

amplitudinei de mișcare a brațului. Din acest motiv ne-am propus de a încerca posibilitatea confecționării unui fixator cu proprietăți fizico-mecanice apropiate de cele ale ligamentelor coraco-claviculare.

Pentru aceasta am inițiat un studiu cadaveric la Biroul Republican de medicină legală unde pe 19 cadavre proaspete. S-a constatat că lungimea ligamentelor coraco-claviculare variază între 1.4 și 1.8 cm iar întindere acestea cedează prin avulsie sau rupere la 500 (± 134) N, posedând o elasticitate de 103 (± 30) N/mm și elongare pînă la cedare de 7.7 (± 1.9) mm.

Totodată pe cadavre a fost modelată o proteză pentru ligamentele coraco-claviculare, care actualmente se află la stadiul de testare clinică.

Concluzii

În testele cu utilizarea implantelor de NiTi, creșterea celulelor a fost la fel ca și în flacoanele de control. Celulele aderă strîns pe implantele de NiTi ce denotă lipsa citotoxicității acestora.

Osteogeneza reparatorie nu este dereglată de prezența implantelor de NiTi și la acestea nu au fost depistate semne de toxicitate sau degradare după implantarea în organismul viu.

Bibliografie

1. Brady George Stuart, Henry R. Clauser, John A. Vaccari. Materials Handbook (15 ed.). McGraw-Hill Professional. 2002, p. 633.
2. Sang David, Peter Ellis, Lawrie Ryan, Jane Taylor, Derek McMonagle, Louise Petheram, Phil Godding. Scientifica (Illustrated ed.). Nelson Thornes. 2005, p. 80.
3. Jones Gail, Michael R. Falvo, Amy R. Taylor, Bethany P. Broadwell. "Nanomaterials: Memory Wire". Nanoscale science (Illustrated ed.). NSTA Press. 2007, p. 109.
4. Ильин А.А., Колачѐв Б.А., Полькин И.С. Титановые сплавы. Состав, структура, свойства. ВИС-МАТИ. Москва 2009, 519 с.

APLICATIILE CULTURILOR DE KERATINOCITE IN ACOPERIREA MARILOR DEFECTE TEGUMENTARE LA ARSI (Revista literaturii)

Anatolie Taran¹, Constantin Furtuna²

Catedra Traumatologie, ortopedie si chirurgie de campanie¹,
Laboratorul cultura celulara si inginerie tisulara² USMF „Nicolae Testemițanu”

Summary

Keratinocyte culture applications in covering the biggest tegumental defects of people suffering from burn

This work proposes an important subject that has always incited the medical thought, and especially, that of the last 30 years: the discovery of some practical solutions for covering tegumental defects, resulted from various traumatism.

Urgent clinical needs for tegumental material of substitution have proved the indisputable value of the epithelial tissues obtention, through the culture and the inestimable benefits that are brought by them, through the utilization in current medical practice, and namely in the case of the vast cutaneous damage.

This work wants to describe the traumatic lesions, that are caused by cutaneous destructions on large surfaces, with a high vital risk, and to present different therapeutic modalities that modern medicine tries to hinder their devastating consequences.

This work tries to enlighten the remarkable value of the new medical success, which is already clinically verified, although the culture epithelium presents some drawbacks, that are in the investigator's attention, who tries to remedy them.

Rezumat

Lucrarea de față își propune ca temă, un subiect important, care a incitat din totdeauna gândirea medicală, dar mai ales, cea din ultimii 30 de ani și anume, găsirea unor soluții practice, pentru acoperirea defectelor tegumentare, rezultate în urma traumatismelor.

Nevoile clinice stringente pentru material tegumentar de substituție, au demonstrat valoarea incontestabilă a obținerii țesuturilor epiteliale, prin cultura dirijată și beneficiile inestimabile pe care acestea le aduc, prin utilizarea în practica medicală curentă și anume, în cazul marilor pierderi cutanate.

Lucrarea are ca scop prezentarea leziunilor traumatice, cauzatoare de distrugerii cutanate pe suprafețe mari, cu înalt risc vital și a diferitelor modalități terapeutice prin care, medicina modernă încearcă să contracareze consecințele devastatoare ale acestora.

