

UNIVERSITATEA DE STIINTE AGRICOLE SI
MEDICINA VETERINARA A BANATULUI TIMISOARA
FACULTATEA DE MEDICINA VETERINARA

RAPORT DE CERCETARE
CONTRACT 1075/2010

GHIDAREA REGENERARII OSOASE PERIOSTALE

COD CNCSIS: 130

ETAPA UNICA AN II: 12 DECEMBRIE 2010

Obiectiv: 1. 1. Studiul experimental in vivo al posibilitatilor de influentare a potentialului osteogenic al periostului nativ prin tehnici chirurgicale in situ

ACTIVITATI

- 1.1. Elaborarea unor modele experimentale animale
- 1.2. Testarea compatibilitatii - monitorizarea clinica si paraclinica a modelului animal realizat
- 1.3. Analiza recuperarii morfologice a masei osoase

Obiectiv: 2. 2. Studiul experimental in vivo a posibilitatii de influentare a potentialului osteogenic al periostului nativ prin aditia de celule periostale cultivate in vitro

ACTIVITATI

- 2.1. Elaborarea unor modele experimentale animale
- 2.2. Testarea compatibilitatii - monitorizarea clinica si paraclinica a modelului animal realizat
- 2.3. Analiza recuperarii morfologice a masei osoase - comparatii histopatologice a refacerii masei osoase
- 2.4. Diseminare rezultate.
- 2.5. Audit intern
- 2.6. Raport anual de activitate pentru obiectivul 1 si 2/2010

Director proiect,
Prof. Dr. Igna Cornel

OBIECTIVUL 1

STUDIUL EXPERIMENTAL IN VIVO AL POSIBILITATILOR DE INFLUENTARE A POTENTIALULUI OSTEOGENIC AL PERIOSTULUI NATIV PRIN TEHNICI CHIRURGICALE IN SITU

IPOTEZE

Analiza datelor bibliografice (1-59) relevă următoarele aspecte incomplet elucidate, necunoscute, ambigue sau controversate:

- are periostul o capacitate de ghidare a regenerării osoase în stare să influențeze proprietățile și viteza de formare a osului nou în defectele fracturale ?
- cunoscut fiind potentialul osteogenic al periostului pot fi dezvoltate tehnici de îmbunătățire a ratei de umplere cu os nou a defectelor structurale fracturale ?

ACTIVITATEA 1.1. ELABORAREA UNOR MODELE EXPERIMENTALE ANIMALE

MATERIAL ȘI METODA

Planul de realizare a acestei activitati a presupus organizarea mai multor loturi experimentale, subordonate tipului de manoperă chirurgicală realizată asupra periostului și în consecință divizate în subetape de lucru – tabel 1.

Tabelul 1.

Loturi experimentale

LOTURI CU DEFECTE OSOASE DEPERIOSTATE (neacoperite de periost)	LOTURI CU DEFECTE OSOASE ACOPERITE CHIRURGICAL CU PERIOST
Defect osos tibial partial, neacoperit de periost și consolidat cu o placa de tip DCP (Dynamic Compresion Plate) <i>Indicativ lot – M-dp-1</i>	Defect osos tibial partial, acoperit de periost și consolidat cu o placa de tip DCP (Dynamic Compresion Plate) <i>Indicativ lot – M-p-2</i>
Defect osos tibial partial, plombat cu β fosfat tricalcic, neacoperit de periost și consolidat cu o placa de tip DCP (Dynamic Compresion Plate) <i>Indicativ lot – EPT-dp-1</i>	Defect osos tibial partial, plombat cu β fosfat tricalcic, acoperit de periost și consolidat cu o placa de tip DCP (Dynamic Compresion Plate) <i>Indicativ lot – EPT-p-2</i>
Defect osos tibial partial, plombat cu triturat osos homolog, neacoperit de periost și consolidat cu o placa de tip DCP (Dynamic Compresion Plate) <i>Indicativ lot – ETO- dp-1</i>	Defect osos tibial partial, plombat cu triturat osos homolog, acoperit de periost și consolidat cu o placa de tip DCP (Dynamic Compresion Plate) <i>Indicativ lot – ETO- p-2</i>

Toate animalele incluse in loturile experimentale au fost deparazitate si vaccinate (DHPPI + RL) iar in urma examenului clinic preoperator au primit incadrarea clinic sanatos.

Preoperator pentru fiecare subiect din loturile experimentale s-a efectuat examenul radiologic prin tehnica clasică de radiografiere și prin fluoroscopie, urmărindu-se integritatea oaselor membrelor pe care urmau a fi realizate defectele.

Creerea de defecte osoase parțiale, martor și plombate cu substituenți osoși, neacoperite de periost și consolidate cu o plăci de osteosinteză

Lot – M-dp-1

Defect osos tibial partial, neacoperit de periost și consolidat cu o placă de tip DCP (Dynamic Compression Plate)

Studiul s-a realizat pe 8 câini (tabelul 2), de rasă comună, de ambele sexe, cu vârsta cuprinsă între 2 și 6 ani, cu greutate corporală între 20 și 29 kilograme, la care sub anestezie generală s-a realizat un defect parțial la nivelul diafizei tibiale de aproximativ 1/2 cm. Peste defectul creat nu s-a suturat periostul, acesta rămânând decolat în lateralul defectului. Focarul fractural s-a fixat cu o placă de osteosinteză de tip DCP (Dynamic Compression Plate).

Tabelul 2.

Material biologic Lot – M-dp-1

Subiect	Sex	Greutate (kg)	Vârsta (ani)
1	Mascul	24	2
2	Mascul	22	3 ½
3	Mascul	26	6
4	Femela	23	3 ½
5	Mascul	25	2 ½
6	Mascul	29	4
7	Femela	20	3
8	Femela	27	5

Protocolul anestezic a constat în: administrarea intravenoasă a premedicației anestezice 0,4 mg/kg Acepromazină 1%¹ urmată la interval de 10 minute de 8 mg/kg Ketamină 10%² și inducție narcotică cu Propofol 1%³ (autodozare), după care subiecții au fost intubați și conectați la aparatul de narcoză inhalatorie – circuit închis – cu respirație asistată, narcoza menținându-se pe toată durata intervenției cu Izofluran⁴ la concentrații care au variat între 5 % și 0,5 %, (MAC⁵ 1,5-1,2) acestea fiind corelate cu timpii operatori.

¹ Calmivet – Vetoquinol S.A. (Franța)

² Ketaminol – Intervet BV (UE)

³ Propofol - Fresenius Kabi (Deutschland GmbH)

⁴ Isofluran - CP Pharma GmbH (Germania)

⁵ MAC – Minimum Alveolar Concentration

Intraoperator pacientii au fost **monitorizat**⁶ după un protocol standard neinvaziv care a inclus măsurarea la intervale prestabilite de timp (5 minute) a presiunii arteriale (sistolice, diastolice și medii), măsurarea continuă a saturatiei hemoglobinei în oxigen, frecvenței cardiace, pulsului periferic, frecvenței respiratorii, capnogramului și MAC-ului, și urmărirea permanentă a traseului EKG (derivata DII).

Procedul operator. Abordul regiunii s-a făcut prin acces clasic, prin incizia pielii pe fața medială a tibiei în treimea proximală și evidențierea suprafeței osoase (fig. 1 a), după deperiostarea mecanică a treimii proximale a diafizei mediale a tibiei. Defectele osoase parțiale (doar corticala medială) cu o suprafață de cca 2 cm² (fig.1 b) s-au realizat cu un ferăstrău oscilant⁷ cu lamă de 6 mm.

După îndepărtarea osului, defectul a ramas necoperit, periostul fiind menținut decolat în lateral de marginile defectului.

Consolidarea osoasă s-a făcut prin fixarea unei plăci de osteosinteză de tip DCP 3,5, 3-6 holes, L 35-74 mm stainless steel, folosind șuruburi de corticală – cortex screw L 10-24mm stainless steel⁸, în funcție de terenul anatomic al fiecărui individ (fig. 1 c).

Planul muscular a fost suturat în fir continuu cu material resorbabil⁹ iar pielea s-a suturat în puncte separate cu material neresorbabil (fig. 1 d).

Analgezia postoperatorie a fost asigurată prin administrarea subcutanată de Butorfanol¹⁰ 0,25 mg/kg la interval de 4 ore în primele 12- 24 de ore după intervenție.

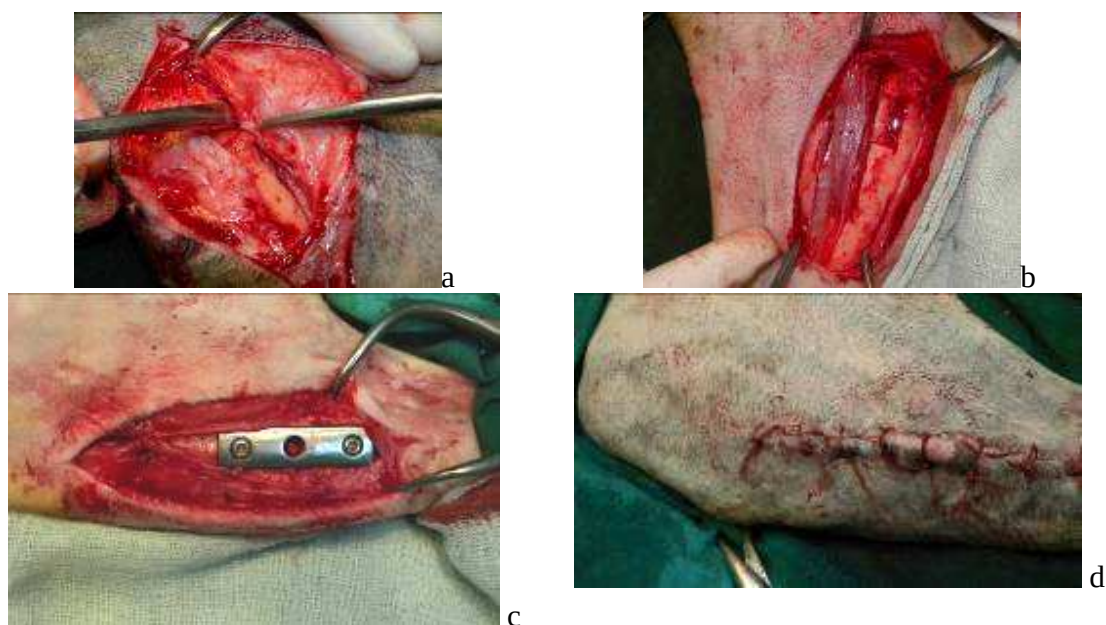


Fig. 1. Aspecte intraoperatorii: a - evidențierea suprafeței osoase, b - defectul osos creat, c – fixarea plăcii de tip DCP 3 holes, d – aspect postoperator după sutura pielii

⁶ monitor Cardell 9405 și Capnomac Ultima Datex

⁷ Synthes (Suisse) – Power drive Oscillator

⁸ Synthes (Suisse) – Small fragment DCP implants set

⁹ PDS II 2 metric Ethicon, Johnson & Johnson Ltd.

¹⁰ Butomidol (Austria) Richter-Pharm AG Wels

Îngrijirile postoperatorii au constat în protejarea plăgii cu un pansament steril schimbat la interval de 48 de ore. Antisepsia s-a efectuat la aceleași intervale cu Terramycin spray ¹¹. Pentru a evita autotraumatizarea plăgii, în timpul necesar vindecării (7 zile), fiecărui individ i-a fost aplicat un colier Elisabethan. Pe cale generală timp de 5 zile s-a administrat intramuscular Synulox¹² în doza de 10mg / kgcorp.

Lot – EPT-dp-1

Defect osos tibial partial, plombat cu β fosfat tricalcic, neacoperit de periost și consolidat cu o placă de tip DCP (Dynamic Compression Plate)

Studiul s-a realizat pe 8 câini (tabelul 3), de rasă comună, de ambele sexe, cu vârsta cuprinsă între 2 și 5 ani, cu greutate corporală între 19 și 26 kilograme.

Condiționările preoperatorii, protocolul anestezic, monitorizarea intraoperatorie, abordarea operatorie și creerea defectului osos, fixarea plăcii de osteosinteză, închiderea prin sutură a planului muscular și cutanat, analgezia postoperatorie și îngrijirile postoperatorii au fost identice ca materiale și tehnici utilizate cu cele prezentate la lotul M-dp-1.

După creerea defectului osos și înainte de aplicarea plăcii de osteosinteză, defectul a fost umplut cu β fosfat tricalcic¹³ - fig. 2.

Tabelul 3.

Material biologic Lot – EPT-dp-1

Subiect	Sex	Greutate (kg)	Vârsta (ani)
1	Femela	24	2
2	Mascul	24	2
3	Mascul	25	2 ½
4	Femela	21	4
5	Mascul	20	5
6	Mascul	23	3 ½
7	Femela	19	4
8	Mascul	26	3

¹¹ Terramycin spray – Pfizer Ltd.

¹² Synulox – Pfizer Ltd.

¹³ BioResorb – Oraltronics GmbH (Germania)

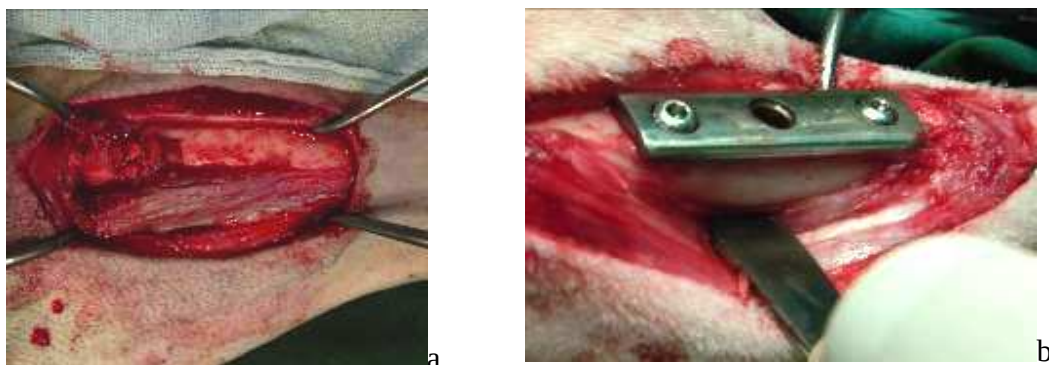


Fig. 2. Aspect intraoperator: a - defect umplut cu β fosfat tricalcic, b - defect acoperit cu placa de tip DCP

Lot – ETO-dp-1

Defect osos tibial partial, plombat cu triturat osos homolog, neacoperit de periost și consolidat cu o placa de tip DCP (Dynamic Compression Plate)

Studiul s-a realizat pe 8 câini (tabelul 4), de rasă comună, de ambele sexe, cu vârsta cuprinsă între 2 și 5 ani, cu greutate corporală între 19 și 25 kilograme.

Condiționările preoperatorii, protocolul anestezic, monitorizarea intraoperatorie, abordarea operatorie și creerea defectului osos, fixarea plăcii de osteosinteză, închiderea prin sutură a planului muscular și cutanat, analgezia postoperatorie și îngrijirile postoperatorii au fost identice ca materiale și tehnici utilizate cu cele prezentate la loturile M-dp-1 și ETP-dp-1.

Tabelul 4.

Material biologic Lot – ETO-dp-1

Subiect	Sex	Greutate (kg)	Vârsta (ani)
1	Mascul	19	2 ½
2	Mascul	23	2
3	Mascul	24	4
4	Femela	25	4 ½
5	Mascul	20	2 ½
6	Mascul	21	3
7	Femela	21	5
8	Femela	19	2

După creerea defectului osos, porțiunea de os prelevată (aproximativ 2 cm²) a fost mărunțită prin tăiere cu un clește ciupitor de os tip Kerryson în fragmente de 0,8-1,1 mm – fig 3. Trituratul osos astfel obținut a fost utilizat la umplerea defectului creat anterior - fig. 3.

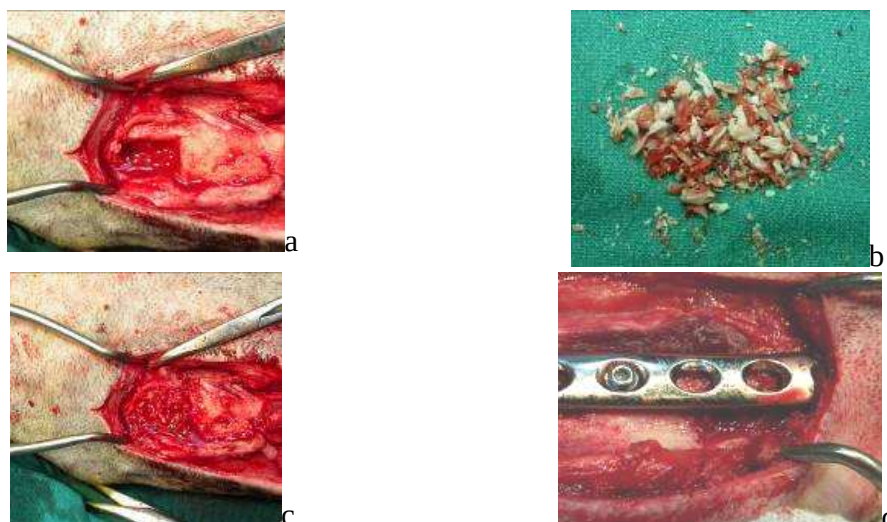


Fig. 3. Aspecte intraoperatorii: a - crearea defectului, b - obținerea trituratului osos homolog, c - umplerea defectului cu triturat osos, d - acoperirea defectului cu o placă de sprijin de tip DCP

Creerea de defecte osoase parțiale, martor și plombate cu substituenți osoși, acoperite de periost și consolidate cu o placă de osteosinteză

Lot – M-p-2

Defect osos tibial parțial, acoperit de periost și consolidat cu o placă de tip DCP (Dynamic Compression Plate)

Studiul s-a realizat pe 8 câini (tabelul 5), de rasă comună, de ambele sexe, cu vârsta cuprinsă între 2 și 5 ani, cu greutate corporală între 20 și 29 kilograme, la care sub anestezie generală s-a realizat un defect parțial la nivelul diafizei tibiale de aproximativ 1/2 cm. Peste defectul creat s-a suturat periostul și s-a fixat focarul fractural cu o placă de osteosinteză de tip DCP (Dynamic Compression Plate)¹⁴.

Tabelul 5.

Material biologic Lot – M-p-2

Subiect	Sex	Greutate (kg)	Vârsta (ani)
1	Mascul	28	4
2	Femela	22	2 ½
3	Mascul	25	5
4	Femela	21	3 ½
5	Femela	24	2
6	Mascul	29	3
7	Femela	20	5
8	Mascul	26	3

¹⁴ Synthes (Suiss) – corespunzător clasificării AO, ASIF

Protocolul anestezic a constat în: administrarea intravenoasă a premedicației anestezice 0,4 mg/kg Acepromazină 1% urmată la interval de 10 minute de 8 mg/kg Ketamină 10% și inducție narcotică cu Propofol 1% (autodozare), după care subiecții au fost intubați și conectați la aparatul de narcoză inhalatorie – circuit închis – cu respirație asistată, narcoza menținându-se pe toată durata intervenției cu Izofluran la concentrații care au variat între 5 % și 0,5 %, (MAC¹⁵ 1,5-1,2) acestea fiind corelate cu timpii operatori.

