

616.71-003.9-018.4:616-001.26-092.9

VLIV RTG ZÁŘENÍ NA HOJENÍ KOSTNÍ TKÁNĚ

MUDr. J. UHER, CSc.

Výzkumný ústav traumatologický

(ředitel: doc. MUDr. J. Kroupa, DrSc.)

Na poruchy hojení různých tkání po ozáření upozorňuje řada autorů našich i cizích. Tak např. Beneš [4] popisuje vliv na povrchové kožní rány, Havlín [23] na gastrotomii a Reinhold a Buisman [49] na kapilární endotel.

Rovněž kostní tkáň byla věnována již řada prací a to jak co do vlivu záření na samu kostní tkáň Bureš [8], Howland aj. [26], tak na poruchy jejího růstu Aronson aj. [1] a na poruchy jejího hojení u lidí Green aj. [19], McCrorie [41] a v experimentu Dokuchaeva [9], Hayashi a Suit [24], Hagen [22] a Pausescu E aj. [45].

Vzhledem k řadě nerozřešených otázek okolo časového vztahu uplatnění radiace k rozsahu vyvolaného poškození hojivého procesu jsme i u nás sledovali vliv ozáření na hojení zlomenin žebířů u krysy.

Materiál a metodika

Pokusná zvířata: Byly použity krysy, samci (SPF, Zverex), jejichž hmotnost na počátku pokusu kolísala mezi 180–220 g. Zvířata byla individuálně ustájena. Larsenova peletovaná dieta a voda byly podávány ad libitum. 70. den po ozáření váha kolísala mezi 255–290 g. Utrácení bylo prováděno éterem.

Ozáření: Zvířata byla ozářena jednorázově, celotělově, terapeutickým rtg přístrojem při 200 kV, 10 mA, filtrací 0.5 mm Cu. Při ohniskové vzdálenosti 40 cm byla získána expoziční rychlost 189×10^{-4} C/kg za min. Byla aplikována celková dávka 7,1 Gy.

Zlomenina: V éterové narkóze byla manuálně za sluchové kontroly zlomena žebra v pravé části hrudního koše. Zlomeniny byly ponechány bez fixace s předpokladem vytvoření svalového korzetu v postižených místech a se změnou ventilace.

Pokusné skupiny:

- A — ozáření 7 dní před zlomeninou
- B — ozáření 5 dní před zlomeninou
- C — ozáření se zlomeninou těsně po jeho ukončení

- D — ozáření provedeno 7. den po zlomení
- K — prostá zlomenina — kontrola.

Doba hojení — byla počítána od provedení zlomeniny a zvířata ve skupinách byla utrácena 2., 4., 6., 9., 12., 18., 21., 25., 30., 40., 50., a 70. den. U kontroly bylo sledování ukončeno již 30. den, neboť 35. den jsme makroskopicky ani mikroskopicky v předpokládaných místech ne našli známky svědčící pro zlomeninu.

V každém časovém údobí bylo utraceno 6 zvířat, pouze u kontrol a 70. den byly výsledky získány z 10 zvířat.

Zpracování žebířů pro mikroskopické hodnocení: po makroskopickém popisu byla kostní tkáň dána do chlazeného 10% formaldehydu 4 °C na 24–30 h. Po vyprání v tekoucí vodě byla odvápněna v EDTA-Na soli za upraveného pH 7,6. Po odvápnění a opětovném vyprání ve fyziologickém roztoku byly vzorky zality do parafínu tak, aby řezy v hlavní části byly rovnoběžné s podélnou rovinou a osou žebra.

U všech skupin bylo při zpracovávání postupováno shodnou metodikou s dodržováním stejné doby, stáří, množství barviva atd. pro srovnatelnost výsledků. Za těchto podmínek by případná chyba metodiky měla být stále stejná.

Pro hodnocení bylo prováděno přehledné barvení hematoxylin-eosínem, Van Giesonem a zeleným trichromem, pro sledování fibril Humsou (27) a pro sledování glykoproteinů Pasa-alcianovou modří (52), toluidinovou modří podle Lisona (40), modifikovanou Haleho metodou (46), 30. min vypírání Lisona a natrávení 1% diastázou před barvením Pasem.

Morfologické hodnocení: mimo popisu zlomenin jsme se zaměřili na semikvantitativní hodnocení edému, velikost a složení hematoidů a nekrotizace, na buněčný charakter zánětu a na změny fibril. Dále jsme hodnotili tvarové změny buněk, jejich chování k barevným reakcím a charakter zlomeniny.

Kvantitativní hodnocení: velikost svalku a jeho složek byla stanovena z 10 středních řezů asi 25 μ od sebe vzdálených planimetrem fy

Reisa-Bad Leibwerda při 32násobném zvětšení, jež bylo promítnuto na matnici ve vzdálenosti 48 cm. Množství buněk a recipročně mezibuněčné hmoty jsme hodnotili z plochy $0,4 \text{ mm}^2$ z 5 různých řezů. Ze shodných míst byly získány počty buněk i průřezy cév.

Množství fibril a intenzita histochemických reakcí byla hodnocena semikvantitativně ve stupnici 0–4 křížky. Pro fibrily bylo použito hodnocení Geilera a Straucha [15] a pro hodnocení histochemických reakcí: **** zřejmé zvýšení reakce, *** lehké zvýšení nebo místní intenzivní vybarvení, ** lehké místní náznaky zvýšení reakce, * normální reakce, 0 snížení reakce.

Statistické hodnocení: jelikož charakter dat nezaručoval, že soubory mají alespoň přibližně normální rozložení, byl použit Wilcoxon-Whitea test. Dále bylo použito jednostranného testu, jenž zjišťuje, zda některý soubor je větší než zbývající, a tu byly použity kritické hodnoty $u_{0,95} = 1,645$ pro významný rozdíl a $u_{0,99} = 2,326$ pro vysoce významný rozdíl. V tabulkách je rozdíl ve smyslu zvýšení ($\nearrow$) či snížení ($\searrow$) oproti kontrole vyznačen jako významný (+) a vysoce významný (++).

