Ortopedia *Traumatologia* **Rehabilitacja**
Vol. 7, Nr 4, 2005, 351-360

Krzysztof H. Włodarski[1], Ryszard Galus[1,2]

[1] Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Centrum Biostruktury, Akademia Medyczna, Warszawa
[2] Klinika Dermatologiczna, Centralny Szpital Kliniczny Ministerstwa Obrony Narodowej, Warszawa

Histologiczne aspekty procesu gojenia złamań kości

Histological aspects of bone fracture healing

Słowa kluczowe: *gojenie złamań, histogeneza, regulacja, prostaglandyny*
Key words: *bone fracture healing, histogenesis, regulation, prostaglandins*

SUMMARY

Bone fracture healing is a multistep phenomenon leading to full restoration of the damaged tissue. It replicates the events that happen during endochondral bone formation in prenatal life. The mechanisms which control bone fracture healing are basically the same as those regulating bone formation in the embryo.

For bone fracture healing the first phase is the most important, i.e. blood clot formation, followed by the inflammatory reaction. During this phase the platelet-derived growth factors (PDGF), released from the blood clot and from the inflammatory cells, recruit and activate mesenchymal cells to differentiate into cartilage-forming cells. The hyaline cartilage thus formed is the scaffolding for endochondral osteogenesis.

Periosteal cells also participate in hyaline cartilage formation.

Endochondrally-formed bone (primary bone) is woven bone and has poor mechanical properties. It is replaced by lamellar bone by the process of 'bone modelling'. Primary bone trabeculae are resorbed by osteoclasts whilst mesenchymal-derived osteoblasts synthetise osteoid for bone lamellae (secondary bone).

The stromal cells of bone marrow are an additional source of bone forming cells capable of differentiating into osteoblasts.

The application of non steroid anti- inflammatory drugs (NSAID) impairs the early inflammatory phase and delayes bone fracture healing, by inhibiting the formation of prostaglandins – one of many factors which activate both osteoblasts and osteoclasts.

STRESZCZENIE

Proces gojenia się złamań kości jest procesem regeneracyjnym, prowadzącym do odtworzenia narządu do stanu przed urazem. Jest to proces wieloetapowy, będący w istocie odtworzeniem u osobnika dorosłego histogenezy kości w okresie płodowym.

W procesie naprawczym złamania kości dochodzi do powstania krwiaka i reakcji zapalnej, którym towarzyszy rekrutacja komórek mezenchymatycznych. Komórki te, pod wpływem m. in. uwalnianych z płytek krwi czynników wzrostu PDGF, proliferują i różnicują w chrząstkę szklistą, która stanowi podłoże dla kostnienia endochondralnego. Kostnienie to przebiega tak samo, jak kostnienie w obrębie chrząstki nasadowej. Dodatkowo, uszkodzona urazem błona okostnowa także wytwarza chrząstkę szklistą oraz kość splotowatą.

Chrząstka szklista ulega hypertrofi i mineralizacji, lecz wytwarza czynniki naczyniotwórcze, dzięki czemu w jej zmineralizowane obszary wnikają naczynia. Naczynia te doprowadzają m. in. komórki resorbujące macierz chrzęstną oraz nowe komórki mezenchymatyczne, które różnicują się do osteoblastów i na resztkach zmineralizowanej macierzy chrzęstnej odkładają osteoid. W ten sposób powstają pierwotne beleczki kości splotowatej.

W dalszych etapach gojenia złamań beleczki te ulegają resorpcji i zostają zastępowane przez nowopowstającą, przez osteoblasty różnicujące się z komórek mezenchymatycznych, kość blaszkowatą o lepszych parametrach mechanicznych niż kość splotowata.

W procesach osteogenezy naprawczej biorą udział także komórki zrębowe szpiku, zdolne do różnicowania się w osteoblasty.

Stosowanie leków przeciwzapalnych hamuje fazę reakcji zapalnej złamania i przez to upośledza jego gojenie.

Omówiono ogólnie udział i stosowanie czynników wzrostu w poszczególnych fazach gojenia złamań.

Gojenie się urazu kości, jakim jest złamanie, jest wieloetapowym procesem, prowadzącym do regeneracji kości, czyli odtworzenia stanu przed złamaniem. Jest to więc proces zasadniczo różniący gojenie się złamań kości od gojenia zranień innych tkanek, które prowadzą do wytworzenia w miejscu urazu blizny łącznotkankowej, nieprzybierającej cech uszkodzonej tkanki.

Zasadniczo wyróżnia się 4, zachodzące na siebie, fazy gojenia złamania kości. Są to:

1) faza zapalna (uszkodzenie pierwotne)
2) faza kostniny miękkiej (faza chrzęstna)
3) faza kostniny twardej (faza mineralizacji)
4) faza przebudowy kostniny twardej.

Z punktu widzenia klinicznego, decydujące znaczenie dla prawidłowego przebiegu gojenia się urazu kości ma pierwsza faza zapalna. Zaburzenia w obrębie tej fazy są bowiem główną przyczyną opóźnienia lub braku gojenia się złamania.

I FAZA ZAPALNA (USZKODZENIE PIERWOTNE)

Faza ta trwa kilka dni i cechuje ją powstanie krwiaka pourazowego oraz pojawienie się komórek charakterystycznych dla reakcji zapalnej: leukocytów polimorficznych i makrofagów, odpowiedzialnych za fagocytozę uszkodzonych tkanek, komórek tucznych, których przypuszczalna rola polega na wydzielaniu histaminy – czynnika rozszerzającego drobne naczynia i ułatwiającego neoangiogenezę i być może partycypujących w procesie wiązania jonów wapnia. Podczas tej fazy uaktywniają się osteoklasty, resorbujące martwą (wskutek przerwania ciągłości naczyń) tkankę kostną.

Krwiak, będący agregatem płytek krwi, erytrocytów i włóknika, stanowi obfite źródło czynnika wzrostu (płytkopochodnego czynnika wzrostu – PDGF), będącego bardzo silnym aktywatorem proliferacji komórek mezenchymatycznych (tzw. „hormon gojenia się ran").

Uwalniany z wynaczynionych płytek krwi PDGF powoduje mobilizację macierzystych komórek mezenchymatycznych i ich proliferację oraz różnicowanie w kierunku komórek chondro- i osteogennych. Usuwanie krwiaka, o ile nie doszło do jego zakażenia, upośledza więc gojenie złamania.

Czynniki wzrostu aktywują także angiogenezę, a więc powstawanie naczyń włosowatych, penetrujących kostninę miękką.

