



MINISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA

Terapia celulară în tratamentul arsurilor grave

Protocol clinic standartizat

Chișinău 2015

**Aprobat la ședința Consiliului de experți al Ministerului Sănătății al Republicii Moldova
din 24.09.2015, proces verbal nr. 3**

**Aprobat prin ordinul Ministerului Sănătății al Republicii Moldova nr.763 din 30.09.2015
Cu privire la aprobarea Protocolului clinic standardizat „Terapia celulară în tratamentul
arsurilor grave”**

Elaborat de colectivul de autori:

Viorel Nacu	doctor habilitat în medicină, profesor universitar, șef Banca de Țesuturi și Celule Umane, IMSP Spitalul Clinic de Traumatologie și Ortopedie
Anatolie Taran	doctor habilitat în medicină, profesor universitar, Catedra de Traumatologie și Ortopedie, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, director general, IMSP Spitalul Clinic de Traumatologie și Ortopedie
Octavian Cirimpei	șef secție, Centrul Republican de Leziuni Termice, IMSP Spitalul Clinic de Traumatologie și Ortopedie
Vadim Anisei	medic, Centrul Republican de Leziuni Termice, IMSP Spitalul Clinic de Traumatologie și Ortopedie
Constantin Furtună	medic, Centrul Republican de Leziuni Termice, IMSP Spitalul Clinic de Traumatologie și Ortopedie
Olesea Prisacaru	medic ordinator, CRLT pentru copii “Em. Coțaga”.

Recenzenți:

Victor Ghicavii	Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”
Valentin Gudumac	Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”
Alexandru Coman	Agenția Medicamentului și Dispozitivelor Medicale
Maria Cumpănă	Consiliul Național de Evaluare și Acreditare în Sănătate
Iurie Osoianu	Compania Națională de Asigurări în Medicină

CUPRINS

PREFAȚĂ.....	3
A. PARTEA INTRODUCȚIVĂ.....	4
A.1 Diagnosticul.....	4
A.2 Codul bolii.....	4
A.3 Utilizatorii.....	4
A.4 Scopul protocolului.....	4
A.5 Data elaborării.....	5
A.6 Revizuire.....	5
A.7 Lista și informațiile de contact ale autorilor.....	5
A.8 Definițiile folosite în document.....	5
A.9 Informația epidemiologică.....	5
B. PARTEA GENERALĂ.....	7
B.1 Nivelul de asistență medicală spitalicească.....	7
C. DESCRIEREA METODELOR, TEHNICILOR ȘI A PROCEDURILOR.....	9
C.1.1 Clasificarea arsurilor termice.....	9
C.1.2 Conduita pacientului cu leziuni termice grave.....	9
C.1.2.1 Anamneza.....	9
C.1.2.2 Examinarea clinică.....	10
C.1.2.3 Examinarea paraclinică.....	10
C.1.3 Managementul preoperator al pacientului.....	10
C.1.3.1 Principiile generale ale conduitei pacientului cu arsuri termice grave.....	10
C.1.3.2 Pregătirea pacientului către intervenția chirurgicală/terapia celulară.....	11
C.1.4 Terapia celulară.....	11
C.1.4.1 Indicațiile și scopul terapiei celulare.....	11
C.1.4.2 Pregătire plăgilor către intervenția chirurgicală/terapia celulară.....	12
C.1.4.3 Etapele intervenției chirurgicale/terapiei celulare.....	12
C.1.5 Fibroblastul.....	13
C.1.5.1 Morfologia fibroblastului.....	13
C.1.5.2 Cultivarea fibroblastului.....	13
C.1.6 Conduita postoperatorie.....	15
C.1.6.1 Supravegherea.....	15
Bibliografia.....	16

ABRIEVIERILE FOLOSITE ÎN DOCUMENT

AC	autoplastie cutanată
AG	anestezie generală
CC	culturi celulare
CF	culturi de fibroblaste
F	fibroblast
GP	grefe de piele
MC	medii de cultură
NT	necrectomie tangențială
PA	pansamente aseptice
PFE	pielea feților embrionali
PG	plăgi granulate
PP	plăgi postcombustionale
TC	transplantare cutanată
TE	tulpini embrionare
TT	terapie tisulară
SBF	ser bovin fetal
SC	suspensie de celule

PREFAȚĂ

Acest protocol clinic standardizat a fost elaborat de către colaboratorii Catedrei de Ortopedie și Traumatologie a USMF „Nicolae Testemițanu”, colaboratorii secției Bancă de țesuturi și celule umane, Centrului Republican de Leziuni Termice, IMSP Spitalul Clinic de Traumatologie și Ortopedie, Centrului Republican de Leziuni Termice pentru copii „Em. Coțaga”.

Protocolul clinic este elaborat în conformitate cu recomandările ghidurilor practice internaționale actuale privind managementul arsurilor termice.

