
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Factori de prognostic și metode
de reducere a incidenței
fistulelor digestive
postoperatorii**

Doctorand: **Alexandra Caziuc**

Conducător de doctorat: **Prof. Dr. Ion Aurel Mironiuc**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	1
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	3
1. Considerații generale	5
1.1. Importanța practică și incidența fistulelor anastomotice	5
1.2. Definiție. Clasificare	6
2. Vindecarea anastomozelor digestive	9
2.1. Etapele vindecării anastomozelor digestive	9
2.1.1. Etapa inflamatorie	9
2.1.2. Etapa proliferativă	10
2.1.3. Etapa de maturare	10
2.2. Rolul celulelor stem în vindecarea suturilor digestive	10
2.3. Metode de cuantificare a vindecării	11
2.3.1. Parametrii mecanici ai vindecării	11
2.3.1.1. Rezistența la rupere	11
2.3.1.2. Presiunea de explozie	12
2.3.2. Parametrii biochimici ai vindecării	12
2.3.2.1. Dozarea hidroxiprolinei	12
2.3.2.2. Calitatea colagenului	12
2.3.3. Parametrii histologici ai vindecării	13
2.3.4. Metode moderne de evaluare a vindecării	13
3. Factori de risc în dezvoltarea fistulelor digestive	15
3.1. Factorii de risc generați de chirurg	15
3.1.1. Vascularizația tranșelor anastomotice	15
3.1.2. Tensiunea la nivelul anastomozei	17
3.1.3. Detalii tehnice	17
3.1.4. Pierderile sanguine	18
3.1.5. Cantitatea de perfuzabil primită	19
3.1.6. Durata intervenției chirurgicale	19
3.2. Factorii de risc generați de pacient	19
3.2.1. Vârsta avansată	20
3.2.2. Sexul masculin	21
3.2.3. Consumul de toxice	21
3.2.4. Comorbiditățile	21
3.2.5. Alterarea parametrilor biochimici	21
3.2.6. Statusul nutrițional deficitar	22
3.2.7. Consumul cronic de glucocorticoizi	22
3.2.8. Consumul cronic de antiinflamatoare nonsteroidiene	22
3.2.9. Terapia neoadjuvantă	23
3.3. Factorii de risc generați de afecțiunea de bază	23
3.3.1. Bolile inflamatorii intestinale	23
3.3.2. Malignitatea	23
3.3.3. Intervențiile efectuate în regim de urgență	24
3.3.4. Trauma	24
4. Metode de reducere a incidenței fistulelor digestive postoperatorii	25
4.1. Intervenții asupra condițiilor locale de anastomozare	25
4.2. Intervenții asupra condițiilor sistemice de anastomozare	26
4.3. Utilizarea celulelor stem multipotente	27
4.3.1. Surse de CSM	27
4.3.2. Rezultate	27
4.3.3. Etica transplantării CSM	28
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	29
1. Introducere	31
2. Obiective	33
3. Metodologie generală	35
3.1. Animale de experiență	35

3.2. Obținerea celulelor stem mezenchimale	35
3.3. Intervenția chirurgicală	37
3.4 Analiza statistică	40
4. Studiul 1 – Cercetarea calității CSM utilizate în studiu	41
4.1. Introducere	41
4.2. Ipoteza de lucru	41
4.3. Material și metodă	41
4.3.1. Recoltarea CSM	41
4.3.2. Caracterizarea imunofenotipică	41
4.3.3. Evaluarea capacității clonale	42
4.3.4. Capacitatea de migrare	42
4.3.5. Testarea caracterului multipotent	42
4.3.5.1. Capacitatea de diferențiere pe linie osteogenică	42
4.3.5.2. Capacitatea de diferențiere pe linie condrogenică	42
4.3.5.3. Capacitatea de diferențiere pe linie adipogenică	43
4.4. Rezultate	43
4.4.1. Caracterizarea imunofenotipică	43
4.4.2. Evaluarea capacității clonale	44
4.4.3. Evaluarea capacității de migrare	44
4.4.4. Testarea caracterului multipotent	45
4.4.4.1. Capacitatea de diferențiere pe linie osteogenică	45
4.4.4.2. Capacitatea de diferențiere pe linie condrogenică	46
4.4.4.3. Capacitatea de diferențiere pe linie adipogenică	46
4.5. Discuții	47
4.6. Concluzii	48
5. Studiul 2 – Influența administrării perianastomotice și intraperitoneale de CSM asupra anastomozelor colonice la diferite perioade de timp postoperator din punct de vedere al parametrilor clinici	49
5.1. Introducere	49
5.2. Ipoteza de lucru	49
5.3. Material și metodă	49
5.4. Rezultate	50
5.5. Discuții	52
5.6. Concluzii	53
6. Studiul 3 – Influența administrării perianastomotice și intraperitoneale de CSM asupra anastomozelor colonice la diferite perioade de timp postoperator din punct de vedere al parametrilor histo-patologici	55
6.1. Introducere	55
6.2. Ipoteza de lucru	55
6.3. Material și metodă	55
6.4. Rezultate	57
6.4.1. Rezultatele la 7 zile postoperator	57
6.4.1.1. Necroză	59
6.4.1.2. Epitelizare	59
6.4.1.3. Inflamație	60
6.4.1.4. Depozite de colagen	60
6.4.2. Rezultatele la 14 zile postoperator	61
6.4.2.1. Necroză	63
6.4.2.2. Epitelizare	63
6.4.2.3. Inflamație	63

