

*Гололобов В. Г.*

## ПОСТТРАВМАТИЧЕСКИЙ ОСТЕОГИСТОГЕНЕЗ (ПОЛЯРИЗАЦИОННО-ОПТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА)

*Кафедра гистологии (заведующая — проф. И. А. Одинцова)  
Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург*

---

Реактивность и регенерация костной ткани является актуальной проблемой теоретической гистологии [1, 4, 6], кроме того, весьма существенными являются ее клинические аспекты [8, 9, 17]. Концепция гистионной организации процесса регенерации открывает возможность для более полного его анализа с позиций взаимодействия клеток и межклеточного вещества, их дифференциальной реакции на регуляторные стимулы [4, 5, 7].

Современные данные свидетельствуют, что исследователи обращают все большее внимание на взаимодействие клеток и компонентов матрикса в процессе регенерации костной ткани. Показано, что материал, собранный на матрице коллагена, совместно с малодифференцированными клетками в костной ране модулирует экспрессию генов для *runx2*, *osterix*, костного сиалопротеина, остеокальцина, повышает активность щелочной фосфатазы, вызывая более эффективную регенерацию [11]. Насыщенные коллагеном поликапролактановые волокна существенно поддерживали адгезию, миграцию и пролиферацию остеобластов, что способствовало восстановлению кости [16]. Выделенные из коллагена межклеточного костного матрикса DGEA-пептиды активировали экспрессию дифференцировки преостеобластов, позволяя регулировать темп регенерации костной ткани [19]. Авторы обоснованно считают, что сложные взаимодействия стволовых скелетогенных клеток, остеобластов, органического матрикса, биологических факторов, эндотелиоцитов и других клеточных типов необходимо учитывать при изучении развития, репаративной регенерации, создании тканеинженерных конструкций кости [13, 14, 17, 18].

Цель работы — комплексное изучение клеточного состава и состояния межклеточного вещества в процессе посттравматической регенерации костной ткани.

**Материал и методы исследования.** Эксперимент проведен на 16 собаках массой 10–15 кг. Животным под наркозом накладывали аппарат внешней фиксации на голень и наносили огнестрельный перелом диафиза большеберцовой кости. Выведение животных из опыта осуществляли передозировкой тиопентала натрия. Сроки наблюдения составили 15, 30, 60, 120 суток от начала опыта. Из стандартных участков кости, включавших зону перелома, части проксимальных и дистальных отломков, готовили препараты по методам, применяемым в световой и электронной микроскопии. Проведено морфометрическое изучение среднего количества клеточных элементов различных дифферонов (макрофаги, фибробласты, фиброциты, эндотелиоциты сосудов, остеобласты, остеоциты, остеокласты, хрящевые клетки) на стандартной единице площади интермедиарного регенерата. Статистический анализ выполнен согласно рекомендациям по морфометрии [10].

Для исследования состояния межклеточного вещества проксимального, дистального отломков и интермедиарного костного регенерата использован метод сканирующей поляризационной микроскопии в монохроматическом свете зондом диаметром 14 мкм с регистрацией оптической анизотропии с помощью цитоспектрофотометра-флуориметра [6]. Угол поворота столика поляризационного микроскопа (ПОЛАМ-Р112) с препаратом продольного среза интактной кости, при котором коллагеновые волокна имели максимум оптической анизотропии, принимали за начальную точку отсчета. Определяли угол максимального свечения волокон в костных отломках. Проксимальный и дистальный костные регенераты исследовали на препаратах с соответствующими отломками при трех углах поворота препарата: первый был равен углу максимального свечения волокон отломка, два других угла выбирали по максимуму оптической анизотропии волокон в двух точках в пределах регенерата. Проводили трехмерную компьютерную реконструкцию изменений оптической анизотропии костной ткани.

