

U.M.F. "Carol Davila" București
Facultatea de Medicină Dentară
Disciplina de Ortodonție și Ortopedie Dento-Facială

Considerații asupra factorilor de creștere din concentratele trombocitare cu potențial regenerativ tisular

Rezumatul Tezei de doctorat

**CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC:
Prof. univ. dr. Ecaterina IONESCU**

**STUDENT DOCTORAND:
Dr. Mihai Bogdan BUCUR**

2019

Introducere

Utilizarea derivaților plasmatici obținuți prin concentrarea sângelui venos periferic, cunoscuți sub numele de "concentrate trombocitare", a fost implementată, de peste un deceniu, ca alternativă de tratament minim – invazivă într-o gamă largă de afecțiuni din sfera ortopediei și a chirurgiei plastice. Interesul pentru aprofundarea cunoștințelor privind concentratelor trombocitare a crescut progresiv în ultima perioadă datorită extinderii folosirii clinice a concentratelor trombocitare în alte specialități, mai ales în medicina dentară.

Deși domeniul cercetării mecanismelor biologice implicate în regenerarea tisulară s-a dezvoltat exponențial în ultimii ani, preocuparea specialiștilor tinde să exploreze cu precădere aria practică (cunoașterea efectelor clinice ale concentratelor trombocitare), și mai puțin ariile legate de științele fundamentale (investigații de biologie moleculară asupra acțiunii mecanismelor fiziopatologice ale derivaților plasmatici autologi).

Accesibilitatea tot mai mare a acestor terapii în medicină dentară a fundamentat cercetarea de față, care își propune de a completa datele existente în literatura de specialitate cu privire la fiziopatologia regenerării tisulare, sub acțiunea factorilor de creștere din concentratele trombocitare.

În acest sens, prima direcție de cercetare a tezei a vizat stabilirea prin teste imunohistochimice a profilului factorilor de creștere al concentratului trombocitar cel mai utilizat în practică la momentul de față - Plasma bogată în plachete/fibrină (PRF) - comparativ cu cheagul alveolar postextractional; studiul încearcă să aducă argumente în favoarea utilizării terapeutice a factorilor de creștere, întrucât substratul fiziopatologic al intervenției acestor molecule în regenerarea tisulară este încă obscur.

Plecând de la diferențele evolutive ale leziunilor mucoasei orale, comparativ cu cele tegumentare (caracterizate printr-o rată crescută a cicatrizării patologice), a doua direcție de cercetare pentru elaborarea tezei de doctorat s-a orientat spre explorarea complexă imunohistochimică a factorilor de creștere exprimați la nivelul cicatricilor mucoasei orale, comparativ cu țesutul cicatricial. Rezultatele acestei cercetări suscită un mare interes practic, confirmând existența unei legături între factorii de creștere investigați și evoluția favorabilă a procesului de vindecare.

Întrucât partizanii utilizării clinice a concentratelor trombocitare susțin eficacitatea acestora, ca o modalitate biologică sigură pentru a accelera procesul de vindecare, m-am orientat - în cadrul celei de-a treia direcții de cercetare – spre evaluarea comparativă *in vitro* a efectului exercitat asupra culturilor celulare de către două tipuri de concentrate trombocitare (diferite prin modalitatea de preparare), comparativ cu cheagurile alveolare postextractionale.

Clarificarea acestui aspect, neabordat până acum de alți autori, ne face să considerăm că indicațiile de tratament în medicina dentară pot fi mai largi decât se credea, utilizarea factorilor de creștere din concentratele trombocitare având certe perspective de ameliorare a regenerării tisulare.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Cercetarea din cadrul tezei se încadrează într-un domeniu extrem de inovativ, cel al aplicațiilor concentratelor trombocitare, bogate în factori de creștere, în medicina dentară. Prezenta lucrare ilustrează rezultatele cercetărilor complexe imunohistochimice și de biologie moleculară asupra diferitelor tipuri de concentrate trombocitare utilizate în domeniul medicinei dentare. Studiile realizate au fost validate prin publicarea în reviste de specialitate.

Originalitatea cercetării constă în stabilirea profilului imunohistochimic al concentratelor trombocitare și respectiv compararea efectului biologic a două tipuri diferite de produse plasmatică (bogate în factori de creștere), realizată experimental pe culturi celulare.

Rezultatele acestei cercetări sunt promițătoare, venind în sprijinul validării aplicării unor procedee minim invazive cu obținerea unor rezultate favorabile în regenerarea tisulară, în domeniul medicinei dentare. Tratamentul cu aceste produse plasmatică autologe are un preț de cost redus, aplicarea lor având potențial benefic, reprezentat de favorizarea procesului de regenerare tisulară, cu risc redus de apariție a complicațiilor.

Domeniul aplicației în medicina dentară a concentratelor trombocitare bogate în factori de creștere este unul de avangardă, cercetările aducând o contribuție valoroasă la ameliorarea fundamentului teoretic pentru utilizarea acestor procedee în practica clinică, în beneficiul pacienților.

Capitolul 1. Considerații generale asupra rolului biologic al trombocitelor

Cu toate că mecanismele celulare implicate în fiziologia și fiziopatologia trombocitară sunt încă incomplet elucidate, rolul lor cheie în multiplele procesele metabolice atrage atenția nu doar asupra factorilor ce pot afecta această linie celulară, dar și mai ales potențialului terapeutic al concentratelor trombocitare.

În prezent sunt disponibile în practică două sisteme mari de obținere a concentratelor trombocitare de generația a doua: 1) Sistemul *Platelet Rich Fibrin (Advanced PRF, A-PRF)* – concentratul trombocitar bogat în trombocite și fibrină și 2) Sistemul *Plasma Rich in Growth Factors (PRGF - Endoret®)* - concentratul de plasmă bogat în factori de creștere (trombocitari). Pentru ambele tipuri de sisteme de preparare a concentratelor trombocitare de generația a doua au fost realizate studii care susțin o serie de indicații potențiale în terapiile regenerative tisulare pentru medicina dentară.

Deși au fost realizate progrese remarcabile în cunoașterea și înțelegerea rolurilor fiziologice și a implicațiilor fiziopatologice ale trombocitelor, rămân numeroase aspecte de elucidat deoarece trombocitele sunt celulele responsabile de vindecarea țesuturilor, având capacitatea fiziologică de a sintetiza și elibera (imediat posttraumatic) atât a unor molecule inflamatorii (citokine) și, mai ales, a unei multitudini de factori de creștere, cu rol în regenerarea tisulară.

Utilizarea derivaților plasmatici, rezultați prin concentrarea trombocitelor din sângele venos propriu, a fost propusă ca o metodă alternativă de tratament minim-invazivă a leziunilor tisulare. Avantajul major al procedurii, afirmat de suținătorii procedurii, constă în aceea că folosește un concentrat al propriului material biologic al pacientului, riscul de complicații fiind foarte redus.

Deși folosirea concentratelor trombocitare în medicina dentară a devenit extinsă în ultimii ani, nu există date concludente în literatură care să elucideze suportul molecular care ar putea explica rezultatele promițătoare (*in vitro* și *in vivo*), demonstrate de studiile clinice. Ca urmare, cercetarea mea s-a orientat spre stabilirea suportului biologic prin care concentratele trombocitare facilitează vindecarea.

Capitolul 2. Factorii de creștere cu potențial regenerativ tisular

Factorii de creștere reprezintă un grup de molecule ce reunește o serie de substanțe bioactive ce acționează cu precădere pe o anumită linie celulară, modulând o serie de procese biologice, printre care creșterea celulară, activitate mitogenă sau inhibarea apoptozei.

Înțelegerea mecanismelor biologice care stau la baza funcționării factorilor de creștere, precum și cunoașterea derulării proceselor fiziopatologice care apar după producerea unei leziuni traumatice, dar și a fenomenelor care intervin în reacția de vindecare endogenă, reprezintă oportunități pentru clarificarea rolului potențial al concentratelor trombocitare în stimularea regenerării țesuturilor epiteliale și conjunctive de la nivelul mucoasei orale.

Studiile recente de fiziopatologie statuează că factorii de creștere sunt secretați majoritar de către trombocite, dar, practic, există și alte linii celulare ce sunt capabile să secrete acești agenți biologici. Atenția cercetărilor a fost îndreptată mai ales asupra concentratelor trombocitare, având în vedere că factorii de creștere plachetari acționează, simultan, la nivelul mai multor procese fiziopatologice, fiind capabili să moduleze mai multe procese biologice din procesul de vindecare. Literatura de specialitate consemnează rezultate clinice favorabile în regenerarea tisulară, atunci când se folosesc în scop terapeutic factori de creștere de origine trombocitară.

