

# ФОРМИРОВАНИЕ И ПЕРЕСТРОЙКА МИНЕРАЛЬНОГО МАТРИКСА КОСТНОЙ ТКАНИ

(Обзор литературы и собственные данные)

А.С. АВРУНИН, Н.В. КОРНИЛОВ, И.Д. ИОФФЕ, Н.Н. КОРНИЛОВ

Лаборатория изотопных исследований (научный руководитель — д. м. н. А. С. Аврунин) Российского НИИ травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена (директор — з. д. н. РФ, член-корр. РАМН, проф. Н.В. Корнилов)

На основании анализа литературы и собственных данных авторы описывают механизмы формирования и перестройки минерального матрикса костной ткани. Подчеркивается тот факт, что попеременное преобладание созидания и разрушения минерального матрикса имеет околонедельную периодичность и за половину этого срока минеральная плотность в среднем меняется на 2% — 4% от исходной величины. Для исключения диагностических ошибок рекомендованы многократные (не менее 5 раз) повторные исследования с интервалом 3 — 10 суток и выделением основной тенденции (тренда) изменения показателя.



Скелет человека составляет около 15% общей массы тела [11], а минеральный матрикс — 65% массы костной ткани [24]. В нем содержится порядка 98% всех неорганических веществ организма (99% кальция, 87% фосфора, 58% магния, 46% натрия и 20% микроэлементов) [8]. Основными компонентами минерального матрикса являются кристаллический гидроксиапатит  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  и аморфный фосфат кальция  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . В эксперименте формирование кристаллов апатита происходит путем или быстрой (с образованием первичных кристаллов), или медленной кристаллизации (из аморфного фосфата кальция) [17].

Ядрообразователем кристаллизации служит костный сиалопротеин, который располагается в межфибриллярных отверстиях [22, 28]. Минеральные ядра представляют собой тонкий слой фосфата кальция. Эти ядра постепенно растут, достигая толщины приблизительно 3 нм, что соответствует максимальному размеру межфибриллярного промежутка [20].

Остеопонтин контролирует образование правого типа кристалла, а остеокальцин и остеоонектин — его размеры и скорость создания [28]. Кристаллы ориентированы таким образом, что их продольная ось параллельна оси фибрилл. Стереохимическое соотношение  $\text{Ca}/\text{P}$  в кристаллическом апатите колеблется от 1,37 до 1,67, в аморфном фосфате оно относительно постоянно — 1,5, и в этой фазе может находиться до 50% всех минеральных солей [8, 12].

Минеральные структуры начинают формироваться через 8 дней после появления органического матрикса [21]. При этом последний первоначально подвергается воздействию ферментов, в том числе нейтральных металлопротеиназ [19]. Одним из элементов этой ферментной обработки является гидролиз протеогликанов, которые подавляют процесс образования минеральных структур. Их ингибирующая активность определяется степенью сульфатирования [17, 19].

В зависимости от условий возможно образование нескольких фаз фосфата кальция. Наименее растворимый гидроксиапатит возникает в нейтральной или основной среде. При кислых рН часто появляются минералы типа дикальцийфосфодигидрат и октакаль-

цийфосфат. Даже в идеальных условиях формирования наименее растворимого гидроксиапатита нестереохимическая преципитация предполагает недостатки в структуре минерала. И дикальцийфосфодигидрат, и октакальцийфосфат, по-видимому, служат предшественниками при формировании апатита. Это может происходить на начальном этапе их преципитации, сопровождающемся продуцированием большего количества фаз апатита. Хотя эти кислые фазы фосфата часто обнаруживаются в процессе кристаллизации *in vitro*, при изучении остеогенеза *in vivo* они выявляются редко. В последнем случае ситуация еще больше усложняется присутствием большого количества различных ионов и молекул, которые могут быть включены в кристаллическую решетку или адсорбированы на кристаллических поверхностях. В биологическом апатите дикальцийфосфодигидрат и октакальцийфосфат обычно встречаются только во время патологической кальцификации, где величина рН зачастую относительно низка. При нормальной *in vivo* кальцификации эти фазы не найдены, что предполагает участие других предшественников или наличие первоначально аморфной фазы фосфата кальция, который в последующем преобразуется в апатит [25].

Минералы кости отличаются от минералов в других тканях. Так, изучение образцов депротенизированных сухожилий ног индюшек с различной степенью кальцификации показало, что неорганическая фаза состоит из плохо кристаллизованного В-карбонатного апатита. При нарастающей кальцификации размер кристаллического апатита и его тепловая стабильность увеличиваются, а относительное содержание магния уменьшается. При этом параметры решетки апатита не изменяются, так как кристаллы становятся большими. Имеется количественная связь между относительным содержанием магния и длительностью преобразования апатита в В-трикальцийфосфат под влиянием температуры. Находящиеся в промежутках коллагеновых фибрилл кристаллы меньшего размера богаче магнием, чем более длинные [15].

