

© Коллектив авторов, 2018
УДК 616.717/.718-001.5-003.93

Р. В. Деев¹, И. Л. Плакса², М. О. Мавликеев³, И. Я. Бозо⁴, М. С. Абызова³

РАННИЕ СТАДИИ РЕГЕНЕРАЦИОННОГО ГИСТОГЕНЕЗА В ПЕРИОСТАЛЬНОЙ ЧАСТИ КОСТНОЙ МОЗОЛИ У ЧЕЛОВЕКА

¹ Кафедра патологической анатомии с курсом судебной медицины (зав. — канд. мед. наук Р. В. Деев), ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. И. П. Павлова» Минздрава России; ² отделение патологической анатомии (зав. — Н. А. Савёлов), Московская городская онкологическая больница № 62 Департамента здравоохранения г. Москвы; ³ кафедра морфологии и общей патологии (зав. — проф. А. П. Киясов), ФГАОУ ВО «Казанский федеральный университет», г. Казань; ⁴ кафедра хирургической стоматологии (зав. — проф. А. Ю. Дробышев), ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А. И. Евдокимова» Минздрава России

Цель — изучить межклеточные молекулярные взаимодействия на ранних стадиях репаративного остеогистогенеза.

Материал и методы. Объектом исследования являлись параоссальные гематомы, которые были получены от пациентов обоего пола в возрасте от 15 до 84 лет в ходе реконструктивного лечения в течение 12 сут после перелома.

Результаты. Наиболее ранним событием остеорепаляции является миграция в область повреждения гетерогенной популяции макрофагов с активной цитокин-синтетической функцией, что приводит к формированию в гематоме локального пула клеток-продуцентов VEGF и предшествует появлению среди тканевого детрита первых тонкостенных сосудов. Высокая митотическая активность клеточных элементов эндотелиального дифферона в совокупности с мембранной экспрессией Flk-1 отражает тесные молекулярные взаимодействия между эндотелиоцитами и цитокин-продуцирующими макрофагами. Активный процесс ангиогенеза происходит параллельно со стремительным увеличением содержания соединительной ткани. К 12-м суткам отмечается достоверное снижение общего числа сосудов, что в совокупности с уменьшением митотической активности эндотелиоцитов отражает снижение активности ангиогенеза к моменту формирования структур грубоволокнистой костной ткани. Экспрессия рецепторов Flk-1 и Flt-4 в клетках остеобластического дифферона свидетельствует о цитокиновой регуляции процессов гистогенеза костной ткани.

Выводы. На ранних стадиях репаративного остеогенеза регуляторная ось VEGF-VEGFR играет ключевую роль в координации межклеточных молекулярных взаимодействий, что обеспечивает последовательную смену клеточно-тканевых дифферонов в параоссальной гематоме.

Ключевые слова: параоссальная гематома, репаративный остеогенез, ангиогенез, VEGF

Несмотря на внедрение в клиническую практику современных методов хирургического лечения переломов и костных дефектов, нарушение их консолидации различной степени выраженности развивается у 5–48 % пациентов [4]. Это обуславливает необходимость проведения фундаментальных исследований регенерации костной ткани, направленных на определение «мишеней» для терапевтической коррекции нарушения консолидации [2].

Известно, что одним из основных этапов восстановления костной ткани является ангиогенез — формирование и рост сосудов, обеспечивающих оксигенацию, миграцию и хоуминг в зоне повреж-

дения клеток-предшественниц, способных к дифференцировке в остеобластическом направлении [1]. Низкий уровень перфузии является одним из основных факторов развития «остеогенной недостаточности» — состояния, при котором собственный камбиальный резерв остеогенных клеток не в состоянии обеспечить процесс остеорепаляции [3]. Таким образом, регенерационный осте- и ангиогенез является взаимосвязанным процессом, молекулярные механизмы регуляции которого изучены недостаточно.

