

INFLUENŢAREA EXPERIMENTALĂ A MATURIZĂRII CALUSULUI OSOS LA ŞOBOLANI ALBI TRATAŢI CU HORMONI STEROIZI.

Nota I *

Maria V. Lakatos, Stela Salamon, G. L. Kemény, Gh. Roth

Efectele hormonilor în vindecarea fracturilor osoase şi în general procesele regenerative ale osului, constituie o problemă mult controversată în literatura de specialitate.

În lucrarea de faţă ne-am propus să studiem efectul hormonilor steroizi anabolizanti (foliculină, madiol), asupra diferitelor etape ale formării calusului, urmărind pe lângă modificările morfologice şi comportarea polizaharidelor, precum şi a fosfatazei alcaline nespecifice.

Încă din 1934 *Nyes* şi *Potter* (cit. 6) atrag atenţia asupra relaţiei dintre foliculina ovariană şi osificarea, iar mai târziu *Clavert* (6), în 1941 şi 1948 ajunge la concluzia că foliculina are acţiune osteogenetică importantă prin stimularea osteoblastelor.

În legătură cu hormonii androgeni sintetici, lipsiţi de proprietăţi virilizante, am pornit de la constatarea lui *Gomez* (cit. 2, 3) care a observat acţiunea favorabilă a metilandrosteronului asupra vindecării fracturilor experimentale, iar *Gatta* şi *Solazzi* (cit. 2, 3) specifică şi faptul că ţesutul de regenerare s-a îmbogăţit în fibroblaşti şi osul osteoid era format din trabecule mai dezvoltate şi mai bogate în substanţe minerale.

* Lucrare prezentată în şedinţa U.S.S.M., filiala Tîrgu Mureş, din 14 XI 1968.

Material și metodă

Experiențele au fost efectuate pe 96 de șobolani albi de cite 100—150 g. Cu 3—4 săptămâni înaintea începerii experiențelor animalele au fost ținute sub același regim alimentar standard. Pentru tratament am utilizat foliculină (Ginosedol-Biofarm) soluție uleioasă și o suspensie apoasă de metilandrosteroid (Madiol-Biofarm) injectabil.

Animalele au fost împărțite în 3 grupe. *Grupa I:* la 30 de animale am produs fracturarea osului femur prin îndoirea coapsei și am administrat simultan Ginosedol 0.1 ml (0.05 mg) profund intramuscular în coapsa opusă. Aceeași doză de Ginosedol s-a repetat și la 7 zile după fracturare. *Grupa a II-a:* la 30 de animale am produs fracturarea tibiei prin același procedeu și am administrat 0.1 ml (2.5 mg) suspensie apoasă de Madiol pentru un animal. Aceeași doză s-a repetat la 7 zile după fractură. *Grupa a III-a:* 36 de șobolani care au servit drept martori. La aceștia am executat fracturarea femurului și tibiei în condițiile arătate mai sus. Fracturile nu au fost imobilizate, deoarece după observațiile noastre anterioare (Kemény, Róth, 12), am constatat că imobilizarea nu modifică procesul de vindecare la șobolani. Papp (22), lucrând pe iepuri a ajuns la concluzii similare. Animalele au fost supuse și unui control radiologic la 14 și 21 de zile. Sacrificarea animalelor s-a făcut la 14, respectiv 21 de zile prin decapitare. Prelevarea pieselor s-a executat precaut pe cât posibil cu păstrarea integrității periostului. Fixarea s-a făcut în alcool 80%, la rece, după care piesele au fost supuse decalcinării cu soluția Lorch modificată de noi (12, 19). După includerea în parafină s-au efectuat secțiuni de 7—10 microni care s-au colorat cu hematoxilină-eozină, reacția PAS, reacția Hale pentru MPZ și reacția Gömöri-Takamatsu pentru fosfataza alcalină nespecifică.

