

А. С. Аврунин, И. В. Корнилов и Ю. Б. Марин

## ГИПОТЕЗА О РОЛИ КЛЕТОК ОСТЕОЦИТАРНОГО РЯДА В ФОРМИРОВАНИИ СТАБИЛЬНОЙ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ МИНЕРАЛОВ КОСТНОГО МАТРИКСА

Лаборатория хронобиологии, адаптационных процессов при **травмах** и заболеваниях опорно-двигательного аппарата (руков. — д-р мед. наук А.С.Аврунин) Государственного федерального **учреждения** науки Российского научно-исследовательского института травматологии и ортопедии им. **Р.Р.Вредена**, Санкт-Петербург; кафедра **минералогии, кристаллографии и петрографии** (зав. — проф. Ю.Б.Марин) Санкт-Петербургского **государственного** горного института

До настоящего времени не существует единой концепции, объединяющей механизмы формирования кристаллов **гидроксиапатита** в костной ткани от момента выпадения минерального вещества до созревания кристалла, с механизмами, определяющими постоянство параметров минерального гомеостаза в биологических жидкостях организма. В данной работе, на основании собственных и литературных данных, **проанализирована** взаимосвязь этих механизмов и предложен алгоритм процессов, которые обеспечивают не только образование кристаллов гидроксиапатита, но и постоянство параметров минерального вещества (фосфатов кальция) в биологических жидкостях вне костной ткани.

Формирование кристаллов гидроксиапатита, по нашему мнению, можно разделить на два этапа. Первый — это отложение первичного аморфного минерального вещества в условиях микрокомпарментов<sup>1</sup> матричных пузырьков и второй — постепенное его преобразование до кристаллов **гидроксиапатита** в условиях макрокомпартамента костного органа.

Первый этап. Оптимальность условий образования каждого минерала в отдельности обеспечивается в микрокомпартаментах матричных пузырьков. Эти пузырьки продуцируются **остеобластами** и содержат липиды, кальций, а также **пирофосфатазу** и щелочную фосфатазу. Ферменты разрушают ингибиторы **кальцификации** и **гидролизуют** фосфорные эфиры с **продуцированием** свободных фосфатов. В результате происходит локальное **увеличение содержания фосфат-ионов**, что приводит к появлению первичных минеральных структур [18]. Средний диаметр большинства из них колеблется в пределах 100.3—121.9 нм, а среднее расстояние их от фронта минерализации составляет менее 976.6 нм. В зоне фронта **кальцификации** выделены следующие **везикулярные** типы: «пустой», «**аморфный**», «кристаллический» и «разорванный». Количество «пустых» и «аморфных» пузырьков со временем **снижается**, а «кристаллических» и «разорванных» увеличивается. Последний тип наиболее близок к фронту минерализации и имеет самый большой диаметр, затем следуют «кристаллический», «аморфный», «пустой». Эта последовательность соответствует нараста-

нию расстояния до фронта минерализации и уменьшению диаметра пузырьков. Представленные данные подтверждают гипотезу о том, что в матричных пузырьках накапливаются кальций и фосфат-ионы, из которых возникают аморфные фосфатнокальциевые комплексы, трансформирующиеся в гидроксиапатит. Рост минерала сопровождается разрывом мембран [29].

Ведущим моментом аккумуляции фосфат-ионов в пузырьках и **индукции** минерализации является модулирующее влияние остеотропных факторов на транспортный механизм **матричных** пузырьков. В результате гормональные и другие факторы могут осуществлять прямую регуляцию механизма доставки в них неорганического фосфата, т. е. инициировать **минерализацию** костей. Этот процесс регулируется остеотропными **факторами**, в том числе паратгормоном, паратгормон-связывающим белком, **инсулиноподобным** фактором роста 1 и **тромбоцитарным** фактором роста [19].