В связи с этим целью настоящей работы является исследование межклеточных молекулярных механизмов репаративной регенерации

Сведения об авторах:

Деев Роман Вадимович (e-mail: romdey@gmail.com), кафедра патологической анатомии с курсом судебной медицины, ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. И. П. Павлова» Минздрава России, 390026, г. Рязань, ул. Высоковольная, 9

Плакса Игорь Леонидович (e-mail: i.plaksa2014@yandex.ru), ГАУЗ «Московская городская онкологическая больница №62», 143423, Московская область, Красногорский район, п/о Степановское, поселок Истра, 27

Мавликеев Михаил Олегович (e-mail: mmavlikeev@gmail.com), Абызова Мария Сергеевна, кафедра морфологии и общей патологии, ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18

Бозо Илья Ядигерович (e-mail: ilya-bozo-1989@yandex.ru), кафедра хирургической стоматологии, ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А. И. Евдокимова» Минздрава России, 127473, Москва, ул. Делегатская, 20, стр. 1

костной ткани при её травматическом повреждении с позиции современной концепции о регенерационном гистогенезе.

Материал и методы. Материал исследования составили параоссальные гематомы, полученные от 12 пациентов в возрасте от 15 до 84 лет (из них 4 — мужчины) с переломами костей верхней конечности (*табл. 1*).

Материал получен в процессе реконструктивного хирургического вмешательства в условиях травматологического отделения НУЗ «Дорожная клиническая больница» им. Н. А. Семашко на 1-, 3–8-, 10-е и 12-е сутки после травмы. Пациенты были информированы о целях и задачах исследования, потенциальной пользе от участия и возможных рисках, связанных с предоставлением биологического материала. Все пациенты подписывали добровольное информированное согласие. Регистрационный номер исследования в международном регистре ClinicalTrials.gov: NCT03244969.

Образцы гематом фиксировали в 10 % забуференном формалине, декальцинировали в Биодек R (Биовитрум, Россия) и заливали в парафин по стандартной методике. Препараты толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, трёхкомпонентным красителем для электроктивного выявления соединительной ткани по Маллори, а также импрегнировали серебром по Футу с целью выявления ретикулярных (арги-

рофильных) волокон. Для селективной оценки различных молекулярных механизмов межклеточных взаимодействий применяли антитела к эндотелиальному сосудистому фактору роста — Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), рецептору эндотелиального сосудистого фактора роста 1-го типа — Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 (VEGFR1, или Flt-1), рецептору эндотелиального сосудистого фактора роста 2-го типа — Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 (VEGFR2, или KDR/Flk-1), рецептору эндотелиального сосудистого фактора роста 3-го типа — Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3 (VEGFR3, или Flt-4), альфа-гладкомышечному актину — α -smooth muscle actin (α -SMA), подоплазину, нейрофиламентам, CD31, CD163, а также PCNA. Характеристика используемых антител приведена в *табл. 2*.

С целью количественной оценки различных компонентов репаративной регенерации выполняли расчёт морфометрических показателей, в том числе: площадь соединительной ткани (%), индекс пролиферации (ИП), индекс VEGF-положительных клеток (%), индекс экспрессии Flt-1 (VEGFR1), индекс экспрессии Flk-1 (VEGFR2), индекс экспрессии Flt-4 (VEGFR3). Изображения для морфометрии были выполнены на микроскопе Zeiss Axio Imager Z2 (Zeiss AG, Германия) с видеокамерой и программным обеспечением AxioVision. Для анализа изображений применяли программу ImageJ, National Institutes of Health (США). Математическая обработка включала вычисление средней величины каждого показателя и стандартного отклонения.

Результаты исследования. В посттравматической регенерации костной ткани принято выделять три фазы: ранних посттравматических изменений, регенерации и функциональной адаптации. Исследованный материал позволил проанализировать гистогенетические процессы в первую фазу и в начале второй.

Фаза ранних посттравматических изменений (1–4-е сутки). В 1-е сутки после перелома на препаратах параоссальной гематомы определяются фибрин и скопления эритроцитов, среди которых встречаются единичные макрофаги, а также отдельные сегментоядерные лейкоциты. В область повреждения наблюдается миграция гетерогенной популяции макрофагов. К 4-м суткам среди массивных пучков нитей фибрина и множества гибнущих эритроцитов отмечается нарастание числа макрофагов с $0,6 \pm 0,1$ до $5,2 \pm 2,1$, которые становятся ведущим клеточным дифференом на этом сроке. В цитоплазме части из них отчётливо видны фагоцитированные фрагменты эритроцитов. В 91 % клеток макрофагального дифферона определяется цитоплазматическая реакция с антителами к VEGF различной степени выраженности, что свидетельствует об активной цитокин-синтетической функции клеток. Экспрессия рецепторов Flt-1 и Flt-4 отмечается на мембране 70,5 и 69,4 % клеточных элементов регенерата соответственно.

