

Roti sääreluu posttraumaatilise reparatsiooni võrdlev elektronmikroskoopiline uurimine kinnise murru, osteotoomia ja perforatsiooni korral

Piret Hussar^{1,2}, Ülo Hussar¹, Tetsuji Sato², Inoue Kouji² – ¹TÜ anatoomia instituut, ²Tsurumi Ülikooli anatoomia kateeder, Yokohama, Jaapan

posttraumaatiline luu reparatsioon, osteotoomia, perforatsioon, luukoe elektronmikroskoopia, osteogenees

Artiklis on tutvustatud tööd, mille eesmärgiks oli uurida elektronmikroskoopiliselt traumajärgset luu paranemist roti sääreluu kinnise murru, osteotoomia ja perforatsiooni esimestel operatsioonijärgsetel nädalatel. Leiti, et kuigi luu paranemise staadiumid on üldjoontes sarnased, sõltub luu reparatsiooni iseloom trauma tüübist (kinnise murru järel indirektne, osteotoomia puhul primaarselt periostealne, sekundaarselt endostealne ja perforatsiooni järel primaarselt endostealne, sekundaarselt periostealne ossifikatsioon) ning kahjustuse ulatusest, samuti on treeningul luu reparatsiooni stimuleeriv, immobilisatsioonil aga inhibeeriv mõju. Tulemused andsid olulist informatsiooni rakusiseste muutuste ja intratsellulaarse substantsi sünteesi kohta erinevate traumade korral.

Posttraumaatiline luureparatsioon on vertebraatide bioloogias üks omapärasemaid reparatsiooni viise (1), mis pakub huvi nii traumatoloogidele kui ka morfoloogidele.

Erinevalt teiste mesenhümaalsete kudede kahjustuse järgsest taastumisest tekib luu reparatsiooni käigus nn provisoorne kude ehk kallus (2). Kuigi posttraumaatilist luureparatsiooni ja seda mõjutavaid tegureid (osteogeenseid, mehaanilisi jt) on põhjalikult uuritud (3, 4), puudub seni kirjanduses täpsem trauma tüübist lähtuv reparatsiooni osteohistogeneeside võrdlev elektronmikroskoopiline uuring. Seepärast seati töö eesmärgiks roti sääreluu elektronmikroskoopiline uurimine kinnise murru, osteotoomia ja perforatsiooni esimestel operatsioonijärgsetel nädalatel; osteotoomia ja perforatsiooni katsete puhul lisandusid kontrollrühmadele ka treeningu ja immobilisatsiooni alarühmad.

Materjal ja meetodika

Katsed tehti 72-l isasel Wistari liini rotil kehakaaluga 200–220 g. Katseloomad jaotati kolme rühma: 1) kinnine murd (34 rott); 2) osteotoomia (15 rott); 3) perforatsioon (28 rott). Teine ja kolmas

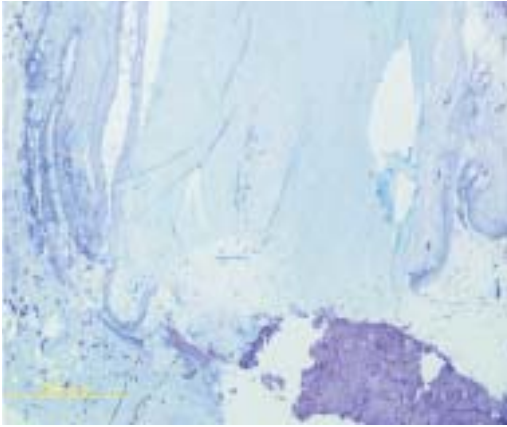
rühm jagunesid omakorda kaheks: 1) kontrollrühmad (vastavalt 9 ja 14 rott); 2) immobiliseeritud katseloomade rühmad (vastavalt 6 ja 14 rott). Immobiliseerimiseks eraldati katseloomad kitsastesse puuridesse. Katseseeriates lõppedes rotid surmati ketamiini ja diazepamami üledoosiga.