6.4.2.4. Depozite de colagen	64
6.4.3. Rezultatele la 30 zile postoperator	64
6.4.3.1. Necroză	65
6.4.3.2. Epitelizare	65
6.4.3.3. Inflamație	66
6.4.3.4. Depozite de colagen	66
6.4.4. Rezultatele în evoluție	67
6.4.4.1. Necroză	67
6.4.4.2. Epitelizare	67
6.4.4.3. Inflamație	68
6.4.4.4. Depozite de colagen	68
6.5. Discuții	69
6.6. Concluzii	70
7. Studiul 4 – Influența administrării perianastomotice și intraperitoneale de CSM asupra anastomozelor colonice la diferite perioade de timp postoperator din punct de vedere al conținutului tisular de hidroxiprolină	71
7.1. Introducere	71
7.2. Ipoteza de lucru	71
7.3. Material și metodă	71
7.4. Rezultate	72
7.5. Discuții	74
7.6. Concluzii	74
8. Studiul 5 – Influența pe termen lung a administrării perianastomotice și intraperitoneale de CSM asupra anastomozelor colonice din punct de vedere al parametrilor clinici, histo-patologici și al conținutului tisular de hidroxiprolină	75
8.1. Introducere	75
8.2. Ipoteza de lucru	75
8.3. Material și metodă	75
8.4. Rezultate	76
8.4.1. Parametri clinici	76
8.4.2. Parametri histo-patologici	77
8.4.2.1. Necroză	78
8.4.2.2. Epitelizare	78
8.4.2.3. Inflamație	79
8.4.2.4. Depozite de colagen	79
8.4.3. Conținutul tisular de hidroxiprolină	79
8.5. Discuții	80
8.6. Concluzii	80
9. Studiul 6 – Efectele administrării perianastomotice și intraperitoneale de CSM asupra sindromului aderențial după anastomoze colonice	81
9.1. Introducere	81
9.2. Ipoteza de lucru	81
9.3. Material și metodă	81
9.4. Rezultate	82

9.4.1. Rezultatele la 7 zile postoperator	82
9.4.2. Rezultatele la 14 zile postoperator	83
9.4.3. Rezultatele la 30 zile postoperator	83
9.4.4. Rezultatele la 6 luni postoperator	84
9.5. Discuții	84
9.6. Concluzii	85
10. Concluzii generale (sinteză)	87
11. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	89
REFERINȚE	91
ANEXE	105

CUVINTE CHEIE: suturi digestive, anastomoze colo-colice, fistule anastomotice, șobolani Wistar, celule stem mezenchimale (CSM), depozite de colagen, hidroxiprolină

INTRODUCERE

Complicațiile anastomotice în general și fistulele anastomotice în particular ocupă un loc central în chirurgia colonului. În lumea științifică există preocupări vaste legate de scăderea incidenței acestora. Teza de față își propune să evalueze rolul pe care celulele stem mezenchimale îl ocupă în vindecarea suturilor digestive.

Teza este structurată în 2 secțiuni distincte: *stadiul actual al cunoașterii* – care pornește de la progresele înregistrate în descrierea procesului de vindecare a suturilor digestive, a factorilor implicați în alterarea acestui proces, metodele de cuantificare a vindecării și procedeele imaginate până în prezent pentru potențarea vindecării și *contribuția personală* – care cuprinde studiile experimentale desfășurate pentru verificarea ipotezei conform căreia administrarea celulelor stem mezenchimale in vivo (fie perianastotic, fie intraperitoneal) favorizează procesul de vindecare.

Cercetarea de față a fost realizată prin finanțarea oferită de grantul POSDRU nr. 159/1.5/S/138776 cu titlul "Model colaborativ instituțional pentru translarea cercetării științifice biomedicale în practica clinică". Complexitatea studiului a impus colaborarea cu specialiști din domeniul medicinei regenerative și anatomiei patologice.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Apariția fistulelor anastomotice reprezintă o complicație importantă a chirurgiei digestive. Acestea cresc semnificativ durata de spitalizare, costurile și necesarul de reintervenții, cu risc ridicat de dezvoltare a infecțiilor nosocomiale. Fistulele alterează semnificativ prognosticul și măresc rata mortalității. Pe termen lung, complicațiile apărute la nivelul anastomozei creează probleme legate de reintegrarea socială a pacienților, durere cronică cu implicații de natură psihologică sau psihiatrică.

Procesul vindecării anastomozelor digestive poate fi sintetizat în 3 faze, care se regăsesc sub controlul mai multor tipuri de celule, chemokine și hormoni care repară aria lezată și oferă suport pentru integritatea țesutului: etapa inflamatorie, proliferativă și de maturare a colagenului. S-a demonstrat că toate elementele implicate în procesul de vindecare se află sub controlul celulelor stem care se găsesc în mod normal în țesuturi fie sub formă de pericite, fie la nivelul criptelor.

Unul dintre cei mai fiabili parametri ai vindecării este prezența colagenului la nivelul anastomozei, identificat fie histo-patologic prin colorații speciale (Trichrome-Masson), fie prin dozarea hidroxiprolinei tisulare.

Există 2 categorii de factori implicați în eșecul vindecării: *factori locali* – care se referă la tehnica de realizare a anastomozei, dar și la caracteristicile locale ale bolii de bază și *factori generali* – care constau în anomalii sistemice cu efect asupra suturilor.

Cuoșterea potențialilor factori de risc și a modalității de vindecare a suturilor digestive a condus la elaborarea mai multor metode de reducere a incidenței complicațiilor anastomotice, nicio metodă nedovedindu-și eficacitatea până în prezent.

Noile direcții în studiul reducerii frecvenței fistulelor anastomotice se îndreaptă către utilizarea celulelor stem în realizarea anastomozelor. La baza acestor studii stă capacitatea acestora de reînnoire și de diferențiere. Provocările legate de transplantarea celulelor stem mezenchimale sunt legate de sursa de prelevare, numărul adecvat de celule, controlul diferențierii celulare/puritate, calitate, depozitarea adecvată a preparatelor și metoda de administrare.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Toate experimentele au fost efectuate în conformitate cu legislația actuală privind drepturile animalelor, cu obținerea avizului Comisiei de Etică (363/21.10.2014).

Lucrare de față și-a propus analiza efectelor celulelor stem mezenchimale prelevate de la nivelul țesutului adipos inghinal asupra vindecării anastomozelor colo-colice realizate pe model experimental utilizând șobolani Wistar în vârstă de 10 săptămâni. Cuprinde atât o parte experimentală in vitro, cât și una in vivo.

Obținerea, prelucrarea și analiza celulelor stem mezenchimale s-a realizat în cadrul Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară Cluj-Napoca, Departamentul de Reproducere, Obstetrică și Ginecologie Veterinară (Dr. Pall Eموke). Intervențiile chirurgicale au fost realizate în cadrul Centrului de Cercetare Experimentală (Biobază) al Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca. Pentru realizarea studiului in vivo s-au realizat anastomoze colo-colice termino-terminale la 5 cm de valve ileocecală, constituindu-se 3 loturi de subiecți: A – fără tratament suplimentar, B – administrare perianastomotică de soluție conținând celule stem și C – administrare intraperitoneală de soluție conținând celule stem.

