

STUDII ȘI SINTEZE

CELULE *STEM* ÎN PROCESUL DE REGENERARE A ȚESUTURILOR SCHELETICE

Ion Ababii, dr. hab., prof. univ., acad., **Viorel Nacu**, dr., conf., **Boris Topor**, dr. hab., prof. univ., **Pavel Ciobanu**, dr. hab., prof. univ., **Filip Gornea**, dr. hab., prof. univ., **Vasile Bairac**, dr. hab., prof. univ., **Nicolae Doni**, dr., conf., USMF „Nicolae Testemițanu”

Scopul transplantării celulare este substituția țesutului sau unei populații de celule afectate de boală sau nefuncționale; stimularea celulelor predecesorii proprii pentru activizarea regenerării reparative.

Este deja dovedit experimental că o cantitate mică de celule specializate poate compensa funcția organului lezat [1].

Actualmente se studiază activ posibilitatea utilizării celulelor stem prelevate din placenta și din cordonul ombilical. Este demonstrat că celulele limfoide ale sângelui ombilical sunt mai puțin imunoreactive și este admisibilă necoresponderea parțială după sistemul HLA la transplantarea celulelor hematopoietice. De asemenea, reacția grefă-gazdă se întâlnește mai rar comparativ cu transplantarea măduvei osoase [2]. Conform datelor bibliografice, au fost efectuate în lume peste 100000 transplantări celulare, din care peste 5000 de sânge ombilical. În majoritatea cazurilor aceste transplanturi au fost efectuate în cazul maladiilor maligne – leucoze cronice și acute la copii și adulți [3].

Culturile celulare autologice și alogene la inocularea în regiunea osului cu osteogeneză suprimată activează regenerarea osoasă [4]. Este cunoscută capacitatea celulelor stem de a se integra în structuri tridimensionale ale organismului, ceea ce confirmă perspectiva folosirii celulelor pentru terapia de substituție. Datorită caracterului lichid al suspensiei celulare, ea nu se menține plasată în locul inoculării și este dificil de folosit în substituția defectelor osoase de dimensiuni mai mari.

De aceea se pledează pentru o combinație a diferitor materiale, metode, ceea ce ar fortifica proprietățile acestor preparate, creând o grefă cu caracteristici care ar satisface doleanțele specialiștilor în traumatologie-ortopedie.

Notă. Aceste cercetări au fost posibile de efectuat prin suportul financiar din proiectul instituțional 06.420.049A.

Material și metodă. Studiul experimental a fost efectuat pe 55 de iepuri de rasa “Shinshilla”, cu vârsta de 12-13 luni și greutatea de 3-3,5 kg. Animalele au fost operate cu anestezie generală, prin administrarea intramusculară a amestecului de Calypsol (Rihter Ghedeon) și Seduxen (1ml/kg). Incizia cutanată cu lungimea de 4-5 cm a fost efectuată pe proiecția osului radial. După denudarea osului radial a fost creat un defect transversal de 20 mm și înlăturat stratul periostal. În cazurile utilizării grefelor complexe (os demineralizat cu celule, autoos morcelat) acestea au fost aplicate în loja defectului, suturând ulterior țesuturile moi. În celelalte cazuri, pentru a preveni scurgerea lichidului, suspensia celulară a fost administrată după suturarea etanșă a țesuturilor moi.

Cinci iepuri au fost excluși din experiment din cauza complicațiilor apărute după intervenția chirurgicală suportată. Intervențiile au fost efectuate în conformitate cu cerințele Comitetului Internațional pentru Utilizarea și Îngrijirea Animalelor.

Luând în considerație sinostoza existentă între ulnă și radius, imobilizarea nu a fost utilizată. Animalele au fost repartizate în cinci loturi experimentale:

Lotul I martor negativ – a fost administrat mediul nutritiv Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM);

Lotul II martor pozitiv – autoos spongios morcelizat;

Lotul III – autocelule osteomedulare cu matrice osoasă demineralizată (MOD);

Lotul IV – matrice osoasă demineralizată cu celule ombilico-placentare (COP);

Lotul V – autocelule din măduva osoasă (CMO).

Termenele de eutanasiere au fost de 15, 30, 60, 120 și 180 de zile de la inocularea materialelor.