Katseloomade kasutamise ja hooldamise tingimused olid kooskõlastatud Tartu Ülikooli eetikakomiteega (grandi nr 3007 raames).

Operatsioonitehnika

Pre- ja postoperatiivne infektsioonide profülaktika toimus ampitsilliiniga – 7,5 mg/kg i/m. Operatsioonid teostati aseptilistes tingimustes, anesteesiaks kasutati i/m ketamiini 50 mg/kg ja diazepamami 5 mg/kg.

Katseplaani lähtudes tehti esimesele katserühmale kinnine fikseerimata murd sääreluu keskosas, teisele katserühmale osteotoomia läbimõõduga 4 mm 1–2 mm sääreluu epifüsaarjoonest allpool pindluu fiksatsiooniga ja kolmandale katserühmale bikortikaalne perforatsioon diameetriga 1,3–1,5 mm sääreluu esiküljel diafüüsi ning epifüüsi vahel.



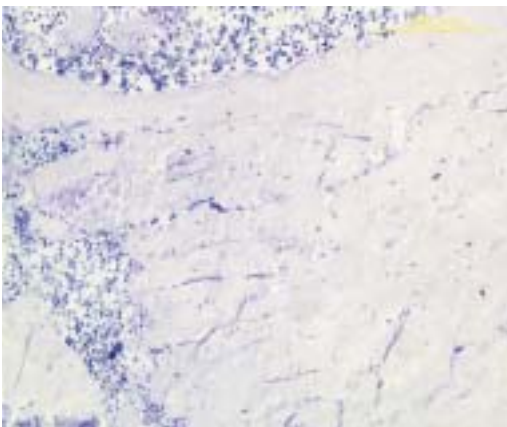
Joonis 1a. Kinnine murd. 4. traumajärgne päev. Mesenhümaalne kude vahemas murdunud luuoste vahele. Toluidiinsinine. Mõõtkava: 200 µm.

Transmissioonelektronmikroskoopia

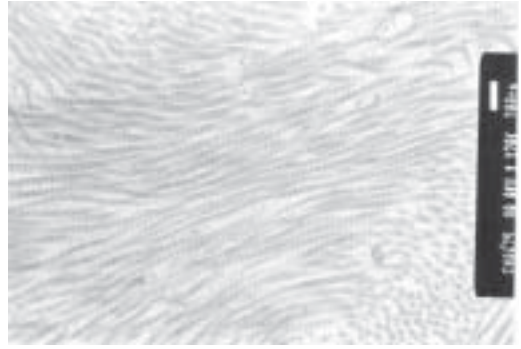
Koematerjal suurusega 0,5 cm fikseeriti 3% glutaaraldehüüdi lahuses ja "värviti" 1% osmiumtetroksiidiga. Eponisestusele järgnes poolpaksude lõikude (0,7 µm) ja seejärel teemantnoaga eriti õhukeste (90 nm) lõikude lõikamine ultramikrotoom Reichert-J Ultracut'i abil. Poolpaksud lõigud värviti toluidiinsinise. Elektronmikroskoopiaks kasutati transmissioonelektronmikroskoopi JEOL JEM-1200 EX II.

Tulemused

Kinnise murru puhul oli 4. traumajärgsel päeval murdunud luude otste vahel rohkesti diferentseerumata mesenhümaalsed rakud sünteesimas kollageenkiude.



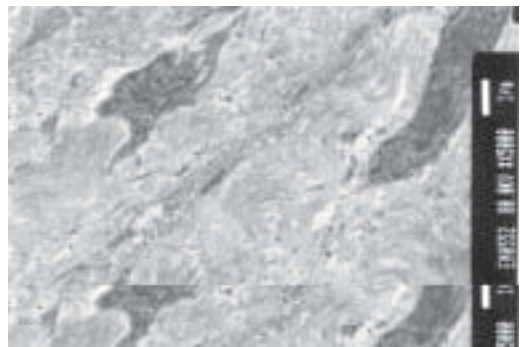
Joonis 2a. Kinnine murd. 7. traumajärgne päev. Fibroosne kude ühendamas traumatiseeritud luude otsi. Toluidiinsinine. Mõõtkava: 200 µm.



