

Zrost kostny i jego zaburzenia. Przegląd literatury

Fracture Healing and its Disturbances. A literature Review

Grzegorz Szczęsny

Klinika Ortopedii i Traumatologii Narządu Ruchu, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa, Polska
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk, Warszawa, Polska
Department of Orthopedics and Traumatology of the Musculoskeletal System, Medical University of Warsaw, Poland
Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, Poland

STRESZCZENIE

Gojenie złamań jest procesem biologicznym zależnym od zdolności do aktywacji, kumulacji w szparze przełomu oraz proliferacji i różnicowania mezenchymalnych komórek prekursorowych w kierunku komórek linii osteoblastycznej. Jego celem jest wytworzenie kostniny i jej remodelowanie do tkanki kostnej o budowie analogicznej do tej, która występowała przed urazem. Jej mineralizacja warunkuje przywrócenie właściwości mechanicznych zapewniając warunki dla spełniania funkcji podporowej utraconej w wyniku złamania.

Zaburzenia zrostu kostnego są relatywnie częstym powikłaniem, w znacznym stopniu utrudniającym postępowanie terapeutyczne i podnoszącym koszty leczenia. Powodem ich wystąpienia jest brak lub uszkodzenie komórek prekursorowych, zaburzenia ich regulacji humoralnej – zarówno wnikające aktywację, jak i napływanie do miejsc urazu, proliferację i różnicowanie w kierunku komórek linii osteoblastycznej oraz brak zapewnienia odpowiedniego środowiska dla optymalnego, z punktu widzenia procesu gojenia złamania, przebiegu procesów reparacyjnych. W niniejszej pracy przedstawiono rolę poszczególnych czynników w procesie zrostu kostnego oraz mechanizmy powstawania ich zaburzeń.

Słowa kluczowe: złamanie kości, zaburzenia zrostu kostnego, molekularna regulacja gojenia złamań, komórki prekursorowe osteoblastów, czynniki stymulujące zrost kostny

SUMMARY

The healing of a bone fracture is a biological process depending on the activation of mesenchymal progenitors, their accumulation in the fracture gap, proliferation and differentiation into the osteoblastic cell lineage. Its aim is to form a callus in the fracture gap which is later remodelled into mature bone, restoring the mechanical properties lost in consequence of the fracture.

Disturbances in fracture repair occur relatively often, causing therapeutic problems and increasing costs of treatment. They are caused by the lack of or damage to progenitor cells, disturbances in molecular regulation of their activation, homing, proliferation and differentiation into the osteoblastic cell lineage, or lack of appropriate environment for their optimal metabolism for fracture repair. This paper discusses the roles of individual factors crucial for the reparative process as well as the mechanisms responsible for their disturbances.

Key words: bone fracture, fracture healing impairment, molecular regulation of fracture repair, osteoblastic precursors, factors stimulating bone union

WSTĘP

Zrost kostny jest procesem biologicznym, którego celem jest przywrócenie ciągłości tkanki kostnej poprzez wytworzenie kostniny remodelowanej do tkanki o budowie analogicznej do tej, która pierwotnie występowała w miejscu złamania, tj. zbitej w przypadku złamań trzonów kości długich i gąbczastej w przypadku złamań jej końców. Jest zatem w swej istocie procesem regeneracyjnym, nie gojeniem, gdyż jego efektem jest wypełnienie szpary złamania tkanką kostną, nie blizną łącznotkankową. Jednak głęboko zakorzenione w środowisku ortopedycznym użycie określenia „gojenie” dla regeneracji złamań powoduje, że jest on nadal używany i z tego też powodu będzie w takim znaczeniu używany w niniejszej pracy.

Z ortopedycznego punktu widzenia celem gojenia złamania jest przywrócenie właściwości mechanicznych kości. Brak ruchomości patologicznej, zdolność przenoszenia obciążeń mechanicznych oraz ustępowanie dolegliwości bólowych, a co za tym idzie – powrót funkcji podporowej – są podstawowymi wskaźnikami prawidłowego przebiegu gojenia, znajdując potwierdzenie w obrazach rentgenowskich pod postacią formowania i przebudowy kostniny.

Kostnina tworzona jest wskutek chemotaksji do szpary złamania mezenchymalnych komórek progenitorowych różnicujących się wskutek odpowiedniej stymulacji molekularnej i przy zapewnieniu optymalnych warunków środowiskowych do komórek linii osteoblastycznej, stanowiących źródło dojrzałych komórek kości – osteocytów [1]. Dzięki zdolności do syntezy i uwalniania białek budują one macierz zewnątrzkomórkową oraz odpowiadają za jej mineralizację. Efektywne tworzenie kostniny wymaga więc 1. komórek prekursorowych, 2. ich odpowiedniej stymulacji molekularnej warunkującej proliferację i różnicowanie do pożądanej z punktu widzenia gojenia złamania komórek linii osteoblastycznej oraz 3. środowiska umożliwiającego prawidłowe funkcjonowanie tych komórek.

KOMÓRKI PREKURSOROWE

Mezenchymalne komórki prekursorowe (komórki pnia, mesenchymal stem cells; MSCs) są zdolne, przy odpowiedniej stymulacji molekularnej, do różnicowania w kierunku wielu linii komórek pochodzenia mezenchymalnego, w tym do osteoblastów, chondrocytów, fibroblastów, adipocytów, komórek nerwowych i miocytów [2,3]. Ich obecność stwierdzono w wielu tkankach, w tym w mięśniach, wokół naczyń krwionośnych, w szpiku i w okostnej [4-7]. Bogatym źródłem komórek prekursorowych są również tkanka tłuszczowa i krew obwodowa [8,9]. Na-

BACKGROUND

Bone union is a biological process aimed at restoring bone continuity through the formation of a callus which is later remodelled into mature bone possessing mechanical properties analogous to those lost in consequence of the fracture, that is compact bone in the case of a long bone shaft fracture and spongy bone in epiphyseal fractures. Therefore, it is, in essence, a regenerative, rather than healing, process as it results in the fracture gap being filled with bone tissue rather than a cartilaginous scar. Nevertheless, the word ‘healing’ has been widely used by orthopaedists to refer to fracture regeneration. Consequently, it is still commonly encountered and will be used in this meaning in the present paper.

From an orthopaedist’s point of view, fracture healing aims at restoring the mechanical properties of bone. The main indicators of normal fracture healing are the following: no pathological mobility, the ability to carry mechanical load, gradual resolution of pain and the resultant recovery of the support function. They are confirmed by radiographic images showing callus formation and remodelling. Callus formation results from chemotaxis of mesenchymal progenitors to the fracture gap; with appropriate molecular stimulation and optimal environmental conditions, they differentiate into the osteoblastic cell lineage, constituting the source of mature bone cells, or osteocytes [1]. Due to their ability to synthesize and release proteins, they form the extracellular matrix and are responsible for its mineralisation. Thus, the effective formation of callus requires 1) precursor cells, 2) appropriate molecular stimulation of precursor cells resulting in their proliferation and differentiation into the osteoblastic cell lineage necessary for fracture healing and 3) an environment allowing these cells to function normally.

PRECURSOR CELLS

With appropriate molecular stimulation, mesenchymal stem cells (MSCs) can differentiate into various mesenchymal cell lineages, including osteoblasts, chondrocytes, fibroblasts, adipocytes, neurons and myocytes [2,3]. They have been found in numerous tissues, such as muscles, around blood vessels, in bone marrow and periosteum [4-7]. Precursor cells are also abundantly present in adipose tissue and peripheral blood [8-9]. The cells migrate from the surrounding tissues in the direction of an increasing gradient of the chemotactic factor SDF-1 (stromal deriv-

plywając z okolicznych tkanek w kierunku wzrastającego gradientu stężenia czynników chemotaktycznych – SDF-1 (stromal derived factor-1) uwalnianych w miejscu złamania, zasiedlają szparę przełomu [10-11]. Biorą one udział w regeneracji tkanki kostnej, w procesach angiogenezy (proces odbudowy uszkodzonego ukrwienia) i w wielu innych [12-14].

Napływające do miejsca urazu MSCs różnicują w kierunku danej populacji komórkowej w zależności od lokalnych warunków środowiskowych. Zapewniają je zarówno macierz zewnątrzkomórkowa, stymulacja molekularna, jak i lokalne właściwości fizykochemiczne i mechaniczne panujące w obrębie szpary złamania i w tkankach do niej przylegających [15]. Specyficzne białka wchodzące w skład macierzy kości stanowią odpowiednie środowisko dla komórek osteogennych, a brak odpowiedniego składnika lub obecność niepożądanych białek prowadzi do zaburzeń gojenia. Stwierdzono na przykład, że o ile złamania gojące się prawidłowo przebiegają bez ekspresji kolagenu typu II-1 α , to jego obecność prowadzi do zaburzeń zrostu z wytworzeniem obfitej tkanki chrzęstnej [16,17].

STYMULACJA MOLEKULARNA

MSCs aktywuje wiele czynników – zarówno fizykochemicznych, takich jak hipoksja i kwasica [18, 19], jak i molekularnych. Te drugie uwalniane z uszkodzonych tkanek i wyznaczonych elementów morfotycznych krwi obwodowej oraz z zakończeń włókien nerwowych [20]. Obfitym ich źródłem są komórki napływające do miejsc urazu: granulocyty, monocyty / makrofagi i limfocyty. Są nimi m.in. cytokiny (interleukiny IL-6 i IL-8), czynniki wzrostu (płytkopochodny czynnik wzrostu – PDGF, czynnik wzrostu fibroblastów – FGF, transformujący czynnik wzrostu – TGF- β i białka morfogenetyczne kości – BMP) [21]. Najsilniejszymi stymulatorami MSCs są czynniki stymulacji kolonii granulocytarnych i granulocytarno – makrofagalnych (G-CSF i GM-CSF), cytokiny (IL-1, IL-3, IL-7, IL-8 i IL-12), czynnik komórek pnia (Stem Cell Factor – SCF), erytropoetyna, trombopoetyna, ligand Flt3, makrofagalne białko zapalne (MIP-1) oraz chemokiny GRO β i SDF-1 [22, 23]. Każdy z nich wywiera określone działanie prowadząc do aktywacji specyficznego szlaku sygnałowego, pobudzając komórkę docelową do przemieszczania się, podziału, różnicowania oraz syntezy i uwalniania substancji białkowych, aktywując jej migrację i różnicowanie w kierunku danej populacji komórkowej. Efekt ostateczny, jakim jest gojenie złamania, wynika ze zbieżnego działania wielu czynników wywierających swój wpływ na komórki docelo-

ed factor-1) released at the fracture site and colonise the fracture gap [10-11]. They participate in bone tissue regeneration, angiogenesis (restoration of damaged blood supply) and many other processes [12-14].