Suspensia celulară, cu concentrația celulelor în suspensie de 15 mln celule/ml, a fost inoculată în regiunea afectată după suturarea etanșă a plăgii. În cazul utilizării autocelulelor osteomedulare, acestea au fost colectate în prealabil, cu două săptămâni înaintea intervențiilor chirurgicale planificate (timp necesar pentru cultivare).

Celulele complexului ombilico-placentar au fost colectate de la iepure (femelă) la a 25-a zi de sarcină, prin extirparea uterului cu embrioni și apoi colectarea sângelui din vasele ombilicale ale fiecăruia dintre ei.

După eutanasiere, în termenele stabilite, oasele operate au fost prelevate în bloc cu țesuturile moi adiacente, fixate în soluție de 10% de formaldehidă pentru studii ulterioare.

Piesele anatomice au fost studiate prin metode macroscopice, radiologice, histologice și tomografie computerizată. O parte din piesele anatomice au fost studiate prin metode histologice tradiționale, secțiunile reușite au fost colorate cu hematoxină-eozină și picrofuxină după Van-Geison.

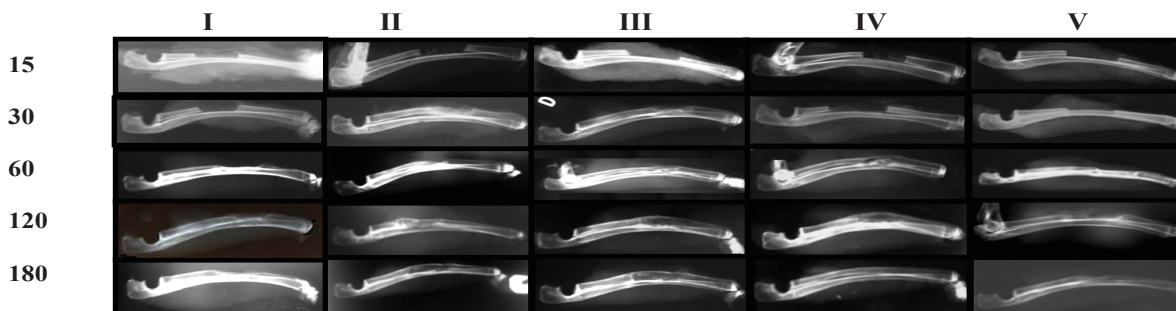


Fig. 1. Radiografie la 15, 30, 60, 120, 180 de zile după osteotomia osului radial. I – mediu nutritiv DMEM (lotul-martor negativ); II – lotul în care a fost utilizat autoos spongios din aripa osului iliac (martor pozitiv); III – lotul cu MOD+CMO; IV – MOD+COP; V – CMO. Se determină aproape același tablou al evoluției radiologice în loturile experimentale II, III, IV, cu o dezvoltare constantă a calusului și la 120 de zile remodelarea acestuia. Pare a fi o remodelare mai rapidă în cazul utilizării MOD+COP.

Pentru a analiza regeneratul osos, a fost utilizat tomograful computerizat Somaton, Siemens. Scanarea tomografică a fost efectuată în trei zone ale osului radial: în regiunea centrală, periferia regeneratului și la nivelul osului intact. Densitatea regeneratului și suprafața au fost apreciate în unități Haunsfield (HU).

Rezultate. În toate cazurile incluse în studiu (50 iepuri) plăgile s-au cicatrizat fără complicații în zece zile după procedură. La 15 zile după intervenția chirurgicală, pe radiografii în toate loturile experimentale nu se determină schimbări evidente comparativ cu cele efectuate nemijlocit după intervenția chirurgicală (fig. 3). Histologic, în toate cazurile la capetele fragmentelor osoase se determină elemente caracteristice resorbției. Sunt multiple osteoclaste, macrofage și infiltrație limfocitară. În loturile în care s-a inoculat matrice osoasă demineralizată se vizualizează particulele intacte de os demineralizat.

După 30 de zile în lotul-martor, capetele fragmentelor osoase sunt puțin rotunjite. Pe micropreparate

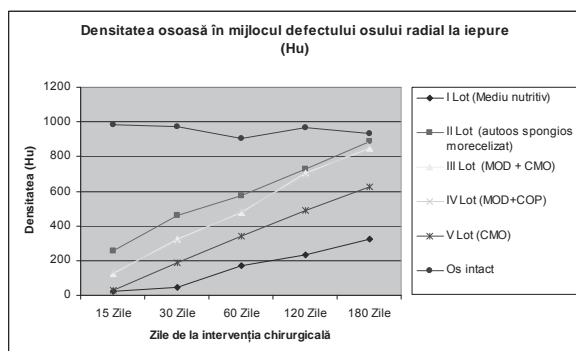


Fig. 2. Reprezentarea grafică a indicilor densității osoase (HU) în mijlocul defectului osului radial obținută prin efectuarea tomografiei computerizate.