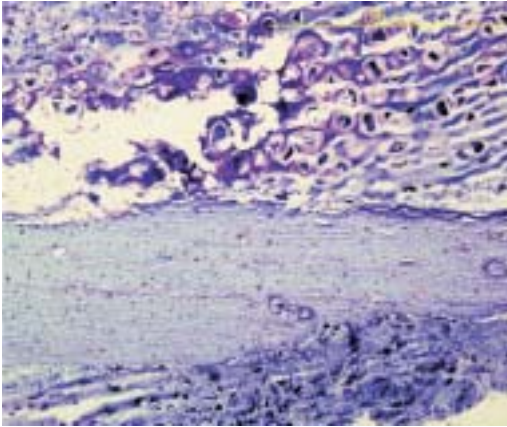
Joonis 1b. Kinnine murd. 4. traumajärgne päev. Diferentseerumata mesenhümaalsed rakud sünteesimas kollageenkiude. Suurendus 20 000 x.

mata mesenhümaalset ja fibroosset kude (vt jn 1a). Fibroblastid ja diferentseerumata mesenhümaalsed rakud sünteesisid kollageenkiude ning ekstratsellulaarmaatriksit (vt jn 1b). 7. traumajärgseks päevaks oli fibroosses koes kollageenkiudude hulk veelgi suurenenud (vt jn 2a ja 2b). 14. päeval pärast traumat oli murru kohas näha ka kondrotsüüte – fibroosne kude oli asendunud kondrofibroosse koega. 28. traumajärgsel päeval oli kõhrkoes luulisi saarekesi (osteoidi, osteoblastide, -tsüütide, -klastidega), kollageeni süntees oli intensiivne (vt jn 3a ja 3b). Kinnise murru korral toimub indirektne/sekundaarne osteohistogenees.

Neljandal traumajärgsel päeval on osteotoomia piirkonnas rohkesti fibroblaste, makrofaage ja lümfotsüüte (vt jn 4a ja 4b). Võrreldes kontrollrühmaga on immobiliseeritud katseloomadel traumatiseeritud rakuvaheaines vähem fibroblaste



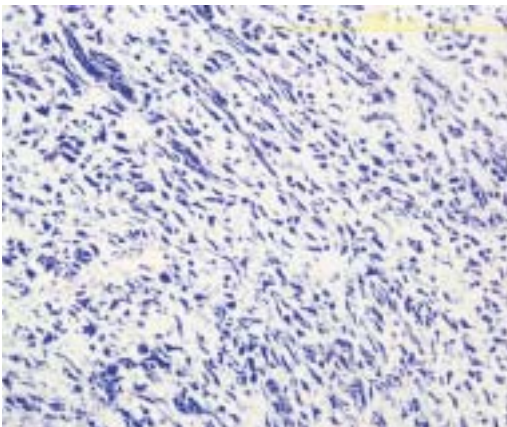
Joonis 2b. Kinnine murd. 7. traumajärgne päev. Kollageen-sünteesitud diferentseerumata mesenhümaalsete rakkude poolt. Suurendus 5000 x.



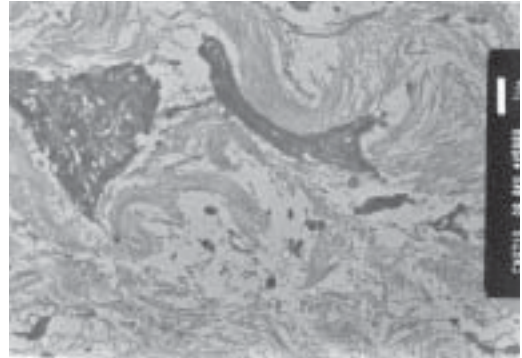
Joonis 3a. Kinnine murd. 28. traumajärgne päev. Luulised saarekesed kõhrkoes. Toluidiinsinine. Mõõtkava: 200 µm.

ja kollageenkiude (vt jn 5a ja 5b). Esimese postoperatiivse nädala lõpul on fibroosne kude asendunud kondrofibroosse koega mõlemas alarühmas (vt jn 6a ja 6b), kuid immobiliseeritud rottidel on kõhrkoe osakaal väiksem (vt jn 7a ja 7b). Osteotoomiajärgne luureparatsioon sarnaneb embrüohistogeneesiga (primaarne periostealne, sekundaarne endostealne ossifikatsioon).