The MSCs homing to the fracture site differentiate into a particular cell lineage depending on the local environment, which is influenced both by the extracellular matrix, molecular stimulation and by local physicochemical and mechanical conditions in the fracture gap and the surrounding tissues [15]. Specific bone matrix proteins constitute an appropriate environment for osteogenic cells and the lack of a necessary component or the presence of unwanted proteins leads to non union. For instance, it has been found that normal fracture healing is not associated with type II 1 α collagen expression and its presence results in non union with the formation of abundant cartilage [16,17].

MOLECULAR STIMULATION

MSCs are activated by numerous factors, including both physicochemical, such as hypoxia and acidosis [18,19], and molecular factors which are released by damaged tissues and extravasated peripheral blood cells as well as nerve endings [20]. Cells homing to the fracture site: granulocytes, monocytes/macrophages and lymphocytes are an ample source of such factors as cytokines (interleukins IL-6 and IL-8), growth factors (platelet-derived growth factor – PDGF, fibroblast growth factor – FGF, transforming growth factor beta – TGF- β and bone morphogenetic proteins – BMPs) [21]. The most effective MSC stimulators are the granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), cytokines (IL-1, IL-3, IL-7, IL-8 and IL-12), stem cell factor (SCF), erythropoietin, thrombopoietin, Flt3 ligand, macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1) and the chemokines GRO β and SDF-1 [22,23]. Each of them has its own effect, leading to the activation of a specific signalling pathway and stimulating the target cell to migrate, divide, differentiate and synthesise and release proteins, thus activating the cell's migration and differentiation into a given cell lineage. The final outcome in the form of fracture healing results from the convergent actions of numerous factors influencing the target cells in an appropriate time sequence and place. The large number of compounds participating in the mo-

we w odpowiedniej sekwencji czasowej i w odpowiednim miejscu. Mnogość znanych obecnie substancji biorących udział w molekularnej regulacji procesu gojenia (szczegółowo opisanych zostało kilkadziesiąt z nich) rozszerzana jest o kolejno odkrywane. Analiza ekspresji genów w szparze złamania wykazała, że uraz wywołuje ekspresję tysięcy genów skutkującą syntezą tysięcy białek, wskazując na złożoność procesu gojenia na poziomie molekularnym [24].

PROCES MINERALIZACJI MACIERZY KOSTNEJ

Proces mineralizacji postępuje dzięki zasiedlaniu szpary przełomu przez populację komórkową zdolną do odkładania organicznych (białkowych – głównie kolagen typu I-go)¹ i nieorganicznych składowych macierzy [25,26]. Składniki białkowe formują rusztowanie dla odkładania elementów nieorganicznych oraz zwiększają elastyczność kości [27]. Ponadto proces enzymatycznej przebudowy białek macierzy, realizowany przez metaloproteiny macierzy, wyznacza kierunek remodelowania beleczek kostnych optymalizując ich formowanie zgodnie z kierunkiem sił mechanicznych oddziaływujących na kość, optymalizując tym samym jej mikroarchitekturę dla spełniania funkcji podporowej [28].

Proces mineralizacji jest procesem enzymatycznym polegającym na odkładaniu wytrąconych jonów wapnia i grup fosforanowych z surowicy krwi w postaci hydroksyapatytu – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Proces ten zachodzi w pęcherzykach macierzy (matrix vesicles) – strukturach o średnicy ok. 20-200 nm, będących wytworami osteocytów. Zawierają one szereg substancji biorących udział w procesie mineralizacji, w tym annexyny (m. in. annexynę V), fosfatazę alkaliczną, calbindinę –D9K, pirofosfatazy, anhydrazę węglanową, AMP-azy, sialoproteinę kostną (BSP-1), osteonektynę i osteokalcynę oraz czynniki wzrostu [29,30].

Pęcherzyki macierzy łączą się z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej – z włóknami kolagenu typu II-go, IX-go i X-go oraz poprzez fosfatazę alkaliczną i annexyny – z włóknami kolagenu typu I-go.

Koncentrację jonów wapniowych wewnątrz pęcherzyków macierzy umożliwia ich transport poprzez kanały tworzone przez annexynę, a fosforanowych, uwalnianych ze związków organicznych przez fosfatazę alkaliczną, przez kotransportery jonowe Na/Pi – NPT3/Pit1. Skoncentrowanie wewnątrz pę-

lularnej regulacji of bone union known to date (several dozen have been described in detail) is constantly growing. An analysis of gene expression in the fracture gap revealed that an injury induces the expression of thousands of genes resulting in the synthesis of thousands of proteins, which indicates the complex nature of fracture healing on the molecular level [24].

THE PROCESS OF BONE MATRIX MINERALISATION

Bone matrix mineralisation takes place due to the infiltration of the fracture gap by cells able to deposit organic (proteins, mainly type I collagen)¹ and inorganic matrix components [25,26]. The proteins form a scaffold for the accumulation of inorganic substances and improve bone elasticity [27]. Moreover, enzymatic remodelling of the matrix proteins mediated by matrix metalloproteinases sets the direction of trabecular bone remodelling, optimizing its formation according to the direction of the mechanical forces acting on the bone and, consequently, optimizing its microarchitecture for performing the support function [28].

Mineralisation is an enzymatic process consisting in the deposition of calcium and phosphate ions precipitating from the serum in the form of hydroxylapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. The process takes place in matrix vesicles, which are structures approx. 20-200 nm in diameter produced by osteocytes. They contain a number of compounds participating in the mineralisation process, including annexins (such as annexin V), alkaline phosphatase, calbindin-D9k, pyrophosphatases, carbonic anhydrase, AMP-ases, bone sialoprotein-1 (BSP-1), osteonectin, osteocalcin and growth factors [29,30].

Matrix vesicles bind to extracellular matrix proteins such as type II, IX and X collagen fibres as well as type I collagen (through alkaline phosphatase and annexins).

Calcium ions are transported into matrix vesicles across channels formed by annexin while phosphate ions, released from organic compounds by alkaline phosphatase, are transported by Na/Pi cotransporters (NPT3/Pit1). A high concentration of calcium and phosphate ions inside vesicles results in the deposition of amorphous calcium-phosphate crystals (the process is facilitated by phosphatidylserine) known

¹ Najlichnieszszą grupą białek kości stanowi kolagen typu I-go (w tkance chrzęstnej i w okostnej również II-go i IX-go). W pewnych elementach strukturalnych kości, np. w naczyniach krwionośnych, występują również inne typy kolagenu.

¹ The largest group of bone proteins consists of type I collagen (in the cartilage and periosteum there is also type II and IX). Certain bone structures, such as blood vessels, contain also other types of collagen.

cherzyków jonów wapniowych i fosforanowych powoduje wytrącanie amorficznych kryształów wapniowo-fosforanowych (proces ten przyspieszany jest przez fosfatydylserynę) jako kryształy octa-Ca/Pi. Stopniowe narastanie odkładanych związków wapniowo-fosforanowych powoduje rozrastanie się owych kryształów, których wydzielanie z pęcherzyków macierzy następuje poprzez działanie osteonektyny, osteokalcyny i sialoproteiny kostnej (BSP-1). Zbieżne działanie tych trzech białek przekształca enzymatycznie amorficzne kryształy Ca/Pi w hydroksyapatyt odkładany wokół rusztowania tworzonego w przestrzeni pozakomórkowej przez włókna kolagenu [31,32].

Reasumując, proces mineralizacji macierzy kostnej jest procesem przebiegającym dzięki obecności jonów wapniowych i fosforanowych ulegających precipitacji regulowanej enzymatycznie². Źródłem czynników regulujących go są osteocyty wytwarzające zarówno enzymy biorące udział w procesie mineralizacji, jak i pęcherzyki macierzy, w obrębie i w sąsiedztwie których zachodzi mineralizacja. Olbrzymią rolę odgrywają w tych procesach białka macierzy (głównie kolageny typu I-go, II-go, IX-go i X-go), tworzące rusztowanie, wzdłuż którego odkładany jest hydroksyapatyt [33].

CHARAKTERYSTYKA PRAWIDŁOWO PRZEBIEGAJĄCEGO PROCESU GOJENIA ZŁAMANIA I JEGO ZABURZENIA

Zaburzenia zrostu kostnego wnikają aż 5-10% złamań. W zależności od nasilenia zmian patologicznych przebiegają w postaci od spowolnienia (zrost powolny, zrost opóźniony), do całkowitego zahamowania zrostu kostnego. O braku zrostu i w konsekwencji powstaniu stawu rzekomego możemy mówić w sytuacji, gdy nie doszło do wytworzenia zrostu między odłamami, a ustały wszelkie procesy regeneracyjne w szparze złamania. Z oczywistych powodów stwierdzenie wytworzenia stawu rzekomego może nastąpić dopiero po odpowiednio długim czasie obserwacji – dawniej wymagano nawet dwuletniej obserwacji, co z przyczyn praktycznych i ekonomicznych jest obecnie nieakceptowalne. Food and Drug Administration zaleca stawianie rozpoznania braku zrostu w 9. miesiącu po złamaniu lub przy braku radiologicznych cech postępu gojenia w kolejnych 3 miesiącach, jednak coraz większa liczba ortopedów skłania się ku pogładowi już w 6. miesiącu

as octa-Ca/Pi crystals. Gradual accumulation of the calcium-phosphate deposits causes the crystals to grow. Their release from matrix vesicles is mediated by osteonectin, osteocalcin and bone sialoprotein-1 (BSP-1). The convergent action of these three proteins leads to the enzymatic transformation of the amorphous Ca/Pi crystals into hydroxylapatite, which is accumulated around the collagen scaffold in extracellular space [31,32].

Overall, bone matrix mineralisation depends on the presence of calcium and phosphate ions which undergo enzymatically-mediated precipitation². The factors regulating the process originate from osteocytes, which produce both the enzymes participating in mineralisation and the matrix vesicles, in and around which mineralisation occurs. Matrix proteins, mainly type I, II, IX and X collagen, play a very important role in these processes, creating a scaffold for the deposition of hydroxylapatite [33].