Výsledky

Z kvantitativních výsledků jsou nejprůkaznější ty, kdy při statistickém vyhodnocení získáváme vysoce významný rozdíl anebo aspoň významný rozdíl. Takovéto posouzení výsledků uvedené na tab. A–D pak pomůže ve snazší orientaci výsledků.

Nejvýrazněji vystupuje do popředí snížené prokrvení, jež se nejdříve objevuje ve skupině B, pak A a nejpozději ve skupině D.

Dále dochází u všech skupin ke zvýšení celkového objemu (plochy) svalu, významnému hlavně po 14 dnech hojení zlomeniny, na němž se v různé míře podílí veškeré jeho složky (tj. osteoidu, chondroidu a vaziva). Pouze skupina B je ve 2. týdnu objemově snížena a teprve po 3. týdnu zvětšena. U všech skupin se na zmnožení hlavně podílí chondroidní složky svalu.

U C skupiny se na zvětšení nejvíce a nejdříve uplatňuje vazivová, mezibuněčná hmota postiradiačním edémem, jak vyplývá z objemového zvětšení bez přispění počtu fibroblastů. Zmnožení fibroblastů u B skupiny a po 3 týdnech u ostatních skupin jde na vrub mikrocytóze, snížení mezibuněčné hmoty a přetrvávání této tkáňové složky ve svalu.

Zmnožení ostatních buněk po 3. týdnu je pak dílem horší výstavby mezibuněčné hmoty a buněk, jak o tom svědčí morfologický obraz svalu.

Statisticky významné zvětšení chondroidní tkáně poukazuje na její špatnou přestavbu a přetrvávání ve svalu. Obdobné zmnožení osteoidní tkáně svědčí nejen pro nadbytečnou výstavbu, ale je i projevem její nedokonalé výstavby. Ta se v pozdějším údobí projeví výraznou osteoporózou s hematopoezou mezi kostními trámcí.

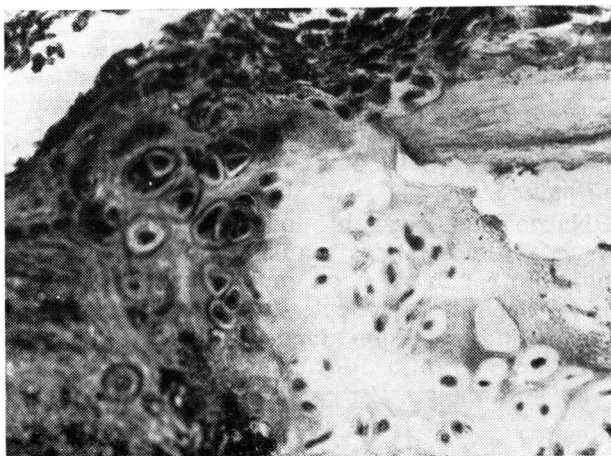
Při morfologickém sledování byl nápadný nepoměr mezi vstřebáváním a případným odbouráváním hematomů a nekrotiz. Zde se ukázal jednoznačně nepříznivý účinek ozáření u všech skupin.

Ze semikvantitativního hodnocení buněčnosti zánětlivé reakce bylo zřejmé, že jí po ozáření ubývá, a to více u skupin ozářených před zlomeninou.

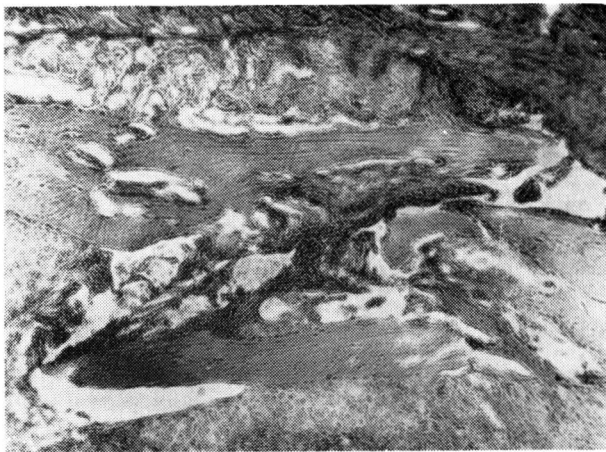
Změny v mezibuněčné hmotě byly nejzřejmější v chrupavce a to jak pro její množství (zvětšení objemu), tak i bradytrofií (zpomalená výživa, činnost a i delší přetrvávání ve svalku). Byla nalezena vakuolizace, granulární rozpad a hlavně změny barvitelnosti mezibuněčné hmoty (obr. 1).

Posouzení těchto změn co do časového vztahu k ozáření bylo velmi obtížné, neboť u skupin ozářených před provedením zlomeniny jsme zaznamenali hojný výskyt tříštivých zlomenin, které tyto změny rovněž ovlivňují (obr. 2).

Proto skupiny s ozářením před zlomeninou



Obr. 1. Okraj chrupavčité tkáně s výraznými změnami barvitelnosti mezibuněčné hmoty a buněk, s granulárním rozpadem a vakuolizací. Barveno hematoxylin-eosinem, zvětšeno 200krát. Skupina C 18. den.



Obr. 2. Tříštivá zlomenina ve středu s volným fragmentem a v okolí s edémem a většími nekrotizacemi s tvorbou chondroosteoidního svalu. Barveno hematoxylin-eosinem, zvětšeno 25krát. Skupina C 6. den.

jsme se snažili v případech, kdy by se tříštitivá zlomenina mohla významněji podílet na našich hodnotách a změnách, posuzovat odděleně od následných dvou skupin.

U chondroidní tkáně jsme proto při hodnocení skupin sledovali jen její přestavbu enchondrální osifikací, která je nejvíce opožděna u skupiny B a C a nejméně u D.

U kostní tkáně, která je na novotvorbu nejnáročnější, jsme předpokládali výraznější změny. Pro posouzení novotvorby kostní tkáně mezi jednotlivými skupinami jsme použili časového nárůstu objemu do největších hodnot. Největší nárůst má kontrola, pak skupina D, C, A a nejmenší skupina B. I když lze namítat, že u tříštitivých zlomenin se kostní tkáň vytváří na větší ploše, domníváme se, že naše pozorování odráží skutečnost.

