

УДК 655.535.2

Клеточные механизмы нарушения репаративного остеогенеза

В.Г. Климовицкий¹, В.М. Оксонец¹, А.Г. Попандопуло², В.Ю. Черныш¹,
А.М. Гребенюк¹, В.В. Буше², А.Ю. Магомедов¹, Ю.А. Магомедов¹

¹НИИТО Донецкого национального медицинского университета. Украина

²ГУ «Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака НАМН Украины», Донецк

The article submits data of a study of the state of cellular sources of osteoreparation in injuries with low and high intensity. Low-energy injuries demonstrate that the above cellular sources of osteoreparation preserve their proliferative activity, cells of the periosteum and endosteum preserving their osteogenic determinacy. Preservation of osteogenic determinacy of periosteal and endosteal cells in low-energy injuries facilitate osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells of the medullary cavity, which proliferate into the bone wound, and formation of a specific bone regenerate in the fracture region. In high-energy injuries, there is some change in the morphofunctional state of cellular sources of osteoreparation: their proliferative activity decreases, periosteal and endosteal cells lose their osteogenic determinacy. As a result of these changes, the mesenchymal stromal cells of the bone marrow, which proliferate into the bone wound, do not receive any osteogenic determinacy and a nonspecific cicatricial tissue forms in the fracture region.

Представлено дані вивчення стану клітинних джерел остеорепарації у випадку травм низької і високої інтенсивності. Показано, що за умов низькоенергетичних травм клітинні джерела остеорепарації зберігають проліферативну активність, а клітини періосту та ендосту — остеогенну детермінованість. Збереження остеогенної детермінованості періостальних та ендостальних клітин у разі низькоенергетичних травм сприяє остеогенному диференціюванню проліферуючих у кісткову рану мезенхімальних стромальних клітин кістковомозкової порожнини і формуванню в ділянці перелому специфічного кісткового регенерату. У випадках високоенергетичних травм відбувається зміна морфофункціонального стану клітинних джерел остеорепарації — знижується їх проліферативна активність, а клітини періосту й ендосту втрачають свою остеогенну детермінованість. Через ці зміни мезенхімальні стромальні клітини кісткового мозку, які проліферують у кісткову рану, не отримують остеогенної детермінованості і в ділянці перелому формується неспецифічна рубцева тканина.

Ключевые слова: клетки периоста, эндоста, мезенхимальные стромальные клетки, остеорепарация

Введение

Проблеме лечения посттравматической дисрегенерации костей посвящено значительное количество работ, в которых рассматриваются как хирургические, так и нехирургические методы стимуляции репаративного остеогенеза. Однако, несмотря на достаточно высокий процент успешного лечения больных с нарушением процессов консолидации костных отломков, у 4,8–15,4% пострадавших достичь положительных результатов не удается [3, 9, 19, 22]. Наибольшие трудности при лечении нарушений остеорепарации возникают

после травм, полученных в результате воздействия высокоэнергетического травмирующего агента. По данным В.А. Соколова с соавт. [6], у 13,7% больных с высокоэнергетическими травмами нижних конечностей переломы не срастались в течение 1,5–3 лет. Примерно такие же данные приводят и С.W. Oh et al. [18]. Проведенные ими исследования показали, что у 10,8% пострадавших, получивших высокоэнергетическую травму, консолидации переломов не наступало в течение 2–2,5 лет.

Формирование костной мозоли в области перелома происходит благодаря клеткам-предшест-

венникам периоста, эндоста и мезенхимальным стромальным (стволовым) клеткам костно-мозговой полости (МСК КП) [1, 4, 5, 13]. Одним из определяющих механизмов формирования костной мозоли является остеогенная дифференцировка пролиферирующих в костную рану клеток-предшественников. Исследования последних лет показали, что дифференциация МСК по остеобластическому типу представляет собой сложный, многогранный процесс и осуществляется под контролем факторов транскрипции, клеточных и матриксных взаимодействий, системных и местных факторов [8, 11, 14, 15]. На процессы остеогенной дифференциации значительное воздействие оказывает большое количество местных факторов, подавляющее большинство которых продуцируется клетками остеобластической линии [12, 16, 17, 21, 23].

Однако, несмотря на то, что в процессе остеогенной дифференцировки мигрирующих в костную рану клеток-предшественников ведущее значение играют паракринные факторы, продуцируемые уже имеющими остеогенную направленность клетками периоста и эндоста, работ, посвященных изучению изменений морфофункционального состояния клеточных источников остеорепарации в зависимости от механизма травмы и роли этих изменений в развитии дисрегенерации, нам найти не удалось.

В связи с этим *целью настоящей работы* было изучение роли изменений морфофункционального состояния клеточных источников остеорепарации (периоста, эндоста и мезенхимальных стромальных клеток костномозговой полости (МСК КП) в нарушении репаративного остеогенеза.

Материал и методы

Для достижения поставленной цели были проведены экспериментальные и клинические исследования. Изучали морфологическую картину области костной раны и морфофункциональное состояние клеточных источников остеорепарации (периоста, эндоста и МСК КП). Экспериментальные исследования в условиях *in vivo* и *in vitro* были проведены на 80 половозрелых белых беспородных крысах самцах. Животных разделили на три группы — контрольную, первую и вторую. Контрольную группу составили десять животных. У них при помощи МТТ-анализа (methylthiazoletetrazolium (МТТ)-Cell Proliferation Assay) изучали пролиферативную активность клеток периоста, эндоста и МСК КП. Для чего после выведения из эксперимента у интактных животных в асептических условиях осуществляли отчленение обеих голени и выделение из мягких тканей берцовых костей, которые помещали в специ-

альный консервант и выдерживали в нем в течение суток. Затем в стерильных условиях ножницами отсекали метаэпифизарные области, оставляя для дальнейшего исследования только диафизарную часть кости. Для определения пролиферативной активности МСК КП в стерильных условиях из костно-мозгового канала при помощи инсулинового шприца и физиологического раствора вымывали костно-мозговое содержимое в чашки Петри с культуральной средой. Для упрощения этой процедуры диафизарную часть кости рассекали поперечно пополам. Половину костных фрагментов рассекали продольно глазами ножницами, тщательно отмывали от остатков костно-мозгового содержимого физиологическим раствором и помещали в чашки Петри с коллагеновой подложкой и питательной средой таким образом, чтобы с коллагеновой подложкой контактировала только надкостница (рис. 1 а). Такое положение костных фрагментов в чашках Петри создавало условия для пролиферации только клеток надкостницы. Оставшуюся половину костных фрагментов при помощи скальпеля тщательно очищали от надкостницы, промывали физиологическим раствором и помещали в чашки Петри с коллагеновой подложкой и питательной средой таким образом, чтобы с коллагеновой подложкой контактировала костная ткань (рис. 1 б). Это создавало условия для пролиферации только клеток собственно костной ткани (клеток эндоста).

Чашки Петри с костномозговым содержимым и костными фрагментами помещали в CO_2 -инкубатор и культивировали при стандартных условиях (температура 37°C и 5% содержание CO_2) со сменой питательной среды каждые третьи сутки. После начала клеточной пролиферации костные фрагменты аккуратно извлекали, а прикрепившиеся к коллагеновой подложке клетки продолжали культивировать. МТТ-анализ пролиферативной активности клеток периоста, эндоста и МСК КП осуществляли на 14-е сутки культивирования. Полученные результаты были приняты как контрольные.