Cercetările experimentale din cadrul cercetării personale au fost direcționate pe evaluarea completă și amănunțită a implicării factorilor de creștere în regenerarea tisulară, cu scopul de a aduce argumente clare asupra rolului terapeutic potențial al concentratelor trombocitare în vindecare.

Contribuția personală

Cercetarea este structurată în trei părți:

1. Studiu de evaluare imunohistochimică al factorilor de creștere din concentratele trombocitare
2. Studiu de evaluare imunohistochimică a expresiei factorilor de creștere la nivelul cicatricilor mucoasei orale și cicatricilor tegumentare
3. Studiu experimental privind efectele concentratelor trombocitare asupra capacității de proliferare și migrare celulară *in vitro*, comparativ cu cheagul alveolar postextractional.

Metodologia generală de studiu

Protocolul studiului a fost aprobat de către Comisia de Etică a Spitalului Clinic de Chirurgie Oro-Maxilo-Facială "Prof.dr.Dan Theodorescu" București (nr. 250/14.01.2016) și de către Comisia de Etică a Spitalului Clinic "Colentina" București (nr. 63/31.10.2016)

Toți participanții la studiile clinice desfășurate la Clinica de Chirurgie OMF a Spitalului Clinic de Chirurgie Oro-Maxilo-Facială "Prof.dr.Dan Theodorescu" București și-au exprimat acordul și au semnat consimțământul informat.

În calitate de autor al acestei lucrări de doctorat, îmi asum anonimizarea datelor folosite la redactarea acestei teze de doctorat, toate datele pacienților urmăriți în acest studiu păstrându-și caracterul confidențial.

Determinările histopatologice și imunohistochimice au fost realizate în colaborare cu serviciul de Anatomie patologică al Spitalului Clinic Colentina, respectiv cu Laboratorul de Imunobiologie al Institutului Național de Cercetare-Dezvoltare în Domeniul Patologiei și Științelor Biomedicale "Victor Babeș".

Capitolul 3. Studiu de evaluare imunohistochimică al factorilor de creștere din concentratele trombocitare

Studierea substratului celular și molecular care ar putea justifica luarea în considerație a produselor biologice obținute prin centrifugarea sângelui venos periferic în regenerarea tisulară nu a reprezentat, până în prezent, o direcție prioritară de cercetare. În acest context, mi-am propus identificarea profilului celular și molecular al concentratelor trombocitare, utilizate în practică, la ora actuală, în cadrul cercetării doctorale.

Obiectivul studiului

Scopul studiului a fost identificarea profilului celular și evaluarea imunoprofilului histochimic al celui mai utilizat tip de concentrat trombocitar de generație nouă (PRF), comparativ cu structura celulară și profilul molecular al cheagului alveolar, organizat postextracțional.

Material și metodă

Am realizat un studiu de tip case control, efectuat pe cheaguri PRF provenind de la un număr de 12 pacienți, fără discrazii sanguine sau coagulopatii în antecedente, selectați aleatoriu din cazuistica Clinicii de Chirurgie OMF a Spitalului Clinic de Chirurgie Oro-Maxilo-Facială "Prof.dr.Dan Theodorescu" București. Toți acești pacienți au necesitat efectuarea unor extracții dentare electiv; lotul a fost constituit din șase indivizi de sex feminin și șase de sex masculin, cu vârste cuprinse între 35 de ani și 65 de ani. Pentru control, am folosit cheaguri alveolare postextracționale, recoltate de la aceeași subiecți din lotul investigat.

Produsele biologice de testat, respectiv cheagurile PRF și cheagurile alveolare postextracționale, au fost obținute astfel:

a) Cheagurile PRF

Pentru obținerea concentratelor trombocitare am utilizat protocoalele standardizate utilizate la ora actuală în practică, recoltarea sângelui venos în vederea obținerii produsului de centrifugare (cheagurile PRF) efectuându-se de la aceeași pacienți cărora li s-au recoltat cheagurile alveolare postextracționale. Pentru a obține cheagurile PRF, de la cei 12 subiecți care au necesitat extracții dentare a fost colectat cu 10 minute preoperator sânge venos periferic în patru eprubete sterile de sticlă tip *A-PRF*, cu capacitate de 10 ml; eprubetele au fost plasate imediat după recoltarea sângelui venos periferic într-o centrifugă preprogramată, conform protocolului *A-PRF*, timp de 14 minute, la o turație de 1300 rpm. După încheierea procesului de centrifugare, produsul rezultat a fost extras din eprubete și s-a realizat mecanic separarea fracției de hematii de restul structurii, ceea ce constituie cheagul de fibrină (cheagul PRF).

b) Cheagurile alveolare postextractionale

Pentru obținerea cheagurilor alveolar postextractionale, protocolul chirurgical a constat în decolarea unui lambou muco-periostal cu grosime totală, rezultat în urma realizării unei incizii intrasulculare unice, ferme, urmată de luxarea și extracția traumatică a dinților, utilizând instrumentar convențional. După toaletarea plăgii postextractionale cu ajutorul unei soluții izotone de ser fiziologic și verificarea obținerii hemostazei la nivelul alveolei, a fost reacolat lamboul muco-periostal deasupra plăgii postextractionale și a fost aplicat un pansament compresiv supraalveolar. După 20 de minute de la finalizarea extracției, pansamentul a fost îndepărtat și s-a obiectivat cheagul constituit intraalveolar; acesta a fost mobilizat și recoltat cu ajutorul unor chiurete alveolare de dimensiuni corespunzătoare. După toaletarea plăgii postextractionale restante cu soluție de ser fiziologic, s-a practicat sutura lambourilor muco-periostale cu fire resorbabile 3-0. Atât cheagurile alveolare postextractionale cât și cheagurile (masele) PRF nu au necesitat orientare macroscopică. Ambele tipuri de materiale (cheagurile alveolare și cheagurile PRF) au fost imersate imediat după preparare în soluție de formaldehidă 10% tamponată, până a doua zi. Prelucrarea histopatologică a constat în următoarele etape succesive: deshidratare, clarificare și impregnare cu parafină cu ajutorul histoprosesorului *Leica ASP200S* după spălare prealabilă în apă de robinet timp de 1,5 ore. Piesele au fost incluse în blocuri de parafină, cu ajutorul unei stații *Thermo Fisher Microm EC 1150 H* și s-au practicat secțiuni de câte 3μ, cu ajutorul microtomului rotativ *Leica RM 2265*. Produsele au fost expuse pe lame de sticlă standard (pentru colorația de rutină hematoxilină-eozină, HE) și pe lame de tip *super-frost* (pentru colorațiile imunohistochimice, IHC). Colorația HE a fost efectuată cu ajutorul coloratorului automat *Leica ST 5020*, lamele colorate fiind montate cu ajutorul echipamentului automatizat *Leica CV 5030*. Pentru studiul imunohistochimic al produselor de testat (cheagurile PRF) și ale produsului de control (cheagurile alveolare) am utilizat anticorpii monoclonali specifici fiecărui tip factor de creștere trombocitar, respectiv pentru citokina proinflamatorie TNF-α, proteină ce constituie un marker fidel pentru răspunsul inflamator (etapa inițială a regenerării tisulare); de asemenea, pentru identificarea trombocitelor, am utilizat imunotiparea cu anticorpi CD61. Testele IHC au fost efectuate cu ajutorul imunocoloratorului automat *Bond III Leica*; pentru dezvoltare s-au folosit kiturile *Bond™ polymer refine detection (DAB)* și *Bond™ polymer refine red detection*. Examinarea secțiunilor a fost efectuată de către doi medici anatomo-patologi cu experiență și a urmărit: 1. identificarea în microscopie optică convențională (colorație HE) a tipurilor celulare din structura cheagului PRF, comparativ cu produsul de control (cheagul alveolar); 2. identificarea prin teste IHC a expresiei factorilor de creștere în cheagul PRF, comparativ cu cheagul alveolar postextractional.