Dalším dokladem odchylných poměrů u ozářených zvířat je zpomalené odbourávání jednotlivých komponent svalku. Přestavba je nejvíce prodloužena u skupiny B, dále u skupin A a C, jak je patrné ze statistického hodnocení objemu (plochy) svalku (viz tab. A—D skupin).

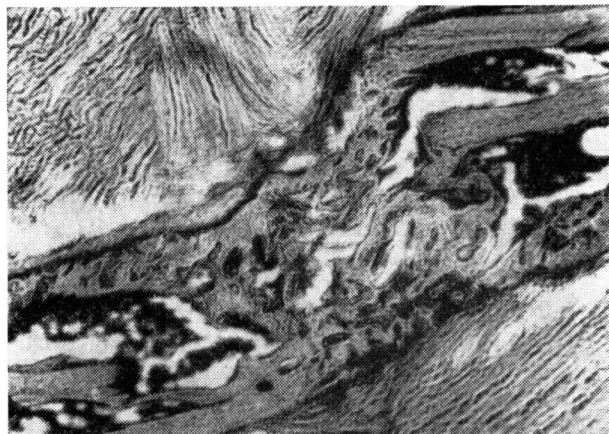
Tento jev potvrzují i morfologické nálezy, při nichž bylo zjištěno, že v okolí osteoblastů se nevytváří Howshipovy lakuny. Navíc počty osteoblastů jsou sníženy, a tak by jejich předpokládaná zvýšená činnost měla být dvojnásobně patrná.

Na poškození všech buněk nás pak upozornily nejen změny barvitelnosti jádra a cytoplazmy, ale i jejich velikost, změny tvarů, různě výrazné změny karyocytoplazmatického indexu i počtu jader, jež jsou často popisovanými změnami po ozáření.

Do jaké míry se tu podílí zpomalení výstavby

mezibuněčné hmoty nebo buněk by mohly ozřejmit počty mitóz (sledovaných z osteoidu), jež jsou nejprve sníženy a pak zvýšeny, neboť ve tkáni dlouho přetrvávají, mimo skupinu B. Poukazuje to na sníženou buněčnou aktivitu, na menší přísun energie a výživy, jež prodlouží mitotický děj (viz tab. A—D).

Výsledkem všech těchto změn je nález svalku i 70. den po zlomenině s osteoporózou a medulizací kompakty v místech zlomeniny (obr. 3).



Obr. 3. Osteoidní svalek s osteoporózou a hematopoezou v kostní dřeni 70. den po zlomenině. Barveno hematoxylin-eosinem, zvětšeno 25krát. Skupina D.

Morfologické sledování opírající se o histochemické změny ukázalo, že v případě kyselých glykoproteinů dochází po ozáření k jejich přetrvávání v místech nektróz svalku, k jejich menšímu zmnožení a prodlouženému nálezu při výstavbě mezibuněčné hmoty pojiva a osteoidu.

Tab. I

Statistické vyhodnocení řady A ke kontrole indexy významnosti

	2.	4.	6.	9.	12.	15.	18.	21.	25.	30. den
Celková plocha	1,643	0,406	0,735	0,981	0,245	2,030 + ↗	2,928 ++ ↗	2,928 ++ ↗	3,065 ++ ↗	3,062 ++ ↗
Osteoidu	0,548	2,847 ++ ↘	0,860	0,245	1,598	1,095	1,610 + ↗	2,785 ++ ↗	2,666 ++ ↗	3,062 ++ ↗
Chondroidu	—	0,298	2,337 ++ ↘	2,572 ++ ↘	0,368	1,826 + ↗	2,345 ++ ↗	2,944 ++ ↗	3,095 ++ ↗	2,358 ++ ↗
Vaziva	2,008 + ↗	1,218	2,084 + ↗	2,084 + ↗	0,735	2,379 ++ ↗	2,940 ++ ↗	—	—	—
Osteoblastů	0,524	2,842 ++ ↘	2,739 ++ ↘	2,739 ++ ↘	1,281	0,419	0,522	2,611 ++ ↗	2,611 ++ ↗	3,065 ++ ↗
Chondroblastů	—	1,225	2,556 ++ ↘	1,643	1,281	1,567	0,940	2,100 + ↗	—	—
Fibroblastů	1,149	2,611 ++ ↗	2,739 ++ ↗	2,739 ++ ↗	2,745 ++ ↗	2,611 ++ ↗	2,460 ++ ↗	—	—	—
Cév	1,567	0,163	2,495 ++ ↘	2,745 ++ ↘	2,928 ++ ↘	2,611 ++ ↘	2,611 ++ ↘	2,611 ++ ↘	2,619 ++ ↘	2,522 ++ ↘
Mitóz	1,375	2,286 + ↗	2,323 + ↗	2,586 ++ ↗	0,751	1,820 + ↗	2,386 ++ ↗	—	—	—

Tab. 2

Statistické vyhodnocení řady B ke kontrole indexy významnosti

	2.	4.	6.	9.	12.	15.	18.	21.	25.	30. den
Celková plocha	1,095	1,380	2,949 ++✓	2,942 ++✓	2,327 ++✓	0,568	0,878	2,928 ++↗	2,084 + ↗	1,347
Osteoidu	0,183	1,871 + ✓	1,229	3,065 ++✓	1,844 + ✓	2,739 ++✓	1,757 + ✓	0,733	0,747	1,225
Chondroidu	—	—	2,830 ++✓	2,817 ++✓	2,822 ++✓	1,095	1,466	2,650 ++↗	2,724 ++↗	1,899 + ↗
Vaziva	2,008 + ↗	0,568	0,613	2,819 ++↗	2,327 ++↗	2,379 ++↗	2,466 ++↗	—	—	—
Osteoblastů	1,781	2,842 + ✓	2,749 ++✓	2,008 ++✓	1,281 + ✓	0,731	2,611 ++↗	2,193 + ↗	2,611 ++↗	3,065 ++↗
Chondroblastů	—	—	1,278	1,143	0,549	1,149	2,611 ++↗	1,938 + ↗	—	—
Fibroblastů	1,567	2,611 ++↗	2,739 ++↗	2,739 ++↗	2,745 ++↗	2,611 ++↗	2,141 + ↗	—	—	—
Cév	2,619 ++✓	2,694 ++✓	2,932 ++✓	2,745 ++✓	2,928 ++✓	2,611 ++✓	2,611 ++✓	2,611 ++✓	2,694 ++✓	2,471 ++✓
Mitóz	2,727 ++✓	2,531 ++✓	2,823 ++✓	2,690 ++✓	2,389 ++✓	1,542	—	—	—	—

