

UMFVBT
FACULTATEA DE MEDICINĂ GENERALĂ
DEPARTAMENTUL X CHIRURGIE II



BLOANCĂ E. VLAD-ADAM

TEZĂ DE DOCTORAT

**ABORDAREA MULTIMODALĂ CLINICĂ ȘI
EXPERIMENTALĂ A INFLUENȚEI ADIȚIEI DE
ȚESUT ADIPOS ASUPRA REGENERĂRII
NERVULUI PERIFERIC LEZAT**

REZUMAT

Conducător științific

PROF.UNIV.DR. TIBERIU BRATU

**TIMIȘOARA
2017**

CUPRINS

<u>ABORDAREA MUTIMODALĂ CLINICĂ ȘI EXPERIMENTALĂ A INFLUENȚEI ADIȚIEI DE ȚESUT ADIPOS ASUPRA REGENERĂRII NERVULUI PERIFERIC LEZAT</u>	<u>1</u>
<u>REZUMAT</u>	<u>1</u>
1.INTRODUCERE, MOTIVAȚIE	4
2.PARTEA GENERALĂ	4
3.PARTEA SPECIALĂ	6
4.CONCLUZII	9

Cuvinte cheie: *nerv periferic, regenerare nervoasă, celula stem, țesut adipos.*

1.Introducere, motivație

Sistemul nervos este considerat cel mai complex sistem al organismului, datorită funcțiilor complexe pe care le are, alertează organismul cu privire la modificările interne și externe, iar pe baza acestora generează răspunsuri către organele efectoare. Traumatismele complexe și defectele majore postexcizionale la nivelul membrului superior pot avea un impact funcțional important, chirurgiei reconstructive îi revine sarcina de a restaura funcția cât mai apropiată de cea inițială. Leziunile nervoase constituie o parte importantă din acest capitol și deseori cele mai dificile de rezolvat, fiind responsabile de existența unor sechele importante. Expresia clinică și tipul de leziune sunt date de structura lezată, structurile componente de origine diferită din cadrul unui nerv periferic răspund diferit la leziune și au posibilități diferite de regenerare.

Argumentele pentru abordarea unei astfel de teme de cercetare reies din incidența mare de cazuri clinice întâlnite în cadrul Clinicii de Chirurgie Plastică Timișoara, unde îmi desfășor activitatea din ianuarie 2009. Leziunile nervoase sunt atât post-traumatice, cât și post-chirurgicale, cu necesitatea unei reinervări sau unei reanimări. Implicațiile unor astfel de intervenții sunt majore, atât de ordin funcțional (membrul superior, membrul inferior), social prin reintegrare socio-economică și profesională, dar și psihologic (reanimarea facială). Observațiile clinice repetate au condus la o întrebare: care este cauza rezultatelor mediocre în cazul chirurgiei nervilor periferici, de ce rezultatele neurorafiei primare sunt uneori imprevizibil slabe?

2.Partea generală

Literatura de specialitate enumeră o serie de astfel de cauze, de la unele de ordin tehnic, material, până la cauze fiziologice, atât locale, cât și generale. Un posibil răspuns ar fi că în acest punct chirurgia nervilor periferici, respectiv microchirurgia nervoasă și-a atins limitele, atenția fiind automat îndreptată către noi resurse, cum ar fi regenerarea tisulară. Regenerarea nervoasă care intervine post-lezional, ghidată în special de celulele Schwann, se pare că este împietată de apariția unui țesut cicatricial, înaintea creșterii axonale. Dar țesutul cicatricial este unul