Analiza statistică a prezentei lucrări a fost de tip descriptive și inferențial. Datele înregistrate au fost prelucrate cu ajutorul programului R-Commander (versiunea R 3.2.1., rcdmr.package). Au fost utilizate testele T-Student Assuming Unequal Variances și testul Z for means. Nivelul de semnificație ales în cazul tuturor testelor bilaterale a fost 0.05.

Studiul 1. Cercetarea calității celulelor stem mezenchimale utilizate în studiu

Obiectivul studiului a fost să stabilim dacă celulele recoltate de la nivelul țesutului adipos respectă caracteristicile impuse de International Society for Cellular Therapy (ISCT): să fie plastic-aderente în culturile standard, mai mult de 95 % să exprime pe suprafață CD105, CD73, CD90, mai puțin de 2% să fie pozitive pentru CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19, HLA clasa II, să posede capacitate de diferențiere pe linie osteogenică, adipogenică și condrogenică.

Material și metodă: A fost utilizat țesut adipos prelevat de la nivel inghinal, prelucrat enzimatic și centrifugat până la obținerea unei suspensii celulare. Prin trecerea acesteia pe medii de cultură successive, s-a obținut soluția conținând cellule stem supusă testărilor ulterioare. A fost realizată caracterizarea imunofenotipică a celulelor prin marcarea acestora cu anticorpi monoclonali anti CD34/45, anti CD44 și anti CD105. S-au urmărit de asemenea capacitatea de a forma colonii, capacitatea de migrare și caracterul multipotent prin diferențierea pe linie osteogenică, condrogenică și adipogenică utilizând inducerea diferențierii în medii specifice.

Rezultate: Analiza imunofenotipică a celulelor izolate relevă pozitivitate pentru markerii mezenchimali CD105, CD 44 și negativitate pentru CD34, CD 45 și HLA-DR. Analiza rezultatelor a identificat un procent de $61 \pm 3.21(\text{SE})$ colonii/100 cm³. $21(\text{SE})$ colonii/100 cm². Capacitatea de migrare a fost în medie $0.613\text{mm}^2 \pm 0.02(\text{SE})$. De asemenea a fost confirmată capacitatea de diferențiere pe linie adipogenică, condrogenică și osteogenică.

Concluzii: Celulele stem mezenchimale prelevate de la nivelul țesutului adipos reprezintă o sursă adecvată din punctual de vedere al criteriilor ISCT.

Studiul 2. Influența administrării perianastomotice și intraperitoneale de celule stem mezenchimale asupra anastomozelor colonice la diferite perioade de timp postoperator din punct de vedere al parametrilor clinici

Obiectivul studiului a fost să stabilim dacă există diferențe semnificative între lotul martor comparativ cu loturile la care s-au transplatat celule stem mezenchimale (fie perianastomotic, fie intraperitoneal) din punct de vedere al parametrilor clinici prin urmărirea pacienților timp de 7,14, respectiv 30 zile postoperator.

Material și metodă: Au fost alcătuite 3 loturi de studiu (martor, administrare perianastomotică de celule stem și administrare intraperitoneală de celule stem), fiecare cu câte 30 de subiecți. Zilnic subiecții au fost urmăriți din punct de vedere al stării generale, reluării și menținerii tranzitului intestinal și al aspectului plăgii postoperatorii. În zilele 7, 14 și 30 postoperator câte 10 subiecți au fost excluși din studiu. Pentru fiecare subiect a fost calculată diferența între greutatea la ieșirea din studiu și greutatea din ziua intervenției chirurgicale (ΔG).

Rezultate: Evoluția postoperatorie a fost favorabilă pentru toți pacienții incluși în studiu. Mortalitatea postoperatorie a fost de 0%, fără apariția unor complicații majore. S-au înregistrat supurații de plagă în toate loturile, fără diferențe semnificative din punct de vedere statistic. În toate loturile s-a înregistrat creșterea greutății față de ziua intervenției, fără diferențe semnificative. Reluarea tranzitului intestinal s-a făcut în medie în ziua 1 postoperator.

Concluzii: Administrarea de CSM nu aduce beneficii semnificative asupra vindecării anastomozelor colonice din punct de vedere al parametrilor clinici. Există o tendință de scădere a complicațiilor de tip septic după transplantarea de CSM atât perianastomotic, cât

și intraperitoneal. Administrarea de CSM s-a dovedit a fi o metodă sigură, fără a aduce complicații suplimentare în vindecarea anastomozelor colonice.

Studiul 3. Influența administrării perianastomotice și intraperitoneale de celule stem mezenchimale asupra anastomozelor colonice la diferite perioade de timp postoperator din punct de vedere al parametrilor histo-patologici

Obiectivul studiului a fost să stabilim dacă există diferențe semnificative între lotul martor comparativ cu loturile la care s-au transplatat celule stem (fie perianastotic, fie intraperitoneal) din punct de vedere al parametrilor histo-patologici prin urmărirea pacienților timp de 7,14, respectiv 30 zile postoperator.

Material și metodă: Au fost alcătuite 9 loturi de studiu, fiecare cu câte 10 subiecți în funcție de modul de administrare al celulelor stem și momentul sacrificării. Analiza histo-patologică a fost realizată în cadrul Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară, Departamentul de Anatomie Patologică (Dr. Nagy Andras-Laszlo). S-a realizat o apreciere macroscopică a anastomozei și a cavității peritoneale, notându-se prezența fistulelor anastomotice, a stenozei sau a abceselor intraperitoneale. După îndepărtarea aderențelor, s-a recoltat un fragment de 1 cm centrat pe anastomoză. Din acesta un segment conținând extremitatea antimezenterică (2/3) a fost trimis pentru analiza histo-patologică. Analiza lamelor a fost făcută de un singur cercetător care nu a cunoscut apartenența subiecților la loturi. Acesta a realizat o notare pe o scală de la 0 la 3 (0=absent, 1=scăzut, 2=moderat, 3=crescut) a depozitelor de colagen, necrozei, epitelizării și a inflamației.