Această lucrare încearcă să aducă în lumină, valoarea deosebită a acestei noi reușite medicale, verificată deja în clinică, cu toate că epiteliul de cultură prezintă unele neajunsuri, ce sunt în atenția cercetătorilor, pentru a le remedia.

Dintre traumatizmele cu cel mai înalt potențial de distrugere instantanee, pe mari suprafețe a tegumentelor arsurile sunt cele mai de temut. Compromiterea funcțiilor capitale ale pielii, are consecințe imediate, dintre cele mai dramatice, prin dezechilibre brutale, greu de compensat și care, adesea, se finalizează prin deces. Exciiziile chirurgicale întinse efectuate în deosebi în avulsii, tumori sau infecții necrozante ale pielii, sunt de asemenea generatoare de mari defecte tegumentare.

Din acest motiv, este pe deplin justificată preocuparea clinicienilor, dar mai ales a cercetării medicale din ultimele decenii, pentru găsirea unor soluții eficiente în obținerea unor substituenți tegumentari, cu ajutorul cărora să se înlocuiască pielea compromisă și să se mențină funcțiile de bază ale organismului uman, agresat [1, 7, 20].

Posibilitatea de a obține, dintr-un eșantion tegumentar redus, o cultură epitelială ce poate fi apoi folosită în acoperirea unor mari defecte tegumentare, constituie o remarcabilă realizare a cercetării medicale și ingineriei tisulare, pusă la îndemâna clinicienilor. Pornind de la faptul, deja cunoscut, al capacității epiteliului uman de a se reînnoi periodic, s-a căutat și s-a găsit, o metodă prin care să se obțină regenerarea țesutului epitelial, într-un timp relativ scurt, prin tehnici complexe de laborator, cunoscute generic sub denumirea de bioinginerie tisulară.

Un rol deosebit de important în realizarea unei apărări eficiente împotriva atacului factorilor externi îl constituie tegumentele. Aceasta reprezintă "bariera" interpusă între organismul uman și mediul extern. Pielea este organul cel mai expus la agresiunea directă a factorilor din exterior. Ea a fost genetic înzestrată cu calități specifice menite să confere rezistență crescută la traumatism. Versalitatea tegumentului uman, se manifestă îndeosebi, printr-o mare capacitate de regenerare după traumatismele directe. Regenerarea se traduce în fapt, prin vindecare (cicatrizare) [7, 13, 21].

Ca urmare a distrugerii integrității și continuității cutanate, apar defectele tegumentare. Acoperirea cât mai rapidă a defectelor cutanate a constituit întotdeauna o adevărată provocare pentru chirurgi, fie că acestea s-au produs prin traumatisme acute, fie a unor nozologii.

În ultimele trei decenii s-au făcut progrese deosebite în domeniul ingineriei tisulare. Utilizând capacitatea naturală a unor celule ce alcătuiesc epidermul uman de a se reînnoi într-un anumit interval de timp, s-a reușit multiplicarea "in vitro", pe mediul de cultură special, a celulelor epidermale, respectiv a keratinocitelor. S-a putut astfel obține o populație celulară de aproximativ 10 000 de ori mai mare decât cea recoltată anterior. Această tehnică a fost îmbunătățită continuu, cercetătorii căutând să perfecționeze atât tehnica recoltării cât și mediile de cultură, pentru ca randamentul multiplicării celulare să fie cât mai bun [3, 6, 14, 18].

Obținerea culturilor de keratinocite, și-a găsit imediat aplicabilitatea clinică, în tratamentul marilor arși. Astfel, s-a reușit acoperirea unor suprafețe arse întinse, cu material autolog obținut prin cultură, această soluție fiind vitală, în cazul pacienților aflați în stare critică, ale căror

rezerve tegumentare erau deficitare. Prin culturile de keratinocite Green a deschis noi orizonturi de tratament la pacienții sever afectați, a căror evoluție era infaustă în urmă cu 2-3 decenii. [9]

Elementul cheie în tratamentul defectelor tegumentare îl constituie keratinocitul, astfel vom relata succint elemente de histologie și embriologie ale pielii [7, 21].