Следовательно, можно говорить о том, что пузырьки, ограниченные мембраной, являются микрокомпартаментами, обеспечивающими необходимую для формирования первичного минерала оптимальность параметров. Это, в свою очередь, определяет однотипность структуры первичных минералов и скорость их формирования. По нашему мнению, в связи с тем, что мембраны пузырьков представляют собой часть мембран остеобластов, на них должны находиться интегриновые и неинтегриновые рецепторы этих **клеток**, в том числе  $\alpha_1$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$  и  $\alpha_v$ -интегрины, ответственные за прикрепление клеток к костному матриксу [24]. Наличие **этих** рецепторов обуславливает фиксацию пузырьков на органическом матриксе соответственно распределению в нем позиционных регуляторов.

Образование минерального матрикса начинается примерно через 8 сут после органического [21], что подтверждает его зависимость от времени. Это связано с лаг-периодом, за который происходит активация механизмов, **обеспечивающих** этот процесс. Данные представления согласуются с концепцией о временной организации биологических систем, которая впервые была изложена Ф.Халбергом и К.Пит-

<sup>1</sup>Компартиментом является обособленная структура, обладающая барьерными механизмами, **отграничивающими** в пространстве **присущие ей регуляторно-метаболические** процессы [6].

тендраем на **Международном симпозиуме** по биологическим часам в **Колд-Спринг-Харборе** (США) в 1960 г. Согласно ей, для оптимального функционирования организма необходима согласованность биоритмов его параметров. При этом высокая сложность пространственно-временной организации определяется не многочисленностью ритмов, а их «сцеплением» между собой [8].

Таким образом, *формирование каждого минерала определяется местом и временем, а также ориентацией относительно других ультраструктурной ткани.*

Процесс образования минерального вещества начинается с возникновения центра, или **ядра**, кристаллизации, которое представляет собой тонкий слой фосфата кальция, расположенный между коллагеновыми фибриллами. Такие ядра постепенно разрастаются, достигая **толщины** приблизительно 3 нм, что соответствует максимальному размеру межфибрилярного промежутка [20]. Регулирует появление ядер кристаллизации костный **сиалопротеин**, который располагается в межфибрилярных промежутках [28]. Он соединен с *иц* цепочкой коллагена **внутри** межфибрилярных отверстий (дыр) [22]. Минеральные структуры (**индивиды**) ориентированы таким образом, что их продольная ось параллельна оси фибрилл [16]. Остеокальцин и остеоонектин регулируют скорость минералообразования и размеры **минеральных индивидов**, а **остеоопонтин** определяет формирование правого типа кристалла [28].

Размеры и фазовый состав образовавшегося минерального вещества зависят от многих параметров, в том числе от температуры, давления, рН, состава элементов-примесей и др. [5, 11]. В природе существуют более 10 фаз фосфата кальция, в том числе несколько разновидностей апатита — фторапатит, хлорапатит, **гидроксиапатит**, **карбонатапатит** и яр. [7, 9]. В организме наименее растворимый гидроксиапатит формируется в нейтральной или основной среде. В кислой среде часто появляются минералы типа **дикальцийфосфодигидрата** и **октакальцийфосфата**. Даже при идеально созданных условиях формирования наименее растворимого гидроксиапатита нестехиометрическая преципитация предполагает появление дефектов в кристаллической структуре минерала. На начальном этапе преципитации может образовываться несколько фаз фосфата кальция. Процесс кристаллизации *in vivo* существенно усложнен присутствием большого количества различных ионов и молекул, которые могут быть включены в кристаллическую решетку или адсорбированы на кристаллических поверхностях минеральных **индивидов**.

В биологическом апатите реликты дикальцийфосфодигидрата и **октакальцийфосфата** обычно встречаются только во время патологической **кальцификации**, когда величина рН зачастую относительно низкая. При нормальной кальцификации *in vivo* возможно возникновение **других** предшественников или аморфной фазы фосфата кальция, который в последующем преобразуется в апатит [25].