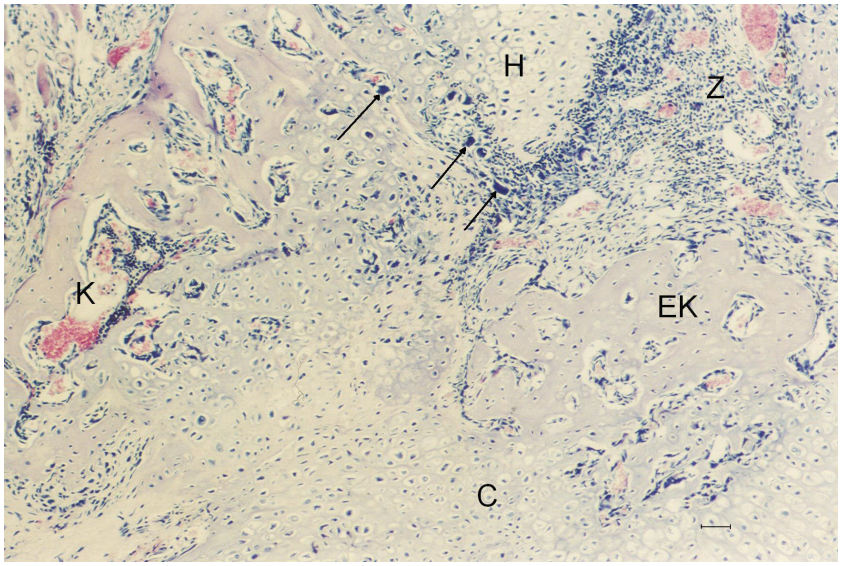
II FAZA KOSTNINY MIĘKKIEJ

Dominującą cechą tej fazy jest powstawanie chrząstki szklistej. Tkanka ta powstaje z dwóch źródeł – z pobudzonej czynnikami wzrostu błony okostnowej (należy przypomnieć, że błona okostnowa powstała z przekształcenia się w okresie prenatalnego rozwoju kości błony ochrzęstnowej, posiada więc w swojej warstwie kambialnej komórki, które zachowały pamięć o swej przeszłości chondrogennej oraz z różnicujących się komórek mezenchymatycznych, istotnego elementu Fazy I [1,2].

Nowopowstałe naczynia krwionośne penetrują kostninę miękką zewnętrzną, wytwarzaną przez pobudzoną urazem błonę okostnową, jak i kostninę wewnętrzną, wytwarzaną z różnicujących się komórek mezenchymatycznych. Inwazja naczyń w obszary dojrzewającej chrząstki szklistej, której macierz ulega uwapnieniu warunkuje proces powstawania kości na podłożu chrzęstnym, tzw. osteogenezę endochondralną lub śródchrzęstną. Istotą tego procesu jest różnicowanie się komórek o potencjale kościotwórczym, doprowadzanych przez naczynia, penetrujące obszary dojrzałej chrząstki (tzw. chrząstki hypertroficznej). Chrząstka ta cechuje się obecnością dużych komórek o pyknotycznych jądrach i zwakuolizowanej cytoplazmie, nie zdolnych do dalszej proliferacji, a macierz międzykomórkowa takiej chrząstki ulega wapnieniu. Te hypertroficzne chondrocyty wykazują jednak silną ekspresję angiogenetycznego czynnika wzrostu (VEGF), one więc odpowiedzialne są za inwazję naczyń w obręb tej wapniejącej chrząstki [3,4,5,6]. Doprowadzone do niej wraz z naczyniami komórki mezenchymatyczne są elementami bardzo plastycznymi i wykazują zdolność m. in. do przekształcania sie w chondroklasty – komórki resorbujące zwapniałą macierz chrzęstną oraz w osteoblasty. W miejsca usuniętej przez chondroklasty chrząstki, wnikają inne elementy mezenchymatyczne, przekształcające się w komórki kościotwórcze – osteoblasty. Osteoblasty wydzielają makromolekuły, tworzące skomplikoway układ związków organicznych, zwanych osteoidem (tworzą go kolagen typu I, glikoproteiny, proteoglikany, enzymy i czynniki wzrostu). Tak więc osteogeneza endochondralna jest procesem podob-

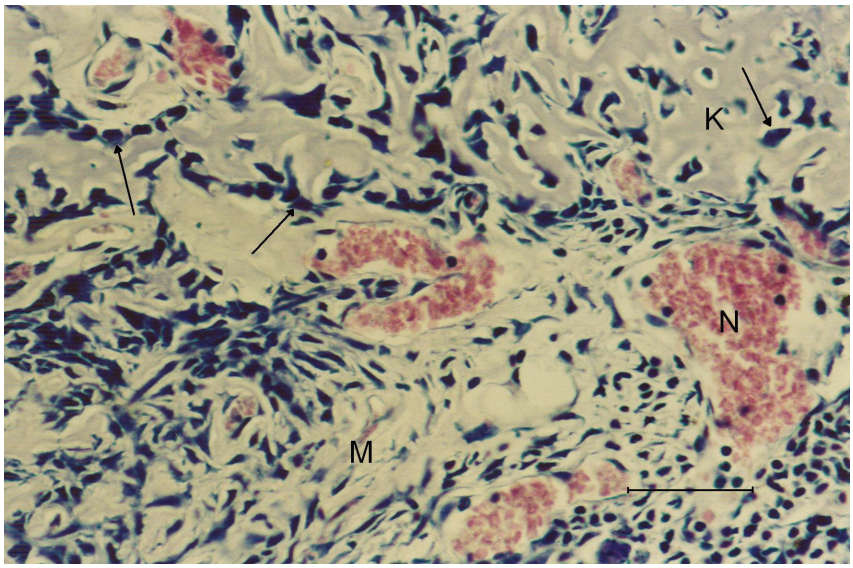
nym w swej istocie do kostnienia śródbłoniastego, charakterystycznego dla powstawania kości płaskich, gdzie komórki mezenchymatyczne skupiając się, różnicują się w osteoblasty syntetyzujące osteoid. W obu typach kostnienia – na podłożu chrzęstnym oraz kostnienia na podłożu mezenchymatycznym – tkanka kostna powstaje, z różnicujących się w osteoblasty, komórek mezenchymatycznych (Ryc. 1, 2).