Формирование к 4-м суткам в гематоме локального пула клеток-продуцентов VEGF предше-

Таблица 1

Характеристика исследованного материала

Сутки после перелома	Возраст, годы	Характер и локализация травмы	Пол	Наличие остеопороза
1-е	15	Закрытый перелом левой плечевой кости	М	—
3-и	54	Закрытый перелом левой плечевой кости	Ж	+
4-е	46	Закрытый перелом правой плечевой кости	Ж	—
5-е	74	Закрытый перелом левой плечевой кости	М	—
6-е	25	Закрытый перелом правой ключицы	Ж	—
7-е	74	Открытый перелом лучевой и локтевой костей слева	Ж	+
8-е	47	Закрытый перелом локтевой кости слева	М	—
10-е	31	Закрытый перелом левой ключицы	м	—
12-е	84	Закрытый перелом правой плечевой кости	Ж	—

Таблица 2

Антитела, используемые для изучения регенерационного гистогенеза в параоссальных гематомах

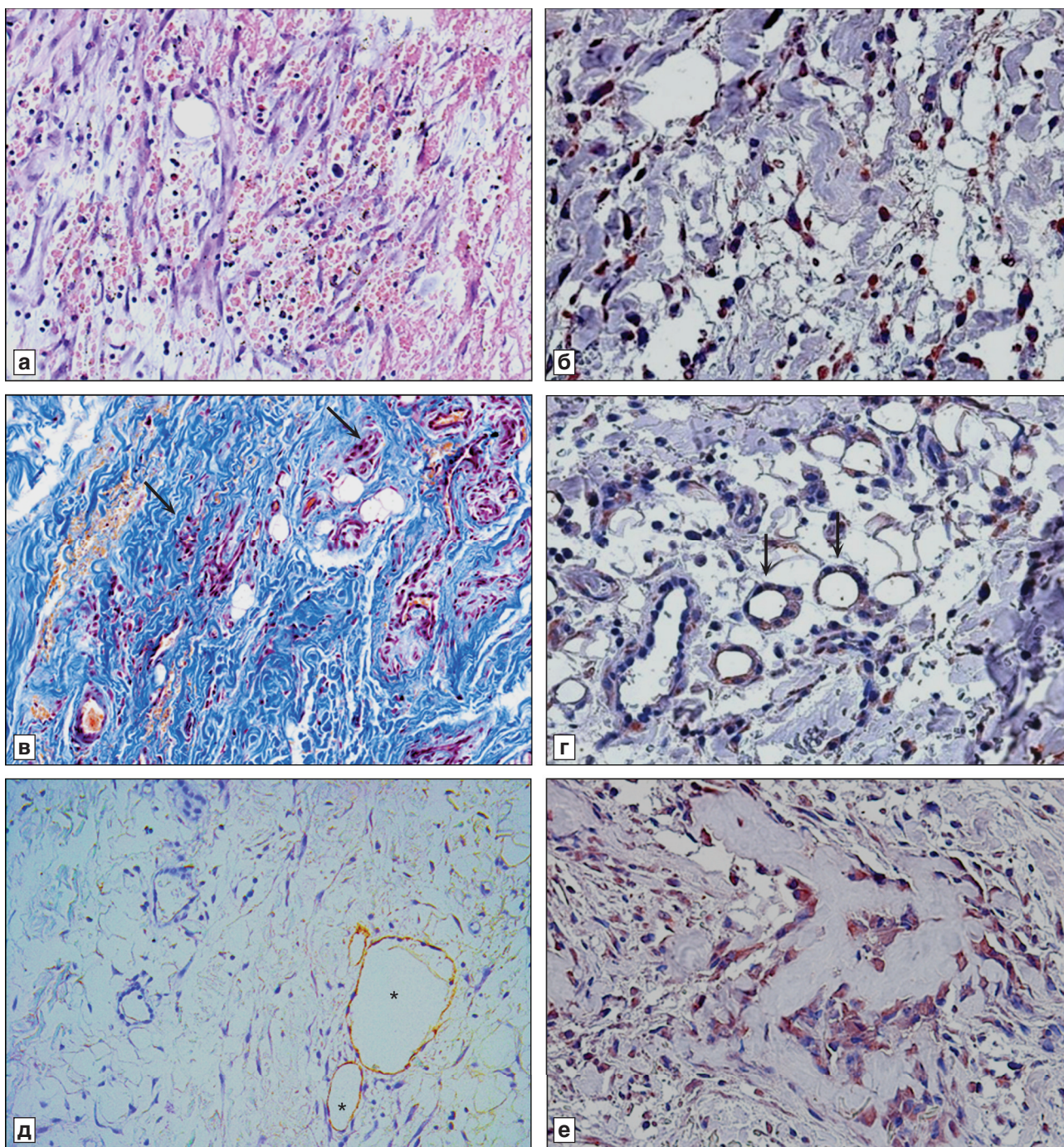
Антиген	Клон	Разведение	Производитель	Система визуализации
VEGF	A-20	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (США)	CSA II, Dako Cytomation, Inc. (США)
VEGFR1 (Flt-1)	Polyclonal	1:100	Abcam plc. (США)	Novolink, Leica Biosystems Newcastle Ltd (США)
VEGFR2 (KDR/Flk-1)	A-3	1:50	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (США)	
VEGFR3 (Flt-4)	C-20		Santa Cruz Biotechnology, Inc. (США)	
α -SMA	Ia4	1:50	Thermo Fisher Scientific, Inc. (США)	
PCNA	PC10	1:100	Dako Corporation (США)	
Neurofilaments	2F11		Dako Corporation (США)	
Podoplanin	RTD4E10	1:100	Abcam plc. (США)	
CD31	JC/70A			
CD163	EPR19518			