Rezultate și discuții

Literatura internațională de specialitate, pe tema organizării structurale a concentratelor trombocitare, se rezumă la un număr mic de articole publicate în reviste de profil și câteva mențiuni legate de acest subiect în contextul unor altor studii mai ample, pe teme conexe. În același timp, profilul molecular pe care îl posedă concentratele trombocitare nu a făcut obiectul niciunui studiu în profunzime până în acest moment. Astfel, în cadrul cercetării, am stabilit că în structura cheagului PRF se regăsește un "nucleu" de fibrină, în rețeaua formată de filamente fiind incluse numeroase trombocite, dispuse fie izolat, fie grupate sub formă de agregate, dar și alte celule (în principal leucocite și mai puțin macrofage).

Spre deosebire de cheagul PRF, produsul de referință – cheagul alveolar postextractional prezintă o rețea de fibrină ceva mai laxă și o configurație celulară mai puțin abundentă, mai ales în ceea ce privește proporția trombocitelor; această observație este concordantă cu literatura de specialitate, care arată diferențe semnificative între cheagul alveolar postextractional și cheagul sanguin, organizat în urma procesului de coagulare fiziologică.

Diferențele identificate între cheagul PRF și cheagul alveolar postextractional nu constituie argumente suficiente, care să justifice *per se*, opțiunea selecționării concentratelor trombocitare, în detrimentul cheagului alveolar (constituit fiziologic), ca instrument terapeutic în favorizarea regenerării tisulare.

Este rezonabil să presupunem că echipamentul molecular al cheagului PRF să justifice efectele pozitive, stabilite în studiile clinice care au avut ca obiectiv stabilirea eficacității concentratelor trombocitare. Acest echipament molecular se referă în principal la citokine și la factorii de creștere.

Cercetarea de față a confirmat prezența în cantități mari a TGF- β 1, TGF- β 3 și PDGF în masa cheagului PRF, fapt ce ne face să ipotезăm că aceste molecule trombocitare (eliberate imediat posttraumatic) sunt adsorbite pe suprafața filamentelor de fibrină, de unde sunt eliberate lent, pe măsură ce trombocitele își epuizează capacitatea funcțională. Aceste date pot susține astfel oportunitatea utilizării PRF, ca promotor al regenerării tisulare, întrucât eliberarea lentă a factorilor de creștere din rețeaua de fibrină ar menține efectul biologic al acestora, pentru o perioadă mai îndelungată de timp (spre deosebire de cheagul alveolar postextractional, unde factorii de creștere sunt epuizați rapid).

În ceea ce privește imunoexpresia redusă a TGF- β 2, FGF1 și TNF- α în cheagul PRF, este posibil ca explicația să fie dată de adsorbția mai redusă pe suprafața filamentelor de fibrină; subliniem că nu există în literatură date care să argumenteze această opinie. Pe de altă parte, este posibil ca variabilitatea procesului de adsorbție să fie consecința unor factori mai puțin

cuantificabili, care țin fie de individ, fie de procesul de prelucrare histologică al specimenelor prelevate.

Pentru a clarifica aceste aspecte, care limitează interpretarea cu acuratețe a rezultatelor, consider că sunt necesare studii suplimentare care să evalueze variațiile adsorbției factorilor de creștere trombocitari la rețeaua de fibrină, monitorizând acei parametri care ar putea influența fenomenul de adsorbție (nivelul glicemiei, profilul lipidic, etc.). În ceea ce privește posibilitatea erorilor legate de prelucrarea histologică a produselor testate, subliniez că am utilizat un histoprosesor performant pentru prelucrarea probelor, variațiile putând proveni doar din erori minore legate de procesul de fixare, celelalte etape de prelucrare fiind automatizate (deshidratarea, clarificarea și impregnarea cu parafină), iar fixarea realizându-se în toate cazurile cu o soluție fixator standard (formol 10% tamponat); astfel, singura variabilă a acestui proces, suspectă de a genera variații, rămâne timpul de fixare. Ca urmare, pentru o cât mai bună standardizare, mi-am propus ca pentru studiile ulterioare să stabilesc o metodologie, care să îmi permită asigurarea unei durate similare a intervalului de fixare, pentru toate probele.

Nu în ultimul rând, consemnăm că studiul de față a confirmat prezența în cantitate mare a izoformelor TGF- β 1 și TGF- β 3 la nivelul zonei de "tranziție"; surprinzătoare este paucitatea trombocitară în această arie, expresia CD61 fiind cvasi-nulă.

Concluziile studiului

Datele obținute în studiul nostru sugerează că este posibil ca prezența cheagurilor PRF să creeze condiții favorabile răspunsului inflamator local, etapă inițială, esențială, a procesului fiziologic de regenerare tisulară.

Sub rezerva imposibilității validării statistice a rezultatelor (din cauza dimensiunii reduse a lotului experimental), diferențele dintre profilele imunohistochimice exprimate de concentratele trombocitare și cheagul alveolar postextractional sunt notabile; astfel, spre deosebire de cheagul alveolar, cheagul PRF reprezintă un potențial "rezervor" de factori de creștere trombocitari, necesari derulării fazei de inflamație - etapă esențială a vindecării tisulare.

În ceea ce privește zona de "tranziție", rezultatele preliminare obținute în cercetare necesită studii suplimentare, pentru a clarifica dacă această porțiune a concentratului trombocitar tip PRF are într-adevăr un rol semnificativ în regenerarea tisulară.

Capitolul 4. Studiu de evaluare imunohistochimică a expresiei factorilor de creștere la nivelul cicatricilor mucoasei orale și cicatricilor tegumentare

Trombocitele sunt responsabile de eliberarea unor factori de creștere cu impact definitoriu în inițierea procesului inflamator, etapă cardinală în regenerarea tisulară. În condițiile în care trombocitele eliberează aproape instantaneu posttraumatic citokine și factori de creștere, se poate presupune că epuizarea funcțională a plachetelor, la câteva zile de la debutul răspunsului inflamator, este compensată și augmentată prin secreția factorilor de creștere (responsabili de modularea celorlalte etape ale procesului imun) de către alte tipuri de celule prezente la nivelul leziunii. Experiența clinică arată că cicatrizarea patologică (cicatricea hipertrofică, cheloidul, etc.) este un fenomen rar observat la nivelul mucoasei orale, comparativ cu tegumentul.

Obiectivul studiului

Cercetarea de față s-a concentrat pe analiza expresiei imunohistochimice a mediatorilor inflamației cu rol în regenerarea tisulară la nivelul cicatricilor mucoasei orale și a cicatricilor tegumentare.

Material și metodă

Am analizat un număr de 32 cicatrici tegumentare (Grupul A) și 32 de cicatrici ale mucoasei orale (Grupul B), selectate aleatoriu din cauzistica Departamentului de Anatomie Patologică a Spitalului Universitar Colentina din București. Specimenele de cicatrici tegumentare au fost obținute în urma reintervențiilor pentru tumori cutanate rezecate anterior. Unele piese operatorii au prezentat tumoră reziduală, dar au fost selectate fragmente fără tumoră (cel puțin 4 mm între tumora reziduală și zona cicatricială selectată pentru analiză).

Toate aceste fragmente au fost procesate conform protocolului următor: fixare 24-72 ore în formalină tamponată 10%; lavaj 1-2 ore în apă robinet; procesare histopatologică automată pe un analizor tisular Leica ASP200S - 90 minute etanol 70° și 40° C, 105 minute etanol 80° la 40° C, 105 minute etanol 96° la 40° C, 60 min etanol 100° la 40° C, 90 min etanol 100° la 40° C, 90 min etanol 100° la 40° C, 2 ore xylene la 52° C 3 băi, 1 oră parafină 58° C, 2 ore parafină 58° C, 3 ore parafină 58° C). Pentru blocurile de parafină am folosit Thermo Fisher Microm EC 1150 H; 30 de secțiuni de grosime 3 micrometri au fost realizate cu un microtom rotativ Leica RM 2265. S-au realizat colorația de rutină (Hematoxilină eozină HE), colorații speciale *periodic acid Schiff* (PAS) și teste imunohistochimice (IHC). Testele de imunohistochimie au studiat următorii anticorpi: factorul de creștere și transformare beta1 (TGF-β1), factorul de creștere și transformare beta2 (TGF-β2), factorul de creștere și transformare beta 3 (TGF-β3), factorul de necroză tumorală alfa (TNF-α), factorul de creștere derivat plachetar (PDGF), factorul de

creștere a fibroblastelor și a celulelor endoteliale(FGF1). Testele IHC au fost efectuate cu ajutorul imunocoloratorului automat Bond III Leica.

