

616.71-001.26-003.9-018:615.361.018.3/4:612.64

STIMULACE POŠKOZENÉHO HOJENÍ KOSTI RENTGENOVÝM ZÁŘENÍM EMBRYONÁLNÍM EXTRAKTEM Z KOSTNÍ DŘENĚ A CHRUPAVKY

MUDr. Jiří UHER, CSc.

Výzkumný ústav traumatologický, Brno
(ředitel: doc. MUDr. Jaroslav Míček, CSc.)

Podpora hojení embryonálními extrakty je starého data. Často jsou tyto počátky spojovány s A. Carrelem (3) a jeho pokusy s pěstováním buněk v embryonálních tkáňových extraktech a s pracemi, kde se použilo embryonálních extraktů k urychlenému hojení kožních ran (18). V této době se však předpokládalo, že tyto látky obsahují humorální stimulatory, cytopoetiny, trefony, jež napomáhají růstu (4). Později se však ukázalo, že tento účinek mají i jiné tkáňové extrakty z dospělých jedinců (14) z chrupavky (8), z kolagenu (18) anebo i jen z plazmy (1) a krve (13).

Pokrokem biochemie se v těchto extraktech nacházely různé látky, o kterých se pak mluvilo jako o faktorech stimulujících resorpci, metabolismus, řídicích koncentraci kyslíku v plyné fázi (10) anebo o látkách napomáhajících k diferenciaci specifických buněk (30).

Použití celého extraktu se však stále ukazuje jako nejlepší. O tom svědčí např. nejrychlejší nárůst buněk v tkáňových kulturách (21). Nejčastěji se používá homologního (1, 20) nebo i heterologního (2, 12, 26) embryonálního extraktu. Proto i v léčbě, kde se chtělo dosáhnout rychlé regenerace u zničené nebo poškozené tkáně, se sáhlo po těchto látkách. Tak např. u poškozených jater Sirepar, u kůže Solcoseryl a u prostaty Raveron. U nás se doposud více používá specifitějších látek jako např. krevních derivátů lidského albuminu, roztoku plazmatických bílkovin, fibrinu anebo trombinu.

Námi použitý embryonální extrakt z chrupavky a kostní dřeně fy. Robafarm Rumalon podporuje jednak vyzrávání, diferenciaci fibroblastů a chondroblastů s vytvářením bohaté základní mezibuněčné hmoty (9, 25, 31) a jednak v kostní dřeni přeměnu primitivních retikulárních buněk v typické plazmatické buňky, jež mají provádět syntézu bílkovin (2). Má jít o mukopolysacharid-peptidový komplex, který, mimo jiné již uvedené vlastnosti, má stimulovat výstavbu mukopolysacharidových složek ve fibro-

blastech a podle Karzela (11) potlačuje činnost hyaluronidázy a kolagenázy a tak brání rozpadu mukopolysacharidového komplexu. Tím napomáhá výstavbě sulfomukopolysacharidů.

Stimulace normálního průběhu hojení se však jen těžko a obtížně prokazuje. Organismus při obvyklém průběhu hojení je ve své činnosti povzbuzován různými látkami, které vyvolávají a ovládají celou řadu reparačních reakcí. Přitom v některých dějích může pracovat s maximálním úsilím, jakého je schopen. Proto se setkáváme u řady takto postavených experimentů i s negativními nálezy.

Mnohem snazší je průkaz stimulačního účinku při nějakém způsobem navozeném zpomaleném hojení. Zpomalení je většinou vyvoláváno potlačením určitých dějů nebo látek. Tím tu jsou určité reakce poškozeny nebo utlumeny, ale ostatní mohou být nepoškozeny anebo mohou i probíhat v maximální intenzitě. Podané stimulační látky nám mohou utlumení odstranit, nepoškozené děje stimulovat a u maximálního uplatnění vyvážením všech dějů prokázat svůj příznivý vliv.