Sääreluu bikortikaalse perforatsiooni järel täidavad esimese nelja päeva jooksul perforatsiooni paiga fibroblastid ja diferentseerumata mesenhümaalsed rakud. Endostealses traumapiirkonnas ei esine kõhrerakke, samal ajal kui periostealne piirkond



Joonis 4a. Osteotoomia. 4. traumajärgne päev. Diferentseerumata mesenhümaalsed rakud ja fibroblastid resektiooni piirkonnas. Toluidiinsinine. Mõõtkava: 200 µm.



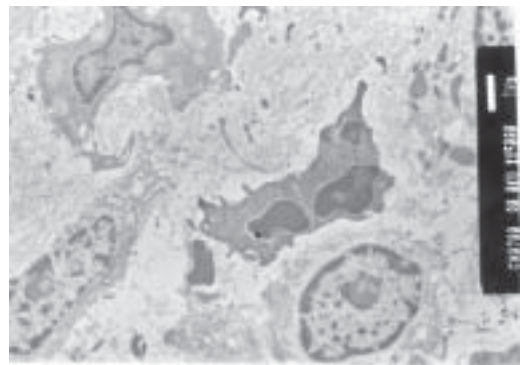
Joonis 3b. Kinnine murd. 28. traumajärgne päev. Osteotsüüdid ja kollageen-I. Suurendus 5000 x.

täitub esimese perforatsiooni järgse nädala lõpuks kondrofibroosse koega (vt jn 8a). Kollageenkiudude süntees on kontrollrühmas intensiivsem kui immobiliseeritud katseloomade rühmas (vt jn 8b ja 8c). Perforatsioonijärgne ossifikatsioon on vastupidi osteotoomiajärgsele luustumisele primaarselt endostealne ja sekundaarselt periostealne.

Arutelu

Posttraumaatilise sääreluu reparatsiooni puhul säilitavad mesenhümaalsed koed suure regeneratsiooni- ja morfoadaptatsioonivõime, kuid reparatsiooni kiirus sõltub trauma tüübist, olles kiireim perforatsiooni järel ning aeglaseim pärast kinnist murdu.

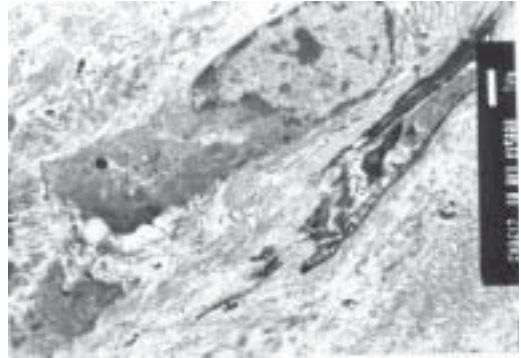
Sarnaselt varem avaldatud kirjandusega (1, 5, 6) on eri liiki traumade järgsel luu reparatsioonil kindlad, üksteisele järgnevad paranemise staadiumid



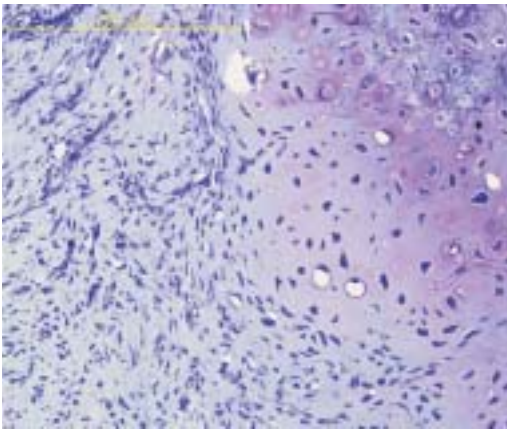
Joonis 4b. Osteotoomia. 4. traumajärgne päev. Fibroblastid ja diferentseerumata mesenhümaalsed rakud ümbritsemas apoptootilist rakku (kondenseerunud kormatiiniga). Suurendus 5000 x.