Rezultate: Toate anastomozele s-au vindecat fără stenoză sau dehiscente. Intraperitoneal nu s-au evidențiat abcese. Prezența necrozei a fost limitată în toate loturile, fără a se putea identifica diferențe statistic semnificative. De asemenea nu am obținut rezultate semnificativ statistice în ceea ce privește epitelizarea. S-a observat o scădere semnificativă a procesului inflamator după administrarea perianastotică a celulelor stem la toate perioadele de analiză ($p < 0.05$). Transplantarea intraperitoneală a condus de asemenea la o scădere a procesului inflamator, semnificativ față de lotul martor. Analiza microscopică a fragmentelor prelevate a relevat prezența depozitelor de colagen în toate cele 3 loturi. S-a observat o creștere semnificativă față de lotul martor după injectarea perianastotică la toate cele 3 intervale de timp și la 14, respectiv 30 zile pentru transplantarea intraperitoneală a celulelor stem.

Concluzii: Administrarea de CSM nu influențează calitatea epitelizării și prezența necrozei la nivelul anastomozelor colonice. Atât administrarea perianastotică, cât și cea intraperitoneală produc o scădere a reacției inflamatorii la nivelul anastomozelor colonice la 7, 14, respectiv 30 zile postoperator. Administrarea perianastotică a CSM crește semnificativ numărul depozitelor de colagen de la nivelul anastomozelor colonice la 7,14, respectiv 30 zile postoperator. Acest efect, deși important pentru administrarea intraperitoneală, este inferior variantei de administrare perianastotică. Administrarea de CSM s-a dovedit a fi o metodă sigură, fără a aduce complicații suplimentare în vindecarea anastomozelor colonice.

Studiul 4. Influența administrării perianastomotice și intraperitoneale de celule stem mezenchimale asupra anastomozelor colonice la diferite perioade de timp postoperator din punct de vedere al conținutului tisular de hidroxiprolină

Obiectivul studiului a fost să stabilim dacă există diferențe semnificative între lotul martor comparativ cu loturile la care s-au transplatat celule stem (fie perianastomotice, fie intraperitoneale) din punct de vedere al conținutului tisular de hidroxiprolină prin urmărirea pacienților timp de 7, 14, respectiv 30 zile postoperator.

Material și metodă : Au fost alcătuite 9 loturi de studiu, fiecare cu câte 10 subiecți în funcție de modul de administrare al celulelor stem și momentul sacrificării. În ziua 7, 14, respectiv 30 postoperator câte 10 subiecți au fost excluși din studiu. După sacrificare s-a realizat o laparotomie mediană, cu identificarea anastomozelor. După îndepărtarea aderențelor, s-a recoltat un fragment de 1 cm centrat pe anastomoză. Din acesta un segment conținând extremitatea mezenterică (1/3) a fost utilizat pentru dozarea hidroxiprolinei. Dozarea hidroxiprolinei a fost realizată în $\mu\text{g}/\text{mg}$ țesut utilizând kitul Hydroxyproline Assay Kit (Sigma-Aldrich®). Probele au fost centrifugate timp de 5 minute la 1500 rpm. Supernatantul a fost hidrolizat prin adăugarea de acid clorhidric în raport de 1:1 timp de 3 ore. Cantitatea de hidroxiprolină a fost calculată absorbția spectrofotometrică a soluției la 560 nm.

Rezultate: La analiza probelor provenite de la subiecții sacrificați în ziua 7 am observat o creștere statistic semnificativă atât după injectarea perianastomotice, cât și după injectarea intraperitoneală. Administrarea perianastomotice s-a dovedit a avea un efect mai important decât cea intraperitoneală. În ziua 14 postoperator administrarea perianastomotice de CSM a determinat o creștere semnificativă față de lotul de control. Același efect a fost observat după administrarea intraperitoneală, însă inferior primei modalități de administrare. La 30 zile de la administrarea celulelor stem, cantitatea de hidroxiprolină tisulară a fost semnificativ crescută în loturile cu administrare de celule stem în comparație cu lotul martor. Nu am putut identifica nicio diferență semnificativă între metodele de administrare.

Concluzii: Administrarea perianastomotice a CSM produce o creștere semnificativă a conținutului tisular de hidroxiprolină. Acest efect scade însă începând cu ziua 14. Administrarea intraperitoneală a CSM produce de asemenea o creștere importantă a conținutului tisular de hidroxiprolină, efect inferior însă administrării perianastomotice.

Studiul 5. Influența pe termen lung a administrării perianastomotice și intraperitoneale de celule stem mezenchimale asupra anastomozelor colonice din punct de vedere al parametrilor clinici, histo-patologici și al conținutului de hidroxiprolină

Obiectivul studiului a fost să stabilim dacă există diferențe semnificative între lotul martor comparativ cu loturile la care s-au transplatat CSM (fie perianastomotice, fie intraperitoneale) din punct de vedere al parametrilor clinici, histo-patologici și al conținutului de hidroxiprolină la 6 luni postoperator.

Material și metodă: Am alcătuit 3 loturi de studiu (martor, administrare perianastomotice de celule stem și administrare intraperitoneală), fiecare cu câte 10 subiecți. La 6 luni

postoperator subiecții au fost sacrificați prin dislocare cervicală conform normelor. Pentru fiecare subiect au fost urmăriți parametrii clinici, histo-patologici și conținutul tisular de hidroxiprolină.

Rezultate: Din punct de vedere clinic nu s-au înregistrat diferențe semnificative din punct de vedere statistic. Administrarea celulelor stem perianastomotice a determinat scăderea semnificativă a necrozei; acest efect nu a putut fi demonstrat și pentru administrarea intraperitoneală. Ambele metode de administrare au determinat o epitelizare mai bună comparativ cu lotul martor, dar și reducerea semnificativă a procesului inflamator și creșterea depozitelor de colagen. La 6 luni postoperator administrarea perianastomotice de celule stem a determinat o creștere semnificativă față de lotul de control a conținutului tisular de hidroxiprolină. Același efect a fost observat după administrarea intraperitoneală, însă inferior primei modalități de administrare.

Concluzii: Administrarea perianastomotice și intraperitoneală de CSM reprezintă metode sigure de îmbunătățire a calității vindecării anastomozelor colonice. La 6 luni postoperator, transplantarea CSM determină menținerea unei reacții inflamatorii și necroză scăzute, depozite de colagen și epitelizare crescute. Administrarea de CSM determină o creștere a nivelului de hidroxiprolină de la nivelul anastomozelor la 6 luni postoperator.