W przypadku kostnienia na podłożu chrzęstnym, osteoblasty – pochodne komórek mezenchymatycz-



Ryc. 1. Chondrogeneza i osteogeneza w miejscu złamania przynasadowej części kości podudzia myszy. Widoczna nowoutworzona chrząstka szklista (C), ulegajaca hypertrofi i wapnieniu (H) oraz beleczki kości, powstałej na podłożu mezenchymatycznym (K) i na podłożu chrzęstnym (EK), komórki reakcji zapalnej (Z) oraz wielojądrzaste komórki resorbujace chrząstkę (chondroklasty, strzałki). 19 dni po złamaniu. Barwienie hematoksyliną-eozyną, pow. 10 x 10

Fig. 1. Chondrogenesis and osteogenesis at the fracture site in the metaphysial part of a mouse leg. The newly formed hyaline cartilage can be seen (C), subjected to hypertrophy and calcification (H), as well as trabeculae of bone forming on the mesenchymatic base (K) and the cartilaginous base (EK), inflammatory reaction cells (Z), and polynuclear cells resorbing cartilage (chondroclasts, arrows). 19 days after fracture. Hematoxyline-eosine staining, magnification 10 x 10



Ryc. 2. Faza kostniny twardej. Widoczne liczne poszerzone naczynia krwionośne (N) oraz beleczki kości splotowatej (K), okryte osteoblastami (strzałki), powstałymi z różnicujących się komórek mezenchymatycznych (M). 19 dni po złamaniu. Barwienie hematoksyliną-eozyna, pow. 40 x 10

Fig. 2. Hard callus phase. Numerous expanded blood vessels can be seen (N), as well as trabeculae of plexiform bone (K), covered with osteoblasts (arrows) created by the differentiation of mesenchymatic cells (M). 19 days after fracture. Hematoxyline-eosine staining, magnification 40 x 10

nych – odkładają osteoid na zrębach resorbowanej chrząstki szklistej.

Kościotworzenie endochondralne dysponuje jednak jeszcze innym mechanizmem – tzw. transdyferencjacją chondrocytów w osteoblasty [7]. W ostatnich latach zebrano dowody, że komóki chrzęstne, nawet bardzo zróżnicowane (tzw. hypertroficzne) mogą uruchamiać geny odpowiedzialne za produkcję kolagenu typu I (kostnego) oraz makromolekuł tworzących osteoid. Tak więc istnieje możliwość powstawania w obrębie chrząstki komórek wytwarzających macierz kostną. Równocześnie z procesem powstawania kości na podłożu chrzęstnym toczy się proces tzw. kostnienia śródbłoniastego lub kostnienia na podłożu mezenchymatycznym, a więc bez udziału chrząstki. Jest to proces osteogenezy odokostnowej, a więc wytwarzania tkanki kostnej z różnicujących się w osteoblasty komórek warstwy rozrodczej błony okostnowej (kambialnej) [8]. Zjawisku temu towarzyszy także intensywna angiogeneza (wytwarzanie naczyń krwionośnych) [9].

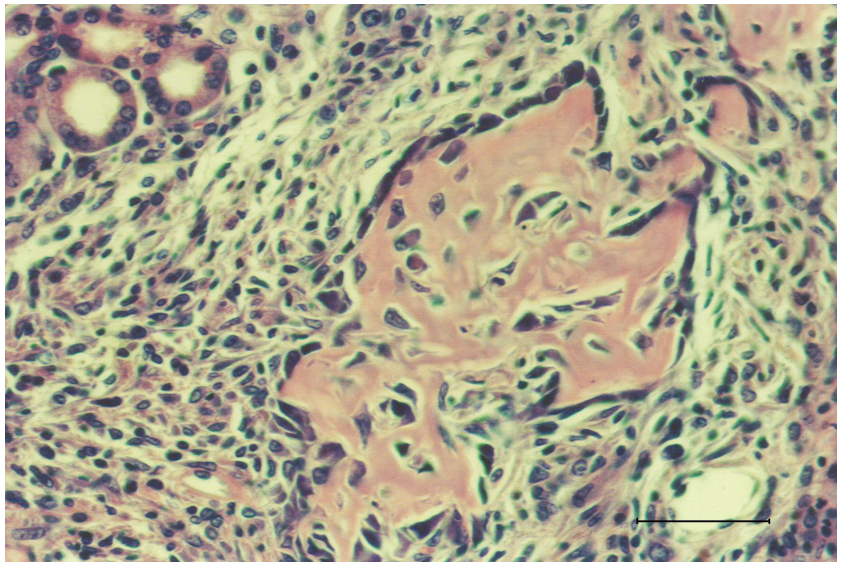
W wytwarzaniu kostniny bierze udział jeszcze jeden bardzo ważny czynnik – komórki zrębowe szpiku [10].

Komórki zrębowe szpiku zawierają macierzyste komórki mezenchymatyczne (z ang. mezenchymal stem cells), mogące różnicować się w wielu kierunkach – fibroblastów, adipocytów, komórek śródbłonka naczyń, komórek mięśni gładkich, chondrocytów i osteocytów (Ryc. 3). Jest to sytuacja analogiczna do multipotencjalnej komórki macierzystej hemopoezy, która może różnicować się w linie komórkowe dla erytropoezy, granulopoezy, monocytopoezy i trombocytopoezy. W przypadku złamania kości, pobudzony urazem szpik uruchamia komórki zrębowe tak, że różnicują się one do osteoblastów i biorą udział w wytwarzaniu tkanki kostnej.

III FAZA – KOSTNINY TWARDEJ (FAZA MINERALIZACJI)

Jest to etap, w którym tkanka chrzęstna ulega eliminacji na drodze apoptozy (samozagłady) chondrocytów oraz resorpcji przez chondroklasty, natomiast osteoid kości pierwotnej, utworzonej na zrębach macierzy chrzęstnej (kostnienie śródchrzęstne) lub kości utworzonej na podłożu mezenchymatycznym (kostnienie odokostnowe i kostnienie śródszpikowe) ulega mineralizacji.

Tkanka kostna w tym okresie posiada cechy tzw. kości grubowłóknistej lub splotowatej, stanowi więc tkankę o gorszych parametrach mechanicznych niż tzw. kość drobnowłóknista lub blaszkowata. Kość splotowata charakteryzuje się przypadkowym ułożeniem włókien kolagenowych i jest mechanicznie mało wytrzymała. Kość blaszkowata natomiast charakteryzuje się regularnym ułożeniem włókien kolagenowych w blaszkach kostnych, tworzących systemy Haversa, blaszki międzysystemowe oraz beleczki ko-



Ryc. 3. Beleczka kostna utworzona przez komórki zrębowe szpiku, hodowane in vitro przez 9 dni i przeszczepione w miąższ nerki syngenicznej myszy. Beleczka kostna okryta osteoblastami, widoczne kanaliki nerkowe. 8 dni od przeszczepienia komórek. Barwienie hematoksyliną-eozyną, pow. 40 x 10

Fig. 3. Bone trabecula formed by interstitial marrow cells, cultured in vitro for 9 days and grafted into the parenchyma of a syngenic mouse kidney. The bone trabecula is covered with osteoblasts, and the renal tubules are visible. 8 days after cell graft. Hematoxyline-eosine staining, magnification 40 x 10

ści gąbczastej i jest mechanicznie bardzo wytrzymała. Dlatego też w ostatniej fazie gojenia, kość splotowata zostaje wymieniona w procesie zwanym przebudową lub przemodelowaniem na wtórną kość blaszkowatą, o regularnym układzie włókien kolagenowych, zwaną też kością drobnowłóknistą.