Intraoperator pacienții au fost **monitorizați** după un protocol standard neinvaziv care a inclus măsurarea la intervale prestabilite de timp (5 minute) a presiunii arteriale (sistolice, diastolice și medii), măsurarea continuă a saturației hemoglobinei în oxigen, frecvenței cardiace, pulsului periferic, frecvenței respiratorii, capnogramului și MAC-ului, și urmărirea permanentă a traseului EKG (derivata DII).

Procedul operator. Abordul regiunii s-a făcut prin acces clasic, prin incizia pielii pe fața medială a tibiei în treimea proximală și evidențierea suprafeței osoase (fig. 4. a), după deperiostarea mecanică a treimii proximale a diafizei mediale a tibiei. Defectele osoase parțiale (doar corticala medială) cu o suprafață de cca 2 cm² (fig. 4 b) s-au realizat cu un ferăstrău oscilant¹⁶ cu lamă de 6 mm.

După îndepărtarea osului, peste defect, s-a suturat periostul cu material resorbabil¹⁷ în puncte separate.

Consolidarea osoasă s-a făcut prin fixarea unei plăci de osteosinteză de tip DCP 3,5 mm, 3-6 holes, L 35-74 mm stainless steel, folosind șuruburi de corticală – cortex screw L 10-24 mm stainless steel¹⁸, în funcție de terenul anatomic al fiecărui individ.

Planul muscular a fost suturat în fir continuu cu material resorbabil iar pielea s-a suturat în puncte separate cu material neresorbabil.

Analgezia postoperatorie a fost asigurată prin administrarea subcutanată de Butorfanol¹⁹ 0,25 mg/kg la interval de 4 ore în primele 12- 24 de ore după intervenție.

Ingrijirile postoperatorii au constat în protejarea plăgii cu un pansament steril schimbat la interval de 48 de ore. Antisepsia s-a efectuat la aceleași intervale cu Terramycin spray²⁰. Pentru a evita autotraumatizarea plăgii, în timpul necesar vindecării (7 zile), fiecărui individ i-a fost aplicat un colier Elisabethan. Pe cale generală timp de 5 zile s-a administrat intramuscular Synulox²¹ în doza de 10mg / kgcorp.

¹⁵ MAC – Minimum Alveolar Concentration

¹⁶ Synthes (Suiss) – Power drive Oscillator

¹⁷ PDS II 2 metric Ethicon, Johnson & Johnson Ltd.

¹⁸ Synthes (Suiss) – Small fragment DCP implants set

¹⁹ Butomidol (Austria) Richter-Pharm AG Wels

²⁰ Terramycin spray – Pfizer Ltd.

²¹ Synulox – Pfizer Ltd.



Fig. 4. Aspecte intraoperatorii: a – evidențierea suprafeței osoase, crearea defectului, b – defect peste care s-a suturat periostul și s-a consolidat cu placă de tip DCP

Lot – EPT-p-2

Defect osos tibial partial, plombat cu β fosfat tricalcic, acoperit de periost și consolidat cu o placă de tip DCP (Dynamic Compression Plate)

Studiul s-a realizat pe 8 câini (tabelul 6), de rasă comună, de ambele sexe, cu vârsta cuprinsă între 2 ½ și 5 ani, cu greutate corporală între 18 și 27 kilograme.

Condiționările preoperatorii, protocolul anestezic, monitorizarea intraoperatorie, abordarea operatorie și crearea defectului osos, fixarea plăcii de osteosinteză, închiderea prin sutură a periostului, a planului muscular și cutanat, analgezia postoperatorie și îngrijirile postoperatorii au fost identice ca materiale și tehnici utilizate cu cele prezentate la lotul M-p-2.

După crearea defectului osos și înainte de aplicarea plăcii de osteosinteză, defectul a fost umplut cu β fosfat tricalcic²² peste care s-a suturat periostul (fig. 5).

Tabelul 6.

Material biologic Lot – EPT-p-2

Subiect	Sex	Greutate (kg)	Vârsta (ani)
1	Mascul	23	4
2	Mascul	20	3
3	Femela	24	2 ½
4	Femela	21	5
5	Mascul	27	3
6	Mascul	25	3 ½
7	Femela	18	2 ^{1/2}
8	Femela	22	4

²² BioResorb – Oraltronics GmbH (Germania)

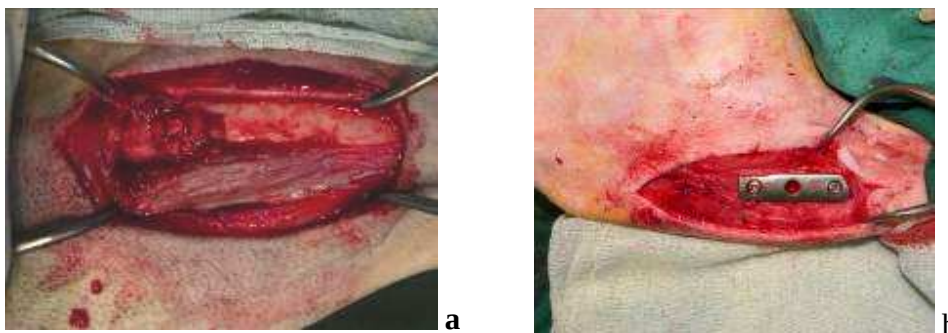


Fig. 5. Aspecte intraoperatorii: a – plombarea defectului cu β -fosfat tricalcic, b- sutura periostului peste defect și consolidarea cu placă de tip DCP

Lot – ETO- p-2

Defect osos tibial partial, plombat cu triturate osos homolog, acoperit de periost și consolidat cu o placa de tip DCP (Dynamic Compression Plate)

Studiul s-a realizat pe 8 câini (tabelul 7), de rasă comună, de ambele sexe, cu vârsta cuprinsă între 2 și 5 ani, cu greutate corporală între 19 și 25 kilograme.

Condiționările preoperatorii, protocolul anestezic, monitorizarea intraoperatorie, abordarea operatorie și crearea defectului osos, fixarea plăcii de osteosinteză, închiderea prin sutură a periostului, a planului muscular și cutanat, analgezia postoperatorie și îngrijirile postoperatorii au fost identice ca materiale și tehnici utilizate cu cele prezentate la loturile M-p-2 și ETP-p-2.

Tabelul 7.

Material biologic Lot – ETO-p-2

Subiect	Sex	Greutate (kg)	Vârsta (ani)
1	Mascul	19	2 ½
2	Mascul	23	2
3	Mascul	24	4
4	Femela	25	4 ½
5	Mascul	20	2 ½
6	Mascul	21	3
7	Femela	21	5
8	Femela	19	2

După crearea defectului osos, porțiunea de os prelevată (aproximativ 2 cm²) a fost marunțită prin tăiere cu un clește ciupitor de os tip Kerryson în fragmente de 0,8 -1,1 mm (fig. 6 a). Trituratul osos astfel obținut a fost utilizat la umplerea defectului creat, peste care ulterior s-a suturat periostul (fig. 6 b).



Fig. 6. Aspecte intraoperatorii: a – obținerea trituratului osos, b – defect umplut cu triturat peste care s-a suturat periostul și s-a consolidat cu placă de tip DCP

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Modelul experimental propus este realizabil fără a se întâmpina dificultăți tehnice deosebite în ceea ce privește crearea defectelor, plombarea lor cu substituenți osoși și acoperirea lor cu periost și fixarea placilor de osteosinteză de susținere (sprijin) peste focarul fractural.

Modelul animal canin ofera avantajul, fata de animalele de laborator, folosirii instrumentarului ortopedic uzual pentru animale de companie.

CONCLUZII

Cele șase modele experimentale canine sunt realizabile fără a se întâmpina dificultăți tehnice deosebite.

ACTIVITATEA 1.2. TESTAREA COMPATIBILITĂȚII – MONITORIZAREA CLINICĂ ȘI PARACLINICĂ A MODELULUI ANIMAL REALIZAT

Monitorizarea postoperatorie a loturilor de modele animale s-a realizat pentru o perioadă de 63 de zile, prin:

- **examen clinic** zilnic timp de 21 zile postoperator urmărindu-se:
 - statusul clinic general,
 - aspectul plăgilor postoperatorii și vindecarea inciziei,
 - sensibilitatea dureroasă la palpare,
 - comportamentul,
 - temperatura corporală;
 - locomotia, interesând gradul de șchiopătură (tabelul 8) și intervalul de timp cât persistă tulburările locomotorii.

Tabelul 8.

Scala de evaluare a gradului șchiopăturii

Gradul	Descriere
0	Atitudine normală atât în stațiune cât și în mers – fără șchiopătură
1	Dificultăți în mers, mai ales la pas alert – șchiopătură discretă
2	Dificultăți în mers, șchiopătură intermitentă în mers rapid
3	Șchiopătură evidentă la fiecare pas, durere
4	Membrul este scos din sprijin atât în stațiune cât și în mișcare, durere intensă

- **examen radiologic** prin fluoroscopia zonei de interes preoperator, imediat postoperator și la interval de șapte zile până la 63 de zile postoperator, urmărindu-se: reacția tisulară la nivelul defectului și în vecinătate precum și modificările radioopacității la nivelul defectului.

Pentru examinarea fluoroscopică toți subiecții au fost anesteziați la fiecare examinare, s-au folosit Acepromazina 2% 0,2 mg/kg, Ketamină 10% 3 mg/kg administrate intravenos și narcoză inhalatorie pe masca cu Izofluran la concentrație de 1% timp de aproximativ 15 minute pentru fiecare examinare.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

În perioada postoperatorie imediată s-a constatat la toți indivizii luați în studiu un status clinic general bun, fără tulburări de locomotie și cu un comportament alimentar normal. Ingerarea primului tain postoperator s-a făcut la un interval de maxim 6 ore, fapt ce dovedește eficiența medicației analgezice în recuperarea postoperatorie.

Sensibilitatea algică la palparea plăgii și a regiunii adiacente plăgii operatorii a fost prezentă în primele 3-4 zile postoperator și a dispărut complet la 7 zile, indiferent de tipul manoperei chirurgicale practică.

Valorile temperaturii corporale s-au încadrat în limitele fiziologice.

La examinarea mersului postoperator s-a observat șchiopătură de gradul 2 la toți subiecții în primele 3 zile postoperator, următoarele 4 zile a mai putut fi observată schiopătură de gradul 1, după 7 zile postoperator semnele de șchiopătură dispar.

Vindecarea plăgii operatorii s-a realizat primar la toți indivizii incluși în experiment cu excepția subiectului 7 din lotul ETO-p-2 la care datorită spațiului limitat de mișcare și a comportamentului agitat s-a produs dehiscența plăgii pe o lungime de 2 cm, (fig. 7) plagă care ulterior a fost resuturată și s-a vindecat secundar în timp de două săptămâni, interval în care a persistat și durerea, de intensitate moderată, la palparea regiunii fără semne de șchiopătură.



Fig. 7. Aspectul plăgilor: a – imagine imediat postoperatorie, b - la 21 de zile postoperator subiect 7 lotul ETO-p-2

LOTURI CU CU DEFECTE OSOASE DEPERIOSTATE (neacoperite de periost)

Lot – M-dp-1

Defect osos tibial parțial, neacoperit de periost și consolidat cu o placă de tip DCP (Dynamic Compression Plate)

Pe parcursul perioadei de monitorizare a lotului M-dp-1 (fig. 8), s-a observat începând cu a 14-a zi postoperator umplerea în proporție de 25% a volumului defectului, la 21 de zile gradul de umplere este de 65%, iar la 28 de zile postoperator defectul este umplut în proporție de 70% la toți subiecții lotului.

La 35 de zile de monitorizare se decelează o reacție periostală discretă proximal de placuță pe fața medială și pe fața cranială a tibiei și umplerea în proporție de 80% a defectului. După 42 de zile de monitorizare defectul este umplut în proporție de 90% cu țesut similar osului sănătos adiacent, reacția periostală se menține discretă. La 49 de zile postoperator defectul este umplut în proporție de 100%.

Finalul perioadei de monitorizare nu relevă modificări comparativ cu imaginile obținute la 49 de zile.



Postoperator



7 zile



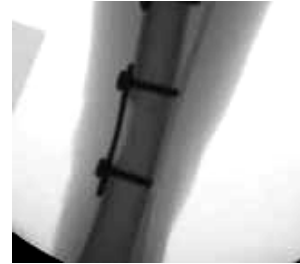
14 zile



21 zile



28 zile



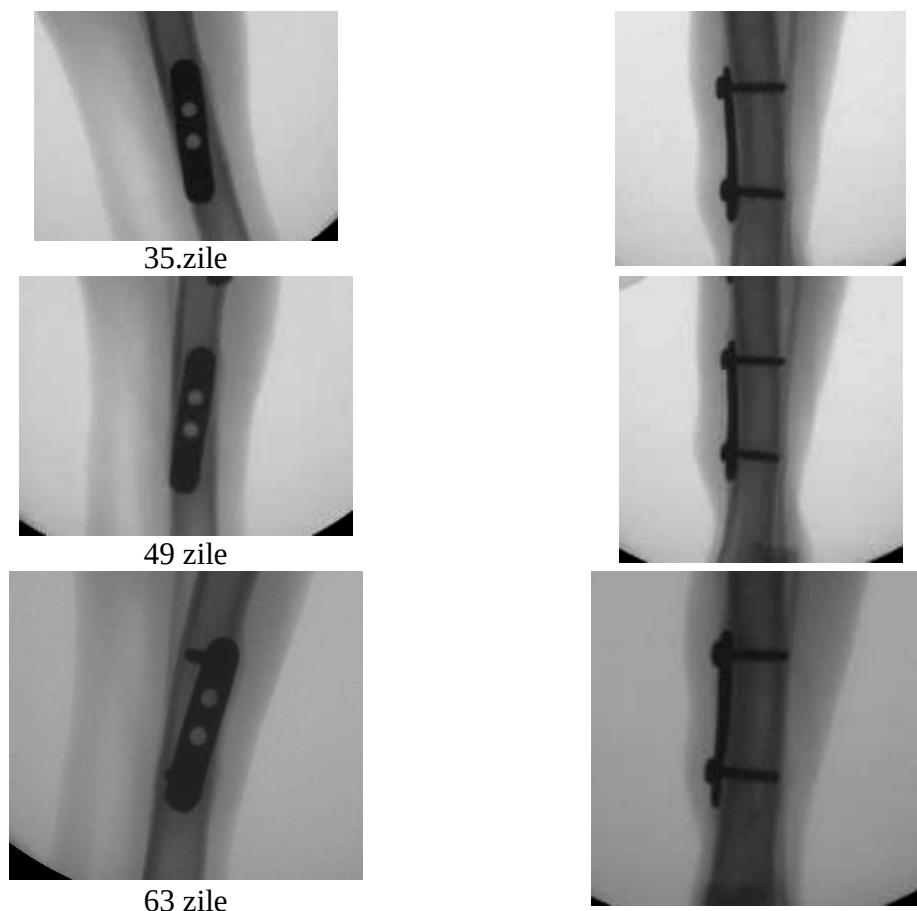


Fig. 8. Monitorizarea radiologică a vindecării osoase la lotul M-dp-1

Lot - EPT-dp-1

Defect osos tibial partial, plombat cu β fosfat tricalcic, neacoperit de periost și consolidat cu o placa de tip DCP (Dynamic Compresion Plate)

În urma examenului radiografic pentru lotul ETP-dp-1 (fig. 9) s-a constatat că la nivelul defectului persistă aspectul neomogen din punct de vedere al radiodensității dat de menținerea materialului cu care s-a plombat defectul (β fosfat tricalcic) în primele 28 de zile postoperator.

La 35 de zile postoperator la nivelul defectului aspectul este omogen din punct de vedere al radiodensității, cu densitate similară țesutului osos sănătos adiacent, aspect care se păstrează până la finalul perioadei de monitorizare.



postoperator



7 zile



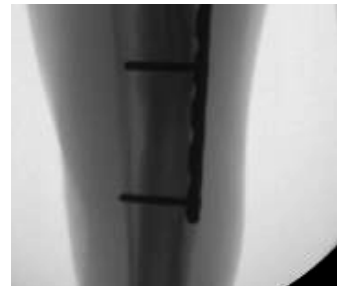
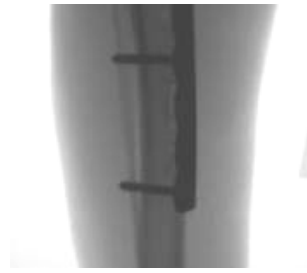
21 zile



28 zile



42 zile



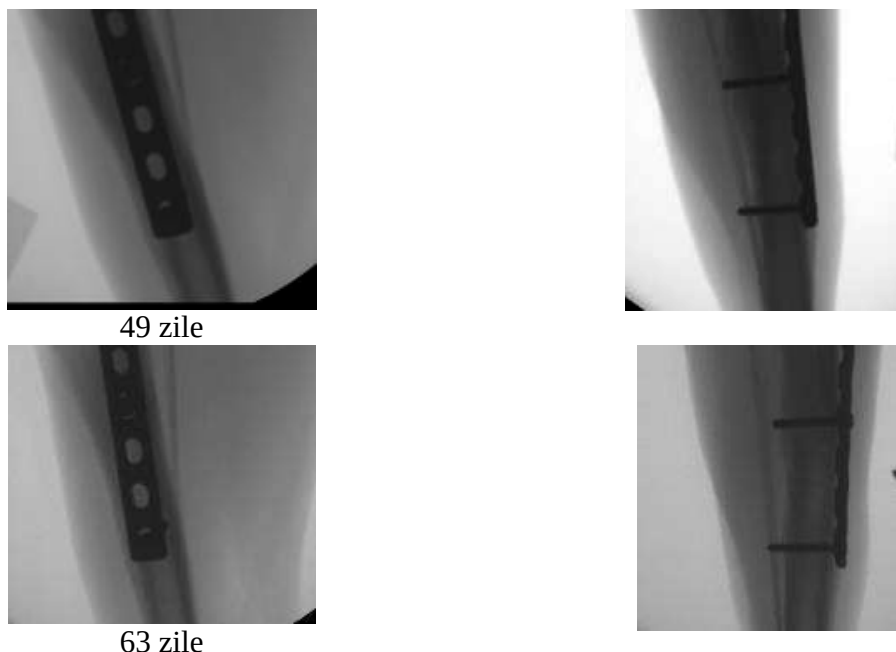


Fig. 9. Monitorizarea radiologică a vindecării osoase la lotul EPT-dp-1.