В настоящее время превалирует теория, сторонники которой связывают минерализацию органического матрикса с процессами, происходящими в мат-

риксных пузырьках. Последние формируются остеобластами и содержат липиды, кальций, а также пирофосфатазу и щелочную фосфатазу. Эти ферменты разрушают ингибиторы кальцификации и гидролизуют фосфорные эфиры с образованием свободных фосфатов. Наступает локальное увеличение содержания фосфатов, что приводит к появлению минеральных структур [14, 19]. Активность щелочной фосфатазы выявлена на внешней поверхности плазматических мембран остеобластов, в матричных пузырьках, а также среди некальцинированных фибрилл коллагена в костной ткани остеоида. В области максимальной кальцификации фосфатазная активность низкая или отсутствует. Щелочная фосфатаза транспортируется из клеток в костный матрикс ассоциированно с матричными пузырьками и компонентами плазматических мембран, и ее действие описано в минерализованном матриксе костей [16].

Впервые мнение о ведущей роли щелочной фосфатазы в локальном повышении концентрации фосфатов высказал Robinson [29]. Он предположил, что подобный эффект достигается при отщеплении остатков фосфорных кислот от гексозофосфатов или глисеофосфатов под ее влиянием. В результате меняется пропорция свободных фосфат-ионов и ионов кальция, что стимулирует процесс формирования минеральных структур.

По мнению Caverzasio и Bonjour [18], местное возрастание содержания неорганического фосфата реализуется посредством сложного транспортного механизма. Остеобластические клетки осуществляют его транслокацию из системного в скелетный внеклеточный компартмент. Этот механизм функционирует в остеогенных клетках и проводит  $\text{Na}^+$ -зависимый транспорт неорганического фосфата через плазматические мембраны. Он регулируется остеотропными факторами, в том числе паратгормоном, паратгормон-связывающим белком, инсулинподобным фактором роста 1, тромбоцитарным фактором роста. Транспортная единица неорганического фосфата идентифицирована также в матричных пузырьках. Она обеспечивает накопление в них фосфатов и может рассматриваться как основа индукции процесса кальцификации. При этом модулирующее влияние остеотропных факторов на транспортный механизм также смещено к матричным пузырькам. Таким образом, гормональные и другие факторы (ионы кальция и неорганического фосфата) могут непосредственно регулировать механизм транспорта неорганического фосфата не только в остеогенных клетках, но и в матричных пузырьках, то есть инициировать минерализацию костей. Основным медиатором регуляции этого механизма после взаимодействия паратгормона с паратгормон-связывающим белком является цАМФ.

На основании электронно-микроскопического исследования матричных пузырьков в зоне фронта кальцификации, проведенного Sela с соавторами [30] на 3-е, 6-е, 8-е, 12-е, 14-е, 18-е, 21-е, 23-е и 28-е сутки после травмы большеберцовой кости у крыс, были выделены следующие везикулярные типы: пустой,

аморфный, кристаллический и разорванный. Средний диаметр большинства пузырьков колебался в пределах 100,3 – 121,9 нм, а среднее расстояние их от фронта кальцификации составляло менее 976,6 нм. Везикулярная плотность (рассчитанная как количество на единицу площади) увеличивалась к 8-м суткам и снижалась к 14-м. Максимальные диаметры везикул зарегистрированы на 6-е сутки с последующим уменьшением. Расстояние от везикул до фронта кальцификации непрерывно сокращалось. Пустых и аморфных пузырьков со временем становилось меньше, а кристаллических и разорванных – больше. Расстояние до фронта кальцификации передних везикул, их диаметр изменялись в зависимости от типа в такой последовательности: разорванный, кристаллический, аморфный, пустой. Первый из этих типов был наиболее близок к фронту минерализации и имел самый большой диаметр. По мнению цитируемых авторов, полученные результаты соответствуют гипотезе о том, что клетка продуцирует матричные пузырьки, накапливающие кальций и фосфат, из которых появляются аморфные фосфатно-кальциевые комплексы, преобразующиеся в гидроксипатит. Кристаллический рост сопровождается разрывом мембран. При этом, согласно данным Rey с соавторами [27], формирование минерального матрикса сопровождается увеличением не только числа кристаллов апатита в ткани, но и длительности кальцификации.

