

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

RAPORT DE CERCETARE  
CONTRACT 1075/2009

GHIDAREA REGENERARII OSOASE PERIOSTALE

ETAPA II: DECEMBRIE 2009 (finala an 2009)

**Obiectiv:** Studiu experimental in vivo al morfogenezei osoase in transplanturile topice si ectopice de periost (oase corticale, oase spongioase)

**ACTIVITATEA**

- 2.1. Elaborarea unor modele experimentale animale
- 2.2. Monitorizarea clinica si paraclinica a modelului animal realizat
- 2.3. Studiul histopatologic al implantului periostal
- 2.4. Audit intern/raport final an
- 2.5. Diseminare rezultate obiectiv 2/2009

Director proiect,  
Prof. Dr. Igna Cornel

## ACTIVITATEA 2.1. Elaborarea modelului experimental animal

Planul de realizare a acestei activitati a presupus organizarea a mai multor loturi experimentale, subordonate tipului de transplant periostal si in consecinta divizate in subetape de lucru:

### - **Implantarea topica (2.1.A)**

- lambouri periostale de pe os spongios pe os spongios (2.1.A<sup>1</sup>)
- lambouri periostale de pe os cortical pe os cortical (2.1.A<sup>2</sup>)

- **Implantare heterotopica (2.1.B)** os cortical-periost spongios (femur acoperit cu periost scapular) și respectiv os spongios-periost cortical (spata acoperită cu lambou periostal femural).

### - **Implantare ectopica (2.1.C)**

- lambou liber de periost spongios (nevascularizat) – (2.1.C<sup>1</sup>)
- lambou liber de periost cortical (nevascularizat) – (2.1.C<sup>2</sup>)
- lambou de periost cortical (vascularizat) – (2.1.C<sup>3</sup>)
- lambou de periost cu fragment osos cortical – femur (vascularizat) - (2.1.C<sup>4</sup>)
- lambou de periost cu fragment osos cortical – tibie (vascularizat) - (2.1.C<sup>5</sup>)

Toate animalele incluse in loturile experimentale au fost deparazitate si vaccinate (DHPPi + RL) si in urma examenului clinic preoperator considerate sanatoase.

### **2.1.A – Modelul animal de implantarea topică a lambourilor de periost**

#### **2.1.A<sup>1</sup>- Transplant lambouri periostale de pe os spongios pe os spongios**

(de pe spata dreaptă pe spata stângă și de pe spata stângă pe spata dreaptă)

Studiul s-a realizat pe 8 câini (tabelul 1), de rasă comună, de ambele sexe, cu vârsta cuprinsă între 2 ½ ani și 5 ani, cu greutate corporală între 18 și 29 kilograme, de la care sub anestezie generală (acepromazină – ketamină – izofluran) s-a recoltat periost din fosa supraspinoasă dreaptă și s-a transplantat în fosa supraspinoasă stângă, iar din fosa supraspinoasă stângă s-a transplantat pe locul ramas deperiostat pe fosa supraspinoasă dreaptă.

Tabelul 1.

Subiect	Sex	Greutate (kg)	Vârsta (ani)
1	Mascul	24	2 1/2
2	Mascul	18	3
3	Mascul	26	4
4	Femela	23	3 ½
5	Mascul	25	4 ½
6	Mascul	29	4
7	Femela	20	3
8	Femela	19	5

Protocolul anestezic a constat în: administrarea intravenoasă a premedicației anestezice 0,4 mg/kg Acepromazină 1% urmată la interval de 15 minute de 8 mg/kg Ketamină 10% după care subiecții au fost intubați și conectați la aparatul de narcoză inhalatorie – circuit semiinchis - folosindu-se pe toată durata intervenției Izofluran la concentrații care au variat între 5 % și 0,5 %, acestea fiind corelate cu timpii operatori. Intraoperator pacientii au fost monitorizati dupa un protocol standard neinvaziv care a inclus masurarea la intervale prestabilite de timp (5 minute) a presiunii arteriale (sistolice, diastolice si medii), a saturatiei hemoglobinei în oxigen, a frecventei cardiace si a pulsului si a frecventei respiratorii.

Abordul regiunii s-a facut prin acces clasic, prin incizia pielii in regiunea supraspinoasa urmata de ridicare-departare a muschilor infra- si supraspinoși (fig. 1.a) si evidentierea suprafetei osoase a fosei supraspinoase de pe care dupa deperiostare s-au recoltat lambouri cu o suprafata de cca 2 cm<sup>2</sup> (fig.1 b). Lambourile obținut au fost transplantate în locul rămas deperiostat de pe spata opusa (fig. 1c si d). Dupa transplantare pielea s-a suturat in puncte separate.

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

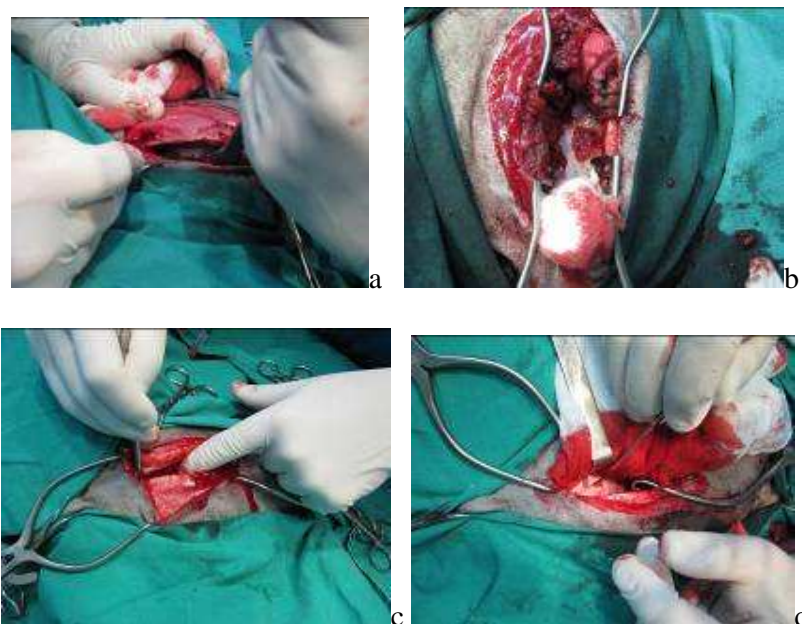


Fig. 1.a,b,c,d. Aspecte intraoperatorii

**2.1.A<sup>2</sup> - Transplant lambouri periostale de pe os cortical pe os cortical**  
(de pe femurul drept pe femurul stâng și de pe femurul stâng pe femurul drept)

Studiul s-a realizat pe 8 câini (tabelul 2), de rasă comună, de ambele sexe, cu vârsta cuprinsă între 3 și 5 ani, cu greutate corporală între 17 și 27 kilograme, de la care sub anestezie generală (protocol anestezic identic cu cel aplicat lotului 2.1.A<sup>1</sup>) s-a recoltat periost de pe diafiza femurală dreaptă și s-a transplatat pe diafiza femurală stângă, iar de pe diafiza femurală stângă s-a transplatat pe locul ramas deperiostat pe diafiza femurală dreaptă. Postoperator s-a asigurat analgezia prin administrarea de Butorfanol in doza de 0,25 mg/kg, la interval de 4 ore în primele 12 ore după intervenție.

Tabelul 2

Subiect	Sex	Greutate (kg)	Vârsta (ani)
1	Mascul	22	3 ½
2	Mascul	19	4
3	Femela	17	3
4	Mascul	25	4 ½
5	Mascul	27	5
6	Mascul	23	3
7	Femela	20	3 ½
8	Mascul	21	4

Accesul la periost s-a facut prin incizia pileii pe fata laterala a regiunii copsei, in treimea superioara, urmata de dilacerarea boanta a musculaturii (m. cvadriceps) cu evidentierea razei osoase, diafiza proximala

(fig. 2a, b). Prin tehnici de decolare a periostului s-au recoltat lambouri cu o suprafata de cca 2 cm<sup>2</sup> de pe femurul drept și de pe femurul stâng, lambourile obținute au fost transplantate în locul deperiostat pe femurul opus (fig. 2 c, d). Dupa transplantare planul muscular a fost suturat in fir continuu cu material resorbabil iar pielea s-a suturat in puncte separate.

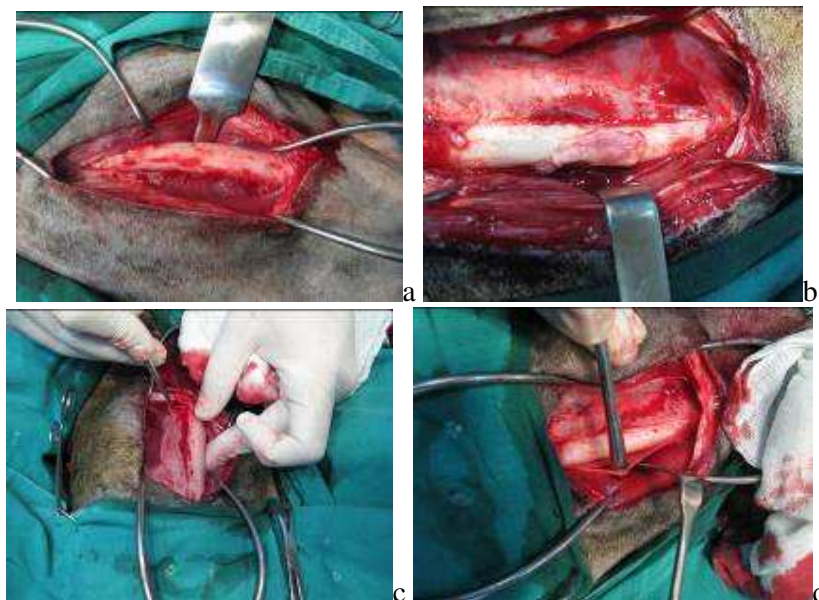


Fig. 2. a, b, c, d, Aspectul intraoperator al recoltării și transplantării de periost

### **2.1. B. - Modelul de implantare heterotopic**

[os cortical-periost spongios (femur acoperit cu periost scapular) și respectiv os spongios-periost cortical (spata acoperită cu lambou periostal femural)]

Studiul a fost realizat pe 8 câini (tabelul 3), de rasă comună, de ambele sexe, cu vârsta cuprinsă între 2 ½ și 4 ½ ani, cu greutate corporală între 16 și 26 kilograme, de la care sub anestezie generală (acepromazină – ketamină – izofluran – protocol identic cu cel aplicat in modelul experimental A) s-a recoltat periost din fosa suprascapuloasă a spetei drepte și s-a transplantat pe diafiza femurală stângă, iar de pe diafiza femurală stângă s-a transplantat pe locul ramas deperiostat în fosa suprascapuloasă dreaptă. Post operator s-a asigurat analgezia prin administrarea de Butorfanol 0,25 mg/kg la interval de 4 ore în primele 12 ore după intervenție.

Tabelul 3.

Subiect	Sex	Greutate (kg)	Vârsta (ani)
1	Mascul	26	3
2	Mascul	18	2 ½
3	Mascul	24	4
4	Femela	23	3 ½
5	Femela	16	4
6	Mascul	25	3
7	Femela	22	4 ½
8	Femela	19	2 ½

Accesul operator la diafiza femurala a fost clasic, abordarea laterala in treime proximala-mijlocie, iar spata prin abordare laterala pe spina scapulara si ridicare- departare a muschilor infra- si suprascapulari.

S-au recoltat lambouri cu o suprafață de cca 2 cm<sup>2</sup> de pe femurul drept și de pe femurul stâng, precum și din fosele supraspinoase ale spetelor, lambourile de pe femururi au fost transplantate în locurile deperiostate de pe spete, iar lambourile de pe spete în locurile deperiostate de pe femururi (fig. 3 și 4).