Tab. 3

Statistické vyhodnocení řady C ke kontrole indexy významnosti

	2.	4.	6.	9.	12.	15.	18.	21.	25.	30. den
Celková plocha	2,739 ++↗	2,842 ++↗	2,694 ++↗	0,613	2,205 + ↗	2,739 ++↗	3,098 ++↗	3,098 ++↗	3,062 ++↗	3,062 ++↗
Osteoidu	1,095	2,034 + ↗	0,860	1,839 + ↗	1,844 + ↗	2,009 + ↗	2,453 ++↗	3,102 ++↗	2,062 ++↗	2,572 ++↗
Chondroidu	—	—	2,091 + ✓	1,225	—	1,278	2,195 + ↗	2,853 ++↗	3,095 ++↗	1,646 + ↗
Vaziva	2,739 ++↗	2,842 ++↗	3,065 ++↗	1,716 + ↗	3,062 ++↗	2,745 ++↗	3,109 ++↗	—	—	—
Osteoblastů	0,733	2,842 ++↗	2,373 ++↗	2,739 ++↗	1,281	1,567	1,358	1,643	2,611	3,065
Chondroblastů	—	—	2,556 ++✓	1,461	2,030 + ✓	0,940	0,311	1,549	—	—
Fibroblastů	2,611 ++✓	0,522	0,730	1,643	0,275	1,776 + ↗	1,968 + ↗	—	—	—
Cév	0,525	2,037 + ✓	2,052 + ✓	2,745 ++✓	2,928 ++✓	2,611 ++✓	2,611 ++✓	2,739 ++✓	2,449 ++✓	2,627 ++✓
Mitóz	2,627 ++✓	1,229	1,429	2,129 + ↗	2,810 ++↗	2,627 ++↗	2,652 ++↗	—	—	—

V nektrózách jsou však nejen zvýšeny kyselé glykoproteiny, ale je tu i zvýšená Pas pozitivita, neodstranitelná diastázou.

V osteoidu a v chrupavce stoupá po ozáření množství lehce uvolnitelných kyselých glykoproteinů až do 18.—25. dne. U kontrol je prokázáno jen do 12. dne. Jde o komplex látek poukazujících na vazkost mezibuněčné hmoty a propustnost kapilár.

Při semikvantitativním hodnocení stejných časových intervalů množství kyselých glykoproteinů klesá v prvních 14. dnech oproti kontrole. Současně tu ale dochází k posunu ke kyseljším složkám (vybarvení za pH 4,0). Podle některých autorů, Lison (40), Lindner (38), tu jde o vybarvování sulfopolysacharidů nebo složek obdobného charakteru a uspořádání. Tento posun je později i v okrajích kostních trámčů.

Tab. 4

Statistické vyhodnocení řady D ke kontrole indexy významnosti

	2.	4.	6.	9.	12.	15.	18.	21.	25.	30. den
Celková plocha	1,643	1,056	0,735	1,103	1,470	2,680 ++↗	2,781 ++↗	2,928 ++↗	3,065 ++↗	3,062 ++↗
Osteoidu	1,626	1,057	0,860	0,981	1,352	2,739 ++↗	1,903 + ↗	2,785 ++↗	3,102 ++↗	3,062 ++↗
Chondroidu	—	1,681	1,107	1,470	0,859	1,095	1,759 + ↗	2,944 ++↗	3,095 ++↗	2,671 ++↗
Vaziva	0,913	0,568	0,368	1,226	0,980	2,379 ++↗	2,466 ++↗	—	—	—
Osteoblastů	1,152	0,731	0,365	2,373 ++↙	0,183	2,611 ++↗	2,193 + ↗	2,611 ++↗	2,611 ++↗	3,065 ++↗
Chondroblastů	—	1,559	0,183	0,183	1,098	2,402 ++↗	0,313	1,342	—	—
Fibroplastů	1,357	0,940	—	2,008 + ↙	2,745 ++↗	2,611 ++↗	2,141 + ↗	—	—	—
Cév	0,210	—	0,147	2,751 ++↙	2,928 ++↙	2,611 ++↙	2,611 ++↙	2,619 ++↙	2,611 ++↙	2,108 + ↙
Mitóz	0,841	1,559	0,316	1,763 + ↗	2,211 + ↗	1,485	—	—	—	—

Po 14 dnech počínají kyselé glykoproteiny klesat, což souvisí s tvorbou a výstavbou kolagenu. Prodloužení jejich poklesu po ozáření svědčí buď o snížené činnosti buněk, nebo o poruchách ve výstavbě kolagenu a o obtížích s jejich zabudováním nebo odstraněním z mezibuněčné hmoty. Ve 3.—4. týdnu nacházíme po ozáření v okrajích kostních trámčů v místech buněčné aktivity mírné zvýšení kyselých glykoproteinů a jejich přetrvávání. Nejspíše tu dochází k jejich depolymerizaci v menší komplexy, čímž se zlepší jejich barvitelnost a záhy tato místa vykazují i průkaz glykogenu.

Po ozáření dochází rovněž ke změnám barvitelnosti retikulárních a ve výstavbě kolagenních fibril. Při stříbření retikulárních vláken dochází k jen granulárnímu vypadávání stříbra a u kolagenních fibril k tvorbě hrubších, širších a kratších fibril.

Výsledky stříbření mohou poukazovat na poškození vazebných mechanismů stříbra, nebo na poruchu přímo ve výstavbě fibril, čímž dojde ke změně tinkčních vlastností, nebo někde v průběhu prováděné reakce.