Минеральный матрикс в частности, как и костная ткань в целом, находится в состоянии постоянной перестройки, которая обеспечивается двумя механизмами ремоделирования: остеокластно-osteобластным и остеонитарным. В первом случае остеокласты резорбируют участки костной ткани с последующей миграцией в эту зону остеобластов и синтезом сначала органического матрикса и на его основе – минерального. Этот процесс достаточно изучен и детально описан нами ранее [3]. Механизм остеонитарного изменения структуры минерального матрикса исследован мало, однако известно, что минеральная плотность меняется относительно быстро и без изменения геометрических характеристик костной ткани. А. Хэм и Д. Кормак [13] рассматривают его как способ поддержания уровня  $\text{Ca}^2+$  в крови.

В связи с этим необходимо отметить, что Staub с соавторами [31] анализировали содержание в плазме крыс  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  и  $^{41}\text{Ca}^{2+}$  и пришли к заключению, что циркулирующие колебания метаболизма кальция есть проявление временной экспрессии самоорганизующейся системы. Ими разработана автоколебательная модель метаболизма кальция у крыс, основанная на компартментальном подходе. Она разделяет всю массу кальция на восемь компартментов и предсказывает различие между количеством кальция, осажженного в зонах роста кости и повторно используемого в процессе ее развития, а также содержание кальция в зрелой кости, распределенной между четырьмя компартментами. Два из них имеют автоколебательный характер и могут отражать изменение соотношения  $\text{Ca}/\text{P}$  в жидкой/твердой фазах костного матрикса. Этот процесс

*Циркадианные колебания – окологичные колебания, при которых длина периода составляет от 20 до 28 ч.*

регулируется клетками остеобластного ряда. Из двух других компарментов один представлен в основном стабильными кристаллами гидроксиапатита, другой — нестабильными. Приток  $\text{Ca}^{2+}$  и ритм его выделения из кости играют главную роль в регуляции этого минерала во внеклеточной жидкости и, должно быть, отражают увеличение массы кости и ее резорбцию.

Подтверждением роли остеоцитов в перестройке минерального матрикса являются результаты, полученные Nishimura с соавторами [26], которые оценивали влияние иммобилизации на декальцификацию кости. Они исследовали 9 молодых здоровых мужчин и женщин в течение 20-дневного постельного режима тремя методами — двойной фотонной абсорбиметрией, количественной томографией и сканирующей рентгеновской флюоресцентометрией. Продемонстрировано быстрое снижение минеральной плотности костной ткани особенно в позвонках шейных и фалангах (в среднем на  $4,6 \pm 0,6\%$  и  $5,6 \pm 0,4\%$  соответственно). Ежедневная экскреция с мочой дезокси-пиридинолина (маркера резорбции костного матрикса) имела тенденцию к повышению до 10-х суток и падению к 20-м (в среднем  $42,2 \pm 1,4$  и  $27,6 \pm 2,2$  нмоль в сутки соответственно). Однако уровни щелочной фосфатазы и тартрат устойчивой кислой фосфатазы не изменились. Эти результаты, по мнению авторов, показали, что быстрая декальцификация позвонков и кортикального слоя трубчатых костей, наблюдаемая уже в начале периода гипокинезии, происходит без различных сдвигов в анатомической структуре, то есть резорбция матрикса костной ткани может протекать без активации остеокластов.

Аналогичные свидетельства остеоцитарной резорбции минерального матрикса представлены Fukuoka с соавторами [23], которые изучали влияние гипокинезии на динамику изменения минерализации поясничных позвонков и метакарпальных костей и также нашли, что она вызывает быструю декальцификацию костной ткани. Действие остеокластных и остеоцитарных механизмов в этом процессе определено опосредованно по содержанию в сыворотке крови тартрат устойчивой кислой и щелочной фосфатаз. Уровень этих ферментов оставался стабильным в течение всего срока наблюдения (20 суток). В то же время экскреция с мочой метаболитов пиридинолина, являющихся маркерами резорбции матрикса костей, к 10-му дню возрастала с последующим снижением к 20-м суткам. Количественное исследование цитокинов, которые целенаправленно модулируют функцию остеокластов (интерлейкин-1, фактор некроза опухоли альфа), показало их увеличение к 7-му дню, а затем быстрое уменьшение. При этом корреляция между динамикой выработки цитокинов и резорбцией костного матрикса отсутствовала. Авторы пришли к выводу, что декальцификация не связана с активностью остеокластов.