FRACTURE HEALING AND ITS DISTURBANCES

Improper bone healing is a complication of as many as 5-10% of all fractures. Depending on the severity of pathological changes, it ranges from slow fracture healing (slow union, delayed union) to complete inhibition of bone union. The lack of union and the resultant pseudoarthrosis are diagnosed when there is no union between the fragments and all regenerative processes in the fracture gap have stopped. Of course, the diagnosis of nonunion requires a long follow-up period, which used to be defined even as 2 years; nowadays, this would be unacceptable from both the economic and practical point of view. According to the recommendations of the Food and Drug Administration, a pseudoarthrosis should be diagnosed in the 9th month following the fracture or if there is no radiographic evidence of fracture healing during three consecutive months. However, more and more orthopaedists agree that the absence of clinical and radiographic evidence of bone union even in the 6th

² Brak bezpośredniego udziału elementów komórkowych w procesie mineralizacji macierzy unaocznia m.in. postępującą mineralizację fragmentów martwej kości (martwaków) w porównaniu z otaczającymi je fragmentami kości żywej, podlegającej procesom przebudowy.

² Cellular components do not participate in matrix mineralisation directly, which is shown by the progressing mineralisation of fragments of dead bone (sequestra) as compared with the surrounding living bone fragments, which undergo remodelling.

po złamaniu brak klinicznych i radiologicznych cech zrostu pozwala rozpoznać zaburzenia gojenia uprawniając do podjęcia działań zmierzających do pobudzenia zrostu kostnego. Przedstawiane są również poglądy, że należy arbitralnie, bazując na doświadczeniu klinicznym, określić czas niezbędny dla gojenia złamania danej kości i ingerować przy braku zrostu w tym określonym okresie [34]. Tak znaczne rozbieżności w definiowaniu zaburzeń gojenia złamań wynikają z braku wypracowanych metod diagnostycznych jednoznacznie wskazujących, kiedy doszło do ustania procesów regeneracyjnych. Wszystkie obarczone są również ogromną wadą, gdyż wymagają biernej obserwacji przebiegu procesu gojenia z jego oceną po odpowiednio długim czasie, wykluczając tym samym prognozowanie jakości przebiegu zrostu kostnego. Jedynym badaniem mogącym być użytecznym w monitorowaniu przebiegu procesu gojenia i prognozowaniu jego skutków może być limfoscintygrafia kończyn [35].

W niezaburzonem gojeniu złamania wyróżnia się trzy fazy:

1. Fazę reaktywną, na którą składają się tworzenie krwaka bezpośrednio po urazie, zasiedlanego następnie przez napływające komórki zapalne formujące ziarninę zapalną,
2. Fazę naprawczą, w której dochodzi do wytworzenia tkanki chrzęstnej, a następnie kostnienia na podłożu chrzęstnym z wytworzeniem kostniny pierwotnej

Fazę remodelowania, której efektem jest wytworzenie dojrzałej tkanki kostnej o strukturze analogicznej do tej, która znajdowała się pierwotnie w miejscu złamania.

Pierwsza faza trwa do kilku (3-7) dni, druga – do 4 tygodni, trzecia – do dwóch (a nawet więcej) lat po złamaniu. Należy jednak zaznaczyć, że szybkość przebiegu procesu gojenia w różnych obszarach szpary przełomu, zwłaszcza złamań wieloodłamowych, może być różna i w przylegających do siebie obszarach mogą przebiegać procesy w różnych stadiach od bardzo wczesnych (w fazie reaktywnej) po zaawansowane (w fazie remodelowania kostniny).

Histologicznie prawidłowo przebiegający zrost kostny charakteryzuje obecność w drugim tygodniu po złamaniu tkanki chrzęstnej wypełniającej szparę przełomu, która w 4. tygodniu jest już zastępowana przez kość gąbczastą, a w 8. – przebudowywana (remodelowana) z wytworzeniem struktury osteonu i beleczek kostnych. W zaburzeniach zrostu w 4 tygodniu po złamaniu brak jest ognisk kostnienia pomimo analogicznego do złamania niepowikłanego wypełnienia szpary przełomu przez nadmiernie tworzoną tkankę chrzęstną „wypływającą” poza miejsce

month after fracture allows for diagnosing impaired fracture healing and taking action to stimulate bone union. Some also believe that the time necessary for fracture healing in a given bone should be determined arbitrarily and on the basis of clinical experience and that the lack of union after that period requires intervention [34]. The varying opinions concerning the definition of non union are associated with the lack of diagnostic methods to clearly indicate the moment of cessation of regenerative processes. All available methods are also flawed as they require passive observation of the healing and assessment of the healing status after a sufficiently long period of follow-up and, consequently, do not allow for predicting the quality of bone union. The only examination which may be useful in the monitoring of the healing process and predicting its outcomes is limb lymphoscintigraphy [35].

Unimpeded fracture healing may be divided into three phases:

1. Reactive phase, including the formation of a haematoma directly after injury which is then colonised by inflammatory cells forming inflammatory granulation tissue,
2. Reparative phase, associated with the formation of cartilaginous tissue followed by endochondral ossification with the formation of primary callus, Remodelling phase, resulting in the formation of mature bone whose structure is similar to that existing prior to the fracture.

The first phase lasts up to several (3-7) days, the second up to 4 weeks and the third may last up to 2 (or even more) years after fracture. However, it should be noted that the healing rate may differ in various parts of the fracture gap, especially in the case of a comminuted fracture. Consequently, the process may be at various stages even in adjacent locations, ranging from very early (reactive phase) to advanced (callus remodelling).

Histologically normal bone healing is characterised by the presence of a callus filling the fracture gap in the 2nd week after injury. In the 4th week, the callus is replaced by spongy bone and in the 8th week it undergoes remodelling as the structural pattern of osteons and trabecular bone develops. In non union, there are no foci of ossification in the 4th week after fracture despite the fact that, similarly to unimpeded bone union, the fracture gap is filled with overproduced cartilage “flowing” out of the fracture site. In the 8th week, histological assessment reveals no union or bone tissue remodelling with the other elements of cartilage and young fibrous tissue, leading to a pseudoarthrosis [36].

złamania. W 8. tygodniu obrazy histologiczne wykazują brak zrostu kostnego i przebudowy tkanki kostnej z pozostałymi elementami tkanki chrzęstnej i młodej tkanki włóknistej, prowadząc do wytworzenia stawu rzekomego [36].

Na poziomie molekularnym w 1. tygodniu od złamania nie obserwuje się różnic w ekspresji PDGF, TGF- β i FGF-2 w szparze złamania gojącego się prawidłowo i z zaburzeniami zrostu kostnego, ale w 8. tygodniu – w zroście prawidłowym, osteocyty ekspresjonują wszystkie te czynniki, natomiast w stawie rzekomym – nie ekspresjonują żadnego z nich [37]. Zaobserwowano też, że nie tylko brak autogennej stymulacji miejscowo syntetyzowanymi czynnikami molekularnymi, ale również mechaniczne ich usuwanie ze szpary złamania (powtarzane debridement, drenaż płuczający itp.) zaburza postęp gojenia [38].

CZYNNIKI ZABURZAJĄCE GOJENIE ZŁAMAŃ

Brak lub uszkodzenie komórek prekursorowych, zaburzenia ich chemotaksji oraz brak zapewnienia im w szparze złamania odpowiednich warunków fizykochemicznych, dostępu substancji odżywczych i/lub nieodpowiednia stymulacja molekularna są czynnikami uniemożliwiającymi napływanie do szpary złamania komórek prekursorowych, ich proliferację i różnicowanie w kierunku pożądanej linii osteoblastycznej.

Mogą do nich prowadzić brak, uszkodzenie lub zaburzenia napływania prekursorów osteoblastów (ubytki i martwica tkanek, uszkodzenie progenitorów przez np. przedłużające się niedokrwienie, napromieniowanie tkanek promieniowaniem jonizującym lub chemoterapię, zaburzenia chemotaksji w wyniku zaburzeń ekspresji SDF-1 lub brak dróg napływu w wyniku wstrząsu i/lub uszkodzenia mikrokrażenia). Natomiast wskutek nieodpowiednich warunków fizykochemicznych i/lub nieodpowiedniej stymulacji molekularnej, różnicowanie komórek progenitorowych w kierunku komórek linii chondrocytarnej lub fibroblastycznej prowadzi do powstania stawu rzekomego.

ROLA CZYNNIKÓW MECHANICZNYCH

Brak styku odłamów kostnych (diastaza) lub interpozycja tkanek miękkich zaburzą gojenie złamania. Ponieważ maksymalna odległość między odłamami kości korowej umożliwiającą gojenie złamania w mechanizmie bezpośredniego, naczyniopochodnego zrostu kostnego (direct osteonal bone healing) wynosi ok. 1 mm, większa diastaza wymaga gojenia w mechanizmie wtórnym, tj. na podłożu chrzęstnym,

On a molecular level, in the 1st week after fracture there are no differences in the expression of PDGF, TGF- β and FGF-2 in the fracture gap undergoing proper or impaired healing but in the 8th week osteocytes express all these factors in a normally healing fracture while in a nonunion they do not express any of them [37]. It has also been observed that fracture healing is impaired not only by the lack of autogenous stimulation with locally synthesised molecular factors but also by their mechanical removal from the fracture gap (repeated debridement, rinsing drainage, etc.) [38].

FACTORS DISTURBING FRACTURE HEALING

The lack of or damage to precursor cells, impaired chemotaxis and the lack of appropriate physicochemical conditions in the fracture gap, the lack of nutrition and/or inappropriate molecular stimulation are factors which prevent the inflow of progenitors to the fracture gap as well as their proliferation and differentiation into the desired osteoblastic cell lineage.

These situations may result from the lack of, damage to or disturbances of the homing of osteoblast precursors (tissue defects and necrosis, damage to progenitors caused e.g. by prolonged ischaemia, ionising radiation or chemotherapy, disturbed chemotaxis resulting from abnormal expression of SDF-1 or the lack of inflow pathways due to shock and/or damaged microcirculation). As a result of inappropriate physicochemical conditions and/or abnormal molecular stimulation, the progenitor cells differentiate into the chondrocyte or fibroblast lineage, which leads to the development of a pseudoarthrosis.

THE ROLE OF MECHANICAL FACTORS

Separation of fracture fragments (diastasis) or soft-tissue interposition disturbs bone union. As the maximum distance between the fragments of cortical bone allowing for direct osteonal bone healing is approx. 1 mm, a larger diastasis requires secondary endochondral healing, thus increasing the risk of non union [39], especially since it is associated with lower fragment stability, which negatively influences

zwiększając tym samym ryzyko zaburzeń gojenia [39]. Tym bardziej, że wiąże się z nią zmniejszenie stabilności odłamów utrudniając zapewnienie odpowiednich warunków biomechanicznych niezbędnych dla postępu procesów reparacyjnych [40]. O ile w złamaniach ustabilizowanych proces gojenia doprowadza do tworzenia kostniny w 4. tygodniu, to w niestabilizowanym brak zrostu z tworzeniem stawu rzekomego można obserwować wiele miesięcy, a nawet lat od złamania [41]. Tym bardziej, że zachowanie ruchomości o nadmiernej amplitudzie doprowadza do mechanicznego uszkodzenia tworzonych w procesie angiogenezy naczyń krwionośnych, które, zbudowane w początkowym okresie jedynie z pojedynczej warstwy komórek śródbłonkowych, są niezwykle podatne na uszkodzenia mechaniczne. Z kolei niedostateczne odtworzenie mikrokrążenia prowadzi do hipoksji i hiperkapnii w szparze złamania, pozbawiając ją jednocześnie dróg napływu komórek prekursorowych.