Bohužel se doposud v klinice nesprávně využívá stimulačních účinků. Používáme jich většinou, až se objeví patologické změny v průběhu hojení. Stimulace pak v této době není vhodná a adekvátní, neboť jí působíme na již rozvinutý patologický děj. Její uplatnění je neadekvátní a obvykle se setkáváme jen s malými účinky nebo účinek překryjí patologické projevy. Dokonce se stimulace může uplatnit i škodlivě, a to tehdy, když působí i na patologický děj. Proto ovlivnění průběhu hojení, má-li být účinné, se musí dít při jakémkoliv podezření na místní anebo celkové poruchy hojení téměř s počátkem léčby profylakticky.

Materiál a metodika

K pokusům byly použity krysy kmene SPF, průměrné váhy okolo 200 g. Byly jednotlivě ustájeny a krmeny

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

Ozáření bylo provedeno shodně jako v předcházející práci [28] celotělově, jednorázově, rtg přístrojem vzdušnou dávkou $189 \times 10^{-4} / \text{kg}^{-1}$ za minutu a dobou ozařování bylo dosaženo dávky 7,0 Gy.

„Rumalon“ byl podáván 2., 3., 4., 8. den po zlomenině i. m. za sterilních podmínek v dávce 0,5 ccm.

Sledování průběhu hojení zlomenin bylo prováděno utrácením zvířete 2., 4., 6., 9., 12., 15., 18., 21., 25., 30., 40., 50. a 70. den. Po utrácení se prováděl makroskopický popis s označením místa a počtu zlomenin. Dále se hodnotil charakter zlomeniny s hrubým hodnocením pevnosti.

Zlomená žebra byla odebrána do 10% formaldehydu a po 24–30 h vypírána ve fyziologickém roztoku a pak odvápněná v EDTA sodné soli za pH 7,6. Po odvápnění a opětovném vyprání byla zalita do parafínu tak, aby řezy byly prováděny v rovnoběžné rovině s podélnou osou žebra.

Morfologické hodnocení pak bylo prováděno z barvení hematoxylin-eosin, Van Gieson a zeleným trichromem; sledování fibril Humasonem a sledování glykoproteinů PAS-AM, toluidinovou modří podle Lisona, metanilovou žlutí mucikarminem podle Mayera a Rhinehart-Abul Hajovou metodou. U toluidinové modře bylo prováděno i 30minutové vypírání lehce uvolnitelných kyselých glykoproteinů.

Pořízené řezy jsme hodnotili kvantitativně a kvalitativně. Kvantitativní hodnocení bylo prováděno planimetří z 10 středních řezů asi 25μ vzdálených proměřováním plochy svalu a jednotlivých tkání (vazivo, chrupavka, osteoid) kompenzačním planimetrem fy. Reisa-Bad Leibwerda při 32krát zvětšení, jež bylo promítnuto na matnici ve vzdálenosti 48 cm. Počty buněk, mitóz, průřezů cév a mezibuněčné hmoty jsme hodnotili z plochy $0,4 \text{ mm}^2$ z 5 různých řezů.

Takto získané výsledky byly statisticky hodnoceny použitím Wilcoxon-Whitea testu a jednostranného testu, který zjišťuje, zda některý soubor je větší než druhý s kritickými hodnotami $u_{0,95}=1,645$ pro významný rozdíl a $u_{0,99}=2,326$ pro vysoce významný rozdíl. Z kvantitativních výsledků jsme pak hodnotili hlavně statisticky významné a vysoce významné rozdíly.

Výsledky

Ve vazivové složce svalu dochází po podání extraktu k urychlené výstavbě kyselých a neutrálních polysacharidů a i fibril. Současně však jeho podání po ozáření statisticky významně snižuje edém a tím se zvyšuje buněčnost této tkáně. Urychlení výstavby vaziva však vede u radičního poškození tkání spíše k opouzdřování nekrotických hematomů než k jejich resorpci. To má pak ale nepříznivý vliv na přestavbu těchto tkání.