**Результаты исследования и их обсуждение.** На 15-е сутки опыта среди клеток интермедиарной части регенерата преобладали элементы фибробластического дифферона ( $45,2 \pm 2,1$  %), а также эндотелиоциты ( $16,7 \pm 2,7$  %) сосудов, что являлось свидетельством неоваскулогенеза. Некротические участки кости отломков подвергались резорбции остеокластами, в каналах остеонов сохранившие жизнеспособность остеогенные элементы и привнесенные с растущими сосудами индуцибельные к остеогенезу периваскулоциты, дифференцировались в остеобласты. Ими формировалась сеть трабекул ретикулофиброзной костной ткани, связанной с краями отломков. Остеобласты ( $8,0 \pm 0,7$  %), остеоциты ( $5,5 \pm 0,6$  %), остеокласты ( $3,8 \pm 0,4$  %) и эндотелиоциты формировали регенерационный гистион костных клеток, межклеточного вещества и эндотелиоцитов кровеносных сосудов. Показано, что клетки остеогенной линии вырабатывают ряд полифункциональных веществ, обеспечивающих их взаимодействие с межклеточным матриксом [13], среди которых костный морфогенетический белок (КМБ) 6 вызывает наибольшую экспрессию и регуляцию комплекса генов коллагена I типа, остеокальцина, костного сиалопротеина, что приводит к усилению синтеза органического матрикса с последующим депонированием гидроксиапатита [12, 13].

Установлено, что показатели оптической анизотропии коллагеновых волокон межклеточного вещества отломков сходны и составляют лишь 32 % от аналогичного показателя для волокон интактной кости. Это связано со снижением степени его минерализации, вымыванием неколлагеновых белков из органического матрикса, уменьшением плотности расположения волокон. В проксимальном регенерате на протяжении 500 мкм от края отломка новообразованные коллагеновые фибриллы оформлялись в тонкие пучки, обладающие слабой анизотропией. В дистальном регенерате на протяжении до 1000 мкм от края отломка при трех углах поворота объекта установлены еще более низкие, чем в проксимальном, величины оптической анизотропии волокнистых структур. Следует отметить, что ориентация пучков волокон в дистальном регенерате практически полностью совпадает с таковой в проксимальной части регенерирующей костной ткани.

Через 30 суток от начала эксперимента, согласно морфометрическим данным, в составе гистииона остеобластов, эндотелиоцитов, остеокластов и межкле-

точного вещества увеличилось количество клеток остеобластического дифферона. Количество эндотелиоцитов значимо не изменилось, так как не снижалась интенсивность ангиогенеза в регенерате, особенно в его костной части. Отмечено увеличение доли остеокластов ( $5,5 \pm 0,7 \%$ ), свидетельствующее об их совместном с остеобластами участии в регенерационном эндоссальном остеогенезе и remodelировании костного регенерата [2]. Гистологическую и морфометрическую характеристику регенерата уточняют данные о том, что остеоиндуктивные КМБ, продуцируемые остеобластами, остеоцитами, хрящевыми клетками, способствуют пролиферации и дифференцировке костеобразующих клеток, синтезу межклеточного вещества [15].

Выявлено увеличение показателя оптической анизотропии фибрилл межклеточного вещества проксимального отломка, он составлял 42,6 % от показателя, характеризующего интактную костную ткань. На фоне продолжающегося снижения степени минерализации костной ткани отломков подъем этого признака в проксимальном отломке обусловлен, наиболее вероятно, регенерационным эндоссальным остеогенезом. Показатель оптических свойств волокон дистального отломка, находящегося в условиях дефицита кровоснабжения, активной деятельности остеокластов, составил только 27,2 % от аналогичного показателя для волокон в интактной кости. В проксимальном регенерате, сканированном при совпадающем азимуте с соответствующим отломком, на протяжении 1800 мкм обозначаются подъемы поляризационных показателей, что свидетельствует об утолщении и уплотнении формирующихся пучков коллагеновых волокон. Дистальный костный регенерат на протяжении 500 мкм от края отломка содержит тонкие пучки фибрилл, обладающих слабой анизотропией при трех углах поворота объекта. В регенерате от 500 до 1800 мкм, исследованном под углом  $125^\circ$  (сходный с основной компонентой отломка), выявлялось равномерное увеличение оптических свойств новообразованных волокон, свидетельствующее об их компактизации за счет активной деятельности остеобластов. Необходимо отметить, что ориентация пучков волокон в дистальном и проксимальных костных регенератах на этом сроке сходна. Остеобласты, синтезируя органические компоненты межклеточного матрикса, выделяют их в зоне дефекта кости не хаотично, а в определенной направленности со стороны одного и другого костных отломков, причем характерен в основном встречный вектор, способствующий их сращению.