ствуется появлению среди тканевого детрита первых тонкостенных сосудов со средним диаметром $11,7 \pm 3,5$ мкм, число которых составляет $4,4 \pm 0,6$. Сосуды располагаются неравномерно, преимущественно одиночно, в отдельных полях зрения — плотно друг к другу по 3–4 капилляра, что может быть проявлением расщепления. В этом случае новые капилляры образуются вследствие формирования перегородки в исходном сосуде с последующим его раздвоением. Стенка большинства сосудов представлена одним слоем эндотелиоцитов, расположенных на базальной мембране. В 83 % из них в составе стенки имеются α -SMA-положительные клеточные элементы. Возможно, ими являются перициты, обеспечивающие стабилизацию структуры новообразованного сосуда. Появление первых сосудов коррелирует с высокой митотической активностью эндотелиоцитов, ИП которых составляет 77,5 %, что является проявлением интенсивного ангиогенеза. Отмечается высокая плотность рецепторного поля VEGF — экспрессия Flt-1 и Flk-1 определяется в 84,5 % и 86,9 % клеток эндотелиального дифферона соответственно, что отражает тесное межклеточное молекулярное взаимодействие с цитокин-продуцирующими макрофагами. В части клеток определяется ядерная локализация Flt-4, что может являться следствием процесса интернализации, при котором рецептор после связывания с лигандом путём эндоцитоза доставляется внутрь ядра и выполняет в нём роль транскрипционного фактора, обеспечивающего регуляцию собственной экспрессии и других ангиогенных цитокинов.

На 4-е сутки преимущественно в перикапиллярном пространстве определяются немногочисленные клетки фибробластического дифферона, а также овальные одноядерные клетки,

богатые слабоокисильной цитоплазмой. ИП в перикапиллярных зонах составляет 66,6 %, что свидетельствует об активном митотическом процессе клеточных элементов, мигрирующих в зону повреждения из новообразованных капилляров. Среди клеток фибробластического дифферона отмечается умеренная неоднородность уровня экспрессии рецепторов к VEGF: антитела к Flk-1 маркируют 52 % клеточных элементов. Также отмечается формирование небольших фокусов незрелой соединительной ткани, представленной молодыми аргирофильными волокнами, что отражает начало процесса формирования соединительнотканного матрикса. Таким образом, в ходе первых 4 сут наблюдаются изменение клеточно-дифференной организации регенерата, формирование регенерационного макрофагально-фибробласто-эндотелиального регенерационного гистиона, морфофункциональное становление которого происходит при участии VEGF-VEGFR-регуляторной оси (рисунк).