normal ca răspuns la orice injurie, și implicit întâlnit în tot organismul. Din nou, practica clinică curentă ne poate oferi răspunsuri și corelații. A devenit uzuală în ultimii ani folosirea lipoaspiratului (țesutul restant împreună cu soluția folosită în cadrul liposucției) pentru corectarea unor deficiențe de volum; acesta s-a folosit și în zone cu deficit de volum după procese de cicatrizare, observația clinică a fost următoarea: aspectul cicatricii s-a îmbunătățit considerabil. Lucrurile au mers mai departe, de ce lipoaspiratul poate influența o cicatrice? S-a demonstrat prezenta de celule stem derivate din țesutul adipos în acest lipoaspirat, iar efectele acestora sunt multiple, de la local antiinflamator, până la producere de factori care pot dirija regenerarea diferitelor linii, procese bineînțelese incomplet înțelese și cunoscute. Studiul celulei stem derivată din țesutul adipos a început prin articolul de referință publicat de Zuk și colaboratorii în 2002 în *Molecular Biology of the Cell*. S-a demonstrat capacitatea celulei stem derivată din adipocit de a fi pluripotentă, nu multipotentă, ca și cea care provine din măduva osoasă. Această observație a lărgit mult domeniile de aplicabilitate, dată fiind și ușurința cu care acest țesut se poate recolta și prelucra, disponibilitatea sa și morbiditatea scăzută. Deasemenea, există o diferență majoră și în cantitatea care se obține după recoltare, dacă din măduva osoasă se obțin aproximativ o celulă stem mezenchimală din 25.000 până la 100.000, 2% din celularitatea lipoaspiratului este formată din celule stem derivate din țesutul adipos. Următorul pas a fost izolarea, aceasta s-a realizat inițial în condiții de laborator, dar aceste procese sunt deseori îndelungate și costisitoare. A urmat studiul lui Rapisio, acesta a comparat metoda clasică, bazată pe collagenază și o variantă mai simplă, mecanică, bazată doar pe centrifugare. O serie de efecte inițiale au fost observate în folosirea chirurgicală, astfel grefa de țesut adipos obținută prin liposucție a fost utilizată în augmentarea anumitor zone atrofile, implicit și la nivelul unor cicatrice, iar rezultatul, pe lângă umplerea mecanică a zonei, s-a observat și o ameliorare în aspectul cicatricilor. Studiile de referință în acest sens au fost întreprinse de Coleman, care folosea tehnica tumescentă pentru recoltare și prelucrare prin centrifugare 3000 rotații pe minut timp de 3 minute.

Corelația dintre aceste două proceduri clinice s-a produs și a urmat întrebarea logică ce se întâmplă cu neuroafia primară, și implicit cu neuroregenerarea, dacă adăugăm țesut adipos prelucrat? În acest sens a fost elaborat studiul de față, medicina experimentală va fi folosită după cum urmează pentru a elabora un model, care să poată răspunde la această întrebare. Literatura de specialitate conține numeroase astfel de

studii legate de regenerarea nervoasă și adiția de țesut adipos prelucrat sau diverși factori de creștere cu influență asupra regenerării.

Structura tezei este una convențională, existând o parte introductivă, parte generală și parte specială, urmate de bibliografia aferentă. Partea generală este constituită din patru capitole distincte, care urmăresc punerea în temă cu privire la nervul periferic, normal și lezat, dar și celula stem derivată din țesutul adipos, respectiv angiogeneza în regenerarea nervoasă. Aceste capitole sunt: aspecte macroscopice și microscopice ale nervului periferic cu implicații în fiziologia nervului periferic, răspunsul nervului periferic la leziune, abordat din punct de vedere microscopic și chirurgical, tehnici adjuvante terapiei chirurgicale în regenerarea nervului periferic: celula stem derivată din țesutul adipos și aspecte ale angiogenezei în regenerarea nervului periferic prin adiția de țesut adipos.

3. Partea specială

Partea specială este constituită din motivația alegerii temei, materiale și metode, rezultate și concluzii finale.

Am elaborat un model experimental pe baza pe dotării biobazei din cadrul Centrului de chirurgie experimentală Pius Brânzeu, UMFT, animalul de studiu ales a fost șobolanul din rasa Wistar. Nervul ales pentru realizarea studiului experimental a fost nervul sciatic, datorită diametrului corespunzător unei suturi microchirurgicale și topografiei anatomice, expunere relativ facilă prin disecție. Pentru a minimaliza posibilitatea de neuroregenerare diferită prin alți factori decât metoda aplicată, s-a decis folosirea ambilor nervi sciatici de la același animal, aplicând cele două metode diferite. La nivelul nervului sciatic drept s-a realizat neurorafie microchirurgicală termino-terminală, iar la nivelul nervului sciatic stâng, după realizarea neurorafiei în același mod cu partea dreaptă, tranșa de nerv suturat este manșonată de fragment de țesut adipos, recoltat de la nivel inghinal și prelucrat prin centrifugare timp de 3 minute la 3000 rotații per minut. Protocol stabilit prealabil a fost împărțit în trei etape consecutive: etapa 0 (ziua 0), în care s-a realizat partea microchirurgicală, etapa 1 (ziua 30) în care au fost evaluate efectele metodelor aplicate și prelevate probe de la primele 5 animale și etapa 2 (ziua 70) în care din nou au fost evaluate efectele și au fost prelevate probe de la ultimele 5 animale; toate animalele au fost ulterior eutanasiate. Urmărirea și cuantificarea rezultatelor a fost realizată prin două mijloace: evaluarea răspunsului motor al mușchiului gastrocnemian situat distal și inervat de