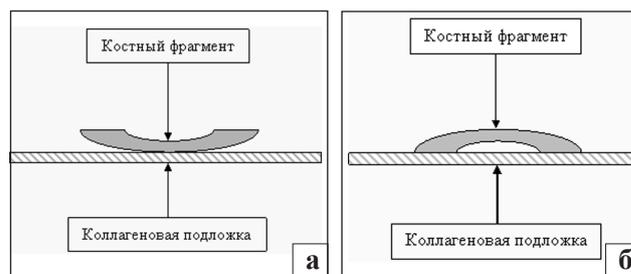


Рис. 1. Схемы положения костных фрагментов на коллагеновой подложке: а) для культивирования клеток периоста; б) для культивирования клеток эндоста

У животных первой (35 крыс) и второй (35 крыс) групп моделировали низко- и высокоэнергетические переломы берцовой кости. При моделировании низкоэнергетических травм (первая группа) в асептических условиях, под эфирным наркозом в области средней трети голени скальпелем осуществляли разрез кожи и выделяли берцовую кость. Узким долотом выполняли поперечную остеотомию кости в средней трети, после чего рану зашивали наглухо. При моделировании высокоэнергетических переломов (2 группа) под эфирным наркозом в области средней трети голени при помощи пружинного устройства наносили дозированный удар, сила которого составляла в среднем $(2,55 \pm 0,04)$ кг·м/с [7].

У 10 животных (по 5 животных каждой группы) травмированные сегменты фиксировали параоссально с использованием игл для внутримышечных инъекций и полихлорвиниловых трубок для внутривенных инфузий. Выведение этих животных из эксперимента осуществляли на 7-е сутки после нанесения травмы. После выведения из эксперимента у животных в асептических условиях отчленили травмированный сегмент, освобождали его от шкуры, фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, декальцинировали и окрашивали гематоксилином и эозином. Полученные гистологические препараты изучали в световом микроскопе.

Шестьдесят животных (по 30 животных каждой группы) были выведены из эксперимента через 1 час после нанесения травмы. После выведения из эксперимента у животных в асептических условиях отчленили травмированный сегмент, костные фрагменты аккуратно выделяли из мягких тканей и помещали во флакон со стерильным консервантом. Костные фрагменты выдерживали во флаконе с консервантом в течение суток. Затем с костными фрагментами каждого животного выполняли те же манипуляции, что и у животных контрольной группы, и культивировали в CO_2 -инкубаторе при стандартных условиях. На 5–8-е сутки культивирования при помощи фазово-контрастной микроскопии осуществляли подсчет пролиферирующих от костных фрагментов клеток периоста и эндоста. Клетки подсчитывали в поле зрения микроскопа при 100-кратном увеличении на пяти уровнях от линии перелома. В качестве критерия, определяющего уровень подсчета, использовали поле зрения микроскопа. На 14-е сутки культивирования в 45 чашках Петри каждой группы (по 15 чашек для каждой из клеточных культур) методом МТТ-анализа определяли пролиферативную активность клеток периоста, эндоста и МСК КП. В остальных 45 чашках Петри каждой группы (по 15 чашек для

каждой из клеточных культур) после формирования монослоя при помощи фазово-контрастной микроскопии оценивали морфологическое состояние пролиферирующих клеток надкостницы, эндоста и МСК КП. В монослое культур периоста и эндоста при помощи реакции с BCIP/NBT Liquid Substrate System (Sigma, США) определяли наличие или отсутствие продукции клетками щелочной фосфатазы (ЩФ), что позволяло судить о наличии или отсутствии остеогенной детерминированности (направленности) клеток.

Клинические исследования были проведены у 5 больных с длительно несрастающимися переломами длинных костей нижних конечностей. У 2 больных были несросшиеся переломы бедренной кости, у 3 — большеберцовой кости. Продолжительность нарушения целостности костной ткани у этих больных составила от 11 месяцев до 2 лет. Во время хирургического лечения у больных из проксимального костного фрагмента в области перелома осуществляли забор периостальных тканей размером $0,5 \times 0,5$ см. Биопсийный материал помещали во флакон с консервантом и выдерживали в течение суток. Затем в стерильных условиях участки периоста извлекали из консерванта и помещали в чашки Петри с питательной средой и культивировали в CO_2 -инкубаторе при стандартных условиях. После появления клеточной пролиферации периостальные ткани извлекали, а прикрепившиеся к пластику клетки культивировали до формирования монослоя. При помощи фазово-контрастной микроскопии оценивали морфологическое состояние пролиферирующих клеток периоста, а при помощи реакции на ЩФ — их остеогенную детерминированность.

Фотодокументирование клеточных культур и гистопрепаратов осуществляли с помощью инвертированного микроскопа «Leica DMIL», рабочей станции по обработке изображений «Leica QWin500 Standart» (версия 2.3, сер. № 3069) и видеокамеры «Sanyo ТК-С1380» (Германия). Полученный в результате исследований цифровой материал подвергали статистической обработке.

Результаты и их обсуждение

При анализе гистоморфологических препаратов области костной раны на 7-е сутки после травмы было отмечено, что состояние костных фрагментов и течение репаративных процессов у животных первой и второй групп было разным. У животных первой группы костные фрагменты имели значительное количество клеточных элементов с хорошо прокрашенными ядрами. В области костной раны происходило образование примитивных костных

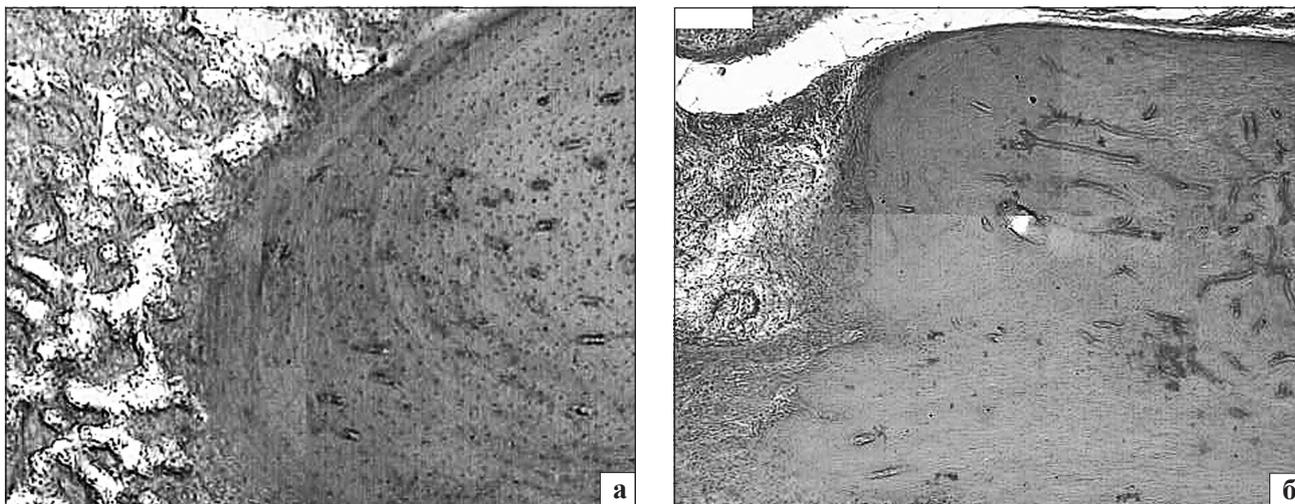


Рис. 2. Область костной раны на 7-е сутки после травмы (микрофотомонтаж, окраска гематоксилином и эозином, ув. 100): а) животные первой группы — образование примитивных костных балок в области перелома, в костном фрагменте значительное количество клеточных элементов; б) животные второй группы — образование грубоволокнистой соединительной ткани в области перелома, в костном фрагменте — единичные клеточные элементы

балок, характерных для процессов формирования костной мозоли (рис. 2 а).