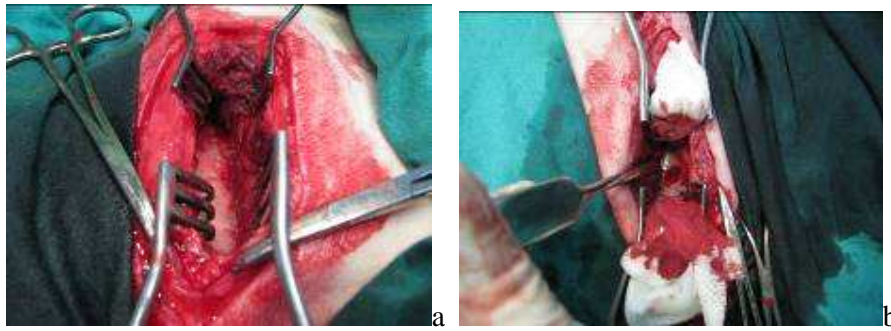


Fig. 3.a, b, Aspectul intraoperator al implantării heterotopice

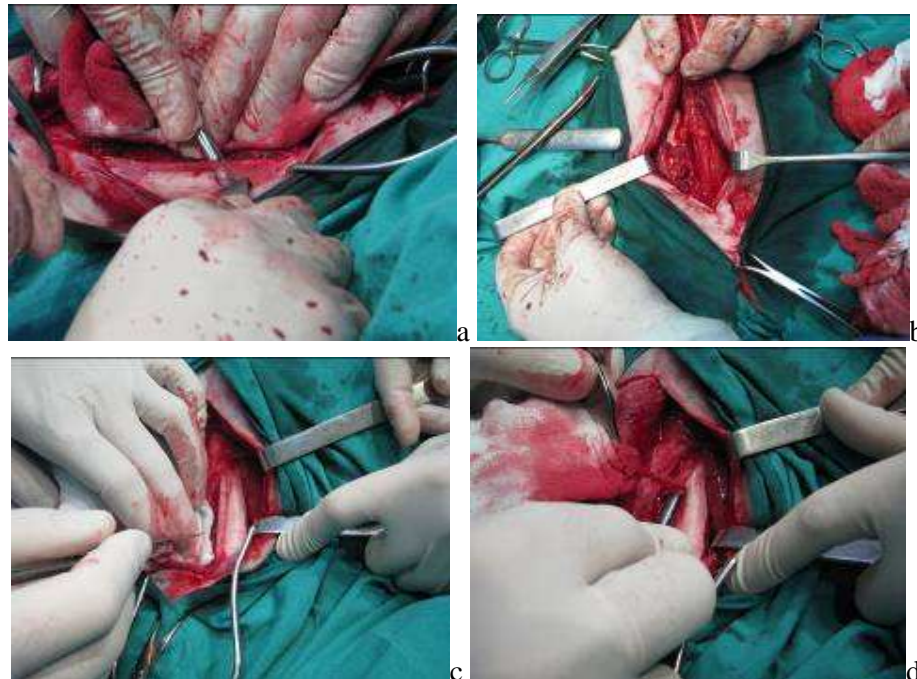


Fig. 4. a, b, c, d, Aspectul intraoperator al transplantării heterotopice a periostului (a,b- femurul drept, c,d- femurul stâng)

### **2.1.C – Modelul de implantare ectopica**

Studiul a fost realizat pe 20 câini (tabelul 4), de rasă comună, de ambele sexe, cu vârsta cuprinsă între 2 și 5 ani, cu greutate corporală între 20 și 32 kilograme, repartizati conform tabelului 4, la care sub anestezie generală (protocol anestezic unic descris anterior) s-au realizat implantarea ectopica.

Subiect	Sex	Greutate (kg)	Vârsta (ani)	Model de transplantare
1	Mascul	26	3	2.1.C <sup>1</sup> lambou liber de periost spongios (nevascularizat)
2	Mascul	25	4	
3	Mascul	29	5	
4	Femela	32	3 ½	
5	Femela	26	4	2.1.C <sup>2</sup> lambou liber de periost cortical (nevascularizat)
6	Mascul	25	3	
7	Femela	20	4 ½	
8	Femela	21	2 ½	
9	Femela	27	4	2.1.C <sup>3</sup> lambou de periost cortical (vascularizat)
10	Mascul	29	2	
11	Femela	31	2 ½	
12	Femela	31	4	
13	Femela	22	2	2.1.C <sup>4</sup> lambou de periost cu fragment osos cortical – femur (vascularizat)
14	Femela	26	2	
15	Mascul	21	4	
16	Mascul	20	5	
17	Mascul	20	5	2.1.C <sup>5</sup> lambou de periost cu fragment osos cortical – tobie (vascularizat)
18	Mascul	22	3½	
19	Mascul	24	4	
20	Femela	26	2½	

Accesul operator la diafiza femurala in scopul recoltarii fragmentului de periost liber cortical, a fost clasic prin abordare laterala in treimea proximala-mijlocie. Pentru recoltarea lamboului liber de periost spongios, spata a fost abordata lateral pe spina scapulara. La fiecare individ s-a lucrat pe ambele membre pelvine, respectiv toracale. Lambourile rezultate avand o suprafata de cca 2 cm<sup>2</sup> au fost implantate ectopic în musculatura membrului opus recoltarii, periost scapular stâng în mușchiul triceps drept – lot 2.1.C<sup>1</sup> (fig. 5), periost femural stang în mușchiul cvadriiceps femural drept – lot 2.1.C<sup>2</sup> (fig. 6), precum si invers.

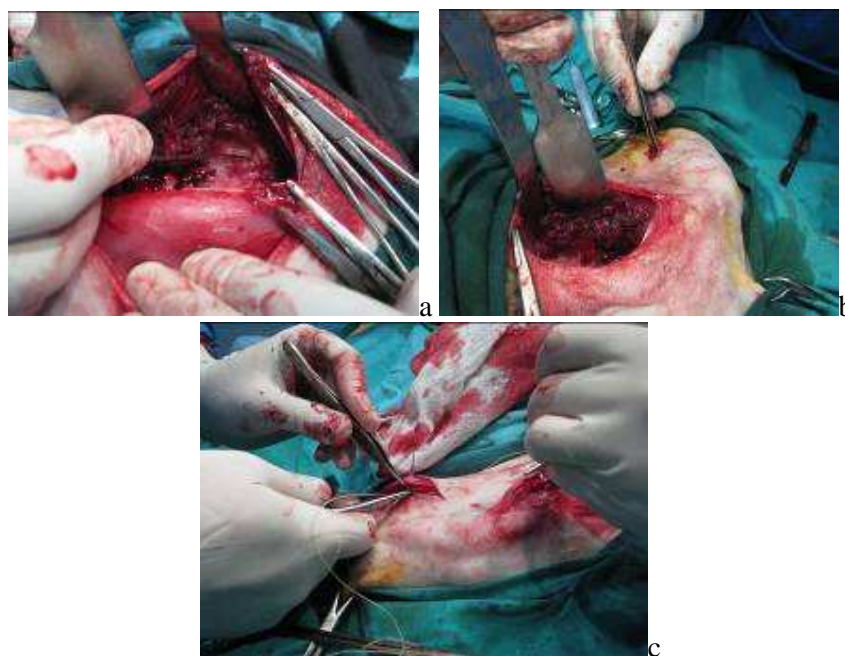


Fig. 5. a,b,c, Aspect intraoperator al implantării ectopice a lambourilor periostale – lot 2.1.C<sup>1</sup>

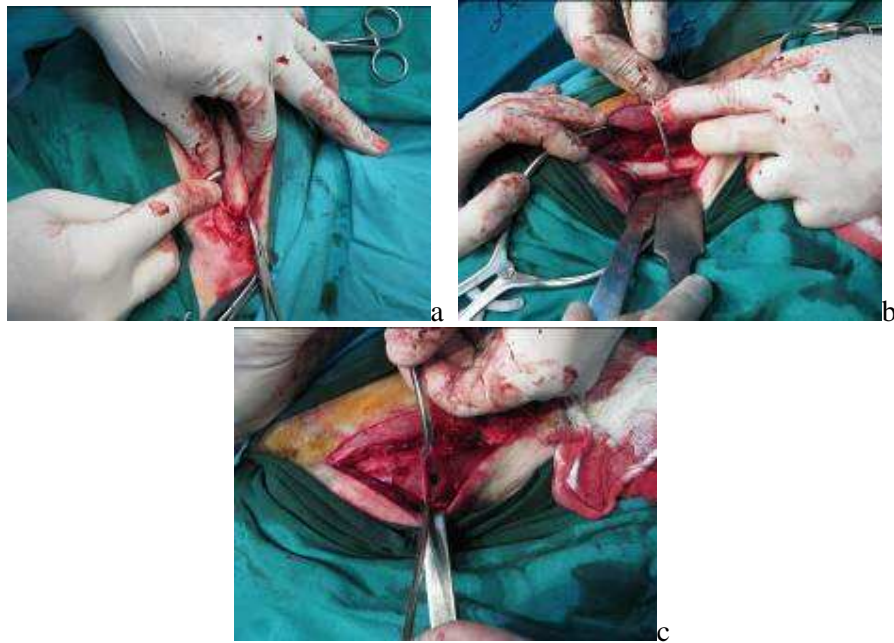


Fig. 6 a,b,c, Aspecte intraoperatorii a,b- recoltarea lamboului periostal, c –implantarea periostului în m. cvadriceps lot 2.1.C<sup>2</sup>

La lotul 2.1.C<sup>3</sup> accesul operator la diafiza femurală a fost cel clasic, descris anterior. Prin tehnici de decolare a periostului de pe suprafața osoasă s-a reușit ridicarea pe trei laturi a unui lambou de 1,5/3 cm cu menținerea continuității cu periostul osos (lambou vascularizat). Punerea în evidență a vascularizației lamboului s-a realizat prin fluoroscopie continuă după injectarea de substanțe de contrast (ultravist) intraoperator în artera femurală al cărei acces a fost obținut prin descoperire în regiunea inghinală. Lamboul vascularizat a fost trecut printr-un tunel muscular în mușchiul cvadriceps și a fost amplasat la aproximativ 1 – 1,5 cm cranial de diafiza femurală, în treimea mijlocie (fig. 7). Periostul a fost implantat sub forma rulantă, cu menținerea la interior a stratului celular, și fixat la musculatură prin sutură în două puncte separate.

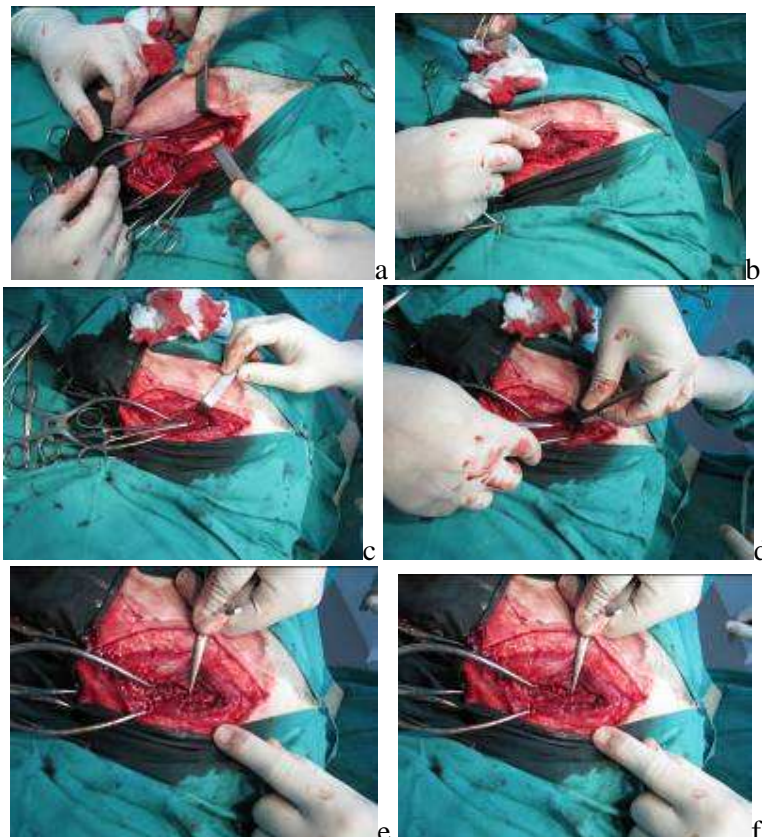


Fig. 7. Aspect intraoperator, a) decolarea periostului vascularizat de pe diafiza femurală treimea mijlocie; b) crearea tunelului intramuscular; c) crearea cilindrului periostal în musculatură; d) sutura cilindrului periostal la musculatură; e,f) aspectul cilindrului periostal suturat la musculatură lot 2.1.C<sup>3</sup>

La lotul 2.1.C<sup>4</sup> accesul operator la diafiza femurala a fost cel clasic, descris mai sus. După incizia periostului, pe trei laturi ale unui dreptunghi, s-a delimitat dimensiunea implantului (1,5/4 cm). Cu ajutorul unei dalti la capatul liber al lamboului s-a decupat un fragment osos de mici dimensiuni cu menținerea contactului cu periostul. S-a continuat decolarea periostului pe lungimea delimitată inițial obținându-se lamboul de periost vascularizat cu fragment osos cortical. Lamboul vascularizat – după verificare angiografică similar tehnicilor aplicate la lotul anterior - a fost trecut printr-un tunel muscular în mușchiul cvadriceps și amplasat la aproximativ 1,5 – 2 cm cranial de diafiza femurală, în treimea mijlocie cu ancorare cu fir de sutură (catgut) la mușchi (fig. 8).