Examinarea secțiunilor a fost realizată de către doi medici anatomo-patologi cu experiență și a urmărit pentru evaluare o scală semicantitativă cu 3 grade pentru pozitivitate: 0 - negativ, 1 - slab pozitiv (examinare secțiuni cu 40x), 2 - intens pozitiv (pozitivitate evidentă când secțiunile au fost examinate la 10x) indiferent de numărul de celule pozitive. Pozitivitatea a fost înregistrată pentru celule mezenchimale (fibroblaste și fibrocite), celule endoteliale, macrofage și, dacă au fost prezente, celule gigante multinucleate. Nivelul de pozitivitate a fost interpretat în corelație cu sexul, localizarea, prezența tumorii reziduale și vârsta cicatricii. Analiza statistică a fost realizată folosind programele EXCEL și EPIINFO, rezultatele fiind considerate semnificative statistic pentru P (χ^2) mai mic de 0,05.

Rezultate și discuții

Cicatrizarea patologică (hipertrofică sau cheloidă) frecvent observată în cazul plăgilor tegumentare, reprezintă un fenomen rar în cazul mucoasei orale. Așa cum se cunoaște, cicatrizarea patologică este consecința hiperproliferării țesutului mezenchimal, putând fi consecința acțiunii unor factori multipli, dintre care mai importanți sunt fibrogenza intensă și alterarea fenomenelor de contracție și remodelare; ca urmare, interesul cercetătorilor în direcția investigării mecanismelor care intervin în regenerarea tisulară a fost canalizat în ultimii ani către stabilirea rolului complex pe care îl joacă factorii de creștere și citokinele proinflamatorii (TNF α).

În studiu, toate cicatricile mucoasei orale și majoritatea cicatricilor tegumentare au prezentat expresia factorului pro-fibrotic TGF- β 1, în cazul cicatricilor tegumentare existând și o corelație între vârsta avansată a cicatricei și expresia TGF- β 1; izoforma TGF- β 2 a prezentat, în peste 75% dintre cicatricile tegumentare, valori pozitive în celulele gigante multinucleate, în timp ce expresia acestui factor pro-fibrotic a fost nulă în cicatricile mucoasei orale. Pe de altă parte, s-a observat pozitivitatea intensă a factorului anti-fibrotic TGF- β 3 în macrofagele prezente în toate cicatricile mucoasei orale, expresia aceluiași factor în macrofage fiind ușor pozitivă în 50% din cicatricile tegumentare. În acest context, citokinele imunomodulatoare tip TNF- α acționează antagonic factorilor de creștere TGF- β pro-fibrotici (izomerele TGF- β 1 și TGF- β 2), intensificând procesele inflamatorii în cursul reparației tisulare.

Am remarcat absența expresiei TNF- α în celulele prezente în cicatricile mucoasei orale, în timp ce la nivelul cicatricilor tegumentare aceeași citokină a avut expresie pozitivă în macrofagele din peste 50% dintre cazuri, și mai puțin frecvent în celulele mezenchimale și endoteliale, fenomen ce explică rata redusă de cicatrizarea patologică în cazul mucoasei orale, comparativ cu tegumentul.

Factorul de creștere derivat din trombocite (PDGF) pare să joace un rol major în regenerarea tisulară, având efect atât în etapa inflamatorie, prin acțiunea mitogenă asupra celulelor mezenchimale, dar și în faza de granulație și proliferare. Cercetarea din acest studiu a arătat PDGF este pozitiv atât în macrofage cât și în celulele endoteliale (fiind absent în celulele mezenchimale) din toate cicatricile mucoasei orale examinate. În cazul cicatricilor tegumentare, jumătate dintre celulele mezenchimale prezintă pozitivitate pentru PDGF, prezența în macrofage și celule endoteliale fiind mult redusă. Aceste observații ar putea explica rata redusă de cicatrizare patologică în cazul leziunilor mucoasei orale, comparativ cu cicatricile tegumentare, caracterizate printr-o rată ridicată a fibrozării.

Alte molecule biologice active, eliberate prin degranularea trombocitelor, sunt cele din familia factorului de creștere fibroblastic, cel mai reprezentativ fiind factorului de creștere fibroblastic 1 (FGF1), responsabil, de stimularea angiogenezei, fenomene major în regenerarea tisulară. În cazul cercetării mele, tiparul expresiei FGF1 în cicatricile mucoasei orale a fost asemănător cu cel observat în cazul PDGF, în ceea ce privește macrofagele și celulele endoteliale, dar se remarcă prezența FGF1 în toate celulele mezenchimale; în cazul cicatricilor tegumentare, FGF1 a exprimat mult mai slab imunocolorație la nivelul macrofagelor și celulelor endoteliale precum și în celulele mezenchimale.

Concluziile studiului:

Evaluarea tipurilor celulare prezente în cicatricile orale și tegumentare și a mediatorilor inflamației din conținutul acestora oferă informații valoroase cu privire la evoluția plăgilor, având în vedere că eliberarea citokinelor și factorilor de creștere cu rol imunomodulator încetează la câteva zile de la inițierea procesului de vindecare, odată cu epuizarea funcțională a trombocitelor.

În urma cercetării, am identificat diferențe remarcabile în exprimarea proteinelor biologice active, implicate în etapele procesului de vindecare, ce urmează fazei de inflamație inițială - modulată de factorii de creștere trombocitari.

Astfel, macrofagele orale expun cantități ridicate de factori de creștere implicați în etapele tardive ale vindecării - faza de granulație (FGF1) și faza de proliferare (PDGF BB), ceea ce nu se constată în cazul macrofagelor din cicatricile tegumentare.

Pe de altă parte, celule gigantice multinucleate din cicatricile tegumentare expun intens moleculele profibrotice (citokina TNF- α și factorii de creștere TGF- β 1 și TGF- β 2), în timp ce macrofagele din cicatricile mucoasei orale exprimă molecule antifibrotice, precum factorul de creștere TGF β 3. Aceste rezultate clarifică în mare măsură de ce nu se manifestă tendința de cicatrizare patologică (observată în cazul leziunilor tegumentare) la nivelul mucoasei orale, observație stabilită în premieră prin cercetarea de față.

Capitolul 5. Elaborarea unui model experimental pentru testarea capacității de proliferare și migrare a fibroblastelor în cazul concentratelor trombocitare și al cheagului alveolar

Implicarea fibroblastelor în regenerarea tisulară a fost evidențiată de numeroși autori, care subliniază, în studiile lor prezența unor variații morfologice în ceea ce privește fenotipul fibroblastic prezent în vindecare. Așa cum arătam în capitolul precedent, există diferențe cuantificabile clinic între tiparul de cicatrizare la nivelul mucoasei orale, comparativ cu cel de vindecare a plăgilor tegumentare, vindecarea mai rapidă și cu reacții inflamatorii/hiperproliferative fibroase mult mai puțin comune față de tegument.

Obiectivul studiului

Obiectivul general al acestui studiu experimental a fost cel de testare a capacității concentratele trombocitare de a stimula procesul de regenerare tisulară, utilizând un model experimental pentru a stabili efectul a două tipuri diferite de concentrate plachetare de generație nouă asupra capacității fibroblastele umane de a prolifera și migra *in vitro* sub acțiunea acestora, comparând efectele cu cele observate în cazul utilizării cheagurilor alveolare postextractionale.

Materiale și metodă

Materiale:

a) Cultura de fibroblaste

Pentru experiment am ales fibroblastele, celule pe care le regăsim în cantitate mare la nivelul mucoasei orale și care prezintă o capacitate naturală de proliferare de proliferare - atât *in vivo*, cât și în condiții de cultură - net superioară celulelor epiteliale (al doilea tip celular major din structura mucoasei orale).

Pentru investigație am folosit linia standard de fibroblaste dermice umane - L929 (cat.No. ATCC® CCL-1™), din colecția *European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC)* și conservată în biobanca *Institutului Național de Cercetare – Dezvoltare în Domeniul Patologiei și Științelor Biomedicale „Victor Babeș”*, conform cerințelor furnizorului.

Manipularea materialului pe parcursul testelor experimentale s-a efectuat într-o hotă cu flux laminar de Clasa II, care asigură un mediu aseptice necesar experimentelor cu culturi celulare.