Se determină o creștere constantă a densității osoase în toate loturile experimentale pe durata experimentului. O densitate mai mare este în cazul utilizării autoosului spongios morcelizat, dar nu este o diferență semnificativă comparativ cu acele loturi în care au fost utilizate MOD + CMO și MOD + COP. O diferență mai mare se constată în lotul în care s-au utilizat numai COM și este una semnificativă în raport cu lotul-martor.

porțiunea interfragmentară este reprezentată de un proces resorbțiv, fără semne evidente de osteogeneză. Os nou format se determină numai la extremitățile fragmentelor, între ele – țesut conjunctiv lax. În lotul doi (autoos spongios morcelizat), radiologic, spațiul interfragmentar este mai opac comparativ cu celelalte loturi. Histologic, în jurul matricei osoase demineralizate implantate se determină țesut conjunctiv bine vascularizat, bogat în fibroblaste, numărul de limfocite și macrofage este mai mic în comparație cu termenul precedent. Pe alocuri sunt neutrofile polimorfonucleare. În jurul particulelor de autoos spongios morcelizat se evidențiază un număr impunător de osteoblaste și vase nou-formate.

La 60 de zile toate animalele sunt active. În spațiul interfragmentar se evidențiază clar calusul în loturile experimentale 2, 3 și 4 (fig. 3). În lotul experimental cinci regeneratul nu acoperă toată suprafața defectului, dar este mai dezvoltat comparativ cu primul lot-martor. Histologic, în spațiul interfragmentar în loturile experimentale 3 și 4 nu se mai vizualizează particule de os demineralizat. Sunt trabecule osoase noi, care nu au o structură bine organizată. Tabloul roentgenologic este asemănător cu termenul precedent, dar opacitatea spațiului interfragmentar

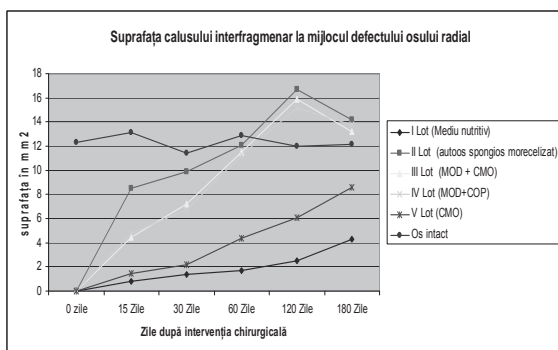


Fig. 3. Reprezentarea grafică a suprafeței regeneratului (mm²) în mijlocul defectului osului radial. Din superior spre inferior: 1. este arătată densitatea osoasă a osului radial normal; 2 – lotul în care a fost utilizat autoos spongios din aripa osului iliac; 3 – MOD + CMO; 4 – MOD + COP; 5 – CMO; 6 – mediu nutritiv (DMEM). Se determină o creștere constantă a suprafeței regeneratului cu o ascensiune mai evidentă în graficele 2, 3, 4.

osteogeneză apozițională mai pronunțată, în mijlocul spațiului interfragmentar nu se identifică țesut osos.

La 180 de zile după intervenție, în toate loturile experimentale, vizual nu se determină diferență între membrele anterioare operate și intacte ale animalelor supravegheate. În loturile experimentale 2, 3, 4, pe clișeele radiologice, în toate cazurile se apreciază consolidarea fragmentelor și în majoritatea cazurilor – restabilirea canalului medular (fig. 3). Histologic, osul are o structură caracteristică osului lung, compact. În lotul experimental 5 calusul suplinește aproape totalmente spațiul interfragmentar, însă în regiunea de mijloc mai rămâne o depresiune mică, în care nu se determină țesut osos. În lotul-martor această depresiune este mai adâncă și este, de asemenea, lipsită de țesut osos.