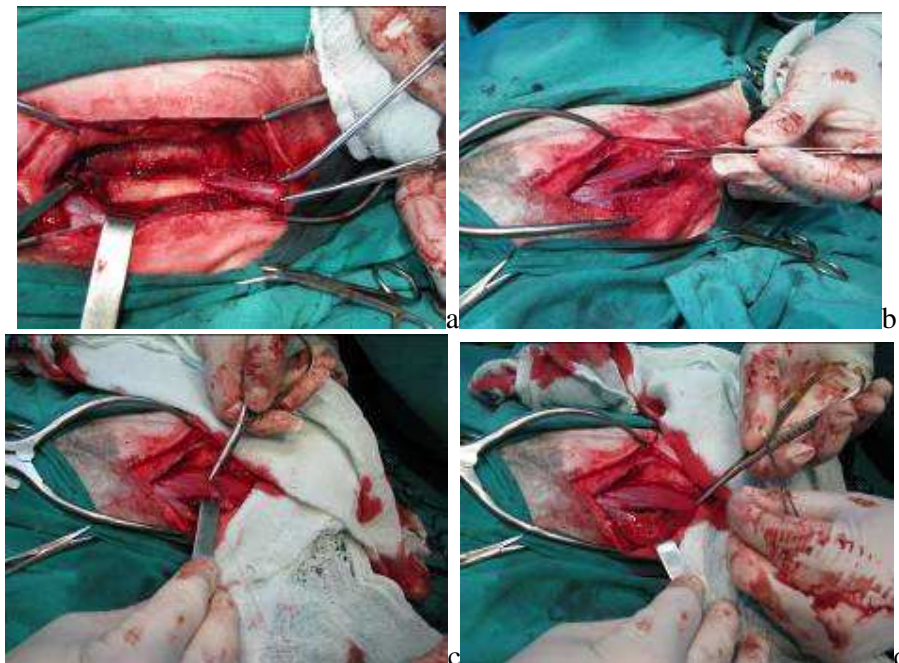


Fig. 8. Aspect intraoperator, a) decolarea periostului vascularizat împreună cu fragmentul osos de pe diafiza femurală treimea mijlocie b) crearea tunelului intra muscular și trecerea flap-ului periostal c) sutura flap-ului periostal vascularizat și a fragmentului osos la musculatură, d) aspectul flap-ului periostal suturat la musculatură – lot 2.1.C<sup>4</sup>

La lotul 2.1.C<sup>5</sup> accesul operator la tibie (treimea inferioara) a fost cel clasic, pe partea mediala. Prin fluoroscopie intraoperator după injectarea de substanțe de contrast s-a pus în evidență vascularizarea viitorului lambou și la sfârșit imediat postoperator s-a verificat menținerea continuității vasculare. După incizia periostului, pe trei laturi ale unui dreptunghi care au delimitat dimensiunile lamboului (aproximativ 1/2 cm) prin daltuire s-a decupat osul pe cele trei laturi rezultând un lambou osteo-periostal care a fost rabatat în țesutul muscular adiacent (fig. 9,10 și 11).



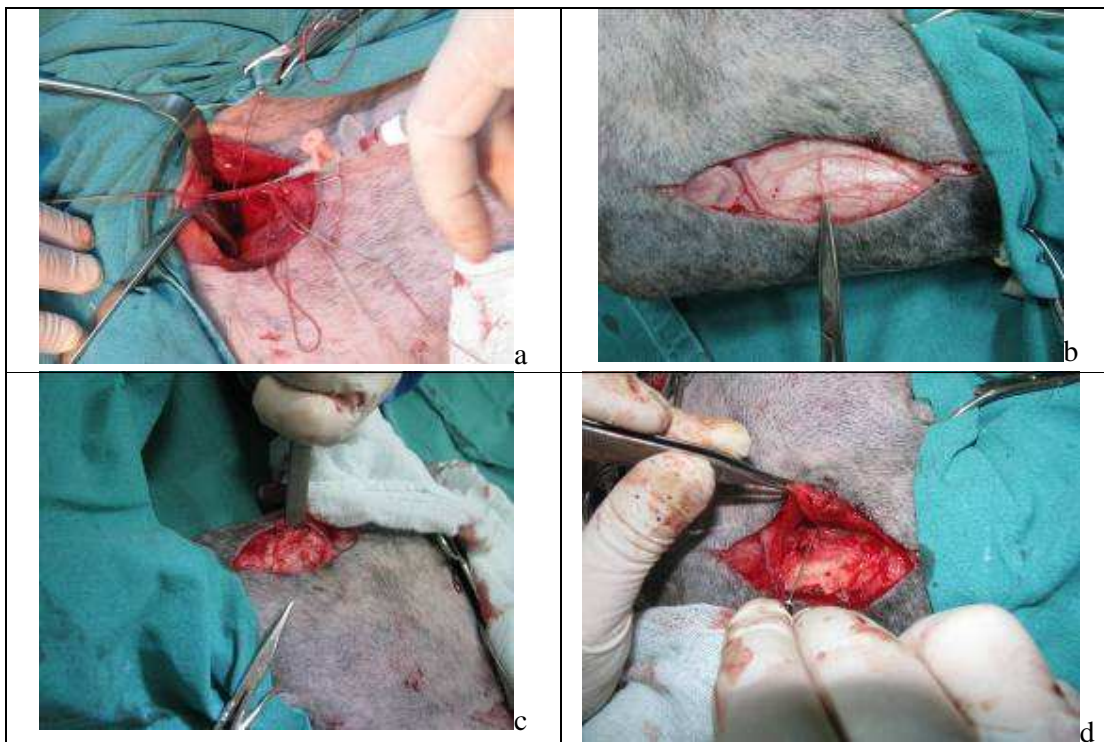


Fig. 9. Aspecte intraoperatorii lot 2.1.C<sup>5</sup> subiect 18: evidențierea arterei femurale și injectarea substanței de contrast (a), delimitarea fragmentului de periost (b), desprinderea lamboului osteo-periostal (c), ridicarea-rabatarea lamboului (d)

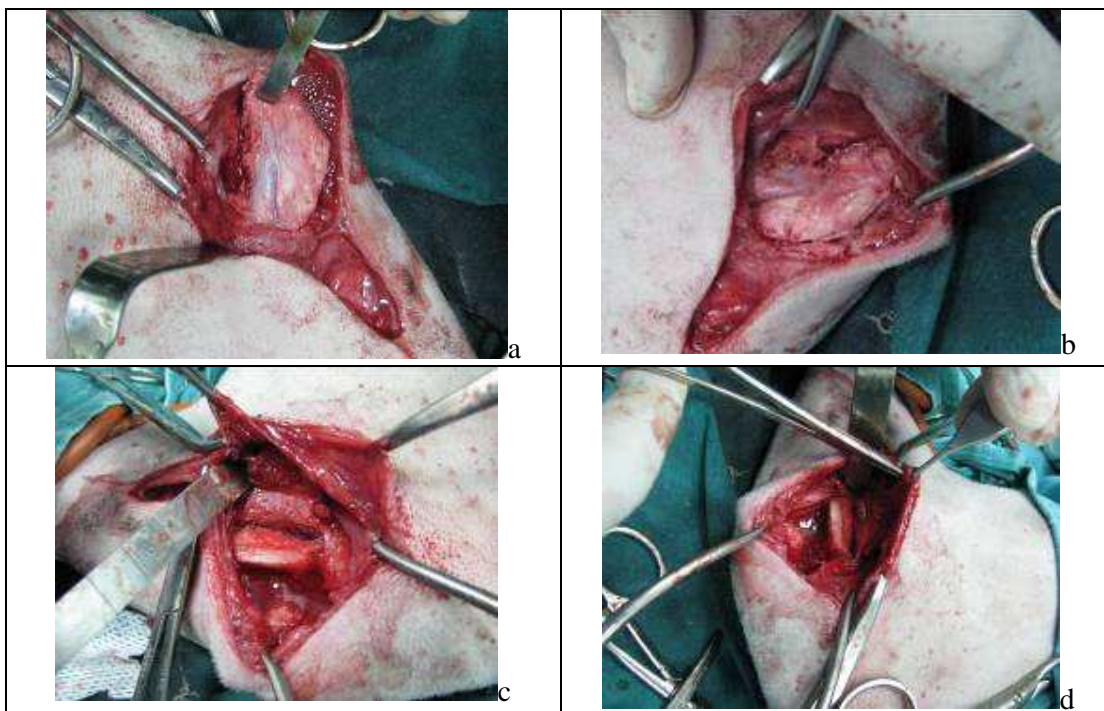


Fig. 10 Aspecte intraoperatorii lot 2.1.C<sup>5</sup> subiect 20: evidențierea macroscopică a vascularizației fragmentului de periost delimitat (a), delimitarea prin daltuire (b), decolarea-rabatarea lamboului osteo-periostal cu menținerea vascularizației (c), implantarea în muscuțura învecinată (d)



Fig. 11 Aspect fluoroscopic postoperator imediat dupa administrarea de ultravist in scopul evidentierii continuitatii vasculare a lamboului osteo=periostal - lot 2.1.C<sup>5</sup> subiect 20

## REZULTATE

Modelul experimental propus este realizabil fara a se intampina dificultati tehnice deosebite in ceea ce priveste prelevarea si implantarea topica, heteropica sau ectopica.

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

### **Concluzie**

Cel sapte modele experimentale canine sunt realizabile fara a se intampina dificultati tehnice deosebite.

## ACTIVITATEA 2.2. Monitorizarea clinica si paraclinica a modelului animal realizat

Monitorizarea postoperatorie a celor opt loturi de modele animale pentru grefele de periost (de pe os spongios pe os spongios - 2.1.A<sup>1</sup>, de pe os cortical pe os cortical - 2.1.A<sup>2</sup>, de pe os cortical-periost spongios și respectiv os spongios-periost cortical 2.1.B, lambouri ectopice nevascularizate: lambou liber de periost spongios - 2.1.C<sup>1</sup> și de periost cortical – 2.1.C<sup>2</sup>, lambouri ectopice vascularizate: periost cortical – 2.1.C<sup>3</sup>, periost cu fragment osos cortical – femur - 2.1.C<sup>4</sup> și periost cu fragment osos cortical – tibie - 2.1.C<sup>5</sup>) s-a facut pentru o perioada de 63 de zile, cu exceptia lotului 2.1.C<sup>5</sup> la care monitorizarea este in derulare situandu-ne la momentul 21 de zile (lot constituit ulterior datorita rezultatelor obtinute la loturile 2.1.C<sup>3</sup> și 2.1.C<sup>4</sup>), prin:

- examen clinic zilnic timp de 21 zile postoperator urmarindu-se:
  - status clinic general (frecventa cardiaca, frecventa respiratorie, temperatura corporala, aspect mucoase, apetit, defecare, urinare)
  - aspectul plagilor postoperatorii și vindecarea inciziei,
  - sensibilitatea dureroasa la palpare,
  - habitus, comportament (inclusiv algic postoperator),
  - atitudine in statiune, locomotie,

- examen radiografic prin radiografie conventionala si examen fluoroscopic al zonei de interes preoperator, imediat postoperator si apoi la 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 și 63 de zile urmarindu-se influenta la locul de implantare, reactie tisulara in vecinatate, reactie vasculara, modificari de radioopacitate. Pentru examinarea fluoroscopică toti subiecții au fost anesteziati la fiecare examinare, s-au folosit Acepromazina 0,2 mg/kg, Ketamină 3 mg/kg și narcoză inhalatorie pe masca cu Izofluran la concentrație de 1% timp de aproximativ 30 de minute pentru fiecare examinare;

- injectare de fluorocromi la lotul 2.1.C<sup>3</sup> și 2.1.C<sup>4</sup>, 0,25 mg/kg tetraciclina SC (ziua 1 a monitorizarii postoperatorii), 0,25 mg/kg alizarina red SC (in ziua 21 a monitorizarii postoperatorii) urmata de administrarea dupa 14 zile a 0,25 mg/kg calceina SC și dupa alte 21 de zile a tetracilinei cu recoltare dupa o saptamana in scopul evidentierii tesutului osos nou format. Prelevarea prin acces operator a fragmentelor periostale plasate ectopic in musculatura, introducerea in alcool 70 volume urmat de bai seriate pentru deshidratare, inglobare in parafina, taiere urmata fixare pe lama cu interpretare histologica la microscop cu fluorescenta.