Depozitarea fiolelor cu fibroblaste s-a făcut prin congelare în azot lichid.

b) Cheagurile alveolare postextractionale

Lotul de studiu a fost reprezentat de un număr de 10 subiecți clinic sănătoși – cinci de sex feminin și alți cinci de sex masculin, cu vârste cuprinse între 18 de ani și 60 de ani, care au necesitat efectuarea unei extracții dentare electivă în cadrul Clinicii de Chirurgie OMF a Spitalului Clinic de Chirurgie Oro-Maxilo-Facială "Prof.dr.Dan Theodorescu" București.

Tehnica de extracție practică pentru fiecare pacient a constat în incizii "în plic", cu reclinarea unui lambou muco-periostal, urmată de extracția atraumatică a dinților cu leziuni irecuperabile, utilizând instrumentar de extracție adecvat. După 20 de minute de la finalizarea procedurii chirurgicale, pentru fiecare subiect s-a identificat și prelevat în totalitate cheagul format la nivelul alveolei postextractionale; după toaleta plăgii restante cu soluție de ser fiziologic, s-a practicat sutura cu fire resorbabile 3-0.

Cheagurile recoltate au fost resuspendate într-o cantitate de 1 ml de mediu de cultură celulară, la care nu s-au adăugat suplimente; pentru a îndepărta toate celulele și resturile celulare, toate cheagurile resuspendate au fost filtrate prin filtre sterile de 0,22 μm (*Millipore*). Ulterior, s-au realizat diluții seriale în mediu de cultură celulară simplu după cum urmează 1:4; 1:8; 1:16; 1:48, în vederea analizării proliferării celulare cu ajutorul sistemului XCELLigence.

c) Concentratele trombocitare:

Cheagurile A-PRF

Pentru fiecare dintre cei 10 subiecți care au necesitat efectuarea unei extracții dentare electivă (de la care s-au prelevat cheagurile alveolare postextractionale), s-a efectuat prelevarea de sânge venos periferic preoperator, colectându-se câte patru eprubete sterile de sticlă (A-PRF10), cu capacitate de 10 ml; eprubetele au fost plasate imediat după recoltarea sângelui venos într-o centrifugă preprogramată, setată conform protocolului A-PRF: turație 1300 rpm, timp de 14 minute, în vederea obținerii cheagurilor PRF.

Cheagurile PRGF-Endoret

Pentru a produce cheagurile PRGF, de la cei zece subiecți din lotul de studiu susmenționat, am recoltat sânge venos periferic (dintr-o venă contralaterală celei din care s-a recoltat pentru procedeul descris la pct.b) în câte o eprubetă cu capacitate de 9 ml conținând 0,9 ml de citrat trisodic 3,8% (greutate / volum); probele de sânge au fost centrifugate la 580 G timp de 8 minute la temperatura camerei în centrifuga PRGF-Endoret System IV (*BTI Biotechnology Institute*), coloana de plasmă de deasupra cheagului (cheagul PRGF) fiind colectată separat de stratul leucocitar.

Metoda de lucru:

Pregătirea culturii de fibroblaste:

Pentru multiplicarea fibroblastelor în cultura de celule este necesară prezența mediului Eagle's Minimum Essential Medium - EMEM (ATCC), în formula completă: soluție de săruri, aminoacizi neesențiali, 2mM L-glutamina, 1mM piruvat de sodiu, 1500 mg/l bicarbonat de sodiu, la care s-a adăugat ser defibrinat de cal în concentrație 10% (ATCC) și o soluție antibiotic-antimicotic 1% (Sigma-Aldrich).

Fiolele cu fibroblaste se decongelează până la temperatura de 37°C, obținându-se un sediment, sub forma unui cristal de mărimea unui bob de orez; după separarea de sediment, suspensia se transferă într-o eprubetă sterilă, ce conține mediul EMEM, suplimentat cu ser defibrinat de cal 10%, în volum fix de 2 ml; amestecul rezultat se supune centrifugării la 1000 rpm, timp de 10 min, la o temperatură de 4°C.

Suspensia de fibroblaste rezultată este introdusă într-o cameră de numărare tip *Burker-Turk*, în care se adaugă o soluție colorantă (trypan blue), pentru a permite identificarea fibroblastelor viabile; astfel, peste o cantitate de 20-50 μ l suspensie celulară s-a adăugat un volum egal de colorant trypan blue 0,4-0,5%, omogenizându-se amestecul cu ajutorul unei pipete automate; dispersia formată din fibroblaste și soluția colorantă de contrast, a fost transferată în camera de numărare, până la umplerea uniformă a întregului volum al acesteia; s-au numărat separat fibroblastele viabile (necolorate) și fibroblastele moarte (colorate albastru datorită încorporării colorantului) în cel puțin două careuri ale camerei de numărare.

Concentrația celulară (numărul de celule *per* ml suspensie) și numărul total de celule din suspensie a fost determinată folosind următorul algoritm de calcul:

- concentrația celulară = număr mediu de celule *per* careu x factorul de diluție x 10⁴;
- număr total de celule = număr celule *per* ml x volumul suspensiei;
- viabilitatea celulară (%) = (număr mediu de celule vii *per* careu/număr mediu total de celule *per* careu) x 100

Suspensia celulară cu viabilitate peste 90% a fost transferată apoi în plăcile de celule (flaskuri de cultură); plăcile de celule au fost introduse ulterior în incubatorul setat la 37°C în atmosferă cu 5% CO₂ și 95% aer; monitorizarea culturilor a fost realizată zilnic, cu ajutorul unui microscop inversat, obiectivându-se distribuția în placa de celulele a fibroblastelor cu aspect morfologic normal – alungit.

Odată ajunse la o confluență de 70-80%, fibroblastele *de novo* au fost desprinse de pe mediul de cultură, pentru a fi cultivate la o densitate mai mică; pentru a îndepărta urmele de ser de cal, care conține inhibitori de tripsină, stratul de fibroblaste a fost spălat cu blândețe cu o soluție de tripsină 0,25% -EDTA 0,53mM; după îndepărtarea soluției de tripsină, utilizată pentru

spălare, s-a adăugat în plăcile de celule o cantitate de 2,5 ml soluție tripsină 0,25% -EDTA 0,53mM.

După obiectivarea cu ajutorul microscopul inversat a fibroblastelor desprinse de suport, s-a adăugat o cantitate de 6 ml mediu EMEM și s-a repartizat suspensia celualră în mai multe plăci de celule, rezultând o rată medie de subcultivare de 1:2; cultura de fibroblaste obținută astfel a fost incubată la 37°C în atmosferă cu 5% CO₂ și 95% aer.

După finalizarea testelor experimentale, fibroblastele au fost desprinse de suport cu ajutorul soluției de tripsină și spălare prin centrifugare, iar sedimentul fibroblastic rezultat a fost depozitat în mediul de înghețare (zăpadă carbonică), suplimentat cu 5% (v/v) dimetilsulfoxid și stocat în azot lichid.

Pentru evaluarea interacțiunii dintre o cultură celulară (fibroblaste) și cele trei tipuri de produse biologice de testat (cheagul PRF, cheagul PRGF și cheagul alveolar postextracțional), utilizând evaluarea proliferării și migrării fibroblastelor prin două metode:

1. monitorizare în dinamică secvențială a proliferării și migrării celulare, *in vitro*, folosind un test standard de cicatrizare la suprafață modificat
2. monitorizare în timp real a proliferării și migrării celulare, *in vitro*, cu ajutorul tehnologiei XCELLigence.

1. Monitorizarea în dinamică secvențială a proliferării și migrării in vitro a fibroblastelor

Pentru monitorizarea procesului de proliferare și migrare a fibroblastelor, am utilizat un experiment inspirat de testul standard de cicatrizare *Beyeler* ([13]). Astfel, fibroblastele au fost însămânțate în plăci de celule speciale (*Ibidi GmbH*), la o densitate de 0.33×10^6 celule/placă în volum total de 1,7 ml; cultura a fost incubată pe durata nopții, la 37°C, într-o atmosferă cu 5% CO₂; după obiectivarea la microscopul inversat a monostratului compact de fibroblaste, a fost îndepărtat cadranul de silicon, expunând o porțiune liberă de celule cu o arie de 500 μm; în acest mod, am reprodus un "defect tisular" cu o arie corespunzătoare dimensional pentru a simula cu acuratețe dinamica procesului de vindecare.