Адаптация клеточных, тканевых и гистионных структур к меняющимся условиям раневого гистогенеза имела пролонгированное течение. На 60-е сутки опыта вновь образованная ретикулофиброзная костная ткань регенерата подвергалась перестройке. Отмечалось формирование структур, сходных по архитектонике с остеонами. Они закладывались вокруг межбалочных промежутков, заполненных соединительной тканью с кровеносными сосудами, периваскулоцитами и элементами остеобластического дифферона. В этот период вновь была выражена реакция остеокластов ( $8,5 \pm 2,0 \%$ ), участвовавших в remodelировании костного регенерата, уменьшилась доля фибробластов ( $17,7 \pm 1,6 \%$ ), но увеличилась — остеоцитов ( $17,3 \pm 1,9 \%$ ).

Определялся значительный подъем оптической анизотропии коллагеновых волокон проксимального отломка до 75,4 % по отношению к подобному показа-

телю интактной костной ткани. Вырос более чем в 2 раза по сравнению с 30-ми сутками опыта показатель оптических свойств, характеризующий костную ткань дистального отломка. Указанные изменения вполне объяснимы продолжающимся регенерационным эндоссальным остеогенезом, при котором происходит формирование новых костных пластинок на месте разрушенных и резорбированных структур. В регенерате, берущем начало от проксимального отломка, при трех углах сканирования (отличия по отношению к углу основной компоненты составляют  $15^\circ$  и  $25^\circ$ ) выявлялись пучки волокон, для которых характерна сходная тенденция изменений показателя оптической анизотропии на протяжении 2000 мкм от края отломка. В каждом отрезке регенерата по 500 мкм регистрируются 2–3 пика показателя, чередующихся со снижениями его количественного значения. В дистальном регенерате определялась похожая трехмерная организация и ориентация пучков фибрилл, лишь цифровое выражение пиков оптического показателя менее выраженное, а снижение его плавное по сравнению с проксимальным регенератом. Результаты анализа трехмерной реконструкции проксимального и дистального регенератов свидетельствуют о том, что на протяжении костного регенерата имеются участки утолщенных и компактно упакованных пучков волокон, соответствующих более зрелому их состоянию, которое чередуется с участками пучков фибрилл, обладающих более низкой анизотропией. Эти данные отражают интенсивно протекающие процессы ремоделирования костного регенерата, формирования пластинчатой костной ткани и гаверсовых систем.

На 120-е сутки эксперимента в регенерате произошло уменьшение в среднем в 2 раза количества макрофагов, фибробластов, эндотелиоцитов, остеобластов и остеокластов, снижение внутридифферонной гетероморфии клеток фибробластической и остеобластической линий. Изменение доли хрящевых клеток, остеокластов и эндотелиоцитов имело отношение к репаративному хондрогенезу в составе сложного регенерата на месте бывшего перелома кости. Хрящевая ткань способствовала консолидации отломков, но параллельно служила объектом для регенерационного эндохондрального остеогенеза. Лишь к концу опыта соотношение остеобластов и остеоцитов изменилось в сторону преобладания последних, что связано с образованием пластинчатой костной ткани и, соответственно, остеонов.

Показатель оптической анизотропии коллагеновых фибрилл межклеточного вещества проксимального отломка приближался к таковому в интактной кости и составлял от последнего 95,5 %, увеличивалось также значение показателя оптических свойств волокон дистального отломка — 79,4 %. Характер сканограмм, особенно дистального отломка, демонстрировал на протяжении 1500 мкм неравномерное чередование подъемов и снижений анизотропии фибрилл межклеточного вещества. Подобное состояние оптических свойств межклеточного матрикса отломков связано с такими процессами как остеокластическая резорбция, реваскуляризация, снижение степени минерализации при заселении кости гемопозитическими элементами. В условиях посттравматического остеогенеза к этому сроку не происходит полного восстановления оптических свойств волокнистой основы межклеточного вещества костной ткани отломков, но это связано с адаптивной ее перестройкой, создающей условия для кроветворения.