U kolagenních vláken jejich zprohýbání a rozšíření souvisí s jejich zkrácením. Hrubší vzhled vyvolávají nepoměry v tloušťce vybarvujících se fibrilárních snopců.

Diskuse

Osud organismu je v podstatě rozhodnut v okamžiku, kdy ozáření skončilo. Od této doby se výchozí poškození zčásti reparuje, zčásti prochází určitou latencí s vývojem nepřímých, druhotných účinků a překrývá se s adaptačními a kompenzačními reakcemi.

Mikroskopicky pak výsledné změny vidíme: A — **na buňkách** jako potrhání buněčných membrán, což zdůrazňuje Bacq a Alexandr (2), jako zduření jader se změnami struktury a barvitelnosti — Robin a Casarett (50) — a jako vakuolizaci cytoplazmy, její granulaci se změnami tvaru celé buňky Berdjis (3).

B — **na mezibuněčné hmotě** jako změny histohematické bariéry, na stavu cévněkapilární sítě, ionálního a makromolekulárního stavu, jež se projevuje ve změnách barvitelnosti a velikosti fibrilární a nefibrilární složky (30), (62).

Proto jsme od těchto popisovaných a pozorovaných změn přešli na kvantitativní a histochemické hodnocení. I další autoři upozornili na poruchy buněk po ozáření, jako např. Aronson aj. (1), Nathanson (43) a Polyakov (47). Přitom mnozí přičítají větší význam poruše DNK než poškození dalších buněčných dějů, jež pak většinou pokládají až za následek poruchy DNK. Williams (64) v této souvislosti upozorňuje na poruchu depolymerázy DNK po ozáření a tím na přetrvávání většího množství DNK v buněčném jádru, což způsobuje prodloužení celého mitotického děje, který jsme našli. Walters (63) naopak radiační poškození vidí hlavně ve snížení enzymatických dějů s dodávkou energie, s výstavbou DNK a její replikace, čímž se celý děj prodlouží. Tím je samozřejmě snížena nejen mitotická činnost, ale i výstavba dalších bílkovinných součástí buňky a mezibuněčné hmoty. Navíc pak, jak ukazují naše nálezy, na základě poškození vytváří buňky pozměněné, nedokonalé látky, které se pak použijí na výstavbu mezibuněčné hmoty. Tato pozměněná mezibuněčná hmota se pak hůře odbourává,

čímž se prodlouží její přestavba, jak dokumentuje prodloužené hojení a dlouhodobý nález svalu.

Rovněž z radiační citlivosti buněk je fibroblast uváděn jako buňka poměrně radiorezistentní a leukocyt nebo makrofág jako radiosenzitivní. Proto je více poškožována resorbce než vazivové opouzdrvení, které je hlavně patrné v opouzdrvování hematomů a nekrotizací a jejich přetrvávání ve svalu. Forsberg (14) tu připisuje velký vliv snížení enzymatických reakcí. To potvrzuje i pokles aktivity enzymatického rozkladu po ozáření *in vitro*, jak uvádí Florey (13). Naše nálezy zvýšení kyselých glykoproteinů a glukózy poukazují na špatné prokrvení a změny v enzymatických reakcích. Na poruchy kostní tkáně po ozáření upozorňuje i Green aj. (19), jenž vyzvedává poruchu jemné vaskulární sítě a potlačení proliferace buněk. Porušení buněčné činnosti zdůrazňuje Dokuchaeva (9) a oběma vlivům přiřítá význam např. Hayashi a Suit (24). Polyakov (47) pak k těmto vlivům přidává i vliv toxických látek z buněčného rozpadu a radiačních štěpů.

To, že radiace působí poruchy kostní tkáně a vytváří sklon ke zlomeninám, uvádí již Guzecki (21) a McCrorie (41) aj., ale většinou je udávají nejdříve mezi 4–6 měsíci, a proto nás časné změny překvapily. Tyto změny Bond aj. (7) připisuje radionekrotizaci a Vaughan (60) změnám cévního prokrvení a následně osteoporóze.

Sami se domníváme, že u těchto časných změn lomivosti jde hlavně o poruchy vodního a minerálního metabolismu, jak uvádí Bureš a Wuehrmann (8), se změnou histochemické bariéry, přes kterou se děje difúze kyslíku a výživy, ale i odsun odpadních štěpů s následnou anoxií. Přitom tkáně s rychlejší obměnou jsou více závislé na těchto změnách než tkáně bradytrofní.

Při poruchách cévní propustnosti a výstavby, jež se hlavně uplatňuje u prvních 3 skupin, dochází nejprve k edému, pak k poruchám tlaků, pH tkáně, enzymatické činnosti postižených buněk a konečně i resorbce. Nedojde-li včas k úpravě, dojde nejprve ke snížené činnosti postižených buněk a pak třeba i k jejich zániku, jak popisují Landis a Pappenheimer (36), Hopwell a Young (25) a Yamaura aj. (65). Poslední práce Blondina a Greena (5), Mittchella (42), Purschottama a Ghoshe (48) ukazují, že již při opakované hypoxii buněk může dojít při překročení určitých mezí k porušení buněčné činnosti. Tyto hypoxické změny se podobají změnám, jež nacházíme v popsáných podmínkách radiačního poškození.

Na význam cévní složky v radiačním poškození organismu upozornili u různých orgánů Glatstein (16) při celotělovém ozáření časné po jeho aplikaci a měsíc po jeho provedení a Reinhold a Ghosh (49). V kostní tkáni pak Gonk aj. (18) za 5 h a 8 dnů po aplikaci 15 Gy, a v kostní dřeni je popisuje Knospe aj. (34). U celotělového ozáření 17,56 Gy King aj. (33) popisuje snížené prokrvení za 1 a 12 měsíců a mimo

to i remodelizaci kostní tkáně a cévní sítě. V obdobné práci Robin aj. (51) se uvádí, že: „radiace vyvolává jak časné, tak i pozdní změny, projevující se degenerací postižených orgánů, radiologickým poškozením endoteliálních buněk nebo uzávěrem lumina kapilár a pak vzestupem „histohematické tkáňové difúzní bariéry“ a reakcemi jiných tkáňových elementů vedoucích k reparaci. Tyto změny vedou k poruchám výživy, hypoxii nebo ischemii parenchymatózních buněk, podporující tak patologický defekt vyvolaný přímo radiací v parenchymatózních buňkách. I tyto změny mohou být bifázické, časné a pozdní“.