IV FAZA GOJENIA

IV faza gojenia, zwana fazą przebudowy, rozpoczyna sie od ok. 35 dnia i polega na usuwaniu przez osteoklasty kości splotowatej i wytwarzaniu przez osteoblasty kości wtórnej, jej przebudowie i modelowaniu zgodnie z kierunkiem działania siły mięśniowej.

W fazie powstawania kości wtórnej w przestrzeniach pomiędzy beleczami kostnymi dochodzi do powstawania ognisk mielopoezy oraz następuje resorpcja osteoklastyczna kości, powiązana z aktywnością osteoblastów (mechanizm sprzęgający resorpcję tkanki kostnej z jej odbudową).

Uwalniane z resorbowanej macierzy kości pierwotnej czynniki wzrostu stymulują proliferację oraz dojrzewanie osteoblastów.

W części brzeżnej kości dochodzi do powstawania osteonów, czyli systemów Haversa oraz blaszek podstawowych. W ten sposób odtwarzana jest część korowa.

Od strony jamy szpikowej kość korowa, zbudowana z przebudowujących się systemów Haversa, otoczona jest przez ulegającą stopniowej przebudowie kość splotowatą (nie posiadającą systemów Haversa), a ta z kolei łączy się z kością śródchrzęstną, zbudowaną z pierwotnych beleczek kostnych, zawierających niezresorbowane resztki macierzy chrzęstnej.

W miarę postępowania gojenia, kość endochondralna zostaje zastąpiona kością splotowatą, a ta – kością blaszkowatą, tworzącą systemy Haversa, blaszki miedzysystemowe, blaszki podstawowe i blaszki kości gąbczastek.

EKSPRESJA GENÓW W PRZEBIEGU GOJENIA SIĘ ZŁAMANIA KOŚCI

W trakcie procesów naprawczych złamań kości następuje różnicowanie się komórek i wytwarzanie przez nie różnych białek strukturalnych, białek niekolagenowych i enzymów. Uruchomienie ich produkcji związane jest z uaktywnianiem się odpowiednich genów. I tak w fazie I, fazie kondensacji mezenchymy, w komórkach mezenchymatycznych uaktywniają się geny Ihh, Cbfa-1 oraz gen dla kolagenu typu II. Geny te odpowiedzialne są za różnicowanie w kierunku chondroblastów. W komórkach ochrzęstnej następuje ekspresja genów dla osteokalcyny oraz bialka gli-1.

W fazie kostniny miękkiej, dojrzewania chondrocytów, występuje nadal ekspresja genów Cbfa-1 i Ihh, a w komórkach okostnej pojawia się ekspresja genów Cbfa-1, gli-1 i osteokalcyny.

W chondrocytach hypertroficznych następuje ekspresja genów VEGF, warunkujących proliferację komórek śródbłonka naczyń krwionośnych, a więc odpowiedzialnych za angiogenezę oraz gen dla kolagenazy MMP-13. Enzym ten wykorzystywany jest do degradowania macierzy chrzęstnej. Istnieje więc korelacja pomiędzy degradacją macierzy chrzęstnej (MPP-13) a angiogenezą (VEGF). Ekspresja śródbłonkowego czynnika wzrostu VEGF występuje także w osteoblastach pod koniec działania grupy czynników wzrostu, zidentyfikowanych jako Morfogenetyczne Białek Kości (ang. Bone Morphogenetic Proteines, BMP).

Porównanie ekspresji genów, regulujących skeletogenezę w okresie życia płodowego oraz skeletogenezą w przebiegu gojenia się złamań kości wskazuje, że mechanizmy regulujące skeletogenezę płodową oraz regenerację kości u dorosłych osobników są jednakowe [11].

BIAŁKA STRUKTURALNE ORAZ BIAŁKA NIEKOLAGENOWE

Każdą z faz gojenia złamań kości charakteryzuje obecność szczególnych białek strukturalnych (kolagenu) oraz białek niekolagenowych, do których zalicza się proteoglikany, fosfoproteiny, enzymy oraz czynniki wzrostu.

W fazie I komórki mezenchymatyczne produkują kolagen typu III, a w naczyniach pojawia się kolagen typu V. Głównym proteoglikanem tej fazy jest siarczan dermatanu.

W fazie II chondrocyty syntetyzują kolagen typu II, a chondrocyty hypertroficzne syntetyzują kolagen typu X. Głównym proteoglikanem tej fazy gojenia jest siarczan chondroityny.

W fazie III, fazie kostniny twardej, obserwuje się obniżenia poziomu obu typów tych proteoglikanów, zaś głównym typem kolagenu staje się kolagen typu I.

W procesach naprawczych złamania kości biorą udział liczne enzymy zwane matryksynami. Zalicza się do nich metaloproteiny MMP, kolagenazy, proteoglikanazy, stromielinazy oraz fosfatazę zasadową [12].

Fosfoproteiny stanowią grupę białek regulujacych procesy mineralizacji. Zalicza sie do nich osteonektynę, osteopontynę oraz zależne od witaminy K, biał-

ka – osteokalcynę i białko macierzy kostnej Gla [13].

Osteonektyna stanowi wczesny marker różnicowania sie osteoblastów. Białko to odpowiedzialne jest za przyłączanie kryształków hydroksyapatytu do kolagenu typu I i hamuje wzrost tych kryształów.

Osteopontyna inicjuje proces wapnienia, stanowi receptor dla integryn – cząsteczek odpowiedzialnych za przyleganie osteoklastów do macierzy kostnej. Wytworzenie ścisłego połączenia osteoklastu z powierzchnią resorbowanej kości jest warunkiem rozpoczęcia erozji kości. Białko to bierze udział w procesach przebudowy kości na drodze ułatwiania resorbowania kości oraz usuwania zwapniałej macierzy chrzęstnej.

Osteokalcyna (BGP, ang. bone gla protein) jest białkiem produkowanym przez osteoblasty i jej poziom wzrasta wraz z rozwojem osteogenezy. Osteokalcyna aktywuje osteoklasty i wiąże się z kryształami hydroksyapatytu.