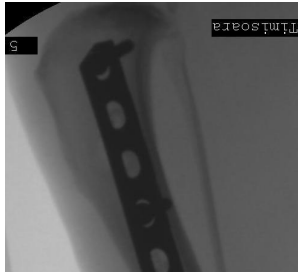
Lot – ETO- dp-1

Defect osos tibial partial, plombat cu triturat osos homolog, neacoperit de periost și consolidat cu o placa de tip DCP (Dynamic Compresion Plate)

Examinarea imaginilor radiografice ale lotului ETO-dp-1 (fig. 10) obținute în primele 28 de zile ale perioadei de monitorizare au decelat la nivelul defectului, persistența aspectului neomogen din punct de vedere al radiodensității dat de menținerea materialului cu care s-a plombat defectul (triturat osos). La 35 de zile postoperator aspectului defectului este omogen din punct de vedere al radiodensității defectului, cu densitate similară țesutului osos sănătos învecinat. La finalul perioadei de monitorizare persistă aceleași caracteristici radiografice decelate la 35 de zile.



postoperator



7 zile



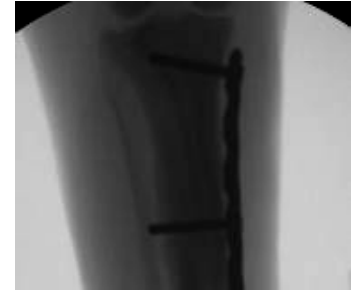
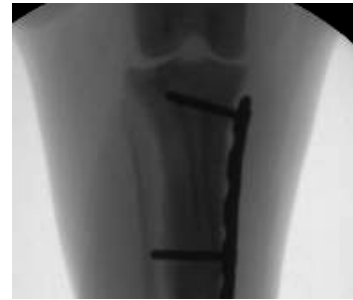
28 zile



35 zile



49 zile





63 de zile



Fig.10. Monitorizarea radiologică a vindecării osoase la lotul ETO-dp-1

Rezultate comune loturi cu deperiostare

Aspectele radiologice specifice vindecării defectelor osoase, sunt vizibile la lotul M-dp-1, începând cu cea de a 14^a zi postoperator în schimb la loturile EPT-dp-1 și ETO-dp-1 datorită materialelor care au plombat defectele aspectul neomogen se păstrează până la 28 de zile postoperator, aspecte similare fiind semnalate de *Koivukangas A.*, (2000), la șobolan. Radiodensitate similara țesutului osos normal la nivelul defectelor, specifică vindecării osoase, este evidentă de la 35 de zile pentru loturile EPT-dp-1 și ETO-dp-1 și de la 49 de zile pentru lotul M-dp-1. Examenenele radiografice realizate ulterior acestor intervale nu decelează modificări ale radiodensității defectelor până la finalul perioadei de monitorizare. Aceste rezultate se încadrează în datele raportate pentru recuperarea țesutului osos de către *Nienhuijs M.E. și col.*, (2010), având ca model experimental capra și *Gao T.J. și col.*, (1997), utilizând ca model experimental oaia. Reacția periostală discretă apărută la lotul M-dp-1 este urmarea fie a stazei asupra periostului realizată de plăcuța de tip DCP, date consemnate și de *Hong și col.*, (2009), *Uhthoff și col.*, (2006), fie a evoluției osteoformatoare a periostului decolat de la substrat.

Vindecarea defectelor se încadrează în limitele fiziologice ale vindecării fracturilor consemnate de *Johnson și col.*, (2005), precum și de *Yuehuei și col.*, (2003), pentru toate cele trei loturi experimentale.

LOTURI CU DEFECTE OSOASE ACOPERITE DE PERIOST

Lot – M-p-2

Defect osos tibial partial acoperit de periost și consolidat cu o placa de tip DCP (Dynamic Compression Plate)

La analiza imaginilor radiografice obținute la lotul M-p-2 (fig. 11) s-a observat că începând cu 14 zile postoperator pot fi observate radiografic modificări la nivelul defectului precum și a zonei învecinate, radiodensitatea țesutului din defect crește treptat până la 42 de zile, când este similară cu cea a țesutului osos sănătos. După acest interval de timp nu mai sunt observate modificări.

La 21 de zile se observă depunerea de țesut de neoformație în procent de 50%, la 28 de zile această depunere ajunge la 65%, cu o umplere de 100% la 42 de zile. Până la încheierea perioadei de monitorizare la 63 de zile volumului acestui țesut rămânând constant.

Dinamica reacției periostale, din punct de vedere a modificării radioopacității țesutului învecinat defectului, este caracterizată de creștere de la 14 până la 42 de zile, după care se constată diminuarea progresivă a radiodensității cu dispariția aproape completă la 63 de zile.



Postoperator



7 zile



14 zile





21 zile



28 zile



35 zile



42 zile



63 zile



Fig.11. Monitorizarea radiologică a vindecării osoase la lotul M-p-2

Lot – EPT-p-2

Defect osos tibial partial, plombat cu β fosfat tricalcic, acoperit de periost și consolidat cu o placa de tip DCP (Dynamic Compression Plate)

Examenul radiologic al imaginilor obținute de la lotul EPT-p-2 (fig. 12) evidențiază la 21 de zile postoperator, radioopacitate ușor crescută pe întreaga suprafață a defectului față de imaginea postoperatorie imediată.

La 28 de zile defectul este umplut până la nivelul corticalei osului normal cu țesut care prezintă o densitate mai redusă (mai radiotransparent) comparativ cu cea a țesutului osos sănătos. Nu se observă reacție periostală.

La 35 de zile postoperator țesutul de neoformație depășește ușor (1-1,5 mm) corticala osoasă, densitatea acestuia rămânând mai redusă decât a țesutului osos sănătos.

Imaginile obținute la 42 de zile postoperator relevă creșterea densității țesutului nou format pe toată suprafața defectului, gradul cu care depășește corticala osoasă este asemănător cu cel de la 35 de zile.

La 56 de zile postoperator se observă umplerea defectului cu țesut care prezintă aceeași densitate ca și țesutul osos sănătos, țesutul neoformat depășește corticala osoasă asemănător cu imaginea de la 35 de zile.

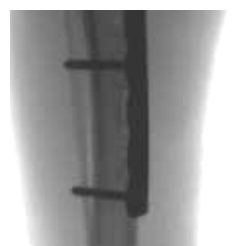
La finalul perioadei de monitorizare nu se observă modificări comparativ cu cele observate la 56 de zile.



postoperator

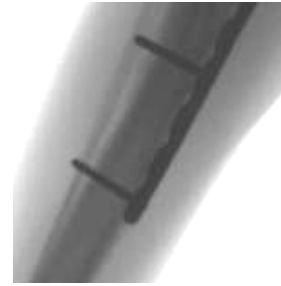


7 zile

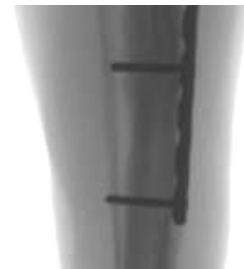




21 zile



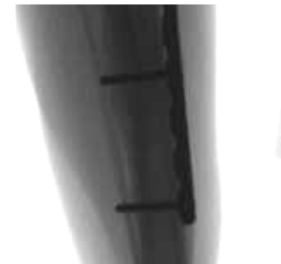
28 zile



35 zile



56 zile



63 zile



Fig. 12. Monitorizarea radiologică a vindecării osoase la lotul EPT-p-2.

Lot – ETO- p-2

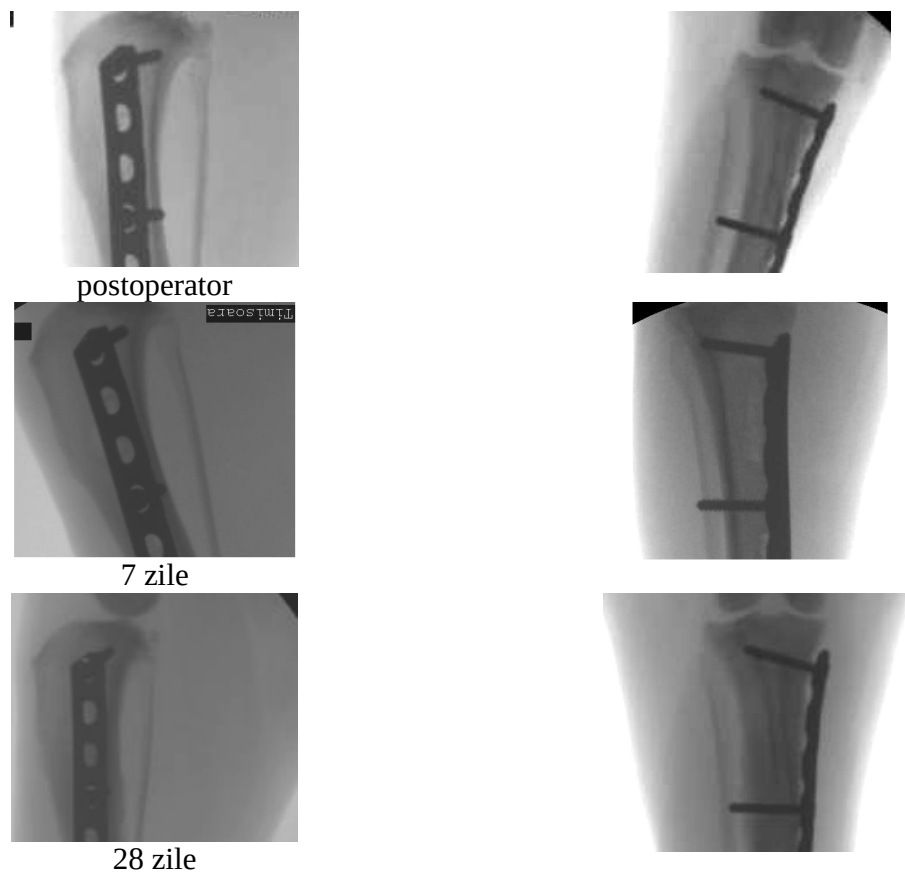
Defect osos tibial partial, plombat cu triturate osos homolog, acoperit de periost și consolidat cu o placa de tip DCP (Dynamic Compression Plate)

Examenul radiologic al subiecților din lotul ETO-p-2, (fig. 13) reliefează începând cu 21 de zile postoperator, radioopacitate ușor crescută pe întreaga suprafață a defectului comparativ cu imaginile obținute în primele două săptămâni postoperator, când predomină aspectul neomogen al trituratului de corticală osoasă.

La 28 de zile defectul este umplut până la nivelul corticalei osului normal cu un țesut care prezintă o densitate asemănătoare cu cea a țesutului osos sănătos. Se observă o ușoară reacție periostală.

La 35 de zile postoperator se observă creșterea densității țesutului nou format pe toată suprafața defectului, gradul de umplere al defectului nu depășește corticala osoasă. Se constată ușoara persistență a reacției periostale observate la 28 de zile.

Finalul perioadei de monitorizare nu prezintă modificări comparativ cu cele observate la 35 de zile.



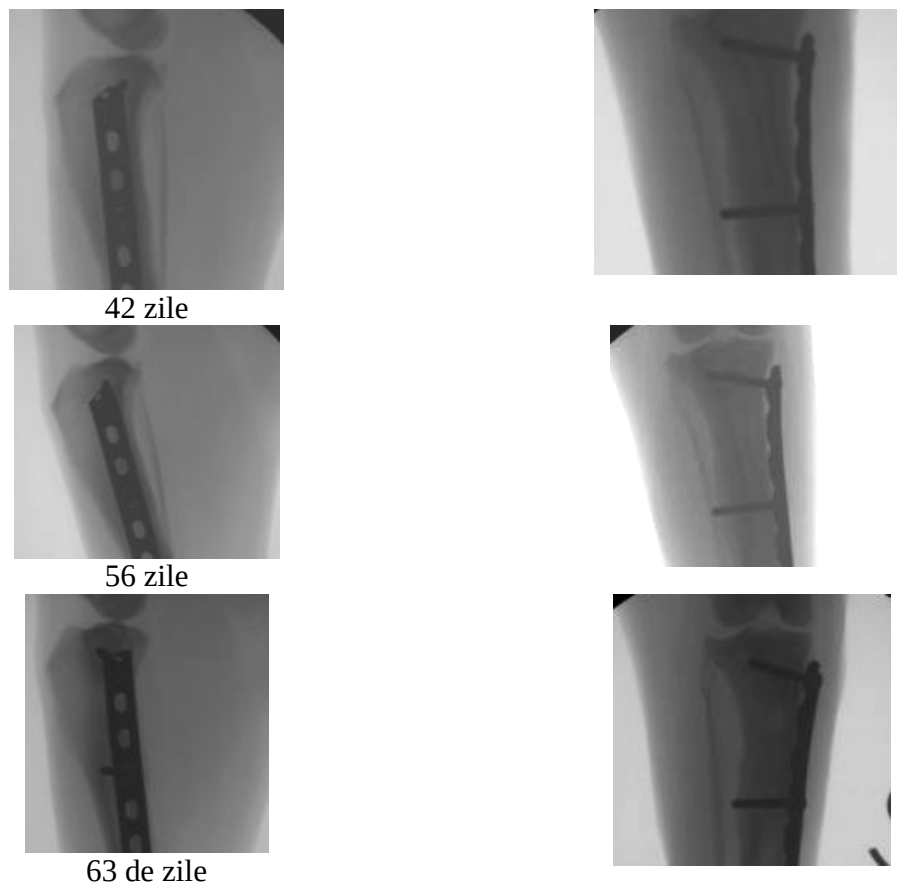


Fig.13. Monitorizarea radiologică a vindecării osoase la lotul ETO-p-2

Rezultate comune loturi cu acoperire periostală

Debutul modificărilor radiografice caracteristice vindecării osoase a defectelor loturilor M-p-2, EPT-p-2 și ETO-p-2 se realizează aproximativ la același interval de timp postoperator 21, 28 de zile, aspecte semnalate la copii de *Islam și col., (2000)*.

Încheierea vindecării din punct de vedere radiologic prin absența modificării radiodensității țesutului de la nivelul defectului comparativ cu țesutul osos normal aflat în vecinătate, este observată la 35 de zile la lotul EPT-p-2, la 42 de zile pentru lotul ETO-p-2 și la 49 de zile în cazul lotului M-p-2. Aceste intervale de timp scurse de la momentul intervenției chirurgicale sunt cu 7-14 zile mai scurte decât limitele fiziologice ale vindecării osoase descrise de *Yuehuei și col., (2003)*, la câine.

Rezultatele privind viteza vindecării osoase la cele două categorii de loturi (cu și fără acoperire periostală) sunt redată sintetic în tabelul 9 și fig. 14.

Tabelul 9.

Evoluția vindecării defectelor osoase

Lotul	Intervalul de timp – zile							
	14 zile	21 zile	28 zile	35 zile	42 zile	49 zile	56 zile	63 zile
M-dp-1	25%	65%	70%	80%	90%	100%	100%	100%
	mai radiotransparent decât țesutul osos normal					densitate similară țes osos normal		
EPT-dp-1	60% *	80% *	90%	100%	100%	100%	100%	100%
	aspect neomogen* - mai radiotransparent decât țesutul osos normal			densitate similară țes osos normal				
ETO-dp-1	65% *	75% *	90%	100%	100%	100%	100%	100%
	aspect neomogen* - mai radiotransparent decât țesutul osos normal			densitate similară țes osos normal				
M-p-2	30%	50%	65%	85%	100%	100%	100%	100%
	mai radiotransparent decât țesutul osos normal				densitate similară țes osos normal			
EPT-p-2	75% *	85% *	95%	100%	100%	100%	100%	100%
	aspect neomogen* - mai radiotransparent decât țesutul osos normal			densitate similară țes osos normal				
ETO-p-2	75% *	90%	95%	100%	100%	100%	100%	100%
	aspect neomogen* - mai radiotransparent decât țesutul osos normal			densitate similară țes osos normal				

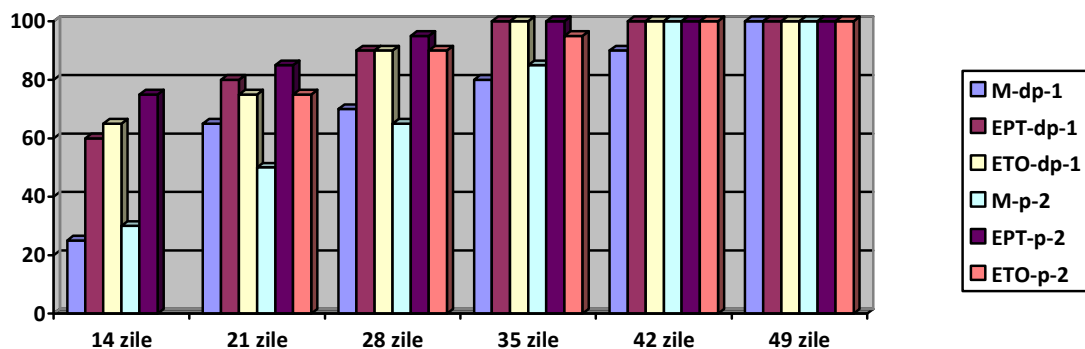


Fig. 14. Reprezentarea grafică a evoluției vitezei de vindecare la cele două categorii de loturi (cu și fără acoperire periostală)

CONCLUZII

Vindecarea osoasă din punct de vedere radiografic se realizează mai repede cu 7-14 zile în cazul defectelor acoperite cu periost comparativ cu cele la care nu s-a suturat periostul.

Adiția substituenților osoși la nivelul focarului de fractură accelerează vindecarea osoasă, monitorizată radiologic, cu aproximativ 7 zile față de defectele neplombate. Constatarea include o diferențiere valabilă atât pentru loturile cu defecte neacoperite de periost cât și pentru cele la care s-a realizat acoperirea periostală.

ACTIVITATEA 1.3. ANALIZA RECUPERĂRII MORFOLOGICE A MASEI OSOASE

Pentru a putea fi stabilit cu exactitate tipul de țesut osos nou format la nivelul defectelor s-a impus analiza recuperării morfologice a masei osoase, realizată prin **examinări histologice** și **osteodensimetrie**.

MATERIALE ȘI METODE

Pentru realizarea acestei etape la finalul perioadei de monitorizare de la toți subiecții fiecărui lot s-au recoltat probe biologice de os de la nivelul defectelor în vederea stabilirii recuperării morfologice a masei osoase prin microscopie clasică și prin osteodensimetrie.

Pentru recoltarea probelor biologice la finalul perioadei de monitorizare subiecții au fost supuși unei noi intervenții chirurgicale.

Protocolul anestezic a constat în: administrarea intravenoasă a premedicației anestezice 0,4 mg/kg Acepromazină 1%²³ urmată la interval de 10 minute de 8 mg/kg Ketamină 10%²⁴ și inducție narcotică cu Propofol 1%²⁵ (autodozare), după care subiecții au fost intubați și conectați la aparatul de narcoză inhalatorie – circuit închis – cu respirație asistată, narcoza menținându-se pe toată durata intervenției cu Izofluran²⁶ la concentrații care au variat între 5 % și 0,5 %, (MAC 1,5-1,2) acestea fiind corelate cu timpii operatori.

Intraoperator pacienții au fost **monitorizați**²⁷ după un protocol standard neinvaziv care a inclus măsurarea la intervale prestabilite de timp (5 minute) a presiunii arteriale (sistolice, diastolice și medii), măsurarea continuă a saturației hemoglobinei în oxigen, frecvenței cardiace, pulsului periferic, frecvenței respiratorii, capnogramului și MAC-ului, și urmărirea permanentă a traseului EKG (derivata DII).

Procedul operator. Abordul regiunii s-a făcut prin acces clasic, prin incizia pielii pe fața medială a tibiei în treimea proximală și evidențierea plăcii pe suprafața osoasă, s-a îndepărtat placa și s-au recoltat probe de os cu dimensiuni de 0,5/1 cm. Fixarea osoasă s-a efectuat cu diferite mijloace și tehnici de osteosinteză internă conform unui plan de studiu corespunzător anului III al proiectului.

Planul muscular a fost suturat în fir continuu cu material resorbabil iar pielea s-a suturat în puncte separate cu material neresorbabil.

Analgezia postoperatorie a fost asigurată prin administrarea subcutanată de Butorfanol²⁸ 0,25 mg/kg la interval de 4 ore în primele 12 de ore după intervenție..

Postoperator timp de 5 zile a fost asigurată antibioterapia (Synulox, Pfizer).