A. PARTEA INTRODUCȚIVĂ

A.1 Diagnosticul: Arsuri termice grave

Exemple de diagnostice clinice:

1. Arsuri prin flacăra gr. IIIB- IV.
2. Arsuri prin lichide și vapori fierbinți de gr. III B.
3. Arsuri prin contact gr. IIIB- IV.
4. Arsuri prin electrocutare gr. III- IV.

Calcularea suprafețelor arse:

Regula palmei (1%). Regula „cifrei 9” descrisă de Wallace.

A.2 Codul: T20.0 – T31.9.

A.3 Utilizatorii:

Centrul Republican de Leziuni Termice.

Centrul Republican de Leziuni Termice pentru Copii, SCRC „Em. Coțaga”.

Bancă de țesuturi și celule umane

A. 4 Scopul protocolului:

1. Reducerea ratei de invaliditate a bolnavilor cu leziuni termice grave.
2. Reducerea mortalității bolnavilor cu leziuni termice grave.
3. Îmbunătățirea calității vieții bolnavilor cu leziuni termice grave în perioada de reconvalescență.

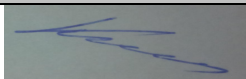
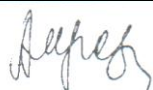
A.5 Elaborat: 2015

A.6 Revizuire: 2017

A. 7 Lista și informațiile de contact ale autorilor și ale persoanelor care au participat la elaborarea protocolului.

Numele, prenumele	Funcția deținută
Dr. Nacu Viorel Doctor habilitat în medicină, profesor universitar	șef Banca de țesuturi și celule umane, IMSP Spitalul Clinic de Traumatologie și Ortopedie
Dr. Taran Anatol Doctor habilitat în medicină, profesor universitar	director general, IMSP Spitalul Clinic de Traumatologie și Ortopedie
Dr. Cirimpei Octavian Doctor în medicină	șef CRLT, IMSP Spitalul Clinic de Traumatologie și Ortopedie
Dr. Anisei Vadim Medic ordinator	medic ordinator, CRLT, IMSP Spitalul Clinic de Traumatologie și Ortopedie
Dr. Furtună Constantin Medic ordinator	medic ordinator, CRLT, IMSP Spitalul Clinic de Traumatologie și Ortopedie
Dr. Prisacaru Olesea Doctor în medicină	medic ordinator, CRLT pentru copii “ Em. Coțaga”.

Protocolul a fost discutat, aprobat și contrasemnat:

Denumirea	Numele și semnătura
Comisia științifico-metodică de profil a MS Ortopedie și Traumatologie	
Agenția Medicamentului și Dispozitivelor Medicale	
Consiliul de experți al Ministerului Sănătății	
Consiliul Național de Evaluare și Acreditare în Sănătate	
Compania Națională de Asigurări în Medicină	

A. 8 Definițiile folosite în document:

1. Arsura este o boală chirurgicală locală și generală produsă de mai mulți agenți vulnerabili, cu evoluție stadială bine definită și cu prognostic în funcție de suprafața afectată, gradul arsurii.

2. Terapia celulară este transplantarea de celule umane pentru înlocuirea sau repararea țesuturilor sau celulelor deteriorate.

A. 9 Informația epidemiologică:

Traumatismul termic constituie o problemă foarte importantă prin frecvența sa înaltă atât în populația de copii 3,4-36%, după datele statisticii mondiale, cât și în cea de adulți 5,6-10%, prin numărul marcant de evoluții letale 4,9-14,5%, prin potențialul lor invalidant și generator de mutilări și disfuncțiuni estetice, dar mai ales prin suferințele îngrozitoare suportate de bolnavii respectivi. Boala arșilor continuă să atragă atenția patofiziologilor și cliniciștilor, datorită nivelului înalt al acestei patologii în structura traumatismului, gravității consecințelor medicale și sociale.

În Republica Moldova în perioada anilor 2007 – 2013 frecvența traumatismului termic varia între 178-182 cazuri la 100 mii populație, cu micșorare în ultimii ani.

Au beneficiat de tratament specializat în Centrul de Leziuni Termice din Republica Moldova 61,6-72,6% din cazurile survenite la adulți.

În țările dezvoltate se constată că de arsuri suferă circa 1% din populația generală. În Republicile fostei Uniuni Sovietice, inclusiv și în Republica Moldova, Rusia, arsurile habituale și cele din sfera de producție constituie 6-12% din totalitatea traumatismelor asistate de staționare, dintre care 31-54 % sunt internate de urgență. În Franța se protocoalează anual aproximativ 500000 de accidentați cu arsuri, iar în SUA solicită asistență pentru diferite tipuri de arsuri circa 2,5 mln. de persoane, peste 100000 din acestea sunt spitalizate, iar 12000 de persoane decedează în rezultatul leziunilor termice. Mortalitatea generală printre subiecții cu arsuri în diferite țări europene se înscrie în limitele 0,6 - 5%.

