

УДК 611.018.41-009.87-092
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2026-1-113-130>

***In vitro* и *in vivo* реакция остеогенных клеток на высокотемпературное воздействие**

Хлусов И.А.^{1,2}, Насибов Т.Ф.¹, Горохова А.В.¹, Порохова Е.Д.^{1,2}, Кокорев О.В.¹, Лешенкова А.В.¹, Рыжкова А.Ю.¹, Пахмурин Д.О.^{1,2}, Анисеня И.И.^{2,3}, Ситников П.К.^{2,3}, Матюшков С.Ю.²

¹ Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

² Томский государственный университет систем управления и радиоэлектроники (ТУСУР)
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 40

³ Научно-исследовательский институт (НИИ) онкологии, филиал Томского национального исследовательского медицинского центра (НИМЦ) Российской академии наук
Россия, 634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5

РЕЗЮМЕ

Цель исследования: оценить реакцию мезенхимных стромальных/стволовых клеток (МСК) *in vitro* и состояние костных клеток (остеобластов, остеоцитов) в процессе восстановления бедренной кости после локальной термоабляции в диапазоне 55–60 °С.

Материалы и методы. Морфологию и жизнеспособность (МТТ-тест) культуры МСК, выделенной из жировой ткани человека, изучали при культивировании в термостатах при 37 °С или 56 °С в диапазоне 0–60 мин. На бедренную кость наркотизированных кроликов накладывали нагревательную манжету и проводили интраоперационную термоабляцию в течение 30 мин (температура в костно-мозговом канале 55–60 °С). Состояние костной ткани анализировали гистологически (окраска гематоксилином и эозином и по Эйнарсону) сразу и через 14 сут после воздействия. Проводили компьютерную морфометрию с использованием ImageJ и статистический анализ в R.

Результаты. Морфологические признаки массовой гибели МСК в культуре *in vitro* наблюдались через 15 мин нагревания; через 30 мин живые фибробластоподобные клетки практически отсутствовали. Прижизненная локальная термоабляция бедренной кости кроликов вызывала прямую гибель остеобластов и остеоцитов, зафиксированную по морфологическим признакам апоптоза и некроза, а также нарушению синтеза ДНК и РНК. Морфологические и молекулярные маркеры клеточного повреждения статистически значимо увеличивались к 14-м сут после нагревания.

Заключение. Умеренные режимы термоабляции (55–60 °С) обладают значительным прямым и отсроченным повреждающим эффектом на остеогенные клетки от стволовых до зрелых форм. Полученные результаты важны для практики комбинированного лечения опухолевых и метастатических поражений костной ткани.

Ключевые слова: мезенхимные стромальные стволовые клетки, клеточная культура, бедренные кости кролика, остеобласты, остеоциты, термоабляция, признаки клеточной смерти

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (номер проекта FEWM-2024-0003).

✉ Хлусов Игорь Альбертович, khlusov63@mail.ru

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено комиссией IACUC СибГМУ (заключение № 1 от 03.04.2023).

Для цитирования: Хлусов И.А., Насибов Т.Ф., Горохова А.В., Порохова Е.Д., Кокорев О.В., Лешенкова А.В., Рыжкова А.Ю., Пахмурин Д.О., Анисеня И.И., Ситников П.К., Матюшков С.Ю. *In vitro* и *in vivo* реакция остеогенных клеток на высокотемпературное воздействие. *Бюллетень сибирской медицины*. 2026;26(1):113–130. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2026-1-113-130>.

***In vitro* and *in vivo* osteogenic cell response to high temperature exposure**

Khlusov I.A.^{1,2}, Nasibov T.F.¹, Gorokhova A.V.¹, Porokhova E.D.^{1,2}, Kokorev O.V.¹, Leshenkova A.V.¹, Ryzhkova A.Yu.¹, Pakhmurin D.O.^{1,2}, Anisenya I.I.^{2,3}, Sitnikov P.K.^{2,3}, Matyushkov S.Yu.²

¹ Siberian State Medical University

² Moskovsky trakt, 634050 Tomsk, Russian Federation

² Tomsk State University of Control Systems and Radioelectronics

40 Lenin Ave., 634050 Tomsk, Russian Federation

³ Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (NRMC), Russian Academy of Sciences

5 Kooperativny St., 634009 Tomsk, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. To evaluate the response of mesenchymal stromal/stem cells (MSCs) *in vitro* and the status of bone cells (osteoblasts, osteocytes) during regeneration of the femoral bone after local thermoablation at 55–60 °C.

Materials and methods. Morphology and viability (MTT assay) of human adipose tissue-derived MSCs were analyzed after incubation at 37 °C or 56 °C for 0–60 minutes. *In vivo*, a heating cuff was applied to the femur of anesthetized rabbits, and intraoperative thermoablation was performed for 30 minutes (bone marrow canal temperature: 55–60 °C). Bone tissue was histologically examined (hematoxylin – eosin and Einarson staining) immediately and 14 days post-treatment. Quantitative morphometry was implemented in ImageJ, with subsequent statistical analysis performed in R.

Results. *In vitro*, signs of massive MSC death were observed after 15 minutes of heating; at 30 minutes, viable fibroblast-like cells were nearly absent. *In vivo*, local thermoablation caused direct death of osteoblasts and osteocytes, evidenced by morphological signs of apoptosis and necrosis, as well as impaired DNA/RNA synthesis. Morphological and molecular markers of cellular damage significantly increased by day 14 post-treatment.

Conclusion. Moderate thermoablation (55–60 °C) exerts significant direct and delayed damaging effects on osteogenic cells, from stem to mature forms. These findings are relevant for combined treatment of tumor and metastatic bone lesions.

Keywords: mesenchymal stromal/stem cells, cell culture, rabbit femurs, osteoblasts, osteocytes, thermalablation, signs of cell death

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious or potential conflict of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project number FEWM-2024-0003).

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the IACUC Commission at SibSMU (Minutes No. 1 dated April 03, 2023).

For citation: Khlusov I.A., Nasibov T.F., Gorokhova A.V., Porokhova E.D., Kokorev O.V., Leshenkova A.V., Ryzhkova A.Yu., Pakhmurin D.O., Anisenya I.I., Sitnikov P.K., Matyushkov S.Yu. *In vitro* and *in vivo* osteogenic cell response to high temperature exposure. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2026;26(1):113–130. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2026-1-113-130>.

ВВЕДЕНИЕ

Оптимальное ремоделирование скелетных тканей при их заболеваниях и повреждениях, в том числе вокруг имплантированных материалов и изделий, остается во многих случаях нерешенной проблемой в травматологии и ортопедии и онкологической хирургии. Центральная роль в процессах физиологической, репаративной и патологической регенерации костной ткани принадлежит мезенхимным стромальным (стволовым) клеткам (МСК) [1, 2].

В настоящее время разработаны и апробируются в эксперименте и клинике разнообразные фармакологические и физико-химические способы управления репаративными процессами. Одним из активно развивающихся направлений (прежде всего, в онкологии) является использование высоких температур, которые разделяют на гипертермию (выше 41 °С) и термоабляцию (выше 55 °С) [3, 4]. Гипертермия в интервале 43–46 °С усиливает *in vivo* процессы остеогенеза [5] и минерализации костной ткани [6] через 2 нед после теплового стресса [7]. Ранее мы показали *ex vivo* или *in vivo* влияние термоабляции при локальной температуре выше 55 °С на механическую прочность костей [8, 9], а также морфологию костной ткани экспериментальных животных в ранние (до 7 сут) сроки после высокотемпературного воздействия [10].

МСК и остеобласты считаются термочувствительными клетками [11, 12], а также являются частью ассоциированного с опухолью микроокружения [12]. Соответственно, реакция остеогенных клеток на нагревание во многом определяет исход терапевтических манипуляций и репаративных процессов в условиях клинической термоабляции.

Следует отметить тот факт, что большинство исследований на клетках выполнено в гипертермических условиях (до 45 °С). В то же время в комбинированном лечении доброкачественных и злокачественных опухолей и метастатических поражений костной ткани применяют в основном термоабляцию [13, 14].

Общеизвестно, что прямой эффект термоабляции на клетки связан с развитием коагуляционного некроза, сопровождающимся денатурацией белков, нарушением целостности и проницаемости клеточных мембран [15]. Часть авторов [4] связывают не прямые термические эффекты с реакцией иммунной системы, которая в русле современной концепции «стеоиммунологии» оказывает существенное влияние на метаболические и репаративные процессы в костной ткани в норме, при экстремальных воздействиях и заболеваниях [16].

Тем не менее конкретные последствия прямых и отсроченных эффектов высокотемпературного воз-

действия на костную ткань до сих пор мало исследованы. Об этом свидетельствуют наши запросы по ключевым словосочетаниям “MSC thermoablation”, “osteoblast thermoablation” или “osteocyte thermoablation”, которые показали нулевые результаты поиска в базе данных Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>).

В связи с вышеперечисленной целью данного исследования было изучение *in vitro* реакции МСК, а также *in vivo* состояния костных клеток (остеобластов и остеоцитов) после локальной термоабляции, выполненной в диапазоне температур 55–60 °С.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

In vitro исследование воздействия термоабляции на культуру МСК

Мезенхимные стромальные (стволовые) клетки получали после четырех пассажей стромально-вазкулярной фракции (СВФ), выделенной из липоаспирата жировой ткани условно здорового добровольца, как описано нами ранее [17]. Наличие МСК в СВФ выявляли согласно минимальным морфологическим критериям Международного общества клеточной терапии [18]. В нашем случае параметры культуры были следующие: 1) фибробласто-подобная морфология клеток; 2) адгезия к культуральному пластику; 3) жизнеспособность 93% в тесте с 0,4%-м раствором трипанового синего; 4) экспрессия CD73 (96%), CD90 (98%) и CD105 (95%); 5) слабая (1,3%) презентация кроветворных маркеров CD45, CD14, CD20 и CD34 согласно проточной цитометрии.

Выделенные клетки культивировали в концентрации 5×10^4 живых клеток в 1 мл питательной среды следующего состава: 90% среды Игла модифицированной Дульбекко (DMEM) (Servicebio, Китай), 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) (Technozero, Россия), антибиотики (100 ед./мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина (Carigricon scientific, Германия) и 2 мМ L-глутамина (ПанЭко, Россия)) при 5%-м CO₂ и 100%-й влажности. Экзотермическое воздействие на культуры МСК в 24-луночных планшетах (Corning Incorporated, США) проводили в двух суховоздушных термостатах ТС-1/80 (Смоленское СКТБ СПУ, Россия), настроенных на требуемую температуру 37 °С или 56 °С (термоабляция). Экспериментальные группы для *in vitro* термоабляции ранжировали по временным интервалам внешнего нагревания в следующем порядке: 1) 37 °С в течение 60 мин (контрольная группа); 2) 37 °С + 56 °С в разных комбинациях: 45 + 15, 30 + 30, 15 + 45 или 0 + 60 мин соответственно. Для каждой временной группы использовали по пять лунок. Затем

клетки дополнительно инкубировали в CO₂-инкубаторе (МСО-170I, Alphavita Bio-Scientific, Dalian, Китай) до 20 ч при 37 °С, 5%-м CO₂ и 100%-й влажности.