Prelucrarea probelor de os în vederea realizării examenului osteodensimetric și ulterior al celui histologic s-a realizat după următorul protocoale:

²³ Calmivet – Vetoquinol S.A. (Franța)

²⁴ Ketaminol – Intervet BV (UE)

²⁵ Propofol - Fresenius Kabi (Deutschland GmbH)

²⁶ Isofluran - CP Pharma GmbH (Germania)

²⁷ monitor Cardell 9405 și Capnomac Ultima Datex

²⁸ Butomidor (Austria) Richter-Pharme AG Wels

Fragmentele de os cu periost au fost introduse în băi seriate de alcool etilic pentru deshidratare. Protocolul de deshidratare este redat în tabelul 10.

Tabelul 10.

Etapele deshidratării în vederea înglobării
(conform prospectului Technovit 9100 New al producătorului Hereus Kulzer)

Etapă	Soluție	Concentrație	Timp
Deshidratare -1	Etanol	70%	1 h
Deshidratare -2	Etanol	80%	1 h
Deshidratare -3	Etanol	96%	1 h
Deshidratare -4	Etanol	96%	1 h
Deshidratare -5	Etanol	absolut	1 h
Deshidratare -6	Etanol	absolut	1 h
Deshidratare -7	Etanol	absolut	1 h

După deshidratarea pieselor au urmat două băi intermediare în xilen, premergătoare etapelor de preinfiltrare, respectiv de infiltrare.

În vederea obținerii secțiunilor histologice cu ajutorul microtomului cu disc diamantat Leica SP1600, speciemenele au fost înglobate după protocolul sistemului Technovit 9100 New (figura 15), care presupune etapele de preinfiltrare, infiltrare și înglobare propriu-zisă.



Fig. 15. Sistemul de înglobare Technovit 9100 New

Tabelul 11.

Etapale preinfiltrării și infiltrării
(conform prospectului Technovit 9100 New al producătorului Hereus Kulzer)

Etapă	Soluție	Timp
Preinfiltrare-1	Technovit 9100 New Basic (stabilizată)	1h
Preinfiltrare-2	Technovit 9100 New Basic (stabilizată) + Întăritor 1	1h
Preinfiltrare-3 (4°C)	Technovit 9100 New Basic (destabilizată) + Întăritor 1	1h
Infiltrare (4°C)	Technovit 9100 New Basic (stabilizată) + Întăritor 1 + Pudră PMMA	1h -2 sau 3 zile

Tabelul 12.

Componentele sistemului Technovit 9100 New

Nr. crt.	Componentă	Cantitate
1	Soluție Basic	1000 ml
2	Pudră PMMA	120 g
3	Întăritor 1	8 plicuri a 1 g
4	Întăritor 2	10 ml
5	Reglator de polimerizare	5 ml

Soluția Basic este compusă din monomeri – molecule organice cu cel puțin o dublă legătură carbon-carbon. Se folosește atât în formă stabilizată (livrată de producător), cât și destabilizată.

Destabilizarea soluției a fost realizată prin trecerea acesteia printr-o coloană de cromatografie în care se găsește oxid de aluminiu. Soluția destabilizată a fost depozitată în flacoane brune la 4°C.

Pudra PMMA este alcătuită din microparticule de polimetilmetacrilat (PMMA) și este folosită pentru a reduce acțiunea contractilă exercitată de procesul de polimerizare asupra probei tisulare (polimerisation shrinking), pentru a diminua energia termică generată de acest proces și pentru a îmbunătăți calitățile polimerizării.

Întăritorul 1 este un derivat de dibenzoil peroxid care, în combinație cu întăritorul 2, declanșează polimerizarea.

Întăritorul 2 este cea de-a doua componentă a sistemului de inițiere a polimerizării și acționează ca un catalizator asupra întăritorului 1 pentru a permite polimerizarea chiar și la temperaturi sub 0°C.

Reglatorul de polimerizare este un compus organic care asigură polimerizarea controlată chiar și a unor cantități mari de polimer, fără o creștere semnificativă a temperaturii în timpul reacției.

Tabelul 13.

Prepararea soluțiilor de lucru din componentele sistemului Technovit 9100 New

Componentă/ Etapă	Soluție Basic	Pudră PMMA	Întăritor 1	Întăritor 2	Reglator de polimerizare	Depozitare
Preinfiltrare	200 ml		1g			temp. camerei
Infiltrare	250 ml	20 g	1 g/2 g			4°C
Înglobare A	500 ml	80 g	3 g/4 g			4°C
Înglobare B	50 ml			4 ml	2 ml	4°C

Prepararea mixturii de înglobare și înglobarea pieselor histologice

Amestecul de înglobare a fost realizat prin combinarea a două părți soluție A cu o parte soluție B, chiar înainte de folosire. Cele două soluții au fost introduse într-un pahar Berzelius și omogenizate cu o baghetă de sticlă. Fragmentele de os au fost poziționate în recipiente din PVC și acoperite complet cu mixtura de înglobare. Aceste recipiente au fost introduse apoi în cuva unui aspirator chirurgical, creând vacuum parțial timp de 15-20 de minute, timp în care mixtura s-a solidificat. Continuarea procesului de polimerizare a fost asigurată prin menținerea specimenelor la temperatura de -20°C, timp de 24 de ore (valoare termică și interval de timp recomandate de producător). Specimenele au fost apoi menținute la temperatura de refrigerare pentru o oră, urmând ca înainte de realizarea secțiunilor să fie lăsate în repaus pentru a ajunge la temperatura camerei.

Examinarea osteodensimetrică

Absorbția duală a energiei (DXA) a fost folosită pentru măsurarea conținutului mineral al osului (BMC) și a densității minerale osoase (BMD).

Specimenele înglobate au fost supuse determinării densității osoase, această etapă s-a realizat cu ajutorul osteodensimetrului Hologic Delphy W Elite, produs de *Hologic*, USA iar analiza probelor osoase s-a realizat cu programul Hologic 11.1:7.

Pentru acuratețea rezultatelor examinarea osteodensimetrică s-a realizat de două ori pentru fiecare probă, în plan longitudinal, rotațional și vertical, cu rotirea 180° a piesei pentru a doua determinare.

Imaginile obținute au fost supuse analizei pixelilor folosind un software de achiziție pentru coloana vertebrală lombară umană cu absorbția fonică a razelor X.

Zona scanată (cm²), conținutul mineral al osului (BMC)(g) și densitatea osoasă (BMD, g/cm², pentru fiecare determinare au fost înregistrate de software-ul Hologic 11.1:7.

Ca parte a procedurii de control al calității s-a reluat scanarea probelor dacă a existat o diferență mai mare de 1 cm² a ariei scanate între cele două determinări.

Secționarea pentru prelucrare histologică

Specimenele au fost fixate cu o rășină epoxidică pe plăcuța port-piesă și au fost instalate în suportul aparatului (fig. 16).

Secțiunile au fost efectuate în plan perpendicular pe axul lung al osului.



Fig. 16. Aspectul microtomului cu specimenul pregătit pentru nivelare

În prima fază a fost stabilit nivelul la care trebuie regularizată suprafața specimenului, astfel încât să fie obținută o secțiune prin toată grosimea fragmentului osos. După regularizarea suprafeței probei a fost reglată microviza microtomului pentru a obține secțiuni cu o grosime de 30 micrometri.

Secționarea a fost făcută cu o viteză de avans redusă și răcire abundantă cu jet de apă pentru a preveni crearea de vibrații ale discului diamantat și, consecutiv, deteriorarea acestuia sau desprinderea osului din materialul de înglobare (fig. 17).



Fig. 17. Detaliu de răcire

Îndepărtarea polimerului din secțiuni

Pentru a face posibilă colorarea țesuturilor din componența secțiunilor obținute după metoda descrisă mai sus, acestea au fost supuse procesului de extragere a polimerului înglobat, conform protocolului redat în tabelul 14.

Tabel 14.

Etapele necesare îndepărtării polimerului din secțiuni

Etapă	Soluție	Timp	Temperatură
1	Xilen	2-3 băi x 20 minute	temp. camerei
2	2-metoxietilacetat	1 baie x 20 minute	temp. camerei
3	Acetonă pură	2 băi x 5 minute	temp. camerei
4	Apă distilată	2 băi x 2 minute	temp. camerei

Preparatele au fost colorate prin metoda Novelli și tricromică Masson și vizualizate la microscopul optic²⁹ cu cameră foto³⁰.

REZULTATE ȘI DISCUȚII**LOTURI CU DEFECTE OSOASE ACOPERITE DE PERIOST**

Evaluarea osteodensimetrică la finalul perioadei de monitorizare, a tuturor subiecților loturilor M-dp-1; EPT-dp-1; ETO-dp.1 (8 probe pentru fiecare lot), sunt redată în tabelul 15 și fig. 18.

Tabelul 15.

Valori osteodensimetrice pentru indivizii loturilor cu defecte osoase acoperite de periost

Subiect \ Lot	Țesut osos normal (valori de referință)		M-dp-1		EPT-dp-1		ETO-dp-1	
	BMC	BMD	BMC	BMD	BMC	BMD	BMC	BMD
1	1,0-2,5	<-1	2,31	0,817	1,83	0,784	1,99	0,813
2			2,30	0,820	1,77	0,787	2,00	0,792
3			2,29	0,854	2,31	0,797	1,96	0,802
4			2,27	0,826	1,86	0,781	1,98	0,771
5			2,29	0,838	1,74	0,784	1,94	0,784
6			2,28	0,829	1,80	0,756	1,97	0,782
7			2,29	0,791	1,88	0,812	2,02	0,792
8			2,29	0,808	1,72	0,771	1,98	0,800
Valorile medii (16determinari/lot)			2,29 ± 0.02	0.823 ± 0.031	1,80 ± 0.08	0.784 ± 0.028	1,98 ± 0.04	0.792 ± 0.021

²⁹ Olympus BX-41

³⁰ Sanyo-XACTI-F50

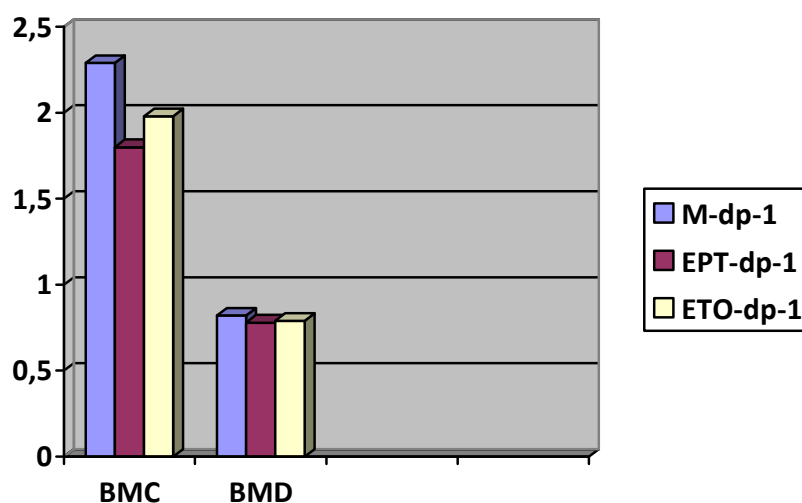


Fig. 18. Valori osteodensimetrice pentru indivizii loturilor cu defecte osoase acoperite de periost

Valorile obținute la 63 zile postoperator, pentru **loturile cu defecte osoase deperiostate** se încadrează în limite normale pentru osul sănătos.

Evaluarea histologică a morfogenezei osoase

Lot – M-dp-1

Defect osos tibial partial, neacoperit de periost și consolidat cu o placă de tip DCP (Dynamic Compression Plate)

Figura 19 redă aspecte histologice provenite de la lotul **M-dp-1** (defect peste care s-a fixat placuță fără a mai fi suturat periostul), imaginile “a” și “b” prezintă sisteme Havers formate din 2-3 lamele osoase cu grosimea de 20-22 μm dispuse concentric, diametrul canalelor Havers este de 55- 60 μm , precum și osteoane în formare a căror canale Havers au diametrul de 40-50 μm .

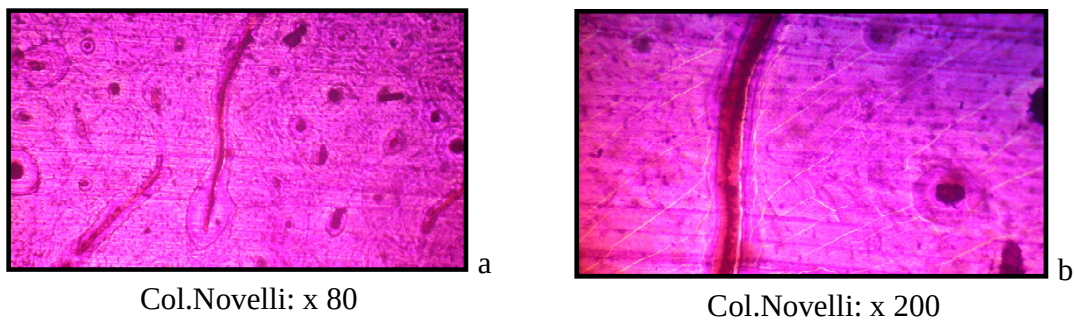


Fig. 19. Imagini histologice lotul M-dp-1, a – subiect 2, b – subiect 6

Lot – EPT-dp-1

Defect osos tibial partial, plombat cu β fosfat tricalcic, neacoperit de periost și consolidat cu o placă de tip DCP (Dynamic Compression Plate)

Examinarea histologică a probelor provenite de la lotul EPT-dp-1, (fig. 20), (defect în care s-a adăugat β fosfat tricalcic peste care s-a fixat placuță fără a mai fi suturat periostul), pune în evidență în ambele imagini, osteoane alcătuite din 3-4 lamele osoase cu grosimea de 20-24 μm dispuse concentric în jurul canaleor Havers care au diametrul de 70- 85 μm , unite printr-un canal Wolkman de 40 μm .

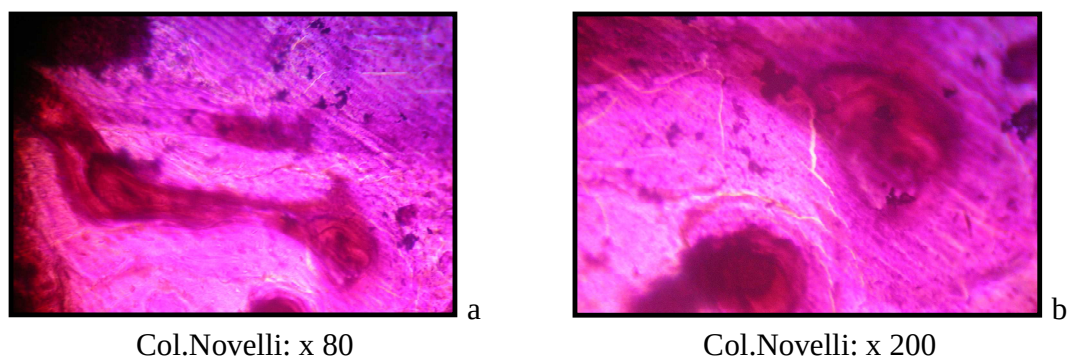
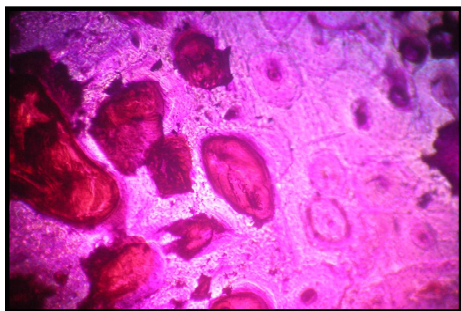


Fig. 20. Imagini histologice lotul EPT-dp-1, a – subiect 1, b – subiect 3

Lot – ETO- dp-1

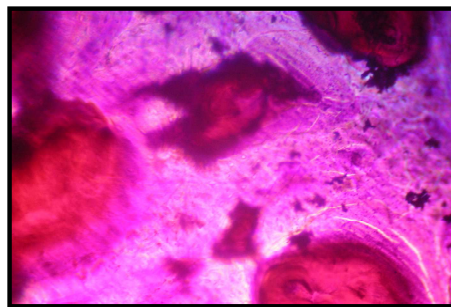
Defect osos tibial partial, plombat cu triturat osos cortical homolog, neacoperit de periost și consolidat cu placa de tip DCP (Dynamic Compression Plate)

Imaginile obținute de la lotul ETO-dp-1, (fig. 21, a și b), (defect în care s-a adăugat triturat osos fixat cu placă de tip DCP), evidențiază sisteme Havers formate din 3-4 lamele osoase cu o grosime de 20-24 μm , dispuse concentric în jurul canaleor Havers cu diametrul de 70- 85 μm , precum și osteoane în formarea a căror canale Havers au diametrul de 120-125 μm .



a

Col.Novelli: x 80



b

Col.Novelli: x 200

Fig. 21. Imagini histologice lotul ETO-dp-1, a – subiect 3, b – subiect 5

Țesutul osos format la nivelul defectelor pe parcursul perioadei de monitorizare prezintă caracteristicile țesutului osos matur cu sisteme Havers bine conturate și puține sisteme Havers în curs de formare, aspect caracteristic osificării encondrale descrisă și de *Hakimi M. și col.*, (2010), la mini pigs, precum și de *Mata A. și col.*, (2010) consecutiv utilizării nanofibrelor pentru stimularea osificării.

LOTURI CU DEFECTE OSOASE ACOPERITE DE PERIOST

Evaluarea osteodensimetrică

Valorile obținute prin osteodensimetrie la finalul celor 63 de zile ale perioadei de monitorizare pentru **loturile în care defectele au fost acoperite cu periost** se încaderază în valorile caracteristice țesutului osos sănătos – tabelul 16 și fig. 22.

Tabelul 16.