Во второй группе количество клеточных элементов в костной ткани отломков было значительно меньше, чем в первой группе. Они располагались преимущественно в удаленных от линии перелома участках костной ткани. В кости, прилегающей непосредственно к линии перелома, встречались единичные клетки со слабо прокрашенными ядрами. Данные изменения морфологически напоминали картину остеонекроза. В области перелома репаративные процессы проявлялись в виде формирования грубоволокнистой ретикулярной соединительной ткани, заполняющей костную рану (рис. 2 б).

Таким образом, данные гистоморфологических исследований свидетельствуют о том, что интенсивность воздействующего на кость травмирующего агента оказывает влияние на течение репаративных процессов в костной ране. При низкоэнергетических травмах в костной ране репаративные процессы протекают с формированием специфического костного регенерата, а при высокоэнергетических травмах ограничиваются образованием неспецифического рубцового регенерата.

При культивировании клеток надкостницы активная клеточная пролиферация начиналась на 5–6-е сутки. У животных первой группы клетки надкостницы пролиферировали равномерно вдоль всего костного фрагмента (рис. 3 а). У животных второй группы пролиферация клеток надкостницы вдоль костного фрагмента была неравномерной. В зоне, прилегающей к линии перелома, пролифе-

рировали единичные клетки. Активная клеточная пролиферация отмечалась в зоне, наиболее удаленной от линии перелома (рис. 3 б).

Результаты подсчета количества клеток периоста у животных 1 и 2 групп представлены в табл. 1 и на рис. 4.

Представленные данные свидетельствуют о том, что у животных первой группы количество пролиферирующих клеток было одинаково на всем протяжении костного фрагмента и составляло 27–29 клеток в поле зрения. Во второй группе животных количество пролиферирующих клеток в области перелома не превышало 6 в поле зрения. В более удаленных от линии перелома зонах количество пролиферирующих клеток постепенно увеличивалось с 17 до 54 клеток. Различия в количестве клеток между уровнями от линии перелома у животных второй группы были достоверными (между 1, 2 и 3 уровнями — $t=2,39$, $p < 0,05$; между 3 и 4 уровнями — $t=2,3$, $p < 0,05$; между 4 и 5 уровнями — $t=2,2$, $p < 0,05$).

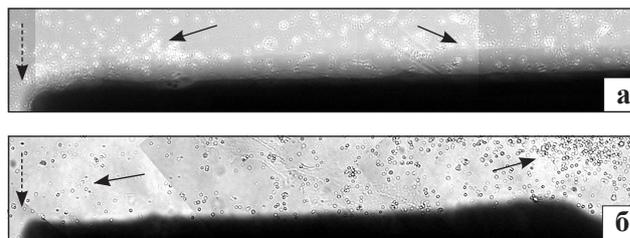


Рис. 3. Пролиферирующие клетки надкостницы (пунктирной стрелкой указана линия перелома, обычными стрелками указаны пролиферирующие клетки надкостницы): а) первая группа животных; б) вторая группа животных (микрофотомонтаж, фазово-контрастная микроскопия, ув. 100)

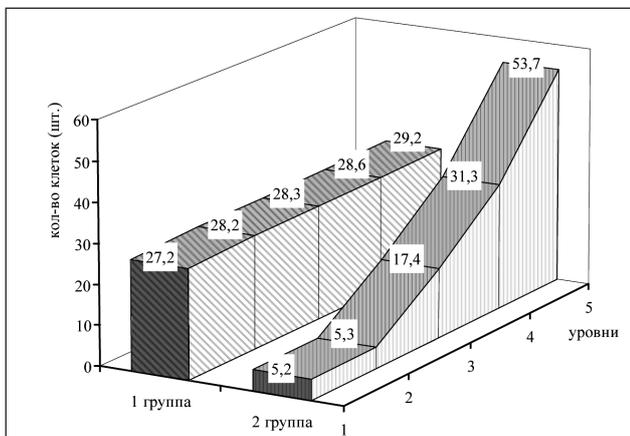
Таблица 1. Количество клеток надкостницы на разных уровнях от линии перелома у крыс первой и второй групп ($\bar{x} \pm m$)

Группы	Уровни				
	1	2	3	4	5
1 группа (n=10)	27,2±5,9	28,2±5,8	28,3±5,0	28,6±5,4	29,2±6,5
2 группа (n=10)	5,2±2,5	5,3±2,1	17,4±4,6*	31,3±3,9*	53,7±9,4*
t-критерий	3,4	3,7	1,8	1,3	2,1
p	<0,002	<0,002	<0,05	>0,10	<0,05

Примечание: * — наличие достоверного различия с предыдущим уровнем в группе

Сопоставление количества клеток на 1–5-м уровнях у животных двух групп показало, что у животных первой группы на первых трех уровнях количество пролиферирующих клеток было значительно больше, чем у животных второй группы ($p < 0,002$ и $p < 0,05$). На четвертом уровне количество пролиферирующих клеток надкостницы в обеих группах было примерно одинаковым ($p > 0,10$), а на пятом уровне от линии перелома различия имели обратную зависимость. В этой области количество пролиферирующих клеток во второй группе было достоверно больше, чем в первой группе ($p < 0,05$). В процессе культивирования пролиферативная активность клеток периоста у животных двух групп была выше контрольного значения. Пролиферативная активность клеток периоста в первой группе была в 1,6 раза ($t = 7,8$; $p < 0,001$), а во второй в 1,4 раза ($t = 7,7$; $p < 0,001$) больше контрольных значений. Различия между пролиферативной активностью клеток периоста первой и второй групп также имели достоверные различия, хотя и были менее выражены ($t = 2,2$; $p < 0,05$) (табл. 2).

При формировании клеточного монослоя отмечали наличие морфологических отличий между клетками надкостницы у крыс первой и второй групп. Во всех наблюдениях у животных первой группы клетки надкостницы имели веретенообразную форму, плотно прилегали одна к другой и располагались параллельно (рис. 5 а).

**Рис. 4.** Диаграмма зависимости числа клеток надкостницы от уровня линии перелома у животных разных групп

Во второй группе пролиферирующие клетки надкостницы имели звездчатую (отростчатую) форму с явно выраженными отростками цитоплазмы. Периостальные клетки животных второй группы, в отличие от периостальных клеток животных первой группы, в процессе культивирования образовывали субконфлуэнт, который имел «сетчатую» структуру (рис. 5 б).

При выявлении продукции культивированными клетками периоста ЩФ положительную реакцию наблюдали только у животных первой группы (рис. 6). Периостальные клетки животных второй группы не продуцировали ЩФ.