### REZULTATE si DISCUTII

In perioada postoperatorie imediata s-a constatat la toti indivizii luati in studiu un status clinic general bun, fara tulburari de locomotie si cu un comportament alimentar normal. Ingerarea primului tain postoperator s-a facut la un interval de maxim 6 ore, fapt ce dovedeste eficienta medicatiei analgezice in recuperarea postoperatorie.

Valorile temperaturii corporale s-au incadrat in limitele normale.

Sensibilitatea algica la palparea plagii regiunii adiacente plagii operatorii prezenta in primele 3-4 zile postoperator a disparut complet la 7 zile, indiferent de tipul de grefa practicat.

Vindecarea plagii operatorii s-a realizat primar la toti indivizii inclusi in experiment (fig. 12 a, b, c) cu exceptia unui individ (subiectul 2 lotul 2.1.A<sup>2</sup> – fig. 12 d) la care datorita spatiului limitat de miscare si a comportamentului agitat s-a format un serom și s-a produs dehiscenta plagii pe o lungime de 2 cm, plaga care ulterior s-a vindecat secundar in timp de doua saptamani, interval de timp in care a persistat și durerea, de intensitate moderata, la palparea regiunii.



Fig. 12. Aspectul plăgilor operatorii la 7 zile postoperator

La lotul 2.1.A<sup>1</sup> și 2.1.A<sup>2</sup> în urma analizei imaginilor obținute preoperator, imediat postoperator și la intervalele de timp precizate în protocolul de monitorizare nu s-au constatat modificări ale radiodensității țesuturilor la locul de implantare la nici unul dintre indivizi pe parcursul întregii perioade de monitorizare (fig. 13, 14, 15, 16), ceea ce semnifică recunoașterea ca structura self a lamboului periostal cu menținerea viabilității sale, aderența la substratul osos și anastomozarea lui la periostul învecinat

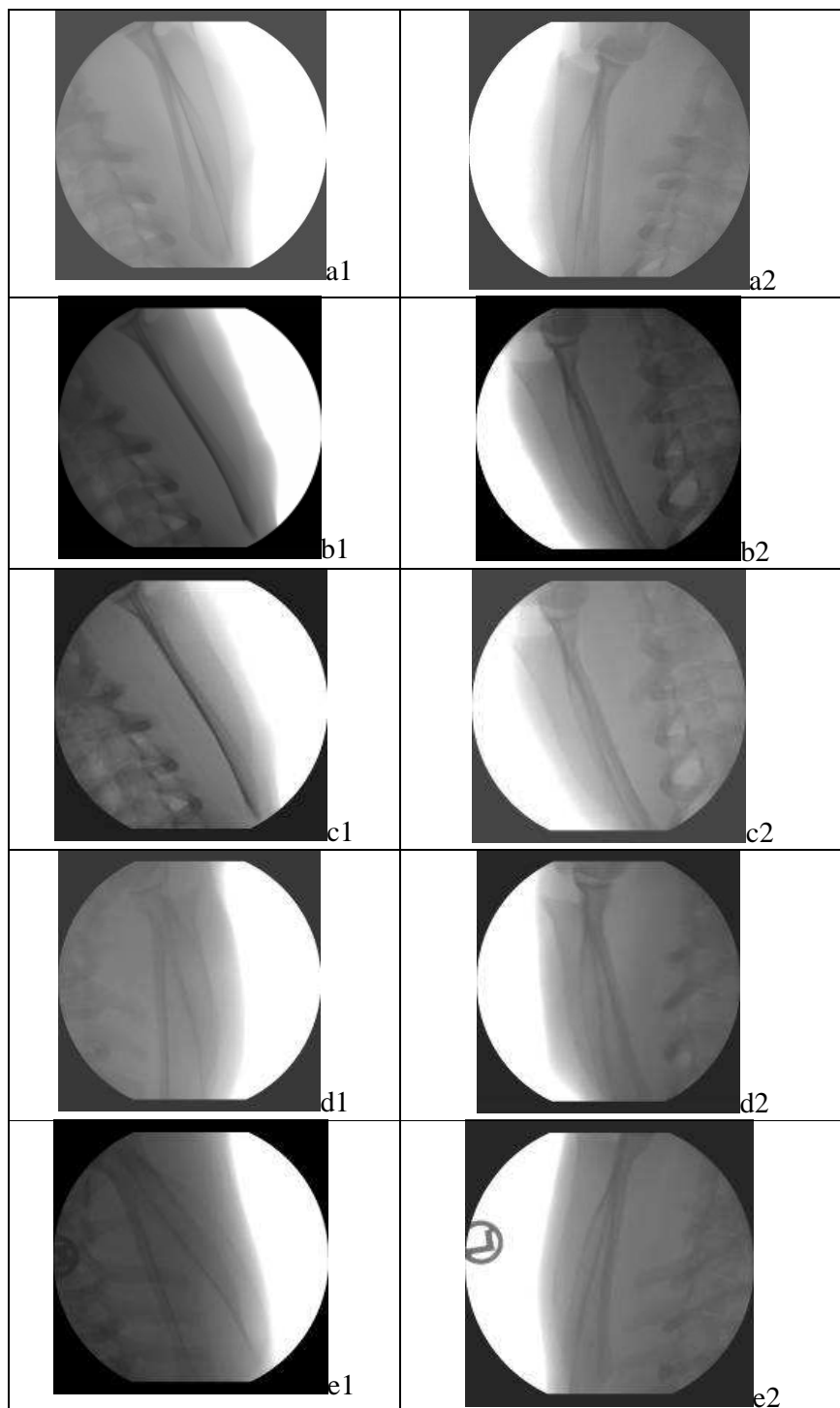


Fig. 13. Lot 2.1.A<sup>1</sup> Aspect fluoroscopic al spatelor, incidenta caudo-craniala, preoperator (a1 - spata dreaptă, a2 - spata stângă), imediat postoperator (b1- spata dreaptă, b2 - spata stângă), la 7 zile postoperator (c1 - spata dreaptă, c2 - spata stângă), la 21 (d1 - spata dreaptă, d2 - spata stângă) și la 63 (e1 - spata dreaptă, e2 - spata stanga).



Fig. 14. Lot 2.1.A<sup>1</sup> Aspect radiografic al spatelor, incidenta caudo-craniala, preoperator (a) si la 7 zile postoperator (b – spata dreapta, c – spata stanga)



Fig. 15. Lot 2.1.A<sup>2</sup> (subiect 3)- aspect radiografic al femurilor, incidenta cranio-caudala, preoperator (a) si la 7 zile postoperator (b)

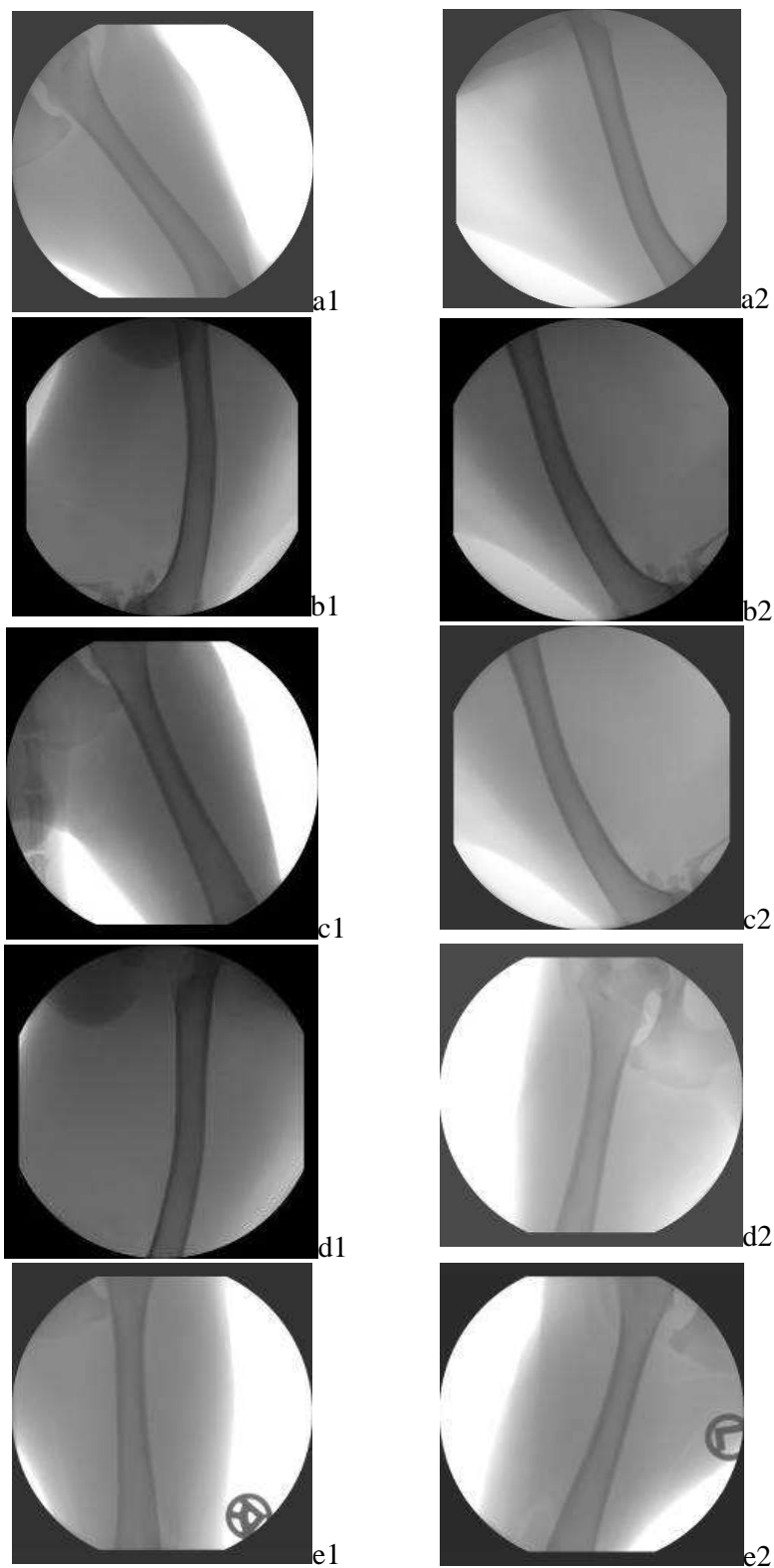


Fig. 16. Lot 2.1.A<sup>2</sup> Aspect fluoroscopic al femurului, incidenta cranio-caudala, preoperator (a1 - femur drept, a2 - femur stâng), imediat postoperator (b1- femur drept, b2 - femur stâng), la 7 zile postoperator (c1 - femur drept, c2 - femur stâng), la 21 (d1 - femur drept, d2 - femur stâng) si la 63 (e1 - femur drept, e2 – femur stâng).

La lotul 2.1.B – implantare heterotopica - os cortical-periost spongios respectiv os spongios-periost cortical, in urma analizei imaginilor obtinute preoperator, imediat postoperator si la intervalele de timp precizate in protocolul de monitorizare nu s-au constatat modificări ale radiodensității țesuturilor sau

structurii osoase la locul de implantare la nici unul dintre indivizi pe parcursul întregii perioade de monitorizare (fig. 17, 18, 19 și 20).