Studiul 6. Efectele administrării perianastomotice și intraperitoneale de celule stem mezenchimale asupra sindromului aderențial după anastomozes colonice

Obiectivul studiului desfășurat a fost să stabilim dacă există diferențe semnificative între lotul martor comparativ cu loturile la care s-au transplatat celule stem mezenchimale (fie perianastomotice, fie intraperitoneale) din punct de vedere al sindromului aderențial la 7, 14, 30 zile, respectiv 6 luni postoperator.

Material și metodă: Am alcătuit 12 loturi de studiu în funcție de modul de administrare al celulelor stem și momentul sacrificării. La 7, 14, 30, respectiv 6 luni postoperator subiecții au fost sacrificați prin dislocare cervicală conform normelor. S-a practicat o laparotomie mediană, cu identificarea anastomozelor colonice realizate. Sindromul aderențial din jurul anastomozelor a fost notat de către un evaluator independent, care nu cunoștea apartenența subiecților la loturi, conform unui scor de severitate după cum urmează: 0-absent, 1-aderențe laxe implicând omentul, 2-aderențe implicând ansele intestinului subțire, 3-sindrom aderențial extins.

Rezultate: La 7 zile postoperator formarea sindromului aderențial a fost limitată. Totuși am putut constata diferențe statistice semnificative între loturi. Ambele metode de administrare au scăzut semnificativ formarea aderențelor tisulare în comparație cu lotul martor, fără a exista diferențe semnificative între cele 2 metode. La evaluarea sindromului aderențial la 14 zile postoperator, în lotul de control s-a identificat un sindrom aderențial extins cu interesarea anselor de intestine subțire, a omentului și a colonului. Analiza statistică a identificat diferențe statistice semnificative între lotul de control și cel cu administrare intraperitoneală. Administrarea perianastomotice și intraperitoneală de celule stem a

determinat diferențe semnificative în formarea aderențelor la 30 zile postoperator comparativ cu lotul martor, fără a se decela diferențe statistice între cele 2 metode de administrare. La 6 luni postoperator cea mai eficientă metodă de administrare în limitarea formării aderențelor tisulare a fost cea intraperitoneală.

Concluzii: Administrarea intraperitoneală constituie o metodă eficientă de limitare a formării aderențelor tisulare. Aceleași efecte, inferioare însă administrării intraperitoneale, s-au observat în cazul administrării perianastomotice.

ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI

Cercetarea de față se încadrează în noile direcții de terapie celulară și medicină regenerativă, fiind concentrată pe o temă de actualitate: evaluarea efectului transplantării celulelor stem prelevate din țesutul adipos asupra vindecării anastomozelor colonice în toate cele 3 etape din punct de vedere clinic, al parametrilor histo-patologici și al conținutului de hidroxiprolină. Studiul efectelor celulelor stem asupra sindromului aderențial aduce un plus de complexitate lucrării de față. Reprezintă o primă încercare de evaluare a efectului în toate cele 3 etape ale vindecării și singura lucrare care evaluează rolul administrării intraperitoneale.

Modelul experimental imaginat este unul ieftin, facil și reproductibil, putând fi modificat pentru evaluarea efectului celulelor stem în condiții de ischemie, imunosupresie sau hipoproteinemie.

Consider că obiectivele propuse au fost atinse și că prin această lucrare am reușit să ofer un suport teoretic și de evidență privind utilizarea terapiei celulare cu celule stem în chirurgia digestivă, răspunzând cerințelor de reproductibilitate, standardizare și siguranță impuse de ISCT. În perspectivă, bioingineria poate contribui la limitarea complicațiilor după anastomoze digestive prin dezvoltarea unor nișe de celule stem la care diferențierea este controlată sau construirea unor scaffold-uri impregnate cu celule stem care se pot integra la nivelul tractului digestiv.

PHD THESIS. ABSTRACT

Prognostic factors and reduction methods for the incidence of anastomotic leaks

PhD student: **Alexandra Caziuc**

PhD Scientific Coordinator: **Prof. Dr. Ion Aurel Mironiuc**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CONTENTS

INTRODUCTION	1
PRESENT STATUS OF KNOWLEDGE	3
1. General considerations	5
1.1. The practical importance and the incidence of anastomotic leaks	5
1.2. Definition. Classification	6
2. Digestive anastomoses healing	9
2.1. Stages of digestive anastomoses healing	9
2.1.1. Inflammatory stage	9
2.1.2. Proliferative stage	10
2.1.3. Maturation stage	10
2.2. The role of stem cells in the healing of digestive sutures	10
2.3. Quantification methods of healing	11
2.3.1. Mechanical parameters of healing	11
2.3.1.1. Breaking strength	11
2.3.1.2. Explosion pressure	12
2.3.2. Biochemical parameters of healing	12
2.3.2.1. Hidroxyproline content	12
2.3.2.2. Quality of collagen	12
2.3.3. Histological parameters of healing	13
2.3.4. Modern methods for the evaluation of healing	13
3. Risk factors in the development of anastomotic leaks	15
3.1. Risk factors generated by the surgeon	15
3.1.1. Vascularization of anastomotic ends	15
3.1.2. Tension at the level of anastomosis	17
3.1.3. Technical details	17
3.1.4. Blood loss	18
3.1.5. Amount of infusional received	19
3.1.6. Duration of the surgical intervention	19
3.2. Risk factors generated by the patient	19
3.2.1. Advanced age	20
3.2.2. Male sex	21
3.2.3. Consumption of toxics	21
3.2.4. Comorbidities	21
3.2.5. Altered biochemical parameters	21
3.2.6. Deficient nutritional status	22
3.2.7. Chronic consumption of glucocorticoids	22
3.2.8. Chronic consumption of non-steroidal anti-inflammatories	22
3.2.9. Neoadjuvant therapy	23
3.3. Risk factors generated by the basic illness	23
3.3.1. Inflammatory bowel diseases	23
3.3.2. Malignancy	23
3.3.3. Interventions carried out in emergency regime	24
3.3.4. Trauma	24
4. Methods for reducing the incidence of anastomotic leaks	25
4.1. Interventions on the local conditions of anastomoses	25
4.2. Interventions on the systemic conditions of anastomoses	26
4.3. Multipotent stem cells	27
4.3.1. Sources of MSC	27
4.3.2. Results	27
4.3.3. Ethics of transplantation	28
ORIGINAL STUDY	29
1. Introduction	31
2. Objectives	33
3. General methodology	35
3.1. Experimental animals	35
3.2. Procurement of mesenchymal stem cells	35
3.3. Surgical intervention	37
3.4. Statistical analysis	40