После культивирования определяли жизнеспособность клеточных культур с помощью МТТ-теста, рекомендуемого ГОСТ ISO 10993-5-2023, как описано ранее [19]. За 4 ч до окончания 24-часового культивирования клеточные культуры снимали 0,25%-м раствором трипсин-ЭДТА (компания «ПанЭко», Россия), центрифугировали при 1 500 об/мин 10 мин и дважды отмывали фосфатно-солевым раствором. Затем добавляли 0,5%-й раствор 3-[4,5-диметилтиазолил-2-ел]-2,5-дифенилтетразолиум бромида (МТТ) (NeoFroxx, Германия) в полной питательной среде в каждую лунку. Образцы инкубировали с МТТ в течение 4 ч при 37 °С. Супернатанты осторожно удаляли и в каждую лунку добавляли раствор солюбилизирующего раствора (10%-й додецилсульфат (SDS) в 0,01 М HCl) для растворения кристаллов формазана. Определяли индекс цитотоксичности (ИЦ) с помощью спектрофотометрии проб при 540 нм на Picon (компания Picon, Uniplan, Россия) с эталонной длиной волны 630 нм.

Морфологию клеток оценивали на фазово-контрастном инвертированном микроскопе ADF I350 (ADF Optics Co Ltd., Китай) со встроенными цифровой камерой и программным обеспечением.

In vivo исследование воздействия термоабляции на костную ткань

Дизайн эксперимента одобрен комиссией IACUC Центральной научно-исследовательской лаборатории (ЦНИЛ) СибГМУ (заключение № 1 от 03.04.2023). Исследование проводилось на базе vivария ЦНИЛ СибГМУ на беспородных здоровых кроликах ($n = 6$) возрастом 15 нед, массой 3–4 кг, после 7-дневного карантина в амбиентных условиях, распределенных случайным образом на две экспериментальные группы. Критерием невключения в эксперимент служили признаки нездоровья животных, установленные ветеринарным врачом при внешнем осмотре (вялость, отсутствие аппетита, выпадение шерсти, зуд и покраснение кожи и слизистых оболочек, ушной клещ). Кроликов, подвергшихся термоабляции, исключали из дальнейшего наблюдения в случае обнаружения патологических переломов бедренных костей.

Термическое воздействие на лабораторных животных

Процедуру локальной контролируемой интраоперационной термоабляции правой бедренной кости у всех кроликов проводили в течение 30 мин, как

подробно описано ранее [10], с помощью комплекса локальной гипертермии «Феникс-2» (ООО «Пром-Эл», Россия), разработанного в ТУСУРе [20].

Животных выводили из эксперимента методом асфиксии углекислым газом: группа 1 (Int 0 days 55–60 °С – контралатеральная конечность; Temp 0 days 55–60 °С – конечность, подвергшаяся термическому воздействию) – сразу после термоабляции ($n = 3$); группа 2 (Int 14 days 55–60 °С; Temp 14 days 55–60 °С) – через 14 сут после термоабляции ($n = 3$).

Гистологическое исследование

Гистологическое исследование бедренных костей кроликов проводили согласно методике, подробно описанной в [10], на базе кафедры морфологии и общей патологии СибГМУ. Извлеченные цельные бедренные кости от каждого животного (подвергавшиеся нагреву и интактную) фиксировали в 10%-м забуференном (pH 7,4) водном растворе формалина (Biovitrum, Россия), декальцинировали по методу Гриппа в модификации [21]. Далее декальцинированные фрагменты костей помещали в 10%-й водный раствор сульфата натрия (АО «Лен-Реактив», Россия) на 24 ч, обезвоживали в шести сменах раствора на основе изопропанола IsoPrep (Biovitrum, Россия) по схеме производителя и помещали в парафиновую смесь HISTOMIX (Biovitrum, Россия).

Парафиновые срезы костей толщиной 5–7 мкм готовили на полуавтоматическом микротоме МЗП 01 (Техном, Россия) и монтировали на предметные стекла. Препараты контралатеральной бедренной кости, а также бедра, подвергшиеся термоабляции, обзорно окрашивали гематоксилином Джилла (Biovitrum, Россия) и эозином (Biovitrum, Россия) и по методу Эйнарсона [22]. Гистохимическое окрашивание по Эйнарсону является высокоспецифичным в отношении нуклеиновых кислот, особенно в условиях повышенной кислотности среды [23].

Гистологические препараты костей изучали на световом микроскопе Axioscope 40 (Zeiss, Германия). Цифровые фотографии получали в фиксированных условиях освещения с использованием фотоаппарата Canon PowerShot A2200 (разрешение 14,1 Мп; Canon Inc., Китай) и программного обеспечения AxioVision 4.8 (Zeiss, Германия).

Площадь, коэффициент округлости и оптическую плотность окрашенных зон интереса (ядро, цитоплазма) оценивали согласно методу компьютерной морфометрии цифровых изображений [24] с применением инструментов программы ImageJ (версия 1.38, Национальный институт здоровья, Бетезда, США; <http://www.rsbl.nih.gov/ij>). Для

оценки округлости CI использовалась формула $CI = 4\pi \times S \div P^2$, где S – площадь, P – периметр выделенной области, число π округлено до 7-го знака после запятой ($\pi = 3,1415926$). Значение, равное 1, соответствует правильному кругу. Значение, близкое к 0, соответствует сильно вытянутому многоугольнику. Метод измерения оптической плотности позволяет получить фотометрические количественные характеристики непрозрачного объекта. Для этого определялась яркость фона SF и яркость исследуемого участка клетки или ткани ST на изображении в режиме градаций серого. Оптическая плотность объекта D определялась по формуле: $D = 100 \times \log(SF \div ST)$.

Статистическая обработка данных

Статистический анализ данных проводился с помощью языка программирования R (версия 4.4.0) в среде RStudio (версия 2023.12.0 + 369) с использованием пакетов MVN [25], stats [26], brunnermunzel [27]. Нормальность распределения количественных признаков проверяли тестом Шапиро – Уилка с поправкой Ройстона [28]. Данные представлены в виде среднего арифметического и стандартного отклонения $M \pm SD$ для нормального распределения, медианы и интерквартильного размаха $Me (Q_1; Q_3)$ – для ненормального.

Для сравнения средних двух выборок использовали тест Смита – Уэлча – Саттеруэйта [29–31], как более мощный, нежели t -критерий Стьюдента, критерий одновременно с хорошим контролем ошибок первого рода [32–34]. Для ранговых и количественных ненормальных данных применяли критерий Бруннера – Мюнзеля [35, 36], который не требует

равенства дисперсий или распределений, в отличие от U -критерия Манна – Уитни, и надежен при выполнении этих допущений [37, 38].

Сравнение категориальных признаков проводили с помощью точного критерия Фишера с поправкой Шидака – Холма для множественных сравнений.

Ввиду того, что в исследуемых группах тестировались неинbredные кролики, состояние кости у которых значительно отличается, применяли подход персонализированной статистики. В рамках этого подхода проводится стандартизация значений и сравнение величин с показателями относительно интактной контралатеральной бедренной кости, не подвергавшейся локальной термоабляции.

РЕЗУЛЬТАТЫ

In vitro исследование воздействия термоабляции на культуру МСК

Клетки в контрольной группе (37 °C в течение 60 мин) имели вытянутую, веретеновидную или полигональную форму, а также подобную крупному, правильному, округлому или овальному ядру (рис. 1, *a*), что соответствует типичной фибробластоподобной морфологии МСК, адгезирующих к пластику. При оценке морфофункционального состояния МСК после термоабляции (56 °C, 15 мин) клеточная культура была представлена адгезированными ко дну лунки одиночными клетками (рис. 1, *b*) с морфологией, близкой к клеткам контрольной группы. Также встречались округлые клетки разного размера, имеющие неоднородную, вспененную/пузырящуюся цитоплазму (рис. 1, *c*).

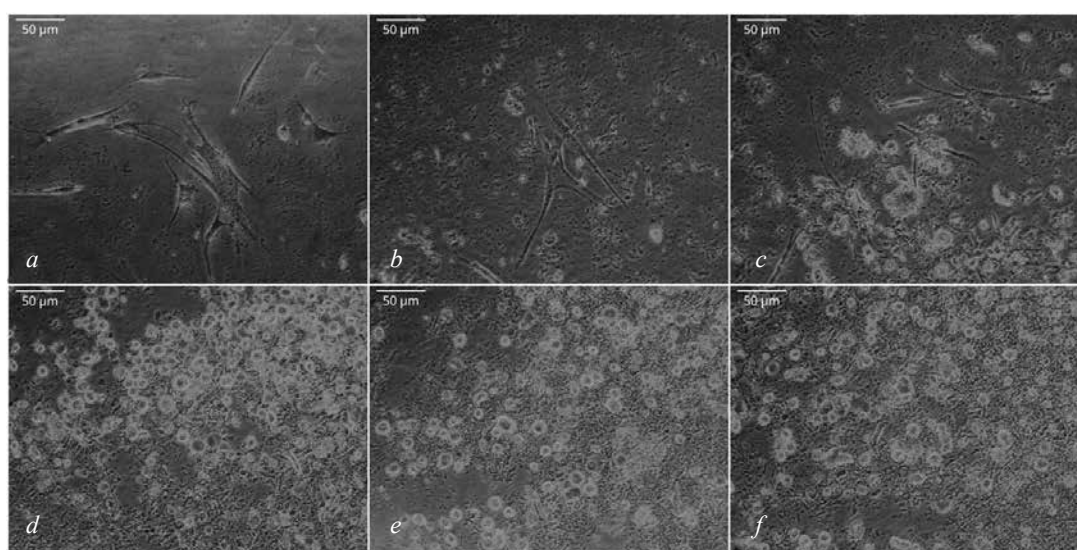


Рис. 1. Морфологическое состояние 20-часовой культуры мезенхимных стромальных (стволовых) клеток после ее нагревания при 56 °C: *a* – контроль при 37 °C; термоабляция: *b*, *c* – 15 мин; *d* – 30 мин; *e* – 45 мин; *f* – 60 мин с последующим культивированием при 37 °C. Темнопольная инвертированная микроскопия, $\times 200$

Между клетками располагалось умеренное количество клеточного дебриса. Уменьшение размеров, изменение состояния цитоплазмы, потеря псевдоподий и округление предполагают клеточную гибель путем апоптоза, как частного случая апоптоза [39]. Данное состояние культуры говорит о повреждающем воздействии термоабляции 56 °С уже при времени экспозиции 15 мин. Действительно, МТТ-тест показал, что среднее значение ИЦ составило $62 \pm 3\%$.