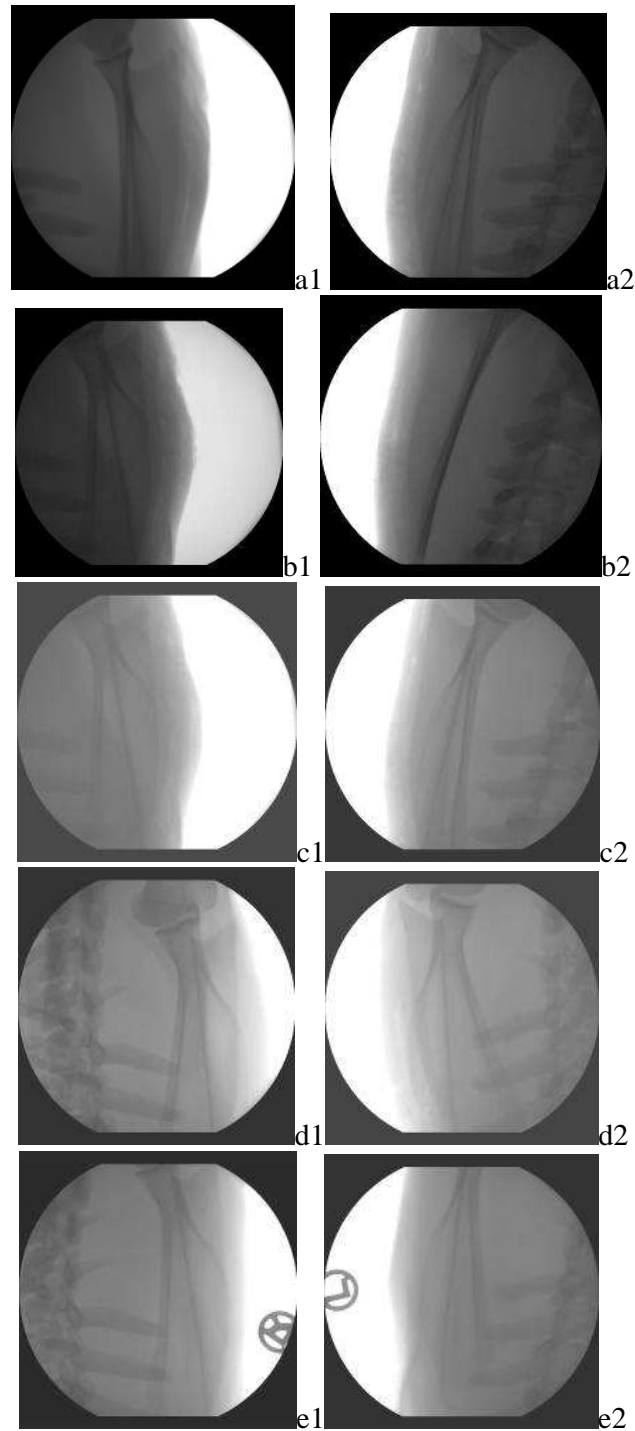


Fig. 17. Lot 2.1.B Aspect fluoroscopic al spatelor, incidenta caudo-craniala, preoperator (a1 - spata dreaptă, a2 - spata stângă), imediat postoperator (b1- spata dreaptă, b2 - spata stângă), la 7 zile postoperator (c1 - spata dreaptă, c2 - spata stângă), la 21 (d1 - spata dreaptă, d2 - spata stângă) și la 63 (e1 - spata dreaptă, e2 – spata stanga).





Fig. 18. Lot 2.1.B Aspect radiografic al spatelor, incidenta caudo-craniala, preoperator (a), la 7 zile postoperator (b1- spata dreaptă, b2 - spata stângă),



Fig. 19. Lot 2.1.B (subiect 12)- aspect radiografic al femurilor, incidenta cranio-caudala, preoperator (a) si la 7 zile postoperator (b)

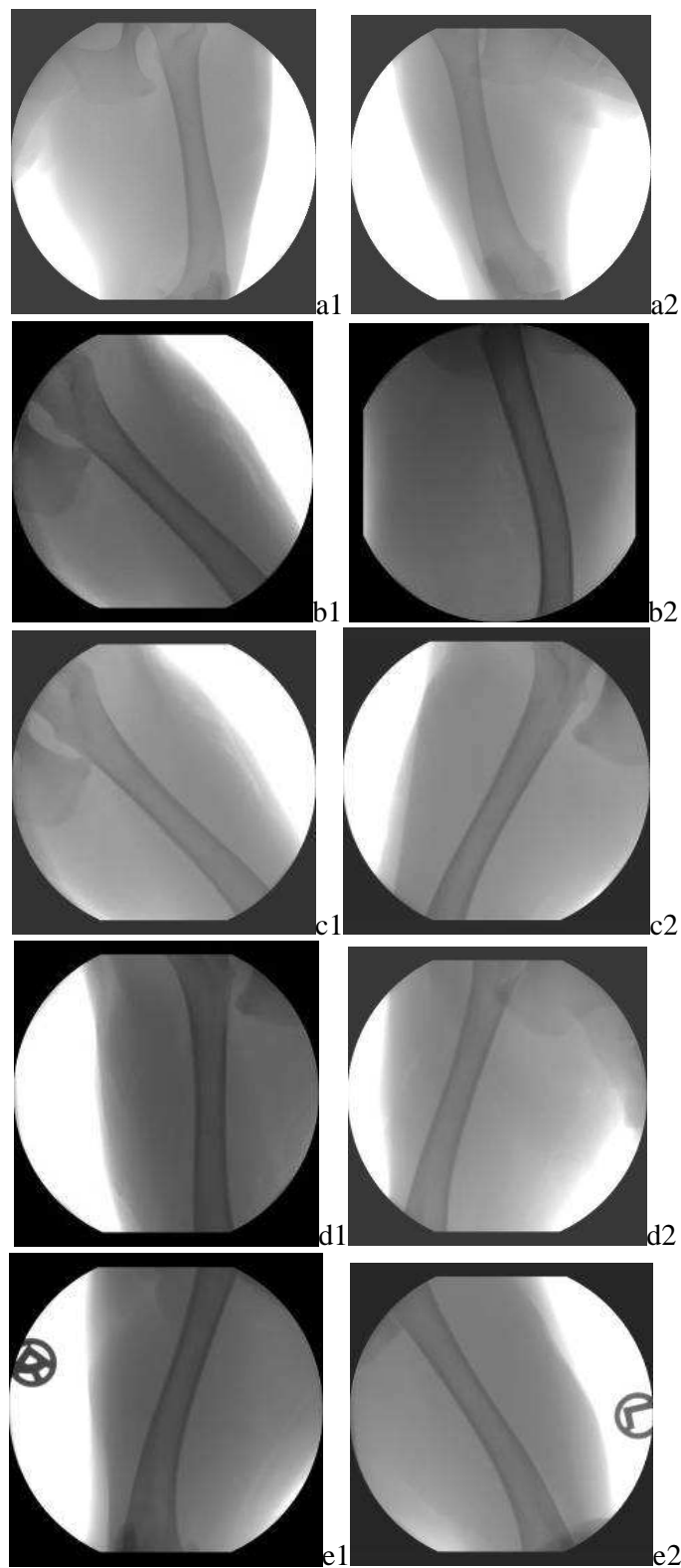


Fig. 20. Lot 2.1.B. Aspect fluoroscopic al femurului, incidenta cranio-caudala, preoperator (a1 - femur drept, a2 - femur stâng), imediat postoperator (b1- femur drept, b2 - femur stâng), la 7 zile postoperator (c1 - femur drept, c2 - femur stâng), la 21 (d1 - femur drept, d2 - femur stâng) și la 63 (e1 - femur drept, e2 – femur stâng).

În urma analizei imaginilor obținute de-a lungul întregii perioade de monitorizare, la indivizii loturilor cu grefa periostala nevascularizata 2.1C<sup>1</sup> (fig. 21) și 2.1 C<sup>2</sup> (fig. 22) nu s-a constatat nici o modificare a radiodensității țesutului muscular în care s-a implantat grefa periostala, fapt care permite

avansarea ideii că periostul nevascularizat implantat ectopic în musculatură nu este capabil de a genera țesut osos de neoformație. De asemenea, imaginilor radiografice conventionale și digitale nu releva prezenta vreunei modificări de radiodensitate la nivelul locului de prelevare a fragmentului de periost.

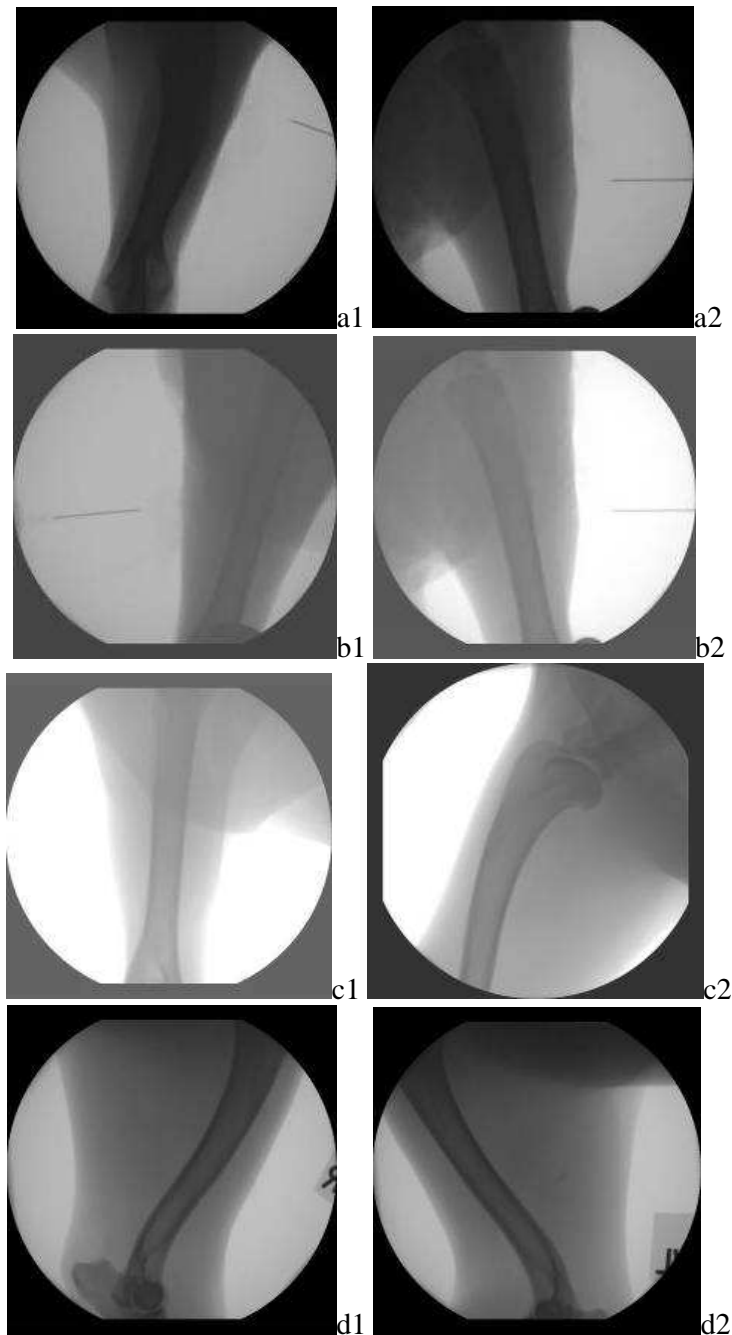


Fig. 21. Lot 2.1.C<sup>1</sup>. Aspect fluoroscopic al musculaturii în care s-a implantat grea nevascularizată de periost de pe os spongios, postoperator (a1 –triceps drept, a2 – triceps stang), la 7 zile postoperator (b1 –triceps drept, b2 – triceps stang), la 21 zile (c1 –triceps drept, c2 – triceps stang) și 63 de zile (d1 –triceps drept, d2 – triceps stang)

Datele obținute în urma studiului efectuat confirmă rezultatele obținute de alți autori (Carlton R., Fang J. și Hall B.K., Frankenhuis Van Den Heuvel T.H.M și colab., O'Driscoll S.W. și colab.) care susțin că implantarea unui lambou periostal ectopic nevascularizat, în timp determină resorbția acestuia.