ROLA UKRWIENIA W PROCESACH GOJENIA I W ICH ZABURZENIACH

Przerwanie ciągłości tkanki kostnej związane jest nieuchronnie z uszkodzeniem przebiegających w kanałach Haversa naczyń krwionośnych, zakrzepicy anastomoz i okolicznych naczyń towarzyszących, i w konsekwencji do martwicy 5-10-milimetrowych fragmentów w bezpośrednim sąsiedztwie szpary przełomu [42]. Zdewitalizowane fragmenty kości ulegają resorpcji tworząc miejsce dla napływu komórek biorących udział w gojeniu, widoczne w postaci poszerzenia szpary przełomu Rtg wykonanym kilka – kilkanaście dni po urazie.

Strefę niedokrwienia potęguje uszkodzenie okolicznych tkanek miękkich i potencjalnie rozwijające się zakażenie. Również wstrząs, prowadząc do centralizacji krążenia, zmniejsza perfuzję tkanek narządu ruchu, w tym szpary złamania, zwiększając obszar uszkodzenia wywołanego urazem [43,44]. Podobne konsekwencje niesie ze sobą hipotermia [45]. O ile kość jest relatywnie odporna na niedokrwienie [46], to jego przedłużanie się może doprowadzać do trwałych zmian z rozległymi obszarami martwicy i zwiększoną podatnością na zakażenia [47]. Pewną odmianą zaburzeń ukrwienia odłamów kostnych w miejscu złamania jest złamanie wieloodłamowe. Pozbawienie krążenia śródszpikowego odłamu pośredniego zarówno w odcinku proksymalnym, jak i dystalnym, uzależnia go od mało wydolnego krążenia okostnowego zaopatrywanego przez anastomozy z okolicznych tkanek miękkich, zapewniających zaledwie 15-25% krwi napływającej do kości (krążenie śródszpikowe zapewnia 70-80%, a stawowe – pozostałe 5%

the biomechanical conditions necessary for regeneration [40]. In stable fractures, the healing process results in the development of callus in the 4th week after fracture, but in unstable ones the lack of fracture healing and the development of a pseudoarthrosis may be observed many months or even years after injury [41]. Additionally, the excessive mobility causes mechanical damage to the new blood vessels forming as a result of angiogenesis. These vessels initially consist of only one layer of endothelial cells and are thus particularly prone to mechanical damage. In turn, insufficient reconstruction of microcirculation leads to hypoxia and hypercapnia in the fracture gap, while also making the inflow of precursor cells impossible.

THE ROLE OF BLOOD SUPPLY IN BONE HEALING AND NON UNION

Breaking the continuity of bone tissue is inevitably connected with damage to the blood vessels in the Haversian canals, thrombosis of anastomoses and the neighbouring accompanying vessels and, consequently, necrosis of 5-10 mm fragments adjacent to the fracture gap [42]. The devitalised bone fragments are resorbed, making space for the inflow of cells involved in the healing process, which is visible as a widening of the fracture gap on radiographs taken several days after injury.

The region of ischaemia is widened by damage to the neighbouring soft tissues and a possible infection. The centralisation of circulation associated with shock similarly decreases the perfusion of musculoskeletal tissues, including the fracture gap, contributing to a greater extent of the damage resulting from the injury [43,44]. Hypothermia has similar consequences [45]. Even though the bone is relatively resistant to ischaemia [46], prolonged ischaemia may result in persistent changes with extensive necrosis and a higher susceptibility to infections [47]. Comminuted fractures are associated with a certain pattern of disturbed blood supply to fracture fragments. When an intermediate fragment is not supplied by intramedullary circulation both proximally and distally, it relies on poor periosteal circulation supplied by anastomoses from the neighbouring soft tissues which provide only 15-25% of the blood flowing to the bone (with intramedullary circulation providing 70-80% and articular circulation the remaining 5%), resulting in deep ischaemia disturbing the healing processes.

ukrwienia), czego skutkiem jest głębokie niedokrwienie zaburzające procesy gojenia.

Angiogeneza, przywracając perfuzję uszkodzonych tkanek, jest oczywistym czynnikiem warunkującym prawidłowy przebieg procesów naprawczych, i wszelkie jej zaburzenia wpływają na przebieg zrostu kostnego [48-49]. Podobne skutki wywołują wszelkie stany upośledzające perfuzję tkanek, w tym lokalne, takie jak miażdżyca zarostowa tętnic, choroba Bürgera, zakrzepica żył głębokich, przewlekła niewydolność żylna, zespół ciasnoty przedziałów powięziowych i ogólnoustrojowe (hipowolemia, znacznego stopnia niewydolność krążenia), a także niedokrwistość [50-52].

Brak unieruchomienia skutkuje uszkodzaniem odtwarzanych w procesie angiogenezy naczyń krwionośnych. Szczególnie groźne są przemieszczenia rotacyjne i kątowe, w których dochodzi do uszkodzania mikrokrażenia przy pozornie śladowych (w obrazach Rtg) przemieszczeniach [53].

Do zaburzeń ukrwienia szpary złamania prowadzą również wstrząs i hipowolemia. Ponieważ aż 50% dorosłej populacji współczesnych społeczeństw choruje na nadciśnienie tętnicze, u wielu chorych wstrząs, z jego następstwami hemodynamicznymi w postaci przewlekłego upośledzenia ukrwienia tkanek narządu ruchu, bywa nierozpoznawany. Do rozpoznania wstrząsu uprawnia stwierdzenie obniżenia ciśnienia skurczowego do wartości mniejszej niż 90 mmHg lub udokumentowane obniżenie o co najmniej 40 mmHg wartości wyjściowych. Pominięcie drugiej składowej definicji prowadzi do przeoczenia następstw hemodynamicznych urazu maskowanych przez pozornie prawidłowe wartości ciśnienia tętniczego krwi u chorych będących *de facto* w głębokim wstrząsie (np. obniżenie ciśnienia tętniczego z wartości 210/120 do 140/70 mmHg). Stąd wartościowym parametrem oceny wydolności krążenia ogólnoustrojowego jest monitorowanie diurezy godzinowej (<25 ml / godz u chorego bez niewydolności nerek wskazuje na wstrząs) [54].

ZABURZENIA EKSPRESJI REGULATORÓW MOLEKULARNYCH

Spośród intensywnie badanych substancji regulujących proces zrostu kostnego, największe znaczenie mają PDGF (silna chemokina dla MSCs) oraz czynniki wzrostu (IGF, TGF- β , BMP i FGF). Zaburzenie ekspresji któregośkolwiek z nich prowadzi do zaburzeń zrostu kostnego. Stwierdzono brak ekspresji TGF- β , FGF-2, PDGF, BMP 2 i 4 w dojrzałej tkance włóknistej w obrębie szpary złamania w zwierzęcym

Restoring the perfusion of damaged tissues, angiogenesis is obviously a factor responsible for normal reparative processes and any disturbances of perfusion influence bone union [48-49]. Similar consequences are seen in all conditions resulting in abnormal tissue perfusion, including local (peripheral artery disease, Buerger's disease, deep vein thrombosis, chronic venous insufficiency, compartment syndrome) and systemic (hypovolaemia, severe heart failure) ones as well as anaemia [50-52].

The lack of immobilisation results in damage to the blood vessels reconstructed through angiogenesis. Rotational and angular displacement is particularly dangerous as it damages microcirculation even though radiographic assessment shows only minimal displacement [53].

Disturbed blood supply to the fracture gap may be also caused by shock and hypovolaemia. Since nowadays as many as 50% of the adult population have hypertension, shock with its haemodynamic consequences in the form of chronic hypoperfusion of musculoskeletal tissues may remain undiagnosed. Shock is diagnosed when systolic blood pressure is below 90 mmHg or has decreased by at least 40 mmHg as compared with baseline values. When the second component of the definition is ignored, the haemodynamic consequences of injury may be overlooked as they are masked by seemingly normal blood pressure values in patients who are in fact in deep shock (e.g. a decrease in blood pressure from 210/120 to 140/70 mmHg). Consequently, systemic circulation may be successfully assessed by monitoring diuresis per hour (<25 ml per hour in a patient without renal failure indicates shock) [54].

DISTURBED EXPRESSION OF MOLECULAR REGULATORS

Among the regulators of bone healing being the objects of intensive research, the most important are PDGF (a potent chemokine for MSCs) and growth factors (IGF, TGF- β , BMP and FGF). Abnormal expression of any of these compounds leads to disturbed bone union. Lack of expression of TGF- β , FGF-2, PDGF, BMP 2 and 4 was found in the mature fibrous tissue within the fracture gap in an animal model of

modelu zaburzeń zrostu kostnego, jak również zaburzenia ekspresji mRNA dla czynników wzrostu (VEGF, FGF-2), kolagenu typu I-go i osteopontyny w szparach przełomu niegojących się złamań [37,55].

USZKODZENIE I ZABURZENIA FUNKCJI KOMÓREK PREKURSOROWYCH

Mechaniczne uszkodzenie tkanek i ich niedokrwienie są czynnikami powodującymi, w zależności od ciężkości zmian, martwicę lub upośledzenie funkcji komórek prekursorowych. Działanie takie wywiera również wiele substancji chemicznych (nikotyna, toksyny), jak również leki (np. chemoterapeutyki, antybiotyki). Niekorzystny wpływ leków na procesy gojenia i regeneracji został szeroko opisany w literaturze, pozwalając na wyciągnięcie wniosku, że niemal każda substancja, o ile wywiera efekt biologiczny inny niż placebo, bezpośrednio lub pośrednio przyczynia się do zaburzeń gojenia. I tak niekorzystny wpływ na procesy gojenia wywierają wszystkie preparaty cytotoksyczne, gdyż ich działanie polegające na hamowaniu proliferacji i różnicowania komórek szybko dzielących się, jakimi są komórki nowotworowe, ale też i komórki prekursorowe [56]. Efekt cytotoksyczny potęgowany jest stosowaną jednocześnie radioterapią, mającą te same cele (tj. uszkodzenie niskoroznicowanych, szybko dzielących się komórek) [57]. Wiele antybiotyków wywiera niekorzystne działanie w stosunku do procesów gojenia, w tym najczęściej stosowane w profilaktyce i leczeniu złamań otwartych i wykonywanych zabiegów operacyjnych (cefalosporyny, ciprofloksacyna, rifampicyna, makrolidy, tetracykliny i wiele innych) [58-60]. Ich stosowanie wymaga racjonalizacji procesu leczenia, rozważając z jednej strony pozytywny wpływ na zmniejszenie ryzyka rozwoju infekcji, z drugiej – niekorzystnego wpływu na proces gojenia.

