
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Metode noi de stimulare a vindecării plăgilor, cu aplicații posibile în sfera ORL

Doctorand **Raluca Laura Sobec**

Conducător de doctorat **Prof. Dr. Dr. H. C. Marcel Cosgarea**

CLUJ-NAPOCA 2016



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	17
1. FIZIOLOGIA VINDECĂRII PLĂGILOR	19
1.1 FAZA INFLAMATORIE.....	19
1.1.1 Hemostaza.....	19
1.1.2 Răspunsul celular și inflamația	21
1.2 FAZA PROLIFERATIVĂ.....	21
1.2.1 Formarea matricii extracelulare	22
1.2.2 Angiogeneza și formarea țesutului de granulație.....	22
1.2.3 Contractia plăgii.....	22
1.2.4 Reepitelizarea.....	23
1.3 FAZA DE REMODELARE.....	24
2. VINDECAREA PLĂGILOR LA FĂȚ	24
3. ANOMALII DE VINDECARE A PLĂGILOR DIN SFERA ORL	27
3.1 DIFERENȚE ÎNTRE CICATRICEA CHELOIDĂ ȘI CEA HIPERTROFICĂ.....	27
3.1.1 Clinic.....	27
3.1.2 Anatomopatologic.....	27
3.1.3 Imunohistochimic.....	28
3.1.4 Microscopie electronică	28
3.2 VINDECĂRI VICIOASE ÎN SFERA ORL.....	28
4. CICATRICEA CHELOIDĂ A URECHII	28
4.1 EPIDEMIOLOGIE.....	28
4.2 PATOGENEZĂ.....	29
4.3 TABLOU CLINIC.....	29
4.4 OPȚIUNI DE TRATAMENT ALE CHELOIDULUI DE URECHE	29
5. BIOTRANSPORTORI	33
5.1 ACIDUL HIALURONIC.....	33
5.2 COLAGENUL.....	34
6. HORMONI ANABOLIZANȚI	35
6.1 HORMONUL RECOMBINANT DE CREȘTERE	36

6.2 STEROIZI ANABOLIZANȚI.....	38
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ.....	41
1.IPOTEZA DE LUCRU.....	43
2. ADAPTAREA MODELULUI EXPERIMENTAL LA STUDIU.....	45
3.METODOLOGIE COMUNĂ STUDII 1-4.....	51
4. STUDIUL 1. EFECTELE APLICĂRII TOPICE DE RGH, FOLOSIND HA CA BIOTRANSPORTOR.....	61
4.1 INTRODUCERE.....	61
4.2 IPOTEZA DE LUCRU.....	61
4.3 MATERIAL ȘI METODĂ.....	61
4.4 REZULTATE.....	62
4.5 DISCUȚII.....	71
4.6 CONCLUZII.....	74
5. STUDIUL 2. EFECTELE APLICĂRII TOPICE DE OXA, FOLOSIND HA CA BIOTRANSPORTOR.....	75
5.1 INTRODUCERE.....	75
5.2 IPOTEZA DE LUCRU.....	75
5.3 MATERIAL ȘI METODE.....	76
5.4 REZULTATE.....	76
5.5 DISCUȚII.....	86
5.6 CONCLUZII.....	89
6. STUDIUL 3. EFECTELE APLICĂRII TOPICE DE RGH, FOLOSIND COL TIP I CA BIOTRANSPORTOR.....	91
6.1 INTRODUCERE.....	91
6.2 IPOTEZA DE LUCRU.....	91
6.3 MATERIAL ȘI METODE.....	91
6.4 REZULTATE.....	91
6.5 DISCUȚII.....	104
6.6 CONCLUZII.....	106
7. STUDIUL 4. EFECTELE APLICĂRII TOPICE DE OXA, FOLOSIND COL TIP I CA BIOTRANSPORTOR.....	107
7.1 INTRODUCERE.....	107
7.2 IPOTEZA DE LUCRU.....	107

7.3 MATERIAL ȘI METODE.....	107
7.4 REZULTATE	108
7.5 DISCUȚII.....	115
7.6 CONCLUZII	116
8. METODOLOGIE STUDIU 5	117
9. STUDIUL 5. EFECTELE APLICĂRII TOPICE A BIOTRANSPORTORILOR ASUPRA VINDECĂRII PLĂGILOR.....	121
9.1 INTRODUCERE	121
9.2 IPOTEZA DE LUCRU	121
9.3 MATERIAL ȘI METODE	121
9.4 REZULTATE	121
9.5 DISCUȚII	129
9.6 CONCLUZII.....	129
10. CONCLUZII GENERALE.....	131
11. ORIGINALITATE ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI	133
REFERINȚE	135