Дальнейшее увеличение длительности температурного воздействия до 30 мин и более (45–60 мин) приводило к полному исчезновению клеток с фибробластоподобной морфологией. Клетки резко уменьшались в размерах, цитоплазма теряла гомогенность, псевдоподии отсутствовали, обнаруживалось большое количество клеточного дебриса (см. рис. 1, *d–f*). Описанные морфологические изменения свидетельствуют о массовой клеточной гибели после 30 мин термоабляции при 56 °С. МТТ-тест подтвердил описанные морфологические изменения; ИЦ для МСК достигал $96 \pm 2\%$.

Таким образом, проведенный эксперимент с внешней *in vitro* термоабляцией культуры МСК при 56 °С показал ее высокую чувствительность к экстремальному воздействию.

In vivo исследование воздействия термоабляции на костную ткань

Состояние костной ткани непосредственно после локальной термоабляции

В контралатеральных левых (относительно интактных) бедренных костях кроликов сразу после термоабляции правых бедер не выявлено морфологических признаков некроза или воспаления при окраске гематоксилином и эозином (рис. 2, *a, c*). Диафиз представлен пластинчатой костной тканью, костномозговой канал заполнен красным костным мозгом. Кость покрыта периостом, к которому прилегают мышечные волокна. В эндостальной зоне видны многочисленные остеобласты (рис. 2, *c*, стрелка).

В зоне прямого нагрева диафизов правых бедренных костей (55–60 °С в костномозговом канале, 60–65 °С под манжетой со стороны периоста) наблюдались признаки венозной гиперемии крупных сосудов костного мозга (рис. 2, *b*); пластинчатая костная ткань эндоста (рис. 2, *d*) при этом не имела явных повреждений.

При микроскопическом исследовании остеоцитов в группе с мгновенным выводом из эксперимента (группа 1) обнаружено, что в зоне термоабляции в компактном веществе кости наблюдаются многочисленные запусевающие лакуны остеоцитов, число которых в периостальной зоне статистически значи-

мо возрастает на 20% в сравнении с показателем в интактной контралатеральной конечности (тест Фишера; $p = 0,0042$, см. рис. 3, *a*) в сравнении с состоянием контралатеральной бедренной кости. Однако при морфометрии компактной кости вблизи эндоста запусевание лакун после термоабляции возрастало, но не достигало достоверных различий (тест Фишера; $p = 0,10$; рис. 3, *a*).

Запусевание лакун свидетельствует, по-видимому, о денуклеации остеоцитов и цитолизе, что является важнейшими морфологическими признаками клеточной гибели путем некроза или апоптоза. Следовательно, 30-минутная термоабляция в диапазоне температур 55–60 °С (со стороны эндоста) и 60–65 °С под манжетой со стороны периоста усиливает на 12–20% прямую гибель остеоцитов диафиза в течение самой процедуры. Более высокая температура прогрева периоста (~ на 5 °С) обуславливает и более высокие цифры (на 8%) клеточной смерти.

При окраске нуклеиновых кислот по Эйнарсону морфология ядер остеоцитов (рис. 2, *g–j*) визуально отличалась. В интактной кости они крупные, округлые или веретеновидные, интенсивно окрашенные (рис. 2, *g, i*; стрелки). После термоабляции ядра остеоцитов менее интенсивно окрашены, веретеновидной или уплощенной формы (рис. 2, *h, j*; стрелки). Тем не менее морфометрический анализ морфофункциональных показателей (площадь, округлость и оптическая плотность ядра) состояния остеоцитов периоста (рис. 2, *i, j*) и эндоста (рис. 2, *g, h*) практически не показал статистических различий (рис. 4, *a, d, g, m, p*) с соответствующими зонами интереса в интактных диафизах.

Некоторый прирост медианной площади ядра остеоцитов вблизи эндоста (на $1,31 \text{ мкм}^2$; тест Брунера – Мюнзеля; $p = 0,04$; см. рис. 4, *j*) может быть связан после нагревания с их набуханием, поскольку оптическая плотность окраски ядер на нуклеиновые кислоты достоверно не снижалась (рис. 4, *m*). Оценить состояние цитоплазмы остеоцитов не представляется возможным при оптической микроскопии, поскольку она практически не прокрашивается по Эйнарсону; наружные цитоплазматические мембраны клеток во многих случаях тесно контактируют со стенками лакун.

С другой стороны, визуальный анализ (рис. 2, *e, f*) выявил выраженные различия в состоянии остеобластов непосредственно после термоабляции. В интактных костях присутствуют многочисленные остеобласты с признаками высокой синтетической активности (базофильная цитоплазма большого объема, апикальное расположение ядра) (рис. 2, *c, e*; стрелки). В зоне термоабляции остеобласты единич-

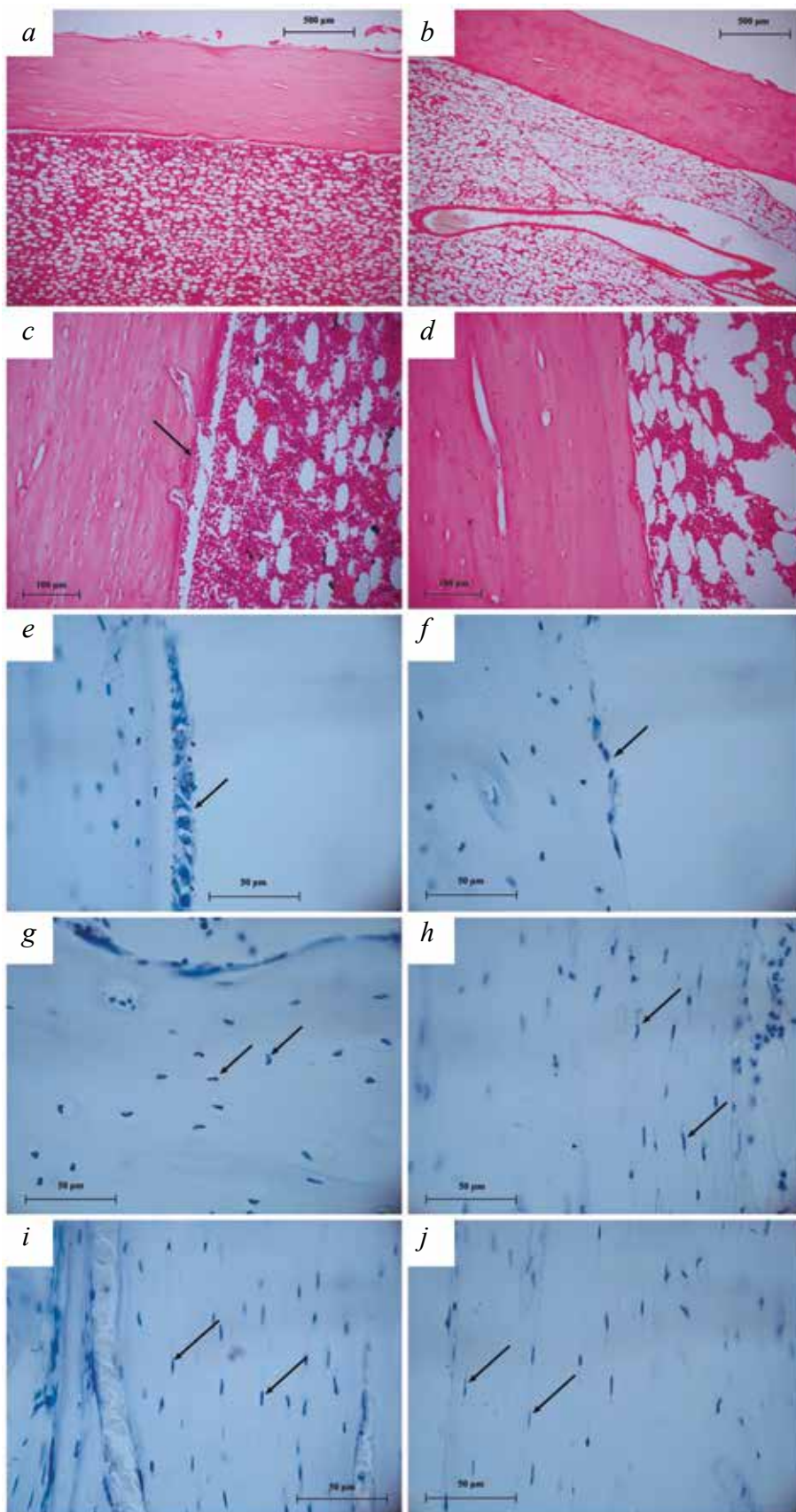
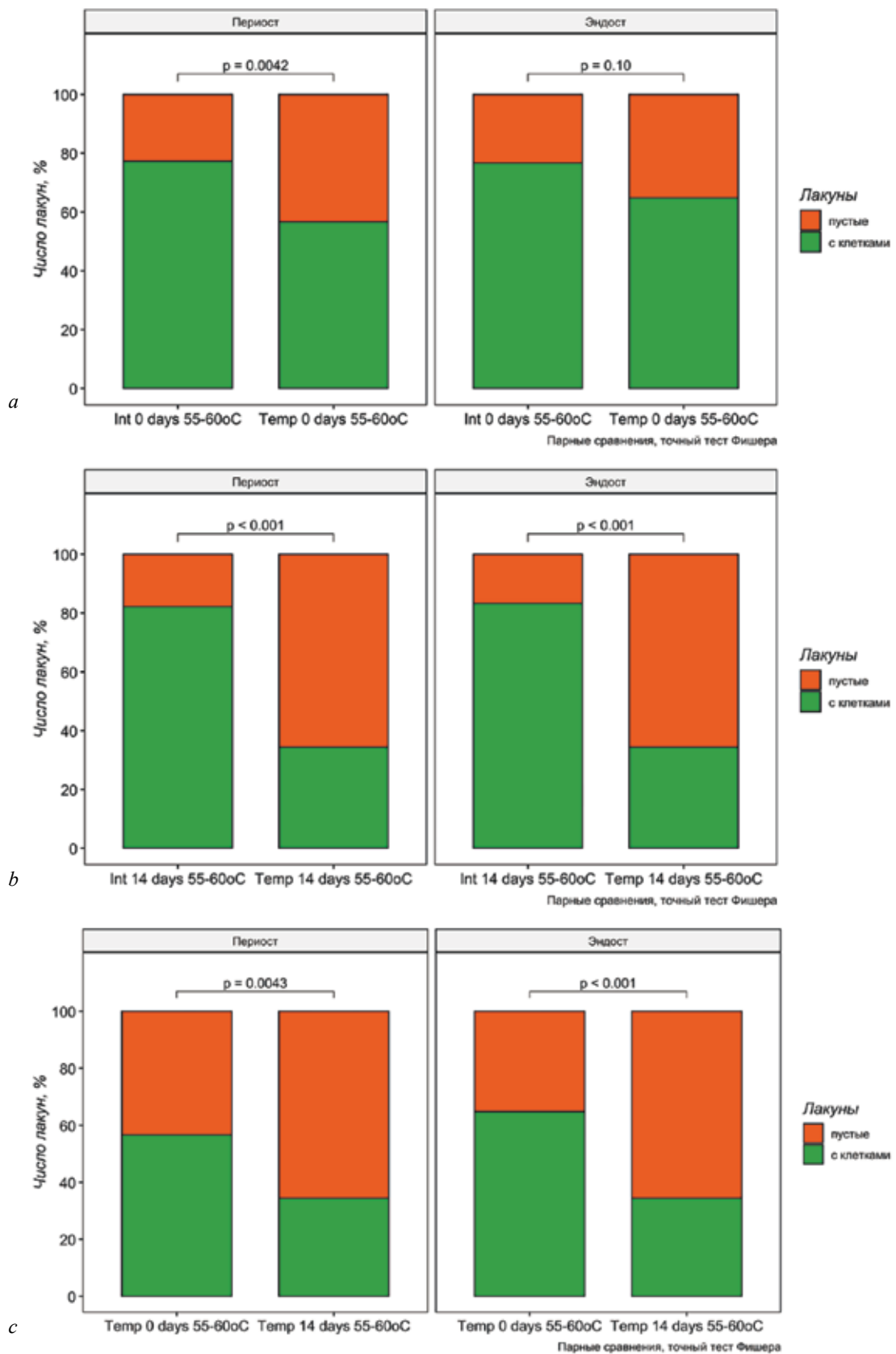