Sterydy kory nadnerczy wywierają niekorzystny wpływ zarówno na samą tkankę kostną, prowadząc do jej demineralizacji (osteoporoza posterydowa), jak i upośledzając procesy jej remodelowania i gojenia [61]. Swoje działanie wywierają hamując fosfolipazo-A2, lipooksygenazo- i cyklooksygenazo – zależne wydzielanie prostaglandyn będących mediatorami molekularnymi biorącymi udział w procesie gojenia [62]. Ich szerokie zastosowania w leczeniu chorób układu oddechowego (astma oskrzelowa, przewlekła obturacyjna choroba płuc), chorobach autoimmunologicznych w reumatologii, dermatologii oraz w immunosupresji po przeszczepach narządów powoduje, że niemal 2 miliony osób w Polsce stale lub okresowo używa tych preparatów. Analogicznie, nie-

pseudoarthrosis; moreover, there was disturbed expression of mRNA for the growth factors (VEGF, FGF-2), type I collagen and osteopontin in the fracture gaps with non union [37,55].

DISTURBED FUNCTION OF PROGENITORS AND THEIR DAMAGE

Mechanical damage to tissues and ischaemia are factors causing necrosis of precursor cells or impaired precursor cell function (depending on the severity of changes). A number of chemical compounds (nicotine, toxins) and drugs (e.g. chemotherapy drugs, antibiotics) also exert this effect. The negative influence of drugs on healing and regeneration has been widely described in the literature, leading to the conclusion that almost all substances directly or indirectly contribute to healing disturbances as long as they have a biological effect other than placebo. Consequently, all cytotoxic substances have a negative influence on healing as they inhibit the proliferation and differentiation of rapidly dividing cells, including tumour cells as well as progenitors [56]. The cytotoxic effect is increased due to the simultaneous use of radiotherapy, which is also aimed at damaging poorly differentiated and rapidly dividing cells [57]. Numerous antibiotics negatively influence healing processes; these include the antibiotics most commonly used in the prevention and treatment of open fractures and in surgery (cephalosporins, ciprofloxacin, rifampicin, macrolides, tetracyclines and many other drugs) [58-60]. Treatment with these substances needs to be rationalised, weighing their positive effect in the form of a lower risk of infection against their negative influence on bone healing.

Corticosteroids affect the bone tissue itself, leading to its demineralisation (steroid-induced osteoporosis), and hinder the process of bone remodelling and healing [61]. They act through the inhibition of phospholipase A2-, lipoxygenase- and cyclooxygenase-mediated production of prostaglandins, which are molecular mediators participating in the healing process [62]. Corticosteroids are widely used in the treatment of respiratory diseases (bronchial asthma, chronic obstructive pulmonary disease), autoimmune diseases in rheumatology, dermatology and immunosuppression after organ transplants. Consequently, almost 2 million people in Poland use these drugs temporarily or continuously. The healing process is similarly affected by antihistamines [63].

Similar but less pronounced adverse effects on bone healing are caused by non-steroidal anti-inflammatory drugs, widely used, for instance, as anal-

korzystny wpływ na procesy gojenia wywierają leki przeciwhistaminowe [63].

Podobne, lecz słabiej wyrażone zaburzenia gojenia wywołują niesteroidowe leki przeciwzapalne, szeroko stosowane m.in. jako leki przeciwbólowe [64,65]. Preparaty te zaburzają wiele procesów, w tym angiogenezę i proces remodelowania kości [66]. Heparyny, wiążąc czynniki wzrostu z grupy TGF- β (w tym BMP), zmniejszają ich biodostępność dla procesów reparacyjnych [67]. Ich przewlekłe stosowanie w dużych dawkach może prowadzić do zaburzeń gojenia złamań. Z kolei niekorzystnego wpływu leków antyresorpcyjnych (w tym najczęściej stosowanych bisfosfonianów) na procesy wzrostu kostnego należy upatrywać w hamowaniu resorpcji zdewitalizowanych odłamów kostnych w początkowej fazie gojenia, jak również w procesach remodelowania, czego jednym z negatywnych skutków są złamania atypowe [68-70].

Wykazano również niekorzystny wpływ na gojenie złamań innych grup leków, w tym powszechnie używanych w terapii nadciśnienia tętniczego. Stwierdzono m.in., że captopril zaburza angiogenezę i odkładanie kolagenu, a beta-blokery – gojenie ran poprzez zaburzenie proliferacji fibroblastów [71-73].

ODŻYWIANIE A ZROST KOSTNY

Niedożywienie jest obecnie rzadko spotykane we współczesnych społeczeństwach państw wysoko rozwiniętych, a nadwaga i otyłość stanowią większy problem zdrowotny niż głodzenie. Niemniej jednak w pewnych sytuacjach dochodzić może do zaburzeń gojenia na tle nieprawidłowego odżywiania. Należą do nich zaburzenia odżywiania (wręcz głodzenia) czy nieracjonalne odżywianie dietą niekompletną, ubogą w witaminy, mikro i makroelementy u osób uzależnionych od alkoholu i narkotyków, u chorych psychicznie, nieprzytomnych oraz z demencją starczą. Do zaburzeń odżywiania dochodzi też w przypadku zaburzeń wchłaniania (ostre i przewlekłe zapalenie trzustki, niewydolność wątroby, po resekcjach jelita, z wylonionym odbytem brzuszny) i w chorobach wyniszczających (procesy nowotworowe, ciężkie infekcje) [74]. O ile nikotynie i środkom odurzającym jednoznacznie przypisywany jest negatywny wpływ na przebieg wzrostu kostnego, to wpływ alkoholu jest dwojaki. Co prawda uzależnienie wiąże się z negatywnymi skutkami w postaci niehigienicznego trybu życia, nieracjonalnym żywieniem, znacznym pogorszeniem standardu życia i związanym z nim zwiększonym ryzykiem zapadalności na schorzenia wklajające wzrost, to sam alkohol, jako taki, wywiera pozytywny wpływ na procesy regeneracyjne [75]. Wynika to prawdopodobnie z wysokiej kaloryczności i bar-

gesics [64,65]. They interfere with numerous processes, including angiogenesis and bone remodelling [66]. Heparins, which bind growth factors from the TGF- β group (including BMP), decrease their bioavailability for reparative processes [67]. Their prolonged use at high doses may result in non union. In turn, the negative influence of antiresorptive drugs (including the most commonly used bisphosphonates) on bone union may be explained by the inhibited resorption of devitalised bone fragments at an early stage of healing and in remodelling processes, resulting in such negative consequences as atypical fractures [68-70].

Other groups of drugs have also been shown to have a negative influence on bone union, including those commonly used in the treatment of hypertension. For instance, it has been established that captopril hinders angiogenesis and collagen deposition and beta blockers affect wound healing through disturbed fibroblast proliferation [71-73].

NUTRITION AND BONE UNION

Nowadays, malnutrition is rarely encountered in developed societies as overweight and obesity constitute a larger health problem than starvation. However, in certain situations healing disturbances may result from inappropriate nutrition. This includes eating disorders (even starving oneself) or irrational diets lacking in some nutrients, including vitamins, macronutrients and micronutrients in people addicted to alcohol and illicit drugs, those with mental disorders, unconscious and with senile dementia. Malnutrition may also result from impaired absorption (acute and chronic pancreatitis, liver failure, after bowel resection, in patients with gastrointestinal stomas) and in wasting diseases (cancer, severe infections) [74]. While nicotine and narcotics are seen as unambiguously harmful to bone healing, alcohol may exert a twofold effect. While alcohol addiction is associated with negative consequences such as an unhealthy lifestyle and diet as well as a significantly worse quality of life and, consequently, a higher risk of diseases which contribute to non union, alcohol itself has a positive effect on regeneration [75]. This is probably caused by its high energy value and very good availability of ethanol, which substitutes for energy-rich compounds for reparative processes.

dzo dobrej dostępności etanolu stanowiącego suplementację związków energetycznych dla procesów naprawczych.

ZAKAŻENIE

Zasiedlenie złamania przez szczepy bakteryjne jest czynnikiem w znacznym stopniu zaburzającym zrost kostny [76]. Otwarte złamania są często wikłane zapaleniem tkanki kostnej i szpiku wywołanym patogenami dostającymi się poprzez uszkodzoną skórę zarówno ze środowiska zewnętrznego, jak i stanowiącego własną florę bakteryjną chorego. Lipopolisacharydy bakteryjne wpływają na układ odpornościowy biorący udział w procesach naprawczych, a same bakterie syntetyzują i uwalniają szereg substancji biologicznie czynnych, w tym egzo- i endotoksyn oraz enzymów proteolitycznych trawiących białka macierzy zewnątrzkomórkowej [77,78]. Patogeny swój niekorzystny wpływ przejawiają między innymi upośledzając funkcję osteoblastów zarówno wskutek ich bezpośredniego oddziaływania, jak i poprzez zaburzenia ekspresji czynników wzrostu [79,80]. Zużywając glukozę i tlen, komórki bakteryjne zmieniają środowisko prowadząc do kwasicy, hipoksji i hipoglikemii, ukierunkowując tym samym różnicowanie komórek prekursorowych w kierunku komórek linii chondrocytarnej, nie osteoblastycznej.

CHOROBY METABOLICZNE

Cukrzyca wikła procesy gojenia wskutek zaburzeń dystrybucji i wewnątrzkomórkowej utylizacji glukozy [81]. Znaczne wahania poziomu glikemii prowadzić mogą do powstania przewlekłych, niezwykle trudno gojących się owrzodzeń w przypadku ran tkanek miękkich (stopa cukrzycowa) lub braku zrostu w przypadku złamań, a znaczne obniżenie odporności tkanek na infekcję powoduje, że u chorych z cukrzycą często dochodzi do powikłań bakteryjnych. Ponadto cukrzyca, wpływając na metabolizm komórek progenitorowych, zaburza ich proliferację i migrację do miejsc gojenia złamania, zmniejsza syntezę i uwalnianie białek tworzących macierz zewnątrzkomórkową [82]. Należy jednak nadmienić, że u chorych z prawidłowo prowadzoną cukrzycą, ryzyko powikłań infekcyjnych i zaburzeń gojenia nie jest wyższe niż u osób zdrowych [83].