Cuvinte cheie: vindecarea plăgilor, hormon recombinant de creștere (rGH), oxandrolon (OXA), acid hialuronic (HA), tratament local, arsură grad 2b, cicatrice hipertrofică, cicatrice cheloidă, collagen (COL) tip I, factor de creștere asemănător insulinei – 1 (IGF-1)) inflamație, fibroză, vascularizație

INTRODUCERE

Vindecarea plăgilor este un subiect îndelung analizat în literatura de specialitate. Deși fiziologia vindecării plăgilor nu pare să mai aibă secrete, în practică, tratamentul cicatricilor patologice rămâne în continuare o sarcină dificilă pentru clinician. Cicatricile retractile, hipertrofice și cheloide, sunt adesea întâlnite în sfera ORL. Noi metode de tratament al acestor cicatrici sunt publicate constant, dar nici o metodă individuală nu asigură în totalitate un rezultat ideal, și anume, obținerea unei cicatrici suple care să nu producă deficit funcțional sau estetic. Astfel, se dovedește că o abordare axată pe prevenția acestor cicatrici este mai eficientă decât alternativa concentrată pe tratamentul lor, o dată ce sunt clinic manifeste.

În acest sens, lucrarea de față investighează diferite metode de intervenție terapeutică precoce, încă din stadiul de vindecare al plăgilor, care au ca obiectiv obținerea de cicatrici cât mai suple, fără tendință la hipertrofie.

Una din cele mai dezbătute probleme privind cicatrizarea în sfera ORL este reprezentată de cicatricea cheloidă de la nivel auricular, motiv pentru care întreaga atenție a fost acordată tratamentului plăgilor de la nivelul urechilor.

Tentativa de a aplica local hormoni anabolizanți a pornit de la bine cunoscutele efecte pe care aceștia le au în vindecarea arsurilor în administrare sistemică. Dar orice administrare sistemică este împovărată de anumite efecte adverse mai mult sau mai puțin grave. În speranța că putem reduce sau chiar aboli aceste efecte adverse ale hormonilor anabolizanți pe de o parte și de

a beneficia de efectele benefice asupra vindecării plăgilor, ne-am propus o abordare nouă și anume aplicarea locală, la nivelul plăgilor.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Ipoteza de lucru

Lucrarea de față își propune investigarea unor noi metode de tratament local a plăgilor de la nivelul auricular, care să permită o vindecare mai rapidă cu cicatrici minime. O atenție deosebită s-a acordat celor doi hormoni anabolizanți: rGH, respectiv OXA, a căror efecte favorabile asupra procesului de vindecare a plăgilor sunt bine cunoscute în administrare sistemică. Orice administrare sistemică atrage după sine și efecte adverse, mai mult sau mai puțin grave. Astfel, aplicarea lor locală ar putea reprezenta o variantă de scurtcircuitare a acestor efecte nedorite, stimulând totodată procesul de vindecare a plăgilor.

În vederea creșterii eficacității acestora în aplicare locală, acești hormoni au fost incorporați în biomateriale transportoare precum HA și COL tip 1.

Astfel, obiectivele principale ale lucrării au fost: dezvoltarea unui model experimental de plagă cu tendința la cicatrizare vicioasă, identificarea efectelor aplicării topice de rGH pe plăgi arse grad 2b la nivelul pavilionului auricular la iepure, folosind HA, respectiv COL tip 1 ca biotransportor, identificarea efectelor aplicării topice de OXA pe plăgi arse grad 2b la nivelul pavilionului auricular la iepure, folosind HA, respectiv COL tip 1 ca biotransportor, precum și monitorizarea posibilelor efecte sistemice ale aplicării locale a celor doi hormoni.

Adaptarea modelului experimental la studiu

Ipoteza de lucru. Scopul acestui experiment a fost acela de obține o arsură grad 2b la nivelul feței ventrale a pavilionului auricular la iepure, ca și model de plagă cu tendință la vindecare vicioasă.

Material și metodă. S-au folosit 5 iepuri rasa Noua Zeelandă. Toate manoperele s-au realizat în anestezie generală. La nivelul pavilionului auricular s-au produs plăgi arse folosind un instrument din cupru, cu o greutate de 85 de grame. Instrumentul s-a încălzit, prin imersie în apă la temperatura de fierbere. Temperatura acestuia a fost măsurată cu un termometru cu infraroșu. Instrumentul a fost aplicat perpendicular pe fața ventrală a pavilionului auricular al iepurei și s-a cronometrat timpul de contact. S-au testat temperaturi ale instrumentului pornind de la 43° până la 54° Celsius, cu timp de contact între 3 și 7 secunde. Plăgile obținute au fost pansate. După 3 zile s-au recoltat biopsii din zonele arse pentru examenul histopatologic, în vederea determinării profunzimii arsurii.