Таким образом, в биологической системе основополагающим моментом при формировании кристаллов **гидроксиапатита** является стандартность условий, которые предотвращают существенные различия между вновь образовавшимися минералами как в пространстве (в зоне минерализации), так и во времени. Это крайне важно, так как, несмотря на относительное постоянство параметров биологической системы в

различных участках даже одного и того же органа, их величины могут несколько различаться, в том числе по значениям рН, ионному составу, концентрации ионов, количеству ядер кристаллизации и т. д.

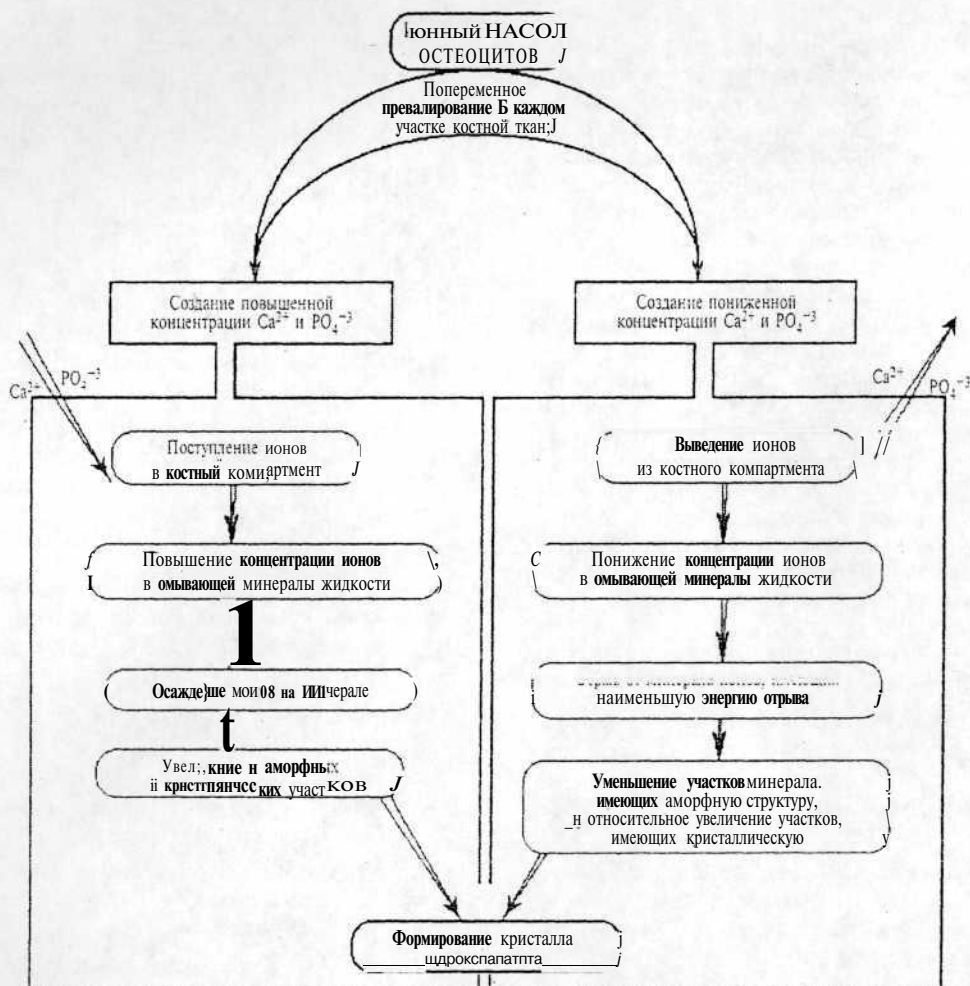
Второй этап. На этом этапе формируется наиболее устойчивая форма минерального вещества — кристаллический **гидроксиапатит**. В экспериментальных условиях показано, что это может происходить путем быстрой прямой кристаллизации с образованием первичных кристаллов или **путем** медленной перекристаллизации из аморфного фосфата кальция [14]. В костной ткани в аморфной фазе может находиться до 50% всего минерального вещества [16].