În Centrul Republican de Leziuni Termice din Republica Moldova, evaluată pentru intervalul 2007 – 2013, letalitatea generală la adulți este de 7,9% - 6,1%, ce denotă o ușoară diminuare în ultimii ani.

Datorită progreselor realizate în domeniul cunoștințelor fiziopatologice, bacteriologice, anatomopatologice, tratamentul arsurilor termice a început să beneficieze din plin de recomandări bazate pe cercetări științifice. Aceste circumstanțe necesită elaborarea unor măsuri de profilaxie și tratament al dereglărilor patologice, dezvoltate la nivel local și în sistemul de organe interne ca rezultat al traumatismului termic. Iată de ce tratamentul pacienților cu arsuri vaste necesită o argumentare patogenică fundamentală, pentru a putea accede și beneficia în timp util la marele arsenal de procedee chirurgicale clasice și moderne în tratamentul arsurilor, potențial care rămîne solicitat insuficient pînă în prezent. Recunoașterea faptului că numai restabilirea cât mai rapidă a tegumentului devitalizat la persoanele cu arsuri grave este singura modalitate de prevenire sau anulare a dereglărilor generate de acestea și prin care organismul agresat poate evolua letal. Acest deziderat stimulează precăutarea unor noi mijloace și metode cât mai eficiente sau perfecționarea celor ce țin de plastiile cutanate, deja cunoscute, precum și crearea condițiilor optime în vederea realizării acestora.

Pe lângă tratamentul complex al bolnavilor arși ce include un arsenal vast de preparate medicamentoase, materiale destinate pansamentelor aseptice, actualmente se dezvoltă și se implimentează activ în practica clinică o metodă alternativă a tratamentului local, capabilă de a stimula real procesele regenerative nu doar a arsurilor subdermale dar și a celor dermale. Una din resursele biologice capabilă să restabilească suprafața tegumentară distrusă și să creeze condiții optimale pentru epitelizare este fibroblastul, keratinocitul.

B.PARTEA GENERALĂ

<i>B. Nivelul de asistență medicală spitalicească (CRLT, CRLT pentru copii „Em. Coțaga”)</i>		
Descriere (măsură)	Motive (reper)	Pași (modalități și condiții de realizare)
Protecția personalului	Protejarea personalului medical în timpul contactului cu pacientul, materialele biologice.	Obligatoriu: Utilizarea articolelor de protecție (mănuși, halate, măști).
1. Spitalizarea		
CRLT, CRLT pentru copii „Em. Coțaga”	- Pacienții în șoc termic și cu complicații severe se vor spitaliza în secțiile de terapie intensivă și reanimare. - Tratamentul pacientului cu arsuri termice grave este posibil numai în condiții de staționar.	Criteriile de spitalizare: - Toți pacienții cu arsuri termice profunde indiferent de suprafață - Pacienții cu arsuri termice, complicate cu arsuri ale căilor respiratorii - Pacienții cu arsuri termice gr. II-III cu S >10%
2. Diagnosticul		
Confirmarea diagnosticului de arsuri termice	Examenul obiectiv și anamneza sunt momente decisive în confirmarea diagnosticului și determinarea managementului pacientului de arsuri termice.	Obligatoriu: - Anamneza (caseta 3) - Examenul obiectiv general și local (casetele 4- 5) - Examenul de laborator și paraclinic obligatoriu (caseta 6) Recomandabil: - Consultația internistului, cardiologului, ORL, oftalmologului etc.
3.Tratamentul		
Tratamentul medicamentos și operativ al pacientului cu arsuri termice grave	Alegerea tratamentului medicamentos și operativ al pacientului cu arsuri termice depinde de gradul de afectare și de complicațiile bolii, aprecierea căroră este posibilă numai în condiții de staționar.	Obligatoriu: - Tratamentul chirurgical de urgență (conform PCN-121 „Arsurile termice la adult”) - Managementul preoperator (casetele 7- 10) - Terapia celulară (casetele 11-16) - Conduita postoperatorie (casetele 22-23)
4. Externarea pacientului		
La domiciliu, Spitalul raional conform locului de trai	Epitelizarea plăgilor după terapia celulară sau metoda mixtă.	Obligatoriu: Eliberarea extrasului care va conține: - Rezultatele investigațiilor și tratamentul efectuat - Recomandările pentru medicul de familie și pentru pacient - efectuarea pansamentelor aseptice cu Sol.Betadină 1% peste o zi - după epitelizarea totală băițe cu infuzii de romanișă, sare de mare - Control repetat la CRLT peste 2-3 săptămâni.