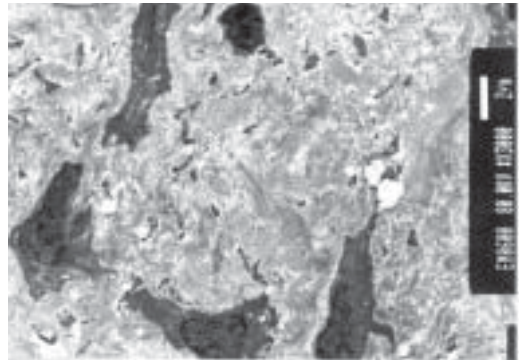
Joonis 5a. Osteotoomia. 4. traumajärgne päev, immobiliseeritud rühm. Trauma piirkonnas väiksem fibroblastide hulk kui kontrollrühmas (vrd jn 7a). Toluidiinsinine. Mõõtkava: 200 μm .



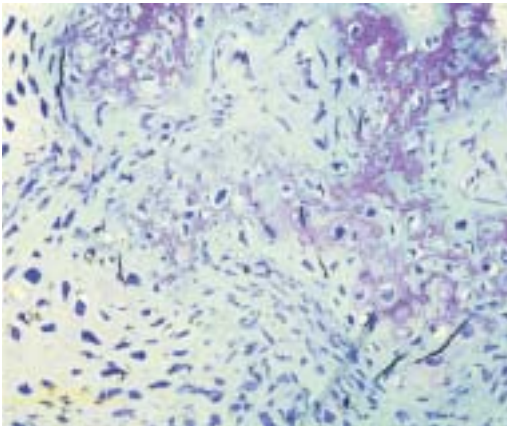
Joonis 5b. Osteotoomia. 4. traumajärgne päev, immobiliseeritud rühm. Diferentseerumata mesenhümaalsed rakud. Suurendus 15 000 x.



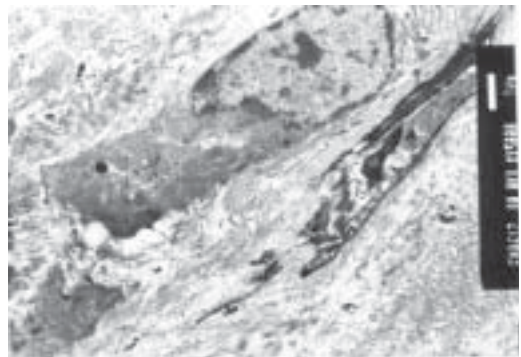
Joonis 6a. Osteotoomia. 7. traumajärgne päev. Kondrofibroosne kude täitmas resektsiooni ala. Toluidiinsinine. Mõõtkava: 200 μm .



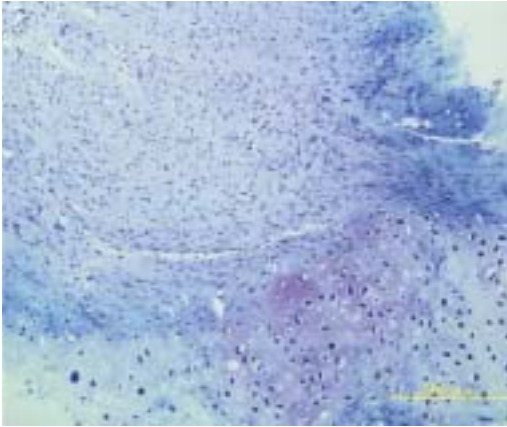
Joonis 6b. Osteotoomia. 7. traumajärgne päev. Kondrotsüüdid sünteesimas kollageenkiude. Suurendus 3000 x.