Rezultate

După 14 zile de la producerea fracturii la animalele de control (netratate) am constatat un calus fibrocartilaginós cu puține semne de osificare. Distanța dintre capetele fracturate este umplută cu un țesut de granulație cu numeroase celule reticulare, fibroblaste tinere și cu o vascularizație abundentă. În apropierea periostului se observă trabecule primitive (col. Hematoxilină-eozină). *Colorația PAS* indică prezența în cartilajul hialin a muco-polizaharidelor (MPZ), mai ales acolo unde se vor forma trabeculele osoase tinere. *Colorația Hale* este pozitivă, mai ales în citoplasma fibroblastelor, în țesutul conjunctiv fibros și în osteoblastele care înconjoară trabeculele în formare. *Reacția pentru fosfataza alcalină* este intens pozitivă intra- și extracelular în zona de osificare.

La grupa animalelor tratate cu foliculină, *colorația cu hematoxilină-eozină* evidențiază un calus fibros mult mai dezvoltat decât la grupa de control, cu pornire de la periost și endost și cu formarea de trabecule osoase. Calusul fibrocartilaginós este bine dezvoltat și se extinde pe un teritoriu mare. *Reacția PAS* este pozitivă, mai ales în jurul vaselor capilare. *Colorația Hale* este intens pozitivă în substanța fundamentală cartilaginóasă și mai puțin pronunțată în calusul fibros. *Fosfataza alcalină* este prezentă la nivelul substanței fundamentale a țesutului cartilaginós în regiunea de mineralizare activă și în calusul fibros în zona de osificare. Se pare că activitatea enzimatică este mai intensă decât la animalele de control.

La grupa animalelor tratate cu Madiol, după 14 zile de la fracturare, *colorația cu hematoxilină-eozină* ne indică prezența unui calus fibros foarte bine dezvoltat față de martori. *Colorația PAS* este intens pozitivă în substanța fundamentală a țesutului cartilaginós la nivelul celulelor mezenchimale tinere și în jurul capilarelor. Cu *reacția Hale* se obține o colorație ce are o localizare identică cu cea a reacției PAS. Intensitatea colorației scade o dată cu începerea procesului de osificare. *Fosfataza alcalină* atinge maximum de

activitate în a 14-a zi de la fracturare și administrare de Madiol. Activitatea enzimelor nu depășește însă cea observată la animalele netratate.

După 21 de zile de la fracturare, animalele de control prezintă cu *colorația H. E.* semne de osificare intensă. Țesutul osos nou format este în curs de remaniere, dar zona osteoidă nu este încă întinsă. *Colorația PAS* scade în intensitate dar persistă mai ales în substanța fundamentală cartilagineasă. *Reacția Hale* devine și ea mai puțin intensă și se extinde numai în zonele încă necalcificate. *Fosfatasa alcalină* dispăre paralel cu maturizarea și calcificarea calusului, dar este încă activă în osteoblaste și în substanța fundamentală a zonei de osificare, atât în țesutul conjunctiv fibros cât și în cartilaj.

La grupa animalelor tratate cu foliculină, *colorația H. E.* prezintă deja un calus osos periostal și endostal mai extins și mai maturizat decît la control. Cavitățile medulare sînt încă voluminoase. Pe aceste preparate se observă deja o remaniere a țesutului osos cu o activitate osteoblastică importantă. Observăm numai insule de calus fibro-cartilaginos neosificate. *Reacția PAS* și *Hale* prezintă o slabă pozitivitate ce dispăre treptat o dată cu apariția calusului osos. *Activitatea fosfatazei alcaline* este prezentă în zona de osificare, dispărînd complet din țesutul osos format. Deoarece osificarea decurge cu o viteză mai mare decît la martor, zona activă este mai îngustă.