4. Study no. 1 - Research of MSC quality used in the study	41
4.1. Introduction	41
4.2. Hypothesis	41
4.3. Material and method	41
4.3.1. Harvesting of MSC	41
4.3.2. Immunophenotyping characterization	41
4.3.3. Evaluation of clonal capacity	42
4.3.4. Migration ability	42
4.3.5. Multipotent character testing	42
4.3.5.1. Differentiation capacity on osteogenic line	42
4.3.5.2. Differentiation capacity on chondrogenic line	42
4.3.5.3. Differentiation capacity on adipogenic line	43
4.4. Results	43
4.4.1. Immunophenotyping characterization	43
4.4.2. Evaluation of clonal capacity	44
4.4.3. Migration ability	44
4.4.4. Multipotent character testing	45
4.4.4.1. Differentiation capacity on osteogenic line	45
4.4.4.2. Differentiation capacity on chondrogenic line	46
4.4.4.3. Differentiation capacity on adipogenic line	46
4.5. Discussion	47
4.6. Conclusions	48
5. Study no. 2- Influence of perianastomotic and intraperitoneal administration of MSC on colonic anastomoses at various periods of time: clinical parameters	49
5.1. Introduction	49
5.2. Hypothesis	49
5.3. Material and method	49
5.4. Results	50
5.5. Discussion	52
5.6. Conclusions	53
6. Study no. 3- Influence of perianastomotic and intraperitoneal administration of MSC on colonic anastomoses at various periods of time: histopathological parameters	55
6.1. Introduction	55
6.2. Hypothesis	55
6.3. Material and method	55
6.4. Results	57
6.4.1. Results at 7 days postoperatively	57
6.4.1.1. Necrosis	59
6.4.1.2. Epithelisation	59
6.4.1.3. Inflammation	60
6.4.1.4. Collagen deposits	60
6.4.2. Results at 14 days postoperatively	61
6.4.2.1. Necrosis	63
6.4.2.2. Epithelisation	63
6.4.2.3. Inflammation	63
6.4.2.4. Collagen deposits	64
6.4.3. Results at 30 days postoperatively	64
6.4.3.1. Necrosis	65

6.4.3.2. Epithelisation	65
6.4.3.3. Inflammation	66
6.4.3.4. Collagen deposits	66
6.4.4. Results in evolution	67
6.4.4.1. Necrosis	67
6.4.4.2. Epithelisation	67
6.4.4.3. Inflammation	68
6.4.4.4. Collagen deposits	68
6.5. Discussion	69
6.6. Conclusions	70
7. Study no. 4– Influence of perianastomotic and intraperitoneal administration of MSC on colonic anastomoses at various periods of time: hydroxyproline content	71
7.1. Introduction	71
7.2. Hypothesis	71
7.3. Material and method	71
7.4. Results	72
7.5. Discussion	74
7.6. Conclusions	74
8. Study no. 5– Influence in the long run of perianastomotic and intraperitoneal administration of MSC over colon anastomoses from the point of view of clinical, histopathological parameters and hydroxyproline content	75
8.1. Introduction	75
8.2. Hypothesis	75
8.3. Material and method	75
8.4. Results	76
8.4.1. Clinical parameters	76
8.4.2. Histopathological parameters	77
8.4.2.1. Necrosis	78
8.4.2.2. Epithelisation	78
8.4.2.3. Inflammation	79
8.4.2.4. Collagen deposits	79
8.4.3. Hydroxyproline content	79
8.5. Discussion	80
8.6. Conclusions	80
9. Study no. 6– The effects of perianastomotic and intraperitoneal administration of MSC on the adherential syndrome after colonic anastomoses	81
9.1. Introduction	81
9.2. Hypothesis	81
9.3. Material and method	81
9.4. Results	82
9.4.1. Results at 7 days postoperatively	82
9.4.2. Results at 14 days postoperatively	83
9.4.3. Results at 30 days postoperatively	83
9.4.4. Results at 6 months postoperatively	84
9.5. Discussion	84
9.6. Conclusions	85

10. Final conclusions (summary)	87
11. Originality of research and innovative contributions	89
REFERENCES	91
APPENDICES	105

KEYWORDS: digestive sutures, colo-colic anastomoses, anastomotic leaks, Wistar rats, Mesenchymal stem cells (MSC), collagen deposits, hydroxyproline

INTRODUCTION

Anastomotic complications, in generally, and anastomotic leaks, in particularly, occupy a central place in colonic surgery. In the scientific world there are concerns related to decreasing their incidence. The present thesis aims to evaluate the role of mesenchymal stem cells in the healing of digestive sutures.

The thesis is structured in two distinct sections: *present status of knowledge* – the progress made in the description of the healing process of digestive sutures, the factors involved in altering this process, quantification methods of healing and methods imagined so far for enhancing the healing, and *original study*– that includes experimental studies carried out for verification of the hypothesis in which administration of mesenchymal stem cells in vivo (either perianastomotic, either intraperitoneal) foster the healing process.

The present research was carried out through funding provided by the grant POSDRU no. 159/1.5/S/138776. The complexity of the study required the cooperation with specialists in the field of regenerative medicine and pathology.

PRESENT STATUS OF KNOWLEDGE

Anastomotic leaks represent an important complication of digestive surgery. They significantly increase the duration of hospitalization, costs and reinterventions, generating a high risk for the development of nosocomial infections. Leaks alter significantly the prognosis and increase the mortality rate. In the long run, complications arising from problems related to anastomoses create social reintegration problems for the patients, and chronic pain with psychological implications or psychiatric.

Healing process of digestive anastomoses can be synthesized in 3 phases, which are under the control of several types of cells, chemokines and hormones that repair the injured area and provide support for the integrity of the tissue: inflammatory, proliferative and maturation of collagen stage. It has been shown that all elements involved in the healing process are under the control of stem cells found normally in tissues or in the form of pericytes, either at the level of the vaults.

One of the most reliable indicators of healing is the presence of collagen at the level of anastomosis, which can be histopathological identified by special stains (Trichrome-Masson), whether through determination of tissular hydroxyproline content.

There are two categories of factors involved in the failure of healing: *local factors* – which refers to the technique of anastomosis, or the local characteristics of basic disease and *general factors* – consisting of systemic abnormalities with effect on sutures.