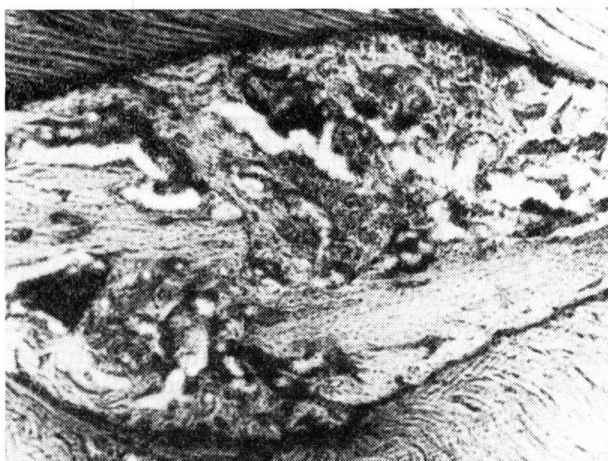
Rychlý přísun glykoproteinů s urychlenou výstavbou fibril, diferenciací buněk a s celkovou výstavbou mezibuněčné hmoty vytváří

rychlé přemostění konců zlomeniny i u příčných a tříštivých zlomenin. Časným přemostěním pak často klesá množství chondroidní tkáně, neboť se vytvářejí příznivější podmínky pro výstavbu kostní tkáně.

U chrupavčité složky je statisticky vysoce významné zmnožení buněk, které jen 4. dne je sledováno i zvýšeným objemem, což svědčí pro časnější výstavbu této tkáně místo vaziva.

Přestavba chondroidní tkáně u pouhého extraktu enchondrální osifikací je dobrá, ale po ozáření i přes poměrně dobré prokrvení je hlavně ke konci 2. týdne zpomalena.

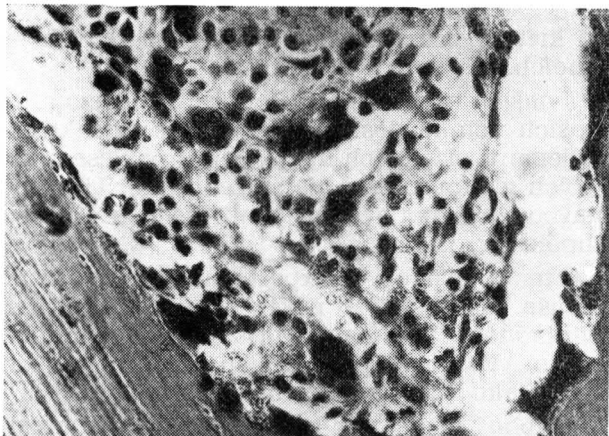
V kostní tkáni dochází jak k statisticky významnému snížení objemu kostní tkáně u pouhého extraktu ve 3. týdnu, tak i k statisticky vysoce významnému po radiaci a extraktu. Současně dochází i ke zmnožení osteocytů, na čemž se podílí i kvalitativní změny ve výstavbě, a to tzv. „pletivovou kostní tkání“, vznikající desmogenní osifikací. S takovou tvorbou kostní tkáně se setkáváme u mládat. Hlavně v těchto místech stoupá buněčnost a množství kyselých glykoproteinů ve vmezeřené pojivové tkáni a tím se napomáhá jak výstavbě této tkáně, tak i přestavbě. Mezenchymální pojivová tkáň mezi trámci má rovněž zvýšenou buněčnost a výrazněji se vybarvuje na glykoproteiny. Při poškození hojení radiací se tyto formy výstavby ještě častěji uplatňují a navíc se tu v těchto místech setkáváme s menší pozdní osteoporózou.