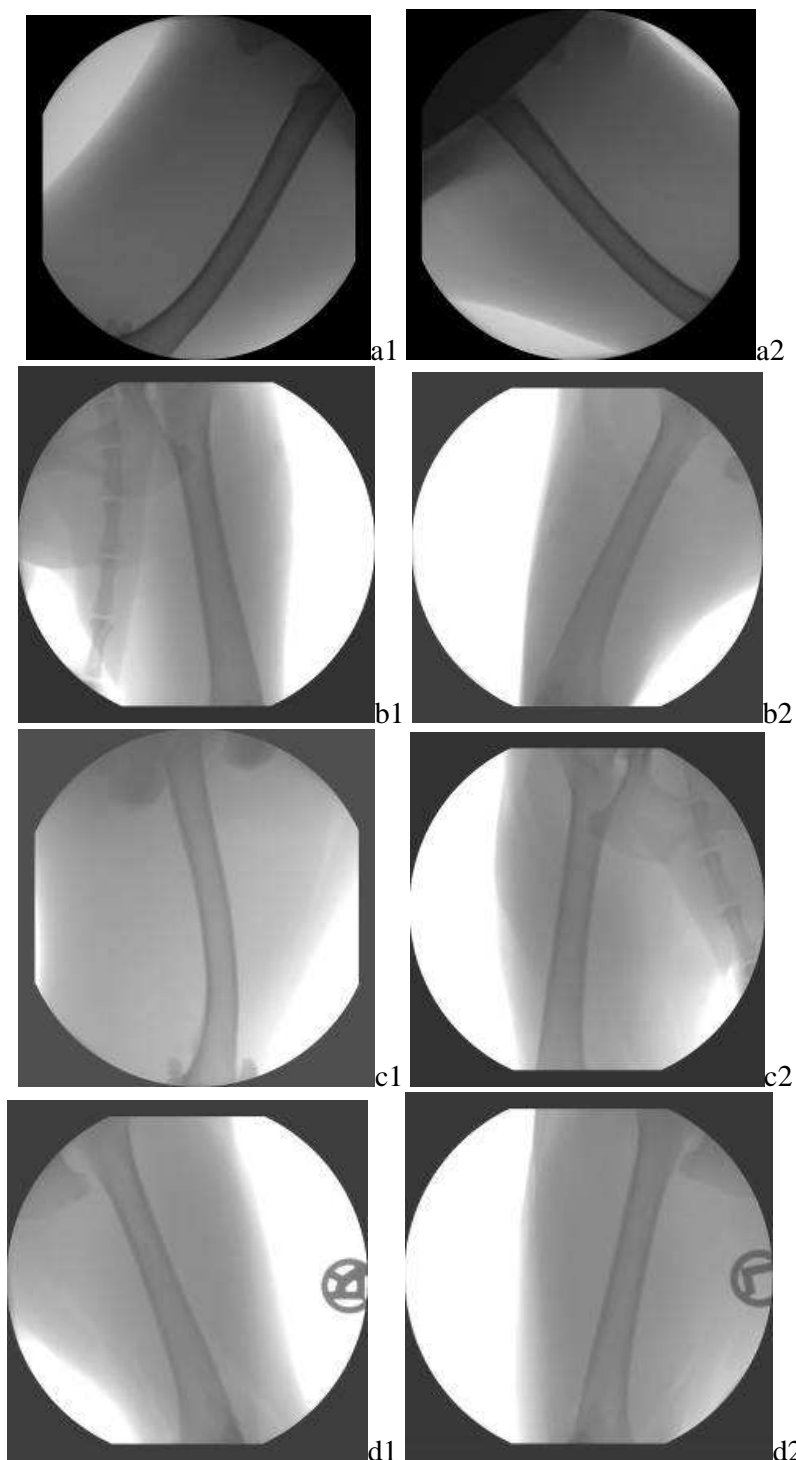


Fig. 22. Lot 2.1.C<sup>2</sup>. Aspect fluoroscopic al musculaturii in care s-a implantat grefa nevascularizata de periost de pe os cortical, postoperator (a1 – femur drept, a2 – femur stang), la 7 zile postoperator (b1 – femur drept, b2 – femur stang), la 21 zile (c1 – femur drept, c2 – femur stang) si 63 de zile (d1 – femur drept, d2 – femur stang)

In urma analizei comparative a imaginilor obtinute pe parcursul intregii perioade de 63 de zile de monitorizare postimplantare nu s-au constatat modificări ale radiodensității țesuturilor in zona musculara de implantare la nici unul din indivizi lotului experimental 2.1.C<sup>3</sup> la care lamboul implantat a fost vascularizat (fig. 23). Rezultatele experimentelor „in vitro” obtinute in etapa anterioara a derularii proiectului nu sunt confirmate de date actuale ale experimentului „in vivo”.

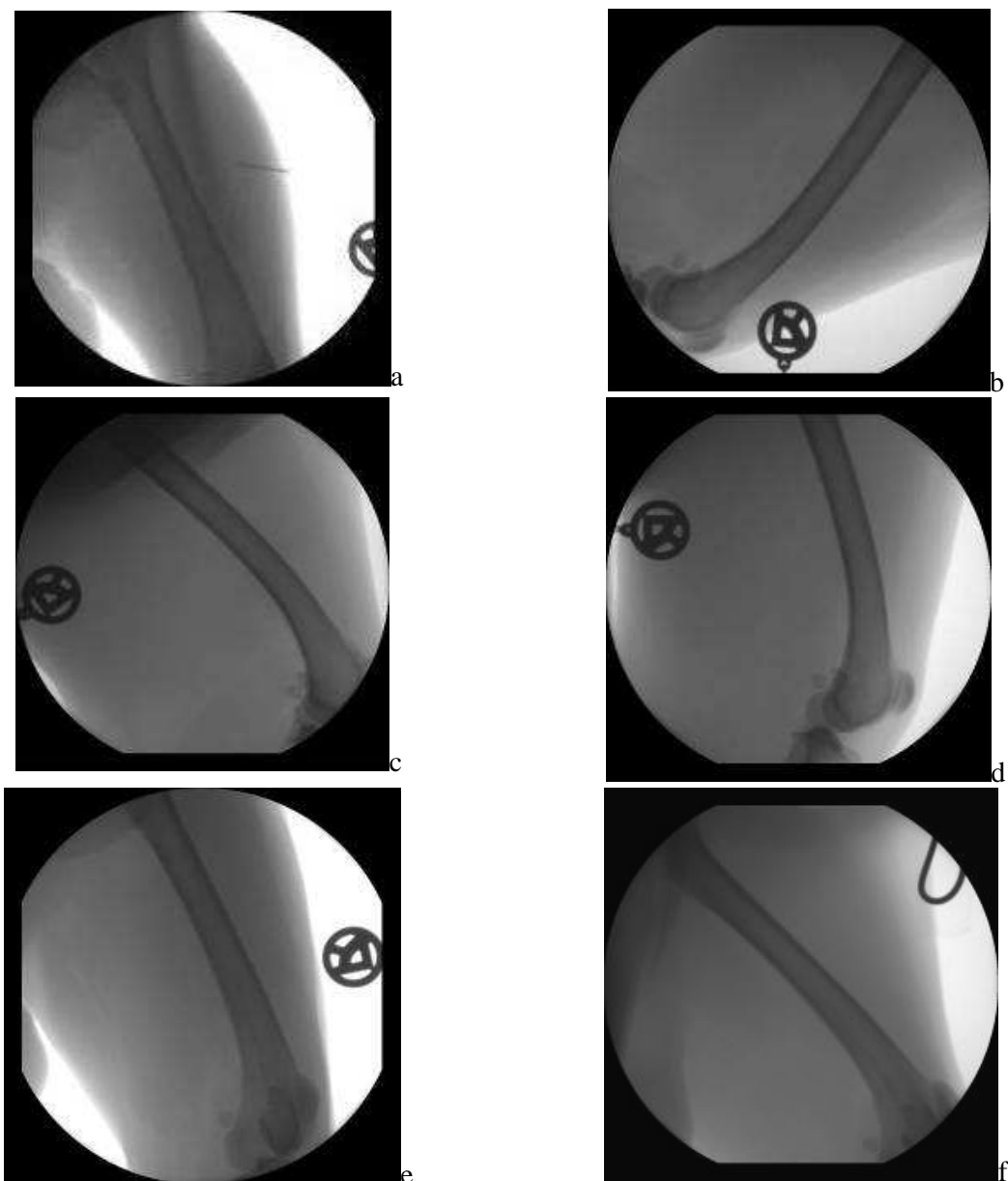


Fig. 23. Lot 2.1.C<sup>3</sup>. Aspect fluoroscopic al musculaturii membrului drept, subiect 12, in care s-a implantat grefa vascularizata de periost de pe os cortical, preoperator (a), postoperator (b), la 7 zile postoperator (c), la 21 zile (d), la 42 de zile (e) si 63 de zile (f).

La toti indivizii lotul 2.1.C<sup>4</sup> examenul fluoroscopic a pus in evidenta prezenta fragmentului osos care si-a mentinut radiodensitatea pana la 21 de zile. Nu s-a constatat nici o modificare de radiopacitate a tesuturilor invecinate inclusiv a lamboului periostal. La examenul efectuat la 28 de zile se observa reducerea radiodensitatii, fenomen constatat la toti subiectii lotului, cu disparitia completa la 42 de zile (fig. 24).

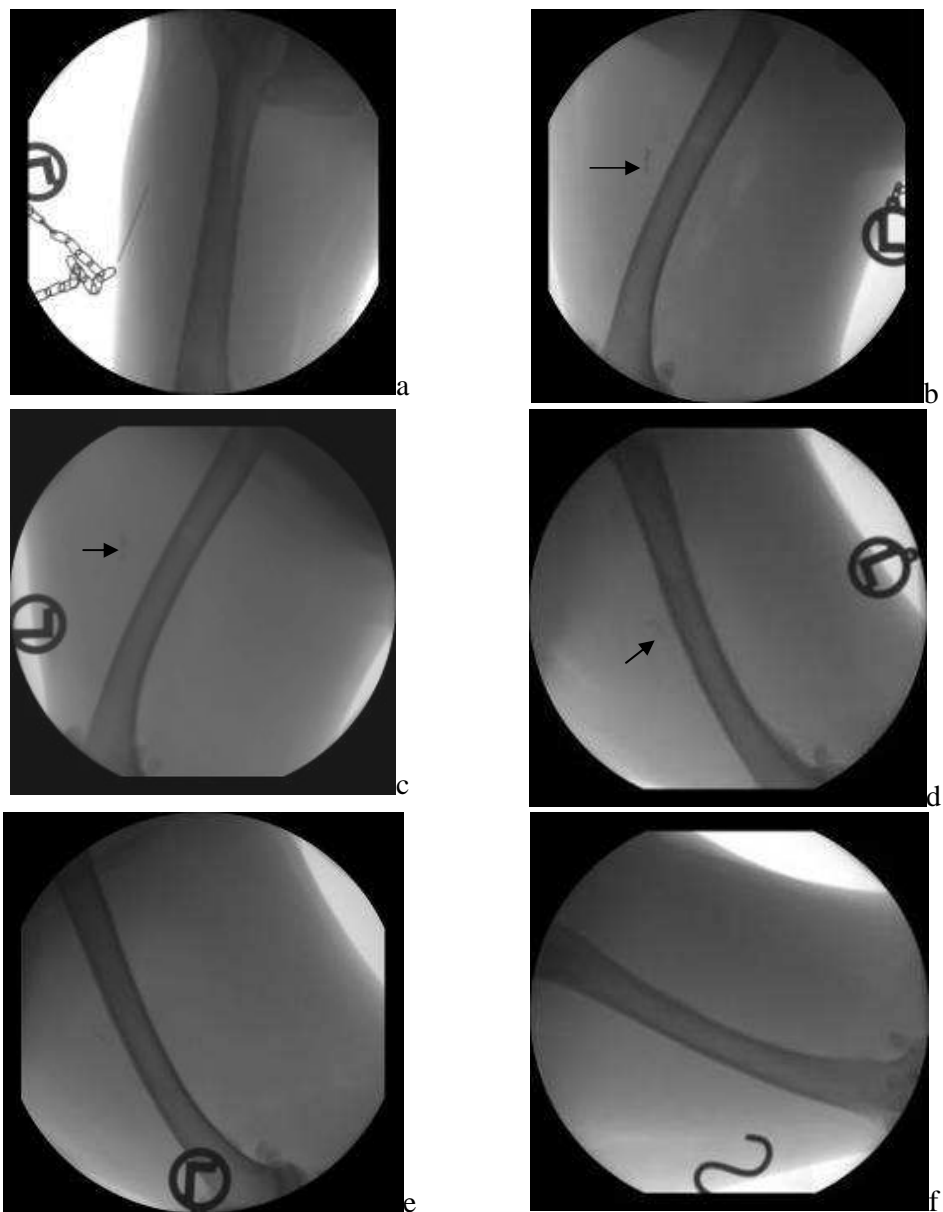


Fig. 24. Lot 2.1.C<sup>4</sup> subiect 15. Monitorizarea fluoroscopica a zonei de implant, membrul stang, subiect 15, preoperator – tesut sanatos (a), postoperator (b), la 7 zile postoperator (c), la 21 zile (d), la 42 de zile (e) si 63 de zile (f)

Rezultatele obtinute in prezentul studiu nu sunt confirmate de datele din literatura in care lambourile periostale care includ fragment osos si au continuitate vasculara, genereaza tesut osos la locul de implantare ectopica. In acele cazuri experimentele au fost derulate pe cobai, iepuri si primate iar zonele de implant au fost altele – maxila, mandibula, tibie, creasta iliaca (Sauerbier S. si colab, 2003, Penteadó C.V., 1990, Carlton R., 1984). In baza acestor observatii putem avansa ideea unui comportament diferit in cazul cainelui.

La loturile 2.1.C<sup>3</sup> si 2.1.C<sup>4</sup> lipsa formarii tesutului osos pe periostul vascularizat, respectiv resorbția fragmentului osos atasat periostului, constatate in urma examenelor imagistice, nu au facut posibila recoltarea la 63 de zile a tesutului pentru examenul prin microscopie cu fluorescena.