Valorile osteodensimetrice pentru indivizii loturilor cu defecte osoase acoperite de periost

Subiect \ Lot	Țesut osos normal		M-p-2		EPT-p-2		ETO-p-2	
	BMC	BMD	BMC	BMD	BMC	BMD	BMC	BMD
1	1,0-2,5	<1	2,32	0,853	2,28	0,826	2,31	0,801
2			2,35	0,810	2,30	0,797	2,36	0,823
3			2,31	0,830	2,31	0,799	2,34	0,830
4			2,33	0,840	2,32	0,808	2,33	0,867
5			2,32	0,832	2,29	0,824	2,32	0,825
6			2,34	0,797	2,30	0,851	2,34	0,838
7			2,33	0,820	2,29	0,842	2,37	0,843
8			2,34	0,818	2,31	0,853	2,35	0,844
Valorile medii (16 determinări/lot)			2,33 ± 0.02	0.825 ± 0.028	2,30 ± 0.02	0.825 ± 0.028	2,34 ± 0.03	0.834 ± 0.033

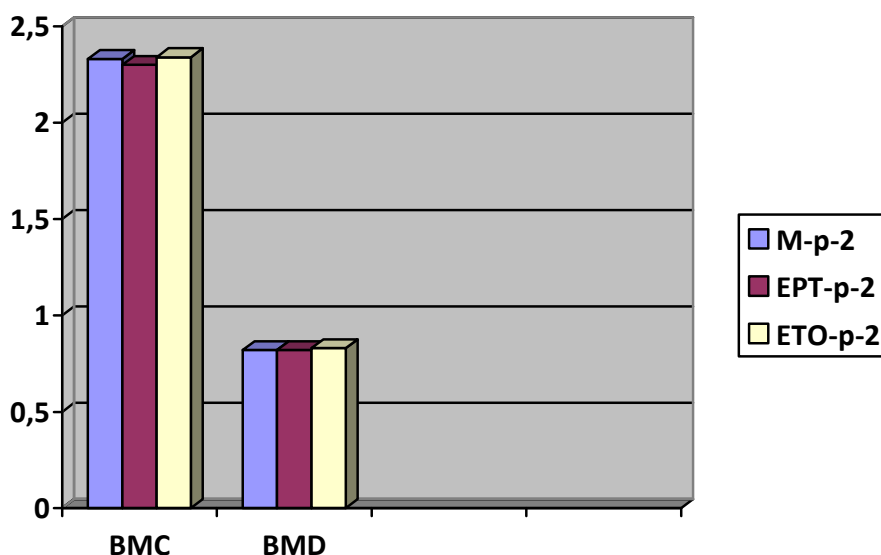


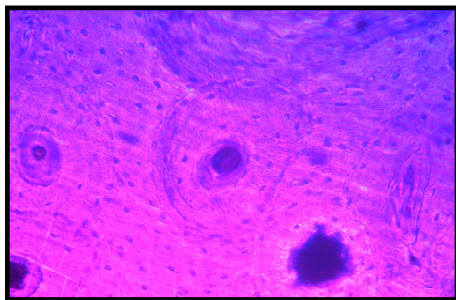
Fig. 22. Valorile osteodensimetrice pentru indivizii loturilor cu defecte osoase acoperite de periost

Evaluarea histologică a morfogenezei osoase

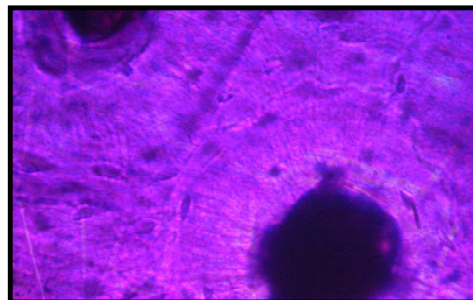
Lot - M-p-2

Defect osos tibial partial, acoperit de periost și consolidat cu o placă de tip DCP (Dynamic Compression Plate)

Analiza histologică a imaginilor obținute de la lotul M-p-2 (defecte peste care s-a suturat periostul) (fig.23), în imaginea “a” sunt prezente osteoane formate din 4-5 lamele osoase cu grosimea de 22-25 μm dispuse concentric în jurul canaleor Havers care au diametrul de 60-75 μm . În imaginea “b” pot fi observate osteoane (sisteme Havers) structurate din 3-4 lamele osoase cu grosimea de 20-24 μm , dispuse concentric în jurul canaleor Havers cu diametrul de 75-90 μm ; prezența unei lacune Howship cu diametru de 350/125 μm ; delimitată de 3 lamele osoase.



Col.Novelli: x 80



Col Novelli; x 200

Fig. 23. Imagini histologice lotul M-p-2, a – subiect 3, b – subiect 6

Examinarea histologică prin colorația tricromică Masson relevă un fragment de os compact diafizar acoperit de periost (fig. 24). Zonele membranei periostale îngroșate inegal, prin fibroză și hialinizare, alternând cu arii bogat vasculare din care plonjază în grosimea țesutului osos canale nutritive ramificate.

Subperiostal se organizează un țesut osos lamelar reactiv dar și imatur fără desen lamelar. unele arii periferice ale diafizei prezintă subperiost țesut osos spongios.

Prezintă o bogată vascularizație subperiostală prin formarea de numeroase canale nutritive, comunicante de tip Vollkman. Este absentă reacția inflamatorie.

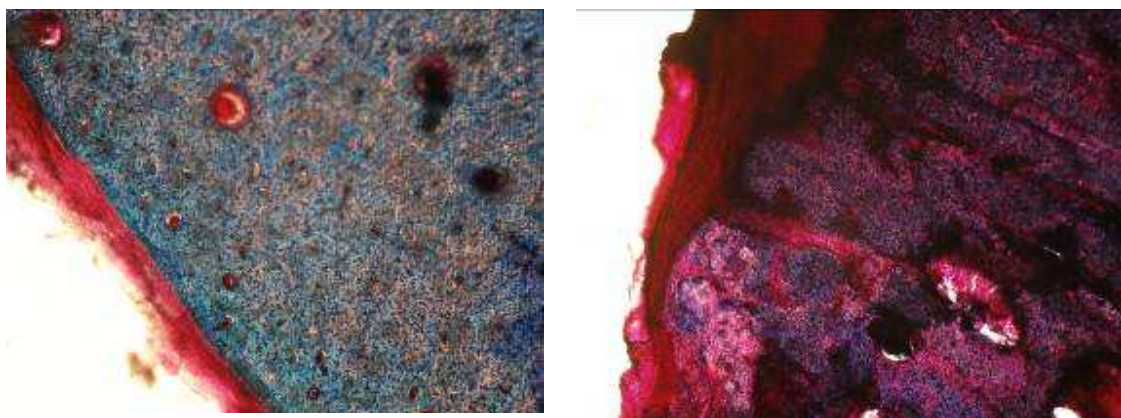
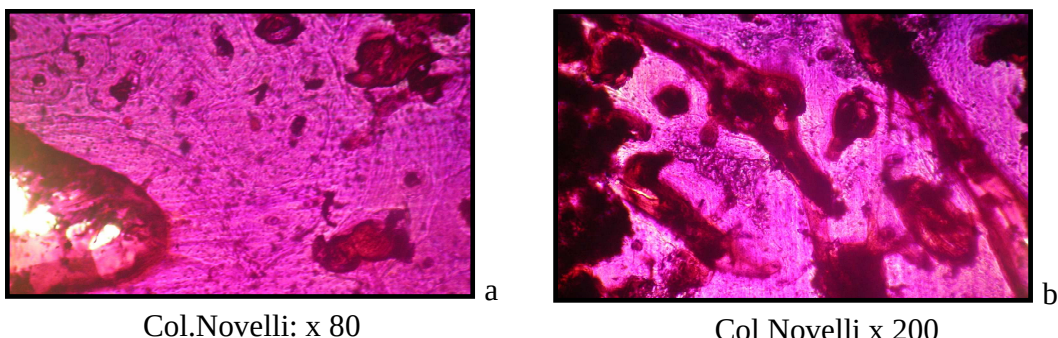


Fig. 24. Imagini histologice lotul M-p-2 (col. Tricromică Masson x 20)

Lot – EPT-p-2

Defect osos tibial partial, plombat cu β fosfat tricalcic, acoperit de periost și consolidat cu o placa de tip DCP (Dynamic Compression Plate)

Examinarea probelor provenite de la lotul EPT-p-2 (defecte în care s-a adăugat β fosfat tricalcic peste care s-a suturat periostul), (fig. 25) reliefează în imaginea “a” osteoane în organizare, structurate din 1-3 lamele osoase dispuse concentric în jurul canaleor Havers care au diametru de 80- 95 μm . Prezenta unei lacune Howship delimitata de 3 lamele osoase. Imaginea “b” evidențiază prezența mugurilor vasculo-conjunctivi, proveniti din stratul vasculo-fibros al periostului. Traveele directoare sunt foarte vascularizate și au grosimea de 50-60 μm , fiind localizate în zona sistemului fundamental extern.



Col.Novelli: x 80

Col Novelli x 200

Fig. 25. Imagini histologice lotul EPT-p-2, a – subiect 1, b – subiect 5

Examinarea histologică prin colorația tricromică Masson relevă: os diafizar acoperit cu periost cu structură lamelară circumferențială periostal și endostal (fig. 26). Central se observă țesut osos compact Haversian fără aspecte de remaniere activă. Canalele nutritive au diametre variabile în limitele histologice. Se remarcă numeroase spații cu țesut amorf subperiostal unele chiar cu aspect pseudochistic. Pe alocuri se observă țesut osos spongios,

incluzând vase trombozate și țesut compact lamelar adiacent spațiului cu material amorf în cele 2/3 externe ale diafizei.

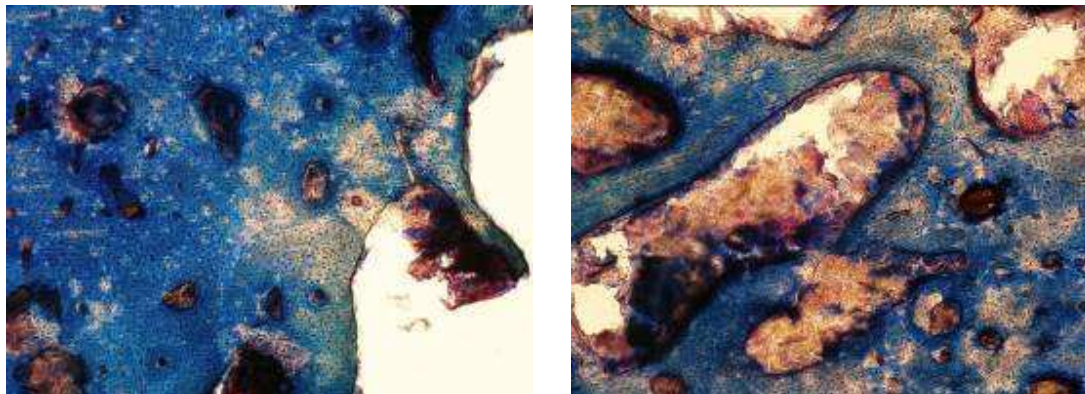
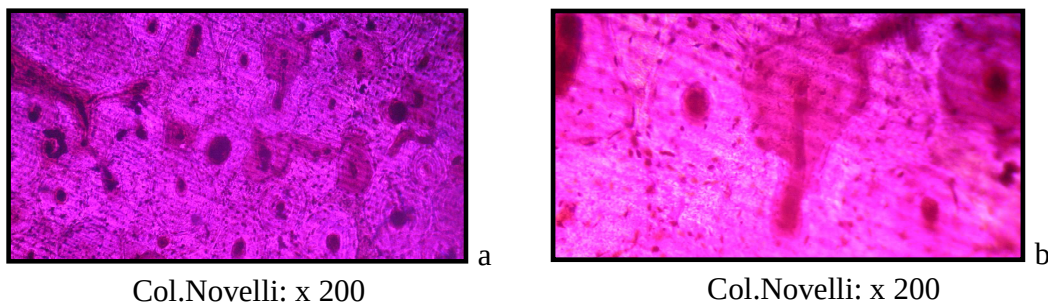


Fig. 26. Imagini histologice lotul EPT-p-2 (col. Tricromică Masson x 20)

Lot – ETO- p-2

Defect osos tibial partial, plombat cu triturate osos homolog, acoperit de periost și consolidat cu o placa de tip DCP (Dynamic Compresion Plate)

Imaginile obținute de la lotul ETO-p-2 (defect în care s-a adăugat triturat osos peste care s-a suturat periostul) (fig. 27) pun în evidență prin colorația Novelli, în imaginea “a” osteoane (sisteme Havers) formate din 2-3 lamele osoase cu grosimea de 24-26 μm , dispuse concentric în jurul canalelor Havers care au diametrul de 70- 95 μm , alături de osteoane în formare la care lamelele osoase apar omogene și nedelimitate. În imaginea “b” sunt prezente sisteme Havers alcătuite din 1-2 lamele osoase dispuse concentric, diametrul canalelor Havers este de 90- 110 μm , se observă și prezenta unor travee vasculo-conjunctive pentru suportul osteogenezei.



Col.Novelli: x 200

Col.Novelli: x 200

Fig. 27. Imagini histologice lotul ETO-p-2, a – subiect 4, b - subiect 8.

Examinarea histologică prin colorația tricromică Masson relevă: os diafizar acoperit cu periost cu structură lamelară circumferențială periostal și endostal (fig. 28). subperiostal sunt

prezente arii bogat vasculare din care plonjază în grosimea țesutului osos canale nutritive ramificate. Canalele nutritive au diametre variabile în limitele histologice. În unele arii se remarcă lacune mici inegale integrate complet în matricea țes osos compact matur.

Central se observă țesut osos compact Haversian fără aspecte de remaniere activă.

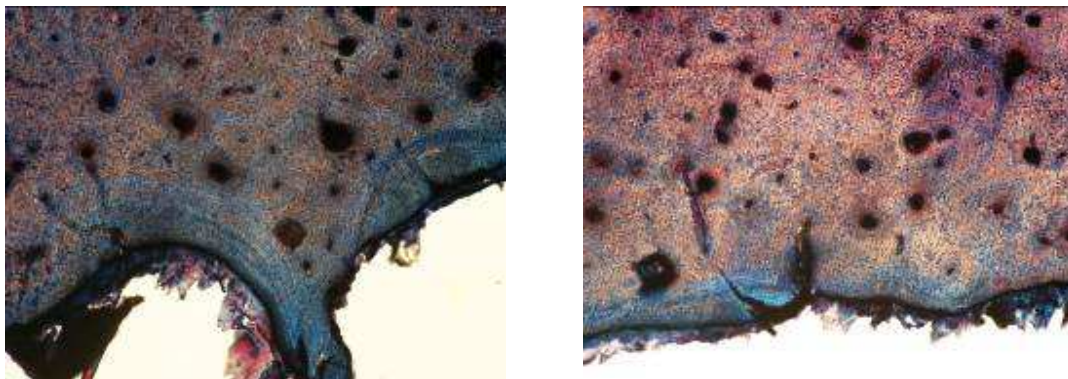


Fig. 28. Imagini histologice lotul EPT-p-2 (col. Tricromică Masson x 20)

Imaginile histologice obținute la finalul perioadei de monitorizare pentru **loturile cu defecte osoase acoperite de periost**, evidențiază la nivelul defectului țesut osos matur prin prezența canalelor Havers bine delimitate, precum și activitate osteogenică sub stratul celular al periostului prin traveele vasculo-conjunctive. Rezultate similare au fost descrise la om de Wong (2010) și Woo (2005) după implantarea unor scaffolduri (matrici) resorbabile încărcate cu osteoblaste .

CONCLUZII

Vindecarea osoasă sub periost se caracterizează prin formarea țesutului osos la nivelul defectului sub influența activității osteogenice a periostului.

Prezența vaselor de neoformație pe secțiunile histologice provenite de la indivizii din loturile la care vindecarea osoasă a avut loc sub acoperire periostală denotă un proces de regenerare osoasă aflată în plină desfășurare.

Vindecarea defectelor neacoperite cu periost se realizează prin osificare mixtă (encondral-intramembranos) sprijinită de țesutul osos adiacent defectului.

Valorile osteodensimetrice obținute la loturile neacoperite cu periost sunt ușor mai mici decât valorile loturilor acoperite cu periost, dar în limitele normale pentru osul sănătos.

OBIECTIVUL 2

STUDIUL EXPERIMENTAL IN VIVO A POSIBILITAȚII DE INFLUENȚARE A POTENȚIALULUI OSTEOGENIC AL PERIOSTULUI NATIV PRIN ADIȚIA ÎN FOCARUL FRACTURAL DE CELULE PERIOSTALE CULTIVATE IN VITRO

ACTIVITATEA 2.1. ELABORAREA UNOR MODELE EXPERIMENTALE ANIMALE

Planul de realizare a acestei activitati a presupus organizarea a mai multor loturi experimentale, subordonate tipului de manoperă chirurgicală realizată asupra periostului și în consecință divizate în subetape de lucru.

- Crearea de defecte la nivelul tibiei care au fost plombate cu o matrice colagenică încărcată cu celule periostale și peste care s-a suturat periostul (MC).

- Crearea de defecte la nivelul tibiei care au fost plombate cu o matrice colagenică încărcată cu celule periostale peste care s-a fixat o placă de tip DCP, fără suturarea periostului (MC-DCP-dp).

2.1. Elaborarea modelelor experimentale animale

Lot - MC

Crearea de defecte la nivelul tibiei care au fost plombate cu o matrice colagenică încărcată cu celule periostale și peste care s-a suturat periostul.

Studiul s-a realizat pe 8 câini (tabelul 17), de rasă comună, de ambele sexe, cu vârsta cuprinsă între 2 și 6 ani, cu greutate corporală între 17 și 25 kilograme, la care sub anestezie generală (acepromazină – ketamină – izofluran) s-a realizat defect la nivelul diafizei tibiale de aproximativ 1/2 cm în care s-a introdus matrice colagenică încărcată cu celule periostale (realizarea matricilor a fost un obiectiv atins, conform planului de cercetare, în anul 2009), peste care s-a suturat periostul.

Tabelul 17.

Material biologic

Subiect	Sex	Greutate (kg)	Vârsta (ani)
1	Mascul	22	5
2	Mascul	25	4½
3	Femela	17	2
4	Femela	19	2½
5	Femela	20	4 ½
6	Mascul	23	6
7	Mascul	20	2
8	Femela	21	3

Protocolul anestezic a constat în: administrarea intravenoasă a premedicației anestezice 0,4 mg/kg Acepromazină 1%³¹ urmată la interval de 10 minute de 8 mg/kg Ketamină 10%³² și inducție narcotică cu Propofol 1%³³ (autodozare), după care subiecții au fost intubați și conectați la aparatul de narcoză inhalatorie – circuit închis – cu respirație asistată, narcoza menținându-se pe toată durata intervenției cu Izofluran³⁴ la concentrații care au variat între 5 % și 0,5 %, (MAC 1,5-1,2) acestea fiind corelate cu timpii operatori.

Intraoperator pacienții au fost **monitorizați**³⁵ după un protocol standard neinvaziv care a inclus măsurarea la intervale prestabilite de timp (5 minute) a presiunii arteriale (sistolice, diastolice și medii), măsurarea continuă a saturației hemoglobinei în oxigen, frecvenței cardiace, pulsului periferic, frecvenței respiratorii, capnogramului și MAC-ului, și urmărirea permanentă a traseului EKG (derivata II).

Abordul regiunii s-a făcut prin acces clasic, prin incizia pielii pe fața medială a tibiei în treimea proximală și evidențierea suprafeței osoase (fig. 29), după deperiostare s-au realizat prin decupare cu ferăstrăul pendular, defecte osoase cu o suprafață de cca 2 cm², în care s-a introdus matrice colagenică încărcată cu celule periostale. Peste defect s-a suturat periostul cu material resorbabil în puncte separate. Planul muscular a fost refăcut în fir continuu cu material resorbabil, iar pielea s-a suturat în puncte separate cu material neresorbabil.

Analgezia postoperatorie a fost asigurată prin administrarea subcutanată de Butorfanol³⁶ 0,25 mg/kg la interval de 4 ore în primele 12 de ore după intervenție..

Antibiototerapia postoperatorie a fost asigurată prin administrarea de Synulox (Pfizer) zilnic timp de 5 zile.