Ясно, что в биологической системе формирование кристаллических структур **путем** прямой кристаллизации или перекристаллизации из аморфного фосфата кальция **не** может не быть связано с жизнедеятельностью клеток, т. е. другими словами не может не регулироваться ими. В связи с этим рассмотрим возможную роль остеоцитов в этом процессе. Как отмечают У.Ньюман и М.Ньюман [14], по ионному составу интерстициальная жидкость кости и внеклеточная жидкость **остального** организма не эквивалентны друг другу, поэтому между ними должен существовать или диффузионный барьер, или ионный насос, который бы регулировал возникающий ионный градиент. Функционирование такого барьера или насоса может обеспечиваться только клетками. **Этот механизм**, как подчеркивают авторы, может объяснить эффект действия витамина D и паратормона. Представление о наличии ионного насоса поддерживают J.Caverzasio и J.Vonjour [19]. По их мнению, **клетки остеоцитарного** ряда осуществляют транслокацию неорганического фосфата из системного в скелетный **внеклеточный** компартмент. Этот механизм реализует Ха<sup>+</sup>-зависимый транспорт через **цитоплазматические** мембраны.

Именно наличием ионного насоса, который обеспечивает то уменьшение, то увеличение минеральной плотности костной ткани можно объяснить результаты исследований, согласно которым процессы минерализации — деминерализации костной ткани происходят постоянно с околонедельной периодичностью [1—4, 10].

Роль остеоцитов в процессах быстрой деминерализации костной ткани **подчеркивают также** Н.Fukuoka и соавт. [23] и Y.Nishimura и соавт. [27], которые изучали влияние гипокинезии на минеральный обмен человека и поставили своей целью выявить степень участия остеокластных и остеоцитарных механизмов в этом процессе. Они сделали вывод, что декальцификация не связана с активностью остеокластов. По их мнению, быстрая **декальцификация** позвонков и компактного вещества **трубчатых** костей (в среднем, на 3—5%), наблюдаемая уже в начале периода гипокинезии, происходит без различимых сдвигов в анатомической структуре, т. е. резорбция **матрикса** костной ткани протекает без активации остеокластов.

Данные этих авторов о быстрой **декальцификации** костной ткани в условиях гипокинезии позволяют предположить, что характер функционирования ионного насоса в остеоиитах связан с действием **механосенсорных** рецепторов. А именно, при гипокинезии начинает преобладать выведение ионов фосфора и кальция из межклеточной жидкости костной ткани в межклеточную жидкость **других** отделов организма, что приводит к частичному растворению



Роль ионного насоса остеоцитов при формировании стабильной морфологической структуры минералов костного матрикса.

минералов и снижению минеральной плотности.

Изменения минеральной плотности не только в разных костных органах, но и в соседних участках **каждого** из них асимметричны. При этом степень асимметрии меняется с околонедельной периодичностью [15], т. е. половину этого временного интервала процессы минерализации преобладают в одном из сопоставляемых участков, а другую половину — в другом. Это свидетельствует о постоянном изменении направления функционирования ионного насоса согласно закону перемежающейся активности [12, 13]. Нам представляется, что функционирование такого насоса способствует реализации следующих адаптационных процессов:

- поддержания концентрации ионов в жидкостях организма [30];

- обеспечения минеральной плотности костной ткани в каждом ее **участке** соответственно биомеханическим нагрузкам на него [23, 27];

- **формирования** минерального матрикса  $Ca$  **по** в зонах физиологической и репаративной регенерации [26];

- **ускорения** образования кристаллического гидроксиапатита.