nervul sciatic, cu urmărirea diametrului în evoluție al acestui mușchi prin tehnica ecografiei musculo-scheletale, dar și prin evaluarea histologică a fragmentului de nerv tratat, împreună cu un fragment de mușchi situat distal de injurie. Din punct de vedere histologic au fost realizate mai multe tipuri de colorații: uzuale (hematoxină-eozină, tricromă Masson), histochimice (impregnare argentică Gordon-Sweet și Luxol Fast blue), dar și imunohistochimice (GFAP, NFAP, Prox1, AC133, OCT3/4, PGP 9.5, CD34 și MCT).

Capitolul rezultate prezintă pe larg diferitele concluzii elaborate după evaluarea ecografică, respectiv histologică. Primul subcapitol, referitor la ecografie, urmărește diametrul mușchiului aferent nervului lezat, cuantificând atrofia și regenerarea acestuia. Se distinge o evoluție mai bună la nivelul mușchiului gastrocnemian stâng, adiacent nervului sural tratat prin sutură și adiție de țesut adipos prelucrat, comparativ cu cel drept; diferența de procentaj recuperată este mai considerabilă la primul lot (4 săptămâni). Ulterior s-a realizat o comparație între evaluarea ecografică și cea histologică, obținându-se corelații semnificativ statistice.

Următorul subcapitol este reprezentat de analiza morfologică a fragmentelor de nerv suturat și mușchi adiacent prin colorația hematoxină-eozină, tricromă Masson și impregnarea argentică. S-au formulat următoarele concluzii: adiția de țesut adipos în jurul neurorafiei are un efect antifibrotic și antiinflamator, adiția de țesut adipos minim prelucrat stimulează creșterea conului de proliferare al celulelor Schwann și realizarea rapidă a interconexiunii celor două capete nervoase, determină o hipervascularizare a micromediului din jurul neurorafiei, aspect care ar putea fi implicat în stimularea regenerării normale a nervului, metodele histochimice utilizate demonstrează parțial stimularea nu numai a creșterii conului de proliferare a celulelor Schwann, dar și stimularea sintezei intraneuronale a neurofibrilelor care au invadat precoce conul de ghidaj al celulelor Schwann la lotul tratat, comparativ cu lotul netratat cu țesut adipos, studiile morfologice și histochimice ale specimenelor recoltate la 10 săptămâni demonstrează capacitatea de autoaderență și fixarea a țesutului adipos prelucrat în jurul neurorafiei, aspect cu un posibil impact asupra tehnicii chirurgicale, respectiv eliminarea altor materiale de fixare utilizate în prezent, în tehnicile de adiție ale țesutului adipos în jurul neurorafiei (și viabilitate).

Subcapitolul următor propune găsirea unui fenotip corespunzător celulelor stem derivate din țesutul adipos implicate în regenerarea nervoasă, prin studierea unor markeri specifici: Prox1, AC133 și OCT3/4. Se decelează un fenotip specific: AC133 pozitiv 3+, Oct 3/4 +/- și Prox1

+/-, caracterizează lotul netratat la 4, cât și la 10 săptămâni. În schimb, lotul tratat la 10 săptămâni am identificat un fenotip Ac133 -, Prox1 3+ și Oct 3/4 +, spre deosebire de cel tratat la 4 săptămâni, unde am observat Ac133 +, Prox1 cu 3+ și Oct 3/4 cu 3+. S-a mai observat că regenerarea nervoasă prin adiție de țesut adipos influențează și reactivitatea celulelor satelite de la nivelul mușchiului, care tind să exprime fenotip similar cu cele identificate cu la nivelul conului de reparare nervoasă, dar și adipos perineural, dar în acest moment nu se poate lansa ipoteza ca acestea să se diferențieze spre filete nervoase.