La grupa tratată cu Madiol, *colorația H. E.* ne arată abundența țesutului osteoid nou format și între părțile fracturate se observă o consolidare mai bună decît la control. Calusul osos primitiv se evidențiază bine periostal cu travee osoase subțiri și așezate neregulat. Apar și puține elemente osteoblastice, dar remanierea osului osteoid se produce mai lent decît la grupa tratată cu foliculină, tabloul histologic fiind mai asemănător cu cel observat la grupa netratată. Insulele de calus fibro-cartilaginos sînt mai extinse decît cele de la grupa precedentă. *Reacțiile PAS* și *Hale* sînt pozitive pe un teritoriu mai restrîns, teritoriul care corespunde resturilor de calus fibro-cartilaginos, precum și resturilor traveelor de direcție situate în axa trabeculilor osului osteoid. *Fosfatasa alcalină* rămîne activă în zona de osificare, o zonă încă destul de largă, o situație asemănătoare cu cea observată la animalele de control.

Concomitent cu rezultatele histologice am efectuat și examinări radiologice la 14 și 21 de zile. Am constat o depunere de calciu mai intensă și mai rapidă sub acțiunea foliculinei. În această grupă la 14 zile conturul calusului este mai bine delimitat decît la grupa martoră, iar la 21 de zile traveele longitudinale radioopace leagă fragmentele între ele. La grupa tratată cu Madiol, depunerea calciului este mai întîrziată totuși aceasta se produce mai timpuriu decît la animalele martore.

Discuții

Vindecarea normală a fracturilor osoase din punct de vedere histologic se petrece în următoarele etape (*Kelsch, Kiener, Rădulescu, 24*): 1. Calusul fibrino-proteic (faza hemoragico-exudativă) cu durata de 5—6 zile la om; 2. Calusul fibro-cartilaginos provizoriu (faza fibro-cartilaginoasă) din ziua a 6-a pînă în ziua a 15-a sau a 16-a; 3. Calusul osos primitiv format din os osteoid (faza osificării provizorii) și 4. Calusul osos definitiv (faza osificării definitive). În urma acțiunii traumatismului la nivelul fracturii, în organism se declanșează o serie de procese locale și generale, evidențiabile clinic și histologic ce au ca scop refacerea integrității anatomice și funcționale a osului.

În privința MPZ s-a stabilit că ele au un rol însemnat în formarea osului, a substanței fundamentale, a fibrelor precum și în precipitarea și legarea substanțelor minerale (*Zenkevici, Meyer, Sylven cit. 11, 24*). Încă în perioada embriogenezei se petrece o acumularea de MPZ acide la locul de formare a țesutului osteogen și pe măsura calcifierii, cantitatea de MPZ acide scade. Observăm același fe-

MARIA V. LAKATOS ȘI COLAB.: INFLUENȚAREA EXPERIMENTALĂ
A MATURIZĂRII CALUSULUI OSOS LA ȘOBOLANI ALBI TRATAȚI
CU HORMONI STEROIZI

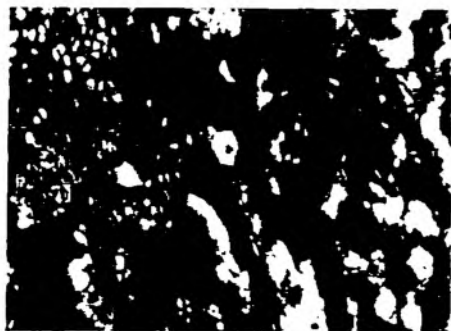


Fig. nr. 1: Calus de 14 zile la un animal de control, zona de osificare. Reacția pentru fosfataza alcalină arată o activitate crescută a enzimei în substanța fundamentală a țesutului cartilajinos. Reacția Gömöri-Takamatsu. Mărire: ob. 20 X, oc. 10 X.

Fig. nr. 2: Calus de 14 zile la un șobolan tratat cu foliculină. Activitatea fosfalazică se extinde pe un teritoriu mai restrâns, decât la control, fiind activă în zona cartilajului seriat, degenerat și pe suprafața trabeculelor osteoide. Linia de eroziune și vascularizație este dreaptă și arată o activitate crescută. Reacția Gömöri-Takamatsu. Mărire: ob. 20 X, oc. 10 X.