Рассмотрим теоретические аспекты, подтвержда-

ющие последнее предположение (схема). Преобразование аморфной фосфатной фазы в кристаллический гидроксиапатит происходит благодаря постоянному химическому взаимодействию минерала с омывающей его **межклеточной** жидкостью. В том случае, если концентрация ионов в омывающей жидкости не меняется, процесс ионного обмена между ней и минералом находится в состоянии динамического равновесия, и масса минералов остается постоянной. Их рост происходит при увеличении концентрации ионов в омывающем растворе, а растворение — при ее снижении. Изменение концентрации фосфат-ионов и кальция в омывающей кристаллы **межклеточной** жидкости обеспечивается ионным насосом, **функционирующим** в клетках остеоцитарной сети костных органов.

Проследим теперь как этот процесс приводит к «созреванию» минерала (см. схем), т. е. к получению наиболее устойчивой (наименее растворимой) его формы. Энергия отрыва иона от кристаллической решетки и от аморфной фазы фосфата **кальция** разная [17]. В последнем случае она ниже. Поэтому, когда в результате действия ионного насоса происходит экскреция ионов из костной ткани и минеральные вещества растворяются, то в первую очередь удаляются ионы, входящие в состав аморфной фазы [9, 11]. Веро-

ятность отрыва элемента, входящего в состав кристаллической фазы, значительно ниже. Когда же ионный насос нагнетает минералообразующие ионы в омывающую костную ткань жидкость, их концентрация увеличивается, начинается отложение минерального вещества, и часть ионов, оказавшихся в более устойчивом состоянии, **формируют** кристаллическую решетку. Следовательно, в дальнейшем вероятность их отрыва при растворении минерала, как отмечают Н.И.Краснова и Т.Г.Петроз [11], **намного ниже**.