Epidermul este un țesut epitelial scuamos, stratificat, ce are capacitatea de a se reînnoi continuu, datorită stratului germinal bazal ce produce keratinocite. Acestea migrează ascendent trecând prin mai multe faze ale maturăției, pentru ca atunci când ajung la suprafață, să devină neviabile și să se descuameze. Odată cu ascensiunea lor dinspre stratul bazal spre cel cornos, keratinocitele suferă un proces de diferențiere, astfel încât celulele diferențiate terminal se vor găsi în stratul cornos superficial. Stratul bazal numit și stratul germinativ, conține celulele cele mai active din punct de vedere mitotic. Elementul central este keratinocitul, celulă cu un potențial regenerativ marcant, ce suferă un proces de diferențiere pe parcursul migrării sale de la nivelul stratului bazal germinativ pînă la stratul cornos, descuamativ. Celulele stratului bazal, au însă potențial de proliferare diferit. Studiile de cinetică celulară au evidențiat trei categorii de populații celulare: celule stem, celule amplificate tranzitoriu și celule aflate în faza postmitotică [8, 10, 11, 21].

Celula stem este considerată cheia de boltă a esofodajului culturilor de keratinocite, ca celulă nediferențiată se poate divide indefinit. Conține puține organite celulare și are un raport nucleo-citoplasmatic crescut. Poate da naștere atît celulelor diferențiate cu funcții bine definite, cît și altor celule stem. Celulele au fost identificate prin marcarea lor cu timidină, iar mai apoi prin folosirea citometriei în flux. Urmărirea cineticii moleculelor astfel marcate, a permis investigatorilor, să localizeze celulele stem, dar și să monitorizeze rata acestora de replicare. Celulele stem epidermale au un potențial proliferativ crescut, prezentînd cicluri de diviziuni rare. Prin diviziune, acestea dau naștere atît altor celule stem cît și celulelor amplificate tranzitoriu. Acestea din urmă prezintă un potențial crescut, dar pe o perioadă limitată de timp avînd cicluri de diviziune rapidă. Celulele amplificate tranzitoriu suferă la rîndul lor un proces de diferențiere terminal, formînd o a treia populație celulară: celulele postmitotice. Astfel, în țesutul regenerativ există trei tipuri de celule: celule stem, celule amplificate tranzitoriu și celule postmitotice. Aplicațiile clinice ale culturilor de keratinocite umane, în tratamentul marilor defecte cutanate, se datorează în mare măsură creșterii și diferențierii pe mediile de cultură a celulelor stem. De aceea identificarea acestora în culturi are un rol foarte important în anticiparea dezvoltării culturii respective [4, 11, 13].

Obținerea culturilor de keratinocite umane

În 1944 Medawar a fost primul care a reușit să izoleze celulele proliferative epidermale. El a reușit de asemenea pentru prima oară, transplantarea cu succes a keratinocitelor din cultură, înapoi la organismul donor.

În 1952 Billingham a arătat că prin tratarea keratinocitelor cu tripsină, s-a menținut vitalitatea lor, putînd fi astfel folosite în culturile celulare. O îmbunătățire majoră a metodei de cultură, a fost realizată, prin disocierea cu tripsină a celulelor epiteliale și cultivarea lor pe un gel colagenic solubil, pe suport de plastic. Astfel s-a realizat creșterea potențialului proliferativ al keratinocitelor, care puteau realiza confluente, dar și obținerea unui număr de 2-3 subculturi din acestea. Deasemenea s-a demonstrat importanța prezenței elementelor dermale, în creșterea culturilor epiteliale. Cercetările întreprinse pentru realizarea unor medii “carrier” prin testarea diferitor substraturi, au dus la descoperirea și folosirea fibroblastelor de șoarece 3T3 iradiate letal. Acestea favorizau creșterea keratinocitelor, obstrucționînd în același timp dezvoltarea fibroblastelor în cultură [5, 12, 22].

Adevăratul “părinte” a culturilor de keratinocite folosite în scop terapeutic este Green. În 1974 el a făcut o descoperire întîmplătoare, care a condus mai apoi, la obținerea epiteliului de cultură și utilizarea lui (1979) în acoperirea arsurilor de gradul III. El studia o formațiune tumorală la șoareci – teratomul – ce conținea celule pluripotente, capabile să dea naștere mai multor tipuri de celule somatice.