La toti indivizii lotului 2.1.C<sup>5</sup> pana la 21 de zile, data celei mai recente examinari fluoroscopice, se evidentiaza prezenta fragmentului osos care isi mentine radiodensitatea. Comparand imaginile obtinute la 14 zile cu cele de la 21 de zile se constata cresterea radiodensitatii lamboului cu mentinerea dimensiunilor initiale. Nu se constata in tesuturile invecinate nici o modificare de radiopacitate (fig. 25 si 26).

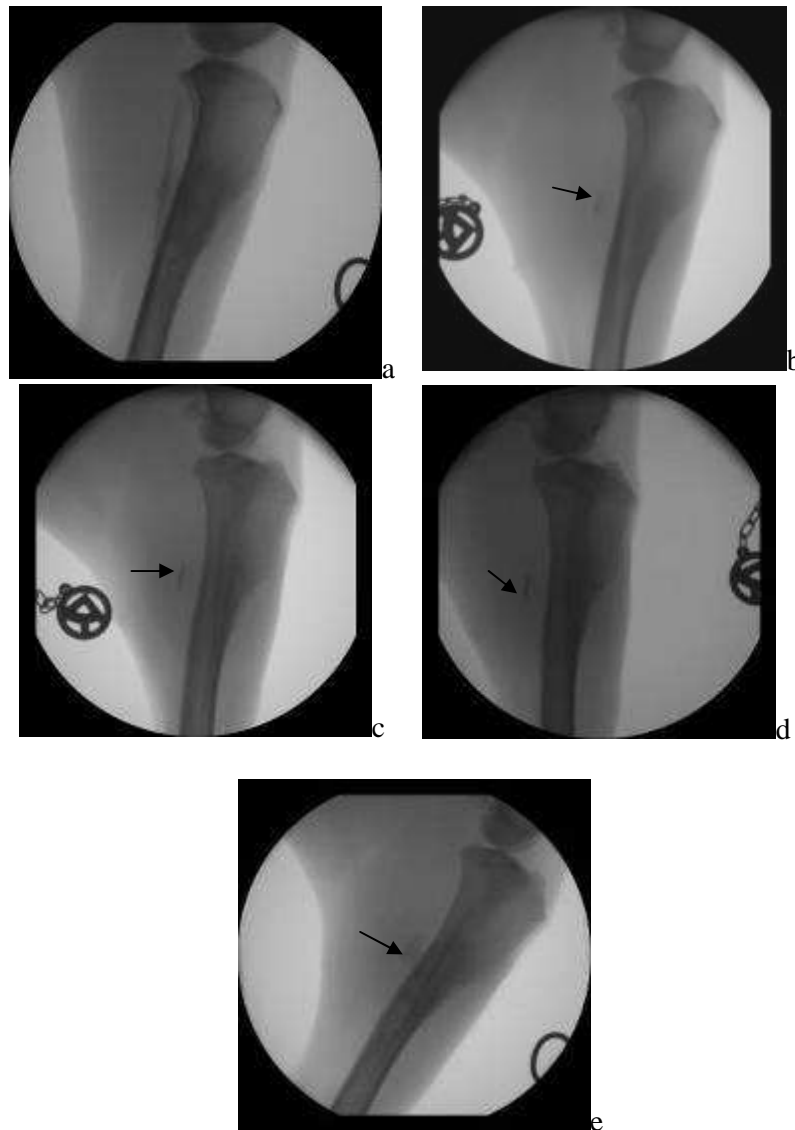


Fig. 25. Lot 2.1.C<sup>5</sup> – subiect 17. Aspecte fluoroscopice ale lamboului ectopic cortical tibie – membrul drept - preoperator (a), imediat postoperator (b), postoperator la 7 zile (c), la 14 zile (d), la 21 de zile (e).



Fig. 26. Lot 2.1.C<sup>5</sup> – subiect 19. Aspect radiografic al zonei cu lambou ectopic cortical tibie – membru drept, incidenta medio-laterala cu grade diferite de rotatie, imediat postoperator (a), la 21 de zile postoperator (b).

Diferentele constatate între loturile 2.1.C<sup>4</sup> și 2.1.C<sup>5</sup> până în ziua a 21 de monitorizare imagistică, adică creșterea radiodensității lamboului în cazul indivizilor lotului 2.1.C<sup>5</sup>, pot fi explicate prin menținerea continuității osoase la locul de basculare al lamboului. Resorbția fragmentului de os atașat capătului lamboului periostal poate fi atribuită lipsei de continuitate osoasă datorită implantării ectopice la distanță mai mare.

#### CONCLUZII

1. Grefele libere de periost cortical sau spongios implantate topic sau heterotopic pe un suport osos in vivo își mențin viabilitatea fără a induce modificări asupra suportului osos primitiv integral.
2. Implantarea ectopică de periost liber cu proveniență corticală sau spongioasă duce la resorbția grefei, comportament diferit față de studiile in vivo care implică cultivarea pe medii de diferențiere.
3. Implantarea ectopică de lambori periost-osoase vascularizate menține atât viabilitatea cât și capacitatea osteogenă a grefei. Rezultatele obținute indică, în premieră, drept condiționare a succesului greferii periostale menținerea la nivel de inițiere a suportului osos subiacent.



### ACTIVITATEA 2.3. Studiul histopatologic al implantului periostal

Sub anestezie generala inhalatorie cu miorelaxare (acepromazina-ketamina-succinilcolina-isofluran) de la indivizii loturilor 2.1.A<sup>1</sup>, 2.1.A<sup>2</sup> si 2.1.B s-a recoltat fragment de tesut osos cu periost din zonele de grefa in vederea investigatiilor histologice (fig. 27).

Dupa recoltarea chirurgicala a pieselor caini au fost tratati ortopedic specific si redati biobazei.

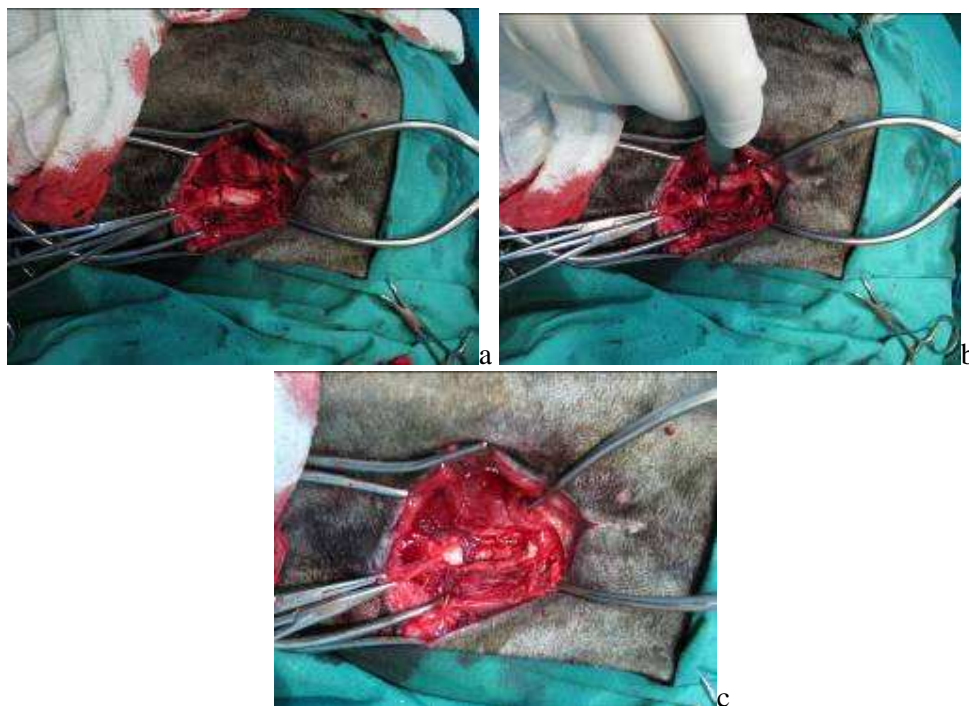


Fig. 27. Aspect intraoperator - recoltarea fragmentelor de tesut osos cu periost grefat

Prelucrarea pieselor recoltate s-a realizat dupa urmatorul protocol de lucru:

Fragmentele de os cu periost au fost introduse în băi seriate de alcool etilic pentru deshidratare (tabelul 5).

Tabelul 5.

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 preinfiltare, respectiv de infiltrare.

În vederea obținerii secțiunilor histologice cu ajutorul microtomului cu disc diamantat Leica SP1600, speci­me­nele au fost înglobate după protocolul sistemului Technovit 9100 New (fig. 28, tabelul 6), care presupune etapele de preinfiltrare, infiltrare și înglobare propriu-zisă (tabelul 7).



Fig. 28. Sistemul de înglobare Technovit 9100 New

Tabelul 6.

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 ca urmare a trecerii 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 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.

Etapele prefiltrării și infiltrării  
(conform prospectului Technovit 9100 New al producătorului Hereus Kulzer)

Etapă	Soluție	Timp
Preinfiltare-1	Technovit 9100 New Basic (stabilizată)	1h
Preinfiltare-2	Technovit 9100 New Basic (stabilizată) + Întăritor 1	1h
Preinfiltare-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

Prepararea mixturii de înglobare și înglobarea pieselor histologice. Amestecul de înglobare (tabelul 8) a fost realizat prin combinarea a nouă părți soluție A cu o parte soluție B, chiar înainte de folosire. Cele două soluții au fost introduse într-un pahar de Berzelius și omogenizate cu o baghetă de sticlă. Porțiunile de os cu implante dentare 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 și s-a creat vacuum parțial timp de 15-20 de minute, timp în care mixtura s-a solidificat. Continuarea procesului de polimerizare a fost asigurată prin menținerea speciemenelor la temperatura de -20°C, timp de 24 de ore (valoare termică și interval de timp recomandate de producător). Speciemenele 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.

Tabelul 8.

Prepararea soluțiilor de lucru din componentele sistemului Technovit 9100 New

Componentă Etapă	Soluție Basic	Pudră PMMA	Întăritor 1	Întăritor 2	Reglator de polimerizare	Depozitare
Preinfiltare	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

Secționarea pieselor înglobate. Secțiunile au fost efectuate în plan perpendicular pe axul lung al osului. Speciemenele au fost fixate cu o rășină epoxidică pe plăcuța port-piesă și au fost instalate în suportul aparatului (fig. 29).



Fig. 29. 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 abundentă 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. 30).



Fig. 30. 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, urmând următoarele etape (tabelul 9):

Tabelul 9.

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 Tricromică redată în tabelul 10 și vizualizate la microscopul optic Olympus CX41 cu cameră foto Olympus PS 300.

## Etapale colorației

Etapă	Soluție	Timp
1	Hematoxină Harris	5-7 minute
2	Apă robinet	5-10 minute
3	Apă robinet	5 minute
4	Apă distilată	Se clătește
5	Pondceau	5 minute
6	Apă distilată	Se clătește
7	Apă distilată	Se clătește
8.	Orange G.	15 minute
9	Apă distilată	Se clătește
10	Alcool 70°	Se clătește
11	Alcool 80°	5 minute
12	Alcool 95°	5 minute
13	Alcool absolut	5 minute
14	Alcool absolut	5 minute
15	Benzen	15 minute
16	Benzen	15 minute
17	Montare (Balsam de Canada)	

Din fiecare proba recoltata au fost prelucrate si examinate 2 lame. Pe fiecare lama au fost urmarite:

- aspectul periostului transplantat
- aspectul tesutului osos adiacent stratului celular al periostului,
- potentialul osteogenic al celor doua tipuri de periost (femural si scapular) si al periostului implantat heterotopic,
- tipul de osificare indusa,
- structura matricei osoase.

## REZULTATE

În urma examinării imaginilor lamelor de la indivizii lotului 2.1.A<sup>1</sup> s-a constatat ca lângă stratul celular al periostului sunt prezente celule osoase cuboidale (osteoblaste) de dimensiuni mari specifice tesutului osos spongios cu spatii mari între osteoane (fig. 31).



Fig.31. Subiect 1, lot 2.1.A<sup>1</sup>, membru drept, obiectiv 60x

La indivizii lotului 2.1.A<sup>2</sup> s-a constatat ca lângă stratul celular al periostului sunt prezente celule osoase cuboidale (osteoblaste) specifice țesutului osos compact. In imaginile examinate spiculi osoși sunt acoperiți de osteoblaste (fig. 32). Aceste osteoblaste care inconjoara spiculi osoși pot fi inactive dar și celule osoase progenitoare (Banks W.J., 1993), aceasta linie celulara activa situandu-se imediat pe suprafata osului si sub stratul celular al periostului (fig. 32 si 33). Natura lamelara a osului este indicata de dispozitia ordonata a lacunelor osoase ceea ce pledeaza pentru mentinerea viabilitatii osului (fig. 33). Organizarea structurala a periostului dispus sub forma stratului fibros si a celui celular se distinge cu usurinta in toate campurile examinate.