Рис. 2. Морфология intactных бедренных костей (*a, c, e, g, i*) и костей сразу после термоабляции (0-е сут) при 55–60 °С (*b, d, f, h, j*). В диафизах intactных образцов (*a, c, e, g, i*): пластинчатая костная ткань, красный костный мозг (*a*), многочисленные активные остеобласты в эндосте (стрелки), остеоциты с интенсивно окрашенными округлыми (*g*, стрелки) и веретеновидными (*i*, стрелки) ядрами. После термоабляции (*b, d, f, h, j*): гиперемия сосудов костного мозга (*b*), костная ткань в зоне эндоста без выраженных изменений (*d*), единичные неактивные остеобласты (*f*, стрелка); остеоциты с менее интенсивно окрашенными веретеновидными (*h*, стрелки) и уплощенными (*j*, стрелки) ядрами. Окраска гематоксилином и эозином (*a-d*) – по методу Эйнарсона (*e-j*); $\times 50$ (*a, b*), $\times 200$ (*c, d*), $\times 630$ (*e-j*)



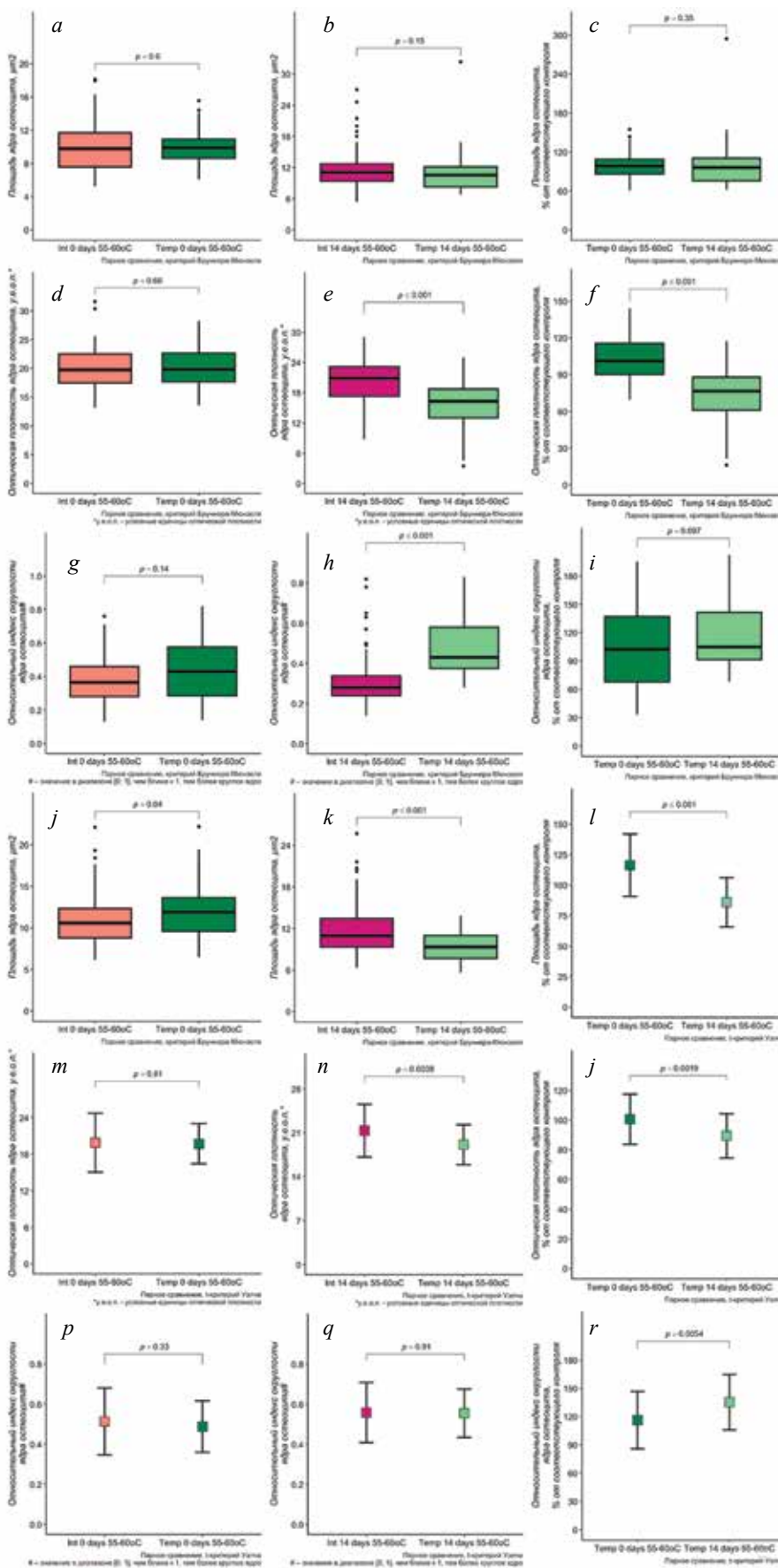


Рис. 4. Морфометрические показатели остеоцитов в периостальной (*a-i*) и эндостальной зоне (*j-r*) диафизов бедренных костей. Площадь ядер остеоцитов (*a-c, j-l*) в интактной кости и кости после гипертермического воздействия на 0-е сут (*a, j*) и 14-е сут (*b, k*), а также в кости после гипертермического воздействия на 0-е и 14-е сут (*c, l*). Оптическая плотность ядер остеоцитов (*d-f, m-o*) в интактной кости и кости после гипертермического воздействия на 0-е сут (*d, m*), 14-е сут (*e, n*), а также в кости после гипертермического воздействия на 0-е и 14-е сут (*f, o*). Относительный индекс округлости ядер остеоцитов (*g-i, p-r*) в интактной кости и кости после гипертермического воздействия на 0-е сут (*g, p*), 14-е сут (*q, r*), а также в кости после гипертермического воздействия на 0-е и 14-е сут (*i, r*). Данные представлены в виде $Me (Q_1; Q_3)$ (*a-k*) и $X \pm SD$ (*l-r*). Критерий сравнения – критерий Бруннера – Мюнцеля (*a-k*), *t*-критерий Уэлча (*l-r*), у.е.о.п. – условные единицы оптической плотности. Индекс округлости имеет значения в диапазоне [0; 1], чем ближе к 1, тем более круглое ядро

ны и демонстрируют низкую синтетическую активность (см. рис. 2, *f*; стрелка). Эти наблюдения нашли подтверждение в результатах морфометрии. Наблюдается сморщивание клеток (*t*-критерий Уэлча; $p < 0,001$; рис. 5, *a*) и уменьшение оптической плотности цитоплазмы (тест Бруннера – Мюнзеля; $p = 0,0036$;

рис. 5, *d*). Также падает площадь ядер (до 79% от интактного показателя, тест Бруннера – Мюнзеля; $p < 0,001$; рис. 5, *g*) и растет их оптическая плотность (до 171 % от интактного уровня, (*t*-критерий Уэлча; $p < 0,001$; рис. 5, *j*), что можно трактовать как признаки каріопикноза.