Inne białka zależne od witaminy K, lecz nie będace osteokalcyną, zwane białkami Gla, są produkowane przez komórki chrzęstne i osteoblasty i wykazują powinowactwo do białek morfogenetycznych kości (BMP).

CZYNNIKI WZROSTU W GOJENIU ZŁAMAŃ KOŚCI

W I fazie gojenia złamań najważniejszą rolę odgrywają czynniki wzrostu uwalniane z płytek krwi tworzącej krwiak pourazowy. Sa to płytkopochodny czynnik wzrostu PDGF oraz transformujący czynnik wzrostu TGF-beta. One regulują procesy „aseptycznej reakcji zapalnej" (wg dawnego mianownictwa tzw „blastemy regeneracyjnej"). W obrębie tej reakcji dochodzi do chondrogenezy (przy niedostatecznym unaczynieniu) lub osteogenezy (przy dobrym unaczynieniu) [14].

Fazę zapalną cechuje aktywność innych cytokin (Interleukiny I, interferonu, czynnika wzrostu monocytów – MCSF) oraz osteoprotegeryny i białek morfogenetycznych, szczególnie BMP-2.

Kostnienie śródchrzęstne fazy II podlega regulacji plejady czynników wzrostu, regulujących funkcje wielu typów komórek. Omówienie ich przekracza ramy niniejszego opracowania. Najważniejsze jednak z nich to tzw. białka morfogenetyczne kości (BMP, ang. bone morphogenetic proteins), których ekspresja rozciąga się na fazę III i IV [15].

Białka BMP (dotychczas zidentyfikowano ich 14) są plejotropowymi czynnikami wzrostu, regulującymi morfogenezę we wszystkich fazach gojenia złamań [16]. W dużych ilościach występują one w macierzy kości w formie latentej, a uwolnione z kości, w przebiegu resorpcji osteoklastycznej, działają parakrynowo jako czynniki wzrostu.

I tak, BMP – 2,6 i 9 warunkują różnicowanie komórek mezenchymatycznych (I faza).

Białka BMP – 2,4,6,7 i 9 indukują fosfatazę zasadową w preosteoblastach, ukierunkowując je w osteoblasty – komórki zdolne do syntezy osteoidu. Wszystkie zaś typy BMP aktywują fosfatazę zasadową w dojrzałych osteoblastach [16].

Białka BMP, jeden ze składników osteoidu, a więc produkt osteoblastów, są uwalniane z macierzy kostnej podczas resorpcji kości. Uwalniane z uszkodzonej podczas urazu kości oraz syntetyzowane de novo przez inne komórki reakcji zapalnej (zwłaszcza limfocyty T), białka BMP aktywują procesy proliferacji, różnicowania komórek mezenchymatycznych, procesy chondro- i osteogenezy. Odmineralizowana w odpowiednich warunkach matryca kości jest bardzo silnym aktywatorem osteogenezy, zarówno ektopowej jak i ortotopowej [17]. Uwalniane z takiej macierzy w wysokich stężeniach białka BMP aktywują komórki mezenchymatyczne do różnicowania sie w chondrocyty, a powstała w ten sposób chrząstka szklista staje się podłożem dla osteogenezy endochondralnej (Ryc. 4 i 5).

Białka BMP działają za pośrednictwem białek przekaźnikowych SMAD, które po fosforylacji przez aktywowanym BMP receptorem aktywują odpowiednie geny (Ryc. 6).

Białka BMP-2/4, których ekspresję we wszystkich fazach regeneracji kości można nasilić, wprowadzając technikami inżynierii genetycznej geny do ich produkcji, znalazły zastosowanie w ortopedii przy wspomaganiu gojenia złamań [3,18,19]. Zagadnienia te zostały omówione w innym opracowaniu [20,21].

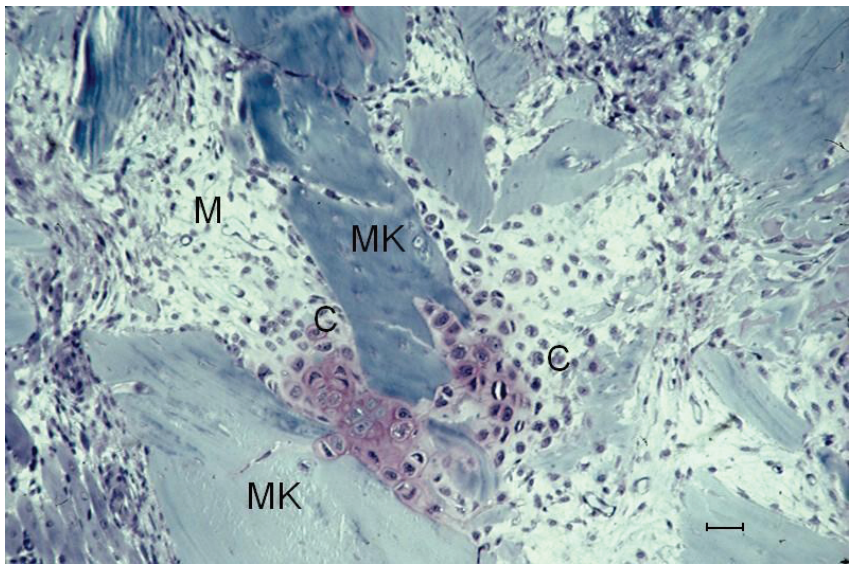
Innymi czynnikami, które pobudzają procesy gojenia się złamań kości to białko pobudzające osteogenezę (ang. osteogenic growth peptide), produkowane w następstwie utraty krwi lub usunięcia szpiku [22]; podawany miejscowo hormon wzrostu [23]; leki obniżające poziom lipidów – statyny (jednak doniesienia na temat pobudzającego osteogenezę działania statyn nie są jednoznaczne) [24]; prostaglandyny [25].