Весьма показательно, что подобную картину мы наблюдали при исследовании периостальных тканей, полученных в ходе хирургического лечения пострадавших с нарушениями остеорепарации после переломов костей. Так, в процессе культивирования тканей периоста, взятых у больных во время хирургического лечения, наблюдали формирование монослоя, который образовывали гетерогенные клетки. В монослое наблюдали как продолговатые веретенообразные клетки, так и клетки округлой формы и больших размеров с цитоплазматическими выростами (рис. 7). По своей морфологической картине монослой, образованный этими клетками, напоминал монослой, образованный клетками животных второй группы. Постановка реакции с ВСIP/NBT показала, что среди пролиферирующих клеток имеются единичные веретенообразные клетки, слабо продуцирующие ЩФ.

При изучении пролиферации клеток эндоста наблюдали картину, схожую с пролиферацией клеток периоста. Эндостальные клетки начинали пролиферировать на 7–8-е сутки культивирования.

Таблица 2. Пролиферативная активность клеток периоста у животных двух групп на 14-е сутки культивирования (оптическая плотность, ед.)

Контроль (n=10)	Группы	
	первая (n=10)	вторая (n=10)
0,846±0,024	1,388±0,065* **	1,218±0,042* **

Примечание: * — наличие достоверных различий с контрольным значением; ** — наличие достоверных различий между группами

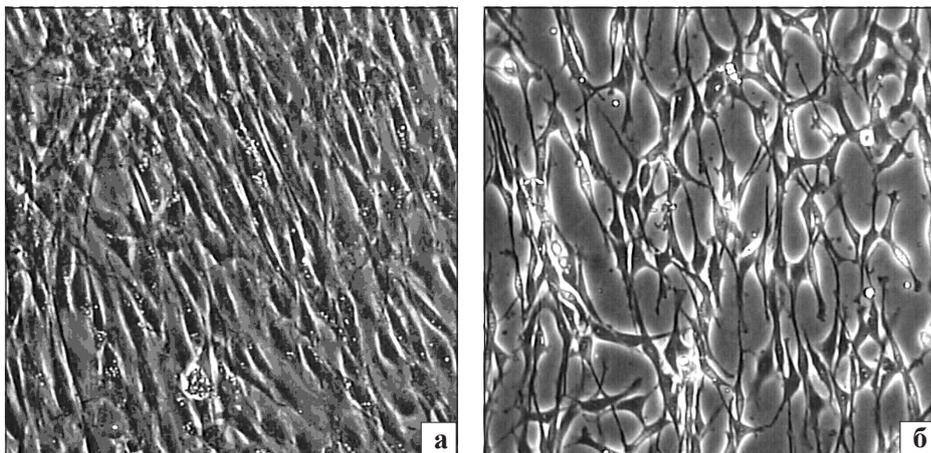


Рис. 5. Монослой, образованный пролиферирующими клетками надкостницы животных первой группы (а), и субконфлуэнт, образованный пролиферирующими клетками надкостницы животных второй группы (б) (фазово-контрастная микроскопия, ув. 200)

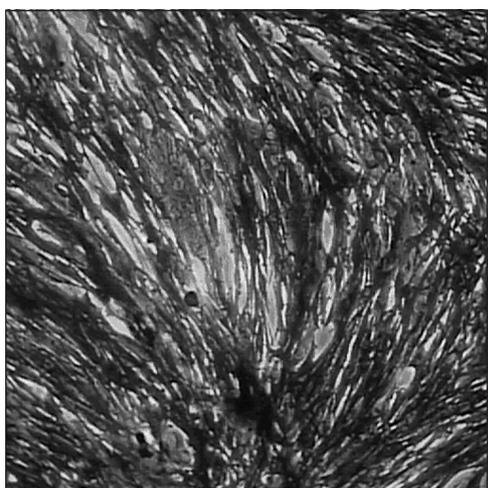


Рис. 6. Клетки периоста животных первой группы, активно продуцирующие ЦФ (реакция ВСIP/NBT, фазово-контрастная микроскопия, ув. 100)

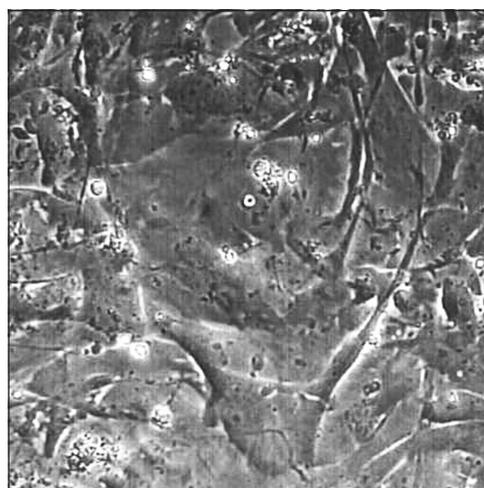


Рис. 7. Монослой, образованный пролиферирующими морфологически гетерогенными клетками надкостницы из области несращения перелома (фазово-контрастная микроскопия, ув. 200)

Количество пролиферирующих эндостальных клеток, как и в случае с клетками периоста, на разных уровнях от линии перелома в двух группах было различным (табл. 3, рис. 8).

У животных первой группы количество пролиферирующих клеток эндоста на всем протяжении костного фрагмента было примерно одинаковым и колебалось от 35 до 50 в поле зрения. У животных второй группы в области перелома количество клеток эндоста не превышало 12–13 в поле зрения, а в зонах, удаленных от перелома, увеличивалось в 3–4 раза и колебалось от 33 до 49 клеток. У жи-

вотных этой группы достоверные различия в количестве пролиферирующих клеток отмечались только между 1–2 уровнями и 3 уровнем ($t = 2,7$, $p < 0,02$). Различий между 3, 4 и 5 уровнями не было ($t = 0,4$, $p > 0,10$; $t = 0,23$, $p > 0,10$ соответственно). Сопоставление количества клеток на 1–5-м уровнях у животных двух групп показало наличие достоверных различий только на первых двух уровнях — $t = 4,24$, $p < 0,001$ для первого уровня и $t = 2,74$, $p < 0,02$ для второго уровня.

Морфология клеток эндоста у животных первой и второй группы была неодинакова. У животных

Таблица 3. Количество клеток эндоста на разных уровнях от линии перелома у крыс первой и второй групп ($\bar{x} \pm m$)

Группы	Уровни				
	1	2	3	4	5
1 группа (n=10)	37,1±4,7	40,6±9,4	38,3±5,8	35,1±9,7	39,2±8,5
2 группа (n=10)	12,2±3,5	11,3±5,1	33,4±6,9*	37,8±8,6	40,7±9,3
t-критерий	4,2	2,7	0,54	0,21	0,12
p	<0,001	<0,01	>0,10	>0,10	>0,10

Примечание: * — наличие достоверного различия с предыдущим уровнем в группе

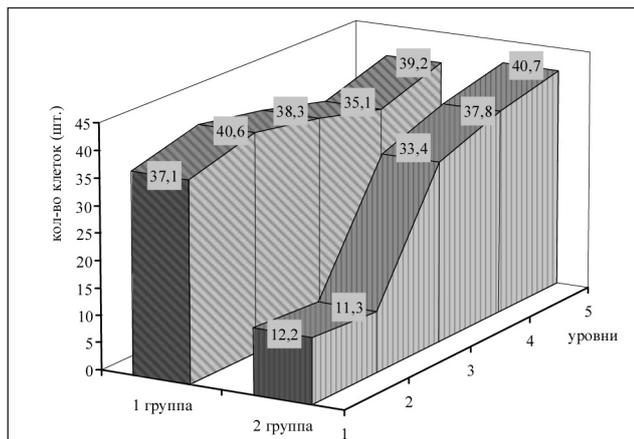


Рис. 8. Диаграмма зависимости количества клеток эндоста от уровня линии перелома у животных разных групп

первой группы клетки имели округлую форму, характерную для остеобластных клеток (рис. 9 а). У животных второй группы пролиферирующие клетки напоминали фибробластоподобные клетки (рис. 9 б).