CZYNNIKI GENETYCZNE USPOSABIAJĄCE DO ZABURZEŃ GOJENIA

Mutacje genów dla białek biorących udział w procesach gojenia korelują z klinicznymi obserwacjami

INFECTION

The colonisation of the fracture gap by bacterial strains significantly hinders bone union [76]. Open fractures are often complicated by osteomyelitis caused by pathogens entering the body through broken skin from the external environment or belonging to the patient's bacterial flora. Bacterial lipopolysaccharides influence the immune system taking part in reparative processes and the bacteria synthesise and release a number of biologically active substances, including exo- and endotoxins as well as proteolytic enzymes degrading extracellular matrix proteins [77,78]. The negative effect of the pathogens includes hindering osteoblast function both through a direct effect and abnormal expression of growth factors [79, 80]. By consuming glucose and oxygen, the bacteria change the environment, leading to acidosis, hypoxia and hypoglycaemia and causing precursor cells to differentiate into the chondrocyte, rather than osteoblast, lineage.

METABOLIC DISEASES

Diabetes complicates healing processes due to the disturbed distribution and intracellular disposal of glucose [81]. Significant changes in the blood glucose level may result in chronic, very poorly healing ulcerations in cases of soft tissue wounds (diabetic foot) or the lack of bone union in cases of fractures. Moreover, markedly decreased tissue immunity to infections often results in bacterial complications in patients with diabetes. Diabetes also affects the metabolism of progenitor cells and their proliferation as well as their migration to the fracture site and decreases the rate of synthesis and release of extracellular matrix proteins [82]. However, it should be noted that the risk of infectious complications and healing disturbances in well-controlled diabetes is not higher than in the healthy population [83].

GENETIC FACTORS PREDISPOSING TO HEALING DISTURBANCES

Mutations in genes coding for the proteins involved in bone healing correlate with clinical obser-

zwiększonego ryzyka wystąpienia zaburzeń zrostu kostnego. Zmiana jednej zasady w genie (single nucleotide polymorphism) może prowadzić do syntezy niepełnowartościowego białka będącego budulcem lub regulatorem czynności komórki. Do mutacji prowadzących do zaburzeń gojenia złamań należą m.in. mutacje genów dla receptora witaminy D (VDR), Runx2 (jego allel A jest związany ze zwiększoną gęstością mineralną kości po menopauzie), kolagenu typu Igo (COLIA1 Sp1; związany ze zwiększoną częstością występowania złamań osteoporotycznych, kolagenu typów II-go i X-go (może to być głównym czynnikiem odpowiedzialnym za zaburzenia zrostu kostnego w cukrzycy), M-CSF, osteoprotegeryny, RANKL (agonista receptora czynnika jądrowego kappa B regulującego aktywację osteoblastów), receptorów dla estrogenów i testosteronu odpowiedzialnych za procesy osteoporozy, remodelowania i gojenia tkanki kostnej, receptora dla androgenów, glikokortykosteroidów, IGF-I [95], BMP-2, IL-1, i wielu innych [84-96]. Do zaburzeń gojenia złamania mogą też predysponować mutacje pojedynczych nukleotydów genów kodujących białka, bezpośrednio niebiorących udziału w procesach gojenia, np. polimorfizm genu dla TLR-4 w pozycji Asp299Gly predysponuje do zaburzeń zrostu kostnego upośledzając rozpoznanie i eliminację patogenów przez układ odpornościowy i tym samym zwiększając szansę ich przetrwania w szparze złamania, prowadząc do bakterio-zależnych zaburzeń gojenia [97]. Szybko rosnąca wiedza na temat czynników genetycznych zaburzających procesy gojenia lub predysponujących do nich, pozwala na wyjaśnienie wielu nieznanych dotąd przyczyn zaburzeń zrostu.

PODSUMOWANIE

Zaburzenia zrostu kostnego, wklajając nawet 10% złamań, stanowią istotny problem terapeutyczny i ekonomiczny. Ich leczenie wymaga znacznie większego wysiłku i nakładów finansowych niż leczenie prawidłowo gojących się złamań. Poznanie mechanizmów prowadzących do zrostu kostnego oraz mechanizmów jego zaburzeń jest podstawowym czynnikiem umożliwiającym podejmowanie prawidłowych decyzji diagnostycznych i terapeutycznych pozwalających zmniejszyć ryzyko ich wystąpienia. Wymaga ono zaakceptowania faktu, że w swojej istocie proces gojenia jest procesem biologicznym wymagającym współdziałania wielu elementów komórkowych regulowanych czynnikami molekularnymi, zachodzącym w sprzyjającym środowisku. Istotą gojenia złamania jest rekrutacja, aktywacja i ukierunkowanie różnicowania komórek progenitorowych w kierunku komórek linii osteoblastycznej. Dostęp-

vations of an increased risk of non union. A change within one nucleobase in a gene (single nucleotide polymorphism) may lead to the synthesis of a deficient protein building or regulating the function of a cell. Mutations causing non union include mutations in the vitamin D receptor gene (VDR), RUNX2 (whose A allele is associated with increased mineral bone density in post-menopausal women), type I collagen (COLIA1 Sp1; associated with increased incidence of osteoporotic fractures), type II and X collagen (this may be the main factor responsible for non union in diabetes), M-CSF, osteoprotegerin, RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa B, which regulates osteoblast activation), receptors for oestrogens and testosterone responsible for the process of osteoporosis and bone tissue remodelling and healing, receptors for androgens, glucocorticoids, IGF-I, BMP-2, IL-1 and many other [84-96]. Patients may be also predisposed to non union due to mutations of single nucleotides in genes encoding proteins not directly involved in fracture healing, e.g. the Asp299Gly TLR4 gene polymorphism predisposes to impaired healing as it hinders the identification and elimination of pathogens by the immune system, which increases their chances of surviving in the fracture gap [97]. The rapidly increasing knowledge about the genetic factors disturbing bone healing or predisposing to non union is instrumental in explaining many previously unknown causes of abnormal fracture healing.

CONCLUSION

Complicating as many as 10% of fractures, non union is an important therapeutic and economic problem. Its treatment requires much more effort and financial input than the treatment of properly healing fractures. The identification of the mechanisms of bone union and its disturbances is the basis for making appropriate diagnostic and therapeutic decisions which help limit the risk of pseudoarthrosis. For this purpose, it is necessary to realise that bone healing is essentially a biological process involving the concerted activity of many cellular components regulated by molecular factors and that it takes place in a supportive environment. Bone union ultimately relies on the recruitment, activation and differentiation of progenitors into the osteoblastic cell lineage. The available study results indicate that this process involves hundreds (if not thousands) of elements, as reflected in the expression of thousands of genes in

ne wyniki badań wskazują, że jest to proces, na który składa się wiele – setki, jeśli nie tysiące – składowych, co znajduje swoje odzwierciedlenie w tysiącach ekspresjonowanych w szparze złamania genów. Rola produktów wielu tych genów pozostaje nieznana, jednak bazując na dotychczas zdobytej wiedzy i fakcie, że genom człowieka składa się ze skończonej liczby genów można przypuszczać, że wraz z postępem badań dojdzie do pełnego zrozumienia procesów zachodzących podczas prawidłowo postępującego i zaburzonego gojenia złamania, i że zostaną opracowane skuteczne metody zapobiegania zaburzeniom zrostu kostnego i korekcji skutków ich wystąpienia.

Należy uświadomić sobie, że każdy człowiek w wyniku ewolucji otrzymał uniwersalne mechanizmy naprawcze umożliwiające mu gojenie powstałych ran i złamań. Mechanizmy te są aktywowane i regulowane przez elementy zaliczane do układu odpornościowego, stąd niezwykle istotna rola fazy reaktywnej (zapalnej) inicjującej i regulującej proces gojenia. Skuteczność tych mechanizmów jest niezwykła – pozwala przetrwać zarówno stałą inwazję patogenów, jak i goić lub regenerować tkanki uszkodzone w wyniku urazów. Ponieważ zdecydowana większość chorych z zaburzeniami zrostu kostnego nie wykazywała jakichkolwiek cech zaburzeń kostnienia w okresie rozwojowym, należy przypuszczać, że za wystąpienie zaburzeń gojenia odpowiedzialne są czynniki uniemożliwiające prawidłowy przebieg mechanizmów naprawczych, a nie brak lub ich genetyczne uszkodzenie. Celem postępowania lekarskiego powinno być zatem zapewnienie optymalnych warunków dla prawidłowego gojenia, do których zaliczane są w pierwszym rzędzie zapewnienie kontaktu między odłamami, odpowiedniego oraz odpowiednio długiego ich unieruchomienia, zapewnienie ukrwienia odłamów i ich pokrycia żywymi tkankami miękkimi, przy zapewnieniu prawidłowego odżywiania chorego. Ważne jest również powstrzymanie się od nieracjonalnego stosowania diagnostyki i leczenia zaburzających gojenie, spośród których szczególną uwagę należy zwrócić na promieniowanie rentgenowskie (zbyt często powtarzane badania Rtg, a zwłaszcza CT) i preparaty farmakologiczne.

Wystąpienie niepowodzeń leczenia złamań kości wynika w zdecydowanej większości z braku spełnienia powyższych warunków. Należy do nich dołączyć niedokrwienie i martwicę odłamów, przewlekłą niewydolność hemodynamiczną oraz nieodpowiednie postępowanie terapeutyczne z szerokim odszkieletowaniem odłamów czy brutalną techniką operacyjną, brak lub nieskuteczne unieruchomienie, niedobór substratów dla komórek regenerujących i ich uszkodzenie przez postępowanie terapeutyczne. Jedynie w niewiel-

the fracture gap. The role of the products of many of these genes remains unknown; however, based on current knowledge and the awareness that the human genome consists of a finite number of genes, it can be assumed that future research will allow us to fully understand the processes taking place during normal and disturbed bone union and that efficient methods preventing non union and treating its consequences will be developed.