Joonis 7a. Osteotoomia. 7. traumajärgne päev, immobiliseeritud rühm. Küpsed kondrotsüüdid. Suurendus 15 000 x.



Joonis 7b. Osteotoomia. 7. traumajärgne päev, immobiliseeritud rühm. Küpsed kondrotsüüdid. Suurendus 15 000 x.



Joonis 8a. Perforatsioon. 4. traumajärgne päev, immobiliseeritud rühm. Diferentseerumata mesenhümaalsed rakud perforatsiooni endostealses piirkonnas ühel ajal kondrofibroosse koega periostealses piirkonnas. Toluidiinsinine. Mõõtkava: 200 µm.

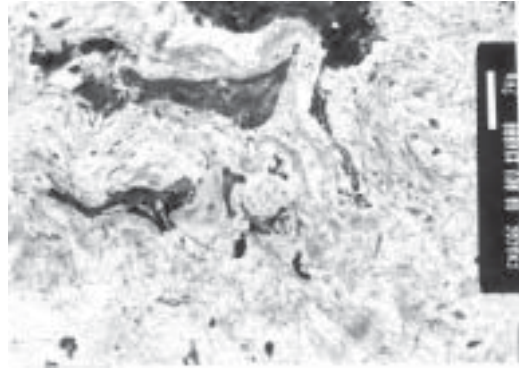
(põletik, fibroosne, kondrofibroosne kallus jne), kuid käesoleva katsega näitasime, et nende staadiumite kestuse ja iseloomu puhul on määravaks trauma tüüp. Kui kinnise murru järel on esimese nädala lõpuks murru kohas näha vaid fibroosset kallust, siis osteotoomia järel täidab samal ajal reparatsiooni paika kondrofibroosne kude.

Luu reparatsiooni mõjutavad mitmesugused mehaanilised, keemilised, endokriinsed jt tegurid (7–9). Katsetes mõjutati luu reparatsiooni treeninguga (ujumine) ja katseloomade immobiliseerimise teel. Leidsime, et treening stimuleerib ning immobiliseerimine vähendab märgatavalt reparatsiooni kiirust (kollageeni sünteesi intensiivsuse langus, kondrofibroosse kalluse hilisem moodustumine jt).

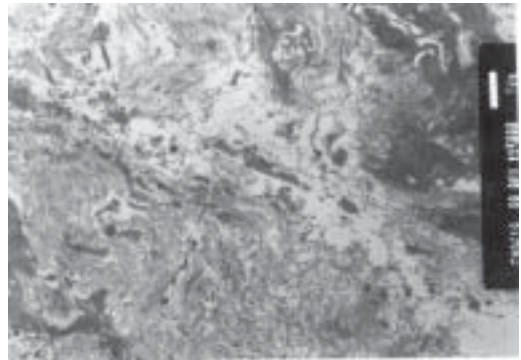
Operatsioonide järel on täheldatud erinevaid luu paranemise tüüpe (10). Elektronmikroskoopilise uuringuga kinnitasime varasemate, peamiselt histoloogiliste, histomorfomeetriliste ja immuunhistokeemiliste, katsete tulemusi (11), et luu reparatsiooni iseloom sõltub trauma tüübist, olles kinnise murru järel indirektn, osteotoomia puhul primaarselt periosteaalne, sekundaarselt endosteaalne ning perforatsiooni järel primaarselt endosteaalne, sekundaarselt periosteaalne.

Kokkuvõte

Luu reparatsiooni võrdlev elektronmikroskoopiline uuring tehti roti sääreluu kinnise murru, osteotoomia



Joonis 8b. Perforatsioon. 7. traumajärgne päev. Diferentseerumata mesenhümaalsed rakud aktiivselt sünteesimas kollageen-I endostealses piirkonnas. Suurendus 4000 x.



Joonis 8c. Perforatsioon. 7. traumajärgne päev, immobiliseeritud rühm. Diferentseerumata mesenhümaalsed rakud nõrgalt sünteesimas kollageen-I endostealses piirkonnas. Suurendus 5000 x.

ja perforatsiooni esimestel operatsiooniärgsetel nädalatel. Osteotoomia ja perforatsiooni katsete puhul jaotati katseloomad kontrolli, treeningu ja immobilisatsiooni alarühmadeks.