Tyto změny se mohou uplatnit i při remodelizaci kostní tkáně a vzniku osteoporózy. Výklad osteoporózy je velmi rozmanitý — Howland aj. (26). Může být projevem stárnutí, hormonálních poruch atd., nebo se jedná o lokální posttraumatickou osteoporózu [Chapchal (28)] či inaktivační [Eichler (10)]. Tyto lokální osteoporózy se liší časově a histologicky, jak na to poukazuje Nollen (44), ale mohou se tu objevit i změny již dříve popisované Ewingem (11), který je přiřítá radiační ostitidě anebo, jak to popisuje Guttenberg, osteoradionektróze (20).

Poruchy kolagenu a kyselých glykoproteinů úzce souvisí se změnami funkční činnosti buněk a s pozměněnou výstavbou mezibuněčné hmoty. Zvýšenou výstavbu kyselých glykoproteinů pozorujeme od 4. dne s maximem v průběhu 1. týdne. Trojnásobné zvýšení u zlomenin tu chemicky prokázali stanovením hexosaminu Boas (6) a Chvapil (29). Pověštině se jejich maximum uvádí mezi 5. [Solheim (56)] a 7. dnem [Kaiser a Stockinger (32)]. Radiačním poškozením se v našich pokusech výstavba kyselých glykoproteinů posunula z 1. týdne až na 8.—12. den, jak je patrné z histochemických reakcí. Obdobné pozorování uvádí Krahe a Kunkell (35) nebo Shipman (54).

Největší nárůst sulfopolysacharidů udává ve svalu Lindner aj. (39) — 7.—10. den, kdy zjistil největší nárůst radioaktivní síry. Jejich přetrvávání po ozáření ukazuje na jejich zpomalenou výstavbu a zabudovávání do mezibuněčné hmoty, což pak může mít vliv i na opožděnou kalcifikaci, jak udává Solheim (55) a Uher (58).

Častěji než se změnami kyselých glykoproteinů se setkáváme s popisováním změn strukturní složky — fibril.

Většina autorů vidí hlavní příčiny poruchy výstavby kolagenu ve snížené aktivitě fibroblastů a prokrvení [Vecchini aj. (62)]. Děj však nebude tak jednoduchý, jak ukázal Chvapil a Hurych (31) *in vitro*, kde ozáření kolagenu vytvořil další křížné vazby v nepolárních místech, čímž došlo k rozštěpení fibril. *In vivo* mnohem menšími dávkami udává Schwarz a Gusek (53) větší vliv na rozpustný kolagen, jehož následkem je zkrácení fibril.

Určitý sklon k fibrogenézi po ozáření není obvyklý a dle Tseleva (57) a Valeta (59) souvisí s nakupením proteinů a aminokyselin v mezibuněčné hmotě v době zvýšené propustnosti

kapilár, což však nemůžeme potvrdit. Největší poškození výstavby fibril po ozáření se uvádí v různé časové závislosti. Tak Gluckman (17) je uvádí 24–28 h po ozáření, Lawrence aj. (37) ihned po poranění, nebo při ozáření týden před poraněním, Pohle aj. (46) při současném ozáření a 15 dní před poraněním, kdy je snížena pevnost jizvy.

Tyto údaje ukazují, že o poškození rozhoduje nejen dávka, ale i doba ozáření ve vztahu k hojivému procesu (zlomeniny). Naše výsledky svědčí pro větší poškození, jestliže se ozáří před zlomeninou.

Protože ani více jak dvojnásobné prodloužení doby hojení kontrol nevedlo ke zhojení svalku u ozářených skupin a ještě 70. den nacházíme snížené prokrvení a osteoporózu, další sledování jsme neprováděli. Je totiž problematické, zda by u takto poškozených jedinců v této době vznikl ještě děj, který by vedl k nové výstavbě cévního řečiště, nebo zda nedokonalá pevnost osteoporotického svalku překročí fyziologické podmínky a bude impulsem k přestavbě.

Souhrn

Byl sledován vliv celotělového jednorázového ozáření 7,1 Gy na různé fáze hojení zlomeniny žeber u krys. Morfologickými, histochemickými, semikvantitativními i kvantitativními metodami byl sledován průběh hojení zlomeniny, která byla prováděna v různém časovém údobí vzhledem k ozáření.

Byly pozorovány poruchy barvitelnosti, vzhledu a funkce buněk a mezibuněčné hmoty s výrazným snížením průřezů cév. Tyto změny měly za následek objemové zvětšení svalku, hlavně chondroidní tkáně, porušenou výstavbu kostní tkáně s její pozdní zvýšenou buněčností a osteoporózou. Dále vedly ke zpomalené přestavbě všech složek svalku, čímž se prodloužilo hojení zlomeniny na více jak dvojnásobnou dobu kontrol.

V průběhu zlomenin byly zaznamenány změny v lomivosti kostní tkáně, v množství a složení kyselých glykoproteinů, ve výstavbě a barvitelnosti fibril a ve sklonu k opouzdřování nektrů a hematům před jejich resorbci.

Nejvýraznější poškození hojivého procesu bylo pozorováno ve skupině zvířat ozářených 5 dnů před provedením zlomeniny a nejmenší u skupiny, kdy ke zlomení došlo až 7. den po radiaci. Jelikož ale u všech skupin v 14denním časovém rozpětí najdeme ještě 70. den osteoidní svalek v jiném stadiu hojení, vyplývá z toho skutečnost, že mimo dávky, doby a způsobu ozáření rozhoduje o konečném výsledku i stav kostní tkáně a celého organismu.

Literatura

1. Aronson, A. S. - Gustafsson, M. - Selvik, G.: Bone growth in the rabbit after irradiation. *Acta Radiol. Diagn.*, 17, 1976, s. 838–844.