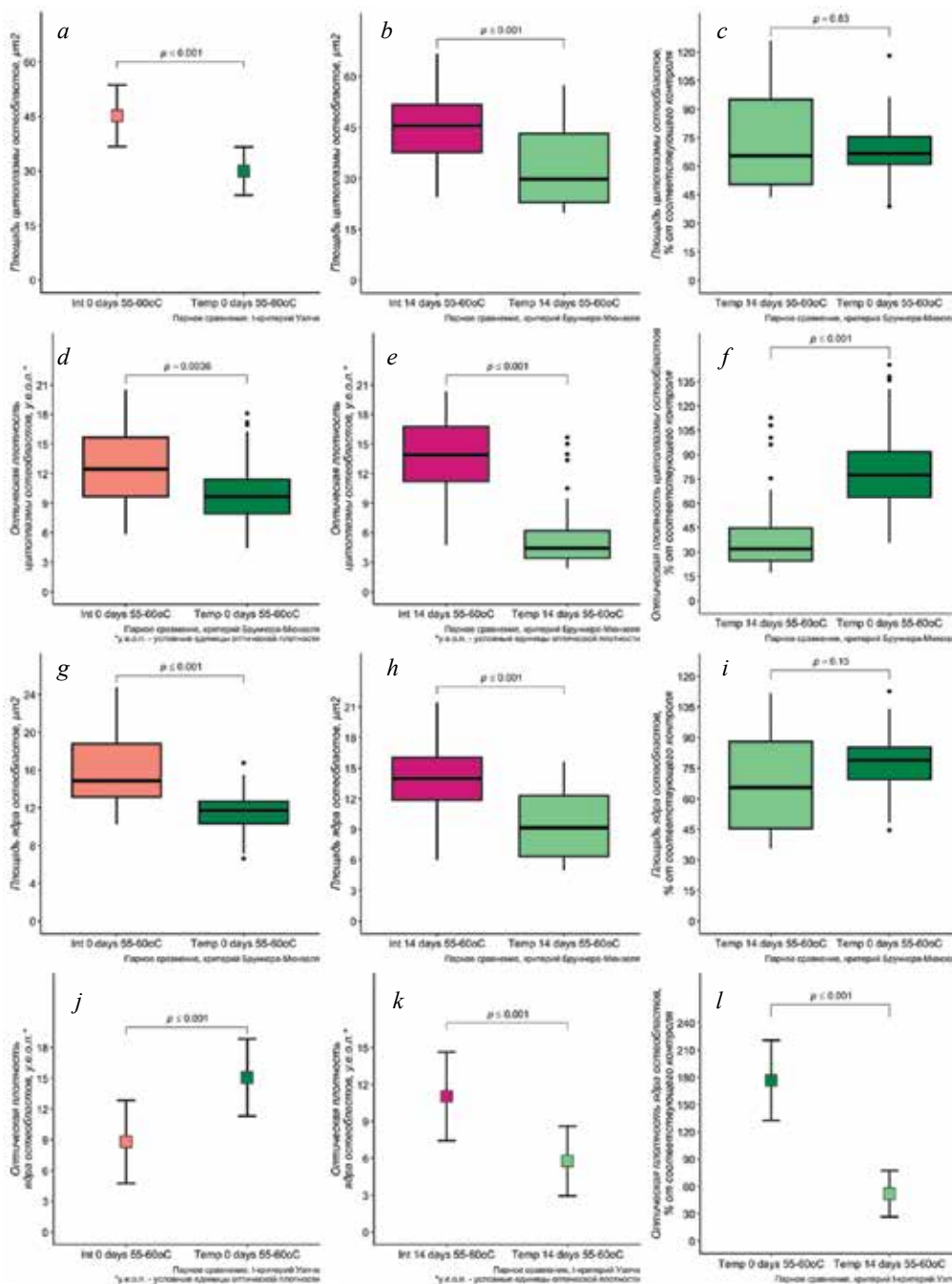


Рис. 5. Морфометрические показатели цитоплазмы (*a–f*) и ядер (*g–l*) остеобластов диафизов бедренных костей. Площадь (*a–c*) и оптическая плотность (*d–f*) цитоплазмы остеобластов в интактной кости и кости после гипертермического воздействия на 0-е сут (*a, d*), 14-е сут (*b, e*), а также в кости после гипертермического воздействия на 0-е и 14-е сут (*c, f*). Площадь (*g–i*) и оптическая плотность (*h–l*) ядер остеобластов в интактной кости и кости после гипертермического воздействия на 0-е сут (*g, j*), 14-е сут (*h, k*), а также в кости после гипертермического воздействия на 0-е и 14-е сут (*i, l*). Данные представлены в виде $Me (Q_1; Q_3)$ (*b–i*) и $X \pm SD$ (*a, j–l*). Критерий сравнения – критерий Бруннера – Мюнзеля (*b–i*), *t*-критерий Уэлча (*a, j–l*), у.е.о.п. – условные единицы оптической плотности

С точки зрения современной интерпретации полученных данных, можно предполагать гибель остеобластов путем апоптоза, описываемого как уменьшение размеров клеток вследствие уплотнения и фрагментации ядра, а также потери клеточной целостности посредством отделения апоптотических телец [39]. Уменьшение оптической плотности цитоплазмы при окраске по Эйнарсону свидетельствует о снижении содержания в ней нуклеиновых кислот (прежде всего, молекул РНК); как следствие, можно предполагать падение синтетической активности остеобластов непосредственно после прямого повреждающего влияния термоабляции в диапазоне температур 55–60 °С.

Состояние костной ткани через 14 дней после локальной термоабляции

Стандартный гистологический анализ с окраской срезов бедренных костей гематоксилином и эозином контрлатеральных костей (рис. 6, *a, c*) показал, что их диафизы сохраняют в целом нормальное строение

через 14 сут после термоабляции. Однако присутствуют полости с тканевым детритом и грануляционной тканью в эндостальной зоне (рис. 6, *a*, стрелки). Полости выстланы остеобластами (рис. 6, *c*, стрелки) с высоким содержанием нуклеиновых кислот при окраске по Эйнарсону (рис. 6, *e*, стрелка), что предполагает ремоделирование костной ткани. Описанные изменения позволяют говорить о возможности дистантного повреждающего влияния локального нагревания, опосредованного через биологические среды и интегральные системы организма.

При визуальной оценке диафизов бедренных костей под манжетой нагревателя выявлены обширные кровоизлияния (по типу гематомы) в костномозговом канале и прилегающих к эндосту областях (рис. 6, *b*, стрелки). При этом пластинчатая костная ткань эндоста при окраске гематоксилином и эозином не имеет явных признаков структурных повреждений или активной регенерации. В то же время, визуализируются лишь единичные остеобласты, слабо окрашивающиеся по Эйнарсону (рис. 6, *d, f*, стрелки).

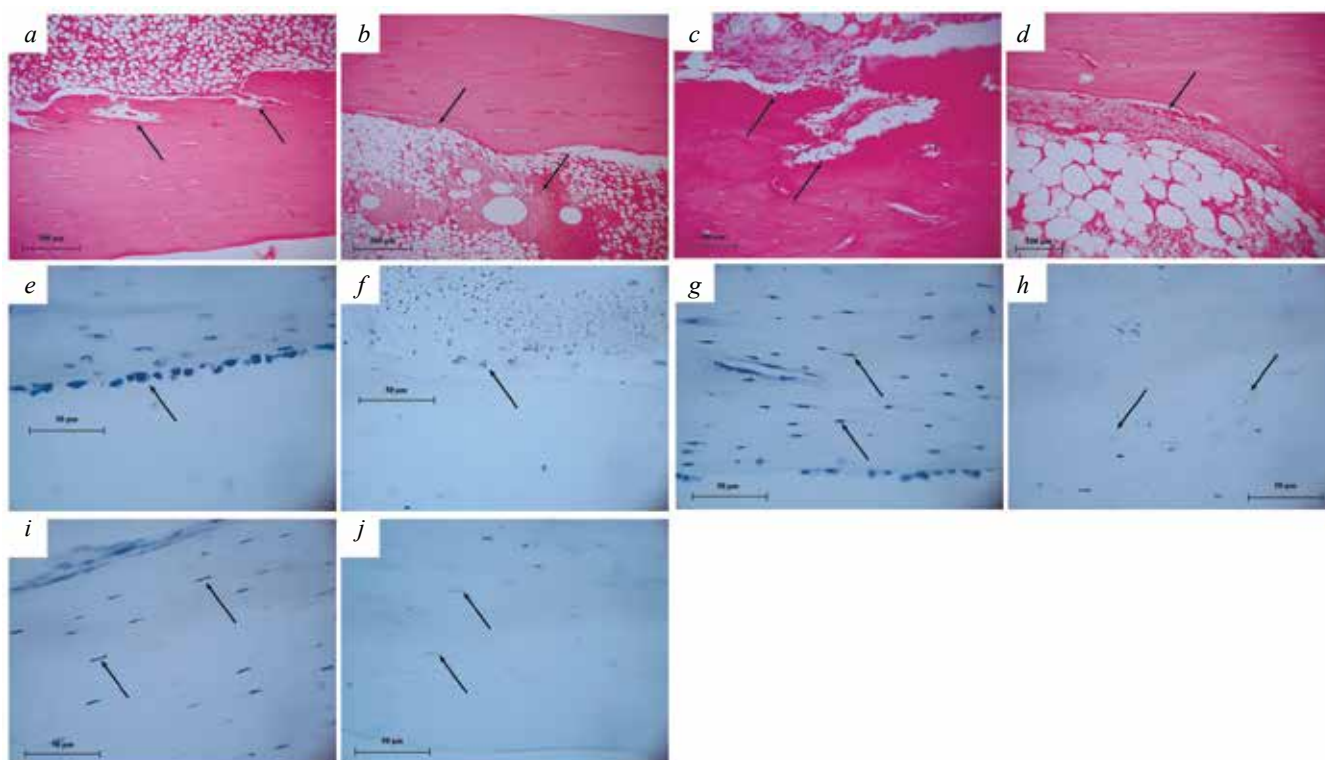


Рис. 6. Морфология intactных бедренных костей (*a, c, e, g, i*) и костей на 14-е сут после термоабляции 55–60 °С (*b, d, f, h, j*). В диафизах контрлатеральных диафизов (*a, c, e, g, i*): полости с грануляционной тканью в эндостальной области (*a*, стрелка); многочисленные активные остеобласты в эндосте и полостях (*c, e*, стрелки); остециты с крупными, интенсивно окрашенными ядрами, в эндостальной (*g*, стрелка) и периостальной (*i*, стрелки) зонах. После термоабляции (*b, d, f, h, j*): кровоизлияния в костномозговом канале и у эндоста (*b*, стрелки), единичные малоактивные остеобласты (*d, f*, стрелки), многочисленные пустые лакуны остеоцитов в эндостальной (*h*, стрелки) и периостальной (*j*, стрелки) зонах. Окраска гематоксилином и эозином (*a–d*), по методу Эйнарсона (*e–j*); $\times 50$ (*a, b*), $\times 200$ (*c, d*), $\times 630$ (*e–j*)

Ухудшение морфофункционального состояния остеобластов в зоне нагревания количественно подтверждается данными компьютерной морфометрии. Так, отмечается значительное падение в 1,5–3 раза всех измеренных показателей: площади и оптической плотности цитоплазмы, площади и оптической плотности ядер (см. рис. 5, *b, e, h, k*). Морфофункциональные изменения остеобластов трактуются в современных реалиях как признаки апоптотической формы клеточной смерти [39].

Таким образом, имеет место отсроченная гибель костных клеток, отвечающих за процессы регенерации костной ткани, в течение 2 нед после экстремального воздействия.

При морфометрическом исследовании состояния лакун остеоцитов в компактном веществе кости через 14 сут после воздействия их запустевание под периостом (см. рис. 6, *j*; стрелки) возрастало на 43% в сравнении с показателем в контралатеральной бедренной кости (тест Фишера; $p < 0,001$; см. рис. 3, *b*). Вблизи эндоста запустевание лакун после термоабляции (рис. 6, *h*, стрелки) достигало аналогичных значений (снижение на 44% от интактного контроля, тест Фишера; $p < 0,001$; рис. 3, *b*).

Через 14 сут после нагревания правых бедренных костей в диафизах контралатеральных костей остеоциты располагаются относительно равномерно, имеют крупные, округлые или веретеновидные ядра, интенсивно окрашивающиеся на нуклеиновые кислоты (рис. 6, *g, i*; стрелки). Напротив, в зоне термоабляции отмечаются многочисленные запустевающие лакуны остеоцитов (рис. 6, *h, j*; стрелки); немногочисленные выжившие остеоциты демонстрируют признаки клеточной гибели (уменьшение размеров и окрашиваемости ядер) (рис. 6, *h, j*).

Количественная оценка морфофункционального состояния морфологически идентифицируемых остеоцитов в зоне локального нагрева диафизов показала снижение оптической плотности окраски ядерной ДНК как под периостом (до 77% (тест Бруннера – Мюнзеля; $p < 0,001$); см. рис. 4, *e*), так и под эндостом (до 85% от соответствующего контроля (t -критерий Уэлча; $p = 0,0038$); рис. 4, *n*). Кроме того, под эндостом уменьшалась площадь ядер зрелых костных клеток до 86% от контроля (тест Бруннера – Мюнзеля; $p < 0,001$; рис. 4, *k*).

Сравнительный анализ состояния костной ткани сразу (0-е сут) и через 14 сут после локальной термоабляции

Ввиду того, что в исследуемых группах тестировались неинбредные кролики, исходное состояние кости у которых значительно отличается, сравнение

динамики изменений костных клеток в бедренных костях сразу (точка 0) или через 14 сут после термоабляции осуществляли в относительных единицах (% от соответствующего показателя контралатерального бедра, не подвергавшегося прямому нагреванию). Это позволило в определенной степени нивелировать влияние различного исходного (до воздействия) состояния, а также не прямой гибели клеток (например, за счет интоксикации продуктами тканевого детрита) в костной ткани в группах неинбредных животных.