CZYNNIKI UPOŚLEDZAJĄCE GOJENIE ZŁAMAŃ KOŚCI

Istnieje wiele czynników upośledzających gojenie złamań kości:

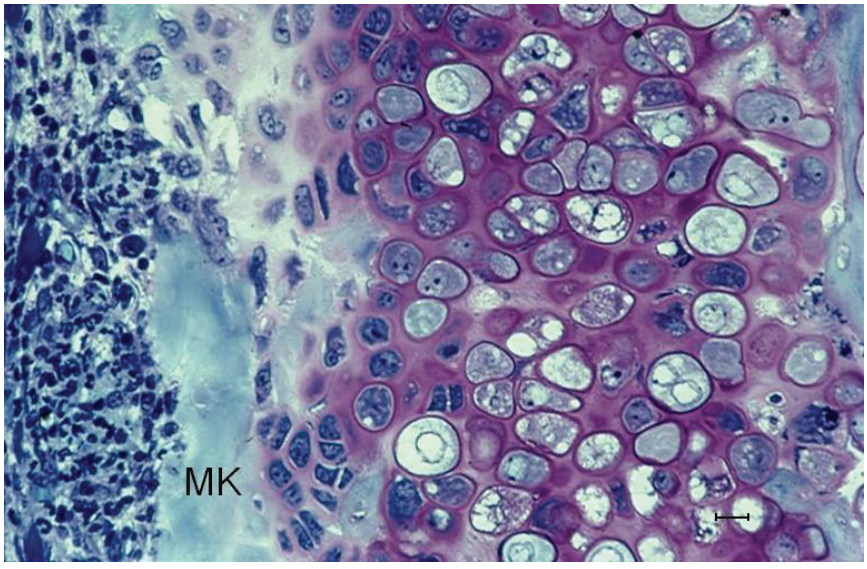
1. Zaburzenia metaboliczne i niedostateczne odżywianie;
2. Zaburzenia ukrwienia, hipoksja, upośledzona angiogeneza;

3. Brak oddziaływań mechanicznych, wywołujących w kościach efekt piezoelektryczny. Powstały w następstwie efektu piezoelektrycznego kości prąd pobudza proliferację osteoblastów i jest sygnałem dla syntezy BMP i czynników wzrostu [26,27];



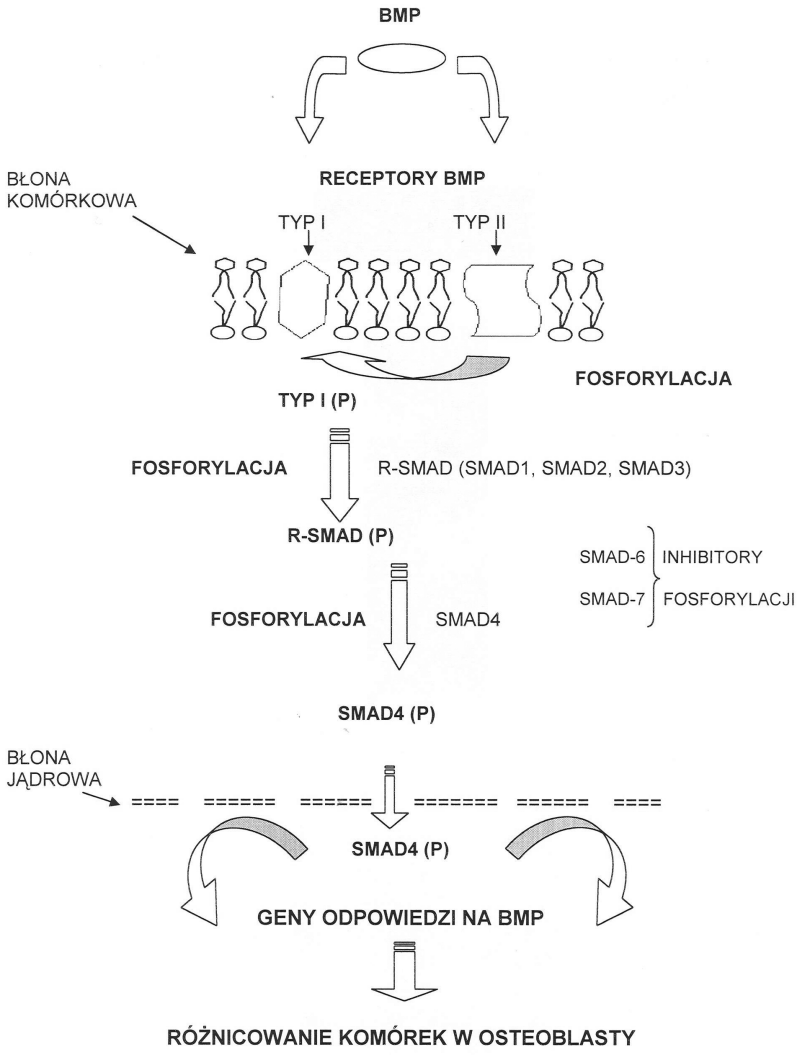
Ryc. 4. Indukcja chondrogenezy po domięśniowym przeszczepieniu fragmentów zdemineralizowanej matrycy kości – źródła białek BMP. Przestrzenie pomiędzy przeszczepioną matrycą odwapnionej kości (MK) zajęte przez tkankę mezenchymatyczną, która pod wpływem uwalnianego z matrycy BMP różnicuje się w chrząstkę szklistą (C). 8 dni od implantacji w mięsień podudzia myszy matrycy kości szczura. Barwienie błękitem toluidyny, pow. 10 x 10

Fig. 4. Induction of chondrogenesis after intramuscular grafting of fragments of demineralized bone: the source of BMP proteins. The spaces between the grafted matrices of decalcified bone (MK) are occupied by mesenchymatic tissue, which, under the influence of the BMP being released from the matrix, differentiates into hyaline cartilage (C). 8 days after implantation of rat bone matrix into the crural muscle of a mouse. Toluidine blue staining, magnification 10 x 10



Ryc. 5. Dalszy etap indukcji chondrogenezy i osteogenezy w mięśniach myszy po implantacji zdemineralizowanej macierzy kości szczura (MK). Powstała z mezenchymy gospodarza chrząstka szklista ulega hypertrofi i apoptozie, a w miejsca pustych jamek chrzęstnych wnikają komórki mezenchymatyczne, które przekształcą się w osteoblasty. Dwa tygodnie od implantacji matrycy. Barwienie błękitem toluidyny, pow. 10 x 10

Fig. 5. A further stage in the induction of chondrogenesis and osteogenesis in mouse muscles after the implantation of demineralized rat bone matrix (MK). The hyaline cartilage formed from the mesenchyma of the host is subjected to hypertrophy and apoptosis, and mesenchymatic cells infiltrate into the place of the empty cartilage lacunae and are transformed into osteoblasts. Two weeks after matrix implantation. Toluidine blue staining, magnification 10 x 10