C.1. DESCRIEREA METODELOR, TEHNICILOR ȘI A PROCEDURILOR

C.1.1. Clasificarea arsurilor termice

Caseta 1. Clasificarea arsurilor termice

- Arsuri termice gr.I
- Arsuri termice gr.II
- Arsuri termice gr.III A
- Arsuri termice gr.III B
- Arsuri termice gr. IV

Tabelul nr.1 Caracteristicile arsurii în dependență de grad

Grad/semne	Gradul I	Gradul II	Gradul III A	Gradul III B - IV
Flictena	-	++	+++	-
Lichidul flictenular	-	Sero - citrin	Sero - sangvinolent	-
Culoarea derm denudat	-	Roșu viu, dilatație capilră	Roză, pală pe alocuri(ce denotă suferința stratului bazal)	Alb marmorat (caramelizare) brun-negru
Epidermul	Eritematos	Brun, decolorat	Brun, decolorat	Absent
Membrana bazală	Integră	Integră	Alterată	Distrusă
Dermul	Integru	Alterat superficial	Alterat profund	Distrus
Durerea la atingere	+	+++ (hiperestezie)	++ (hipoestezie)	- (anestezie)
Vindecare	Restabilire integrală	Epitelizare spontană	Epitelizare lentă, cu sechele cicatriceale hiperpigmentare	După tratament chirurgical (excizie-grefare)
Recolorarea	+++	++	+ (-)	-
Tracțiunea firelor de păr	Nu se smulge (dureroasă)	Se smulge (dureroasă)	Cade în pensă (durere minimă)	Fire de păr absente

C.1.2. Conduita pacientului cu leziuni termice grave

Caseta 2. Pași obligatorii în conduita pacientului cu leziuni termice grave

1. Culegerea anamnezei
2. Examinarea clinică
3. Examinarea paraclinică
4. Managementul preoperator al pacientului
5. Luarea deciziei privind terapia celulară
6. Efectuarea terapiei celulare
7. Supravegherea în dinamică după cicatrizarea plăgilor

C.1.2.1. Anamneza

Caseta 3. Acuzele bolnavului cu arsuri termice grave:

- Dureri și prurit în plăgi
- Afectare a stării de cunoaștere
- Cefalee (dureri de cap)
- Hiperpirexie (t° corporală $> 38,5^{\circ}$ C)
- Insomnie
- Inapetență
- Dereglări gastrointestinale (vomă, diaree)
- Tahipnee (FR $> 30/\text{min}$)
- Tahicardie (FCC $> 125/\text{min}$)

C.1.2.2. Examinarea clinică

Caseta 4. Examenul obiectiv general:

- Semne generale de infecție (febră, cefalee, slăbiciune, inapetență, etc.)
- Manifestări neurologice (neliniște, agitație, dereglări ale somnului, grețuri, convulsii)
- Dereglări gastro-intestinale (inapetență, vomă, diaree)
- Semne de dereglări ale sistemului cardio-vascular (tahicardie, T/A labilă)
- Semne de dereglări ale sistemului respirator (tahipnee, dispnee)
- Semne de dereglări ale sistemului urinar (oligoanurie, hematurie)

Caseta 5. Examenul obiectiv local:

1. Faza de inflamație-detersie a țesuturilor alterate:
 - edem și hiperimie a țesuturilor învecinate plăgilor
 - detașarea și decolarea marginală a crustelor
 - apariția granulațiilor
2. Faza de proliferare-granulare:
 - granulații roz-pale acoperite de fibrină și rămășițe de cruste
 - eliminările purulente se micșorează
 - granulațiile devin roze cu semne de impregnare a tifonului
3. Faza de reparare-epitelizare:
 - grefele celulare transplantate se vascularizează, stimulează procesele de reparare
 - eliminările sero-purulente diminuează
4. Faza de remodelare-maturare a cicatricei

C.1.2.3. Examinarea paraclinică**Caseta 6. Examenul paraclinic**

1. Examenul general al sîngelui
2. Examenul general al urinei
3. Examenul biochimic al sîngelui (proteina generală, urea, creatinina, ALAT, ASAT, Na, Ca, K, glucoza)
4. ECG
5. Examenul bacteriologic din plagă - antibioticograma (depistarea factorului microbian)
6. Coagulograma (fibrinogenul, protrombina)
7. Radiografia cutiei toracice - **recomandabil**

C.1.3. Managementul preoperator**C.1.3.1. Principii generale ale conduitei pacientului cu arsuri termice grave****Caseta 7. Principii generale:**

1. Alimentație enterală, asigurînd calorajul necesar; la necesitate alimentare prin sonda nazo-gastrică.
2. Administrare parenterală, în prezența indicațiilor (detoxicare, suport caloric și electrolitic), sub controlul glicemiei, a soluțiilor concentrate de glucoză, soluții de aminoacizi, emulsii lipidice, vitamine și microelemente.
3. Terapie complexă ce vizează înlăturarea hipoxiei tisulare și restabilirea microcirculației în plagă și țesuturilor adiacente, incluzînd: dextrani, anticuagulate.
4. În cazul incapacității efectuării simultane a necrectomiei, cu ulterioara autoplastie cutanată, se va efectua pregătirea plăgilor pentru transplantarea celulară.