Результаты показали (рис. 3, *c*), что доля запустевающих лакун с погибшими остеоцитами статистически значимо нарастала к 14-м сут с 32 до 59% под эндостом (тест Фишера; $p < 0,001$) и с 39 до 59% под периостом (тест Фишера; $p = 0,0043$). Другими словами, имеет место отсроченное (непрямое) повреждение тканевых структур компактной кости, которые не разрушились в течение процедуры высокотемпературного нагревания. При этом морфофункциональные признаки гибели остеоцитов нарастали после прекращения гипертермического воздействия вблизи эндоста, несмотря на тот факт, что интрамедуллярная температура термоабляции примерно на 5 °С меньше, чем в области периоста (под манжетой нагревателя). Так, под эндостом к 14-м сут наблюдения, в сравнении с точкой 0, происходит уменьшение площади (t -критерий Уэлча; $p < 0,001$; рис. 4, *l*) и интенсивности окраски на нуклеиновые кислоты (t -критерий Уэлча; $p = 0,0019$; рис. 4, *o*) ядер остеоцитов, а также увеличение их округлости (t -критерий Уэлча; $p = 0,0054$; рис. 4, *r*). В то же время под периостом наблюдается только снижение окраски (оптической плотности) ядер на нуклеиновые кислоты (тест Бруннера – Мюнзеля; $p < 0,001$; рис. 4, *f*).

Таким образом, после термоабляции диафизов бедренных костей кроликов при температуре 55–60 °С имеет место нарастающая гибель остеоцитов в течение первых 14 сут после экстремального воздействия. В свою очередь, со стороны остеобластов при окраске гистологических срезов диафизов по Эйнарсону на 14-е сут (в сравнении с точкой 0) происходило выраженное снижение оптической плотности как цитоплазмы (в 2,5 раза; тест Бруннера – Мюнзеля; $p < 0,001$; рис. 5, *f*), так и ядра (в 3,4 раза; t -критерий Уэлча; $p < 0,001$; рис. 5, *l*). По-видимому, функциональные нарушения синтетических процессов в делящихся клетках костной ткани также нарастают после окончания экстремального термического воздействия.

ОБСУЖДЕНИЕ

По мнению К. Ahmed и соавт. [40], чувствительность к гипертермии нормальных и опухолевых клеток приблизительно одинакова. В то же время

другие авторы считают, что опухолевые ткани имеют более низкий уровень толерантности к высоко-температурному воздействию. Это объясняется не только прямым температурным повреждением, но и совокупностью вторичных эффектов, в том числе стресс-модулирующим влиянием на иммунитет [41–43] и увеличением проницаемости хорошо развитой сосудистой сети. Соответственно, прямые и опосредованные эффекты нагревания делают опухоль уязвимой для лекарственных средств и иммунокомпетентных клеток [44–48].

На сегодняшний день имеется крайне мало информации о влиянии повышенной температуры на структурно-функциональное состояние здоровых стволовых клеток. В частности, культивирование МСК с интервалами гипертермии при небольших температурах (гипертермия до 43 °С) положительно сказывается на жизнеспособности клеток. В таких культурах МСК характеризуются усиленной пролиферацией, повышенной устойчивостью к стресс-факторам, а также замедлением процессов клеточного старения [49]. Другой особенностью является их активная дифференцировка в остеобласты и адипоциты [49].

Влияние более высоких температур описано в литературе фрагментарно. При кратковременном (в течение 45 с) воздействии температуры 58 °С в клеточной мембране возникают необратимые изменения, которые приводят к массовой гибели МСК. Однако парадокс в том, что более длительное (150 с) влияние температуры 48 °С уже не оказывало значительного влияния на метаболизм и жизнеспособность МСК [50]. В клинической практике термоабляции остеосарком нагревание проводят в течение более продолжительного времени (до 2,5 ч). В связи с этим, а также с неоднозначными литературными данными, мы провели экспериментальное исследование прямого эффекта повышения температуры окружающей среды (время воздействия до 60 мин) на выживаемость МСК *in vitro*.

Результаты показали (см. рис. 1), что экзогенная термоабляция при 56 °С уже через 15 мин приводила к морфологическим изменениям МСК (потеря псевдоподий, округление клеток), которые считаются признаками клеточной гибели путем апоптоза и (или) некроза. МТТ-тест показал метаболические внутриклеточные изменения, связанные с уменьшением жизнеспособности клеточной культуры. Дальнейшее увеличение времени термоабляции вызывало полную гибель культуры МСК *in vitro* (рис. 1). Таким образом, в процессе нагревания костной ткани МСК могут быть клетками-мишенями; их гибель неизбежно оказывает значительное влияние на ди-

намику посттравматической репаративной регенерации.

Повреждающее воздействие на костную ткань имеет место не только в процессе лечебной термоабляции первичных узлов и метастазов злокачественных опухолей. Во время операций остеосинтеза и эндопротезирования крупных суставов кость подвергается воздействию высоких температур за счет трения, возникающего при использовании хирургического инструмента, например, автоматических дрелей и (или) пил [51, 52].

Считается, что при температуре до 60 °С костная ткань способна сохранять свои морфофункциональные и биомеханические свойства [8, 9]. Последующее увеличение температуры приводит к денатурации белков, участвующих в образовании межклеточного костного матрикса [53–55], в результате чего может нарушаться целостность кости. Однако повреждение костных клеток зафиксировано и при более низких температурах. Например, в работе [56] показано, что культивация остеобластов при температуре 48 °С приводит к необратимым изменениям цитоскелета с последующей активацией апоптоза через сигнальные пути p53 и JNK. Более низкие температуры 42–45 °С сопровождаются не только обратимыми изменениями структуры актиновых филаментов, но и значительным повышением уровня белка теплового шока 70 (hsp70), который отвечает за сохранность клеток [56].

Напротив, *in vivo* установлено, что гипертермия в интервале 43–46 °С способствует процессам остеогенеза [5] и минерализации костной ткани [6]; максимальный эффект развивается через 2 нед после теплового стресса [7]. Вместе с тем на сегодняшний день практически отсутствуют данные о состоянии костных клеток после локального термического воздействия в режиме термоабляции (выше 55 °С).

В нашей работе объектом исследования *in vivo* были выбраны кролики, которые часто используются для изучения состояния костной ткани и суставов при повреждениях и лечебных манипуляциях [57]. Следует подчеркнуть, что в работе [58] были выявлены существенные разбросы в морфометрических показателях бедренных костей кроликов, не подвергавшихся прямому повреждающему воздействию термоабляции. В работе [59] значительная вариабельность маркеров костной ткани выявлена также у людей. В связи с этим при проведении статистической обработки и сравнении результатов локальной термоабляции мы основывались на принципах персонализированной биомедицины. Для каждого животного нормализовали морфометрические индексы относительно соответствующих значений в контра-

латеральных бедренных костях, не подвергавшихся прямой локальной термоабляции, как описано нами ранее [10].

Остеоциты представляют собой консервативную популяцию клеток, неспособную к самоподдержанию (митотическому делению); они образуются из клеток-предшественников остеобластов [60]. Несмотря на низкую синтетическую активность, их роль в метаболизме костной ткани достаточно значима, они активно участвуют в регуляции обновления костного матрикса посредством различных механосенсорных механизмов [58]. Остеобласты – синтетически активные клетки, потомки МСК, которые локализуются преимущественно в эндосте и надкостнице, участвуют в синтезе межклеточного костного матрикса [61].

Полученные нами результаты показали (см. рис. 3–5), что в зоне локальной термоабляции диафизов бедренных костей, непосредственно после нагревания (55–60 °С в костномозговом канале, 60–65 °С под манжетой со стороны периоста), при стандартной окраске срезов гематоксилином и эозином или по Эйнарсону (для нуклеиновых кислот), отмечены морфофункциональные изменения (в сравнении с состоянием клеток в контралатеральной бедренной кости), в большей степени со стороны остеобластов (см. рис. 5). Их можно интерпретировать как клеточную гибель путем апоптоза, сопровождающуюся уменьшением размеров клеток вследствие уплотнения и фрагментации ядер, потери клеточной целостности посредством отделения апоптотических телец [39] и снижением синтеза нуклеиновых кислот.

В то же время в период восстановления костной ткани (14 сут после термического воздействия) в костных клетках синтетические процессы продолжали снижаться. Это происходит из-за дальнейшего уменьшения оптической плотности ядер и цитоплазмы клеток в сравнении с показателями сразу после нагревания (см. рис. 3, с; 4, f, l, o, r; 5, f, l). С точки зрения морфологических изменений в костных клетках, идентификация различных форм клеточной смерти (апоптоз, аутофагия, разновидности некроза) сложна и постоянно совершенствуется [62]. Тем не менее описанные выше признаки их морфофункциональных изменений можно классифицировать как клеточную смерть, в большей степени путем апоптоза. В свою очередь, нарастающее в динамике 14-суточного наблюдения запустевание костных лакун (рис. 3, с) как признак цитолита остеоцитов рассматривается в пользу некротического фенотипа [39].

Таким образом, термоабляция диафизов бедренных костей кроликов в диапазоне интрамедуллярных температур 55–60 °С, помимо прямого повреждающего влияния «под лучом», обладает длительным

периодом последствия («следовой эффект»), проявляющимся морфофункциональными признаками гибели как остеобластов, так и остеоцитов (в первую очередь, в области эндоста). Как следствие, ожидаемое постстрессорное восстановление костной ткани со стороны эндоста, несмотря на меньшую температуру нагрева, гипотетически должно быть более медленным в сравнении с периостом. Действительно, в предыдущем исследовании [10] мы зафиксировали раннюю регенерацию костной ткани, прежде всего, в области периоста, которая начиналась с области проксимального метафиза бедренной кости, не подвергавшегося термоабляции.

При термоабляции диафизов бедренных костей кроликов в диапазоне 55–60 °С мы не отметили гистологических признаков перелома бедра в ранний послеоперационный период. Тем не менее наблюдается прогрессирующая 14-суточная гибель костных клеток, которая может иметь последствия в поздние сроки хирургических процедур остеосинтеза и эндопротезирования [63].

Таким образом, эксперименты *in vitro* показали высокую термочувствительность МСК к температуре 56 °С уже в первые 15 мин прямого нагревания. В условиях *in vivo* костная ткань, по-видимому, экранирует прямое повреждающее действие 30-минутной термоабляции (55–60 °С в костномозговом канале, 60–65 °С под манжетой со стороны периоста) на остеоциты и остеобласты. Защитный эффект может иметь значение при коротких интервалах нагрева кости, например при работе электрических дрейлей и (или) пил в условиях ортопедотравматологических манипуляций [64]. Тем не менее 30 мин термоабляции достаточно для инициации механизмов отсроченной клеточной гибели.