При культивировании эндостальных клеток животных двух групп было установлено, что пролиферативная активность клеток эндоста у животных двух групп имела достоверные отличия. У животных первой группы пролиферативная активность клеток эндоста практически не отличалась от контрольных значений ($t = 2,7$; $p < 0,05$). Пролиферативная активность эндостальных клеток животных

Таблица 4. Пролиферативная активность клеток эндоста у животных двух групп на 14-е сутки культивирования (оптическая плотность, ед.)

Контроль (n=10)	Группы	
	первая (n=10)	вторая (n=10)
0,212±0,011	0,269±0,018**	0,508±0,037***

Примечание: * — наличие достоверных различий с контрольным значением; ** — наличие достоверных различий между группами

второй группы была достоверно выше контрольных значений и пролиферативной активности клеток эндоста животных первой группы ($t = 5,8$; $p < 0,001$ и $t = 5,4$; $p < 0,001$ соответственно) (табл. 4).

К 14-м суткам культивирования эндостальные клетки животных первой группы формировали субконфлуэнтную структуру с остеобластоподобными клетками, активно продуцирующими ЩФ (рис. 10 а). Эндостальные клетки животных второй группы к этому времени формировали плотный монослой, образованный фибробластоподобными клетками, не продуцирующими ЩФ (рис. 10 б).

При фазово-контрастной микроскопии первичных культур мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из костно-мозгового канала травмированных сегментов, было отмечено, что у животных первой группы количество МСК, адгезировавшихся к пластику, было примерно в 10–12 раз больше, чем у животных второй группы (рис. 11). Так как способностью адгезировать к плас-

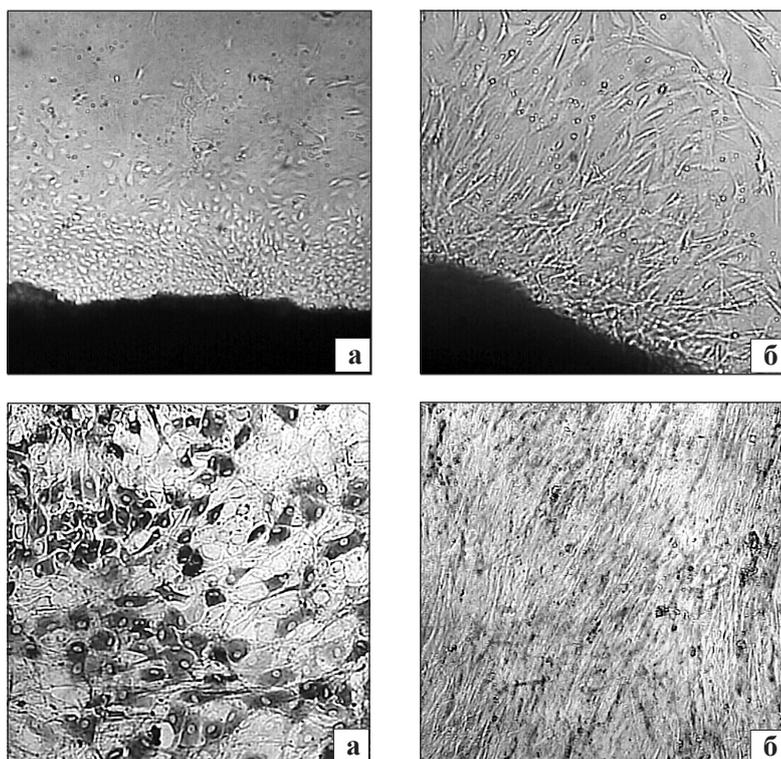


Рис. 9. Пролиферирующие клетки эндоста крыс на 10-е сутки культивирования в области, удаленной от линии перелома (микрофотомонтаж, фазово-контрастная микроскопия, ув. 100): а) животные первой группы; б) животные второй группы

Рис. 10. 14-е сутки культивирования эндостальных клеток (реакция ВСИР/NBT, фазово-контрастная микроскопия, ув. 200): а) первая группа — монослой, образованный остеобластоподобными клетками, активно продуцирующими ЩФ; б) вторая группа — плотный монослой, образованный веретеноподобными клетками, практически не продуцирующими ЩФ

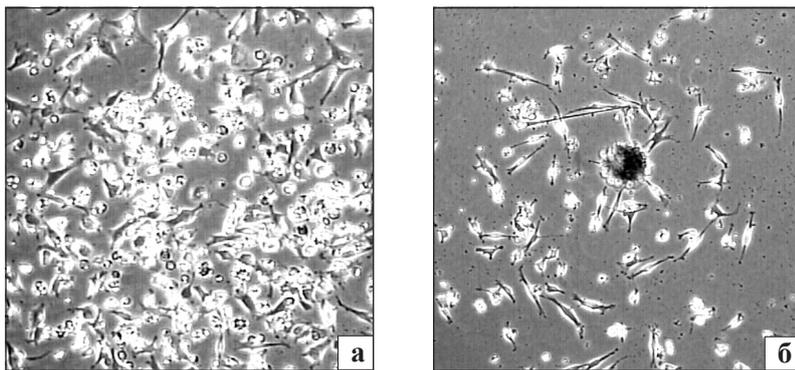


Рис. 11. Первичная культура МСК (микрофотомонтаж, фазово-контрастная микроскопия, ув. 100): а) животные первой группы; б) животные второй группы

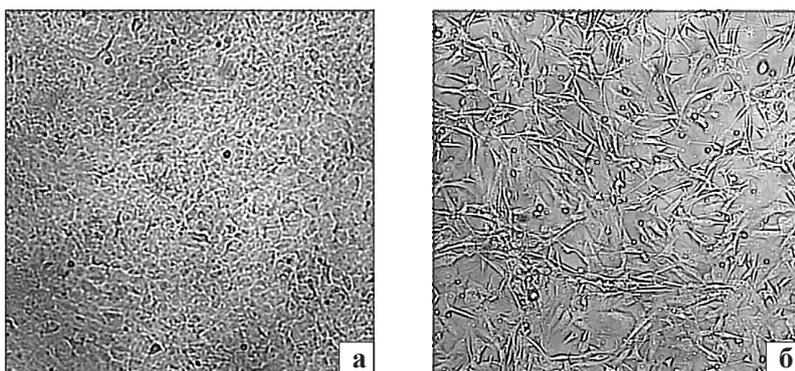


Рис. 12. 14-е сутки культивирования МСК КП (фазово-контрастная микроскопия, ув. 100): а) первая группа — плотный монослой, образованный клетками эпителиоидной морфологии; б) вторая группа — субконфлуэнт, образованный веретеноподобными и звездчатыми клетками

тику обладают только жизнеспособные МСК, то данные микроскопии первичных культур позволяют утверждать, что в костно-мозговом канале под воздействием травмирующего агента высокой интенсивности происходит гибель значительного количества МСК.