Фаза регенерации. Период активного ангиогенеза и формирования соединительнотканного матрикса (4–10-е сутки). К 5–7-м суткам количество клеточного детрита заметно уменьшается. В центральных зонах гематомы встречаются лишь островки лизированных эритроцитов и нитей фибрина, что сопровождается нарастанием числа клеток макрофагального дифферона до $7,2 \pm 3,4$ к 6-м суткам. Доля VEGF-положительных клеток к 10-м суткам уменьшается с 91 до 73 %, что, по-видимому, отражает снижение активности цитокин-синтетической функции и смену популяционного состава макрофагов. К 7-м суткам плотность сосудов в гематоме увеличивается в 2,5 раза и достигает $11,4 \pm 0,9$, а их диаметр — $8,2 \pm 2,3$ мкм. Стабильно высо-



Параоссальная гематома.

а — клетки фибробластического дифферона, расположенные между нитями фибрина и лизированных эритроцитов (4-е сутки); б — продукт реакции с антителами к VEGF в цитоплазме макрофагов (4-е сутки). Иммуногистохимическая реакция с антителами к VEGF; в — реактивно изменённая волокнистая соединительная ткань разной степени зрелости с многочисленными новообразованными сосудами (8-е сутки); г — экспрессия VEGFR2 эндотелиоцитами новообразованных сосудов (8-е сутки). Иммуногистохимическая реакция с антителами к VEGFR2 (KDR/Flk-1); д — лимфатические сосуды, в просвете которых отсутствуют форменные клеточные элементы (звездочки) (8-е сутки). Иммуногистохимическая реакция с антителами к подоплаину; е — экспрессия VEGFR1 клетками остеобластического дифферона (12-е сутки). Иммуногистохимическая реакция с антителами к VEGFR1 (Flt-1). Стрелки — новообразованные сосуды (в, г). Окраска: а — гематоксилином и эозином; в — по Маллори. Ув.: а, б, г, е — 200; в, д — 100

кий ИП эндотелиоцитов остаётся в интервале от 77,5 до 88,5%. Антитела к Flk-1 и Flt-4 маркируют 86 и 74% клеток соответственно, что отражает высокую плотность рецепторного поля клеток эндотелиального дифферона и обеспечи-

вает реализацию сигнала VEGF. Таким образом, в период с 5-х до 10-х суток определяется наибольшая активность ангиогенеза. В мембране эндотелиоцитов единичных тонкостенных сосудов на 6-е сутки отмечается умеренно интенсив-

ная экспрессия подопланина, что свидетельствует о формировании в посттравматической гематоме немногочисленных лимфатических сосудов диаметром до 76 мкм, что отражает процесс лимфангиогенеза.

Активный процесс ангиогенеза происходит параллельно с увеличением объёма соединительной ткани разной степени зрелости, к 6-м суткам составляющего 63,8 %. Клетки фибробластического дифферона распределены относительно равномерно по всей площади препарата, что может являться проявлением активного процесса их миграции из перикапиллярной зоны. Их ИП в этом периоде увеличивается и к 10-м суткам составляет 74 %, что в корреляции с мембранной экспрессией 89 % клеток Flk-1 определяет важную роль VEGF-VEGFR-регуляторной оси в формировании зрелого соединительнотканного матрикса. Плотный каркас коллагеновых волокон, по-видимому, обеспечивает оптимальные условия для нейрогенеза: на 8-е сутки отмечается прорастание первых нервных волокон диаметром до 68 мкм.

Период раннего остеогистогенеза (10–12-е сутки). К 10-м суткам весь объём параоссальной гематомы представлен соединительной тканью разной степени зрелости, доля которой составляет 80,3. Реактивно изменённая соединительная ткань становится более дифференцированной, фибробласты активно синтезируют коллаген, коллагеновые волокна объединяются в пучки различной ориентации, фибробласты дифференцируются в фиброциты. Снижение к 12-м суткам ИП фибробластов до 54 % отражает преобладание дифференцировки над пролиферацией. Экспрессия Flk-1 и Flt-4 составляет 80 и 82 % соответственно, что свидетельствует о значимой роли VEGF не только в процессе пролиферации клеток фибробластического дифферона, но и в процессе их дифференцировки.

