität-störungen der Rattenhaut. *Osterr Z Stomatol*. 1970;67:338-359.
16. RosenthalAR, EgbertPR, Harbury C, Hopkins JL, Rubenstein E. Use of platelet- fibrinogen-thrombin mixture to seal experimental penetrating corneal wounds. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol*. 1978;207:111-115
17. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, Gogly B. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2006, 101(3):e37-44.
18. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci*, 2004, 4(8):743-765.
19. Feldkamp LA, Davis LC, Kress JW. Practical cone-beam algorithm. *J Opt Soc Am*, 1994, 1:612–619.

- 
20. Wrixon AD. New ICRP recommendations. *J Radiol Prot*, 2008, 28:161–168.
  21. Patel ZS, Young S, Tabata Y, Jansen JA, Wong ME, Mikos AG. Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. *Bone*, 2008, 43(5):931–940.
  22. Diehl, K. , Hull, R. , Morton, D. , Pfister, R. , Rabemampianina, Y. , Smith, D. , Vidal, J. and Vorstenbosch, C. V. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J. Appl. Toxicol.*, 2001, 21: 15-23.
  23. Beeton C, Garcia A, Chandy KG. Drawing blood from rats through the saphenous vein and by cardiac puncture. *J Vis Exp*. 2007;(7):266.
  24. GRECU AF, GRECU DC, NICA O, CIUCA EM, CAMEN A, CIUREA ME. A Novel Method of Obtaining Platelet Rich Fibrin from Rats and Quantifying Platelet Count. *Curr Health Sci J*, 2019, 45(1):104-110.
  25. Lytsy P. P in the right place: Revisiting the evidential value of P-values. *J Evid Based Med*, 2018, 11(4):288-291.
  26. McGough JJ, Faraone SV. Estimating the size of treatment effects: moving beyond p values. *Psychiatry (Edgmont)*, 2009, 6(10):21-29.
  27. Coe R. It's the effect size, stupid: what effect size is and why it is important. *British Educational Research Association Annual Conference*. 2002, Sept 12–14, Exeter, England.
  28. Osiac E, Bălșeanu TA, Mogoantă L, Gheonea DI, Pirici I, Iancău M, Mitran SI, Albu CV, Cătălin B, Sfredel V. Optical coherence tomography investigation of ischemic stroke inside a rodent model. *Rom J Morphol Embryol*, 2014, 55(3):767–772.
  29. Obadan F, Craitoiu M, Manolea H, Mogoanta L, Osiac E, Rica R, Salan AI, Earar K. Osseointegration Evaluation of Two Socket Preservation Materials in Small Diameter Bone Cavities An in vivo lab rats study. *REV.CHIM.(Bucharest)*, 2018, 69(10):2904-2909.