Fig. nr. 3: O porțiune mărită din imaginea precedentă care prezintă semnele unei osificări intense. Reacția Gömöri-Takamatsu. Mărire: ob. 40 X, oc. 10 X.

MARIA V. LAKATOS ȘI COLAB.: INFLUENȚAREA EXPERIMENTALĂ
A MATURIZĂRII CALUSULUI OSOS LA ȘOBOLANI ALBI TRATAȚI
CU HORMONI STEROIZI

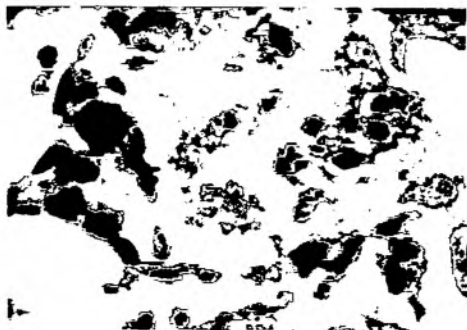


Fig nr. 4: Calus după 21 de zile tratat cu foliculină, în imagine se observă zona de remaniere cu un osteoclast polinuclear în centrul imaginii. Procesul de remaniere a țesutului osteoid este foarte intens. Colorație: H. E. Mărire: ob. 40 X, oc. 10 X.



Fig nr. 5: Calus de 14 zile tratat cu Madiol. Reacția PAS. este intens pozitivă în substanța fundamentală a cartilajului și în axa trabeculilor de os osteoid. Colorație: PAS. Mărire: ob. 10 X, oc. 10 X.

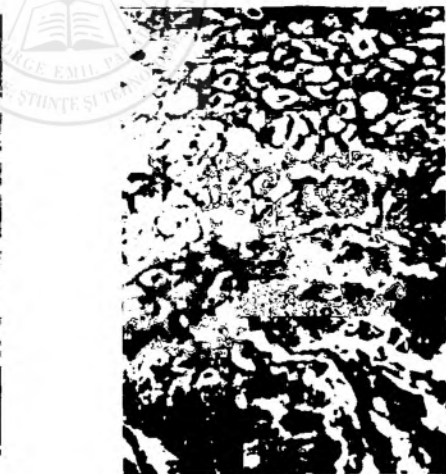


Fig nr. 6: Calus de 21 de zile de la animal de control. Se observă zonele de osificare endocondrală. Colorație: H. E. Mărire: ob. 20 X, oc. 10 X.

MARIA V LAKATOS ȘI COLAB : INFLUENȚAREA EXPERIMENTALĂ
A MATURIZĂRII CALUSULUI OSOS LA ȘOBOLANI ALBI TRATAȚI
CU HORMONI STEROIZI



Fig. nr. 7: Calus de 21 de zile tratat cu foliculină. Se observă o activitate celulară intensă cu micșorarea zonei cartilajinoase. Colorație: H. E. Mărire: ob. 20 X, oc. 10 X.

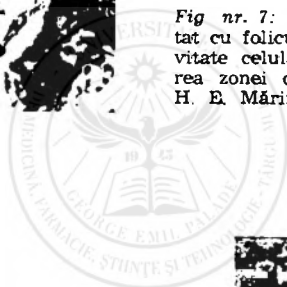


Fig. nr. 8: Calus de 21 de zile după tratament cu Madiol. Se observă abundența cartilajului hialin. Colorație: H. E. Mărire: ob. 20 X, oc. 10 X.

nomen și în cursul vindecării fracturilor osoase. Rezultatele noastre obținute în cursul acestor experiențe și în altele încă nepublicate, coincid cu datele din literatura de specialitate, în sensul că acumularea de MPZ se produce pînă în ziua a 14-a după fracturarea osului. Această afirmație este în concordanță și cu datele lui *Duthie* și *Baeker* (cit. 5) care au observat o acumulare activă de ^{35}S în această perioadă. Mucopolizaharidele iau parte și în procesul de collagenogeneză (28), iar *Policard* (cit. 28) presupune că proprietățile de calcifiere sînt direct dependente de starea de polimerizare sau depolimerizare a MPZ din substanța fundamentală.