Rezultate. Arsura de grad IIb, la nivelul pavilionului auricular a fost obținută în urma unui timp de contact de 6 secunde, cu instrumentul de cupru la temperatura de 50° Celsius. Examinarea histopatologică a evidențiat afectarea arhitecturii normale a tegumentului de la nivelul urechii, cuprinzând în profunzime inclusiv dermul reticular.

Concluzii. Obținerea unei arsuri gradul 2b la nivelul feței ventrale a urechii la iepurele rasa Noua Zeelandă a fost posibilă folosind un instrument de ardere din cupru la o temperatură de 50°C, în urma unui contact cu tegumentul de 6 secunde.

Metodologie comună studii 1-4

Studiile s-au realizat pe iepuri rasa Noua Zeelandă, masculi. Toate manoperele s-au realizat în anestezie generală. S-au recoltat 2 ml sânge venos de la fiecare animal în vederea determinării următorilor parametri: glicemie, bilirubină totală, bilirubină directă, ASAT, ALAT,

proteine totale, albumină. În cazul experimentelor în care a fost aplicat rGH, s-a determinat, în plus IGF-1.

Pe fața ventrală a fiecărei urechi s-a produs câte o **arsură tip 2b**, cu ajutorul instrumentului din cupru. Fiecare iepure prezintă o plagă martor și o plagă de studiu. La toți iepurii, **urechea stângă** a fost considerată **control**, iar **urechea dreaptă- studiu**. Pe urechea stângă, de control, s-a aplicat un gel conținând doar biomaterialul (HA sau COL1, în funcție de experiment), iar pe urechea dreaptă un gel conținând biomaterialul (același ca pentru urechea stângă) și un hormon anabolizant (rGH sau OXA, în funcție de experiment). Peste s-a aplicat pansamentul semi-ocluziv.

Pansamentul s-a schimbat tot a doua zi, în anestezie generală, timp de 2 săptămâni. La finalul celor două săptămâni, noi probe de sânge venos s-au recoltat de la fiecare animal de experiență. În săptămâna a zecea s-au recoltat biopsii excizionale de la nivelul cicatricilor pentru examen histopatologic și imunohistochimic.

Astfel s-a evaluat semicantitativ răspunsul inflamator, depunerea de colagen, celularitatea fibroblastică și vascularizația. S-au realizat măsuratori ale epidermului și dermului. S-a realizat examenul imunohistochimic, utilizând anticorpi anti-alfa-actină musculară neteda, anti-colagen I și anti-colagen III .

Studiul 1. Efectele aplicării topice de rGH, folosind HA ca biotransportor

Ipoteza de lucru. Într-o încercare de a grăbi vindecarea plăgilor și de a obține cicatrici minime, am produs arsuri gradul 2b la iepuri, la nivelul urechilor și s-au testat efectele aplicării locale de rGH, folosind HA ca biotransportor.

Material și metodă. Pentru acest studiu a fost folosit un grup de 15 iepuri rasa Noua Zeelandă. Două arsuri de gradul 2b au fost produse, câte una pe fața ventrală a fiecărei urechi. Pe urechea stângă a fiecărui iepure, considerată martor, s-a aplicat gelul de HA, iar pe urechea dreaptă, considerată studiu, s-a aplicat gelul alcătuit din HA și rGH. Concentrația principiului activ a fost astfel stabilită, încât, după aplicare doza de rGH să fie de 0,50 mg/m².

Rezultate. Valorile glicemiei, IGF-1 nu au variat semnificativ după administrarea de rGH locală. S-au înregistrat diferențe semnificative între cele două părți anatomice (urechea dreaptă față de urechea stângă) în ceea ce privește celularitatea fibroblastică, depunerea de colagen ($p(0,03)<0,05$) și vascularizația ($p(0,01)<0,05$), dar și inflamația ($p(0,01)<0,05$). S-au înregistrat diferențe semnificative în ceea ce privește grosimea dermului între partea de studiu (dreaptă) și partea de control (stângă).