Knowing the potential risk factors and the stages of digestive sutures healing led to drafting of several methods for reducing the incidence of anastomotic complications, but no method provided effectiveness so far.

New directions in the study of the reduction of frequency of anastomotic leaks are turning to the use of stem cells in the realization of anastomoses. The basis of these studies is their ability to differentiation and renewal. Challenges of mesenchymal stem cells transplantation are related to sampling source, adequate number of cells, control of cell differentiation/purity, quality, and proper storage of solutions and method of administration.

ORIGINAL STUDY

All experiments were carried out in accordance with current legislation regarding animal rights, and the Ethics Commission approval (363/21.10.2014).

The present paper has proposed an analysis of the effects of mesenchymal stem cells harvested from the inguinal adipose tissue upon colo-colic anastomoses healing made on an experimental model using Wistar rats aged 10 weeks. The study includes both an in vitro and an in vivo experimental part.

Procurement, processing and analysis of mesenchymal stem cells was conducted at the University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca, Department of Obstetrics and Gynecology, Reproductive Veterinary (Dr. Pall Eموke). Surgical interventions were carried out at Experimental Research Center (Biobase) of the University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca. For the in vivo study we performed a colo-colic termino-terminal anastomosis at 5 cm from the ileocecal valve, on 3 groups of subjects: A – without additional treatment, B – perianastomotic transplantation and C – intraperitoneal transplantation.

Statistical analysis was descriptive and inferential. The recorded data were processed with R-Commander (version R 3.2.1., rcdmr.package). The tests used were T-Student Assuming Unequal Variances and test Z for means. Significance level chosen in the case of all bilateral tests was 0.05.

Study no. 1. Research of mesenchymal stem cell quality used in the study

The objective of the study was to determine whether the cells harvested from adipose tissue comply with the characteristics laid down by International Society for Cellular Therapy (ISCT): to be plastic-adhering in the crops standard, more than 95 % to cast on the surface CD105, CD73, CD90, less than 2% to be positive for CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19, HLA class II, possession of the capacity for osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation.

Material and method: Inguinal adipose tissue has been used, enzymatic and centrifugal processed until a cell suspension. Stem cells were obtained after passage on several specific cultures. Immunophenotyping characterization of the cells was done by tagging them with

monoclonal antibodies anti CD34/45, anti CD44 and anti CD105. We followed the ability to form colonies, the ability to migrate and multipotent differentiation character.

Results: Immunophenotypic analysis of isolated cells revealed positivity for mesenchymal markers CD105, CD 44 and negativity for CD34, CD 45 and HLA-DR. Analysis of the results identified a percentage of 61 ± 3.21 (SE) colonies/100 cm². The ability of migration was averaging $0.613 \text{mm}^2 \pm 0.02$ (SE). Our study also confirmed the ability of differentiation on adipogenic, chondrogenic and osteogenic line.

Conclusions: Mesenchymal stem cells harvested from inguinal adipose tissue level represent an adequate supply, respecting the criteria imposed by ISCT.

Study no. 2. Influence of perianastomotic and intraperitoneal administration of MSC on colonic anastomoses at various periods of time: clinical parameters

The objective of the study was to determine whether there are significant differences between the control group compared to the lots with MSC transplantation (either perianastomotic, either intraperitoneal) from the point of view of clinical parameters by following the patients for 7, 14, respectively 30 days postoperatively.

Material and method: We used 3 groups in our study (the control group, with perianastomotic stem cells transplantation and intraperitoneal administration), each with 30 subjects. The subjects were followed daily in terms of general condition, resumption and maintaining of bowel habits and appearance of postoperative wound. On days 7, 14 and 30 10 subjects from each group were excluded from the study. For each subject we calculated the difference between the weight at day 0 and the weight at the exclusion from the study (ΔG).

Results: Postoperative evolution was favorable for all patients included in the study. Postoperative mortality was 0%, without any major complications. There have been suppurations of the plague in all groups, without significant differences from the statistical point of view. All groups registered an increase in weight in relation to the day of the intervention, without significant differences. Resumption of bowel happened in average on day 1 after surgery.

Conclusions: MSC transplantation does not bring significant benefits on colonic anastomoses healing regarding clinical parameters. There is a tendency of decrease in septic type complications after transplantation of MSC. Administration of MSC proved to be a safe method, without making any additional complications in the healing of colonic anastomoses.

Study no. 3. – Influence of perianastomotic and intraperitoneal administration of MSC on colonic anastomoses at various periods of time: histopathological parameters

The objective of the study was to determine whether there are significant differences between the control group compared to the lots with MSC transplantation (either perianastomotic, either intraperitoneal) from the point of view of histopathological

parameters by following the patients for 7, 14, respectively 30 days postoperatively.

Material and method: We used 3 groups in our study (the control group, with perianastomotic stem cells transplantation and intraperitoneal administration), each with 10 subjects. Histopathological analysis was conducted at the University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Department of Pathology, Cluj-Napoca (Dr. Nagy Andras-Laszlo). We did a macroscopic exploration of the peritoneal cavity, registering the presence of anastomotic leaks, stenoses or intraperitoneal abscesses. After removing adhesions, we collected a fragment of 1 cm centered on anastomosis. The segment containing the anti-mesenteric end (2/3) was sent for histopathological analysis. A single scientist analysed the slices, who didn't knew the appurtenance of the subjects. We made a notation on a scale from 0 to 3 (0= absent, 1= low, 2= moderate, 3= increased) of collagen deposits, necrosis, epithelialization and inflammation.

Results: All anastomoses healed without stenosis or leaks. The presence of necrosis was limited in all groups, without being able to identify statistically significant differences. Also we didn't observed significant differences in terms of epithelialization. We noticed a significant decline in inflammatory process after administration of perianastomotic stem cells during all periods of analysis ($p < 0.05$). Intraperitoneal transplantation also led to a drop in the inflammatory process, significant in relation to the control group. Microscopic analysis revealed the presence of collagen deposits in all 3 groups. We observed a significant increase in relation to the control group after perianastomotic transplantation during all 3 stages.

Conclusions: MSC transplantation does not affect the quality of the epithelialization and the presence of necrosis at the level of colonic anastomoses. Both perianastomotic and intraperitoneal administration produce a decrease in inflammatory reaction at 7, 14, and 30 days postoperatively. Perianastomotic administration of the MSC significantly increases the number of collagen deposits in colonic anastomoses at 7, 14, respectively 30 days postoperatively. This effect, although important in intraperitoneal administration, is inferior to perianastomotic administration. Administration of MSC proved to be a safe method, without any additional complications in the healing of colon anastomoses.