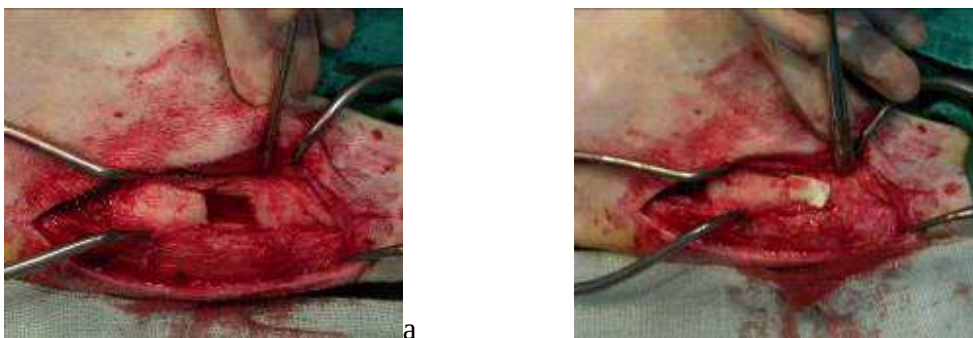


Fig. 29. Aspecte intraoperatorii lotul MC, a- crearea defectului, b- plombarea defectului cu matrice colagenică încărcată cu celule periostale

³¹ Calmivet – Vetoquinol S.A. (Franța)

³² Ketaminol – Intervet BV (UE)

³³ Propofol - Fresenius Kabi (Deutschland GmbH)

³⁴ Isofluran - CP Pharma GmbH (Germania)

³⁵ monitor Cardell 9405 și Capnomac Ultima Datex

³⁶ Butomidor (Austria) Richter-Pharme AG Wels

Lot – MC-DCP-dp

Crearea de defecte la nivelul tibiei plombate cu matrice colagenică încărcată cu celule periostale și fixată cu placă de tip DCP

Studiul s-a realizat pe 8 câini (tabelul 18), de rasă comună, de ambele sexe, cu vârsta cuprinsă între 2 și 5 ½ ani, cu greutate corporală între 19 și 27 kilograme, la care sub anestezie generală (acepromazină – ketamină – izofluran) s-au realizat defecte la nivelul diafizei tibiale de aproximativ 1/2 cm în care s-a introdus matrice colagenică încărcată cu celule periostale și peste care s-a fixat o placă de tip DCP.

Tabelul 18.

Material biologic

Subiect	Sex	Greutate (kg)	Vârsta (ani)
1	Mascul	24	2
2	Mascul	23	3 ½
3	Mascul	25	2 ½
4	Femela	20	4
5	Femela	19	3
6	Mascul	22	2 ½
7	Mascul	27	5 ½
8	Femela	22	4

Protocolul anestezic a fost identic cu cel folosit și pentru celelalte loturi luate în studiu.

Abordul regiunii s-a făcut prin accesul clasic utilizat și la lotul MC, adică prin incizia pielii pe fața medială a tibiei în treimea proximală și evidențierea suprafeței osoase. După deperiostare s-au realizat defecte osoase cu o suprafață de cca 2 cm², care au fost plombate cu matrice colagenică încărcată cu celule periostale. Matricea a fost fixată cu placă de tip DCP (fig. 30). Planul muscular a fost suturat în fir continuu cu material resorbabil iar pielea s-a suturat în puncte separate cu material neresorbabil.

Postoperator s-a asigurat analgezia, prin administrarea de Butorfanol 0,25 mg/kg la interval de 4 ore în primele 12 ore după intervenție, și antibioterapia timp de 5 zile.



Fig. 30. Aspecte intraoperatorii lotul MC-DCP-dp: a- defect plombat cu matrice încărcată cu celule periostale, b – fixarea plăcii DCP peste defect

ACTIVITATEA 2.2. MONITORIZAREA CLINICA SI PARACLINICA A MODELULUI ANIMAL REALIZAT

Monitorizarea postoperatorie a loturilor s-a realizat pentru o perioada de 63 de zile, prin:

- **examen clinic** zilnic timp de 21 zile postoperator urmărindu-se:
 - statusul clinic general,
 - aspectul plăgilor postoperatorii și vindecarea inciziei,
 - sensibilitatea dureroasă la palpare,
 - comportamentul,
 - temperatura corporală;
 - locomotia, interesând gradul de șchiopătură (tabelul 19) și intervalul de timp cât persistă tulburările locomotorii.

Tabelul 19.

Scala de evaluare a gradului șchiopăturii

Gradul	Descriere
0	Atitudine normală atât în stațiune cât și în mers – fără șchiopătură
1	Dificultăți în mers, mai ales la pas alert – șchiopătură discretă
2	Dificultăți în mers, șchiopătură intermitentă în mers rapid
3	Șchiopătură evidentă la fiecare pas, durere
4	Membrul este scos din sprijin atât în stațiune cât și în mișcare, durere intensă

- **examen radiologic** prin fluoroscopia zonei de interes preoperator, imediat postoperator și la interval de șapte zile până la 63 de zile postoperator, urmărindu-se: reacția tisulară la nivelul defectului și în vecinătate precum și modificările radioopacității la nivelul defectului.

Pentru examinarea fluoroscopică toți subiecții au fost aneșteziați, la fiecare examinare s-au folosit Acepromazina 1% 0,2 mg/kg, Ketamină 10% 3 mg/kg și narcoză inhalatorie pe masca cu Izofluran la concentrație de 1% timp de aproximativ 15 minute.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

În perioada postoperatorie imediată s-a constatat la toți indivizii luați în studiu un status clinic general bun, fără tulburări de locomotie și un comportament alimentar normal. Ingerarea primului tain postoperator s-a făcut la un interval de maxim 7 ore, fapt ce dovedește eficiența medicației analgezice în recuperarea postoperatorie.

Valorile temperaturii corporale s-au încadrat în limitele fiziologice.

Sensibilitatea algică la palparea plăgii operatorii și a regiunii adiacente a fost prezentă în primele 3-4 zile postoperator și a dispărut complet la 7 zile, indiferent de tipul manoperei chirurgicale practică.

Vindecarea plăgii operatorii s-a realizat primar la toți indivizii incluși în experiment.

Lot – MC

Crearea de defecte la nivelul tibiei în care s-a adăugat matrice colagenică încărcată cu celule periostale și peste care s-a suturat periostul.

Analiza radiologică a imaginilor obținute de la lotul MC (fig. 31) a decelat începând cu a 14-a zi postoperator radioopacitate ușor crescută pe întreaga suprafață a defectului.

La 21 de zile defectul este umplut în proporție de 75% cu țesut cu densitate crescută comparativ cu imaginile obținute la verificările anterioare. Densitatea este crescută pe toată suprafața defectului însă țesutul nou format este mai radiotransparent comparativ cu țesutul osos normal adiacent.

În a 28-a zi de monitorizare defectul este umplut în proporție de 90%. Radioopacitatea rămâne inferioară țesutului osos normal, rezultat asemanator celui obținut la 21 de zile.

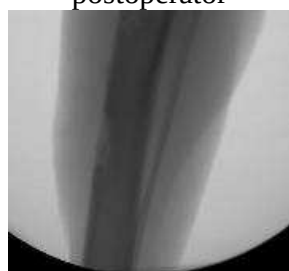
La 35 de zile postoperator defectul este umplut în proporție de 100% cu țesut cu densitate crescută, similară țesutului osos normal. Pe ambele fețe ale tibiei se observă o ușoară creștere a densității corticalei osoase specific reacției periostale.

La 56 de zile de monitorizare defectul este umplut cu țesut cu densitate asemănătoare țesutului osos normal. Reacția periostală este redusă.

La finalul perioadei de monitorizare zona defectului are aspect asemănător țesutului osos sănătos în ambele incidențe.



postoperator



7 zile





14 zile



21 zile



28 zile



35 zile



42 zile



49 zile



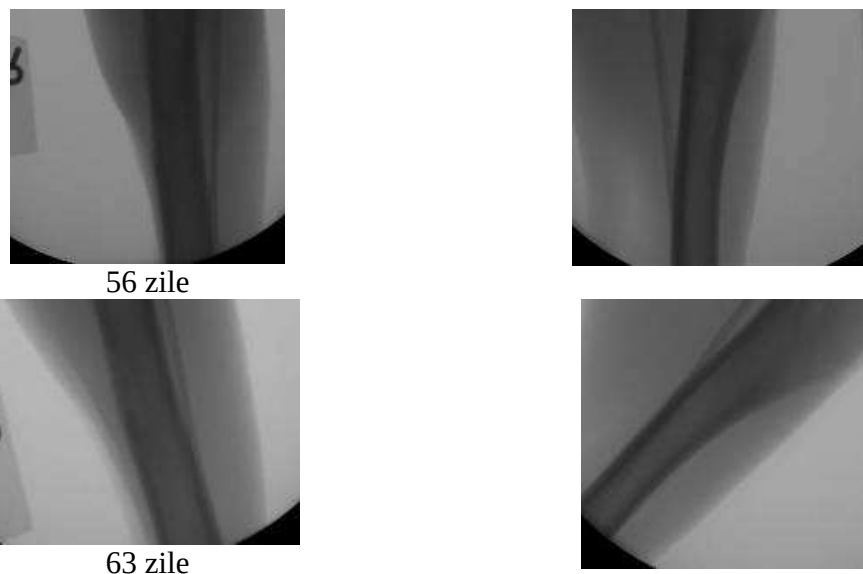


Fig. 31. Evoluția radiografică a vindecării osoase la lotul MC

Lot – MC-DCP-dp

Crearea de defecte la nivelul tibiei plombate cu matrice colagenică încărcată cu celule periostale și fixată cu placă de tip DCP

Analiza imaginilor obținute la lotul MC-DCP-dp (fig. 32) pe parcursul perioadei de monitorizare evidențiază umplerea defectului în proporție de 35% la 14 zile postoperator, la 21 de zile se observă îngroșarea corticalei de pe fața caudală a tibiei în dreptul plăcii și umplerea defectului în proporție de 60%.

În a 28-a zi postoperator defectul este umplut în proporție de 80%, apărând reacție periostală discretă proximal și distal de placă.

La 35 de zile postoperator umplerea defectului este realizată în proporție de 95%, observându-se și reacție periostală discretă proximal și distal de placă.

Defectul este umplut în proporție de 100% în a 42-a zi de monitorizare, cu radiodensitate similară țesutului osos adiacent și persistând reacția periostală discretă proximal și distal de placă.

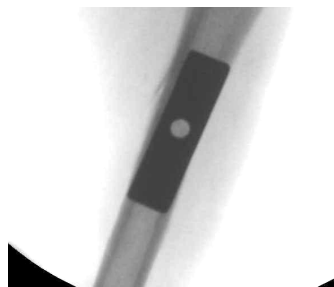
La 56 de zile postoperator se menține o reacție periostală discretă asemănătoare cu cea observată la 42 de zile.



Postoperator



7 zile



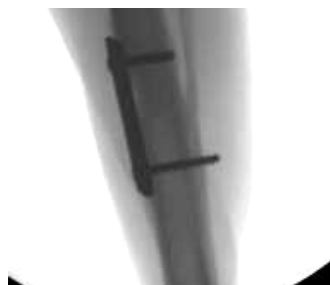
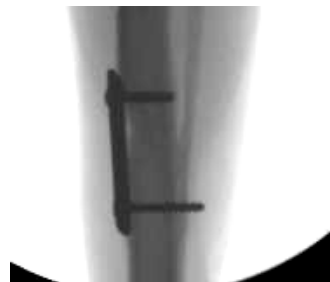
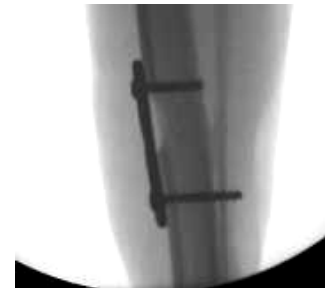
14 zile

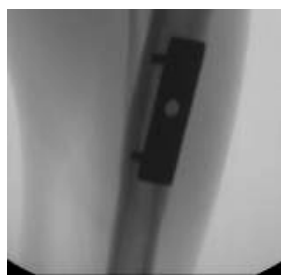


21 zile



28 zile





35 zile



42 zile



49 de zile



56 de zile



63 de zile

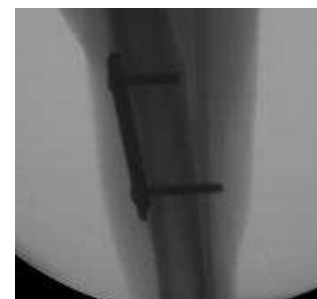
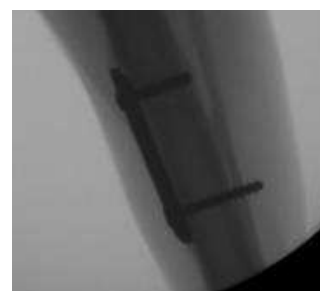
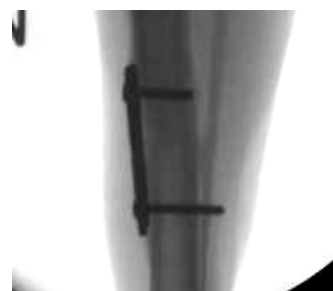


Fig. 32. Evoluția radiografică a vindecării osoase la lotul MC-DCP-dp

Modificările radiodensității la nivelul defectului precum și gradul de umplere al acestuia cu țesut cu densitate asemănătoare țesutului osos normal debutează din a doua săptămână de monitorizare. Vindecarea radiografică a fost decelată la lotul MC din a 35-a zi de monitorizare și la lotul MC-DCP-dp la 42 de zile, ulterior nu au mai putut fi observate modificări ale densității sau ale gradului de umplere al defectului. Reacția periostală discretă observată la extremitățile plăcuței este consecința suprimării vascularizației periostale fapt descris de *Igna* (2009), *Xiong și col.*, (2009) și de *Yuehuei și col.*, (2003).

Rezultatele privind viteza vindecării osoase la cele două categorii de loturi (cu și fără acoperire periostală) sunt redată sintetic în tabelul 20 și fig. 33.

Tabelul 20.

Evoluția vindecării osoase în urma adărierii în focarul fractural de celule periostale cultivate in vitro

<i>Lotul</i>	<i>Intervalul evoluției vindecării defectelor osoase</i>				
	<i>14 zile</i>	<i>21 zile</i>	<i>28 zile</i>	<i>35 zile</i>	<i>42 zile</i>
MC	25%	75%	90%	100%	100%
	mai radiotransparent decât țesutul osos normal			densitate similară țes osos normal	
MC-DCP-dp	35%	60%	80%	95%	100%
	mai radiotransparent decât țesutul osos normal				densitate similară țes osos normal

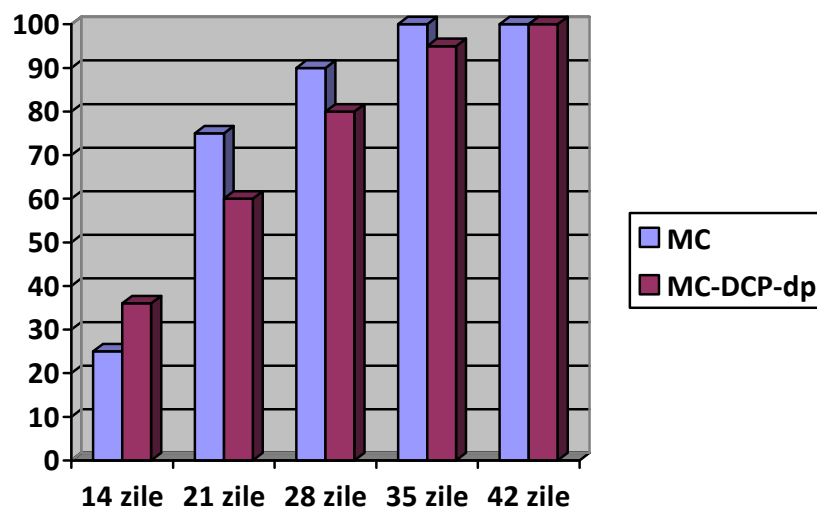


Fig. 33. Evoluția vindecării osoase în urma adității în focarul fractural de celule periostale cultivate in vitro

CONCLUZII

Radiologic vindecarea defectelor osoase, apariția de țesut osos cu aceeași densitate ca și a țesutului osos normal din vecinătate la lotul MC, se produce cu 7 zile mai repede decât la lotul MC-DCP-dp.

Vindecarea defectelor osoase umplute cu matrice colagenică încărcată cu celule periostale și acoperită cu periost, lotul MC, se produce în același interval de timp ca și în cazul loturilor EPT-p-2 și ETO-p-2, respectiv mai devreme cu 7-14 zile comparativ cu defectele osoase ale loturilor martor (M-dp-1 și M-p-2) și a celor plombate cu β fosfat tricalcic. neacoperit de periost (EPT-dp-1).

ACTIVITATEA 2.3. ANALIZA RECUPERĂRII MORFOLOGICE – COMPARAȚII HISTOPATOLOGICE SI DE OSTEODENSIMETRIE ALE REFACERII MASEI OSOASE.

Pentru a putea fi stabilit cu exactitate tipul de țesut osos nou format la nivelul defectelor s-a impus analiza recuperării morfologice a masei osoase, realizată prin microscopie și osteodensimetrie.

MATERIALE ȘI METODE

Pentru evidențierea recuperării morfologice a țesutului osos, la finalul perioadei de monitorizare de la toți subiecții ambelor loturi s-au recoltat probe biologice de os de la nivelul defectelor în vederea evaluării prin microscopie clasică și prin osteodensimetrie.

Pentru realizarea acestei etape s-a respectat protocolul de lucru descris la ACTIVITATEA 1.3..

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Analiza osteodensimetrică a probelor osoase de la **loturilor în care defectele osoase au fost umplute cu matrice colagenică încărcată cu celule periostale** la toți subiecții la finalul perioadei de monitorizare, sunt redate în tabelul 21 și fig. 34.

Tabelul 21.

Valori osteodensimetrice pentru indivizi din loturilor în care defectele osoase au fost umplute cu matrice colagenică încărcată cu celule periostale

Subiect \ Lot	Țesut osos normal (valori de referinta)		MC		MC-DCP-dp	
	BMC	BMD	BMC	BMD	BMC	BMD
1	1,0 -2,5	<1	1,72	0,848	1,90	0,874
2			1,78	0,898	1,80	0,858
3			1,85	0,889	1,84	0,894
4			1,84	0,892	1,89	0,842
5			1,71	0,869	1,88	0,850
6			1,78	0,852	1,84	0,882
7			1,75	0,881	1,83	0,830
8			1,81	0,861	1,85	0,866
Valorile medii (16 determinări/lot)			1,78 ± 0.07	0,875 ± 0,027	1,84 ± 0.06	0,862 ± 0,032

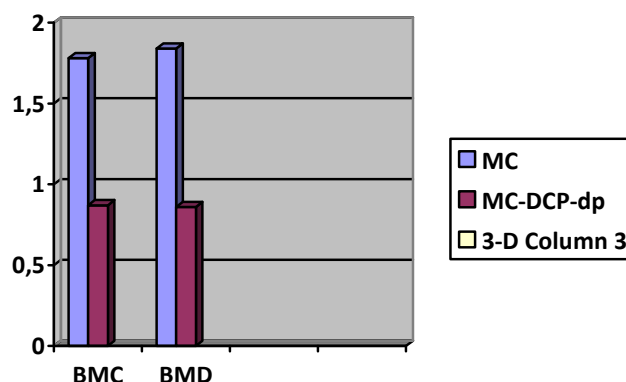


Fig. 34. Valori osteodensimetrice pentru indivizi din loturilor în care defectele osoase au fost umplute cu matrice colagenică încărcată cu celule periostale

Valorile conținutului mineral osos (BMC) la loturilor MC și MC-DCP-dp sunt mai scăzute comparativ cu loturile EPT-dp-1, ETO-dp-1, EPT-p-2 și ETO-p-2, fapt explicat prin timpul necesar celulelor periostale pentru a iniția procesul de osteogeneză. Valorile determinate se încadrează în limitele normale pentru țesutul osos sănătos.