Cuantificarea semicantitativă a expresiei α -SMA, a relevat o expresie mai intensă pe partea de studiu unde s-a aplicat topic rGH. Pe ambele părți anatomice, intensitatea expresiei colagenului tip III a fost mai mare în dermul papilar, în timp ce expresia colagenului tip I a fost mai mare în dermul reticular. În ceea ce privește distribuția fibrelor de colagen, nu s-au sesizat diferențe importante între cele două părți anatomice.

Concluzii. rGH aplicat pe plăgi arse la nivelul pavilionului auricular, a avut efecte benefice asupra procesului de vindecare. Vindecarea a fost mai completă pe partea de studiu unde s-a aplicat combinația de rGH și HA.

Studiul 2. Efectele aplicării topice de OXA, folosind HA ca biotransportor

Ipoteza de lucru. Într-o încercare de a preveni formarea de cicatrici hipetrofice, efectele aplicării locale ale OXA, folosind HA ca biotransportor au fost testate. Ca ipoteză de studiu am considerat că OXA poate influența inflamația, colagenul, depunerea de fibroblaști,

neovascularizația, expresia α -SMA, așa că l-am testat pe arsuri gradul 2b (profund) realizate pe urechi la iepuri.

Material și metode. S-a folosit un lot alcătuit din 10 iepuri. Pe urechea dreaptă a fiecărui iepure (studiu) s-a aplicat un gel de HA și OXA, iar pe urechea stângă (control), numai gelul de HA. Concentrația de OXA a fost astfel stabilită, încât, după aplicarea gelului, acesta să fie de $2,4\text{mg}/\text{m}^2$.

Rezultate. Patrusprezece plăgi au fost studiate: șapte aparținând grupului de control și șapte grupului de studiu. 6 cicatrici de pe partea de control au prezentat aspect hipertrofic și o cicatrice de pe partea de studiu. Inflamația, depunerea de colagen și fibroblaști, precum și vascularizația au fost mai intens exprimate pe partea stângă de control, acolo unde și numărul de cicatrici hipertrofice din punct de vedere clinic a fost mai mare. S-a constatat o grosime mai mare a epidermului și a dermului de pe partea stângă, de control. Orientarea fibrelor de colagen a fost paralelă cu suprafața cutanată pe partea de studiu, spre deosebire de partea de control unde orientarea acestora a fost pe mai multe planuri. Pe partea dreaptă, de studiu, numărul miofibroblaștilor activați a fost mult redus comparativ cu partea contralaterală.

Concluzii. Administrarea topică a OXA folosind HA ca biotransportor a redus apariția cicatricilor hipertrofice. Nu s-au înregistrat efecte adverse sistemice.

Studiul 3. Efectele aplicării topice de rGH, folosind COL tip I ca biotransportor

Ipoteza de lucru. În acest studiu, într-o încercare de a grăbi vindecarea plăgilor și de a obține cicatrici minime, am produs arsuri gradul 2b la iepuri, la nivelul urechilor și s-au testat efectele aplicării locale de rGH, folosind colagenul tip 1 ca biomaterial transportor.

Material și metode. Au fost folosiți 15 iepuri rasa Noua Zeelandă. Pe urechea stângă a fiecărui iepure, considerată martor, s-a aplicat gelul de colagen tip 1, iar pe urechea dreaptă, considerată studiu, s-a aplicat gelul alcătuit din colagen tip 1 și rGH.

Rezultate. În majoritatea cazurilor, plăgile au fost uscate (10 pe partea stângă și 12 pe partea dreaptă), acoperite de o crustă/escară. Crustele nu au fost îndepărtate mecanic, s-au autodelimitat. Nu au rezultat modificări ale valorilor glicemiei și IGF-1 după aplicarea topică de rGH. Nu s-au înregistrat diferențe semnificative între urechea dreaptă și cea stângă în ceea ce privește inflamația, fibroza și vascularizația. În secțiunile provenite de pe partea dreaptă numărul miofibroblaștilor activați a fost mai redus față de partea stângă.

Concluzii. Aplicarea locală de gel de rGH și COL tip 1 nu a influențat semnificativ procesul de vindecare a plăgilor, și nu e dus la metabolizarea sistemică a rGH.

Studiul 4. Efectele aplicării topice de OXA, folosind COL tip I ca biotransportor

Ipoteza de lucru. Într-o încercare de a grăbi vindecarea plăgilor și de a obține cicatrici minime, s-au testat efectele aplicării locale de OXA, folosind COL tip 1 ca biomaterial transportor.

Material și metode. Un lot format din 10 iepuri rasa Noua Zeelandă a fost folosit. Pe urechea stângă a fiecărui iepure s-a aplicat gelul de colagen tip 1, iar pe urechea dreaptă gelul alcătuit din colagen tip 1 și OXA.