We need to understand that evolution has equipped each person with universal reparatory mechanisms to enable the healing of wounds and fractures. These mechanisms are activated and regulated by components of the immune system; hence the crucial role of the reactive (inflammatory) phase, which initiates and regulates bone union. The effectiveness of these mechanisms is astonishing as it allows for surviving a constant attack of pathogens as well as for healing and regenerating tissues damaged due to injury. Seeing that the vast majority of patients with non union did not show any evidence of ossification disorders in childhood and adolescence, non union is probably caused by factors disturbing the normal reparatory mechanisms rather than by their absence or genetic damage. Treatment should thus be aimed at ensuring optimal conditions for normal healing, mainly maintaining contact between the fragments, appropriate immobilisation over a required period, and ensuring that the fragments receive adequate blood supply and are covered with viable soft tissues while making sure the patient has a good nutrition status. It is also important to avoid irrational use of diagnostic methods and treatments that disturb bone healing, particularly X-ray-based imaging (too frequent roentgenographic examinations, especially CT) and drugs.

The vast majority of cases of non union occur when these requirements are not met. The list should also include ischaemia and necrosis of the fragments, chronic haemodynamic insufficiency and inappropriate treatment with wide fragment separation or violent surgical techniques, the lack of or ineffective immobilisation and deficiency of substrates for regenerative cells and iatrogenic damage to the cells. Non union results from congenital predispositions in a small percentage of patients; even in these cases, genetic factors usually only increase the risk of bone union complications and are not their direct cause.

kim odsetku przypadków do zaburzeń zrostu może dochodzić wskutek wrodzonych predyspozycji, ale nawet w tych przypadkach rola czynnika genetycznego najczęściej ogranicza się do zwiększonej predyspozycji wystąpienia powikłań wklajających proces gojenia niż do ich bezpośredniego wywołania.

PIŚMIENICTWO / REFERENCES

1. Bielby R, Jones E, McGonagle D. The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone. *Injury Int J Care Injured* 2007; 38: 26-32.
2. Prockop DJ, Gregory CA, Spees JL. One strategy for cell and gene therapy: Harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. *PNAS* 2003; 100 (suppl. 1): 11917-23.
3. Lau K, Paus R, Tiede S, Day P, Bayat A. Exploring the role of stem cells in cutaneous wound healing. *Exp Dermatol* 2009; 18 (11): 921-33.
4. Danoviz ME, Yablonka-Reuveni Z. Skeletal muscle satellite cells: background and methods for isolation and analysis in a primary culture system. *Methods Mol Biol* 2012; 798: 21-52.
5. Yamanishi H, Fujiwara S, Soma T. Perivascular localization of dermal stem cells in human scalp. *Exp Dermatol* 2012; 21 (1): 78-80.
6. Charbord P. Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts. *Hum Gene Ther* 2010; 21 (9): 1045-56.
7. Mara CS, Sartori AR, Duarte AS, Andrade AL, Pedro MA, Coimbra IB. Periosteum as a source of mesenchymal stem cells: the effects of TGF- β 3 on chondrogenesis. *Clinics (Sao Paulo)* 2011; 66 (3): 487-92.
8. Philips BJ, Marra KG, Rubin JP. Adipose stem cell-based soft tissue regeneration. *Expert Opin Biol Ther* 2012; 12 (2): 155-63.
9. Post S, Goumans MJ, Doevendans PA. Peripheral blood derived cell trafficking for cardiac regeneration. *Curr Stem Cell Res Ther* 2010; 5 (4): 303-13.
10. Kucia M, Ratajczak J, Reca R, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Tissue-specific muscle, neural and liver stem/progenitor cells reside in the bone marrow, respond to an SDF-1 gradient and are mobilized into peripheral blood during stress and tissue injury. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2004; 3: 52-7.
11. Devine MJ, Mierisch CM, Jang E, Anderson PC, Balian G. Transplanted bone marrow cells localize to fracture callus in a mouse model. *Journal of Orthop Res* 2002; 20: 1232-9.
12. Erices A, Conget P, Rojas C, Minguell JJ. gp130 Activation by Soluble Interleukin-6 Receptor/Interleukin-6 Enhances Osteoblastic Differentiation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Exp Cell Res* 2001; 280: 24-32.
13. Rabbany SY, Heissig B, Hattori K, Rafii S. Molecular pathways regulating mobilization of marrow-derived stem cells for tissue revascularization. *TRENDS in Molecular Med* 2003; 9 (3): 109-13.
14. Long MW. Stem Cell Plasticity: Molding the Future of Tissue development and Repair. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2001; 27 (3): 586-9.
15. Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: the diamond concept. *Injury* 2007; 38 (Suppl. 4): 3-6.
16. Thompson Z, Miclau T, Hu D, Helms JA. A model for intramembranous ossification during fracture healing. *J Orthop Res* 2002; 20 (5): 1091-8.
17. Bland YS, Critchlow MA, Ashhurs DE. The expression of the fibrillar collagen genes during fracture healing: heterogeneity of the matrices and differentiation of the osteoprogenitor cells. *Histochemical J* 1999; 31: 797-809.
18. Kolar P, Gaber T, Perka C, Duda GN, Buttgerit F. Human early fracture hematoma is characterized by inflammation and hypoxia. *Clin Orthop Relat Res* 2011; 469 (11): 3118-26.
19. Grayson WL, Zhao F, Bunnell B, Ma T. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Bioch Biophys Res Commun* 2007; 358: 948-53.
20. Onuoha GN. Circulating sensory peptide levels within 24 h of human bone fracture. *Peptides* 2001; 22 (7): 1107-10.
21. Szczęsny G. Molecular aspects of bone healing and remodeling. *Pol J Pathol* 2002; 53 (3): 145-53.
22. Fu S, Liesveld. Mobilization of hematopoietic stem cells. *Blood Rev* 2000; 14: 205-18.
23. Mayani H, Alvarado-Moreno JA, Flores-Guzma'n P. Biology of Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Present in Circulation. *Arch Medical Res* 2003; 34: 476-88.
24. Hadjiargyrou M, Lombardo F, Zhao S, et al. Transcriptional profiling of bone regeneration. Insight into the molecular complexity of wound repair. *J Biol Chem* 2002; 277 (33): 30177-82.
25. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology. Part I: structure, blood supply, cells, matrix and mineralisation. *J Bone Joint Surg* 1995; 77-A: 1256-75.
26. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology. Part II: formation, form, remodelling and regulation of cell function. *J Bone Joint Surg* 1995; 77-A: 1276-89.
27. Bala Y, Depalle B, Douillard T, et al. Respective roles of organic and mineral components of human cortical bone matrix in micromechanical behavior: An instrumented indentation study. *J Mech Behav Biomed Mater* 2011; 4 (7): 1473-82.
28. Gollub EE. Role of Matrix Vesicles in Biomineralization. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1790 (12): 1592-8.
29. Mahamid J, Sharir A, Gur D, Zelzer E, Addadi L, Weiner S. Bone mineralization proceeds through intracellular calcium phosphate loaded vesicles: A cryo-electron microscopy study. *J Structural Biol* 2011; 174 (3): 527-35.

30. Nahar NN, Missana LR, Garimella R, Tague SE, Anderson HC. Matrix vesicles are carriers of bone morphogenetic proteins (BMPs), vascular endothelial growth factor (VEGF), and noncollagenous matrix proteins. *J Bone Min Metabolism* 2008; 26 (5): 514 -9.
31. Wuthier RE, Lipscomb GF. Matrix vesicles: structure, composition, formation and function in calcification. *Front Biosci* 2011; 17: 2812-902.
32. Balcerzak M, Hamade E, Zhang L, et al. The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process. *Acta Biochim Pol* 2003; 50 (4): 1019-38.
33. Nudelman F, Pieterse K, George A, et al. The role of collagen in bone apatite formation in the presence of hydroxyapatite nucleation inhibitors. *Nat Mater* 2010; 9 (12): 1004-9.
34. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem* 2003; 88: 873-84.
35. Szczęsny G, Olszewski WL, Górecki A. Lymphoscintigraphic monitoring of the lower limb lymphatic system response to bone fracture and healing. *Lymphat Res Biol* 2005; 3 (3): 137-45.
36. Szczęsny G, Olszewski WL, Gewartowska M, Zaleska M, Górecki A. The healing of tibial fracture and response of the local lymphatic system. *J Trauma* 2007; 63 (4): 849-54.
37. Brownlow HC, Reed A, Simpson AH. Growth factor expression during the development of atrophic non-union. *Injury* 2001; 32: 519-24.
38. Park SH, Silva M, Bahk WJ, McKellop H, Lieberman JR. Effect of repeated irrigation and debridement on fracture healing in an animal model *Journal of Orthop Res* 2002; 20 (6): 1197-204.
39. Mehta M, Schell H, Schwarz C, et al. A 5-mm femoral defect in female but not in male rats leads to a reproducible atrophic non-union. *Arch Orthop Trauma Surg* 2011; 131 (1): 121-9.
40. Jagodzinski M, Krettek C. Effect of mechanical stability on fracture healing – an update. *Injury, Int J Care Injured* 2007; 38: 3-10.
41. Szczęsny G, Olszewski WL, Gewartowska M, Zaleska M, Górecki A. The healing of tibial fracture and response of the local lymphatic system. *J Trauma* 2007; 63 (4): 849-54.
42. Lane JM. *Fracture Healing*. New York: Churchill Livingstone; 1987.
43. Skjeldal S, Groggaard B, Reikerås O, Müller C, Torvik A, Svindland A. Model for skeletal muscle ischemia in rat hindlimb – evaluation of reperfusion and necrosis. *Eur Surg Res* 1991; 23: 355-65.
44. Kirkeby OJ, Berg LT. Regional blood flow and strontium-85 incorporation rate in the rat hindlimb skeleton. *J Orthop Res* 1991; 9: 862-8.
45. Szczęsny G, Veihelmann A, Massberg S, Nolte D, Messmer K. Long-term anaesthesia using inhalatory isoflurane in different strains of mice-the haemodynamic effects. *Lab Anim* 2004; 38 (1): 64-9.
46. Starr AJ, Welch RD, Eastridge BJ, Pierce W, Zhang H. The effect of hemorrhagic shock in a caprine tibial fracture model. *J Orthop Trauma* 2002; 16 (4): 250-6.
47. Hausman MR, Rinker BD. Intractable wounds and infections: the role of impaired vascularity and advanced surgical methods for treatment. *Am J Surg* 2004; 187 (5A): 44-55.
48. Street J, Winter D, Wang JH, Wakai A, McGuinness A, Redmond HP. Is human fracture hematoma inherently angiogenic? *Clin Orthop* 2000; 378: 224-37.
49. Brownlow HC, Reed A, Simpson AH. The vascularity of atrophic non-unions. *Injury* 2002; 33 (2): 145-50.
50. Battaglia TC, Armstrong DG, Schwend RM. Factors affecting forearm compartment pressures in children with supracondylar fractures of the humerus. *J Pediatr Orthop* 2002; 22 (4): 431-9.
51. Wichmann MW, Arnoczky SP, DeMaso CM, Ayala A, Chaudry IH. Depressed osteoblast activity and increased osteocyte necrosis after closed bone fracture and hemorrhagic shock. *J Trauma* 1996; 41 (4): 628-33.
52. Gruson KI, Aharonoff GB, Egol KA, Zuckerman JD, Koval KJ. The relationship between admission hemoglobin level and outcome after hip fracture. *J Orthop Trauma* 2002; 16 (1): 39-44.
53. Szczęsny G. Analysis of the influence of bone fragment displacement in long bone fractures on interfragmentary contact surface. *Pol Orthop Traumatol* 2012; 77: 151-5.
54. Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest* 1992; 101 (6): 1481-3.
55. Fang TD, Nacamuli RP, Song HM, et al. Creation and characterization of a mouse model of mandibular distraction osteogenesis. *Bone* 2004; 34: 1004-12.
56. Mavrogenis AF, Papagelopoulos PJ, Romantini M, Angelini A, Ruggieri P. Side effects of chemotherapy in musculoskeletal oncology. *J Long Term Eff Med Implants* 2010; 20 (1): 1-12.
57. Mavrogenis AF, Papagelopoulos PJ, Romantini M, Guerra G, Ruggieri P. Side effects of radiation in musculoskeletal oncology. *J Long Term Eff Med Implants* 2009; 19 (4): 287-304.
58. Isefuku S, Joyner CJ, Simpson AH. Toxic effect of rifampicin on human osteoblast-like cells. *J Orthop Res* 2001; 19 (5): 950-4.
59. Keller DC, Carano A. Tetracycline effect on osteoclastic and osteoblastic activity. *Gen Dent* 1995; 43 (1): 60-3.
60. Huddleston PM, Steckelberg JM, Hanssen AD, Rouse MS, Bolander ME, Patel R. Ciprofloxacin inhibition of experimental fracture healing. *J Bone Joint Surg Am* 2000; 82 (2): 161-73.
61. Adler RA, Funkhouser HL, Petkov VI, Berger MM. Glucocorticoid-induced osteoporosis in patients with sarcoidosis. *Am J Med Sci* 2003; 325 (1): 1-6.
62. Waters RV, Gamradt SC, Asnis P, et al. Systemic corticosteroids inhibit bone healing in a rabbit ulnar osteotomy model. *Acta Orthop Scand* 2000; 71 (3): 316-21.