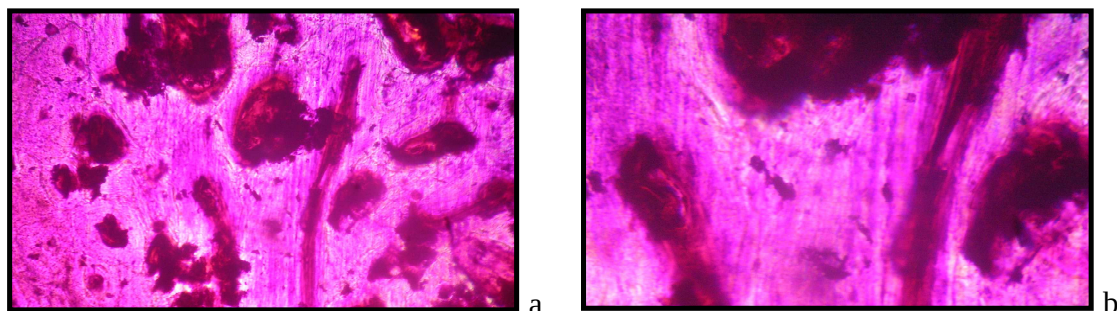
Valorile obținute pentru densitatea osoasă (BMD) la loturile MC, MC-DCP-dp sunt mai mari decât cele obținute la celelalte loturi experimentale dar se încadrează în valorile caracteristice țesutului osos sănătos.

Evaluarea histologică a morfogenezei osoase

Lot – MC

Crearea de defecte la nivelul tibiei în care s-a adăugat matrice colagenică încărcată cu celule periostale și peste care s-a suturat periostul

Evaluarea histologică a probelor de la lotul MC (fig. 35) evidențiază, după colorația Novelli, prezența osteoanelor organizate, alcătuite din 2-3 lamele precum și muguri vasculo-conjunctivi, proveniti din periost. Traveele directe foarte vascularizate au grosimea de 70-80 μm și sunt localizate în zona sistemului fundamental extern.



Col Novelli x 80
 Fig. 35. Imagini histologice lotul MC, a – subiect 4, b – subiect 6

Examinarea histologică a preparatelor colorate tricromic Masson relevă un os diafizar acoperit cu periost cu structură lamelară circumferențială periostal și endostal (fig.36).

Central se observă țesut osos compact Haversian, fără aspecte de remaniere activă. Canalele nutritive au diametre variabile. Se remarcă spații cu material amorf inegale, unele cu aspect pseudochistic integrat complet în matricea osoasă, care se organizează lamelar în jurul acestora.

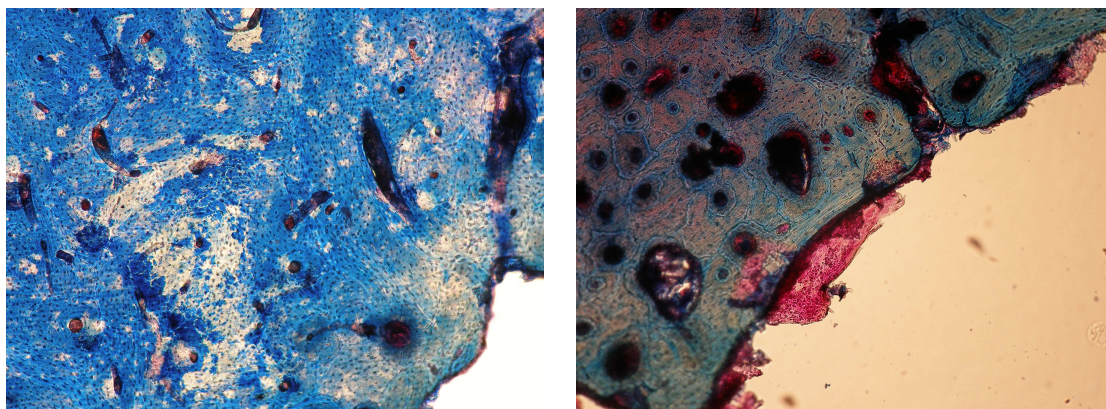


Fig. 36. Imagini histologice lotul M-p-2 (col. Tricromică Masson x 20)

Lot – MC-DCP-dp

Crearea de defecte la nivelul tibiei plombate cu matrice colagenică încărcată cu celule periostale și fixată cu placă de tip DCP

În imaginile lotului MC-DCP-dp (fig. 37) pot fi observate osteoane în organizare, alcătuite din 2-3 lamele osoase dispuse concentric în jurul canaleor Havers care au diametrul de 60- 70 μm , precum și osteoane în organizare ale căror canale Havers au diametru de 120-130 μm iar în jurul acestora pot fi observați muguri vasculo-conjunctivi.

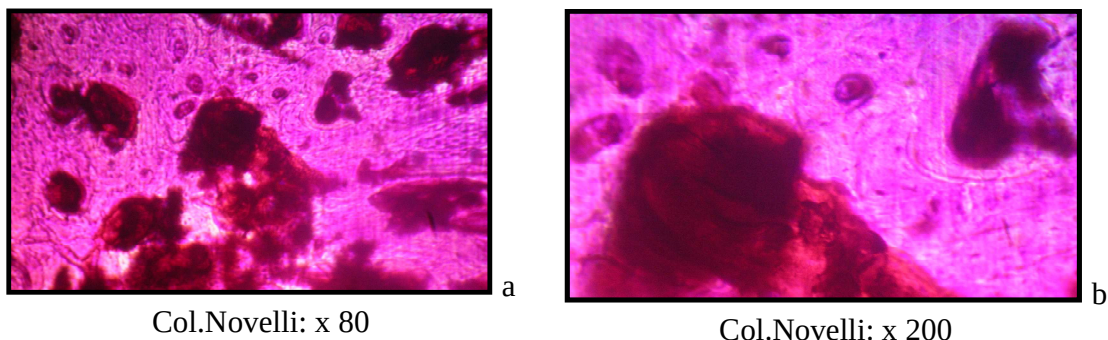


Fig. 37. Imagini histologice lotul MC-DCP-dp, a – subiect 5, b – subiect 7

Examinarea histologică a imaginilor aparținând **loturilor în care defectele au fost plombate cu matrice colagenică încărcată cu celule periostale**, pune în evidență. țesut osos matur la ambele loturi și sisteme Havers organizate, formate din lamele concentrice. La lotul MC se observă o activitate osteogenică subperiostală generată de stratul vasculo-celular al periostului. La lotul MC-DCP-dp activitatea osteogenică este de tip encondral determinată de țesutul osos învecinat defectului fapt consemnat și la alte specii de animale utilizate în cercetări experimentale de *Cappana* (2009) și *Brude și col.*, (1998).

CONCLUZII

Examenul histologic al probelor lotului MC confirmă prezența activității osteogenice generată de periostul de acoperire a defectului, aceleași aspecte au fost observate și la loturile M-p-2, EPT-p-2 și ETO-p-2, la care defectele au fost acoperite cu periost.

Analiza histologică a lotului MC-DCP-dp evidențiază că activitatea osteogenică la nivelul defectului este susținută de țesutul osos învecinat, confirmând rezultatele obținute la loturile M-dp-1, EPT-dp-1 și ETO-dp-1, la care defectele nu au fost acoperite cu periost.

CONCLUZII GENERALE

La nivelul defectelor acoperite cu periost, la toate loturile, este prezentă activitate osteogenică determinată de stratul celular al periostului, caracterizată prin prezența mugurilor vasculo-conjunctivi în țesutul osos în curs de organizare, fenomen nesemnlat la defectele tratate fără manipularea periostului.

Adiția la nivelul defectului a substituenților osoși accelerează vindecarea osoasă cu un interval de timp cuprins între 7 și 14 zile comparativ cu defectele la nivelul cărora nu s-au adăugat substituenți osoși. Astfel adiția la nivelul defectului a β fosfatului tricalcic precum și a matricei colagenice încărcată cu celule periostale grăbește apariția semnelor de vindecare osoasă cu 14 zile față de defectele în care nu s-au adăugat substituenți osoși și cu 7 zile față de defectele plombate cu triturat osos.

Diferențele sesizate radiologic, în ceea ce privește perioada de vindecare a defectelor osoase neacoperite cu periost și fixate cu placă de tip DCP sunt semnificative, vindecarea apare după un interval de timp de 35 – 49 zile comparativ cu defectele acoperite cu periost și placă de tip DCP la care vindecarea debutează după 28 – 42 de zile postoperator.

Valorile osteodensimetrice, la finalul perioadei de monitorizare de 63 de zile, obținute de la toate loturile se încadrează în limitele normale pentru țesutul osos.

Confirmarea histologică a vindecării defectelor acoperite cu periost (plombate sau lăsate libere, fixate sau nu cu placă DCP) susține activitatea osteoprogenitoare a stratului celular al periostului.

RECOMANDĂRI PRACTICE

Folosirea trituratului osos obținut intraoperator, din fragmentele osoase sau eschile în cazul fracturilor, depus la nivelul defectului osos și acoperit cu periost s-a dovedit a fi o alternativă viabilă, rapidă și ieftină pentru înlocuirea substituenților osoși de sinteză, care au prețuri de achiziție destul de ridicate.

ELEMENTE DE ORIGINALITATE

- Datele obținute pentru ghidarea periostală a regenerării osoase în urma manipulării chirurgicale a periostului (2010) coroborate cu rezultatele obținute prin grefarea heterotopică a unor lambouri cortico-periostale vascularizate (2009) la câine demonstrează pentru prima dată în literatura de specialitate comportamentul particular de derulare a fenomenelor de morfo-osteogeneză periostală, total diferit față de cel raportat în lucrările de specialitate ca fiind propriu pentru șobolan, iepure și mini pig. Se pune în discuție modelul animal cel mai potrivit pentru transferul și extrapolarea datelor de osteogeneză experimentală către medicina umană.
- Folosirea în premiera națională în medicina veterinară a osteodensimetriei de absorbție duală pentru stabilirea morfogenezei osoase, la nivelul defectelor tibiale a adus date importante cu privire la: conținutul mineral al osului (BMC) și la densitatea minerală osoasă (BMD), al osului nou format la nivelul defectelor.
- Utilizarea trituratului de corticală osoasă, acoperit cu periost ca alternativă la substituenții osoși de sinteză pentru a crea suportul necesar osteogenezei periostale, reprezintă o metodă inovativă aplicată pentru prima dată în medicina veterinară românească.

Cercetările noastre arată că în defectele osoase corticale induse experimental la câine modul și viteza de producere a vindecării osoase este influențat preponderent de manipularea chirurgicală a periostului (acoperirea sau nu a defectului cu periost) și mai puțin de utilizarea substituenților osoși [plombarea (umplerea) defectului cu os cortical sau cu substituenți osoși]. Se propun, lumii științifice, spre validare următoarele ipoteze și rezultate:

- regenerarea osoasă a defectelor osoase corticale la câine se face preponderent prin mecanisme de osificare intramembranară atunci când focarul distructiv este plasat chirurgical sub periost (acoperit cu periost), calitățile osului nou format fiind similare osului normal;
- regenerarea osoasă a defectelor osoase corticale la câine, atunci când focarul fractural este lăsat să evolueze neacoperit de periostul nativ; se face preponderent prin mecanisme de osificare mixte (endocondral-intramembranară), mai lente decât osificarea intramembranară;
- evoluția vindecării defectelor osoase în care s-au utilizat tehnici de tratament bazate pe umplerea (plombarea) defectului cu triturat osos cortical sau substituenți osoși minerali (fosfat tricalcic) se desfășoară după modelul prezentat mai sus, atât modul cât și viteza de vindecare fiind decise de modalitățile de manipulare in situ a periostului;
- plombarea defectelor corticale cu matrice colagenice încărcate cu celule subperiostale (de cultura) nu aduce modificări semnificative ale vitezei și calității vindecării defectelor osoase acoperite chirurgical cu periost;
- periostul lăsat neatasat osului dezvoltă inițial fenomene reactive de tip inflamator hiperplazic și ulterior osificări periosoase în vecinătatea defectului, fiind probabil responsabil de demararea osificării de tip secundar;
- vindecarea primară a defectelor osoase este posibilă prin demararea în faza inițială a mecanismelor de regenerare caracteristice osificării intramembranare și de abia ulterior

- a osificarii encondrale, derulararea seventiala fiind influentata de tehnicile de manipulare chirurgicala in situ a periostului ?
- in tratamentul pierderilor osoase fracturale, bazat pe principiile osteosintezei biologice cu tehnici de MIPO (Minim Invasive Plate Osteosynthesis) si montaje de fixare de tip "bridging" cu placi de tip LCP (Locking Compression Plate) vindecarea osoasa superioara se datoreaza neinterventiei directe in focar cu netulburarea fenomenelor reparatorii amorstate in momentul producerii (coagul, populare cu celule pluripotente din maduva hematogena) sau rolul preponderant este detinut de nemplificare distructiilor (in special vasculare) prin abtinerea de la interventia chirurgicala asupra stratului periostal din focarul de fractura ?

**DISEMINAREA REZULTATELOR - LUCRARI ȘTIINȚIFICE PUBLICATE
și/sau PREZENTATE LA MANIFESTĂRI ȘTIINȚIFICE NAȚIONALE ȘI
INTERNAȚIONALE**

1. Igna C., Dascalu Roxana, Schuszler Larisa, Sabau M., Luca C. - Kutya izuleti porchianyanak potlasi autolog chondroblasttal toltott nano-hidroxiapatit betetekkel (Nano-hydroxyapatite scaffolds loaded with autologous chondroblasts used in the treatment of articular osteochondral defects in dog). Magyar Allatorvosok Lapja (Hungarian Veterinary Journal), vol. 132, no. 8, p. 466-474 , 2010, HU ISSN 0025-004X INDEX 25531, H Index: 7 Impact Factor (2009) 1,29
2. Roxana Dascălu, C. Igna, Mirela Toth-Tașcău, M. Sabău, Larisa Schuszler, K. Menyhardt, A. Sala, C. Luca - Kinematic motion analysis of the forelimbs in healthy dogs Scientific Work Veterinary Medicine, C Series, LIII, Bucuresti, (CABI; COD CNCIS 48, rev. categ. B+ 2008), 2010, sub tipar
3. C. Igna, Roxana Dascălu, Larisa Schuszler, M. Sabău, C. Luca, A. Sala - Metode noi în tratamentul defectelor osteocondrale la câine. Rev. Rom. Med. Vet., vol. 20, nr. 1, p. 76-84, 2010
4. Cornel Igna, Larisa Schuszler, Aurel Sala, Roxana Dascălu, Marius Sabău, Călin Luca - Technological Stress Prevention to Nutria (Myocastor coypus). Lucr. Șt. Zootehnie și Biotehnologii, USAMVB Timisoara, vol 43(1), p. 275-278, 2010, ISSN 1221-5287, E-ISSN 1841-9364
5. Cornel Igna, Larisa Schuszler, Roxana Dascălu, Marius Sabău, Călin Luca - Percutaneous normograde intramedullary pinning of feline femur fractures. Lucr. St. USAMV "Ion Ionescu de la Brad" Iași, vol. 53 (12) partea a 3, p. 180-185 , 2010, ISSN 1454-7406
6. Cornel Igna, Călin Luca, Roxana Dascălu, Larisa Schuszler, Marius Sabău - Osteogenesis capacity of free vascularised corticoperiosteal flap in dogs. Lucr. St. USAMV "Ion Ionescu de la Brad" Iași, vol. 53 (12) partea a 3, p. 186- 191, 2010, ISSN 1454-7406
7. Cornel Igna, Luca Calin, Roxana Dascalu, Marius Sabau, Larisa Schuszler - Comparative X-Ray Evaluation of Bone Healing in Dogs After Tibial Defects Fixed with Dynamic Compression Plate (DCP) and Low-Contact Dynamic Compression Plate (LC-DCP). Bulletin USAVM Cluj, 67(2) p. 110-117, 2010, ISSN 1843-5270; Electronic ISSN 1843-5378
8. Larisa Schuszler, C. Igna, M. Sabău, Roxana Dascălu, A. Sala, C. Luca - The role of lidocaine continuous infusion in pain control after orthopaedic surgery. Lucr. St. USAMV "Ion Ionescu de la Brad" Iași, vol 53 (12) partea a 3, p. 315- 318, 2010, ISSN 1454-7406
9. Igna C., Luca Calin, Oneț I, Schuszler Larisa, Sabău M., Dascălu Roxana, Miclăuș M. - Heterotopic neo-osteogenesis from vascularized periosteum and bone grafts. Scientific Work Veterinary Medicine, C Series, LIV, Bucuresti, 2010, sub tipar
10. Igna C., Luca Calin, Dascălu Roxana, Schuszler Larisa, Sabău M., Simona Anghel - The treatment of long bone defects in dogs with β . tricalcium phosphate and collagen matrix loaded with periosteal derived cells. Scientific Work Veterinary Medicine, C Series, LIV, Bucuresti, 2010. sub tipar

11. Schuszler Larisa, Igna C., Luca Calin, Sala A., Sabău M., Dascălu Roxana. - Anaesthetic protocol for closed reduction of hip dislocation in the dogs. Scientific Work Veterinary Medicine, C Series, LIV, Bucuresti, 2010, sub tipar
12. Larisa Schuszler, C. Igna, A. Sala, Roxana Dascălu, M. Sabău, C. Luca - Analgesic effect of premedication with tramadol or butorphanol in dogs undergoing osteosynthesis. Lucr. Șt. Medicină Veterinară, USAMVB Timișoara, vol. XLIII (2) Scientific Papers Vet. Med., p. 104-108, 2010
13. Cornel Igna, Călin Luca, Simona Anghel, Larisa Schuszler, Marius Sabău, Roxana Dascălu. - Evaluation of osteogenic activity and mineralization of cultured canine periosteal cells. Lucr. Șt. Medicină Veterinară, USAMVB Timișoara, vol. XLIII (2), Scientific Papers Vet. Med., p. 81-85, 2010
14. Igna C., Dascalu Roxana, Luca C., Schuszler Larisa, Sabau M. - X-ray evaluation of bone formation capacity by use of periosteal flap in dog. Lucr. Șt. Medicină Veterinară, USAMVB Timișoara, vol. XLIII (2), Scientific Papers Vet. Med., p. 86-89, 2010
15. Schuszler Larisa, Igna C., Luca C., Sala A., Sabau M., Dascalu Roxana - A clinical study of "ketofol" (ketamine-propofol mixture) for orthopedic procedure in dog. 11th International Symposium "Interdisciplinary Regional Research" in Szeged, Hungary, 13-15 October, ISIRR 2010 Hungary - Romania – Serbia, CD, p.175 ISBN 978-963-508-600-9
16. C. Igna, D. Onet, C. Luca, M. Miclaus, Larisa Schuszler, M. Sabau, Roxana Dascalu. - Bone mineral density in dogs after removal of rigid plates. 11th International Symposium "Interdisciplinary Regional Research" in Szeged, Hungary, 13-15 October, ISIRR 2010 Hungary - Romania – Serbia, CD, p.169 ISBN 978-963-508-600-9
17. C. Luca, C. Igna. Roxana Dascalu, Larisa Schuszler, M. Sabau, Simona Anghel. - Evaluation of bone defect healing, using bone substitutes: β -tricalcium phosphate and collagen matrix loaded with periosteal derived cells. 11th International Symposium "Interdisciplinary Regional Research" in Szeged, Hungary, 13-15 October, ISIRR 2010 Hungary - Romania – Serbia, CD, p.170 ISBN 978-963-508-600-9

Mulțumiri,

- Sponsorului nostru principal **CNCSIS** pentru grantul Idei 130 contact 1075 din cadrul Planului National PN II programul Proiecte de Cercetare Exploratorie PCE;
- Domnului **Prof. Dr. Corneliu Cotea** de la Universitatea de Stiinte Agricole și Medicina Veterinară „Ion Ionescu de la Brad” Iași pentru sprijinul acordat în pregătirea colorației Novelli și interpretarea imaginilor histologice;
- Doamnei Șef lucrări **Dr. Liliana Vasile** de la Universitatea de Medicina și Farmacie „Victor Babeș” Timișoara pentru ajutorul primit pentru lucrările de histologie necesitate de contract;
- Domnilor **Șef lucrări Dr. Onet D. și Asistent Dr. Miclaus M.** De la Spitalul Județean de Urgență Timiș al Universității de Medicina și Farmacie „Victor Babeș” Timișoara pentru ajutorul primit la efectuarea determinărilor de osteodensimetrie.
- Firmei **Ronda Medical** pentru disponibilitatea și promptitudinea aratăată în efectuarea unor reparații la aparatura ortopedică din dotarea Clinicii de Chirurgie a Facultății de Medicină Veterinară Timișoara.