Obr. 1. Osteoidní svalek 28. den po zlomenině, ozáření a podání extraktu, kde ve středu je stav desmogenní osifikace se zvýšenou buněčností, v okrajích s hojnou hematopoézou a s počátky osteoporózy. Barveno Van Giesonem, zvětšeno 25krát

Při přestavbě kostní tkáně se po podání extraktu setkáváme s vícejadernými osteoklasty s 20–30 jádry a mimoto i s granulárním rozpadem kostní mezibuněčné hmoty, jež se pak snadněji odbourává.

Již samotný extrakt v údobí výstavby svalu statisticky významně zlepšuje prokrvení. Po ozáření s podáním extraktu se po celou dobu sledování vytváří statisticky vysoce významné



Obr. 2. Svalek 21. den po zlomenině, ozáření a podání extraktu. Okraj kostní přestavby s hojnými vícejadernými osteoklasty. Barveno hematoxylin-eosinem, zvětšeno 200krát

zlepšené prokrvení. Tento účinek u ozáření je spojen se zvýšením nejen buněčné činnosti pojivových buněk, ale i hematogenních. Proto se zlepši nejen výstavba svalku, ale i celkový stav organismu zlepšenou hematopoézou.

Ve vazivové a chrupavčité tkáni je výrazné zmnožení kyselých glykoproteinů. Přitom dochází ke zkrácení doby lehce vyplavitelných, nenavázaných složek glykoproteinů.

Prvé známky výstavby fibril najdeme již 4. den ve formě jemných argyrofilních a od 6. dne kolagenních vláken, kde se nejprve objevují kratší a širší vlákenka a teprve později užší a delší, hlavně ve vytvářejících se trámčích kostní tkáni. Ozáření značně poškodí výstavbu fibril, a tak i když extrakt napomáhá jejich výstavbě, nedosahuje jejich množství kontrolních neovlivněných poměrů.

U kolagenních fibril většinou zůstává po delší dobu převaha kratších širších fibril nad úzkými a dlouhými a najdeme je i v místech přestavby svalku. U vybarvování kyselých glykoproteinů se toto vybarvení blíží normě, místy s jejich mírným delším přetrváváním v mezibuněčné hmotě.

Posledním nálezem přesvědčivě a dokonale dokumentujícím urychlenou přestavbu svalku po podání extraktu je stav svalku 50. a 70. den po ozáření. U zvířat po podání extraktu a ozáření jsme 50. den makroskopicky a mikroskopicky nenalezli frakturu u 4 jedinců z 5 a 70. den u 3 zvířat z 10.

Určité zmnožení mitóz je těžko zhodnotitelné vzhledem k jejich prodlouženému nálezu po ozáření.

Rozprava

Přímý vliv extraktu z chrupavky a kostní dřeviny na chondrocyty prokazuje ve svých pracích Silberbergová (25). Řada dalších autorů jako Davidson (4), Lorin-Epstein (13), Prudden (19), Urist (30), Weigel (31) vidí u těchto látek mnohem širší uplatnění, nejen místní, ale i ovliv-

nění hormonální součinnosti, enzymatické aktivity, vlivy calcifilaxe atd.

Z histochemických nálezů je zřejmé časně nakupení kyselých glykoproteinů, ke kterým dochází jednak zvýšenou činností buněk a jednak i přímým působením těchto látek z extraktu. Pro tento předpoklad lze najít i literární podklady (9, 22, 31).

Gersh (6) totiž prokázal, že počátky chondrogenézy jsou spojeny s kyselými glykoproteiny. Muirová (16) pak prokazuje podobné účinky u chondroitin sulfátu, kdy jeho snížením dosáhla poklesu chondrogenézy. Sám extrakt obsahuje kyselé glykoproteiny (11, 31).