Tomografia computerizată a permis de a obține o informație amplă despre regenerat, determinându-i densitatea și forma exactă. În lucrare sunt prezentate datele obținute la scanarea mijlocului defectului, unde procesul de regenerare este mai puțin influențat de osteogeneza asigurată de capetele osului radial secționat. Parametrii regeneratului au fost apreciați în unitățile Haunsfield (HU) de la -900 până la +3000 HU. Prelucrarea secțiunilor regeneratului a fost efectuată în regim de reconstrucție multiplanică în plan sagital și frontal. Pe imaginile obținute a fost evidențiat regeneratul și calculată în regim automat suprafața lui în mm². Tomografia computerizată permite de a studia structura regeneratului interfragmentar și la termene incipiente de formare. Examenul tomografic a fost început cu o tomogramă panoramică, pentru a avea o imagine generală a regeneratului și pentru a alege un regim corect pentru scanare. Rezultatele analizei statistice de repartiție a indicilor de scanare tomografică HU (unităților Haunsfield) la nivelul regeneratului osului radial sunt prezentate în tabelul 1. Analiza caracteristicii cifrate a tomografiilor denotă că regeneratul ce se dezvoltă în defectul osului radial extremitatea anterioară la iepure la 120 de zile are o structură spongioasă, conținând țesut osos și fibros.

Tabelul 1

Indicii de scanare tomografică la nivelul defectului osului radial la iepure în diverse loturi

Loturile experimentale	Zile după intervenție				
	15	30	60	120	180
1. Lotul I. martor. Administrat mediu nutritiv DMEM	24± 4,15	48±11,8	170±71,6	232±69,9	324±81,1
2. Lotul II. Autoos spongios morcelizat	258± 89,2	463±93,8*	572±69,6**	726±41,2**	890±67,6*
3. Lotul III. Autocelule măduvă osoasă cu matrice osoasă demineralizată	126± 88,1	324±99,5*	475±63,1*	705±53,0**	850±105,8
4. Lotul IV. Grefă compozită din matrice demineralizată și celule ombilicale	134± 69,1*	307±77,3	489±88,7**	687±58,9**	867±87,3*
5. Lotul V. Autocelule din măduva osoasă	30± 3,8	189±43,6*	344± 95,1	489±99,3*	626±101,0*
Os intact	986± 49,4	974±85,6	906±66,3	964±78,6	930± 91,1

Notă: diferență statistic semnificativă cu lotul-martor, * – p < 0,05; ** – p < 0,01

Densitatea țesuturilor concordă direct proporțional cu predominarea unui sau altui tip de țesut. De exemplu, în a 30-a zi după inoculare densitatea țesuturilor defectului echivalează cu $48 \pm 11,8$ HU în lotul-martor (negativ, utilizat mediu nutritiv DMEM). În lotul II consistența țesuturilor este mai accentuată – $463 \pm 103,8$ HU, datorită grefei osoase de os spongios plasate în defect. Aceste date corespund tabloului morfologic descris mai sus. În ziua a 120-a în lotul experimental I densitatea echivalează cu $232 \pm 69,9$ HU, în lotul II – $726 \pm 41,2$ HU. Constatăm că inițial indicii din loturile experimentale erau cvasiidentici, alternând, pentru ca în final densitatea osului în loturile experimentale II–IV să crească mai rapid comparativ cu lotul experimental I.

Aria suprafeței în studiul actual a fost analizată în regiunea de mijloc a regeneratului în plan transversal axei osului radial. Datele obținute arată o corelație directă între mărirea densității osoase și a suprafeței calusului odată cu mărirea perioadei de supraveghere, aproximativ până la ziua 120-a, după care aria calusului se micșorează în loturile experimentale II–IV, fiind în concordanță cu procesul de remodelare, care se poate vedea și pe tomogramele efectuate la acest termen. Compactarea regeneratului se manifestă prin creșterea densității lui la nivelul porțiunii corticale nou-formate și refacerea canalului medular în osul radial (*fig. 1*). Dinamica modificării suprafeței regeneratului și densității lui sunt reprezentate grafic în *figurile 2 și 3*.

Discuții. Procesele de osteogeneză reparatorie se activează în caz de traumatisme. În cazul dat, ca răspuns la distrugerea unor celule osoase, are loc autoreproducerea lor și restabilirea populației celulare date. Ea evoluează în mai multe etape și se desfășoară într-un cadru restrâns de regenerare-reparare, care vor duce la un sfârșit echilibrat – recăpătarea integrității morfofuncționale a osului. În linii generale, consolidarea fracturii reprezintă un proces obișnuit de cicatrizare, iar în particular este sinteza unui proces de osificare interfragmentară [5].