La început în grupele tratate, MPZ apar în mod similar ca la animalele de control, ulterior însă, foliculina favorizează capilarizarea calusului fibros, modificînd metabolismul în sensul proceselor oxibiotice (22). În concordanță cu datele din literatură, în prezența unei oxigenări mai bune, calusul fibros se maturizează mai repede, cantitatea de MPZ descrește, fibrele colagene devin mai numeroase și mai maturizate. Osificarea acestui țesut începe mai devreme (27).

Studiind activitatea fosfatazei alcaline, sub acțiunea foliculinei am constatat că după 14 zile se observă o activitate mărită față de control, iar la 21 de zile fosfataza alcalină este activă doar în insule mici de calus fibro-cartilagininos și în zona de osificare, restul calusului fiind format din țesut osteoid sau țesut osos mai maturizat. Fosfataza alcalină descrisă de *Robinson* în 1923, în zona de osificare a osului, este prezentă în primele faze de formare a osului, acționînd în: 1) procesul de formare a MPZ deci a substanței fundamentale; 2) în fibrilogeneza *Fell* și *Dannielli*, cit. 5 și 3. în faza de depunere a substanțelor minerale. *Guttman* (3), *Bourne* (4), *Kemény* și *Roth* (12).

Efectul steroizilor anabolizanți în dezvoltarea matricei osoase a fost studiat de *Weikerth* și *Löhre* (29), iar în 1958 *Kowalewski* (cit. 15) observă deja o creștere a cantității de MPZ la animalele tratate cu acești hormoni. S-a constatat în același timp și o incorporare mai rapidă de ^{35}S la animalele tratate, ceea ce pledează pentru o sinteză mai accelerată de acid condroitin sulfuric și a acidului hialuronic, substanțe prezente și în calusul fibro-cartilagininos. *Weikert* și *Löhr* (29). În experiențele noastre am constatat o creștere considerabilă a MPZ față de animalele de control și o activitate fibroblastică pronunțată. Steroizii anabolizanți pot înlătura și efectele nocive ale unor substanțe care acționează asupra țesutului osos, cum ar fi factorul *Lathyrus* studiat de *Allalouef* în 1961. Acest extract de plante produce osteoporoză deformantă la șobolani prin inhibarea sintezei acidului condroitinsulfuric și întîrzie astfel procesul de vindecare a fracturilor experimentale. Steroizii anabolizanți produc o balanță de calciu pozitivă și anihilează efectul antianabolic al hormonilor glucocorticoizi. Madiolul acționează mai ales asupra formării calusului conjunctivo-cartilagininos și favorizează apariția cartilajului hialin, dar nu influențează procesul de osificare și remaniere a țesutului osteoid. *Gomez* (cit. 15) observă o acțiune favorabilă a metilandrosteroidului asupra vindecării fracturilor și asupra activității fosfatazei alcaline. În privința activității fosfatazei alcaline nespecifice, noi nu am observat diferențe semnificative între grupa de control și cea tratată cu Madiol. Se pare că la șobolani cu metabolism normal această substanță acționează mai ales prin intermediul metabolismului MPZ și a proteinelor. După observațiile noastre modul de acțiune al Madiolului seamănă cu cel al pre-satului de embrion. Acesta accelerează vindecarea fracturilor fără intensificarea activității fosfatazei alcaline. *Kemény*, *Roth* (12).

Concluzii

1. Foliculina favorizează maturizarea calusului fibros, accelerează procesul de osificare, în special osificarea condrală.

2. Foliculina produce o intensificare a proceselor de remaniere a țesutului osos, ameliorînd astfel calitățile mecanice ale calusului.