Pentru îndepărtarea fibroblastelor restante din suspensie, plăcile de celule au fost spălate de două ori cu o soluție tampon sterilă fosfat; consecutiv, au fost introduse în "defectul tisular" creat experimental, produsele biologice de testat; în plăcile de celule care conțineau produsele biologice de testat a fost adăugată o cantitate de 3 ml mediu EMEM simplu (pentru testarea compușilor), iar în plăcile de celule utilizate pentru control s-a adăugat o cantitate de 3 ml mediu EMEM suplimentat cu 10% ser defibrinat de cal.

Plăcile de celule au fost introduse apoi într-un sistem de monitorizare imagistică a proliferării și migrării fibroblastelor (în prezența compușilor de testat) – platforma *BioStation IM-Q (Nikon)*; acest echipament este format dintr-o cameră de incubare, care menține

temperatura constantă și atmosfera necesară cultivării celulelor, și un sistem de monitorizare imagistică a culturii, alcătuit dintr-un microscop inversat (setabil în funcție de necesitățile experimentului, atât în microscopie optică - 20x, 40X, 60X- cât și în microscopie de fluorescență), o cameră foto cu senzor de înaltă sensibilitate tip CCD, senzori de temperatură/umiditate și CO₂.

Testul propriu-zis a constat în observarea directă, la microscopul optic inversat, a migrării fibroblastelor în "defectul tisular" reprodus experimental, în contact cu produsele biologice evaluate - cheagul alveolar postextracțional, cheagul PRF sau cheagul PRGF. Analiza secvențială s-a făcut la intervale de 24 și respectiv 48 de ore, întrucât, așa cum se cunoaște, fibroblastele manifestă o rată inițială crescută de proliferare.

2. Monitorizarea în timp real a proliferării și migrării in vitro a fibroblastelor

Pentru a măsura în timp real modificările celulare generate de fenomenele esențiale ale regenerării tisulare – proliferarea și migrarea celulară, am utilizat dispozitivul *xCELLigence* (*Roche Applied Science/ ACEA Biosciences*).

Principiul pe baza căruia funcționează dispozitivul este înregistrarea impedanței electrochimice a fibroblastelor, variabilă care permite cuantificarea non-invazivă a fiziologiei celulare prin introducerea populației de fibroblaști în plăci speciale de cultură prevăzute cu circuite integrate formate din microelectrozi de aur.

Aplicarea unui curent continuu de voltaj mic (sub 20 mV) determină un semnal care generează un camp electric între electrozi care interacționează cu mediul ionic din interiorul godeurilor cu celule și este diferit în funcție de numărul de celule din godeu, morfologia celulei și gradul de aderare al acesteia la suprafață; toate aceste modificări sunt detectate atât temporal, la nivelul de milisecunde, cât și spațial, la nivelul modificărilor spațiale membranare.

Așa cum arătam, tehnologia utilizează un echipament specific (*xCELLigence*) pentru înregistrarea impedanței electrochimice a fibroblastelor, format dintr-o stație de înregistrare efectivă a parametrilor celulari în atmosferă controlată de temperatură și 5% CO₂, la care se atașează un computer, care înregistrează și prelucrează datele de impedanță. Înregistrarea este prezentată în timp real - cinetica impedanței și indexul celular (CI) – fiind determinată automat de software, la anumite intervale de timp.

Pentru a înregistra proliferarea fibroblastelor s-au utilizat plăcile E-Plate 16 (un dispozitiv cu 16 godeuri), care se plasează direct într-un incubator prevăzut cu atmosfera de 5% CO₂; software-ul specific înregistrează nivelul impedanței la timpii setați de utilizator și afișează valoarea acesteia în timp real.

Pentru înregistrarea impedanței celulare a fibroblastelor din cultura de celule a fost adăugat un volum de 50 μ l în fiecare din cele 16 godeuri; celulele, cultivate în condițiile descrise mai sus, au fost desprinse din plăcile de cultură cu ajutorul soluției de tripsină, au fost numărate și însămânțate în plăcile de măsurare a impedanței la densitatea de 2.500 celule/godeu, într-un volum de 100 μ l, astfel încât prin adaugarea compuşilor testați (în câte 50 μ l) volumul total/godeu sa fie de 200 μ l; după 5 minute de la însămânțare, plăcile E16 au fost introduse în echipamentul de măsurare și se setează înregistrarea la 15ms timp de 2 ore, iar după 2 ore de la începerea experimentului au fost introduși compuşii de testat în triplicate; echipamentul a fost setat pentru înregistrarea la 15 min timp de 48 ore, pentru înregistrarea proliferării fibroblastelor.

Monitorizarea în timp real a migrării fibroblastelor a fost realizată cu ajutorul plăcilor pentru testarea migrării celulare (CIM-Plate 16), camere de tip *Boyden*, formate din două camere (compartimente): una superioară și una inferioară, care se assemblează după introducerea culturii de fibroblaste.

Membrana microporoasă din construcția plăcuțelor pentru testare, realizată din polietilen-tereftalat, permite migrarea fibroblastelor în sensul gradientului de concentrație; porțiunea inferioară a membranei conține microelectrozii care înregistrează impedanța fibroblastelor care migrează din compartimentul superior în cel inferior al plăcii CIM-Plate 16.

Pregătirea culturii de fibroblaste începe prin aplicarea soluției de tripsină, cu 4 ore înainte de desprinderea culturii de fibroblaste din plăcile de celule, celulele cultivându-se în mediu EMEM simplu (fără ser defibrinat de cal adăugat); fibroblastele se desprind de suport și se resuspendă în mediu (nesuplimentat cu ser defibrinat de cal), ajustându-se suspensia până la o concentrație de 1×10^5 /ml.

Înainte de inițierea sistemului de monitorizare a migrării fibroblastelor a fost necesară pregătirea plăcilor CIM-Plate 16 și a suspensiei de celule. Această etapă este necesară pentru a facilita migrarea fibroblastelor prin membrana microporoasă, fenomen realizat prin tratarea plăcii cu o soluție de fibronectină cu concentrație de 1 μ g/ml în tampon fosfat salin steril; după pipetarea a câte 75 μ l soluție fibronectină în fiecare godeu al compartimentului superior al plăcii CIM, compartimentul a fost sigilat și incubat peste noapte la 4°C, iar în ziua următoare a fost îndepărtată soluția de fibronectină din camera superioară prin spălare dublă cu tampon fosfat salin steril.

Ulterior s-au adăugat produșii de testat (cheagurile alveolare postextractionale, cheagurile PRF, cheagurile PRGF) peste cultura de fibroblaste din compartimentul inferior al plăcuței CIM; în plăcuțele de control s-a adăugat ser defibrinat de cal 10%; după asamblarea componentelor, plăcuțele CIM a fost lăsată pentru echilibrare la incubator.

După o oră a fost înregistrat semnalul bazal în modulul modulul RTCA al dispozitivului *xCELLigence*; peste compuşii de testat din camera inferioară (cheagurile alveolare, cheagurile PRF, cheagurile PRGF) am adăugat 160 µl mediu EMEM, fără ser defibrinat de cal, iar ulterior am adăugat câte 20.000 celule/godeu în volum de 100 µl, în camera superioară a plăcii CIM (tratată anterior cu fibronectină); după reasamblarea compartimentelor plăcii CIM, s-a început înregistrarea migrării fibroblastelor, timp de 48 de ore, utilizând modulul RTCA.

Rezultate și discuții

Așa cum arătam în capitolul precedent, patologia vindecării este o sursă majoră de morbiditate; în acest context, este esențială cunoașterea mecanismelor celulare și moleculare, care reglează regenerarea tisulară, scopul fiind identificarea factorilor care pot interveni favorabil asupra vindecării. Astfel, pe lângă mijloacele terapeutice clasice (cu aplicabilitate relativ redusă în leziunile mucoasei orale), în ultimii ani a fost propusă utilizarea concentratelor trombocitare, bogate în molecule biologice active (citokine, factori de creștere).

În studiul de față, testarea *in vitro*, atât în dinamică, cât și în timp real, a evidențiat apariția proliferării și migării fibroblastelor, la interfața culturii de celule cu dispersia de cheag alveolar postextracțional. Acest rezultat este unic în literatura de specialitate, nefiind studiat de alți autori.