Utilizarea matricei osoase demineralizate [6] cu celule autologice din măduvă osoasă în tratamentul defectului osului radial, în experiment, permite scurtarea perioadei de vindecare, comparativ cu inocularea numai a mediului nutritiv DMEM.

Autocelulele sunt considerate actualmente unele dintre cele mai bune grefe pentru terapia celulară și ingineria tisulară. Spre deosebire de cele embrionare, ele au capacități de proliferare și diferențiere mai limitate, dar, fiind autologice, nu provoacă reacții ale sistemului imun al gazdei către transplant. O sursă sigură de celule predecesorii este măduva osoasă, bogată în celule de acest tip; și mulți autori consideră oportună posibilitatea utilizării lor în optimizarea și activizarea procesului reparator în diferite țesuturi. Avantajele utilizării autocelulelor sunt evidente prin lipsa conflictului imun (rejecția grefei) și este redusă la minimum posibilitatea de contaminare a pacientului cu maladii hematotransmisibile [1, 2].

Utilizarea măduvei osoase pentru stimularea regenerării osului este argumentată prin existența în ea a celulelor predecesorii. Din celulele stem mezenchimale localizate în stroma măduvei osoase se pot diferenția în anumite condiții osteoblaste, fibroblaste, chondroblaste și adipocite.

Celulele fetale au atras atenția transplantologilor prin faptul că acest tip de țesuturi embrionare nu are un sistem imun matur, ceea ce micșorează probabilitatea complicațiilor după transplantare [4]. La acest tip de celule pot fi atribuite și celulele obținute din sângele ombilical. Ele dispun de un grad mare de proliferare și sunt capabile să formeze colonii de celule care participă la regenerarea organului. Concomitent cu celulele stem, se administrează un complex de citochine și factori de creștere care stimulează regenerarea țesuturilor. Anume aceste capacități ale țesutului fetal și sistemul imun imatur asigură un efect terapeutic adecvat, fără agresivitate imună a celulelor transplantate față de recipient.

Analizând impactul materialelor morfoinductive asupra proceselor reparatorii în defectul unui os lung – radiusul la iepure, putem constata că matricea osoasă demineralizată cu cultura celulară autologică osteomedulară, celule ombilico-placentare și autoosul spongiform din osul iliac stimulează formarea țesutului osos în spațiul interfragmentar. Totodată, aloosul morcelizat demineralizat în combinație atât cu celule autologice osteomedulare, cât și cu celule ombilicale prezintă un efect regenerativ mai pronunțat comparativ cu utilizarea numai a celulelor osteomedulare. Reprezentând o structură tridimensională, osul demineralizat este un bun suport pentru grefele celulare. Plasarea lor în spațiu asigură creșterea nestingherită a vaselor în spațiul interfragmentar, celulele și citochinele asigură decurgerea normală a procesului reparativ, promovând pătrunderea în regiunea defectului a celulelor predecesorii autologice transportate în această regiune prin patul sanguin. Osul radial, după creșterea și remodelarea regeneratului, își recapătă structura caracteristică osului lung. Investigațiile demonstrează că inocularea între fragmentele osoase a materialului osos demineralizat, atât a grefei complexe din matrice demineralizată și culturi celulare osteomedulare autologice, cât și a celor ombilicale, în cazul procesului reparativ de substituție, face posibilă stimularea elementelor conjunctive ale regeneratului și a lojei recipiente spre formarea unui regenerat calitativ în regiunea afectată.

Stimularea procesului reparativ este indicată în cazul existenței defectelor osoase primare și în cazul unui proces de regenerare care decurge lent. Probabil, poate fi utilizată și în cazurile când se prognozează o dereglare a procesului de reparare a osului (fracturi deschise cu defect osos, deperiostări masive etc.), pentru a asigura o osteogeneză normală în regiunea afectată.