Se cunoaște faptul că celulele umane nu-și modifică proprietățile în cultură, deci își păstrează capacitatea de diferențiere. Astfel keratinocitele de cultură puteau fi folosite în acoperirea defectelor epidermice ca grefe autoloage [19].

Un alt element important îl constituie însăși structura epidermului. Acesta este constituit în proporție de 90 % dintr-un singur tip celular – keratinocite. Prin obținerea culturilor de keratinocite, se poate astfel “fabrica” epiderm de cultură asemănător ca structură cu cel normal. Fibroblaștii au un rol esențial în asigurarea optimă a proliferării keratinocitelor. Producții secretați de acestea, împreună cu fluidele din terminațiunile capilare difuzează prin membrana bazală, ajungând astfel în epiderm. Prin introducerea fibroblaștilor în cultură s-au creat condiții favorabile, asemănătoare modelului “in vivo”, pentru creșterea keratinocitelor de cultură. Ca atare s-au folosit linii de fibroblaste numite 3T3, iradiate letal, pentru a preveni propria lor proliferare. Culturile au fost îmbogățite mai târziu și cu alte substraturi: factori de creștere epidermali, toxină holerică, mixturi de diverși factori de creștere, care au îmbunătățit multiplicarea celulelor epiteliale [9, 15, 17].

Reușind să obțină culturi întinse de keratinocite din epidermul uman Green și colaboratorii (1979) au demonstrat că acestea pot fi utilizate în acoperirea pe termen lung a unor defecte cutanate întinse (în special la pacienții arși) [9].

Succesul unei astfel de operațiuni depinde și de natura patului receptor. De aceea s-a acordat o mai mare atenție pregătirii acestuia pentru grefare. Însă, rolul definitoriu îl au celulele ce formează aceste culturi, iar numărul și capacitatea lor de regenerare este strâns legată de prezența celulelor stem. Prezența acestora în număr cât mai mare, asigură un rezultat funcțional remarcabil dar și viabilitatea pe termen lung a epidermului. Rezultatele slabe obținute în practica medicală pot fi explicate astfel prin depleția acestor celule din cultură.

Reprezentarea slabă a holoclonelor în cultură, poate fi explicat prin:

- condiții incorecte de realizare a culturii
- injurii la nivelul stratului bazal epidermic
- utilizarea unor substraturi și a unor tehnologii de cultură noi, netestate suficient [18].

Regenerarea permanentă a epidermului ce se obține după transplantul culturilor din keratinocite, demonstrează că :

- celulele stem epidermale pot fi prezervate în culturile de keratinocite
- celulele stem nu își pierd calitățile după efectuarea transplantului
- holoclonele au un potențial proliferativ foarte ridicat [7, 9, 20].

Metode utilizate

Tegumentul, recoltat sub forma unei mici piese bioptice, a fost tratat cu dispază, pentru separarea epidermului de derm, și apoi cu tripsină, pentru separarea celulelor epidermice. Keratinocitele astfel obținute, au fost cultivate pe un substrat ce conținea fibroblaste 3T3 iradiate letal, îmbogățite cu diverși factori de creștere. Majoritatea celulelor nu au fost capabile să inițieze formarea de colonii, deoarece își începuseră deja procesul de diferențiere terminal. Chiar dacă sunt îndeplinite condițiile optime de cultură, doar aproximativ 1-10% din celule proliferază, inițiind mai apoi formarea de colonii. Aceste celule se multiplică exponențial, având o perioadă de diviziune de aproximativ 17 h. Prin separarea lor și transferul pe medii noi de cultură, formează colonii, cu o eficiență de aproximativ 70% [17].