Extrakt se uplatňuje i při výstavbě kolagenu, jak nezávisle na sobě prokazují Kahlben (10) a Mathews (15). Tito autoři prokazují vliv chondroitin sulfátu na agregaci tropokolagenových molekul a tím i na urychlenou výstavbu kolagenu. Přímý vliv tohoto extraktu na výstavbu kolagenu prokazuje in vitro Ryback (22). Ve výkladu účinků se však uchyluje k vlivu chondroitin sulfátu A a C, které mají urychlovat celý děj.

Naše nálezy fibrilárních změn svědčí pro časnější výstavbu kolagenu. I když téměř nedochází k barevným změnám kyselých glykoproteinů, dochází u větší části fibril k tvorbě kratších a širších komplexů.

Touto urychlenou výstavbou převážně mezibuněčné hmoty všech tkání svalku dochází k jeho časnějšímu přemostění chondroosteoidním svalkem. Na těchto dějích se podílí zlepšené prokrvení v 1. a 2. týdnu. Jeho snížení po 14. dnech ke kontrole přičítáme hlavně časnějšímu přemostění zlomeniny. Jistě se tu i podílí změna míst, z nichž je prokrvení hodnoceno (výstavba osteoidu a enchondrální osifikace).

U poškození hojení zlomenin ozářením nám tyto účinky extraktu vyniknou. Jednak tu v prvních dnech pozorujeme snížení edému v místech zlomeniny a okolí. Tento účinek přičítáme vlivu extraktu na stabilizaci mezibuněčné hmoty potlačením účinku hyaluronidáz a kolagenáz, jak to popisuje Weigel (31). Gersh a Catchpole (6) přičítají těmto změnám velký význam při vzniku zánětlivého prosáknutí.

Dochází ke snížení rozsahu nekrotizace a hematomů s jejich opouzdřováním. Tím se ale u těchto ložisek zhorší jejich resorbce a nedochází k jejich tak časnému odstranění.

Při výstavbě fibrilární složky po ozáření a extraktu najdeme v jejich počáteční výstavbě ve vazivu neuspořádanost. Při výstavbě kostních trámčů se již poměry kolagenních fibril mění, oproti krátkým a širokým v počátcích nacházíme i užší a delší. Nálezy Weigla (31) o působení extraktu poukazují na 10% zvýšení výstavby kyselých glykoproteinů a fibril. Nově syntetizované molekuly mají mít však menší velikost oproti normálním. Podobné výsledky uvádí i Astaldi (2) v tkáňových kulturách po působení tohoto extraktu. Tím se dá vysvětlit

převaha kratších, širších fibril v počátcích hojení, kdy je podáván extrakt, a to zmnožením menších molekul kyselých glykoproteinů.

Při výstavbě kostní tkáně se po podávání extraktu setkáváme ojediněle s tvorbou „pletivové kosti“, jež je častá u prvotní výstavby. Později je tento způsob výstavby okolními vlivy a podmínkami potlačen.

Ozářením se buď potlačí určité imunobiologické děje, jež umožní tuto výstavbu, nebo podáním embryonálního extraktu se natolik změní podmínky ve výstavbě svalu, že jsou i příznivé pro tuto výstavbu, nebo se tu podílí obě složky. Dokonce by se tu mohly i uplatnit další látky z extraktu.

Vytvořený osteoidní svalek se lépe a rychleji přestavuje. Podílí se na tom jednak zvýšený počet osteoklastů, místy i značně jaderných, a zvýšená buněčnost ve vmezežené pojivové tkáni mezi trámci s časnější úpravou hematopoézy a granulárním rozpadem základní substance kostní tkáně.

Podobné vícejaderné osteoklasty byly pozorovány u zlomenin sajících mláďat, kdy zlomeniny jsme provedli v nejčasnější době po narození, kdy se nám je podařilo vytvořit (27).

Granulární rozpad základní substance kostní tkáně je běžný v místech Howshipových lakun. Ham (7) tyto změny přičítá natrávení základní substance látkami vyloučenými z osteoklastů a tím má dojít ke granulárnímu rozpadu kostní matrix.