3. Androstendiolul favorizează faza conjunctivo-cartilaginoasă și metaplasia țesutului conjunctiv în cartilaj hialin cu maturizarea timpurie a țesuturilor preosoase.

4. Din cercetările noastre reiese că hormonii steroizi anabolizanți modifică în sens pozitiv vindecarea fracturilor, iar aplicarea lor practică este indicată mai ales la vîrstnici, unde reacția țesutului conjunctiv este deficitară.

Sosit la redacție: 23 decembrie 1968.

Bibliografie

1. BERESKINA L. F.: Dokl. Acad. Nauk. S.S.S.R. (1949), 5, 59; 2. BIELOUS A. M., PANKOV A. M.: Ortop. Travmat. i Protez. (1967), 11, 11; 3. BIELOUS A. M.: Ortop. Travmat. i Protez. (1968), 2, 76; 4. BOURNE G.: The biochemistry and physiology of bone. Academic Press, New York, 1956, 231—286, 287—307; 5. CABRINI L. ROMULO: Internat. Rev. of Cytology (1961), 11, 283; 6. CLAVERT I.: Arch. Anat. Micr. et Morph. Exptl. (1948), 37, 41; 7. GOLDBERG B., GREEN H., TODARO G. I.: Exptl. Cell. Res. (1963), 31, 2, 444; 8. GÖMÖRI G.: Proc. Soc. Exper. Biol. N. Y. (1939), 42/23; 9. KASAVINA B. S., MUZIKANT L. I.: Exper. Hirg. (1960), 5/54, 57; 10. KASAVINA B. S., SENKEVICH G. B.: Biochemia (1960), 25/4, 669; 11. KEMÉNY G. L.: Contribuții la problema impermeabilității epitelului de tranziție. Teză de disertație 1962, 28; 12. KEMÉNY G. L., ROTH GY.: Comunicare la U.S.S.M. Tirgu Mureș, 18 VI 1952; 13. KOSKINEN E. V.: Symp. Biol. Hung. (1967), 7, 305; 14. KROMPECHER I.: Das Knochenbildung. Ed. Fischer, Jena, 1937; 15. KRÜSKEMPER H. L.: Anabole Steroide G. T. Verlag, Stuttgart, 1963, 49; 16. LAKATOS V. MARIA: Comportarea histologică și histochimică a vaselor sanguine în calusul osos experimental. Comunicare la conferința de morfologie. Eforie Nord, 1967; 17. LAVRISCHEVA G. I., DUBROV I. A.: Rev. Path. (1965), 27/9, 70; 18. LINDHOLME R.: Acta Orthop. Scand. (1965), 36, 3, 221; 19. LORCH I. J.: J. of bone (1949), 31, 94; 20. MODIAEV V. P.: Arhiv Patol. (1965), 22/12, 55; 21. MORITO T.: Kyoto prefect. Med. Univ. (1961), 70/4, 1550; Excerpta Med. (1963), IX, B, 8, 1, 5644; 22. PAP K.: Symp. Biol. Hung. (1967), 7, 137; 23. PREMONT D.: Presse Med. (1960), 25, 970; 24. RĂDULESCU A., BACIU C., BROȘTEANU C.: Probleme de patologie a osului. Ed. Med. București, 1955, 25—30; 25. RĂDULESCU A., BACIU C.: Traumatismele osteoarticulare, Ed. Acad. R.S.R. București, 1967, vol. I, 64; 26. SMIDT H.: Symp. Biol. Hung. (1967), 7, 263; 27. TARSOLY E., HASER G., URBÁN I.: Symp. Biol. Hung. (1967), 7, 411; 28. VELICAN C., VELICAN D.: Histochimia și fiziopatologia mucopolizaharidelor, Ed. Acad. R.S.R., București, 1963, 138; 29. WEIKERT H., LÖHR E.: J. Orthop. (1965), 100/3, 302; Excerpta Med. IX, B., 1966, 795.