Următoarea temă de studiu a constatat în variabilitatea expresiei GFAP, NFAP în leziunile traumatiche ale nervului. După analiza și interpretarea rezultatelor s-a concluzionat că regenerarea filetelor este haotică la 10 săptămâni, constând într-o posibilă remodelare, procesul fiind incomplet.

În continuare s-a urmărit expresia PGP 9.5 la nivelul nervului aflat în proces de regenerare și s-a observat că PGP 9.5 este util pentru identificarea celulelor mezenchimale din țesutul adipos cu capacitate de diferențiere spre linia neuronală și că o corelația între expresia PGP 9.5 în țesutul adipos, mușchiul corespondent, nervul în regenerare și datele ecografice ar putea reprezenta un marker util pentru evaluarea recuperării funcției motorii la pacienții cu injurie de nerv periferic.

Un studiu aparte și de interes a constatat în evaluarea prezenței și posibilelor roluri ale mastocitelor în regenerarea nervoasă. Aceasta s-a realizat prin colorația Luxol fast blue și evaluarea triptazei mastocitare (MCT). Concluziile au fost următoarele: mastocitele sunt direct implicate în regenerarea nervoasă, numărul lor fiind stimulat de adiția de țesut adipos, acumularea mastocitelor comparativ cu țesutul nervos normal, începe precoce la 4 săptămâni de la neurorafie și crește progresiv la 10 săptămâni, mastocitele influențează nu doar regenerarea nervoasă, dar și stimularea funcției musculare, fapt dovedit de corelația semnificativ statistică găsită între diametrul mușchiului gastrocnemian și numărul de mastocite la lotul tratat cu adiție de țesut adipos, creșterea numărului de mastocite la lotul tratat cu adiție de țesut adipos la 10 săptămâni atât intranervos, cât și în țesutul adipos perinervos, sugerează că ultimul reprezintă o sursă de mastocite cu implicare directă în stimularea regenerării nervoase.

Nu în ultimul rând a fost evaluat procesul de angiogeneză la nivelul nervului în regenerarea prin expresia CD34, s-a observat că microdensitatea vasculară are un rol major în regenerarea nervului periferic și că angiogeneza din regenerarea nervului periferic este

independentă de activarea mastocitelor și de activarea triptazei din mastocite.

4.Concluzii

La final s-au elaborat un set de concluzii generale:

- Regenerarea nervului este un proces multistep care include o serie de evenimente celulare și moleculare particulare și specifice acestui tip de regenerare.
- Adiția de țesut adipos în jurul neurorafiei are multiple efecte pozitive asupra acestei regenerări, pornind de la efectul său antiinflamator, sursă de celule stem cu potențial de diferențiere spre celule Schwann activate, până la acțiuni indirecte asupra mușchiului corespondent.
- Celulele stem implicate în regenerarea nervoasă prezintă un fenotip versatil care se modifică dependent de timpul scurs de la realizarea neurorafiei și a adiției de țesut adipos.
- În primele 4 săptămâni regenerarea nervoasă prin adiție de țesut adipos este activă, fiind caracterizată de persistența fenotipului imatur al celulelor Schwann, la 10 săptămâni procesul de regenerare este incomplet, dar spre deosebire de prima etapă, predomină elementele de maturare a nervului, fapt dovedit și de creșterea diametrului mușchiului la lotul tratat prin adiție de țesut adipos la 10 săptămâni.
- Angiogeneza este obligatorie în regenerarea nervoasă, fiind stimulată de adiția de țesut adipos, pe lângă celulele endoteliale, mastocitele joacă un rol important în regenerarea nervoasă, numărul lor crescând la lotul cu adiție de țesut adipos (ceea ce sugerează că acesta poate fi sursă de mastocite), dar care paradoxal nu își exercită funcția prin triptaza mastocitară.
- Scăderea triptazei mastocitare la lotul cu adiție de țesut adipos și în a doua parte a regenerării (săptămânile 5-10) susține efectul antiinflamator. Cel mai probabil creșterea numărului total de mastocite este determinată de atracția lor printr-o serie de factori secretați la locul injuriei, iar rolul lor cel mai probabil este de sinteză a NGF, aspect

care va trebui dovedit ulterior, nefăcând parte din scopul studiului de față.

Domeniul de studiu ales s-a dovedit a fi unul surprinzător, bogat în rezultate, acesta a inițiat deschiderea de noi orizonturi cu privire la cercetarea și îmbunătățirea regenerării nervului periferic, cu posibile implicații directe în practica clinică curentă.