63. Numata Y, Terui T, Okuyama R, et al. The accelerating effect of histamine on the cutaneous wound-healing process through the action of basic fibroblast growth factor. *J Invest Dermatol* 2006; 126 (6): 1403-9.
64. Vuolteenaho K, Moilanen T, Moilanen E. Non-steroidal anti-inflammatory drugs, cyclooxygenase-2 and the bone healing process. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008; 102 (1): 10-4.
65. Goodman S, Ma T, Trindade M, et al. COX-2 selective NSAID decreases bone ingrowth in vivo. *J Orthop Res* 2002; 20 (6): 1164-9.
66. O'Connor JP, Capo JT, Tan V, et al. A comparison of the effects of ibuprofen and rofecoxib on rabbit fibula osteotomy healing. *Acta Orthop* 2009; 80 (5): 597-605.
67. Rider CC. Heparin/heparan sulphate binding in the TGF-beta cytokine superfamily. *Biochem Soc Trans* 2006; 34 (Pt 3): 458-60.
68. Lynch JR, Taitsman LA, Barei DP, Nork SE. Femoral nonunion: risk factors and treatment options. *J Am Acad Orthop Surg* 2008; 16 (2): 88-97.
69. Kidd LJ, Cowling NR, Wu AC, Kelly WL, Forwood MR. Bisphosphonate treatment delays stress fracture remodeling in the rat ulna. *J Orthop Res* 2011; 29 (12): 1827-33.
70. Schilcher J, Koeppe V, Aspenberg P, Michaëlsson K. Risk of atypical femoral fracture during and after bisphosphonate use. *N Engl J Med* 2014; 371 (10): 974-6.
71. Jugdutt BI, Khan MI, Jugdutt SJ, Blinston G. Combined captopril and isosorbide dinitrate during healing after myocardial infarction. Effect on ventricular remodeling, function, mass and collagen. *J Am Coll Cardiol* 1995; 25 (5): 1089-96.
72. Qiu JG, Factor S, Chang TH, Knighton D, Nadel H, Levenson SM. Wound healing: captopril, an angiogenesis inhibitor, and *Staphylococcus aureus* peptidoglycan. *J Surg Res* 2000; 92 (2): 177-85.
73. Cunliffe I, McIntyre C, Rees R, Rennie I. The effect of topical beta-blocker medications on the proliferation and viability of human Tenon's capsule fibroblasts in tissue culture. *Ger J Ophthalmol* 1995; 4 (3): 167-74.
74. Day SM, DeHeer DH. Reversal of the detrimental effects of chronic protein malnutrition on long bone fracture healing. *J Orthop Trauma* 2001; 15 (1): 47-53.
75. Jugdaohsingh R, O'Connell MA, Sripanyakorn S, Powell JJ. Moderate alcohol consumption and increased bone mineral density: potential ethanol and non-ethanol mechanisms. *Proc Nutr Soc* 2006; 65 (3): 291-310.
76. Lynch JR, Taitsman LA, Barei DP, Nork SE. Femoral nonunion: risk factors and treatment options. *J Am Acad Orthop Surg* 2008; 16 (2): 88-97.
77. Nolan B, Duffy A, Paquin L, et al. Mitogen-activated protein kinases signal inhibition of apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated neutrophils. *Surgery* 1999; 126 (2): 406-12.
78. Schmidtchen A, Holst E, Tapper H, Björck L. Elastase-producing *Pseudomonas aeruginosa* degrade plasma proteins and extracellular products of human skin and fibroblasts, and inhibit fibroblast growth. *Microb Pathog* 2003; 34 (1): 47-55.
79. Williams RJ, Henderson B, Nair SP. *Staphylococcus aureus* Fibronectin Binding Proteins A and B Possess a Second Fibronectin Binding Region That May Have Biological Relevance to Bone Tissues. *Calcif Tissue Int* 2002; 70 (5): 416-21.
80. Pascu C, Ljungh A, Wadstrom T. *Staphylococci* bind heparin-binding host growth factors. *Curr Microbiol* 1996; 32 (4): 201-7.
81. Roszer T. Inflammation as death or life signal in diabetic fracture healing. *Inflamm Res* 2011; 60 (1): 3-10.
82. Stolzing A, Sellers D, Llewelyn O, Scutt A. Diabetes induced changes in rat mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs* 2010; 191 (6): 453-65.
83. Norris R, Parker M. Diabetes mellitus and hip fracture: a study of 5966 cases. *Injury* 2011; 42 (11): 1313-6.
84. Miyamoto KI, Kesterson RA, Yamamoto H, et al. Structural organization of the human Vitamin D receptor chromosomal gene and its promotor. *Mol Endocrinol* 1997; 11: 1165-79.
85. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Van Leeuwen H, Pols HA. Vitamin D receptor gene polymorphisms in relation to Vitamin D related disease states. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; 89-90: 187-93.
86. Vaughan T, Pasco JA, Kotowicz MA, Nicholson GC, Morrison NA. Alleles of RUNX2/CBFA1 gene are associated with differences in bone mineral density and risk of fracture. *J Bone Miner Res* 2002; 17 (8): 1527-34.
87. Vaughan T, Reid DM, Morrison NA, Ralston SH. RUNX2 alleles associated with BMD in Scottish women; interaction of RUNX2 alleles with menopausal status and body mass index. *Bone* 2004; 34 (6): 1029-36.
88. Mann V, Ralston SH. Meta-analysis of COL1A1 Sp1 polymorphism in relation to bone mineral density and osteoporotic fracture. *Bone* 2003; 32 (6): 711-7.
89. Pluijm SM, van Essen HW, Bravenboer N, et al. Collagen type I alpha1 Sp1 polymorphism, osteoporosis, and intervertebral disc degeneration in older men and women. *Ann Rheum Dis* 2004; 63 (1): 71-7.
90. Gooch HL, Hale JE, Fujioka H, Balian G, Hurwitz SR. Alterations of cartilage and collagen expression during fracture healing in experimental diabetes. *Connect Tissue Res* 2000; 41: 81-91.
91. Efsthadiadou Z, Tsatsoulis A, Ioannidis JP. Association of collagen Ialpha 1 Sp1 polymorphism with the risk of prevalent fractures: a meta-analysis. *J Bone Miner Res* 2001; 16 (9): 1586-92.
92. Uitterlinden AG, Burger H, Huang Q, et al. Relation of alleles of the collagen Type Ialpha1 gene to bone density and the risk of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1998; 338: 1016-21.
93. Ioannidis JP, Stavrou I, Trikalinos TA, et al. ER-alpha Genetics Meta-Analysis. Association of polymorphisms of the estrogen receptor alpha gene with bone mineral density and fracture risk in women: a meta-analysis. *J Bone Miner Res*. 2002; 17 (11): 2048-60.
94. Langdahl BL, Stenkjaer L, Carstens M, Tofteng CL, Eriksen EF. A CAG repeat polymorphism in the androgen receptor gene is associated with reduced bone mass and increased risk of osteoporotic fractures. *Calcif Tissue Int* 2003; 73 (3): 237-43.

95. Rivadeneira F, Houwing-Duistermaat JJ, Beck TJ, et al. The Influence of an Insulin-Like Growth Factor I Gene Promoter Polymorphism on Hip Bone Geometry and the Risk of Nonvertebral Fracture in the Elderly: The Rotterdam Study. *J Bone Miner Res* 2004; 19 (8): 1280-90.
96. Asensi V, Alvarez V, Valle E, et al. IL-1 alpha (-889) promoter polymorphism is a risk factor for osteomyelitis. *Am J Med Genet* 2003; 119A (2): 132-6.
97. Szczęsny G, Olszewski WL, Zagozda M, et al. Genetic factors responsible for long bone fractures non-union. *Arch Orthop Trauma Surg* 2011; 131 (2): 275-81.

Liczba słów/Word count: 11392

Tabele/Tables: 0

Ryciny/Figures: 0

Piśmiennictwo/References: 97

Adres do korespondencji / Address for correspondence

Grzegorz Szczęsny

Klinika Ortopedii i Traumatologii Narządu Ruchu, Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Lindleya 4, 02-005 Warszawa, Poland, tel. 501167475, e-mail 501167475@orange.pl

Otrzymano / Received

24.02.2015 r.

Zaakceptowano / Accepted

13.04.2015 r.