Rezultate. Nu s-au înregistrat diferențe semnificativ statistice între partea de studiu și cea de control la acest lot în ceea ce privește inflamația, fibroza și vascularizația. Nu s-au înregistrat diferențe semnificative de grosime ale epidermului ($p(0,37)>0,05$), respectiv ale dermului ($p(0,21)>0,05$) între grupul de control și cel de studiu. Rezultatele privind natura și orientarea fibrelor de colagen au fost identice între partea de studiu și cea de control.

Concluzii. Aplicarea topică a OXA, folosind COL tip 1 ca biomaterial transportor nu a influențat procesul de vindecare a plăgilor.

Studiul 5. Efectele aplicării topice a biotransportorilor asupra vindecării plăgilor

Ipoteza de lucru. Acidul hialuronic, respectiv colagenul tip I, aplicate topic, intervin în procesul de vindecare a plăgilor, influențând aspectul final al cicatricii.

Material și metode. S-au folosit două grupuri a câte 5 iepuri, rasa Noua Zeelandă, câte un grup pentru fiecare biomaterial transportor. Urechea martor a fost pansată cu tulpă vazelinată, iar urechea de studiu cu biomaterialul transportor. Pansamentele s-au schimbat tot a doua zi timp de 2 săptămâni. În săptămâna a zecea s-au recoltat biopsii pentru examen histopatologic și imunohistochimic. Din punct de vedere statistic, analiza datelor nu s-a rezumat la cele două grupuri anterior menționate, ci s-a extins la toate studiile.

Rezultate

Grupul 1- testarea HA. S-a observat un proces inflamator mai redus acolo unde s-a aplicat gelul de HA 1,2% în comparație cu zonele netratate ($p < 0,05$). Depunerea de colagen și celularitate fibroblastică a fost ușor mai bine reprezentată la nivelul biopsiilor recoltate de pe partea de studiu, iar neovascularizația a fost mai redusă comparativ cu zona netratată. La examenul IHC, α -SMA a fost mai intens reprezentată după aplicarea gelului de HA 1,2% în comparație cu partea netratată.

Grupul 2- testarea COL tip1. În cazul COL tip 1 s-a înregistrat o reducere a infiltratului inflamator, cu o intensificare a depunerii de colagen, celularitate fibroblastică și a vascularizației pe parte de studiu unde s-a aplicat gelul de COL tip 1. S-a înregistrat o intensificare a expresiei α -SMA la nivelul zonelor netratate în comparație cu zonele tratate cu gelul de COL tip 1.

Concluzii. În acest studiu a fost evidențiat încă o dată, efectul benefic al utilizării locale de geluri de HA, respectiv COL tip 1, asupra procesului de vindecare a plăgilor.

Lucrarea de față reprezintă un pas înainte în cercetarea privind vindecarea plăgilor atât la nivel național cât și internațional.

Până în prezent nu există alte studii publicate în literatura de specialitate care evalueze efectele aplicării topice de rGH sau OXA folosind HA sau COL tip 1 ca biotransportor asupra procesului de vindecare a plăgilor.

PHD THESIS SUMMARY

New ways to stimulate wound healing, with possible applications in ENT

PhD Student **Raluca Laura Sobec**

PhD Scientific Coordinator **Prof. Dr.Dr.H.C. Marcel Cosgarea**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

SUMMARY

INTRODUCTION.....	15
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE.....	17
1.WOUND HEALING PHYSIOLOGY.....	19
1.1 INFAMMATORY PHASE.....	19
1.1.1 Haemostasis.....	19
1.1.2 Cellular response and inflammation.....	21
1.2 PROLIFERATIVE PHASE.....	21
1.2.1 Extracelullar matrix formation.....	22
1.2.2 Angiogenesis and granulation tissue formation.....	22
1.2.3 Wound contraction.....	22
1.2.4 Reepithelialisation.....	23
1.3 REMODELING PHASE.....	24
2. FETUS WOUND HEALING.....	24
3. ABNORMAL WOUND HEALING IN ENT AREA.....	27
3.1 DIFFERENCES BETWEEN HYPERTROPHIIC AND KELOID SCARS.....	27
3.1.1 Clinical	27
3.1.2 Histopathological.....	27
3.1.3 Immunohistochemical.....	28
3.1.4 Electron microscopy.....	28
3.2 ABNORMAL HEALING IN ENT	28
4. THE KELOID SCAR OF THE EAR.....	28
4.1 EPIDEMIOLOGY.....	28
4.2 PATHOGENESIS.....	29
4.3 CLINICAL ASPECT	29
4.4 TREATMENT OPTIONS.....	29
5. BIOMATERIALS.....	33
5.1 HYALURONIC ACID.....	33
5.2 COLLAGEN.....	34
6. ANABOLIC HORMONES.....	35
6.1 RECOMBINANT GROWTH HORMONE.....	36
6.2 ANABOLIC STEROIDS.....	38
PERSONAL CONTRIBUTION.....	41
1. WORKING HYPOTHESIS.....	43
2. ADJUSTMENT OF THE EXPERIMENTAL MODEL TO THE STUDY	45
3. COMMON METHODOLOGY FOR STUDIES 1 TO 4.....	51
4. STUDY NO 1. THE EFFECTS OF TOPICAL APPLIED RGH, USING HA AS	
BIOMATERIAL.....	61
4.1 INTRODUCTION.....	61
4.2 WORKING HYPOTHESIS.....	61
4.3 MATERIAL AND METHODS.....	61
4.4 RESULTS.....	62
4.5 DISCUSSIONS.....	71
4.6 CONCLUSIONS.....	74