C.1.3.2. Pregătirea pacientului către intervenția chirurgicală/terapia celulară

Caseta 8. Pregătirea generală a pacientului pentru intervenție:

1. Analgezia și terapia antibacterială se efectuează conform indicațiilor, în conformitate cu protocolul clinic.

Analgezicele și antibioticele trebuie selectate în dependență de evaluarea inițială, iar doza trebuie titrată corespunzător rezultatelor reevaluării sistematice și răspunsului la tratament. Prescrierea analgezicelor trebuie întotdeauna ajustată la severitatea durerii. Nu se prescriu alte analgezice și antibiotice de aceeași potență. Tuturor pacienților cu durere de la moderată până la severă, trebuie să li se încerce un tratament cu opioide (conform protocolului clinic privind Managementul durerii).

2. Corecția anemiei, bilanțului hidro-electrolitic, prin transfuzii de masă eritocitară, plasmă proaspăt congelată, crioprecipitat, pierfuzii de cristaloizi în cantități necesare pentru restabilirea homeostaziei, pentru a asigura:

- Hemoglobina – nu mai < de 110 g/l;
- Hematocritul – 0,28 - 0,4;
- Fibrinogenul de la 3 g/l până la 7 g/l.

Caseta 9. Criteriile pentru luarea deciziei privind terapia celulară

1. Determinarea deficitului zonelor donatorii
2. Determinarea contraindicațiilor la intervenții chirurgicale cu grefare cutanată
3. Pregătirea plăgilor postcombustionale către terapia celulară (cu sau fără grefarea cutanată)
4. Informarea pacientului referitor la tactica de tratament (terapia celulară), cu obținerea acordului informat de la bolnav sau rudele acestuia.

Caseta 10. Factori ce pot determina un eșec al grefării:

1. Aplicarea grefelor la un bolnav ce nu îndeplinește condițiile biologice minimale
2. Interpunerea între grefă și "pat" a unor elemente ce se opun penetrării vasculare: hematoame, seroame, țesuturi necrotice
3. Existența unui pat incapabil de a elabora elemente vasculare
4. Prezența mișcărilor de forfecare între pat și grefă, imobilizare inefficientă
5. Prezența florei hemolitice, a piocianicului
6. Aplicarea unui pansament mult prea compresiv, ischemiant
7. Nerespectarea unui interval optim între pansamente

C.1.4. Terapia celulară**C.1.4.1 Indicațiile și scopul terapiei celulare****Caseta 11. Indicații către terapia celulară**

1. Arsurile de gr. III B-IV pe o suprafață $\geq 10\%$ din suprafața corpului
2. Deficitul resurselor donatorii proprii
3. Incapacitatea de-a efectua simultan necrectomia cu ulterioara autoplastie cutanată în legătură cu starea gravă a pacientului
4. Arsurile de gr. III A după necrectomii tangenziale, cu scopul de accelerare a regenerării plăgilor postcombustionale și prevenirea formării cicatricilor postcombustionale (de ex. în arsurile regiunii dorsale ale mâinilor)
5. Plăgile de altă etiologie:
 - a) plăgi postoperatorii
 - b) procese necrotico-infecțioase
 - c) ulcere trofice
6. Terapia celulară este indicată îndeosebi bolnavilor senili care suportă patologii somatice.

Nota: Această metodă este indicată și în combustiologia pediatrică în arsuri vaste, peste 30% din

suprafața corpului, de grad profund.

Caseta 12. Scopul terapiei celulare

1. Stimularea activității regenerative prin formarea țesutului de granulație (neovascularizarea) și epitelizarea
2. Crearea unei bariere în calea invaziei bacteriene
3. Stimularea epitelizării
4. Diminuarea durerilor

C.1.4.2 Pregătirea plăgilor către intervenția chirurgicală/terapia celulară

Caseta 13. Pregătirea plăgilor pentru terapia celulară:

1. Transplantarea culturii celulare trebuie efectuată pe plăgile fără necroză și fibrină, fără secreții purulente. Acest lucru se realizează prin efectuarea necrectomiei tangențiale cu cuțitul Watson și tratamentului antibacterian conform antibioticogramei.
2. Pentru pregătirea plăgilor către transplantarea culturilor celulare se execută necrectomii tangențiale, care sunt posibile doar în lipsa contraindicațiilor.

Caseta 14. Contraindicațiile către necrectomie:

a) Perioada de șoc:

- hipotensiune și tahicardie,
- oligurie sau anurie,
- hipotermie,
- hemoconcentrație.

b) Prezența Sindromului de Coagulare Intravasculară Disiminatedă

- fibrinogen < 3 g/l sau > 7 g/l,
- protrombină > 70%,
- Timpul Quick > 16 sec.,
- antitrombina III < de 75%.

c) Anemia

- Hb < de 110 g/l.