V kostní tkáni je podceněn obsah vody. Uher (29) kdysi tyto změny ve vazbě vody popisoval v jaterních buňkách u parenchymatozní degenerace a spojoval je s poruchou vodních a ionálních přesunů a tím se změnou eukoloidního stavu, vzniklým špatným odstraňováním buněčných katabolitů přes buněčné membrány. I v kostní tkáni jde o změnu eukoloidního stavu, ale ne v buňkách, ale v základní substanci — matrix. Nemůže být tato změna způsobena zvýšeným přísunem těchto látek do kostní matrix a tím dojít k vytvoření granulárního rozpadu?

O tom, že osteoidní svalek se rychleji přestavuje, svědčí i to, že po 50. dnu jej tvoří jen vrstevnaté zduření kompakty anebo mírné úhlové spojení kompakty s jejím ztlustěním, ale bez změn ve dřeni nebo v periostu, a proto jej lze i přehlédnout.

Působení extraktu se neomezuje jen na účinek na chrupavčitou tkáň. Svědčí o tom práce Jasinského (9), jenž popisuje jeho účinky na granulační tkáň a Fabera (5), jenž popisuje nejen příznivý účinek na regeneraci chrupavky, ale i na hojení kostní tkáně pod kloubní chrupavkou. Naše nálezy ukazují, že působí jak na kostní tkáň, tak i na regeneraci hematopoézy po ozáření.

Jsou však i práce, kde se tak jednoznačný účinek extraktů neprokazuje, jako Inoue (8) a Trusler (26), jež jsou ve svých závěrech vel-

mi kritičtí, ale vliv sledují jen na zdravých jedincích.

Z našich experimentálních řad se ukazuje, že lepších účinků dosáhneme, jestliže extrakt použijeme v případech spojených s poklesem kyselých glykoproteinů, se sníženou fibrilární výstavbou a s potlačením proliferace a činnosti buněk.

I tento přístup k experimentálně navozené poruše není nový a někteří autoři tu použili avitaminózy, jako např. Mussini (17), nebo hladovění, Peacock (19), anebo i hormonálních vlivů, jako např. kortizonu (9) a diabetu (23).

Podobný názor pak k použití Rumalonu uplatňují i Karzel (11) a Weigel (31), kteří jeho účinek při degenerativních stavech kloubů vykládají na základě úpravy poměrů v kloubu dodáním látek obsažených v extraktu.

Proto je nutno stimulaci hojení provádět velmi uvážlivě při předpokladu nebo zjištění určitých poruch a co nejčasněji, neboť v pozdějším údobí může působit i na patologický děj. Běžný průběh hojení se jen těžko ovlivňuje, neboť co se nám třeba i podaří při výstavbě, ztrácíme při přestavbě, a tak je nutno stále dále hledat a zkoušet.

Souhrn

Byl sledován účinek extraktu z chrupavky a kostní dřene Rumalonu na zpomalené hojení žeber vyvolané celkovým ozářením zvířat dávkou 7,0 Gy.

Nálezy samotného extraktu poukazují na zvýšenou proliferaci buněk vytvářejících svalek, zlepšenou výstavbu chondrocytů, prokrvení osteoidní tkáně, zmnožení kyselých glykoproteinů v místě zlomeniny a zlepšenou výstavbu vláknitých složek, čímž dojde k časnějšímu přemostění zlomeniny a zhojení.

Při spojení s celkovým radiačním poškozením nám extrakt nejen příznivě ovlivňuje výstavbu tkání jako u samotného extraktu, ale i výstavbu cévní sítě, krve tvorby v kostní dřeni a přestavbu osteoidního svalu. V kostní tkáni pak najdeme místy tvorbu „pletivové kosti“ a urychlenou přestavbu kostní tkáně s granulárním rozpadem mezibuněčné hmoty a s resorbci velkými vícejadernými osteoklasty.