По данным МТТ-анализа, пролиферативная активность МСК на 14-е сутки культивирования у животных первой группы была в 3,5 раза выше контрольных значений ($t = 9,9$; $p < 0,001$), а у животных 2 группы — в 2,5 раза ($t = 7,5$; $p < 0,001$). Различия в пролиферативной активности МСК между группами были достоверными — пролиферативная активность МСК животных первой группы была в 1,4 раза выше, чем у животных второй группы ($t = 3,2$; $p < 0,01$) (табл. 5).

К 14-м суткам культивирования МСК КП животных первой группы формировали плотный монослой с клетками округлой формы, которые по своей морфологии напоминали эпителиоидные

клетки (рис. 12 а). МСК КП животных второй группы к этому времени формировали субконфлуэнт. По своей структуре субконфлуэнт, образованный этими клетками, напоминал субконфлуэнт, образованный клетками периоста животных этой же группы (рис. 5 б) — одна часть клеток имела веретенообразную форму, а вторая часть — звездчатую (рис. 12 б).

При сопоставлении пролиферативной активности различных клеточных источников остеорепарации у животных контрольной, первой и второй групп было отмечено, что клетки периоста и МСК во всех группах обладают большей пролиферативной активностью, чем клетки эндоста. У животных контрольной группы различий между пролиферативной активностью периостальных клеток и МСК не отмечалось ($t = 0,63$; $p < 0,10$), а по отношению к пролиферативной активности эндостальных клеток эти различия носили достоверный характер ($t = 24,01$; $p < 0,001$ и $t = 27,69$; $p < 0,001$ соответственно) (табл. 6, рис. 13).

Данное различие обусловлено тем, что клетки периоста и МСК являются менее дифференцированными, чем клетки эндоста, которые по своей сути являются остеобластическими клетками, находящимися на разной стадии дифференцировки — от преостеобластов до остеобластов.

После нанесения травмы пролиферативная активность клеток из различных источников остеорепарации возрастала. Наибольшая активация

Таблица 5. Пролиферативная активность МСК у животных двух групп на 14-е сутки культивирования (оптическая плотность, ед.)

Контроль (n=10)	Группы	
	первая (n=10)	вторая (n=10)
0,866±0,021	3,047±0,22* **	2,159±0,17* **

Примечание: * — наличие достоверных различий с контрольным значением; ** — наличие достоверных различий между группами

Таблица 6. Проллиферативная активность клеточных источников остеорепарации у животных двух групп на 14-е сутки культивирования (оптическая плотность, ед.)

Группы	Клеточные источники остеорепарации		
	периост	эндост	МСК
Контроль (n=10)	0,846±0,024	0,212±0,011	0,866±0,021
1 группа (n=10)	1,388±0,065	0,269±0,018	3,047±0,22
2 группа (n=10)	1,218±0,042	0,508±0,037	2,159±0,17

процессов пролиферации отмечалась со стороны МСК костно-мозгового канала. У животных первой группы пролиферативная активность МСК КП была в 2,2 раза выше, чем клеток периоста ($t = 7,2$; $p < 0,001$), и в 11,3 раза больше, чем клеток эндоста ($t = 12,55$; $p < 0,001$). У животных второй группы пролиферативная активность МСК КП была больше пролиферативной активности клеток периоста в 1,8 раза ($t = 5,37$; $p < 0,001$) и в 4,3 раза больше, чем клеток эндоста ($t = 9,49$; $p < 0,001$). На втором месте по пролиферативной активности находились клетки периоста. В первой группе их активность была в 5,2 раза выше, чем активность эндостальных клеток ($t = 16,1$; $p < 0,001$), а во второй группе — в 2,4 раза больше ($t = 12,7$; $p < 0,001$). В то же время пролиферативная активность клеток периоста и МСК КП у животных первой группы была достоверно выше, чем у животных второй группы ($t = 2,19$; $p < 0,05$ и $t = 3,19$; $p < 0,01$ соответственно). Со стороны клеток эндоста, наоборот, более выраженная пролиферативная активность отмечалась у животных второй группы ($t = 5,35$; $p < 0,001$).

Заключение

Полученные в результате исследований данные свидетельствуют о том, что на течение репаративных процессов в костной ране значительное влияние оказывает характер травмы, а именно интенсивность, с которой травмирующий агент воздействует на костную ткань. При травмах низкой интенсивности репаративные процессы, развивающиеся в костной ране, приводят к образованию костного регенерата и сращению перелома. При травмах высокой интенсивности в костной ране также протекают репаративные процессы, но они завершаются формированием неспецифической фиброзной ткани (рис. 2). Закономерно возникает вопрос, почему после воздействия травмирующего агента высокой интенсивности в области перелома не происходит формирование костного регенерата. По нашему мнению, ответ на этот вопрос дают результаты проведенных исследований.

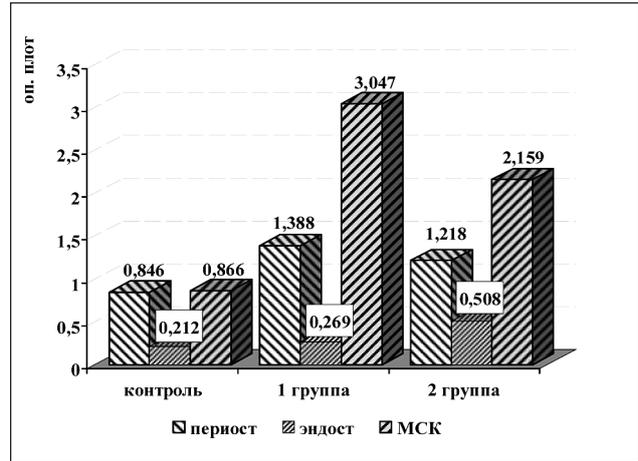


Рис. 13. Диаграмма пролиферативной активности клеток из различных источников остеорепарации у животных разных групп по данным МТТ-анализа

Полученные при исследованиях в условиях *in vitro* данные свидетельствуют о том, что при травмах высокой интенсивности клетки периоста, эндоста и МСК КП претерпевают определенные морфофункциональные изменения. Во-первых, при травме высокой интенсивности в костных фрагментах происходит гибель значительного количества клеток периоста и эндоста на значительном удалении от линии перелома. Количество способных к пролиферации клеток периоста в этой области сокращается более чем в 5 раз, а количество клеток эндоста уменьшается более чем в 3,5 раза. Большая часть МСК костно-мозгового канала также теряет свою жизнеспособность. В пользу этого свидетельствует уменьшение более чем в 10 раз количества жизнеспособных МСК. Во-вторых, пролиферативная активность клеток периоста и МСК при травмах высокой интенсивности в 1,2 и 1,4 раза ниже, чем при травмах низкой интенсивности, а пролиферативная активность эндостальных клеток, наоборот, при травмах высокой интенсивности почти в 2 раза выше, чем при травмах низкой интенсивности. Последнее может быть объяснено дедифференцировкой эндостальных клеток, которая происходит в результате воздействия на костную ткань травмирующего агента высокой интенсивности. В пользу дедифференцировки клеток эндоста свидетельствует изменение формы клеток — от округлой, характерной для остеобластных клеток, до веретенообразной, характерной для фибробластоподобных клеток, которые обладают большей пролиферативной активностью. В-третьих, при травмах высокой интенсивности клетки периоста и МСК КП теряют способность формировать монослой. Вместо монослоев, образованных упорядоченными,

имеющими одинаковую форму клетками, происходит формирование субконфлуэнтных культур, образованных морфологически гетерогенными (в т.ч. гипертрофированными и некротизирующимися) клетками, которые имеют нехарактерную для клеток периоста и МСК форму (рис. 5, 7, 12). Клетки эндоста, в отличие от клеток периоста и МСК, формируют плотный монослой, но в образовании монослоя принимают участие клетки, имеющие фибробластоподобную, не характерную для клеток эндоста форму (рис. 10). Кроме того, в результате воздействия травмирующего агента высокой интенсивности периостальные и эндостальные клетки прекращают продуцировать ЩФ.