2. Bacq, Z. M. - Alexandr, P.: *Fundamentals of radiology*. Oxford, Pergamon Press 1961.
3. Berdjis, Ch. C.: *Pathology of irradiation*. Baltimore, Williams & Wilkins Co. 1971.
4. Beneš, A.: Ranný radioaktivní mixt. *Voj. zdrav. Listy* 26, 1957, s. 150–156.
5. Blondin, G. A. - Green, D. E.: A unifying model of bioenergetics. *Chem. Eng. News*, 10, 1975, s. 26–42.
6. Boas, N. F.: Method for determination of hexosamines in tissues. *J. Biol. Chem.*, 204, 1953, s. 553–556.
7. Bond, V. P. - Fleidner, T. M. - Archambeau, J. E.: *Mammalian radiation lethality*. New York, Acad. Press 1965.
8. Bureš, M. F. - Wuehrmann, A. H.: Bone-remodeling dynamics following local x irradiation. *J. Dent Res.*, 48, 1969, s. 376–384.
9. Dokuchaeva, N.: Callus formation in progeny of animals subjected to chronic radiation. *Bull. Eksp. Biol. Med.* 62, 1966, s. 98–100.
10. Eichler, J.: Inaktivitätsosteoporose. Stuttgart, G. Thieme, 1970.
11. Ewing, J.: Radiation osteitis. *Acta Radiol.*, 6, 1926, s. 399–412.
12. Fletcher, W. - Loutit, J. F. - Papworth, D. G.: Interpretation of levels of strontium⁹⁰ in human bone. *Br. Med. J.*, 2, 1966, s. 1225–1230.
13. Florey, L.: *General pathology*. London, Loyd-Luke LTD 1970.
14. Forsberg, A.: Effects of small doses of ionizing radiations. In „*Advances in radiation Biology*“ vol. 1. New York, Acad. Press Ed. Augenstein 1964.
15. Geiler, G. - Strauch, G.: Histochemische Untersuchungen am Fracturcallus bei experimentellem Vitamin C Mangel. *Frankfurt. Z. Path.*, 73, 1963, s. 52–69.
16. Glatstein, E.: Alterations in rubidium⁸⁶ extraction in normal mouse tissue after irradiation. An estimate of long term blood flow changes in kidney, lung, liver, skin, and muscle. *Radiat. Res.*, 53, 1973, s. 88 až 101.
17. Gluckman, A.: Comparison of dermal healing after thermal and radiation burns. *Quart. J. Surg. Sci.* 3, 1967, s. 126–132.
18. Gong, J. K. - Vertalino, J. E. - Kane, M. J.: The effect of x-irradiation on the bone marrow blood volume in rat tibia. *Radiat. Res.*, 39, 1969, s. 277–288.
19. Gonsalves, N. I. - Chase, H. B.: Wound healing in x-irradiated mammalian skin. *T. I. T. J. Life Sci.*, 5, 1975, s. 77–86.
- 19a. Green, F. - French, S. - Rodriguez, G. - Hays, M. - Fingerhut, A.: Radiation-induced delayed union of fractures. *Radiology*, 93, 1969, s. 635–641.
20. Guttenberg, S. A.: Osteoradionecrosis of the jaw. *Am. J. Surg.*, 127, 1974, s. 326–332.
21. Guzecki, A.: Lesions of bone tissue following breast carcinoma treated radiotherapeutically. *Pol. Przegl. Radiol.*, 37, 1973, s. 277–281.
22. Hagen, U.: Biochemie der biologischen Strahlenwirkung. In „*Ergebnisse der Medizinischen Strahlenforschung*“. Bd. 1. Stuttgart, G. Thieme 1964 (Hrsg. Schine H. Z.).
23. Havlín, I.: Hojení ošetřené rány žaludku při nemoci z ozáření. Kandidátská práce Z H N 1–3, Brno 1964.
24. Hayashi, S. - Suit, H. D.: Effect of fractionation of radiation dose on callus formation at site of fracture. *Radiology*, 101, 1971, s. 181–186.
25. Hopewell, J. W. - Young, C. M. A.: Changes in the microcirculation of normal tissues after irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 4, 1978, s. 55–58.
26. Howland, W. J. - Loeffler, R. K. - Starchman, D. E. - Johnson, R. G.: Postirradiation atrophic changes of bone and related complications. *Radiology*, 117, 1975, s. 677–685.
27. Humason, G. L. - Lushbaugh, C. C.: Selective demonstration of elastin, reticulum and collagen by silver,