Проведенные нами ранее экспериментальные исследования позволили установить, что перестройка минерального матрикса происходит с околонедельной периодичностью и в течение половины этого временного интервала преобладает формирование минеральных структур, а в другую половину — их разрушение и наоборот [1, 2]. Клинические исследования, осно-

ванные на применении метода двойной фотонной рентгеновской абсорбиметрии, подтвердили результаты этих экспериментов. И здесь крайне важным является тот факт, что за половину околонедельного интервала минеральная плотность в одном и том же участке скелета в среднем меняется на  $2\% - 4\%$  от исходной величины. Это нужно учитывать при использовании двойной фотонной рентгеновской абсорбиметрии с целью диагностики остеопороза и контроля за ходом лечения. Для исключения диагностических ошибок каждому больному необходимо проводить исследование зоны интереса не менее пяти раз с интервалами 3 — 10 суток и определять основную тенденцию процесса (тренда) [6].

Выявленную околонедельную периодичность колебаний минеральной плотности следует рассматривать как один из элементов пространственно-временной организации функций в организме, протекании которой в последние годы интенсивно развиваются. Впервые эта концепция была изложена Ф. Халбергом и К. Питтендрая на Международном симпозиуме по биологическим часам в Колд-Спринг-Харборе (США) в 1960 г. Согласно ей для оптимального состояния функций организма требуется согласованность осуществления биоритмов его параметров. По мнению авторов, временная структура есть проявление интра- и экстраорганизменной интеграции, а не просто генетической адаптации видов или ответа на влияние окружающей среды [5].

Таким образом, эти колебания функциональной активности несут приспособительный характер, причем они вызваны не ускорением или замедлением процессов, а увеличением или уменьшением числа структур, в них участвующих. Любой сдвиг интенсивности биологических реакций обязательно сопряжен с эквивалентным изменением числа обеспечивающих их структур [10]. Одним из основных элементов формирования структуры пространственно-временной организации функции является то, что в основе временной координации ритмов лежит принцип синхронизации колебаний уровня функционирования различных элементов организма по фазе с их функциональными возможностями [4].

Другими словами, происходит постоянное уравновешивание ритмов биологических процессов с ритмами многочисленных и разнообразных воздействий на организм. Именно соответствующее изменение ритма и интенсивности физиологических процессов относится к важнейшим механизмам приспособления организма к факторам среды и компенсации нарушенных функций [9].