К 12-м суткам общее число сосудов снижается с $11,4 \pm 0,9$ до $4,5 \pm 0,5$, из которых 73 % содержат в стенке α -SMA-положительные клетки. Снижение митотической активности эндотелиоцитов до 57 % коррелирует со снижением Flk-1-позитивных клеток на 15 %. Также уменьшается число клеток макрофагального дифферона с $7,2 \pm 3,4$ до $2,1 \pm 1,1$, из которых 74 % положительно маркируются антителами к VEGF. Число сосудов, достигнув максимума на 7–8-е сутки, начинает снижаться, что обусловлено гибелью клеточных элементов части капилляров путём апоптоза.

На 10–12-е сутки в параоссальной гематоме формируются структуры грубоволокнистой

костной ткани, внутри и по периметру которых залегают дифференцирующиеся остеобласты. Синтезируя коллагеновую основу межклеточного вещества, остеобласты образуют тонкие ажурные трабекулы и по мере увеличения объёма сами включаются в их структуру, приобретая черты остеоцитарной дифференцировки. Антитела к PCNA маркируют ядра 30 % клеток остеобластического дифферона, которые располагаются преимущественно по периферии структур грубоволокнистой костной ткани, что отражает их снижающуюся митотическую активность. Наличие экспрессии Flt-1 и Flk-4 у более чем 90 % клеток остеобластического дифферона подтверждает роль VEGF-VEGFR-регуляторной оси в процессах их гистогенеза. Положительное маркирование части остеобластов антителами к α -SMA отражает наличие сократительного аппарата, который обеспечивает их миграцию в соединительнотканном матриксе.

Обсуждение полученных данных. Формирование параоссальной гематомы является самым ранним этапом репаративного остеогистогенеза. В эксперименте показано, что уже на 4-е сутки после перелома параоссальная гематома обладает остеогенным потенциалом [11]. Процессы репаративного остеогенеза в гематоме начинаются сразу после её формирования, а удаление гематомы на 2-е и 4-е сутки после перелома сопровождается увеличением продолжительности заживления [7].

Одним из ранних событий остеорепарации является миграция в область повреждения популяции макрофагов, большая часть которых экспрессируют VEGF. Наибольший уровень экспрессии ангиогенных факторов роста обеспечивают M1-макрофаги, относящиеся к провоспалительной фракции, в то время как M2c-макрофаги обеспечивают продукцию MMP9 — белка, который играет важную роль в процессе ремоделирования экстрацеллюлярного матрикса на этапе «созревания» грануляционной ткани [13]. Как и в кожной ране, репаративный остеогистогенез сопровождается последовательной сменой популяционного состава макрофагов — M1-макрофаги, преобладающие на ранних этапах, постепенно сменяются популяцией M2-макрофагов, которые синтезируют противовоспалительные цитокины, такие как IL-10. Наличие экспрессии Flk-1 на мембране большей части клеток макрофагального дифферона, по нашим данным, также подтверждает гипотезу о том, что действие цитокина осуществляется по принципу ауто- и паракринной регуляции с участием VEGF-VEGFR-регуляторной оси.

Нарушение кровоснабжения области повреждения является одним из основных лимитирующих факторов восстановления целостности костной ткани. В эксперименте было показано, что введение в область репаративной регенерации VEGF индуцирует ангиогенез и сокращает сроки формирования костной мозоли [12]. Нами установлено, что экспрессия рецепторов VEGF имеется не только на мембране подавляющей части эндотелиоцитов, но и у других видов клеток, включая остеобласты. Таким образом, полученные результаты анализа посттравматического остеогистогенеза в параоссальных гематомах у человека создают предпосылки к разработке новых средств оптимизации репаративной регенерации костной ткани [5, 10].