Caseta 15. Criteriile clinice ce denotă pregătirea plăgilor pentru terapia celulară:

- Lipsa țesuturilor necrotice pe suprafața plăgilor
- Lipsa oricarui exudat
- Granulare uniformă macroscopic
- Microglanulare de culoare roză sau roșie, fără sîngerare evidentă
- Adezivitate marcată
- Prezența epitelizării marginale

În procesul de pregătire a plăgilor granulare pentru transplantarea cutanată este necesar tratamentul local al plăgilor prin efectuarea pansamentelor aseptice cu soluții antiseptice, unguente, creme, pulbere menite să lupte contra microorganismelor.

C.1.4.3 Etapele intervenției chirurgicale/terapii celulare

Caseta 16. Etapele intervenției chirurgicale/terapii celulare:

1. Premedicație
2. Inducție în anestezie generală (conform Protocolului clinic standardizat în anestezie)
3. Colectare a grefelor de piele (în cazul metodei mixte)
4. Necrectomie sau excizie a granulațiilor sau hipergranulațiilor
5. Plastie cu transplante libere cutanate a plăgilor cu suturarea lor sau aplicarea metodei ingineresti cu grefe celulare
6. Inoculare a culturilor celulare pe suprafața plăgilor sau în ochiurile grefelor de piele (în cazul metodei

mixte)

7. Aplicare a pansamentelor neadezive și tifon

8. Ieșire din anestezia generală

La fiecare etapă a tratamentului chirurgical se ia în considerație starea generală și vârsta bolnavului, patologiile concomitente, suprafața arsurilor și localizarea, prezența resurselor donatorii.

C.1.5 Fibroblastul

C.1.5.1 Morfologia fibroblastului

Caseta 17. Morfologia fibroblastului

Fibroblastul formează o familie mare de constituenți celulari: fibroblastele, fibrocitele și miofibroblastele.

Fibroblastele sunt cele mai active și mai răspândite celule ale țesutului conjunctiv. Au originea în celula mezenchimală.

1. La microscopul optic au următorul aspect:

- au forma alungită dar neregulată, cu numeroase prelungiri
- au raportul nucleo-plasmatic supraunitar
- nucleul are forma ovalar-alungită, este palid colorat și prezintă un nucleol evident localizat în zona mai bombată a celulei
- citoplasma este puternic bazofilă

2. La microscopul electronic apar următoarele particularități:

- celula stabilește contacte focale cu matricea dar și joncțiuni gap cu alte celule
- în citoplasmă se evidențiază foarte mulți ribozomi liberi (poliribozomi) și RE rugos
- există foarte multe mitocondrii, aparatul Golgi este bine reprezentat, cu alte cuvinte, întreg aparatul de sinteză proteică este foarte bine dezvoltat
- citoscheletul este de asemenea bine dezvoltat, format din microfilamente de actină și miozină, microtubuli și filamente intermediare de desmină și timetină.

3. Funcția:

- Fibroblastul secretă toate macromoleculele matricei conjunctive: tropocolagen, tropoelastină, fibrilină glicozaminoglicani și proteoglicani, precum și toate cele șase proteine de adezivitate, proenzimele lizozomale de tipul collagenazei, elastazei, hialuronidazei, glucuronidazei și catepsinei care intervin în digestia matricei conjunctive.
- Fibroblastele secretă factorul de proliferare care stimulează dezvoltarea microcirculației.
- Fibroblastele intervin în secreția de interferon, care este mult mai activ decât interferonul secretat de macrofage. El intervine în apărarea antivirală și antitumorală.
- Ele diferă între ele în funcție de tipul de țesut conjunctiv căruia îi aparțin și chiar în cadrul aceluiasi tip de țesut conjunctiv, în funcție de localizare. Dacă se transplantează porțiuni de piele palmară sau plantară la nivelul trunchiului, aceasta se va îngroșa ca urmare a fibroblastelor care sunt diferite și induc diferențele epiteliale.

C.1.5.2 Cultivarea fibroblastului

Caseta 18. Etapele cultivării fibroblastelor

Există două metode utilizate în mod obișnuit pentru obținerea culturilor de fibroblaste.

I. Prima etapă constă în prelevarea unei porțiuni de piele de dimensiunea de 2×5 mm. Înainte de a primi cultura, această porțiune de piele se prelucrează cu antibiotice și antimicotice, apoi epiderma și țesutul adipos sunt eliminate, iar derma rămasă se taie în bucăți mici cu foarfecele. Fragmentele rezultate ale dermei sunt plasate separat pe suprafața umedă a cutiei petri și lăsate timp de 5-10 minute, cu scop de adeziune, se adaugă apoi puțin mediu de cultură și se incubează timp de 24 ore. După acest interval de timp, se adaugă mediul de cultură. Pentru obținerea fibroblastelor durata de timp este de cca

o săptămână.