Snad nejvýraznějším celkovým projevem všech těchto změn u ozářených skupin je jejich zhojení do 50 až 70 dnů u větší části jedinců po podání extraktu, zatímco u samotného ozáření je svalek patrný u všech sledovaných jedinců i 70. den.

Literatura

1. AKAMATSU, N.: Virchiws Arch. Pathol. Anat., 240, 1922, s. 308.
2. ASTALDI, G. - STROSSEL, E. - RINALDI, C.: Med. exp. (Basel), 6, 1960, s. 349.
3. CARREL, A. - BAKER, L. E.: J. Exper. Med., 44, 1926, s. 387.

4. DAVIDSON, J. N.: Edinburgh Med. J., 50, 1943, s. 70.
5. FABER, U. - WALTHER, D.: Arch. orthop. unfall. Chir., 59, 1966, s. 401.
6. GERSH, I. - CATCHPOLE, R. R.: Amer. J. Anat., 85, 1949, s. 457.
7. HAM, A. W.: Histology. 5. ed. Philadelphia 1965.
8. INOUE, T.: Arch. Surg., 82, 1961, s. 422.
9. JASINSKI, B. - GRAUWEILER, J.: Pathol. Microbiol. (Basel), 24, 1961, s. 148.
10. KAHLBEN, D. A. - KARZEL, K. - DOMENJOZ, R.: Pharmacology, 1, 1968, s. 33.
11. KARZEL, K. DOMENJOZ, R.: Med. exp. (Basel), 9, 1963, s. 385.
12. KUTSKY, R. J. et al.: Exp. Cell. Res., 10, 1956, s. 48.
13. LORIN-EPSTEIN, M. J.: Arch. Klin. Chir., 144, 1927, s. 632.
14. MANDL, F.: J. inte. Coll. Surg., 7, 1944, s. 34.
15. MATHEWS, M. B.: Biochem. J., 96, 1965, s. 710.
16. MUIR, H.: Int. Rev. Conn. Tis. Res. New York 1964.
17. MUSSINI, E. - HUTTON, J. J.: Science, 1967, s. 927.
18. PEACOCK, Jr. E. E.: Surg. Gynecol. Obstet., 113, 1961, s. 329.
19. PRUDDEN, J. F. - ALLEN, J.: J. Amer. med. Assoc., 195, 1965, s. 92.
20. PRUDDEN, J. F. - MIGAL, P. - HANSON, P.: Amer. J. Surg., 119, 1970, s. 560.
21. RAJAN, K. L.: Proc. Ann. Meet. Swiss Soc. Phys. Med. Rheum. Soc. Bürgenstock 1968.
22. RYBACK, R.: Exp. Med. Surg., 26, 1969, s. 3.
23. SABO, J. C. - OBERLAND, L. - ENQUIST, J. E.: Surg. Gynecol. Obstet., 119, 1964, s. 559.
24. SELEY, H. et al.: Amer. J. Surg., 117, 1969, s. 610.
25. SILBERBERG, R. - HASLER, M.: Path. Microbiol., 37, 1971, s. 215.
26. TRUSLER, H. M.: Arch. Surg., 22, 1931, s. 983.
27. UHER, J.: Acta Chir. orthop. Traumatol. cecoslov., 40, 1973, s. 15.
28. UHER, J.: Voj. zdrav. Listy, 51, 1982, s. 232.
29. UHER, V.: Funkční patologie. Blansko 1948.
30. URIST, M. R.: Dev. Biol. Suppl., 4, 1970, s. 125.
31. WEIGEL, W. - JASINSKI, B.: Path. Microbiol., 22, 1962, s. 400.
32. WOODWARD, S. C. - HERRMANN, J. B.: Arch. Surg., 96, 1968, s. 189.

Klíčová slova: Hojení kostní tkáně; Poškození rtg; Stimulace embryonálním extraktem.