С помощью антител к подопланину нам удалось селективно выделить единичные лимфатические сосуды в составе параоссальной гематомы, источником которых могут являться лимфатические сосуды периоста. Их направленный рост в область повреждения может обеспечиваться высокой локальной концентрацией VEGF, который реализует свой сигнальный путь при взаимодействии с рецептором VEGFR2 [8].

Исследования последних 10–15 лет показали, что кость является хорошо иннервируемым органом — процессы резорбции и остеогенеза регулируются рядом биологически активных пептидов [6]. В настоящей работе применение антител к нейрофиламентам позволило продемонстрировать появление первых нервных волокон в составе гематомы уже на 8-е сутки, что интересно в связи с данными о том, что VEGF индуцирует пролиферацию шванновских клеток, рост нейритов и является важным регулятором регенерации периферических нервов [9].

Таким образом, на ранних стадиях репаративного остеогенеза одним из ключевых компонентов регуляции является регуляторная ось VEGF-VEGFR. Межклеточные молекулярные взаимодействия в рамках этой регуляторной оси обеспечивают последовательную смену клеточно-тканевых дифференциров в параоссальной гематоме и контролируют такие компоненты гистогенеза, как миграция, пролиферация и дифференцировка клеточных элементов. Понимание значимой роли VEGF-VEGFR-регуляторной оси может быть использовано для разработки новых таргетных препаратов, направленных на коррекцию репаративного остеогистогенеза и остеопластических материалов, которые обладали бы хорошей остеоиндуктивностью и были бы максимально приближены к понятию «идеальный» костно-замещающий материал.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ мол_а № 16-34-00440. Работа поддержана программой повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета и субсидиями, выделенными Казанским (Приволжским) федеральным университетом по государственному заданию в сфере научной деятельности.

Вклад авторов:

Концепция и дизайн исследования: Р. В. Д.

Сбор и обработка материала: М. О. М.

Статистическая обработка данных: М. О. М.

Анализ и интерпретация данных: И. Л. П., И. Я. Б., М. С. А.

Написание текста: И. Л. П.

Авторы сообщают об отсутствии в статье конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гололобов В.Г., Деев Р.В. Стволовые стромальные клетки и остеобластический клеточный дифферен // Морфология. 2003. № 1. С. 1–19 [Gololobov V.G., Deev R.V. Stromal stem cells and osteoblastic cellular differon // Morfologiya. 2003. Vol. 123, № 1. P. 9–19. In Russ.]
2. Гололобов В.Г. Посттравматическая регенерация костной ткани. Современный взгляд на проблему // Труды Военно-медицинской академии им. С.М.Кирова. 2004. Т. 257. С. 94–109 [Gololobov V.G. Post-traumatic regeneration of bone tissue. A modern view of the problem // Proceedings of S.M.Kirov Military Medical Academy. 2004. Vol. 123. P. 94–109. In Russ.]
3. Деев Р.В., Цупкина Н.В., Бозо И.Я., Калигин М.С., Гребнёв А.Р., Исаев А.А., Пинаев Г.П. Тканеинженерный эквивалент кости: методологические основы создания и биологические свойства // Гены и клетки. 2011. Т. 4, вып. 1. С. 62–67 [Deev R.V., Tsupkina N.V., Bozo I.Y., Kaligin M.S., Isaev A.A., Pinaev G.P. The tissue engineering bone: a methodological basis and biological properties // Geny i kletki. 2011. Vol. 4, № 1. P. 62–67. In Russ.]
4. Bhandari M., Guyatt G.H., Tong D., Adili A., Shaughnessy S.G. Reamed versus nonreamed intramedullary nailing of lower extremity long bone fractures: a systematic overview and meta-analysis // J. Orthop. Trauma. 2000. Vol. 14. P. 2–9.
5. Bozo I.Y., Deev R.V., Drobyshev A.Y., Isaev A.A., Eremin I.I. World's first clinical case of gene-activated bone substitute application case // Rep. Dent. 2016. 8648949.
6. Grässel S. The role of peripheral nerve fibers and their neurotransmitters in cartilage and bone physiology and pathophysiology // Arthritis Res. Ther. 2014. Vol. 16, № 6. P. 485.
7. Grundnes O., Reiker O. The importance of the hematoma for fracture healing in rats // As ActaOrthop. Scand. 1993. Vol. 64, № 3. P. 340–342.
8. Hong Y.K., Lange-Asschenfeldt B., Velasco P., Hirakawa S., Kunstfeld R., Brown L.F., Bohlen P., Senger D.R., Detmar M. VEGF-A promotes tissue repair-associated lymphatic vessel formation via VEGFR-2 and the $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ integrins // FASEB J. 2004. Vol. 18. P. 1111–1113. doi: 10.1096/fj.03-1179fje.
9. Jin K., Zhu Y., Sun Y., Mao X.O. Xie L., Greenberg D.A. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis