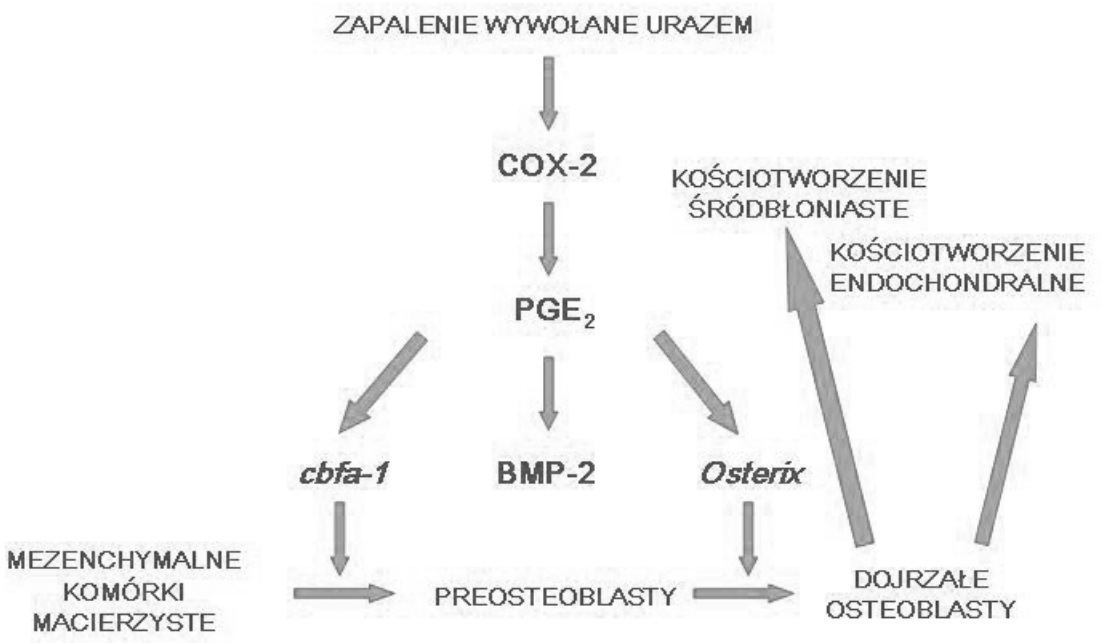


Ryc. 6. Mechanizm przekazywania sygnału dla różnicowania sie komórek pod wpływem morfogenetycznych białek BMP. Związanie BMP z receptorem obecnym na powierzchni komórki (mezenchymatycznej) powoduje fosforylację cytoplazmatycznych białek SMAD, które przedostając się na obszar jądra aktywują geny odpowiedzi na BMP. W wyniku tej aktywacji dochodzi do różnicowania sie komórek mezenchymatycznych w osteoblasty
Fig. 6. Mechanism of signal transmission for differentiation of cells under the influence of morphogenetic BMP proteins. The binding of BMP with a receptor present on the (mesenchymatic) cell surface causes the phosphorylation of the cytoplasmatic SMAD proteins, which enter into the vicinity of the nucleus and activate the genes responding to BMP. As a result of this activation there is differentiation of the mesenchymatic cells into osteoblasts.

4. Infekcje bakteryjne. Produkty bakteryjne degradują macierz kostną i wiążą się z uwalnianymi czynnikami wzrostu;
5. Zaburzenia ze strony układu nerwowego. Osteoblasty bowiem posiadają receptory dla neuroprzekaźników: serotoniny, VIP (wazoaktywny peptyd jelitowy), neuropeptydu Y, substancji P, peptydu CGRP (peptyd o budowie zbliżonej do kalcytoniny). Odnerwienie upośledza procesy gojenia złamań kości.

WPŁYW NIESTERYDOWYCH LEKÓW PRZECIWZAPALNYCH NA PRZEBIEG GOJENIA ZŁAMAŃ KOŚCI

Badania doświadczalne i kliniczne ostatnich kilku lat wykazują, że stosowanie niesterydowych leków przeciwzapalnych bardzo upośledza procesy gojenia złamań kości [28,29]. Leki tej grupy opóźniają prze-



Ryc. 7. Rola cyklooksygenazy (COX-2) w procesie gojenia złamania kości. W następstwie reakcji zapalnej (I faza) dochodzi do wzmożonej produkcji cyklooksygenazy, niezbędnej do wytwarzania prostaglandyn (PGE2). Prostaglandyny wywierają wielorakie efekty, m. in. aktywują gen cbfa-1 w komórkach mezenchymatycznych, co wprowadza je na szlak różnicowania się w preosteoblasty; aktywują gen osterix w preosteoblastach, co wywołuje dalsze ich różnicowanie do dojrzałych osteoblastów, zdolnych do wytwarzania kości (na podłożu mezenchymatycznym lub na podłożu chrzęstnym). Prostaglandyny aktywują także odpowiedź na BMP

Fig. 7. The role of cyclooxygenase (COX-2) in the process of healing a bone fracture. As a result of the inflammatory reaction (1st phase) there is increased production of cyclooxygenase, which is essential to the creation of prostaglandins (PGE2). The prostoglandins exert a variegated effect, including activization of the cbfa-1 genes in mesenchymatic cells, which leads them down the path to differentiate into preosteoblasts; they activate the osterix gene pre-osteoblasts, which prompts them to differentiate further into mature osteoblasts, capable of forming bone (on a mesenchymatic or cartilaginous base). Prostaglandins also activate the response to BMP

bieg fazy I. Działanie tych leków (aspiryna, ibuprofen) polega na blokowaniu syntezy cyklooksygenazy, enzymu potrzebnego do syntezy prostaglandyn. Prostaglandyny są aktywatorami wielu procesów, m. in. aktywują osteoklasty oraz pobudzają osteogenezę poprzez aktywowanie osteoblastów (Ryc. 7).

U zwierząt, u których doprowadzono do braku ekspresji cyklooksygenazy wykazano upośledzenie powstawania osteoblastów (osteoblastogenezę) i stan ten można było odwrócić podając prostaglandynę PGE2. Wykazano, że upośledzenie osteoblastogenezy było wynikiem zaburzeń w rekrutacji komórek mezenchymatycznych (Faza I) oraz zaburzeń w różnicowaniu ich do osteoblastów.

Prostaglandyny aktywują geny cbfa-1, związany z różnicowaniem się komórek mezenchymatycznych w preosteoblasty, aktywują syntezę BMP-2 oraz geny osterix w preosteoblastach, potrzebne do różnicowania ich w dojrzałe osteoblasty, zdolne do syntezy wszystkich składników osteoidu.

PODZIĘKOWANIA

Autorzy dziękują st. techn. Ewie Wiśniewskiej za pomoc w opracowaniu histologicznym własnego materiału doświadczalnego oraz za pomoc w prowadzeniu hodowli tkankowej zrębu szpiku. Praca została sfinansowano po części z funduszy Akademii Medycznej w Warszawie: 1M15/NK/2002 oraz 1M15/W2/04.