5. STUDY NO 2. THE EFFECTS OF TOPICAL APPLIED OXA, USING HA AS BIOMATERIAL	75
5.1 INTRODUCTION.....	75
5.2 WORKING HYPOTHESIS.....	75
5.3 MATERIAL AND METHODS.....	76
5.4 RESULTS.....	76
5.5 DISCUSSIONS.....	86
5.6 CONCLUSIONS.....	89
6. STUDY NO 3. THE EFFECTS OF TOPICAL APPLIED RGH, USING COL TYPE I AS BIOMATERIAL	91
6.1 INTRODUCTION.....	91
6.2 WORKING HYPOTHESIS.....	91
6.3 MATERIAL AND METHODS.....	91
6.4 RESULTS.....	91
6.5 DISCUSSIONS.....	104
6.6 CONCLUSIONS.....	106
7. STUDY NO 4. THE EFFECTS OF TOPICAL APPLIED OXA, USING COL TYPE I AS BIOMATERIAL	107
7.1 INTRODUCTION.....	107
7.2 WORKING HYPOTHESIS.....	107
7.3 MATERIAL AND METHODS.....	107
7.4 RESULTS.....	108
7.5 DISCUSSIONS.....	115
7.6 CONCLUSIONS.....	116
8. METHODOLOGY FOR STUDY NO 5	117
9. STUDY NO 5. THE EFFECTS OF CARRIERS ON WOUND HEALING	121
9.1 INTRODUCTION.....	121
9.2 WORKING HYPOTHESIS.....	121
9.3 MATERIAL AND METHODS.....	121
9.4 RESULTS.....	121
9.5 DISCUSSIONS	129
9.6 CONCLUSIONS.....	129
10. GENERAL CONCLUSIONS	130
11. ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF THE THESIS	132
REFERENCES	134

Keywords: wound healing, hormone recombinant growth (rGH), oxandrolone (OXA), hyaluronic acid (HA), local treatment, deep dermal burn wound (2b), hypertrophic scar, keloid scar, collagen (COL) type I, insulin-like growth factor - 1 (IGF-1), inflammation, fibrosis, vascularization.

INTRODUCTION

Wound healing is an extensively debated subject in the medical literature. Although the physiology of wound healing seems to have no secrets, in medical practice pathological scars treatment remains a difficult task for the physician. Retractable scars, hypertrophic and keloid are often encountered in ENT. New methods of treatment are constantly published, but no single method does not fully an ideal result,, namely, obtaining fine scars, with no functional or aesthetic deficit. Thus, it appears that an approach based on the prevention of these scars is more effective than focusing on their treatment alternative, once they are clinically present.

The present research is focused on investigation of different early therapeutic methods, starting with the early stage of wound healing, aiming to obtain fine scars without tendency to hypertrophy.

One of the most debated scarring issues in ENT is the ear keloid, which is why the whole attention was paid to the treatment of ear wounds.

The attempt to apply locally anabolic hormones has it's origins from the well-known effects that they have in healing burns, when administered systemically. But any systemic administration of a drug is burdened with certain side effects less or more serious. In an attempt to reduce or even abolish these side effects and to use the beneficial effects on the wound healing, a new approach is proposed – topical use of these hormones on the wounds.

PERSONAL CONTRIBUTIONS

This paper aims to investigate new methods of local treatment of ear wounds, enabling faster healing with minimal scarring. Particular attention was given two anabolic hormones: rGH respectively OXA. Their favorable effects on wound healing are well known in systemic administration. But any systemic administration is followed by more or less serious side effects. Thus, their topical application could be a good way to bypass the undesirable effects while stimulating wound healing process.