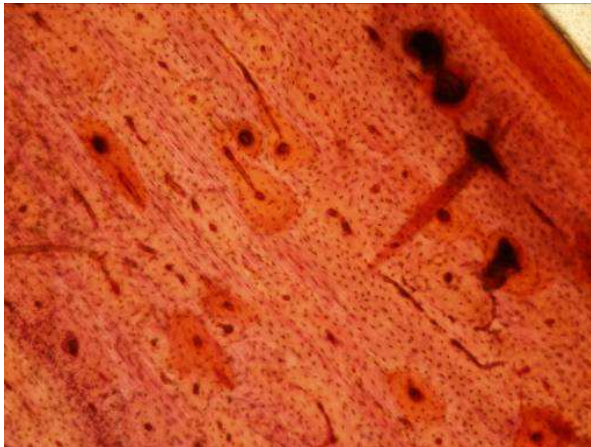


Fig. 32 Subiect 4, lot 2.1.A<sup>2</sup>, membru stâng, obiectiv 60x

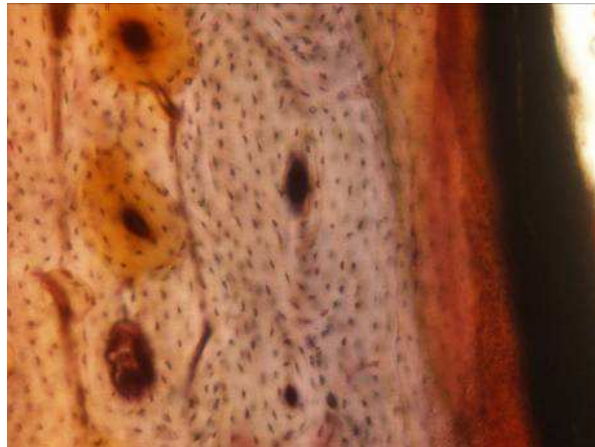


Fig. 33 Subiect 6, lot 2.1.A<sup>2</sup>, membru stâng, obiectiv 90x

La indivizii lotului 2.1.B, transplant heterotopic, la examinarea țesutului osos spongios peste care a fost transplantat periost de pe os cortical, s-a observat că se pastrează arhitectura celulelor osoase specifice țesutului osos spongios, remarcandu-se osteoane mari precum și spații interosoase largi (fig. 34). La examinarea țesutului osos compact peste care s-a transplantat periost de pe os spongios, s-a constatat că țesutul osos păstrează caracteristicile țesutului osos compact, spațiul interosos este foarte redus și mărginit de canalele osteonale și de canalele de comunicare (fig. 35, 36 si 37).

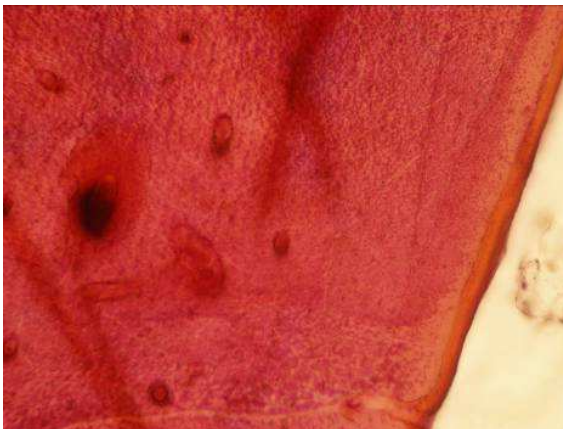


Fig. 34. Subiect 7, lot 2.1.B, membru anterior drept, obiectiv 60x

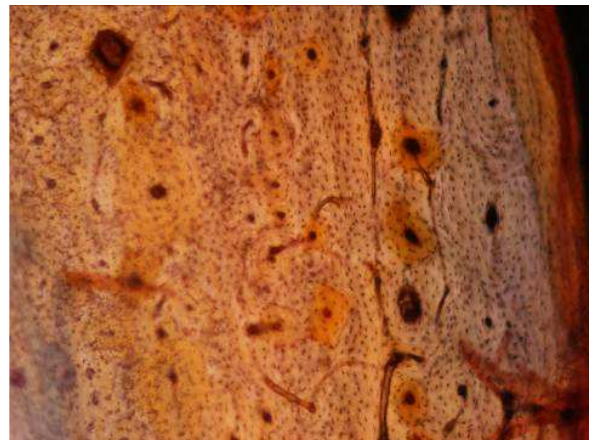


Fig. 35. Subiect 7, lot 2.1.B, membru pelvin drept, obiectiv 60x



Fig. 36. Subject 3, lot 2.1.B, membru pelvin stang, obiectiv 60x

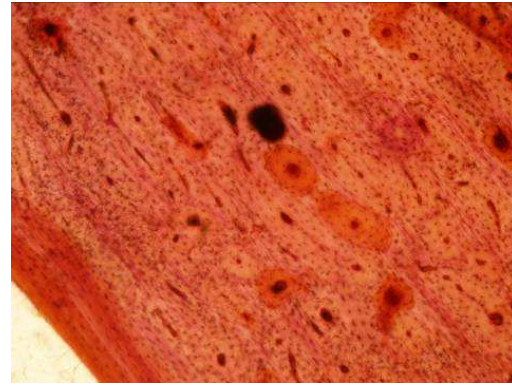


Fig. 37. Subject 5, lot 2.1.B, membru pelvin drept, obiectiv 60x

#### CONCLUZII:

1. La toti subiectii de experiment s-a constatat viabilitatea si integrarea periostului transplantat indiferent de structura, spongioasa sau corticala, a osului pe care a fost amplasat.
2. Periostul transplantat heterotopic nu a indus modificari de structura osoasa, osul pastrandu-si structura.

#### Bibliografie

1. **Barbour T D A, Briggs C A, Bell S N, Bradshaw C J, Venter D J, Brukner P D**, - Histology of the fascial-periosteal interface in lower limb chronic deep posterior compartment syndrome, *British Journal of Sports Medicine*, 2004, vol. 38; pag.:709-717.
2. **Carlton Richard**, - Free Periosteal Graft Repair of Maxillary Clefts in Adolescents, *Plastic and Reconstructive Surgery*, April 1984, vol. 73 - Issue 4 – pag.: .556-565.
3. **Dudley H. Robert, Spiro David**, - The Fine Structure of Bone Cells, *The Journal of Cell Biology*, 1961, Vol 11, pag.: 627-649.
4. **Fang Jianmin, Hall Brian K.**, - Chondrogenic cell differentiation from membrane bone periosteal, *Anatomy and Embryology*, 1997, vol. 196, :pag.: 349–362.
5. **Frankenhuis Van Den Heuvel T.H.M., Maltha J.C., Kuijpers-Jagtman A.M., Van't hof M.A.** - A Longitudinal Radiographic Study of the Periosteal Migration along the Growing Rabbit Mandible, *Journal of Dental Research*, 2009, Vol.: 71 Nr. 2, pag.: 398 – 402.
6. **King Kevin F.** – Periosteal pedicle grafting in dogs, *Journal of bone & joint surgery*, 1976, vol. 58 B, pag.: 117 – 121.
7. **O'Driscoll SW, Keeley FW, Salter RB** - The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biological resurfacing of major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit, *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 1986; vol.: 68, pag.:1017-1035.
8. **Poussa Mikko, Rubak Jens, Ristila Veijo**, - Differentiation of the osteochondrogenic cells of the periosteum in chondrotrophic environment, *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 1981, vol.52, pag.: 235 – 239.
9. **Sauerbier S., Voss P., Weyer N., Kuschnierz J., Zizelmann C., Schön R., Gutwald R., Schmelzeisen R.**, - Sinus Augmentation with Periosteum derived Tissue Engineered Bone, *European Cells and Materials*, 2007, Vol. 13. Suppl. 2, pag.: 58.
10. **Svindland Aud D, Nordstetten Lars, Reiker Olav, Skjelda1 Sigmund** - Periosteal response to transient ischemia, Histological studies on the rat tibia, *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 1995; vol.:66, Issue 5, pag.: 468-472.
11. **Yaremchuk Michael J., May James W., Jr.**- Bone scintigraphy in evaluating the viability of composite bone grafts revascularized by microvascular anastomoses, conventional autogenous bone grafts and free non-revascularized periosteal grafts,. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 1983;Vol.: 65, pag.:279-280.

12. **Yoon T R; Lee Y S; Jung E J; Roh Y J; Song E K, Seon J K,** - Osteogenic function of periosteum and periosteal cells of rabbit , *52nd Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society*, 2006, Lucrarea Nr: 0975.
13. **Zhang X., Naik A., Xie C., Reynolds D., Palmer J., Lin A., Awad H., Guldberg R., Schwarz E., O’Keefe R.,** - Periosteal stem cells are essential for bone revitalization and repair, *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*, 2005; Vol.: 5, Issue 4, :pag.: 360-362.
14. **Penteado CV, Masquelet AC, Romana MC , Chevrel JP** - Periosteal flaps: anatomical bases of sites of elevation, *Journal of Clinical Anatomy*, 1990, Vol. 12, pag.:3-7.
15. **Brownlow H. C., Reed A., Joyner C., A. Simpson H. R. W.**- Anatomical Effects of Periosteal Elevation, *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 2000, Vol.:18, pag.:500 – 502.

#### ACTIVITATEA 2.4. Audit intern/raport final an

Au fost puse la dispozitia comisiei de audit intern actele primare de evidenta a achizitiilor, a deplasarilor si fisele de caz pentru animalele incluse in experiment. Raportul de audit este anexat documentelor justificative pentru etapa finala a anului 2009.

#### ACTIVITATEA 2.5. Diseminare rezultate obiectiv 2/2009

Ignă Cornel, Simona Anghel, Larisa Schuszler, Sabău M. Roxana Dascălu, Monica Șereș, Luca C	Periosteal Cells Sampling, Culturing And Differentiation In The Dog	Simp. Șt. International “Agricultura moderna – realizări și perspective”, Universitatea Agrară de Stat din Moldova, Chisinău, 15-16 octombrie 2009, pag. 161 – 163
Ignă Cornel, Larisa Schuszler	Contribution At Osseous Regeneration In The Dog	Simp. Șt. International “Agricultura moderna – realizări și perspective”, Universitatea Agrară de Stat din Moldova, Chisinău, 15-16 octombrie 2009, pag. 147 - 149
Roxana Dascălu, C. Ignă, Mirela Toth-Tașcău, M. Sabău, Larisa Schuszler, K. Menyhardt, C. Luca	Humeral Head Ocd Healing Assessment On Dogs, Using Kinematic Analysis	Buletinul USAMV Cluj- Napoca, vol. 66, (2), pag. 189 - 193
C. Luca, C. Ignă, Roxana Dascălu, M. Sabău, Larisa Schuszler	In Vitro Diferentiation Of Periosteal Canine Cells Diferentierea Celulelor Periostale Canine In Vitro	Scientific Works Veterinary Medicine București, C Series, sub tipar
C. Ignă, C. Luca, Roxana Dascălu, M. Sabău, Larisa Schuszler	The Comparative Study Of Some Isolation Methods Of Periosteal Canine Cells	Scientific Works Veterinary Medicine București, C Series, sub tipar
C. Ignă, C. Luca, Roxana Dascălu, M. Sabău, Larisa Schuszler	The Cryopreservation Of Periosteal Canine Cells	Scientific Works Veterinary Medicine București, C Series, sub tipar
Larisa Schuszler, Cornel Ignă, Aurel Sala, Roxana Dascalu, Marius Sabau, Calin Luca	Hypothermia prevention during anesthesia in major surgery in dog	Buletinul USAMV Cluj- Napoca, vol. 66 (2), pag. 247 - 250



Cornel Igna, Larisa Schuszler, Capacity of guiding osseous  
Calin Luca, Roxana Dascalu, regeneration: periosteum versus  
Marius Sabau mesenchymal stem cells

Buletinul USAMV Cluj-  
Napoca, vol. 66 (2), pag. 206 -  
211

Director proiect,  
Prof. dr. Igna Cornel

Colectiv de cercetare,

Prof. Dr. ing. Ghita Mihai

Sef lucr. Dr. Schuszler Larisa

Asistent Dr. Dascalu Roxana

Asistent Dr. Sabau Marius

Doctorand dr. Luca Calin