Study no. 4. Influence of perianastomotic and intraperitoneal administration of MSC on colonic anastomoses at various periods of time: hydroxyproline content

The objective of the study was to determine whether there are significant differences between the control group compared to the lots with MSC transplantation (either perianastomotic, either intraperitoneal) from the point of view of hydroxyproline content by following the patients for 7, 14, respectively 30 days postoperatively.

Material and method: We used 3 groups in our study (the control group, with perianastomotic stem cells transplantation and intraperitoneal administration), each with 10 subjects. After removing adhesions, we collected a fragment of 1 cm centered on anastomosis. The segment containing the mesenteric end (1/3) was used for the determination of hydroxyproline content. For the determination of hydroxyproline content we used the Hydroxyproline Assay Kit (Sigma-Aldrich®). The samples were centrifuged for 5

minutes at 1500 rpm. The supernatant was hydrolyzed by the addition of hydrochloric acid in relation to the 1:1 for about 3 hours. The amount of hydroxyproline content was calculated by spectrophotometric absorption of the solution at 560 nm.

Results: The analysis of samples obtained from subjects killed on day 7 showed a statistically significant increase in hydroxyproline for both methods of transplantation. Perianastomotic administration has been shown to have a more significant effect than the intraperitoneal transplantation. Both in day 14 and 30, the amount of hydroxyproline content was significantly increased in the groups with stem cells administration in comparison with control group. We could not identify any significant difference between the methods of administration.

Conclusions: Perianastomotic administration of MSC produces a significant increase of hydroxyproline tissue content. This effect decreases however in day 14. Intraperitoneal MSC transplantation produces a significant increase in tissue content of hydroxyproline, but inferior to the perianastomotic administration.

Study no. 5. Influence in the long run of perianastomotic and intraperitoneal administration of MSC over colon anastomoses from the point of view of clinical, histopathological parameters and hydroxyproline content

The objective of the study was to determine whether there are significant differences between the control group compared to the lots with MSC transplantation (either perianastomotic, either intraperitoneal) from the point of view of clinical, histopathological parameters and hydroxyproline content at 6 months postoperatively.

Material and method: We used 3 groups in our study (the control group, with perianastomotic stem cells transplantation and intraperitoneal administration), each with 10 subjects. At 6 months the subjects were sacrificed by cervical dislocation. For each subject we analysed clinical and histopathological parameters, and hydroxyproline content.

Results: Regarding the clinical parameters we did not record significant differences. Perianastomotic administration of stem cells caused significant decrease of necrosis; this effect could not be demonstrated after intraperitoneal transplantation. Both methods of administration have prompted a faster epithelial regeneration, better compared to the control group, a significant reduction of the inflammatory reaction, and increased collagen deposits. Perianastomotic administration of stem cells caused a significant increase of the hydroxyproline tissue content. The same effect was observed after intraperitoneal administration, but inferior to the first method of administration.

Conclusions: Intraperitoneal and perianastomotic administration of MSC represents safe ways of improving the quality of healing in colonic anastomoses. At 6 months after surgery, MSC transplantation determines the decrease in inflammatory reaction and low level of necrosis, increased collagen deposits, and faster epithelial regeneration. MSC transplantation determined an increased level of hydroxyproline in the anastomosis at 6 months postoperatively.

Study no. 6. The effects of perianastomotic and intraperitoneal administration of MSC on the adherential syndrome after colonic anastomoses

The objective of the study was to determine whether there are significant differences between the control group compared to the lots with MSC transplantation (either perianastomotic, either intraperitoneal) from the point of view of adherential syndrome by following the patients for 7, 14, 30 days and 6 months postoperatively.

Material and method: We used 3 groups in our study (the control group, with perianastomotic stem cells transplantation and intraperitoneal administration), each with 10 subjects. At 7, 14, 30 days, and 6 months postoperatively the subjects were sacrificed by cervical dislocation. We performed a median laparotomy, with identification of colonic anastomosis. Adherential syndrome around was noted by an independent assessor, who he did not know the appurtenance of the subjects, according to a score of severity as follows: 0- absent, 1- lax adhesions involving omentum, 2- adhesions involving bowel loops, 3- extended adherential syndrome.

Results: At 7 days postoperatively the formation of the adherential syndrome was confined. However we couldn't find any significant statistical differences between the groups. Both methods of administration decreased significantly the formation of adhesional tissue in comparison with the control group, without any significant differences between the two methods. The evaluation of adherential syndrome 14 days after surgery demonstrated in the control group was an extensive adherential syndrome involving bowel loops, omentum and colon. Statistical analysis identified important differences between the control group and the intraperitoneal administration. Perianastomotic and intraperitoneal administration of stem cells has led to significant differences in the formation of adhesions at 30 days postoperatively in comparison with control group, without significant statistical differences between the two methods of administration. At 6 months after surgery, the most effective method of administration in limiting adhesion tissue formation was intraperitoneal transplantation.

Conclusions: Intraperitoneal administration constitutes an effective method of limiting the formation of tissue adhesions. The same effects, but inferior to the intraperitoneal administration, were observed after perianastomotic transplantation.

ORIGINALITY OF RESEARCH AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS

The present research fits the new directions of cell therapy and regenerative medicine, centered on evaluation of the MSC transplantation effect upon healing of colonic anastomoses in all three phases, in terms of clinical, histopathological parameters and hydroxyproline content. Study on the effects of stem cells over adherential syndrome added complexity to the work. This study represents a first attempt of evaluation of MSC effect in all three stages of healing and the only paper which evaluates the role of intraperitoneal administration.

The experimental model is cheap and reproducible, and it can be modified to assess the effect of stem cells under conditions of immunosuppression, ischemia or hypoproteinemia. I believe that the objectives have been achieved and that through this work I have been able to offer a theoretical support and records regarding the use of cellular therapy with stem cells in digestive surgery, responding to the requirements of safety, standardization and reproducibility noted by ISCT. In perspective, bioengineering may help in limiting complications after digestive anastomoses by developing stem cell niches at which differentiation is controlled or building scaffolds impregnated with stem cells that can integrate in the digestive tract.