După aproximativ 7 zile colonia epidermală devine monostratificată, iar celulele din regiunea centrală, încep să se stratifice. Aceasta din urmă aflându-se în straturile superioare încep să își piardă din capacitatea proliferativă, ne mai asigurând creșterea exponențială a coloniei. Pentru a evita acest inconvenient vor trebui dissociate celulele, înaintea începerii stratificării lor, și transferate pe medii proaspete de cultură, în vederea formării de noi colonii. Celulele bazale sunt în contact direct cu mediile de cultură, ce joacă rol de membrană bazală, iar celulele diferențiate terminal, se regăsesc în stratul suprabazal [2, 15].

Similar cu structura “in vivo”, keratinocitele din cultură, sunt ancorate între ele prin intermediul desmozomilor. Acestea asigură compactarea straturilor celulare având rol și în

inițierea confluării coloniilor vecine. Se va forma astfel, un strat compact de epitelii ale cărui celule, sunt unite între ele de către desmozomi. Epiteliul de neocultură, va putea fi ușor detașat de mediul de cultură, prin acțiunea dispazei, care va dizolva legăturile dintre celulele bazale și substrat fără însă a afecta joncțiunile desmozomale [3, 21].

Capacitatea keratinocitelor de a genera colonii, diferă în funcție de gradul de diferențiere a fiecărui tip celular. Tipurile celulare sunt reprezentate de : holoclone, meroclone și paraclone. Holoclonele pot genera îndeajuns de multe progene, pentru a reconstitui în totalitate populația de keratinocite conținută în epidermul uman. Așadar populația de keratinocite din cultură nu este omogenă. Holoclonele reprezintă coloniile cu cel mai mare potențial de proliferare. Dacă nu sunt îndeplinite condițiile de cultură acestea se pot transforma în paraclone – clone cu potențial scăzut de proliferare de aceea trebuie asigurate condiții de cultură propice pentru conservarea unui număr cât mai mare de holoclone [12].

Pentru a realiza o cultură epidermală este suficient să se recolteze o piesă biptică tegumentară de mici dimensiuni, aproximativ 3-4 cm. Din aceasta se pot obține în 3-4 săptămâni, aproximativ 2 m² de epitelii, cantitate suficientă pentru a acoperi întreaga suprafață a corpului unui individ. Integrarea unui epitelii de cultură la nivelul patului receptor este diferită de cea a grefei autoloage de piele liberă [3, 10, 19].

Tehnica de lucru

Probele de țesut tegumentar au fost obținute de la persoanele ce au dat acordul, în urma unor intervenții chirurgicale. Fragmentele ce conțin foliculi piloși trebuie să aibă dimensiuni cuprinse între 3-4 cm . Ajunse în laborator fragmentele au fost spălate de câteva ori în mediul PBS Dulbeco fără Ca și Mg cu penicilină-streptomicină-amfotericină [4, 13].

Se îndepărtează o mare parte din derm și țesutul gras cu ajutorul unei foarfeci fine, apoi fragmentul tegumentar se spală și se taie în bucăți mici de 0.5 cm. Fragmentele astfel obținute sunt incubate timp de 18h la 4 grade C într-o soluție de dispază în PBS fără Ca și Mg (dispază 2,5 mg /ml). În felul acesta se produce separarea epidermului de derm. Epidermul obținut este spălat și secționat în fragmente cât mai mici cu ajutorul unei foarfeci. Fragmentele se incubează la 37 grade C pe agitator timp de 20 min, în 4-5 ml sol de tripsină(0.05%) și EDTA(0.01%) . După incubare reacția de tripsinizare este întreruptă cu ajutorul unei soluții de inhibitor de tripsină 1mg/ml. Celulele obținute în urma tripsinizării sunt colectate în tuburi de plastic de 50 ml și spălate în PBS fără Ca și Mg [15, 17].

Culturile primare de keratinocite s-au realizat la o densitate de 0.5-1• 10000 celule /cm² în flacoane sau plăci de cultură. S-a utilizat mediul KSM.

Din structura epidermică rezultată lipsind foliculii piloși, glandele sebacee, sudoripare, totuși în situații limită această structură poate constitui un instrument util pentru a salva viața unor pacienți aflați în stare critică [4, 21].