Также важно отметить, что клеточные культуры, полученные от группы животных с низкоэнергетической травмой, морфологически отличаются от культур, полученных от животных с высокоэнергетической травмой. Первые имеют эпителиоидную морфологию (кроме клеток периоста) и являются остеобластными линиями (рис. 9 а, 10 а, 12 а). Клетки периоста и эндоста животных первой группы активно продуцируют ЩФ, что свидетельствует об их остеогенной направленности и способности оказывать остеогенную индукцию малодифференцированных клеток костного мозга. В то же время фибробластоподобные клетки животных второй группы (рис. 9 б, 10 б, 12 б) теряют свою остеогенную детерминированность (о чем свидетельствует отсутствие у них продукции ЩФ) и способность оказывать остеогенную индукцию малодифференцированных клеток костного мозга.

В работах последних лет было показано, что в костной ране под действием значительного количества биологически активных веществ происходит активация и миграция в костную рану пролиферирующих некоммутированных малодифференци-

рованных стромальных элементов костного мозга (МСК КП), по сути являющихся прото-миофибробластами [10, 20]. При этом в участке перелома локально выделяется значительное количество ТФР- β , накапливается значительное количество специфического белка фибронектина и возникают мощные силы натяжения экстрацеллюлярного матрикса, отражающие механические свойства матрикса и ремоделирующей активности клеток. Механорецепция между миофибробластами приводит к значительной контракции образующейся в ране грануляционной ткани. После этого постепенно происходит реорганизация грануляционной ткани с запуском процесса апоптоза в миофибробластах и заселением на их место детерминированных и индуцированных клеточных элементов [20].

При переломах на место миофибробластов, подвергшихся апоптозу, приходят МСК из костномозгового канала и остеогенно детерминированные элементы эндоста и периоста. Периостальные и эндостальные клетки, наряду с формированием костного регенерата по периферии, остеоиндуцируют МСК, проникающие в грануляционную ткань, тем самым создавая условия для образования специфического костного регенерата во всей толще костной раны (рис. 14).

В тех случаях, когда в силу каких-либо причин (в нашем случае в результате воздействия травмы высокой интенсивности) клетки периоста и эндоста теряют свою остеогенную детерминацию, остеоиндуцирующего воздействия с их стороны на МСК, находящиеся в грануляционной ткани, не происходит. В результате этого при реорганизации грануляционной ткани костной раны на место миофибробластов, подвергшихся апоптозу, из костномозгового канала, гаверсовых каналов и области периоста мигрируют морфологически из-

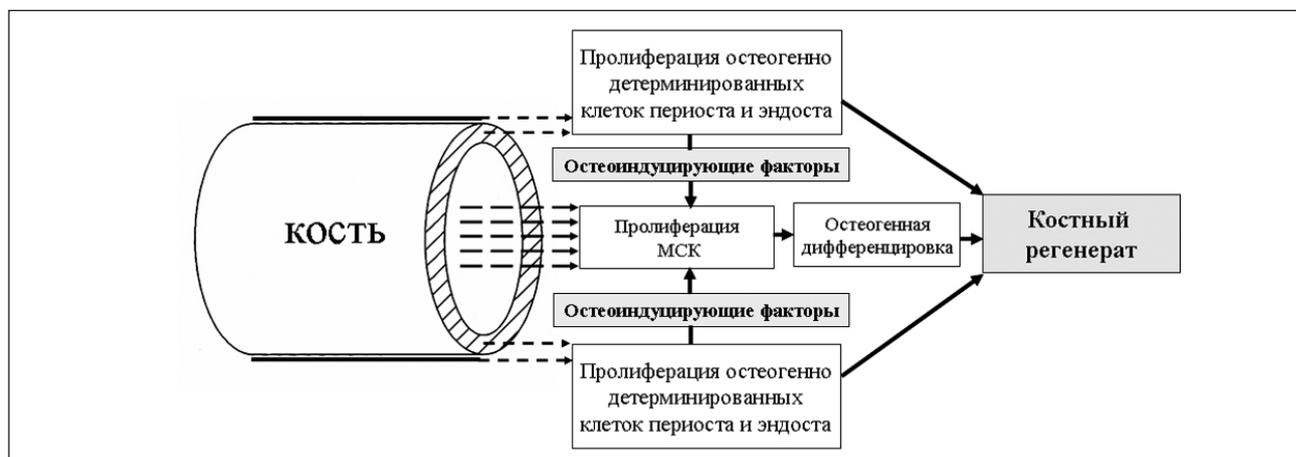


Рис. 14. Блок-схема формирования костного регенерата в области перелома при нормальном течении репаративного остеогенеза

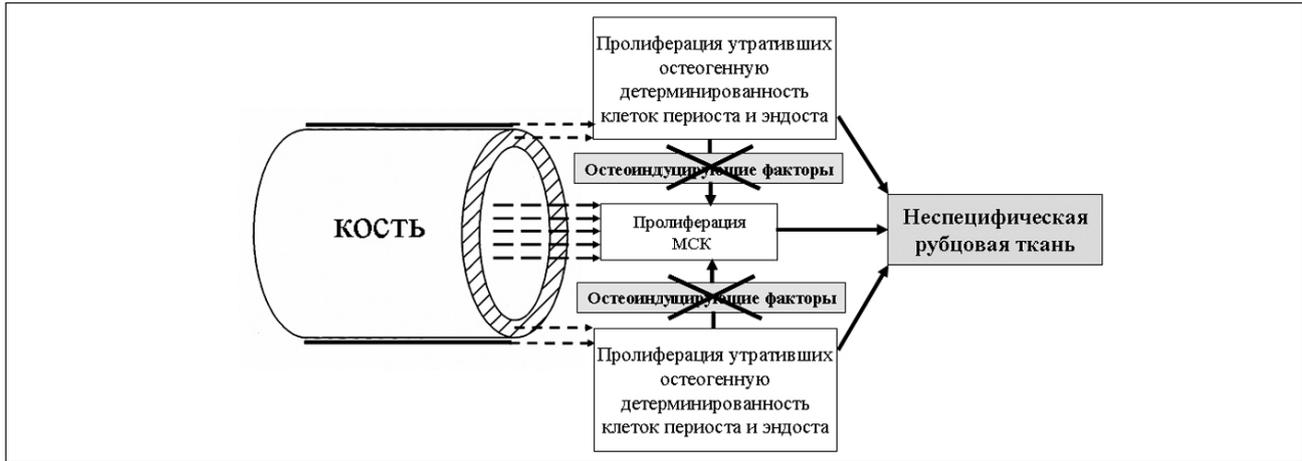


Рис. 15. Блок-схема нарушения формирования костного регенерата в области перелома (в частности при высокоэнергетических травмах)

мененные и утратившие присущие им остеогенные свойства фибробластоподобные клетки, которые способствуют образованию грубоволокнистого неспецифического рубца в месте перелома (рис. 15).