La etapele incipiente este de dorit ca fragmentele să rămână atașate la suprafața vasului de cultură, cele fragmente ce s-au detașat să fie mutate în vase noi. Creșterea numărului de fragmente aderente se datorează acoperirii vasului de către sticlă: ce creează o presiune suplimentară, mărind astfel suprafața de contact a fragmentelor cu mediul de cultură. Proliferarea fibroblastelor se poate stimula prin adăugarea în mediul de cultură, pentru o perioadă scurtă, a tripsinei – EDTA, dar nu trebuie uitat faptul, că timpul de expunere trebuie să fie considerabil mai mic decât timpul necesar pentru a separa celulele din peretele vasului.

La cultivare se folosește mediul de cultură ce conține 90 % mediul de cultură DMEM și 10 % ser bovin fetal suplimentat cu 0,1 % Sodiu L – glutamină.

II. A doua etapă constă în extragerea fibroblastelor din fragmente mici de dermă. După lavajul cu soluție de antibiotic (sol.Ghentamicină 80 mg) maximal este necesar de-a mărunți țesutul, se adaugă soluție de collagenază 0,1 %, se amestecă și se pun în incubator timp de 40-60 minute apoi se selectează cu ajutorul pipetei și se centrifughează.

Fracțiunea de celule primite se diluează pe mediu nutritiv și se incubează până la formarea monostratului de celule. Mediul nutritiv este schimbat după necesitate, aproximativ la 2-3 zile. După obținerea monostratului de celule și subcultivarea acestora are loc producerea liniei de fibroblaști.

III. A treia etapă este tripsinizarea cu ajutorul soluției Versen și tripsinei la 40°C. Cîte 2 ml de suspensie de celule se însămînțează pe cutia Petri și sunt incubate în condiții de umiditate de 37°C, cu 5 % CO₂. Densitatea celulelor însămînțate, în creșterea culturilor de celule și fibroblaste umane, este de 2×10^4 per cm² suprafață. Numărul coloniilor se determină la 14-18 zile după însămînțare. Celulele se fixează cu soluție de Formol 10 % și se colorează cu albastru de metilen. Eficiența cultivării este definită ca raportul dintre numărul de colonii/la numărul de celule placcate. Ca tulpini de control pot fi utilizate fibroblaste din pielea feților embrionali de 8-12 săptămîni. Pentru tulpinile embrionare, eficacitatea multiplicării, adică capacitatea celulelor de a forma colonii formate din 16 sau mai multe celule, variază de la 38-82 % iar pentru tulpinile postnatale - 12-60 %. Pentru producția cantității necesare de celule pentru transplant sunt necesare 5-6 pasaje în cultură.

Pentru a preveni transmiterea de infecții, fibroblastele se testează la HIV , hepatita A, B și C, Citomegalovirus, mycoplasma, chlamydia și sîngele donatorului.

Cu ajutorul microscopului se studiază morfologia celulară. În condiții normale, fibroblastele sunt celule fusiforme, alungite, cu citoplasma clară. Celulele pot fi utilizate direct pentru tratament sau vor fi congelate și vor fi folosite mai tîrziu. Congelarea fibroblastelor are loc în mediu care conține 70 % DMEM, ser bovin fetal 20 % și 10 % dimetilsulfoxi DMSO. Celulele decongelate pot fi utilizate pentru cultura secundară și generarea unui număr suficient de celule pentru scopuri terapeutice.

Caseta 19. Medii de cultură și necesarul pentru cultivarea fibroblastelor

Pentru cultivarea celulară se utilizează:

- **Mediile de cultură:** medii Thioglycollate Broth Dextrose, medii Sabourand Dextrose, (MEM), Dulibenco Modificat (DMEM), F-12, Ser bovin fetal.
- **Reactivele:** soluții de tripsină, soluția Versen (EDTA), soluția tampon fosfat.
- **Dispozitivele:** veselă din plastic de unică folosință, vase sterile 200 ml de polipropilenă; seringi de 2 ml; pipetele de unică folosință Pasteur, pompa de cauciuc pentru pipetare, flacoane preconizate pentru lavajul cu antibiotic, tuburi conice din polipropilen, lamele din sticlă pentru microscopie, pincete oftalmologice anatomice și chirurgicale, foarfece oftalmologice, incubator, termostat, hotă cu flux laminar de aer, bandaje de tifon parafinizate.

Caseta 20. Prelevarea

- Recoltarea unei porțiuni de piele în staționar în urma unei operații semiinvazive, pentru cultivarea culturilor celulare.
- Probele prelevate pentru testele bacteriologice sunt colectate în staționar.

Caseta 21. Procedura operațională

- Se ia o probă de cultură și se aplică pe mediul Thioglycollate Broth Dextrose

- Se închide vasul și se incubează la temperatura de 37°C.

Testele biologice urmăresc decelarea microorganismelor patogene ce pot fi prezente pe materialul biologic studiat.