- in vitro and in vivo // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. Vol. 99, № 18. P. 11946–11950. doi: 10.1073/pnas.182296499.
10. Komlev V.S., Popov V.K., Mironov A.V., Fedotov A.Yu., Teterina A.Y., Smirnov I.V., Bozo I.Y., Rybko V.A., Deev R.V. 3D printing of octacalcium phosphate bone substitutes // Front. Bioeng. Biotechnol. 2015. Vol. 3. P. 81. doi: 10.3389/fbioe.2015.00081.
 11. Mizuno K., Mineo K., Tachibana T., Sumi M., Matsubara T., Hirohata K. The osteogenic potential of fracture haematoma subperiosteal and intramuscular transplantation of the haematoma // J. Bone Joint Surg. 1990. Vol. 72-B. P. 822–829.
 12. Ogilvie C.M., Lu C., Marcucio R., Lee M., Thompson Z., Hu D., Helms J.A., Miclau T. Vascular endothelial growth factor improves bone repair in a murine nonunion model // Iowa Orthop. J. 2012. Vol. 32. P. 90–94.
 13. Spiller K.L., Anfang R.R., Spiller K.J. The role of macrophage phenotype in vascularization of tissue engineering scaffolds // Biomaterials. 2014. Vol. 35, № 15. P. 4477–4488.

Поступила в редакцию 24.10.2017
Получена после доработки 05.12.2017

EARLY STAGES OF REGENERATION HISTOGENESIS IN PERIOSTEAL PART OF BONE CALLUS IN MAN

R. V. Deyev¹, I. L. Plaksa², M. O. Mavlikeyev³,
I. Ya. Bozo⁴, M. S. Abyzova³

Objective — to study the intercellular interactions during early stages of reparative osteohistogenesis.

Materials and methods. The object of the study were fracture hematomas, which were obtained from patients of both sexes aged 15–84 years in the course of reconstructive treatment during the first 12 days after the fracture.

Results. The earliest event of bone repair was the migration to the fracture area of a heterogeneous macrophage population with an active cytokine-synthetic function that resulted in the formation of a local pool of VEGF-producing cells in the hematoma and preceded the appearance of the first thin-walled vessels among the tissue detritus. High mitotic activity of the endothelial cell elements in conjunction with the membrane expression of Flk-1 reflected a close molecular interaction between endothelial cells and cytokine-producing macrophages. The active process of angiogenesis occurred in parallel with a rapid increase in the amount of connective tissue. By 12 days, a significant decrease in the total number of vessels was noted, which, together with a decrease in mitotic activity of endothelial cells, reflected a decrease in angiogenesis activity at the time of formation of the structures of woven bone. Expression of Flk-1 and Flt-4 receptors in osteoblastic cells indicated a cytokine regulation of the processes of bone tissue histogenesis.

Conclusion. At the early stages of reparative osteogenesis, VEGF-VEGFR regulatory axis was shown to play a key role in the coordination of intercellular molecular interactions, ensuring a consistent replacement of cell-tissue populations in fracture hematoma.

Key words: *fracture hematoma, reparative histogenesis, angiogenesis, VEGF*

¹ Department of Pathology with Forensic Medicine Course, I. P. Pavlov Ryazan State Medical University, 9 Vysokovol'tnaya Str., Ryazan 390026; ² Department of Pathology, Moscow City Oncology Hospital No 62, 27 Istra Village, Krasnogorskiy district, Moscow region 143423; ³ Department of Morphology and General Pathology, Kazan' Federal University, 18 Kremlevskaya Str., Kazan 420008; ⁴ Department of Maxillofacial Surgery, A. I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, 20/1 Delegatskaya Str., Moscow 127473