- orcein and aniline blue. *Stain Technol.*, 35, 1960, s. 209—214.
28. Chapchal, G.: Zur Kenntnis der Knochenschäden durch Gliedmassen-ruhigstellung. *Int. Prax.*, 4, 1964, s. 281—294.
 29. Chvapil, M.: *Physiology of connective tissue*. Praha, Czech. Med. Press, 1967.
 30. Chvapil, M. - Hurgch, J.: Control of collagen biosynthesis. In „International review of connective tissue research. Bd. IV. New York, Acad. Press 1968 (Ed. Hall D. A.).
 31. Chvapil, M. - Hurych, J.: Možnosti ovlivnění tvorby kolagenu. Praha, S. Zdr. N. (Babakova sbírka) 1969.
 32. Kaiser, E. - Stockinger, L.: Morphologie und Biochemie des Bindegewebes. *Münch. Med. Wchschr.*, 113, 1971, s. 321—333.
 33. King, M. A. - Casarett, G. W. - Weber, D. A.: A study of irradiated bone: histopathologic and physiologic changes. *J. Nucl. Med.*, 20, 1979, s. 1142—1149.
 34. Knospe, W. H. - Blom, J. - Crosby, W. H.: Regeneration of locally irradiated bone marrow. I. Dose dependent long term changes in the rat with particular emphasis upon vascular and stromal reaction. *Blood*, 28, 1966, s. 398—415.
 35. Krahe, M. - Künkell, H. A.: Die Strahlenempfindlichkeit der Ratte bei erhöhten Grundsubstanz. *Strahlentherapie*, 106, 1958, s. 260—262.
 36. Landis, E. M. - Pappenheimer, J. R.: Exchange of substances through the capillary walls. In „Handbook of physiology“ V. 2. Washington, Acad. Press 1963 (Amer. Physiol. Soc.).
 37. Lawrence, W. - Nickson, J. J. - Warshaw, L. M.: Roentgen rays and wound healing: experimental study. *Surgery*, 148, 1953, s. 145—149.
 38. Lindner, J.: Histochemische Methodik des Nachweises von Polysaccharidkomponenten in Schleimstoffen und Grundsubstanzen. *Acta Histochem., Suppl. V.*, 1965.
 39. Lindner, J. - Freytag, G. - Johannes, G. - Schlosser, C. A. - Reiter, E. - Schmidt, I.: Autoradiographie and chemical studies on the healing of bone fractures. In „Callus formation“. Budapest, Ak. Kiado 1967 (Ed. Krompecher).
 40. Lison, L.: *Histochemie et cytochimie animales*. Paris, Canthier-Villars 1953.
 41. McCrorie, W. D.: Fracture of the femoral neck following pelvic irradiation. *Br. J. Radiol.*, 23, 1952, s. 587—592.
 42. Mitchell, P.: Chemiosmotic coupling in energy transduction. A logical development of biochemical knowledge. *Bioenergetica*, 3, 1972, s. 5—24.
 43. Nathanson, T. I.: Effect of gamma-ray of radium on wound healing. *Surg. Gynecol. Obstet.*, 59, 1934, s. 62 až 69.
 44. Nollen, A. J. G.: Effects of inorganic phosphate supplements on fracture healing and bone remodelling. *Disert. práce. Kathol. Univ. Van Nijmegen, Schippers* 1972.
 45. Pausescu, E. - Teodosiu, T. - Pausescu, M. - Chirvasie, R. - Duducgian, L. M.: Effect of total exposure to Co^{60} gamma irradiation on cerebral water and electrolyte metabolism. *Radiobiol. Radiother.*, 5, 1973, s. 603—611.
 46. Pearse, A. G. E.: *Histochemistry*. Boston, Little Brown Co. 1960.
 46. Pohle, E. A. - Ritchie, G. - Moir, W. W.: Studies of the effect of roentgen rays on healing Wounds. *Radiology*, 52, 1949, s. 707—711.
 47. Polyakov, V.: Roentgenstructural analysis of the process of bone tissue regeneration after fractures in routine conditions and in the action of ionizing radiation. *Chirurgia*, 3, 1961, s. 76—85.
 48. Purschottam, T. - Ghosh, N. C.: Enzymatic regulation of electrolyte balance in rats exposed to varying levels of acute hypoxia. *Am. J. Physiol.*, 225, 1973, s. 801—804.
 49. Reinhold, H. S. - Buisman, G. H.: Repair of radiation damage to capillary endothelium. *Br. J. Radiol.*, 48, 1975, s. 727—731.
 50. Robin, Ph. - Casarett, G. W.: *Clinical radiation pathology*. London, Saunders Co. 1968.
 51. Robin, Ph. - Casarett, G. W. - Reinhold, H. S.: Structural changes in blood vessels after cure radiation. *Radiat. Res.*, 10, 1974, s. 58—74.
 52. Runge, W. H. - Ebner, H. - Lindenschmidt, W.: Vorzüge der kombinierten Alcianblau-Perjodsäure-Schiff-Reaktion für die gynäkologische Histopathologie. *Dtsch. Med. Wochenschr.*, 38, 1956, s. 1525—1529.
 53. Schwarz, W. W. - Gusek, W.: Veränderte Längsperiodik der Fibrillen. In „Bindegewebe und Stützgewebe“. Darmstadt, Steinkopff 1966 (Hrsg. Bartelheimer).
 54. Shipman, T. L.: Radiation changes by healing. In „Diagnosis and treatment of acute radiation injury“. Geneva, World Health Org. Publ. 1961.
 55. Solheim, K.: Biphysical and biochemical studies of healing fractures. *Acta Univ. Upsal.*, 28, 1966, s. 1 až 27.
 56. Solheim, K.: Glycosaminoglycans, hydroxyproline and phosphorus in healing fractures. *Acta Univ. Upsal.*, 28, 1966, s. 28—36.
 57. Tseleva, I. A.: Collagen biosynthesis in the lungs of rats with radiation injury. *Vopr. Med. Khim.*, 30, 1974, č. 6, s. 640—643.
 58. Uher, J.: Die Mukopolysacchariden bei der Wundheilung. *Zentralbl. Allg. Pathol.*, 107, 1969, s. 228—233.
 59. Valet, G.: Veränderungen des Proteinstoffwechsels nach Bestrahlung. *Strahlentherapie*, 151, 1976, s. 61 až 68.
 60. Vaughan, J. M.: *The physiology of bone*. Oxford, Clarendon Press 1970.
 61. Vaughan, J. M.: The effect of radiation on bone. In „The biochemistry and physiology of bone“ Vol. III. London, Acad. Press 1971 (Ed. Bourne).
 62. Vecchioni, R. - Galucci, V. - Bottero, M. - Ruffato, G.: Effect of ionizing radiations on collagen. II. The collagen fractions in irradiated granulation tissue. *Radiobiol. Radiother. Fis. Med.*, 17, 1962, s. 137—143.
 63. Walters, R. A. - Enger, M. D.: Effect of ionizing radiation on nucleic acid synthesis in mammalian cells. In „Advances in radiation biology“. New York, Acad. Press 1976 (Ed. Lett J. T.).
 64. Williams, J. N.: Role of DNA repair in cell inactivation aging and transformation. In „Advances in radiation biology“. New York, Acad. Press 1976. (Ed. Lett J. T.).
 65. Yamaura, H. - Yamada, K. - Matsuzawa, T.: Radiation effect on the proliferating capillaries in rat transparent chambers. *Int. J. Radiat. Biol.*, 30, 1976, s. 179 až 187.

Klíčová slova: Kostní tkáň; Hojení; RTG záření.