C.1.6. Conduita postoperatorie

Caseta 22. Conduita postoperatorie

- Se exclude efortul fizic 7- 10 zile
- Regim alimentar (masa 1 prima zi)
- Examen obiectiv zilnic
- Antibioticoterapie - conform antibioticogramei
- Preparate analgezice (Dexketoprofenum, Tramadolium)
- Preparate anticoagulante (Nadroparinum calcium, Bemiparinum, Enoxaparinum natrium, Heparinum natrium)
- Antihistaminice (Diphenhydraminum, Clemastinum, Chloropyraminum)
- Vitaminoterapie
- Gastroprotectori
- Tratament local (toaleta plăgilor postoperatorii, pansamente aseptice cu Povidonum iodidum 1% ș.a., prelucrarea plăgilor donor (în cazul metodei mixte) cu Xeroform*, iradiere cu raze infraroșii.

C.1.6. 1 Supravegherea

Caseta 23. Supravegherea în dinamică după epitelizarea/cicatrizarea plăgilor

- După epitelizarea totală efectuarea băișelor cu infuzii de romaniță, sare de mare
- Control repetat peste 2-3 săptămâni
- Evidența medicului de familie

Bibliografie:

1. Alekseev A. Volume of immune status analysis in the assessment of burns patients. // Management of burns and fire disasters: perspective 2000. - 221 - 222 p.
2. Bocchi A., Caleffi E. Management of the burned patient: a surgical and anaesthesiological protocol.// Management of burns and fire disasters: perspective 2000. - 324 - 326 p.
3. Deitch E.A., Dobke M. Failure of local immunity: a pre-disposing cause of burn wound sepsis // Arch. Surg., 1995, 120, 78-84 p.
4. Duncan MR, Berman B: Stimulation of collagen and glycosaminoglycan production in cultured human adult dermal fibroblasts by recombinant human interleukin 6. *J Invest Dermatol* 97:686, 1991.
5. Gibran NS, Isik FF, Heimbach DM, et al: Basic fibroblast growth factor in the early human burn wound. *J Surg Res* 56:226, 1994.
6. Gospodarowicz D, Neufeld G, Schweigerer L: Fibroblast growth factor : Structure and biologic properties. *J Cell Physiol* 5: 15.1987.
7. Gudumac E., Vicol G. \Verlaufskontrolle septischer Patienten of deer intensivstation mit hilfe von "Sepsisscore", Endotoxin-und AT-111-Bestimmung // Langenbecks Arch. Chir., 1997, 373 p.
8. Hemant Saraiya, MS MCh. Managment of An Unusual Extreme Extension Contracture of the Wrist. *J. Burns Care Rehabil*, 2003, 24: 378-381 p.
9. Kohase M, May LT. Tamin I, et al : A cytokine network in human diploid fibroblasts: Interactions of beta- interferons, tumor necrosis factor, platelet- derived growth factor, and interleukin-1. *Mol Cell Biol* 7:273, 1987.
10. Masellius M., Ferrare M.M. Fire disaster and disaster: planing and manangement. // Annals of Burns and Fire Disasters. Vol.12, Nr. 2, 1999, 67 p.
11. Park KY, Kim MS, Choi SY. Fabrication and characteristics of MOSFET protein chip for detection of ribosomal protein. *Biosens Bioelectron*. 2005 Apr 15;20(10):2111-5 p.
12. Taran A. \Congresul Național Practico-Științific în Domeniul Medicinii de Urgență, 26 decembrie, 2001.
13. Taran A. \Rezultatele aplicării clinice a unguentului "Armon" în Centrul Leziuni Termice Republicii Moldova în perioada 1 martie - 30 septembrie 1996. Conferința Practic Științifică SCM de Urgență, 3-4 decembrie, 1997, 46 p.
14. Wassermann D., Leberton F. Comparasion of epidemiological date and life prognosis in patients transferred from the Maghreb to France, and in all patients admitted to one Burns Centre in Paris. //Management of burns and fire disasters: perspective 2000. - 169 - 173p.
15. Алексеев А.А., Крутиков М.Г. Антибиотикотерапия антибиотико - профилактика в комбустиологии. //II Международный симпозиум Новые методы лечения ожогов с использованием культивированных клеток кожи. - 2008. - с. 45-74.
16. Гусак В.К., Шано В.П. //К вопросу о диагностических критериях синдрома системного воспалительного ответа при ожоговом шоке. // Международный конгрес Комбустиология на рубеже веков. – Москва, 9-12 октября, 2000, С. 45-46.
17. Козулин Д.А., Современная характеристика летальности обожженных // 8 - я Конференция по проблеме ожогов. С. Петербург, 2005, с. 80.
18. Саркисов Д.С. Алексеев А.А. Пятнадцатилетний опыт использования культивированных фибробластов для лечения тяжело обожженных. //II Международный симпозиум Новые методы лечения ожогов с использованием культивированных клеток кожи. - 2008. - с. 31-32.
19. Филимонов А.А., Королев В.Ю. Активная хирургическая тактика в лечении больных с обширными критическими ожогами. //II Конгресс Ассоциации хирургов имени Н.И. Пирогова. - С. Петербург. - 2008. 23-25 сент. - с. 288.