In order to increase their effectiveness in topical administration, these hormones were incorporated into biomaterials such as HA and COL type I.

Thus, the main objectives of this work were: to develop an experimental model of wound with tendency to vicious scarring, identifying the effects of topical application of rGH on deep dermal burn wounds on ears in rabbits using HA, respectively COL type 1 as biomaterial, identification of topical effects of OXA in deep dermal burn wounds on rabbit's ear using HA, respectively COL type 1 as carrier biomaterial, as well as monitoring possible systemic effects of topical application of the two hormones.

Adapting the experimental model to study

Working hypothesis. The purpose of this study was to get a deep dermal (2nd b degree) burn to the ventral surface of the rabbit's ear, as a model of wound healing prone to vicious.

Material and methods. Five New Zealand rabbits were used. All the procedures were performed under general anesthesia. On each ear, burn wounds were inflicted using an 85 grams instrument made of copper. The instrument was heated by immersion in boiling water. Its temperature was measured with an infrared thermometer. The tool was applied perpendicular to the ventral side of the ear and contact time was measured. Temperatures from 43 ° to 54 ° C, with a contact time between 3 and 7 seconds were tested. The wounds were dressed. Three days later

biopsies were harvested histopathological examination in order to determine the depth of the burn.

Results. Deep dermal burns on the ventral sides of the ear were obtained with the instrument heated at 50 ° Celsius and a contact time with the skin of 6 seconds. Histopathological examination revealed damage of the normal skin architecture, including the reticular dermis.

Conclusions. A deep dermal burn on the ventral side of the ear in New Zealand rabbit was possible using a copper instrument heated at 50 ° C, and a contact time with the skin of 6 seconds.

Common methodology for studies 1-4

New Zealand rabbits, males, were used for these studies. All the procedures were performed under general anesthesia. A sample of 2ml venous blood was taken from each animal in order to determine the following parameters: glucose, total bilirubin, direct bilirubin, AST, ALT, total protein, albumin. In those studies where topical rGH was applied, it was determined, in addition IGF-1.

On the ventral side of each ear a deep dermal burn was inflicted, using the copper instrument. Each rabbit had a study wound and a control wound. For all rabbits, left ear was considered control and the right ear -study. On the left ear, considered control, a gel containing only the biomaterial (HA or COL1, depending on the experiment) was applied, while, on the right ear (considered the study side) a gel containing biomaterial (same as for the left ear) and an anabolic hormone (rGH or OXA, depending on the experiment) was used. The wounds were then protected by semi-occlusive dressings. The dressing was changed every other day, under general anesthesia, for 2 weeks. At the end of two weeks, venous blood samples were collected from each animal. In the tenth week, excisional biopsies were harvested for histopathology and immunohistochemistry exams.

It was assessed semiquantitatively the inflammatory response, fibroblast cellularity and collagen deposition, and vascularity. The epidermis and dermis were also measured. The immunohistochemistry exam was performed using anti-alpha smooth muscle actin, and anti-collagen I, anti collagen III antibodies.

Study no. 1. The effects of topical applied rGH, using HA as biomaterial

Working hypothesis. In an attempt to speed the wound healing process and to obtain minimal scarring, deep dermal (2b degree) burns were inflicted on rabbits ears and the effects of topical applied rGH using HA as biomaterial were tested.

Material and methods. For this study a group of 15 New Zealand rabbits was used. Two 2nd b degree burns (deep dermal) were inflicted- one on the ventral side of each ear. On the left ear of each rabbit, considered as control, the HA gel was applied, while, on the right ear, considered as study, a gel containing the rGH and HA was used. The concentration of rGH was established as 0.50 mg / m².

Results. Blood glucose and IGF-1 did not vary significantly after topical administration of rGH. Significant differences were encountered between the two body parts (right ear-left ear) regarding fibroblast cellularity and collagen deposition (p (0.03) <0.05), vascularization (p (0.01) <0.05), and inflammation (p (0.01) <0.05).

There were significant differences regarding the thickness of the dermis between the study (right) and the control (left) sides.

The semiquantitative quantification of α -SMA expression revealed a more intense expression on the study side, where the rGH was applied. On both sides type III collagen expression intensity was higher in the papillary dermis, while type I collagen expression was higher in the reticular dermis. Regarding the distribution of collagen fibers, no significant differences were noticed between the two sides.