Постоянное **остеокластно-остеобластное ремоделирование** костной ткани, медленное образование кристаллов из аморфного состояния, **наличие** дефектов кристаллической решетки даже при идеальных условиях ее формирования подразумевают в каждом локусе костной ткани наличие минерального вещества разной степени «зрелости» и совершенства структуры. В этих условиях данный гипотетический механизм регуляторной роли остеоцитов в перестройке минерального матрикса обеспечивает более активный процесс «созревания» кристаллов при **минимальном** влиянии на наиболее совершенные кристаллические структуры.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Аврунин А.С. Механизмы **развития** адаптационного ответа организма на нарушение целостности костей и пути превентивной профилактики послеоперационных осложнений (**экспериментально-клиническое** исследование): Автореф. дис. ... д-ра >мед. наук. Самара, 1998.
2. Аврунин А.С., Корнилов Н.В. и Суханов А.В. Хронобиологические характеристики ремоделирования кортикального слоя **поврежденной** кости (сообщение I). Анналы травматологии и ортопедии, 1997, № 3-4, с. 30-25.
3. Аврунин А.С., Корнилов Н.В. и Суханов А.В. **Позиционные регуляторы** костной ткани — основа ауторегуляторного механизма **развития** и воспроизведения остеопороза. Морфология, 1998, т. 114, вып. 4, с. 7-12.
4. Аврунин А.С., Корнилов Н.В. и Суханов А.В. Хронобиологические характеристики ремоделирования костной ткани позвонков после остеотомии правой бедренной кости (сообщение IV). Анналы травматологии и ортопедии, 1999, № 1, с. 11-17.
5. **Асхабов** А.М. Процессы и механизмы кристаллогенезиса. Л., Наука, 1934.
6. **Албертс** В., Брей Д., **Льюис Дж.** и др. Молекулярная биология клетки. М., **Мир**, 1994.
7. Годовиков А.А. Минералогия. М., Недра, 1953.
8. Комаров Ф.И., Романов ЮА и Моисеева Н.И. Хрономедицина — новое направление в медико-биологической науке и практике. В кн.: Хронобиология и хрономедицина. МЛ, Медицина, 1989, с. 5-17.
9. Кораго А.А. Введение в биоминералогияю. СПб., Недра, 1992.
10. Корнилов Н.В., Аврунин А.С., Синюкоза И.В. и **Кзземирский** В.Е. Биоритмы обменных процессов в костной ткани и **диагностическая** ценность двойной фотонной рентгеновской **абсорбциометрии**. Вести, травматол. и ортопед, им. **Н.Н.Приорова**, 1999, №4, с. 52-56.
- 11: Краснова Н.И. и Петров Т.Г. Генезис минеральных индивидов и агрегатов. СПб., Невский курьер, 1997.
12. Крыжановский Г.Н. Биологические ритмы и закон структурно-функциональной дискретности биологических процессов. В кн.: Биологические ритмы в механизмах компенсации нарушенных функций. М., изд. Ин-та общей патологии и пат. ФИЗИОЛОГИИ АМН СССР, 1973, с. 20-34.
13. **Крыжановский** Г.Н. Расстройство нерзной регуляции. 3 кн.: Патология **нервной** регуляции функций, М., изд. Ин-та общей патологии и пат. физиологии АМН СССР, 1937, с. 5-42.
14. **Ньюман** У. и Ньюман М. **Минеральный** обмен кости. М., **Гипос** Гр. ЛИТ-ра, 1901,
15. Паршин В.А. Изолированная и множественная скелетная травма. Хронобиологические характеристики **адаптивной** реакции: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. **СПб.**, 1999.
16. Прохончуков А.А., Жижина Н.А. и Тигронян Р.А. Гомеостаз костной ткани в норме и при экстремальном воздействии. **Пробл. космической биол.**, 1984, т. 49, с. 136-162.
17. Урусов В.С. Энергетическая кристаллохимия. М., Наука, 1989.
18. Bernard V.A. Ca<sup>++</sup> binding alkaline phosphatase in mechanism of calcification. In: Calcium regulation and bone **metabolism**. Basic and **clinical** aspects. 1987, y. 9, p. 413-418.
19. **Caverzasio J.** and **Bonjour J.** Characteristics and **regulation** of Pi transport in csteogenic cells for bone **metabolism**. Kidney Int., 1996, 7.49, №4, p. 975-980.
20. **Fratz 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. Mathemaiictai elements of **lamellar** bone **remodelling**. Springfield, Thomas books, 1964.
22. **Fujisawa R., Noçasaka Y. and Kuboki Y.** Further characterization of interaction between bone sialoprotein and collagen. Caicif Tiss. Int., 1995, v. 56 № 2, p. 140-144.
23. **Fukuoka H., Kiriyaма M., Nishimura Y. et al.** Metabolic **turnover** o' bone and peripheral **monocyte** release of cytokines during short-term bed rest. Acta physioi. scand., 1994, v. 616 (Suppl.), p. 37-41.
24. Hughes D., Salter D., Godoiphin J, et a). Integrin expression in primary bone and **cartilage** tumors. J. Pathol. 1993, v. 170 (Suppl.412A), p. 65A-89A.
25. Johnsson M. and Nancollas G. The role of brushite and dicaicum phosphate dihydrate in apatite formation. Crit. Rev. Oral Biol. Med., 1992, v. 3, № 1, p. 61-82.
26. Mullender M. and Huiskes R. Proposal for the regulatory mechanism of Wolffs law. J. Orthop. Res., 1995, v. 13, № 4, p. 503-512.
27. Nishimura Y., Fukuoka H., Kiriyaма M. et al. Bone turnover and calcium metabolism during 20 days bed rest in young healthy males and females. Acta physioi. Scand., 1994, v. 516 (Suppl.). p. 27-35.
28. Roach H. Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone siaioptein in bone mineralisation and **resorption**. Cell **Biol. Int.**, 1994, v. 18, № 15, p. 617-628.
29. Seia J., Schwartz Z., Amir D. et al. The effect of oone injury on extracellular matrix vesicle proliferation and mineral formation. Bone Miner., 1992, v. 17, № 2, p. 163-167,
30. **Staub J., Tracqui P., Brezi'ion P. et al.** Calcium metabolism m the rat: a temporal self-organized model. Amer. J. **Physioi.**, 1988. v. 254, № 1 [Pi. 2), p. R134-149.