Bibliografie

1. Radu E., Simionescu O., Regalia T., Dumitrescu D., Popescu L.M. Stem cells (p.63) in keratinocyte cultures from human adult skin, J.Cell.Mol.Med.6(4):593-598, 2002
2. Raymund E., Horch E., Munster M., Achauer B.M., Cultured human keratinocytes and tissue engineering skin substitutes, p.3-14;147-158., 2001.
3. Kolodka T.M.,Garlick J.A., Taichman L.B., Evidence for keratinocyte stem cells in vitro:long term engraftment and persistence of transgene expression from retrovirus-transduced keratinocytes Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 95:4356-4361, 1998
4. Tiberio R., Marconi A.,Fila C., Fumelli C., Pignatti M., Krajewski S., Keratinocytesenriched for stem cells are protected from anoikis via an integrin signaling pathway in aBc1-2 dependent manner, FEBS Lett., 524:139-144, 2002
5. Janes S.M., Lowell S., Hutter C. Epidermal stem cells J. Pathol., 197:479-491, 2002
6. Conti E Criteres d'utilisation du Re-Cell Brulure, vol. VIII, no 1, mai 2007
7. Enescu D.M., Bordeianu I. Manual de chirurgie plastică, Ovidius University Press,2001

8. Horch R, Munster A, Achauer B Cultured Human Keratynocytes and Tissue Engineered Skin Substitutes Thieme, Germany, 2001
9. Howard Green Cultured cells for the Treatment of Disease. Scientific American, nov., 1991, p.96-102
10. Jensen U.B., Liwell S., Watt F.M. The relationship between stem cells and their progeny in the basal layer of human epidermis:a new view based on whole-mount labelling and lineage analysis Development, 126:2409-2418, 1999
11. Lavker R.M., Sun T.T. Epidermal stem cells: properties, markers and location Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 97:13473-13475, 2000
12. Lehrer M.S., Lavker R.M., Sun T.T. Strategies of epithelial repair:modulation of stem cell and transit amplifying cell proliferation, J.Cell.Sci., 111:2867-2875., 1998
13. Liang L., Biekenbach J.R., Somatic epidermal cells can produce multiple cell lineages during development Stem cells, 20:21-31, 2002
14. Li A., Simmonds P.J., Kauer P., Identification and isolation of candidate human keratynocytes stem cells based on cell surface phenotype Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 95:3902-3907, 1998
15. Potten C.S., The epidermal proliferative unit, Cell Tissue Kinet, 7,77-78, 1974
16. Pellegrine G., Golisano O., Paternal P., Lambiase A., Bonini S., Rama P., Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface , J.Cell.Biol.145:769-782, 1999
17. Van Rossum M.M., Schalkwijk J., Van de Kerkhof P.C., Van ErpP.E., Immunofluorescent surface labelling flow sorting and culturing of putative epidermal stem cells derived from small skin punch biopsies. J.Immunol.Methods 267:109-117; 2002
18. Eugen R. Izolarea culturilor si caracterizarea celulelor stem epidermale adulte in vederea utilizarii terapeutice. Raport de cercetare/2003
19. Kamolz L. P. colaborator The Viennese culture method: cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on fibroblast containing fibrin glue gels vol. 31., no. 1 feb.2005
20. Lascar I. Principii de chirurgie plastică și microchirurgie reconstructive Ed.Național, 2005
21. Odland G. F., Structure of the skin., Physiol. Biochem. and Molec. Biology of the skin., Oxford Univ. Press, 2 th'ed., p.3-62.
22. Billingham, R.E.; Medawar, P.B. (1951), "The Technique of Free Skin Grafting in Mammals", Journal of Experimental Biology 28 (3): 385–402, <http://jeb.biologists.org/cgi/reprint/28/3/385.pdf>.

SINDROMUL „HIP-SPINE”

Andrei Olaru

Catedra Traumatologie, ortopedie și chirurgie de campanie USMF “Nicolae Testemițanu”

Summary

„Hip-spine” syndrome

Hip osteoarthritis causes abnormal gait and spinal sagittal alignment and is associated with low back pain. In this paper is related the review of literature for hip-spine syndrome problem.

Rezumat

Osteoartrita șoldului induc modificări prin înclinarea anterioară a bazinului și hiperlordoză lombară asociată de dureri de spate. În această lucrare esre relatată revista literaturii pe sindromul “hip-spine”.