Измерение оптической анизотропии коллагеновых фибрилл проксимального регенерата, проведенное при азимуте, совпадающем с направлением основной компоненты отломка ( $130^\circ$ ), показало, что этот признак в регенерате достигает 65,1 % от аналогичного показателя для волокон отломка. В регенерате в промежутках от 0 до 300 мкм, от 500 до 1000 мкм, от 1300 до 2000 мкм выявляются значения оптической анизотропии, свидетельствующие о заметном утолщении пучков волокон и их более плотной упаковке. При смене угла поворота столика с препаратом кости на  $25^\circ$  и  $15^\circ$  в проксимальном регенерате выявлялись пучки коллагеновых волокон другой ориентации, показатель анизотропии которых составляет 55,7 % и 45,7 % соответственно, от подобного показателя для фибрилл в межклеточном веществе проксимального отломка. В дистальном регенерате три его составляющие, измеренные при указанных углах поворота объекта под световым зондом, отражают наличие в нем созревающих разнонаправленных пучков фибрилл, показатели анизотропии которых достигают от 55 до 58 % от показателей поляризационных свойств волокон дистального отломка. Нарастающие значения показателей анизотропии волокнистой основы межклеточного вещества проксимального и дистального регенератов свидетельствуют об изменяющейся и упорядочивающейся фибриллоархитектонике новообразованной костной ткани на месте бывшего костного дефекта.