Znaczna część przedstawionego w tekscie materiału została wygłoszona jako referat programowy na I Mazurskich Spotkaniach Ortopedycznych „Ortopedzi pod żaglami", Giżycko 3-6 VI 2004.

PIŚMIENNICTWO

1. Sanyal A, Clemens V, Fitzsimmons JS, Reinholz GG, Sarkar G, Mukherjee N, O'Driscoll SW. Induction of CD--RAP mRNA during periosteal chondrogenesis. J Orthop Res 2003; 21: 296-304.

2. Sandberg M, Aro H, Multimaki P, Aho P, Vourio E. In situ localization of collagen production by chondrocytes and osteoblasts in fracture callus. J Bone Jt Surg 1989; 71A: 69-77.
3. Carano RA, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. Drug Discovery Today 2003; 8: 980-989.
4. Street J, Bao M, de Guyman L, Bunting S, Peale Jr FV, Ferrara N, Steinmety H, Hoeftel J, Cleland JL, Daughterz A, van Bruggen N, Redmond HP, Carano RAD, Filvaroff EH. Vascular endothelial growth factor stimulates bone rapair by promoting angiogenesis and bone turnover. PNAS 2002; 99: 9656-9661.
5. Gerber HP, Vu TH, Rzan AM, Kowalski J, Werb Y, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. Nature Medicine 1999; 5: 623-628.
6. Herper J, Klagsbrun M. Cartilage to bone – angiogenesis leads the way. Nature Medicine 1999; 5: 617-618.
7. Ford JL, Robinson DE, Scammed BF. Endochondral ossification in fracture callus during long bone repair: the localization of 'cavity-lining cells' within the cartilage. J Orthop Res 2004; 22: 368-375.
8. Aro HT, Wippermann BW, Hodgson SF, Chao EY. Internal remodeling of periosteal new bone during fracture healing. J Orthop Res. 1990; 8: 238-246.
9. Glowacki J. Angiogenesis in fracture repair. Clin Orthop 1998;(355 Suppl): S82-S89.
10. Krebsbach PH, Kuznetsov SA, Bianco P, Robey PG. Bone marrow stromal cells: characterization and clinical application. Crit Rev Oral Biol Med 1999; 10: 165-81.
11. 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.
12. Sakamoto S., Sakamoto M. Bone collagenase, osteoblasts and cell-mediated bone resorption. W: Peck WA, editor. Bone and Mineral Research. Elsevier Science Publishers B. V. 1986, str. 49-102.
13. Robey PG, Fisher LW, Young MF, Termine JD. The biochemistry of bone. W: B. L. Riggs and L. J. Melton, editors. Osteoporosis: Etiology, Diagnosis and Management. New York: Raven Press; 1988, str. 95-109.
14. Claes L, Eckert-Hubner K, Augat P. Th efracture gap size influences the local vascularization and tissue differentiation in callus healing. Langenbecks Arch Surg 2003; 388: 316-22.
15. Bostrom MP. Expression of bone morphogenetic proteins in fracture healing. Clin Orthop 1998;(355 Suppl): S116-23.
16. Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Hayden FM, Peng Y, Zhou L, Luu HHh, An N, Breyer B, Vanichakarn P, Szatkowski JP, Park JY, He Tong-Chuan. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). J Bone Jt Surg 2003; 85A: 1544-1552.
17. Wang J, Glimcher MJ. Characterization of matrix-induced osteogenesis in rat calvarial bone deffects: I. Differences in the cellular response to demineralized bone matrix implanted in calvarial defects and in subcutaneous sites. Calcif Tissue 1999; 65: 156-165.
18. Bax BE, Wozney JM, Ashurst DE. Bone morphogenetic protein-2 increases the rate of callus formation after fracture of the rabbit tibia. Calcif Tissue 1999; 65: 83-89.
19. Einhorn TA, Majeska RJ, Mohaideen A, Kagel EM, Bouxsein ML, Turek TJ and Wozney JM. A single percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates fracture repair. J Bone Joint Surg Am 2003; 85: 1425-35.
20. Włodarski KH, Włodarski PK, Galus R, Kobus M. Zastosowanie białek morfogenetycznych kosci (BMP) w leczeniu ubytków kosci – podstawy teoretyczne i doświadczalne na podstawie piśmiennictwa. Czas. Stomat 2001; 12: 762-769.
21. Włodarski PK, Galus R, Brodzikowska A, Włodarski KH. Zastosowanie białek morfogenetycznych kosci (BMP) w leczeniu ubytków kosci. Aplikacja kliniczna w stomatologii i ortopedii – przegląd piśmiennictwa. Czas. Stomat 2002; 2: 110-114.
22. Bab I, Chorev M. Osteogenic growth peptides from concept to drug design. Biopolymers 2002; 66: 33-48.
23. Andreassen TT, Oxlund H. Local anabolic effects of growth hormnone on intact bone and healing fractures in rats. Calcif Tissue Int 2003; 73: 258-64.
24. Skoglund B, Forslund C, Aspenberg P. Simvastatin improves fracture healing in mice. J Bone Miner Res 2002; 17: 2004-2008.
25. Childs SG. Stimulators of bone healing. Biologic and biomechanical Orthop Nurs 2003; 22: 421-428.
26. Landry SP, Sadasiva KK, Marino AA, Albright JA. Electromagnetic fields can affect osteogenesis by increasing the rate of differentiation. Clin Orthop Rel Res 1997; 338: 262-270.
27. Yenomori K, Matsunaga S, Ishidou Y, Yoshida H. Early effects of electrical stimulation on osteogenesis. Bone 1996; 19: 173-180.
28. Beck A, Krischak G, Sorg T, Augat P, Farker K, Merkel U, Kinzl L, Claes L. Influence of diclofenac (group of nonsteroidal anti-inflammatory drugs) on fracture healing. Arch Orthop Trauma Surg 2003; 123: 327-32.
29. Zhang X, Schwarz EM, Young DA, Puzas E, Rosuer RNn, O'Keefe RJ. Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into osteoblast lineage and is critically involved in bone repair. J Clin Investig 2002; 109: 1405-1415.

Praca wykonana z grantu 1M15/H2/2002 oraz 1M15/W2/04

Adres do korespondencji / Address for correspondence
Prof. dr hab. Krzysztof H. Włodarski
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii
Centrum Biostruktury AM
05-004 Warszawa, ul. Chałubińskiego 5

Otrzymano / Received *06.05.2005 r.*
Zaakceptowano / Accepted *19.07.2005 r.*