Studiul experimental efectuat de noi demonstrează că capacitățile osteomodulatoare ale preparatelor celulare compozite, plasate în efectul osului radial, sunt mai pronunțate decât ale matricei osoase demineralizate și materialului celular, folosite separat. La combinare, capacitățile osteoconductive și osteoinductive ale lor se completează reciproc, asigurând angiogeneza și decurgerea normală a procesului reparator. Rezultatele obținute în experiență pe animale relevă că peste 30 de zile după administrarea materialului combinat, zona limitrofă este invadată de țesut conjunctiv lax și vase sangvine. În jurul acestor particule apar multiple capilare și celule osoase predecesorii, care în ansamblu constituie țesutul osos nou-format. Ulterior, particulele de os demineralizat sunt substituite totalmente cu țesut osos nou-format.

Concluzii

Experimentele prezentate au arătat că grefele complexe compuse din aloos demineralizat, morcelizat combinat cu celule osteomedulare autologice sau cu cele ombilicale asigură o osteogeneză activă și uniformă în defectul osului. Capacitatea acestor două grefe nu arată o diferență majoră în capacitatea de a forma os nou în defectul critic, experimental al radiusului.

Este argumentată utilizarea autogrefei celulare din maduva osoasă în tratament din considerente etice, totodată celulele ombilico-placentare dispun de o capacitate de proliferare mai mare comparativ cu cele autologice.

Grefa osoasă demineralizată combinată atât cu celule ombilicale, cât și cu celule autologice din măduva osoasă are proprietăți regenerative pronunțate, comparative cu osul spongios autologic, care este considerat „standartul de aur” în grefarea osoasă.

Bibliografie selectivă

1. Trounson A., Cram D., Jenchin G. et al., *Stem cells and regenerative medicine: An opportunity for the special involvement of fertility service. Advanced in fertility studies and reproductive medicine.* IFFS 2007, South Africa, p. 1-3.
2. Constantinescu N., *Valoarea biologică a transplantului autogen de os*, București, 1980, 246 p.
3. Ababii I., Ciobanu P., Eșanu N., Topor B., Nacu V., *Actualități și perspective în transplantarea celulară.* Curierul Medical, nr. 3 (285), 2005, p. 42-47.
4. Ciobanu P., *Activizarea osteogenezei reparatoare prin celule osteomedulare.* Dis. dr. h. în med., Chișinău 1994., 232 p.
5. Einhorn G.E., *Enhancement of fracture Healing.* J. Bone and Joint Surg., 1995, 77A, p. 940-956.
6. Urist M.R., *New Bone formation induced in postfetal life by Morphogenetic protein. Mecanism of Growth Control,* Springfield, 1981, p. 406-438.

Summary

The ability of grafts containing autogenous bone marrow cells; alogenous cord blood cells with alogenic demineralized bone to stimulate bone formation in the critical rabbit radial bone defect was studied.

The experimental research was carried out on 55 adults (12-13 months), rabbits (body weight 3,0-3,5kg). The radial bone was cut transversely and made a bone defect of 20 mm long. The animals were divided in five experimental groups: first – was injected Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM); second – morselized autogenous cortico-cancelous bone from iliac crest; third – decalcified bone matrix and autogenous bone marrow cells; the fourth - decalcified bone matrix and alogenic cord blood cells; the fifth – the autogenous bone marrow cells.

The combination of the grafts from demineralized morcelized alogenous bone with autogenous bone marrow cells or cord blood cells provides active and uniform osteogenesis in to the bone defect comparable with the autogenous cancelous bone. In cases where was used only the suspension of bone marrow cells the osteogenesis was active, but the bone formation is more slowly and not uniform.

ANESTEZIA CU SEVOFLURAN LA PACIENTUL PEDIATRIC – PREMIERĂ PENTRU REPUBLICA MOLDOVA. CONSIDERAȚII GENERALE/ASPECTE CONTROVERSATE

Eva Gudumac, dr.hab.în med., prof. univ., academician. **Gabriela Munteanu**, medic anestezist-reanimatolog, **Serghei Malanco**, șef secție de anestezie chirurgicală pediatrică. Centrul Național Științifico-Practic de Chirurgie Pediatrică „Academician Natalia Gheorghiu”

Introducere. Era modernă a anesteziei generale a început la jumătatea anilor '50 ai secolului trecut, când a fost introdus în practica clinică halotanul, considerat standardul de aur pediatric. Deși pe piața republicii cu o întârziere de peste 30 de ani a apărut izofluranul, acesta fiind mai maniabil și mult mai puțin toxic decât halotanul, totuși utilizarea sa la copii este limitată. Cauzele sunt preponderent de ordin organizațional și în