Таким образом, в течение фазы регенерации (15–60 суток) процессы пролиферации и дифференцировки приводят к увеличению количества клеток остеобластического, эндотелиоцитарного дифферонов, что свидетельствует о нарастании темпов регенерационного остеогистогенеза и интенсификации неоваскулогенеза. При увеличении продукции органического матрикса поляризационно-оптическая характеристика костного регенерата соотносилась с мозаично расположенными участками, содержащими утолщенные и уплотненные пучки коллагеновых волокон, тонкие пучки фибрилл, равномерно компактизированные волокнистые структуры. В фазу функциональной адаптации (60–120 суток) в гистионе, состоящем из совокупности костных клеток, эндотелиоцитов и межклеточного вещества, продолжалась дифференцировка остеобластов, увеличились доли остеоцитов и остеокластов. Эти показатели имели прямое отношение к ремоделиции регенерата, формированию остеонов пластинчатой костной ткани, в том числе за счет эндохондрального остеогистогенеза. Оптическая анизотропия коллагеновых волокон межклеточного вещества приблизилась к показателю интактной кости на 95,5 % и 79,4 % в проксимальном и дистальном отломках соответственно. Возросшие значения показателей анизотропии волокнистой основы межклеточного вещества костного регенерата свидетельствовали об изменяющейся и упорядочивающейся по вектору фибриллоархитектоники новообразованной костной ткани. Межклеточное вещество является неотъемлемой составляющей надтканевых структур — функциональных гистионов. В целом гистологические критерии способствуют оценке течения процесса регенерации, прогнозированию исхода восстановления кости как органа опорно-двигательной системы, а также теоретическому обоснованию разработки и внедрения в клиническую практику современных методов регенеративной медицины.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Гололобов В. Г.* Регенерация костной ткани при заживлении огнестрельных переломов. СПб.: Петербург-XXI век, 1997.
2. *Гололобов В. Г.* Костная ткань — повреждение — регенерация. Закономерные процессы посттравматического остеогенеза // Вопросы морфологии XXI века. Вып. 2. Сборник науч. трудов, посв. 80-летию со дня рождения профессора А. А. Клишова / Под ред. Р. К. Данилова, С. В. Костюкевича, И. А. Одицовой. СПб.: ДЕАН, 2010. С. 90—94.
3. *Гололобов В. Г., Деев Р. В.* Стволовые стромальные клетки и остеобластический клеточный дифферон // Морфология. 2003. Т. 123. № 1. С. 9—19.
4. *Данилов Р. К.* Вклад ученых-гистологов Военно-медицинской академии в разработку учения о тканях. Актуальные вопросы гистогенеза и регенерации. Общие принципы организации тканей позвоночных // Фундаментальные и прикладные проблемы гистологии: Гистогенез и регенерация тканей. Тр. Военно-медицинской академии. Т. 257 / Под ред. Р. К. Данилова. СПб.: ВМедА, 2004. С. 11—47.
5. *Данилов Р. К.* Раневой процесс: гистогенетические основы. СПб.: ВМедА, 2008.
6. *Данилов Р. К., Гололобов В. Г., Русакова С. Э.* Поляризационно-оптический метод исследования коллагеновых волокон интактной и регенерирующей волокнистой соединительной и костной тканей // Морфология. 1997. Т. 112, № 4. С. 83—86.
7. *Данилов Р. К., Одицова И. А., Мурзабаев Х. Х., Русакова С. Э., Найденова Ю. Г.* Методы оценки жизнеспособности клеток и тканей при моделировании огнестрельной кожно-мышечной раны и костных переломов // Фундаментальные и прикладные проблемы гистологии: Гистогенез и регенерация тканей. Тр. Военно-медицинской академии. Т. 257 / Под ред. Р. К. Данилова. СПб.: ВМедА, 2004. С. 48—66.
8. *Денисов-Никольский Ю. И., Миронов С. П., Омеляненко Н. П., Матвейчук И. В.* Актуальные проблемы теоретической и клинической ортопедии. М.: Типография «Новости», 2005.
9. *Иорданишвили А. К., Гололобов В. Г.* Репаративный остеогенез: теоретические и прикладные аспекты проблемы. Основы клинической стоматологии / Под ред. проф. А. К. Иорданишвили. М.: Медицинская книга, 2010. С. 395—404.
10. *Юнкеров В. И., Григорьев С. Г.* Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований. СПб.: ВМедА, 2002.
11. *Balian G., Beck G., Madhu V. et al.* Peptides from phage display library modulate gene expression in mesenchymal cells and potentiate osteogenesis in unicortical bone defects // Vis. Exp. 2010. V. 10. № 46. P. 362—379.
12. *Friedman M. S., Long M. W., Hankenson K. D.* Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells is regulated by bone morphogenetic protein-6 // J. Cell Biochem. 2006. V. 98. № 3. P. 538—554.
13. *Jayakumar P., Di Silvio L.* Osteoblasts in bone tissue engineering // Proc. Inst. Mech. Eng. H., 2010. V. 224. № 12. P. 1415—1440.
14. *Kanczler J. M., Oreffo R. O.* Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone // Eur. Cell Mater., 2008. V. 2. № 15. P. 100—114.

15. *Katagiri T., Takahashi N.* Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation // *Oral. Dis.* 2002. V. 8. № 3. P. 147–159.
16. *McNeil S. E., Griffiths H. R., Perrie Y.* Polycaprolactone fibres as a potential delivery system for collagen to support bone regeneration // *Curr. Drug Deliv.* 2011, [Epubahead of print].
17. *Schauwecker J., VON Eisenhart-Rothe R., Burgkart R. et al.* Revitalization of human bone after extracorporeal high hydrostatic pressure treatment // *Anticancer Res.* 2011. V. 31. № 4. P. 1235–1239.
18. *Tare R. S., Kanczler J., Aarvold A. et al.* Skeletal stem cells and bone regeneration: translational strategies from bench to clinic // *Proc. Inst. Mech. Eng. H.* 2010. V. 224. № 12. P. 1455–1470.
19. *Yoo S. Y., Kobayashi M., Lee P. P., Lee S. W.* Early osteogenic differentiation of mouse preosteoblasts induced by collagen-derived DGEA-peptide on nanofibrous phage tissue matrices // *Biomacromolecules.* 2011. V. 12. № 4. P. 987–996.