Таким образом, можно утверждать, что одной из основных причин, нарушающих течение репаративного остеогенеза при травмах высокой интенсивности, являются морфофункциональные изменения клеточных источников остеорепарации. Последние характеризуются дедифференцировкой остеогенно детерминированных клеток периоста и эндоста, что приводит к развитию остеогенной недостаточности, которая была описана В.Г. Гололобовым с соавт. [2] на основании эмпирических заключений и подтверждена нашими экспериментальными исследованиями. Механизмы, приводящие к морфофункциональным изменениям клеточных источников остеорепарации, нам не известны и требуют отдельного изучения.

Литература

1. Виноградова Т.П. Регенерация и пересадка костей / Т.П. Виноградова, Г.И. Лаврищева. — М.: Медицина, 1974. — 247 с.
2. Оптимизация репаративного остеогенеза трансплантацией стромальных клеток костного мозга / В.Г. Гололобов, А.К. Дулаев, Р.В. Деев и др. // Клеточная трансплантология. — 2004. — № 1. — С. 15–16.
3. Калашников А.В. Діагностика та лікування розладів репаративного остеогенезу у хворих із переломами кісток / А.В. Калашников, А.Т. Бруско // Вісник ортоп., травматол. та протез. — 2002. — № 3. — С. 35–40. — ISSN 0132-2486.
4. Канторова В.И. Гетерогенность клеточных источников восстановительных процессов у позвоночных / В.И. Канторова // Онтогенез. — 1985. — Т. 16, № 15. — С. 450–473.
5. Лаврищева Г.И. Морфологические и клинические аспекты репаративной регенерации опорных органов и тканей / Г.И. Лаврищева, Г.А. Оноприенко. — М.: Медицина, 1996. — 208 с.
6. Соколов В.А. Выбор метода фиксации сложных переломов

длинных костей у пострадавших с политравмой / В.А. Соколов, Е.И. Бялик, О.И. Бояршинова // Современные технологии в травматологии и ортопедии: материалы науч. конф., посвящ. 75-летию со дня рожд. проф. К.М. Сиваша. — Москва, 1999. — С. 183–184.

7. Энглези А.П. Влияние переменных магнитных полей на травматический отек и набухание головного мозга (экспериментально-клиническое исследование): дис. ... канд. мед. наук / А.П. Энглези. — Киев, 1997. — 204 с.
8. Craniofacial, vestibular and bone defects in mice lacking the distal less related gene *Dlx5* / D. Acampora, G.R. Merla, L. Paleari et al. // *Development*. — 1999. — Vol. 126. — P. 3795–3809.
9. Birjandinejad A. Augmentation plate fixation for the treatment of femoral and tibial nonunion after intramedullary nailing / A. Birjandinejad, M.H. Ebrahimzadeh, H. Ahmadvadeh Chabock // *Orthopedics*. — 2009. — Vol. 32, № 6. — P. 409.
10. The cytoskeleton of stromal cells from human bone marrow cultures resembles that of cultured smooth muscle cells / P. Charbord, H. Lerat, P. Herve et al. // *Exp. Hematol.* — 1990. — Vol. 18. — P. 276–282.
11. A dominant negative cadherin inhibits osteoblast differentiation / S.L. Cheng, C.S. Shin, D.A. Towler, R. Civitelli // *J. Bone Miner. Res.* — 2000. — Vol. 15. — P. 2362–2370.
12. Bone morphogenetic protein 3 is a negative regulator of bone density / A. Daluiski, T. Engstrand, M.E. Bahamonde et al. // *Nat. Genet.* — 2001. — Vol. 27. — P. 84–88.
13. Ham A.W. Repair and transplantation of bone / A.W. Ham, W.R. Harris // *The Biochemistry and Physiology of Bone*. — N.Y.: Academic Press, 1971. — Vol. 3. — P. 338–379.
14. Bone morphogenetic protein 2 promotes human calvaria cell aggregation and osteoblast differentiation by increasing N and E cadherin Expression / E. Hay, J. Lemonnier, D. Modrowski et al. // *J. Cell Physiol.* — 2000. — Vol. 183. — P. 117–128.
15. *Msx2* gene dosage influences the number of proliferative osteogenic cells in growth centers of the developing murine skull: a possible mechanism for *MSX2* mediated craniosynostosis in humans / Y.H. Liu, Z. Tang, R.K. Kundu et al. // *Dev. Biol.* — 1999. — Vol. 205. — P. 260–274.
16. Evidence that IGF binding protein 5 functions as a growth factor / N. Miyakoshi, C. Richman, Y. Kasukawa et al. // *J. Clin. Invest.* — 2001. — Vol. 107. — P. 73–81.
17. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins / G. Mundy, R. Garrett, S. Harris et al. // *Science*. — 1999. — Vol. 286. — P. 1946–1949.
18. Primary unreamed intramedullary nailing for open fractures

- of the tibia / C.W. Oh, B.C. Park, J.C. Ihn, H.J. Park // *Int. Orthop.* — 2001. — Vol. 24, № 6. — P. 338–341.
19. Expandable intramedullary nailing for tibial and femoral fractures: a preliminary analysis of perioperative complications / W.R. Smith, B. Ziran, J.F. Agudelo et al. // *J. Orthop. Trauma.* — 2006. — Vol. 20, № 5. — P. 310–314.
20. Myofibroblasts and mechanoregulation of connective tissue remodelling / J.J. Tomasek, G. Gabbiani, B. Hinz et al. // *Molecular cell biolog.* — 2002. — Vol. 3. — P. 349–363.
21. Yamaguchi A. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1 / A. Yamaguchi, T. Komori, T. Suda // *Endocrinol. Rev.* — 2000. — Vol. 21. — P. 393–411.
22. The surgical technique and follow up of the treatment with locking internal fixation on long bone nonunion of extremities / C.Q. Zhang, X.G. Cheng, J.G. Sheng et al. // *Zhonghua Wai Ke Za Zhi.* — 2008. — Vol. 46, № 7. — P. 510–513.
23. Targeted overexpression of insulin like growth factor I to osteoblasts to transgenic mice: increased trabecular bone volume without increased osteoblast proliferation / G. Zhao, M.C. Monier-Faugere, M.C. Langub et al. // *Endocrinology.* — 2000. — Vol. 141. — P. 2674–2682.

Статья поступила в редакцию 14.02.11

ВНИМАНИЮ АВТОРОВ

В связи с тем, что журнал внесен в Перечень научных специализированных изданий, в которых могут публиковаться результаты диссертационных работ, обращаем ваше внимание на необходимость указывать на титульном листе статьи следующие сведения: 1) фамилию, инициалы; 2) название статьи; 3) полное название учреждения и отдела (кафедры, лаборатории), в котором выполнена работа. Фамилия автора и учреждение, в котором он(она) работает, должны быть снабжены одним цифровым индексом.

Кроме того, согласно требованиям ВАК, для публикации в журнале просьба предоставлять на отдельном листе сведения о каждом авторе: 1) фамилию, имя и отчество; 2) должность; 3) полный почтовый служебный адрес и e-mail; 4) номер служебного телефона и факса. Следует указать контактное лицо.

При подготовке статьи следует соблюдать правила для авторов, публикуемые в журнале.