Leidsime, et kuigi posttraumaatilisel luu reparatsioonil on üldjoontes sarnased paranemise staadiumid, sõltub luu reparatsiooni iseloom trauma tüübist (kinnise murru järel indirektn, osteotoomia puhul primaarselt periosteaalne, sekundaarselt endosteaalne ning perforatsiooni järel primaarselt endosteaalne, sekundaarselt periosteaalne ossifikatsioon) ja kahjustuse ulatusest, põhjustades erinevates katserühmades spetsiifilisi reparatsiooni erinevusi (treeningul on luu reparatsiooni stimuleeriv, immobilisatsioonil inhibeeriv mõju).

Katsetulemused kinnitasid meie eelnevaid (rutiin)histoloogiliste, histomorfomeetriste ja immuunhistokeemiliste uuringute tulemusi ning andsid olulist informatsiooni rakusiseste muutuste ja intratsellulaarse substantsi sünteesi kohta erinevate traumade korral (ajaliselt erinevate kalluse tüüpide teke).

Tänuavaldus. Südamlikud tänud Tsurumi Ülikooli anatoomia kateedrile, kus Piret Hussar viibis järel-doktorantuuris 2005.–2006. aastal. Uuringuid on toetanud Jaapani Teaduse Edendamise Ühing (JSPS) ja Eesti Teadusfond (grant nr 3007).

Kirjandus

1. Einhorn T. Mechanisms of fracture healing. *Hosp Pract* 1991;26(1):41–5.
2. Cormack DH. *Ham's Histology*. Philadelphia: Lippincott; 1987.
3. Einhorn TA. Enhancement of fracture-healing (Review). *J Bone Joint Surg Am* 1995;77(6):940–56.
4. Hiltunen A, Vuorio E, Aro HT. A standardized experimental fracture in the mouse tibia. *J Orthop Res* 1993;11(2):305–12.
5. Ferguson C, Alpern E, Miclau T, et al. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mech Dev* 1999;87(1–2):57–66.
6. Hall BK. *Bone*. Vol 5: Fracture repair and regeneration. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1992.
7. Schelling SH. Secondary (classical) bone healing (Review). *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 1991;6(1):16–20.
8. Meyer U, Wiesmann HP. *Bone and cartilage engineering*. Heidelberg: Springer-Verlag; 2006.
9. Ueda M. *Tissue engineering*. Nagoya: Nagoya University Press; 1999.
10. Goranson H, Patiala H, Linden M, et al. Histology and histomorphometry of bone regeneration after experimental injuries. *Ann Chir Gynaecol* 1992;81(1):58–65.
11. Hussar P, Piirsoo A, Martson A, et al. Bone healing models in rat tibia after different injuries. *Ann Chir Gynaecol* 2001;90(4):271–9.

Summary

Comparative electronmicroscopic study of bone repair after internal fracture, osteotomy and perforation

Aim. Comparative electronmicroscopic study of bone repair after internal fracture, osteotomy and perforation was performed. The study focused on tibia repair during the first post-traumatic weeks.

Subjects and methods. Altogether 72 male Wistar rats (200–220 g), subdivided in the case of osteotomy and perforation into the control, training (swimming) and immobilization groups, were involved in the experiments.

Results. Although the stages of bone repair were in general similar in all groups, the repair process was dependent on the mode and degree of injury, thus being different in the experimental

groups (with indirect ossification after internal fracture; primary periosteal, secondary endosteal ossification after osteotomy and primary endosteal, secondary periosteal ossification after perforation). Training had a stimulating and immobilization – inhibiting influence on bone repair.

Conclusion. The results gave information about intracellular changes and intercellular matrix synthesis (formation of the callus and its changes) and confirmed our previous reports on similar post-traumatic bone repair studies where basically routine histology, histomorphometry and immunohistochemistry were used.

piret.hussar@ut.ee