В русле концепции остеоиммунологии отсроченные процессы гибели костных клеток могут быть опосредованы провоспалительными макрофагами, как это описано для хондроцитов [65]. В частности, при пироптозе отмечается выделение во внеклеточную среду большого числа внутриклеточных пептидных фрагментов, которые могут препятствовать клеточной адгезии [66, 67], что приводит, в свою очередь, к апоптозу неповрежденных остеобластов [68].

В условиях термического повреждения МСК возникает «порочный круг» гибели и нарушения регенерации костного дифферона, который может способствовать длительному периоду восстановления популяций костных клеток в диафизах бедренных костей, подвергшихся местной термоабляции при интрамедуллярной температуре 55–60 °С. Как следствие, процессы ремоделирования поврежденной кости будут во многом определяться интенсивно-

стью остеокондукции из неповрежденных участков, например, метафизов, как это было отмечено нами ранее [10].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При экзотермическом воздействии уже через 15 мин со стороны культуры МСК человека наблюдается уменьшение размеров клеток, изменение состояния цитоплазмы, потеря псевдоподий и округление, что предполагает клеточную гибель путем апоптоза, как частного случая апоптоза. Через 30 мин нагревания фибробластоподобные клетки практически не встречаются.

В условиях *in vivo*, непосредственно после однократной процедуры 30-минутного локального нагрева диафизов бедренных костей у кроликов, в компактном веществе кости под периостом, но не эндостом, отмечается достоверное увеличение доли (в сравнении с состоянием контралатеральной бедренной кости) запустевающих лакун остеоцитов. Более высокая температура прогрева периоста (~ на 5 °С) обуславливает и более высокие цифры (на 8%) клеточной смерти в сравнении с эндостом. В свою очередь, имеет место уменьшение площади остеобластов и концентрации нуклеиновых кислот (синтетической активности) в цитоплазме, а также снижение площади ядер с увеличением их оптической плотности, что можно расценивать как морфологические признаки клеточной гибели путем апоптоза.

Интересно, что через 14 сут после локальной термоабляции диафизов бедренных костей кроликов признаки отсроченного повреждения костных лакун нарастают. Морфометрические показатели гибели костных клеток (остеобластов, остеоцитов) также статистически значимо увеличивались; при этом остециты погибали, прежде всего, в области эндоста, а не периоста, как было зафиксировано сразу после прямого гипертермического воздействия.

Таким образом, даже невысокие режимы термоабляции в интервале температур 55–65 °С обладают значительным, нарастающим в динамике 14-суточного наблюдения, повреждающим потенциалом в отношении костных клеток, от стволовых до зрелых форм. Полученные результаты следует учитывать в практике комбинированного лечения доброкачественных и злокачественных опухолей и метастатических поражений костной ткани, поскольку с точки зрения персонализированной биомедицины индивидуальная реакция здоровых и патологически измененных клеток на нагревание во многом определяет исход терапевтических манипуляций и репаративных процессов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Huang S., Jin M., Su N., Chen L. New insights on the reparative cells in bone regeneration and repair. *Biological Reviews*. 2021;96(2):357–375. DOI: 10.1111/brv.12659.
- Trompet D., Melis S., Chagin A.S., Maes C. Skeletal stem and progenitor cells in bone development and repair. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2024;39(6):633–654. DOI: 10.1093/jbmr/zjae069.
- Анисеня И.И., Ситников П.К., Пахмурин Д.О., Пахмурина В.В., Васильев Н.В., Зельчан Р.В. и др. Радикальная интраоперационная термоабляция остеогенной саркомы: клиническое наблюдение. *Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи*. 2023;15(3):34–45. DOI: 10.17650/2782-3687-2023-15-3-34-45.
- Payne M., Bossmann S.H., Basel M.T. Direct treatment versus indirect: Thermo-ablative and mild hyperthermia effects. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2020;12(5): e1638. DOI: 10.1002/wnan.1638.
- Ota T., Nishida Y., Ikuta K., Kato R., Kozawa E., Hamada S. et al. Heat-stimuli-enhanced osteogenesis using clinically available biomaterials. *PLoS One*. 2017;12(7): e0181404. DOI: 10.1371/journal.pone.0181404.
- Leon S.A., Asbell S.O., Arastu H.H., Edelstein G., Packer A.J., Sheehan S. et al. Effects of hyperthermia on bone. II. Heating of bone in vivo and stimulation of bone growth. *International Journal of Hyperthermia*. 1993;9(1):77–87. DOI: 10.3109/02656739309061480.
- Ikuta K., Urakawa H., Kozawa E., Hamada S., Ota T., Kato R. et al. In vivo heat-stimulus-triggered osteogenesis. *International Journal of Hyperthermia*. 2015;31(1):58–66. DOI: 10.3109/02656736.2014.988662.
- Pakhmurin D., Pakhmurina V., Kashin A., Kulkov A., Khlusov I., Kostyuchenko E. et al. Compressive strength characteristics of long tubular bones after hyperthermal ablation. *Symmetry (Basel)*. 2022;14(2):303. DOI: 10.3390/sym14020303.
- Pakhmurin D., Pakhmurina V., Kashin A., Kulkov A., Khlusov I., Kostyuchenko E. et al. Mechanical and histological characteristics of human tubular bones after hyperthermal treatment. *Symmetry (Basel)*. 2023;15(1):156. DOI: 10.3390/sym15010156.
- Горохова А.В., Насибов Т.Ф., Порохова Е.Д., Бариев У.А., Носов В.Е., Пахмурин Д.О. и др. Состояние костной ткани в ранние сроки восстановления после термического воздействия. *Морфология*. 2024;162(3):298–315. DOI: 10.17816/morph.634692.
- Flour M.P., Ronot X., Vincent F., Benoit B., Adolphe M. Differential temperature sensitivity of cultured cells from cartilaginous or bone origin. *Biology of the Cell*. 1992;75(1):83–87. DOI: 10.1016/0248-4900(92)90127-M.
- Rühle A., Thomsen A., Saffrich R., Voglstätter M., Bieber B., Sprave T. et al. Multipotent mesenchymal stromal cells are sensitive to thermic stress—potential implications for therapeutic hyperthermia. *International Journal of Hyperthermia*. 2020;37(1):430–441. DOI: 10.1080/02656736.2020.1758350.
- Piras A., la Vecchia M., Boldrini L., D'Aviero A., Galanti D., Guarini A. et al. Radiofrequency thermoablation (RFA) and

- radiotherapy (RT) combined treatment for bone metastases: A systematic review. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2021;25(10):3647-3654. DOI: 10.26355/eurrev_202105_25930.
14. Ringe K.I., Panzica M., Von Falck C. Thermoablation of bone tumors. *RöFo-Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der bildgebenden Verfahren*. 2016;188(06):539–550. DOI: 10.1055/s-0042-100477.
15. Brace C. Thermal tumor ablation in clinical use. *IEEE Pulse*. 2011;2(5):28–38. DOI: 10.1109/MPUL.2011.942603.
16. Zhao Z., Du Y., Yan K., Zhang L., Guo Q. Exercise and osteoimmunology in bone remodeling. *The FASEB Journal*. 2024;38(7):e23554. DOI: 10.1096/fj.202301508RRR.
17. Khlusov I., Yurova K., Shupletsova V., Khaziakhmatova O., Malashchenko V., Kudryavtseva V. et al. Microcapsule-Based Dose-Dependent Regulation of the Lifespan and Behavior of Adipose-Derived MSCs as a Cell-Mediated Delivery System: *In Vitro* Study. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;24(1):292. DOI: 10.3390/ijms24010292.
18. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F.C., Krause D.S. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315–317. DOI: 10.1080/14653240600855905.
19. Evtushenko D.N., Fateev A.V., Khainovsky M.A., Polishchuk J., Kokorev O.V., Nasibov T.F. et al. Intermolecular interactions, regioselectivity, and biological activity of l-ascorbic acid, nicotinic acid and their co-crystal. *Cryst. Eng. Comm.* 2024;26(46):6650–6666. DOI: 10.1039/D4CE00770K.
20. Пахмурин Д.О., Пахмурина В.В., Анисеня И.И., Ситников П.К. Экспериментальное изучение распределения температуры в длинных трубчатых костях при периостальном расположении нагревателей. *Сибирский онкологический журнал*. 2023;22(2):65–75. DOI: 10.21294/1814-4861-2023-22-2-65-75.
21. Саркисов Д.С., Петров Ю.Л. Микроскопическая техника. М.: Медицина, 1996:544.
22. Pearse A.G.E. Histochemistry, Theoretical and applied: theoretical and applied. London: Churchill Livingstone. 1968:759.
23. Луппа Х. Основы гистохимии. М.: Мир, 1980:343.
24. Шахов В.П., Хлусов И.А., Дамбаев Г.Ц., Зайцев К.В., Салмина А.Б., Шахова С.С. и др. Введение в методы культуры клеток, биоинженерии органов и тканей. Томск: STT, 2004:385.
25. Korkmaz S., Goksuluk D., Zararsiz G. MVN: An R package for assessing multivariate normality. *The R Journal*. 2014;6(2):151–162.
26. Documentation for package 'stats' version 4.4.1. The R Stats Package [Internet]. Available: [cited 2024 Jul 21]. URL: Available from: <https://search.r-project.org/R/refmans/stats/html/00Index.html>
27. Brunnermunzel (version 2.0). Rdocumentation [Internet]. Available: [cited 2024 Jul 21]. URL: Available from: <https://www.rdocumentation.org/packages/brunnermunzel/versions/2.0>
28. Royston P. Remark AS R94: A Remark on Algorithm AS 181: The W-test for Normality. *Journal of the Royal Statistical Society. Series C (Applied Statistics)*. 1995;44(4):547–551. DOI: 10.2307/2986146.
29. Smith H.F. The problem of comparing the results of two experiments with unequal errors. *Journal of the Council for Scientific and Industrial Research*. 1936;9:211–212.
30. Satterthwaite F.E. An approximate distribution of estimates of variance components. *Biometrics Bulletin*. 1946;2(6):110–114. DOI: 10.2307/3002019.
31. Welch B.L. The Significance of the difference between two means when the population variances are unequal. *Biometrika*. 1938;29(3/4):350–362. DOI: 10.2307/2332010.
32. Moser B.K., Stevens G.R., Watts C.L. The Two-Sample T Test Versus Satterthwaite's Approximate F Test. *Communications in Statistics – Theory and Methods*. 1989;18(11):3963–3975. DOI: 10.1080/03610928908830135.
33. Ruxton G.D. The unequal variance t-test is an underused alternative to Student's t-test and the Mann – Whitney U test. *Behavioral Ecology*. 2006;17(4):688–690. DOI: 10.1093/beheco/ark016.
34. Zimmerman D.W., Zumbo B.D. Rank transformations and the power of the Student t test and Welch t' test for non-normal populations with unequal variances. *Canadian Journal of Experimental Psychology/Revue canadienne de psychologie expérimentale*. 1993;47(3):523–539. DOI: 10.1037/h0078850.
35. Brunner E., Munzel U. The nonparametric chi-square-Fisher problem: asymptotic theory and a small-sample approximation. *Biometrical Journal*. 2000;42(1):17–25. DOI: 10.1002/(SICI)1521-4036(200001)42:1<17::AID-BIMJ17>3.0.CO;2-U.
36. Munzel U., Brunner E. Nonparametric tests in the unbalanced multivariate one-way design. *Biometrical Journal*. 2000;42(7):837–854. DOI: 10.1002/1521-4036(200011)42:7<837::AID-BIMJ837>3.0.CO;2-S.
37. Karch J.D. Psychologists should use Brunner-Munzel's instead of Mann-Whitney's U Test as the default nonparametric procedure. *Advances in Methods and Practices in Psychological Science*. 2021;4(2):2515245921999602. DOI: 10.1177/2515245921999602.
38. Noguchi K., Konietzschke F., Marmolejo-Ramos F., Pauly M. Permutation tests are robust and powerful at 0.5% and 5% significance levels. *Behavior Research Methods*. 2021;53(6):2712–2724. DOI: 10.3758/s13428-021-01595-5.
39. Galluzzi L., Maiuri M.C., Vitale I., Zischka H., Castedo M., Zitvogel L. et al. Cell death modalities: Classification and pathophysiological implications. *Cell Death & Differentiation*. 2007;14(7):1237–1243. DOI: 10.1038/sj.cdd.4402148.
40. Ahmed K., Tabuchi Y., Kondo T. Hyperthermia: an effective strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Apoptosis*. 2015;20(11):1411–1419. DOI: 10.1007/s10495-015-1168-3.
41. Suzuki M., Shinkai M., Honda H., Kobayashi T. Anticancer effect and immune induction by hyperthermia of malignant melanoma using magnetite cationic liposomes. *Melanoma Research*. 2003;13(2):129–135. DOI: 10.1097/00008390-200304000-00004.
42. Vaupel P.W., Kelleher D.K. Metabolic status and reaction to heat of normal and tumor tissue in thermoradiotherapy and thermochemotherapy. Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1995:483.