Așa cum aminteam, la ora actuală sunt larg utilizate în practică două procedee de obținere a concentratelor trombocitare de generația a doua – A-PRF și PRGF-Endoret. Întrucât literatura este foarte săracă în studii asupra comparării acestor două tipuri de concentrate trombocitare, am decis să evaluez comparativ cele două tipuri de produse biologice, ținând cont de faptul că cele două procedee tehnice de preparare a cheagurilor de fibrină - PRF sau PRGF – sunt foarte diferite, existând supoziția că ar putea exista diferențe semnificative atât în calitatea produsului, cât mai ales a concentrației de trombocite.

Rezultatele studiului de față, atât în cazul monitorizării fenomenelor proliferative celulare în dinamică, cât și în cazul evaluării în timp real (prin înregistrarea electroimpedanței celulelor), au confirmat existența unor diferențe semnificative statistic între proliferarea și migrarea fibroblastelor, fenomene cu amplitudine superioară în cazul utilizării cheagurilor PRGF, în comparație cu cheagurile PRF; aceste date vin în contradicție cu observațiile unor autori care au identificat cantități mai reduse a factorilor de creștere trombocitari (TGF-β, PDGF, VEGF), comparativ cu PRF. Aceste rezultate trebuie interpretate prin prisma faptului că, așa cum arătam în Capitolul precedent, concentratele trombocitare conțin, alături de factorii de creștere cu potențial pro-regenerativ, și molecule pro-inflamatorii (interleukine); urmare a faptului că aceste interleukine (care interferă acțiunea factorilor de creștere) sunt în cantitate

scăzută în cheagul PRGF, ar putea justifica efectul pro-proliferativ asupra fibroblastelor, mai intens decât al concentratelor obținute prin procedeul A-PRF.

Pe de altă parte, așa cum arătam în Capitolul 3, în concentratele trombocitare coexistă alături de plachetele sanguine și alte celule - cel mai frecvent leucocitele; în același timp, conținutul PRGF se regăsește doar o cantitate foarte redusă de leucocite, observație care vine în concordanță cu rezultatele studiului meu, care stabilește o capacitate ridicată de proliferare și migrare *in vitro* a fibroblastelor, net superioară celei asociate prezenței cheagurilor PRF. Nu în ultimul rând, remarc că este foarte posibil ca efectul pro-proliferativ, manifestat de fibroblaste sub acțiunea concentratelor trombocitare, să se regăsească și în cazul altor sușe celulare.

Rezultatele studiului de față sunt relevante în ceea ce privește capacitatea concentratelor trombocitare de generația a doua asupra proliferării fibroblastelor, având în vedere că, pentru acuratețea demersului științific, am considerat oportun să utilizez două metode diferite pentru monitorizarea proliferării și migării celulare; deși majoritatea cercetărilor asupra dinamicii celulare din literatură au utilizat exclusiv testul standard de cicatrizare, opinez că interpretarea rezultatelor acestuia trebuie făcută cu rezerve, întrucât procedeul presupune un grad important de subiectivitate în analiza datelor.

Deși rezultatele mele confirmă eficiența concentratelor trombocitare asupra proliferării fibroblastelor *in vitro*, extrapolarea acestei observații în practică este hazardată, în lipsa unor studii clinice prospective randomizate, care ar trebui să valideze eficacitatea și aplicabilitatea produselor biologice testate în prezentul studiu. Pe de altă parte, întrucât cercetarea prezentă se rezumă doar la efectul concentratelor trombocitare de generația a doua asupra fibroblastelor, sunt necesare studii care să evalueze impactul asupra altor linii celulare - celule epiteliale, osteoblaste - pentru a testa capacitatea de stimulare a dinamicii celulare.

Concluziile studiului

Identificarea unor teste experimentale care să confere obiectivitate și care să poată aduce argumente în evaluarea fiziologiei regenerării tisulare rămâne o continuare provocare; în prezentul studiu am utilizat pentru monitorizarea proliferării și migării celor mai reprezentative celule cu rol în vindecare – fibroblastele – două metode de evaluare, primul dintre acestea, testul standard de cicatrizare, oferind doar rezultate în dinamică, orientative, datorită potențialelor variații de interpretare subiectivă; ca urmare, am procedat la validarea observațiilor primului test prin măsurarea electroimpedanței, metodă absolut reproductibilă și cu acuratețe superioară.

Atât monitorizarea în dinamică secvențială, cât și cea în timp real, a demonstrat că în cazul culturilor de fibroblaste asupra cărora s-au aplicat cheaguri de fibrină obținute fie prin procedeul PRGF-Endoret există o corespondență semnificativă statistic cu rata de migrare celulară, superioară atât cheagurilor de fibrină PRF, cât și cheagurilor alveolare postextractionale.

În cazul cheagurilor de fibrină obținute prin tehnica A-PRF, după o perioadă de latență (primele 24 de ore), proliferare și migrarea fibroblastelor evoluează similar cu situația în care se utilizează cheagul alveolar postextractional, ceea ce indică potențialul în vindecare.

Capitolul 6. Concluzii

Complexitatea fiziologiei factorilor de creștere nu este elucidată complet până în prezent, făcându-ne să privim cu scepticism eficacitatea concentratelor trombocitare în regenerarea tisulară din teritoriul oro-maxilo-facial.

Teza de față aduce contribuții importante într-un domeniu de mare actualitate, respectiv utilizarea clinică a concentratelor trombocitare, propuse ca alternativă terapeutică în promovarea regenerării tisulare - grație potențialelor roluri imunomodulatoare conferite de conținutul crescut de plachete sanguine - și având în vedere necesitatea maximizării resursele proprii organismului și oportunitatea reducerii aportului de biomateriale exogene, cu rol în regenerarea tisulară.

Cu toate că evaluarea sistematică a profilului molecular constituie un demers esențial pentru validarea potențialului terapeutic al concentratelor trombocitare, această temă nu a mai fost abordată în literatură studiată. Ca urmare, am implementat un studiu imunohistochimic pentru decelarea factorilor de creștere din concentratul trombocitar cel mai uzitat în practică la ora actual - PRF - luând ca termen de comparație profilul molecular al cheagului alveolar postextractional, prelevate de la același subiect.

Acest studiu fiind unul pilot, analizele statistice efectuate nu au putut evidenția nici o asociație semnificativă statistic (componența numerică a lotului investigat fiind redusă); totuși, consemnăm că rezultatele obținute sunt concordante cu puținele date disponibile în literatură, demonstrând că în cheagul de fibrină se regăsesc numeroși factori de creștere, cu origine predominant trombocitară.

Importanța clinică a acestei observații este evidentă, întrucât factorii de creștere trombocitari eliberați posttraumatic, intervin în prima și cea mai importantă fază a vindecării (etapa de inflamație), ceea ce justifică opțiunea aplicării concentratelor trombocitare pentru promovarea regenerării tisulare, ca alternativă la "soluția" fiziologică - cheagul alveolar postextractional. Remarcăm că aceste concentrate trombocitare pot fi considerate un veritabil "rezervor" de factori de creștere, perfect biocompatibil, care eliberează rapid moleculele bioactive.

Pe măsură ce rețeaua de fibrină din cheagul PRF se degradează, apare și epuizarea funcțională a trombocitelor, ceea ce semnifică și o reducere rapid progresivă a factorilor de creștere cu origine plachetară. Pe de altă parte, realitatea clinică evidențiază că procesul de vindecare nu suferă sincope, consecutive încetării activității trombocitelor, dovadă că stimularea

regenerării tisulare este preluată de factori de creștere sintetizați de alte linii celulare locale; acești factori de creștere sunt identici structural cu cei eliberați de trombocite și exercită roluri în fazele tardive ale vindecării (granulație, proliferare, maturizare/remaniere).

Pe baza datelor din literatură, care indică că regenerarea tisulară nu urmează aceeași tendință pentru toate țesuturile de origine epitelială, existând diferențe nete între tegument (țesut grevat de apariția frecventă a cicatricilor patologice de tip hipertrofic) și mucoasa orală, am desfășurat următorul studiu din cadrul cercetării doctorale; acest studiu a vizat stabilirea profilului imunohistochimic al moleculelor biologice active în cicatricile mucoasei orale, respectiv în cicatricile tegumentare.

Rezultatele studiului au fost extrem de interesante, apărând diferențe remarcabile în exprimarea proteinelor implicate în etapele procesului de vindecare consecutive fazei de inflamație inițială (etapă modulată de factorii de creștere trombocitari).