Bibliografie selectiva

1. **Agata H et al.** – Effective bone engineering with periosteum derived cells, J Dent Res., 86(1), 79, 2007.
2. **Akiyama M et al.** - Periosteal cell pellet culture system: a new technique for bone engineering, Cell Transplant, 15(6), 521, 2006.
3. **Alexander D et al.** - Analysis of OPLA scaffolds for bone engineering constructs using human jaw periosteal cells, J Mater Sci Mater Med, 2007. index Pub Med.
4. **Bauer TW** - An overview of the histology of skeletal substitute materials. Arch Pathol Lab Med. 2007; 131(2):217. Review.
5. **Borselli C et al.** Induction of directional sprouting angiogenesis by matrix gradients. J Biomed Mater Res A 2007;80(2):297.
6. **Boswell S et al..** - Mechanical characteristics of locking and compression plate constructs applied dorsally to distal radius fractures, J Hand Surg [Am], 32(5), 623, 2007.
7. **Caria PH et al.** - Biological assessment of porous-implant hydroxyapatite combined with periosteal grafting in maxillary defects, J Oral Maxillofac Surg, 65(5), 847, 2007.
8. **Carpenter RD, Carter DR** - The mechanobiological effects of periosteal surface loads, Biomech Model Mechanobiol, 2007 index PubMed.
9. **Causa F et al.** - A multi-functional scaffold for tissue regeneration: The need to engineer a tissue analogue, Biomaterials, 28, 5093, 2007.
10. **Chen H et al.** - Alfacalcidol-Stimulated Focal Bone Formation on the Cancellous Surface and Increased Bone Formation on the Periosteal Surface of the Lumbar Vertebrae of Adult Female Rats, Calcif Tissue Int, 2008 index PubMed.

11. **Chen, X.B., et al.** - A histologic observation of bone formation induced by subperiosteal implantation of resorbable porous block beta-tricalcium phosphate on calvarial surface in rabbits, *Shanghai Kou Yi Xue*, 11(1), 40, 2002.
12. **De Bari C et al.** - A biomarker-based mathematical model to predict bone-forming potency of human synovial and periosteal mesenchymal stem cells, *Arthritis Rheum*, 58(1), 240, 2008.
13. **Dennis JE. et al.** - The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. *Cells Tissues Organs*. 2002;170(2-3):73
14. **Dennis JE, et al.** - Clinical-scale expansion of a mixed population of bone-marrow-derived stem and progenitor cells for potential use in bone-tissue regeneration. *Stem Cells*. 25(10):2575. Epub 2007
15. **Emans PJ et al.** - In vivo generation of cartilage from periosteum, *Tissue Eng.*, 11(3-4), 369, 2005.
16. **Eyckmans J, Luyten FP** - Species specificity of ectopic bone formation using periosteum-derived mesenchymal progenitor cells, *Tissue Eng.*, 12(8), 2203, 2006.
17. **Frayssinet P, Guichet JM** - Cellular aspects of bone regeneration: role of bone marrow periosteum, *Rev Chir Othop Reparatrice Appar Mot.*, 90(8), 765, 2004.
18. **Funk J.F et al.** - Promotion of bone healing through clinical application of autologous periosteum derived stem cells in a case of atrophic non-union, *Z Orthop Unfall*, 145(6), 790, 2007.
19. **Gelse K et al.** - Cell-based resurfacing of large cartilage defects: Long-term evaluation of grafts from autologous transgene-activated periosteal cells in a porcine model of osteoarthritis, *Arthritis Rheum*, 58(2), 475, 2008.
20. **Griffith LG, Swartz MA** - Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7(3):211
21. **Günes T et al.** - Combination of microfracture and periosteal transplantation techniques for the treatment of full-thickness cartilage defects, *Acta Orthop Traumatol Turc.*, 40(4), 315, 2006.
22. **Gupta A.** - The management of ununited fractures of the femoral neck using internal fixation and muscle pedicle periosteal grafting, *J Bone Joint Surg Br*, 89(11), 1482, 2007.
23. **Hacker MC, Mikos AG** - Trends in tissue engineering research. *Tissue Eng* 2006;12(8):2049.
24. **Hopf T, Osthege S** - Interfragmental compression of the Zespol osteosynthesis system. Experimental biomechanical studies, *Z Orthop Ihre Grenzgeb*, 125(5), 546, 1987.
25. **Hutmacher DW, Sittinger M** - Periosteal cells in bone engineering, *Tissue Eng.*, 9 suppl. 1, 45, 2003.
26. **Jain R et al.** - Influence of plate design on cortical bone perfusion and fracture healing in canine segmental tibial *J Orthop Trauma.*, 1999, 13(3):178.
27. **Jang DG et al.** - Simple excision and periosteal reattachment for the treatment of calcified cephalhematoma. Technical note, *J Neurosurg*, 106(2 Suppl), 162, 2007.
28. **Karagenorgiou V, Kaplan D** - Porosity of 3D biomaterial scaffold and osteogenesis. *Biomaterials* 2005;26:5474
29. **Khademhosseini A et al.** - Microscale technologies for tissue engineering and biology. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;21, 103(8):2480

30. **Kleinman HK et al.** - The role of the extracellular matrix in morphogenesis. *Curr Opin Biotechnol* 2003;14:526
31. **Kregor PJ et al.** - Cortical bone perfusion in plated fractured sheep tibiae. *J Orthop Res.*, 1995 Sep;13(5):715
32. **Kubo K et al.** - Microtopography of titanium suppresses osteoblastic differentiation but enhances chondroblastic differentiation of rat femoral periosteum-derived cells, *J Biomed Mater Res A.*, 2008. index PubMed
33. **Langer R, Tirrell DA.** - Designing materials for biology and medicine. *Nature* 2004;1;428(6982):487
34. **Levine DG, Richardson DW** - Clinical use of the locking compression plate (LCP) in horses: a retrospective study of 31 cases (2004-2006), *Equine Vet J*, 39(5), 406, 2007.
35. **Manfredini M et al.** - Autologous chondrocyte implantation: a comparison between an open periosteal-covered and an arthroscopic matrix-guided technique, *Acta Orthop Belg*, 73(2), 207-18, 2007.
36. **Matsuzaki H et al.** - Damaging fatigue loading stimulates increases in periosteal vascularity at sites of bone formation in the rat ulna *Calcif Tissue Int.* 2007, 80(6):391.
37. **Meury T, Alini M** - Endothelial cells modulate bone marrow stromal cell differentiation into osteoblasts. *Swiss Societies for Experimental Biology*, Davos, 2003
38. **Nair LS, Laurencin CT** - Polymers as biomaterials for tissue engineering and controlled drug delivery. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2006;102:47
39. **Norman JJ, Desai TA.** - Methods for fabrication of nanoscale topography for tissue engineering scaffolds. *Ann Biomed Eng* 2006;34(1):89.
40. **Ochaereon P, Herring SW** - Growing the mandible: role of the periosteum and its cells, *Anat Rec (Hoboken)*, 290(11), 1366, 2007.
41. **Olofsson L.B., et al.** - Periosteal transplantation to the rabbit patella, *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.*, 15(5), 560, 2007.
42. **Ortak T et al.** - Osteogenic capacities of periost grafts, periost flaps and prefabricated periosteal flaps: experimental study, *J Craniofac Surg.*, 16(4), 594, 2005.
43. **Ozdemir R et al.** - Evaluation of osteogenic and chondrogenic activities of prefabricated periallografts. *J Craniofac Surg.*, 16(6), 1015, 2005.
44. **Perrot P et al.** - Extraosseous bone formation obtained by association of mesenchymal stem cells with a periosteal flap in the rat, *Ann Plast Surg*, 59(2), 201, 2007.
45. **Sakata Y et al.** - Osteogenic potential of cultured human periosteum-derived cells - a pilot study of human cell transplantation into a rat calvarial defect model, *J Craniomaxillofac Surg.*, 34(8), 461, 2006
46. **Skjeldal S et al.** - Severe hindlimb ischemia causes periosteal proliferation in the rat tibia, *Acta Orthop Scand*, 68(6), 593, 1997.
47. **Steiner GG et al.** - The inverted periosteal graft, *Compend Contin Educ Dent*, 28(3), 154, 2007.
48. **Stürmer KM** - Elastic plate osteosynthesis, biomechanics, indications and technique in comparison with rigid osteosynthesis, *Unfallchirurg*, 99(11), 816, 1996.
49. **Svindland AD et al.** - Periosteal response to transient ischemia. Histological studies on the rat tibia, *Acta Orthop Scand*, 66(5), 468, 1995.
50. **Takushima A et al.** - Osteogenic potential of cultured periosteal cells in a distracted bone gap in rabbits, *J Surg Res.*, 78(1), 68, 1998.

51. **Teixeira CR et al.** - Tibial segmental bone defect treated with bone plate and cage filled with either xenogeneic composite or autologous cortical bone graft. An experimental study in sheep, *Vet Comp Orthop Traumatol*, 20(4), 269, 2007.
52. **Uddströmer L, Ritsilä V.** - Healing of membranous and long bone defects. An experimental study in growing rabbits, *Scand J Plast Reconstr Surg.*, 13(2), 281, 1979
53. **Ueno T et al.** - Histological comparison of bone induced from autogenously grafted periosteum with bone induced from autogenously grafted bone marrow in the rat calvarial defect model, *Acta Histochem*, 2007 index Pub Med.
54. **Ueno T. et al.** - Cellular origin of endochondral ossification from grafted periosteum, *Anat Rec*, 264(4), 348, 2001.
55. **Uthhoff HK et al.** - Internal plate fixation of fractures: short history and recent developments. *J Orthop Sci.* 2006 11(2):118
56. **Uthgenannt BA et al.** - Skeletal self-repair: stress fracture healing by rapid formation and densification of woven bone. *J Bone Miner Res.* 2007;22(10):1548
57. **Utvag SE et al.** - Effects of lesion between bone, periosteum and muscle on fracture healing in rats, *Acta Orthop Scan*, 69(2), 177, 1998.
58. **Yiannakopoulos CK et al.** - The biomechanical capacity of the periosteum in intact long bones, *Arch Orthop Trauma Surg*, 128(1), 117, 2008.
59. **Zhang X et al.** - Periosteal progenitor cell fate in segmental cortical bone graft transplantations: implications for functional tissue engineering, *J Bone Miner Res.*, 20(12), 2124, 2005.
60. **Brude, S. P., și col.,** (1998) - The Effect of Implants Loaded with Autologous Mesenchymal Stem Cells on the Healing of Canine Segmental Bone Defects. *The Journal of Bone and Joint Surgery*. 80:985-996.
61. **Capanna, R. and De Biase P.** (2009) - Scaffolds combined with stem cells and growth factors in reconstruction of large bone defects. www.recoa.org/Papers/2009/3cl302.pdf.
62. **Chen, A.C., și col.,** (2009) - Osteogenesis of prefabricated vascularized periosteal graft in rabbits. *J. Trauma.*, 67(1), pp 165-167,
63. **Clarke S.A și col.,** (2007) - Healing of an ulnar defect using a proprietary TCP bone graft substitute, JAX™, in association with autologous osteogenic cells and growth factors, *Bone*, vol.:40,pg.: 939-947.
64. **Dailiana, Z.H., și col.,** (2002) - Heterotopic neo-osteogenesis from vascularized periosteum and bone grafts. *J. Trauma.*, 53(5), pp 934-938,
65. **Gao T.J. și col.,** (1997), - Stabilization of an inserted tricalcium phosphate spacer enhances the healing of a segmental tibial defect in sheep *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, vol.:116, pg.:290-294.
66. **Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E.,** (2005) - Bone substitutes: an update. *Injury*, vol.:36, Suppl. 3, pg.:820-827.
67. **Hakimi M. și col.,** (2010) - Combined use of platelet-rich plasma and autologous bone grafts in the treatment of long bone defects in mini-pigs, *Injury, Int. J. Care Injured*, vol.: 41, pg.: 811-817.
68. **Igna, C. și col.,** (2010) - Osteogenesis capacity of free vascularized corticoperiosteal flap in dogs. *Lucr. St. USAMV Iasi*, 53(12),3,
69. **Igna, C.,** (2009) - Comparative studies between dynamic compression plate (DCP) and low-contact dynamic compression plate (LC-DCP). *Scientifical Papers Veterinary Medicine Iasi*, 52(11):609-611.

70. **Islam, O., și col.,** (2000) - Development and Duration of Radiographic Signs of Bone Healing in Children, *American Journal of Roentgenology*. 175:75-78.
71. **Jain, R.,** (1999) - Influence of plate design on cortical bone perfusion and fracture healing in canine segmental tibial fractures. *J. Orthop. Trauma.*, 13(3):178-186.
72. **Johnson, A. L., și col.,** (2005) - AO Principles of Fracture Management in the Dog and Cat. In: *Bone Healing. AO. Publishing, Dübendorf.*, p. 72-92
73. **Kalfas, I. H.,** (2001) - Principles of bone healing. *Neurosurgery Focus*. 10(4):1-5.
74. **Kaminski, A., Bürger H., Müller E.J.,** (2009) - Free corticoperiosteal flap in the treatment of an infected bone defect of the tibia. A case report, *Ortop. Traumatol. Rehabil.*, 11(4), pp 360-365,
75. **Koivukangas A.,** (2002) - *Effects of long-term clodronate administration on bone and on fracture healing in rat, with special reference to methodological aspects, Academic Dissertation Faculty of Medicine, University of Oulu*, pg.:17-19
76. **Kregor, P. J., și col.,** (1995) - Cortical bone perfusion in plated fractured sheep tibiae. *J. Orthop. Res.*, 13(5):715-724
77. **Malizos, K. N., și Papatheodorou L. N.,** (2005) - The healing potential of the periosteum: Molecular aspects, *Injury. International Journal of the Care of the Injured*. 36:S13—S19
78. **Mata A. și col.,** (2010) - Bone regeneration mediated by biomimetic mineralization of a nanofiber matrix, *Biomaterials*, vol.:31, pg.: 6004-6012.
79. **Matsuzaki, H., și col.,** (2007) - Damaging fatigue loading stimulates increases in periosteal vascularity at sites of bone formation in the rat ulna. *Calcif. Tissue Int.*, 80(6):391-399.
80. **Nienhuijs ME. și col.,** (2010), - Healing of bone defects in the goat mandible, using COLLOSS E and beta-tricalciumphosphate, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, vol.:92(2), pg.:517-524.
81. **Ortak, T., și col.,** (2005) - Osteogenic capacities of periost grafts, periost flaps and prefabricated periosteal flaps: experimental study. *J. Craniofac, Surg.*, 16(4), pp 594-600,
82. **O'Sullivan, M.E., Chao E.Y., și Kelly P.J.,** (1989) - The effects of fixation on fracture-healing. *Journal of Bone and Joint Surgery*. 71:306-310.
83. **Ozerdem, O., și col.,** (2003) - Roles of periosteum, dura, and adjacent bone on healing of cranial osteonecrosis. *Journal of Craniofacial Surgery*. 14(3):371-379.
84. **Perka, C., și col.,** (2000) - Segmental bone repair by tissue-engineered periosteal cell transplants with bioresorbable fleece and fibrin scaffolds in rabbit. *Biomaterials*. 21(11):1145-1153.
85. **Ragni P, Lindholm TS.,** (1992) - Porous hydroxyapatite blocks combined to demineralized bone matrix and autogenous bone marrow induced spinal fusion in rabbit. New trends in bone grafting, *University of Tampere, Tampere*, pg. 118-120
86. **Redlich, A., și col.,** (1999) - Bone engineering on the basis of periosteal cells cultured in polymer fleeces. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 10:767-772.
87. **Rodrigues Cunha M. și col.,** (2008) - Implants of polyanionic collagen matrix in bone defects of ovariectomized rats, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol.:19, pg.:1341–1348
88. **Sauerbier, S., și col.,** (2007) - Sinus augmentation with periosteum derived tissue engineered bone, *Europ. Cell Mat.*, 13 (2), pp 58,

89. **Schouten Corinne și col.,** (2010) - In vivo bone response and mechanical evaluation of electrosprayed CaP nanoparticle coatings using the iliac crest of goats as an implantation mode, *Acta Biomaterialia* vol.:6, pg.: 2227–2236.
90. **Soltan, M., Smiller D., și Soltan C.,** (2009) - The inverted periosteal flap: A source of stem cells enhancing bone regeneration. *Implant Dentistry*. 18:373-377.
91. **Stürmer, K. M.** (1996). Elastic plate osteosynthesis, biomechanics, indications and technique in comparison with rigid osteosynthesis. *Unfallchirurg*. 99(11):816-829.
92. **Svindland, A.D., și col.,** (1995) - Periosteal response to transient ischemia: Histological studies on the rat tibia. *Acta Orthopaedica*, 66(5), pp 468-472,
93. **Takaaki, U. și col.,** (2001) - Cellular Origin of Endochondral Ossification From Grafted Periosteum, *The Anatomical Record*, 264, pp 348–357,
94. **Takeuchi, S., Matsuo A., Chiba H.,** (2010) - Beneficial role of periosteum in distraction osteogenesis of mandible: its preservation prevents the external bone resorption. *Tohoku J. Exp. Med.*, 220(1), pp 67-75,
95. **Terjesen, T.** (1984) - Bone healing after metal plate fixation and external fixation of the osteotomized rabbit tibia. *Acta Orthopaedica*. 55(1):69-77.
96. **Uhthoff, H., Poitras K., P., și Backman D. S.,** (2006) - Internal plate fixation of fractures: short history and recent developments. *Journal of Orthopaedic Science*. 11:118–126.
97. **Vögelin, M.D.E., și col.,** (2002) - Prefabrication of bone by use of a vascularized periosteal flap and bone morphogenetic protein. *Plast. Reconstr. Surg.*, 109(1), pp 190-198,
98. **Wong R.W.K., Rabie A.B.M.** (2010), - Effect of Bio-Oss® Collagen and Collagen Matrix on Bone Formation, *The Open Biomedical Engineering Journal*, vol.: 4, pg.: 71-76.
99. **Woo Seob, Han Koo** (2005), - Tissue Engineered Vascularized Bone Formation Using in vivo Implanted Osteoblast-Polyglycolic acid Scaffold , *Journal of Korean Medical Science*, vol.: 20, pg.: 479-482..
100. **Xinping, Z., și col.,** (2008) - Engineering Periosteum for Structural Bone Graft Healing. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 466:1777–1787.
101. **Xiong, Y., și col.,** (2009) - Comparison of a new minimum contact locking plate and the limited contact dynamic compression plate in an osteoporotic fracture model. *International Orthopaedics (SICOT)*. 33:1415–1419.
102. **Yuehuei, H., Kylie A., și Martin L.,** (2003) - Handbook of histology methods for bone and cartilage. *Humanna Press Inc., Totowa, N.J.*