43. Yanase M., Shinkai M., Honda H., Wakabayashi T., Yoshida J., Kobayashi T. Antitumor immunity induction by intracellular hyperthermia using magnetite cationic liposomes. *Japanese Journal of Cancer Research*. 1998;89(7):775–782. DOI: 10.1111/j.1349-7006.1998.tb03283.x.
44. Fisher D.T., Chen Q., Skitzki J.J., Muhitch J.B., Zhou L., Appenheimer M.M. et al. IL-6 trans-signaling licenses mouse and human tumor microvascular gateways for trafficking of cytotoxic T cells. *Journal of Clinical Investigation*. 2011;121(10):3846–3859. DOI: 10.1172/JCI44952.
45. Kong G., Braun R.D., Dewhirst M.W. Characterization of the effect of hyperthermia on nanoparticle extravasation from tumor vasculature. *Cancer Research*. 2001;61(7):3027–3032.
46. Meyer R.E., Braun R.D., Rosner G.L., Dewhirst M.W. Local 42°C hyperthermia improves vascular conductance of the R3230Ac rat mammary adenocarcinoma during sodium nitroprusside infusion. *Radiation Research*. 2000;154(2):196–201. DOI: 10.1667/0033-7587(2000)154[0196:LCHIVC]2.0.CO;2.
47. Song C.W., Shakil A., Griffin R.J., Okajima K. Improvement of tumor oxygenation status by mild temperature hyperthermia alone or in combination with carbogen. *Seminars in Oncology*. 1997;24(6):626–632.
48. Toraya-Brown S., Sheen M.R., Zhang P., Chen L., Baird J.R., Demidenko E. et al. Local hyperthermia treatment of tumors induces CD8+ T cell-mediated resistance against distal and secondary tumors. *Nanomedicine*. 2014;10(6):1273–1285. DOI: 10.1016/j.nano.2014.01.011.
49. Choudhery M.S., Badowski M., Muise A., Harris D.T. Effect of mild heat stress on the proliferative and differentiative ability of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2015;17(4):359–368. DOI: 10.1016/j.jcyt.2014.11.003.
50. Reissis Y., García-Gareta E., Korda M., Blunn G.W., Hua J. The effect of temperature on the viability of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*. 2013;4(6):139. DOI: 10.1186/scrt350.
51. Lavelle C., Wedgwood D. Effect of internal irrigation on frictional heat generated from bone drilling. *Journal of Oral Surgery*. 1980;38(7):499–503.
52. Tetsch P. Development of raised temperature after osteotomies. *Journal of maxillofacial surgery*. 1974;2:141–145. DOI: 10.1016/S0301-0503(74)80030-5.
53. Eriksson A., Albrektsson T., Grane B., McQueen D. Thermal injury to bone: A vital-microscopic description of heat effects. *International Journal of Oral Surgery*. 1982;11(2):115–121. DOI: 10.1016/S0300-9785(82)80020-3.
54. Lehnartz E. Einführung in die Chemische Physiologie. Heidelberg: Springer Berlin, 1959:627. DOI: 10.1007/978-3-642-86501-5.
55. Matthews L.S., Hirsch C. Temperatures measured in human cortical bone when drilling. *The Journal of Bone & Joint Surgery*. 1972;54(2):297–308.
56. Li S., Chien S., Brånemark P.I. Heat shock-induced necrosis and apoptosis in osteoblasts. *Journal of Orthopaedic Research*. 1999;17(6):891–899. DOI: 10.1002/jor.1100170614.
57. Qi H., Jin S., Yin C., Chen L., Sun L., Liu Y. Radial extracorporeal shock wave therapy promotes osteochondral regeneration of knee joints in rabbits. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2018;16(4):3478–3484. DOI: 10.3892/etm.2018.6631.
58. Robling A.G., Bonewald L.F. The osteocyte: new insights. *Annual Review of Physiology*. 2020;82(1):485–506. DOI: 10.1146/annurev-physiol-021119-034332.
59. Дружинина Т.В., Хлусов И.А., Карлов А.В., Ростовцев А.В. Маркеры остеогенеза в периферической крови как патогенетические факторы и предикторы системных эффектов имплантатов для остеосинтеза. *Гений ортопедии*. 2007;4:83–88.
60. Tate M.L.K., Adamson J.R., Tami A.E., Bauer T.W. The osteocyte. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2004;36(1):1–8. DOI: 10.1016/S1357-2725(03)00241-3.
61. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143–147. DOI: 10.1126/science.284.5411.143.
62. Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S.A., Abrams J.M., Adam D., Agostinis P. et al. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the nomenclature committee on cell death 2018. *Cell Death & Differentiation*. 2018;25(3):486–541. DOI: 10.1038/s41418-017-0012-4.
63. Ruggiero C., Bonamassa L., Pelini L., Prioletta I., Cianferotti L., Metozzi A. et al. Early post-surgical cognitive dysfunction is a risk factor for mortality among hip fracture hospitalized older persons. *Osteoporosis International*. 2017;28(2):667–675. DOI: 10.1007/s00198-016-3784-3.
64. Shu L., Bai W., Shimada T., Ying Z., Li S., Sugita N. Thermographic assessment of heat-induced cellular damage during orthopedic surgery. *Medical Engineering & Physics*. 2020;83:100–105. DOI: 10.1016/j.medengphy.2020.05.014.
65. Ebata T., Terkawi M.A., Kitahara K., Yokota S., Shiota J., Nishida Y. et al. Noncanonical pyroptosis triggered by Mmacrophage-derived extracellular vesicles in chondrocytes leading to cartilage catabolism in osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatology*. 2023;75(8):1358–1369. DOI: 10.1002/art.42505.
66. Frisch S.M., Ruoslahti E. Integrins and anoikis. *Current Opinion in Cell Biology*. 1997;9(5):701–706. DOI: 10.1016/S0955-0674(97)80124-X.
67. Ruoslahti E., Reed J. New way to activate caspases. *Nature*. 1999;397(6719):479–480. DOI: 10.1038/17229.
68. Adams C.S., Shapiro I.M. Mechanisms by which extracellular matrix components induce osteoblast apoptosis. *Connective Tissue Research*. 2003;44(1):230–239. DOI: 10.1080/03008200390181717.

Вклад авторов

Хлусов И.А. – разработка дизайна исследования, написание и редактирование рукописи статьи. Кокорев О.В. – проведение *in vitro* исследования. Матюшков С.Ю., Анисеня И.И., Ситников П.К. – проведение экспериментального исследования *in vivo*, Порохова Е.Д., Лещенкова А.В., Рыжкова А.Ю. – проведение гистологического исследования, подготовка иллюстративного ма-

териала. Насибов Т.Ф., Горохова А.В. – статистическая обработка и анализ данных. Пахмурин Д.О. – разработка идеи и концепция исследования.

Информация об авторах

Хлусов Игорь Альбертович – д-р мед. наук, профессор кафедры морфологии и общей патологии, руководитель лаборатории клеточных и микрофлюидных технологий, СибГМУ; вед. науч. сотрудник, лаборатория «Медтех», ТУСУР, г. Томск, khlusov63@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3465-8452>

Насибов Темура Фиррудин оглы – лаборант-исследователь, кафедра морфологии и общей патологии, СибГМУ, г. Томск, temur.nsbv@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-8056-3967>

Горохова Анна Владимировна – лаборант-исследователь, кафедра морфологии и общей патологии, СибГМУ, г. Томск, a.gorokhova3062@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-8401-7181>

Порохова Екатерина Даниловна – ассистент-исследователь, кафедра морфологии и общей патологии, СибГМУ; мл. науч. сотрудник, лаборатория «Медтех», ТУСУР, г. Томск, porokhova_e@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7317-2036>

Кокорев Олег Викторович – д-р мед. наук, профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, СибГМУ, г. Томск, kokorev.ov@ssmu.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3690-0177>

Лешенкова Анастасия Владимировна – студентка, медико-биологический факультет СибГМУ, г. Томск, nasya14.a@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0003-5358-9795>

Рыжкова Алина Юрьевна – студентка, медико-биологический факультет СибГМУ, г. Томск, alya.ryzhkova.20031@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-7862-7992>

Пахмурин Денис Олегович – канд. техн. наук, доцент, зав. лабораторией «Медтех» ТУСУР; доцент кафедры медицинской и биологической кибернетики, СибГМУ, г. Томск, pdo@ie.tusur.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5191-6938>

Анисеня Илья Иванович – канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, отделение общей онкологии, НИИ онкологии, Томский НИМЦ; науч. сотрудник, лаборатория «Медтех», ТУСУР, г. Томск, aii@mail.tsu.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3882-4665>

Ситников Павел Константинович – врач-онколог, отделение общей онкологии, НИИ онкологии, Томский НИМЦ; мл. науч. сотрудник, лаборатория «Медтех», ТУСУР, г. Томск, sitnikov.pavel.k@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0674-2067>

Матюшков Сергей Юрьевич – мл. науч. сотрудник, лаборатория «Медтех», ТУСУР, г. Томск, djmatart@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0003-8916-9995>

(✉) **Хлусов Игорь Альбертович**, khlusov63@mail.ru

Поступила в редакцию 23.08.2025;
одобрена после рецензирования 03.09.2025;
принята к публикации 04.09.2025