Astfel, am constatat că macrofagele orale expun cantități ridicate de factori de creștere implicați în etapele tardive ale vindecării - faza de granulație (FGF1) și faza de proliferare (PDGF BB), fenomen nespecific cicatricilor tegumentare. O altă observație remarcabilă a reprezentat-o expunerea moleculelor profibrotice (citokina TNF- α și factorii de creștere TGF- β 1 și TGF- β 2), de către celule gigantice multinucleate din cicatricile tegumentare; în același timp, macrofagele din cicatricile mucoasei orale exprimă intens factorul de creștere TGF- β 3, cu efect antifibrotic.

Aceste rezultate clarifică în mare măsură de ce la nivelul mucoasei orale nu se manifestă tendința de cicatrizare patologică (tipar frecvent observat în cazul leziunilor tegumentare), observație stabilită în premieră prin cercetarea de față.

Pe baza acestor observații, putem considera că există argumente pentru continuarea studiilor asupra determinării rolului macrofagelor, leucocitele și a altor tipuri celulare, identificate și în compoziția concentratelor trombocitare - mai ales la nivelul "zonei de tranziție" – care ar putea reprezenta un factor-cheie în modularea fazelor tardive ale regenerării tisulare.

Cea de-a treia direcție de cercetare a demonstrat printr-un procedeu original, evaluarea eficienței potențiale a produselor biologice studiate, în regenerarea tisulară. Prin măsurătorile efectuate, atât secvențial (cu evaluare la 24 de ore și 48 de ore), cât și în timp real (pe parcursul a 48 de ore), am constatat obiectiv o reducere progresivă a dimensiunii "defectului tisular" creat experimental, prin migrarea fibroblastelor nou-formate, atât în cazul utilizării cheagurilor alveolare, cât și al concentratelor trombocitare obținute prin procedeu *PRGF-Endoret* sau prin tehnica *A-PRF*.

Deși declanșarea precoce a proliferării fibroblastelor nu poate fi considerată un parametru obiectiv care să indice progresul spre vindecare fiziologică, menționez că, în cazul aplicării cheagurilor PRF peste cultura celulară, am constatat o tendință redusă de obliterare a suprafeței "defectului tisular" în primele 24 de ore de la inițierea multiplicării celulare, cu o creștere importantă în următoarele 24 de ore; semnificația acestei "activări" a migrării fibroblastelor nu poate fi interpretată, deși se poate specula că prezența altor elemente celulare (leucocite) sau moleculare (citokine) ar putea explica fenomenul observat.

Rezultate acestui studiu trebuie privite sub rezerva faptului că testarea s-a făcut doar pentru o linie celulară standardizată, luând în considerație o dimensiune convențională a "defectului tisular" (500 μ). În același timp, nu se pot extrapola *a priori* observațiile experimentale, întrucât evoluția *in vivo* a plăgilor nu respectă același patern pentru toți pacienții; de asemenea, investigația s-a desfășurat pe un interval limitat (48 de ore), durată care se suprapune doar parțial peste perioada de vindecare a plăgilor; ca urmare, opinez că pentru validarea acestor date preliminare, sunt necesare studii clinice prospective randomizate.

Pe baza studiilor realizate în cadrul acestei cercetări, consider că există premise pentru a considera concentratele trombocitare ca pe o posibilă alternativă terapeutică cu caracter adjuvant, grație capacității potențiale de favorizarea vindecării, reprezentând un produs biocompatibil, obținut cu costuri reduse. Pentru validarea clinică a utilizării concentratelor trombocitare în practica medico-dentară este necesară efectuarea de investigații suplimentare, în cadrul unei platforme de studiu mai largi (universale), care să aducă în discuție rezultatele inconsistente sau incomplete ale studiilor efectuate până la momentul actual.

Bibliografie selectivă

1. Collier BS. Historical perspective and future directions in platelet research. *J Thromb Haemost* 2011;9(Suppl. 1):374–95.
2. Rumbaut RE, Thiagarajan P. Platelet–vessel wall interactions in hemostasis and thrombosis. *Integrated systems physiology: from molecule to function to disease*. San Rafael (CA); 2010.
3. Duckers C, Simioni P, Spiezia L, Radu C, Dabrilli P, Gavasso S, et al. Residual platelet factor V ensures thrombin generation in patients with severe congenital factor V deficiency and mild bleeding symptoms. *Blood* 2010;115(4):879–86.
4. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*. 2003; 83:835–70.
5. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev*. 2008; 22:1276–312.
6. Gao Z, Sasaoka T, Fujimori T, et al. Deletion of the PDGFR-beta gene affects key fibroblast functions important for wound healing. *J Biol Chem*. 2005; 280:9375–89.
7. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*. 2008; 16:585–601.
8. Rucha S, Triveni MG, Raison T, Dhoom Singh M. An Update on the Protocols and Biologic Actions of Platelet Rich Fibrin in Dentistry. *Eur J Prosthodont Restor Dent*. 2017 Jun;25(2):64-72.
9. Dohan Ehrenfest DM, Bielecki T, Jimbo R, Barbé G, Del Corso M, Inchingolo F, Sammartino G. Do the fibrin architecture and leukocyte content influence the growth factor release of platelet concentrates? An evidence-based answer comparing a pure platelet-rich plasma (P-PRP) gel and a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Curr Pharm Biotechnol*. 2012;13:1145-52.
10. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101:e45-50
11. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J et al. 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:e37-44.
12. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101:e51-5.

13. Dincă O, Zurac S, Stăniceanu F, Bucur MB, Bodnar DC, Vlădan C, Bucur A. Clinical and histopathological studies using fibrin-rich plasma in the treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Romanian Journal of Morphology and Embryology* 2014; 55(3):961-64
14. Irimia C, Dincă O, Bucur MB, Vlădan C. Immunohistochemical staining analysis of platelet concentrate. *Medicine in Evolution*, 2015; Volume XXI, No.1:127-30
15. Parayialis A, Dincă O, Bucur MB, Vlădan C, Bucur A. Platelet-derived endothelial cell growth factor (PDEGF) expression in fibrin-rich plasma. *Medicine in Evolution*, 2015; Volume XXI, No.1:135-38
16. Irimia C, Dincă O, Bucur MB, Vlădan C, Bucur A. Histologic comparison between intra-alveolar clot and platelet concentrate. *Medicine in Evolution*, 2014; Volume XX, No. 4:667-70
17. Cohen I.K., Diegelmann R.F., Lindblad W.J. *Wound Healing: Biochemical and Clinical Aspects. Plastic and Reconstructive Surgery.* 1992; vol. 90, no. 5: 926.
18. Nunes, Li Y., Sun C., Kinnunen T.K., Fernig D.G. Fibroblast growth factors as tissue repair and regeneration therapeutics. *PeerJ.* 2016; vol. 12, no. 44, e1535.
19. Bucur M, Dincă O, Vlădan C, Popp C, Nichita L, Cioplea M, Stînga P, Mustatea P, Zurac S, Ionescu E. Variation in Expression of Inflammation-Related Signaling Molecules with Profibrotic and Antifibrotic Effects in Cutaneous and Oral Mucosa Scars. *Journal of Immunology Research* Volume 2018, Article ID 5196023
20. Mah W., Jiang G., Olver D., Cheung G., Kim B., Larjava H., Häkkinen L. Human gingival fibroblasts display a non-fibrotic phenotype distinct from skin fibroblasts in three-dimensional cultures. *PLoS One.* 2014; 9(3):e90715.
21. Shoji T., Nakasa T., Yoshizuka M., Yamasaki T., Yasunaga Y., Adachi N., Ochi M. Comparison of fibrin clots derived from peripheral blood and bone marrow, *Connective Tissue Research* 2017;58(2):208-214
22. Szaba F.M., Smiley S.T. Roles for thrombin and fibrin(ogen) in cytokine/chemokine production and macrophage adhesion in vivo. *Blood.* 2002; 99:1053–1059
23. Noor Mohamed R, Basha S, Al-Thomali Y. Efficacy of platelet concentrates in pulpotomy - a systematic review. *Platelets.* 2018 Mar 14:1-6. doi: 10.1080/09537104.2018.1445844. [Epub ahead of print]
24. ASTM International Standard Practice for Direct Contact Cell Culture Evaluation of Materials for Medical Devices. West Conshohocken, PA: ASTM International; ASTM Standard Test Method F 0813-07