Conclusions. rGH applied on burned wounds, had beneficial effects on the healing process. The healing was complete on the study side where the rGH and HA were applied.

Study no. 2. The effects of topical applied OXA, using HA as biomaterial

Working hypothesis. In an attempt to prevent hypertrophic scar, the effects of topical OXA, using HA as biomaterial were tested. As study hypothesis OXA was considered to influence inflammation, collagen deposition, neovascularization, α -SMA expression, so OXA was tested on deep dermal burns.

Material and methods. A group of ten rabbits was used. On the study (right) ear of each rabbit OXA and HA were applied, while on the control (left) ear only the HA gel. The OXA concentration was 2,4mg/m².

Results. Fourteen wounds were studied: seven in the control group and seven in the study group. Six scars on the control side and only one on the study side appeared to be hypertrophic. Inflammations, deposition of collagen and fibroblasts, as well as vascularization were more intense expressed on the control side, where the number of the hypertrophic scars was clinically higher. A greater thickness, of both the epidermis and the dermis, was encountered on the control side.

The collagen fibers were oriented parallel to the skin surface on the study side, and on several levels on the control side.

On the study side, less activated myofibroblasts were encountered.

Conclusions. Topical administration of oxandrolone using hyaluronic acid as biomaterial led to a better healing and prevented hypertrophic scar formation. No systemic side effects were reported.

Study no. 3. The effects of topical applied rGH, using COL type I as biomaterial

Working hypothesis. In an attempt to speed the wound healing process and to obtain minimal scarring, the effects of topical applied rGH using COL type I as biomaterial were tested.

Material and methods. 15 rabbits were used in this study. On the left ear (control), Col type I was applied. On the right ear (study)- rGH with Col type I was tested.

Results. In most of the cases, the wounds were covered by a dry eschar. The eschars were not mechanically removed, they were self-delimiting. Blood glucose and IGF-1 did not vary after topical administration of rGH.

There were no significant differences between right and left ear in terms of inflammation, fibrosis and vascularization. On the right side, the number of myofibroblasts was reduced compared with the other side.

Conclusions. Topically applied rGH and COL Type 1 did not significantly affect the healing process of the wounds and no side effects were encountered.

Study no. 4. The effects of topical applied OXA, using COL type I as biomaterial

Working hypothesis. In an attempt to speed the wound healing process and to obtain fine scars, the effects of topical OXA were tested, using COL type I as biomaterial.

Material and methods. A group of 10 New Zealand rabbits was used. On the left ear of each rabbit collagen type 1 was applied, on the right ear -Col type I and OXA.

Results. There were no statistically significant differences between the study and the control for this group in terms of inflammation, fibrosis and vascularization. No significant differences in the thickness of the epidermis ($p(0.37) > 0,05$) and the dermis ($p(0.21) > 0,05$) between the control group and the study group were reported.

Results concerning the nature and orientation of the collagen fibers were identical between the study and the control.

Conclusions. Topical use of OXA using Col type I as biomaterial did not affect the wound healing process.

Study no. 5. The effects of topical applied biomaterials on wound healing

Working hypothesis. Hyaluronic acid or collagen type I, applied topically, may interfere with the wound healing and to influence the final appearance of the scar.

Material and methods. Two groups of five New Zealand rabbits were used, one group for each biomaterial. The control ear was dressed with Vaseline gauze and the study ear with the biomaterial. The dressings were changed every other day for 2 weeks. On the tenth week, biopsies were harvested for histopathological and immunohistochemical examination. In terms of statistical analysis, the study was not limited to the two aforementioned groups, it was expanded to all studies.

Results. Group no. 1- testing HA. It has been observed a reduced inflammatory process where HA gel 1.2% was applied, compared to the untreated zones ($p < 0,05$). Collagen deposition and fibroblast cellularity was slightly better represented in the biopsies harvested from the study part, and neovascularization was lower compared to the untreated. Regarding the IHC examination, α -SMA was heavily represented after application of HA gel compared to the untreated.

Group no. 2- testing COL type 1. In this case, reduction of the inflammatory process, with increased collagen deposition, fibroblast cellularity and vascularity were seen on the study side, where COL type I was applied. There has been an increase in α -SMA expression in the untreated areas compared with the treated areas with COL type 1 gel.

Conclusions. In this study was highlighted once again the effects of HA, respectively COL type 1, on the wound healing process.

This work represents an important step forward in the national and international research on wound healing.

So far, there are no studies published in the medical literature that evaluate the effects of topical application of rGH or OXA using HA or COL type 1 as biomaterial on the wound healing process.