*Basing on the published information and their own findings, the authors describe the mechanisms of bone mineral matrix formation and remodeling. It is emphasized that the alternative predomination of bone matrix production and destruction occurs with the periodicity of for about one week, and during of this time mineral density may change as much as 7% or even more of its initial value. To avoid diagnostic mistakes it is expedient to check mineral density several (at least five) times every 3 — 10 days to determine the tendency (trend) of its changes.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Аврунин А.С. Операционная травма с нарушением целостности костей: патогенез восстановительного процесса и возможность снижения риска послеоперационных осложнений: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. СПб., 1998. 33 с.
2. Аврунин А.С., Корнилов И.В., Суханов А.В. Хронобиологические характеристики ремоделирования костной ткани позвонков после остеотомии правой бедренной кости (сообщение IV) // *Аннала траматологии и ортопедии*. 1999. № 1. С. 11 – 17.
3. Аврунин А.С., Корнилов И.В., Суханов А.В., Емельянов В.Г. Формирование остеопоротических сдвигов в структуре костной ткани (костные органы, структура костной ткани и ее ремоделирование, концепция патогенеза остеопороза, ее диагностики и лечения). СПб.: Ольга, 1998. 67 с.
4. Ляряпа Н.Р., Машкин М.П., Постный В.С. Проблемы медицинской биоритмологии. М.: Медицина, 1985. 206 с.
5. Комаров Ф.И., Романов Ю.А., Моисеева Н.И. Хрономедицина – новое направление в медико-биологической науке и практике // *Хронобиология и хрономедицина*. М., 1989. С. 5 – 17.
6. Корнилов И.В., Аврунин А.С., Сняжкова И.В., Каземирский В.Е. Биоритмы обменных процессов в костной ткани и диагностическая ценность двойной фотонной рентгеновской абсорбциометрии // *Вестник траматологии и ортопедии им. Н. Н. Приорова*. 1999. № 4. С. 52 – 56.
7. Ньюмен У., Ньюмен М. Минеральный матрикс кости. М.: Иностранная литература, 1961. 270 с.
8. Прохончуков А.А., Жижина Н.А., Тигрозян Р. А. Гомеостаз костной ткани в норме и при экстремальном воздействии // *Проблемы космической биологии*. Т. 49. М., 1984. С. 136 – 162.
9. Саркисов Д.С. Ультраструктурные основы биоритмов и проблема гомеостаза // *Биологические ритмы в механизмах компенсации нарушенных функций / Тезисы Всесоюзного симпозиума – 1973*. С. 35 – 45.
10. Саркисов Д.С. Структурные основы гомеостаза // *Гомеостаз*. М., 1981. С. 256 – 311.
11. Франке Ю., Рунге Г. Остеопороз. М.: Медицина, 1995. 300 с.
12. Хит Д., Маркс С. Дж. Нарушение обмена кальция. М.: Медицина, 1985. 334 с.
13. Хэм А., Кормак Д. Костная ткань // *Гистология*. Т. 3. М., 1983. С. 19 – 131.
14. Bernard B. A. Ca<sup>++</sup> binding alkaline phosphatase in mechanism of calcification // *Calcium regulation and bone metabolism. Basis and clinical aspects*. 1987. V. 9. P. 413 – 418.
15. Bigi A., Foresti E., Gregorini R. et al. The role of magnesium on the structure of biological apatites // *Calcif. Tiss. Int.* 1992. V. 50, № 5. P. 439 – 444.
16. Bonucci E., Silvestrini G. Ultrastructure of the organic matrix of embryonic avian bone after en bloc reaction with various electron-dense "stains" // *Acta Anat.* 1996. V. 156, № 1. P. 22 – 33.
17. Boskey A., Maresca M., Wikstrom B. Hydroxyapatite formation in the presence of proteoglycans of reduced sulfate content: studies in the brachymorphic mouse // *Calcif. Tiss. Int.* 1991. V. 49, № 6. P. 389 – 393.
18. Caverzasio J., Bonjour J. Characteristics and regulation of Pi transport in osteogenic cells for bone metabolism // *Kidney Int.* 1996. V. 49, № 4. P. 975 – 980.
19. Dean D., Schwartz Z., Bonewald L. et al. Matrix vesicles produced by osteoblast-like cells in culture become significantly enriched in proteoglycan-degrading metalloproteinases after addition of beta-glycerophosphate and ascorbic acid // *Calcif. Tiss. Int.* 1994. V. 54, № 5. P. 399 – 408.
20. Fratzl P., Fratzl-Zelman N., Klaushofer K. et al. Nucleation and growth of mineral crystals in bone studied by small angle X ray scattering // *Calcif. Tiss. Int.* 1991. V. 48, № 6. P. 407 – 413.
21. Frost H. *Mathematical elements of lamella bone remodeling*. – Springfield: Thomas books, 1964. 127 p.
22. Fujisawa R., Nodasaka Y., Kuboki Y. Further characterization of interaction between bone sialoprotein and collagen // *Calcif. Tiss. Int.* 1995. V. 56, № 2. P. 140 – 144.
23. Fukuoka H., Kiriya M., Nishimura Y. et al. Metabolic turnover of bone and peripheral monocyte release of cytokines during short-term bed rest // *Acta Physiol. Scand.* 1994. V. 616 (Suppl). P. 37 – 41.
24. Herring G. Methods for the study of glycoproteins and proteoglycans of bone using bacterial collagenase. Determination of bone sialoprotein and chondroitin sulfate // *Calcif. Tiss. Res.* 1977. V. 24, № 1. P. 29 – 36.
25. Johansson M., Nancollas G. The role of brushite and dicalcium phosphate dihydrate in apatite formation // *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 1992. V. 3, № 1. P. 61 – 82.
26. Nishimura Y., Fukuoka H., Kiriya M. et al. Bone turnover and calcium metabolism during 20 days bed rest in young healthy males and females // *Acta Physiol. Scand.* 1994. V. 616 (Suppl). P. 27 – 35.
27. Rey C., Collins B., Goehl T. et al. The carbonate environment in bone mineral: a resolution-enhanced, Fourier transform infrared spectroscopy study // *Calcif. Tiss. Int.* 1989. V. 45, № 2. P. 157 – 164.
28. Roach H. Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption // *Cell Biol. Int.* 1994. V. 18, № 6. P. 617 – 628.
29. Robinson R. The significance of phosphoric esters in metabolism. 1932. 47 p.
30. Sela J., Schwartz Z., Amir D. et al. The effect of bone injury on extracellular matrix vesicle proliferation and mineral formation // *Bone Miner.* 1992. V. 17, № 2. P. 163 – 167.
31. Staub J., Tracqui P., Brezillon P. et al. Calcium metabolism in the rat: a temporal self-organized model // *Am. J. Physiol.* 1988. V. 254, № 1 (Pt 2). P. R134 – R149.