

© Группа авторов, 2008

Гормональная регуляция репаративного костеобразования

А.А. Свешников, В.В. Патраков, Т.А. Ларионова

Hormonal regulation of reparative osteogenesis

A.A. Sveshnikov, V.V. Patrakov, T.A. Larionova

Федеральное государственное учреждение

«Российский научный центр "Восстановительная травматология и ортопедия" им. академика Г. А. Илизарова Росмединтехнологий», г. Курган
(генеральный директор — заслуженный деятель науки РФ, член-корреспондент РАМН, д.м.н., профессор В.И. Шевцов)

У людей после травм и в процессе уравнивания длины конечностей определяли концентрацию гормонов стресс-группы и регулирующих репаративное костеобразование, а также циклических нуклеотидов. Для оценки функционального состояния костной ткани в процессе лечения контролировали плотность минеральных веществ (МП) у концов костных фрагментов и в регенерате на костных денситометрах фирм "Норлэнд" и «GE/Lunar» (США). Изучение гормонального фона в организме позволяет контролировать состояние отдельных звеньев репаративного процесса, подтверждает обоснованность заключений, проводимых по результатам денситометрических и радионуклидных исследований.

Ключевые слова: репаративное костеобразование, минералы кости, остеотропные гормоны, циклические нуклеотиды.

The concentration of stress-group hormones and of those regulating reparative osteogenesis, as well as the concentration of cyclic nucleotides was determined in patients after injuries and in subjects during limb length equalization. Mineral density (MD) at the ends of bone fragments and in regenerate bones was controlled to evaluate the functional status of bone tissue in the process of treatment using bone densitometers of *Norland* and *GE/Lunar* firms (USA). Studying of organism hormonal background allows to control the status of separate parts of reparative process, confirms the validity of conclusions, made by the results of densitometric and radionuclide studies.

Keywords: reparative osteogenesis, bone minerals, osteotropic hormones, cyclic nucleotides.

Травма является мощным стресс-фактором, который вызывает изменения не только в системе гипоталамус-гипофиз-надпочечники, но и в других органах и тканях. Так, описан "диабетогенный" эффект травмы, изменения в желудочно-кишечном тракте. Своебразным длительно действующим стрессором является рас-tяжение напряжением тканей для уравнивания длины конечностей [4]. Изучение гормональной регуляции пролиферации, дифференцировки клеток костной ткани, минерализации основного вещества при переломах является актуальной и малоизученной проблемой. Выяснение взаимодействия гормонов с рецепторами клеток, изменения под их влиянием концентрации циклических нуклеотидов в клетках стало возмож-

ным благодаря внедрению метода радиоиммuno-логического анализа. Дальнейшие исследования в этом направлении, несомненно, будут способствовать расшифровке молекулярного механизма действия гормонов. В частности, целесообразно изучение циклических нуклеотидов, обладающих уникальной способностью передавать гормональную информацию клеткам и регулировать множество биохимических процессов.

В задачу исследования входило изучение концентрации гормонов крови, ответственных за синтез органической основы и ее минерализацию, а также циклических нуклеотидов при лечении закрытых переломов длинных костей или при уравнивании длины конечностей.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Наши наблюдения проведены на 160 больных с закрытыми поперечными, косыми и винтообразными переломами костей голени. Чрескостный остеосинтез осуществляли по методу Г.А. Илизарова. Гормоны определяли также у 138 больных, которым проводилось уравнивание длины конечности. Концентрацию гормонов (АКТГ, кортизола, альдостерона, паратиреина, соматотропина, кальцитонина, остеокальцина) определяли методом радиоиммунологического анализа с использованием китов фирмы «CIS»

(Франция), а циклических нуклеотидов – радио-конкурентным методом с наборами фирмы «Amersham» (Англия). Подсчет активности и распечатка результатов осуществлялись на бета- и гамма-счетчиках фирмы «Tracor Europa» (Голландия).

Для оценки функционального состояния костной ткани в процессе лечения контролировали плотность минеральных веществ у концов костных фрагментов и в регенерате на костных денситометрах фирм «Норлэнд» и «GE/Lunar»

(США). Изучали состояние репаративного процесса начиная с 3-7-го дня после травмы или остеотомии.

В качестве инструмента вычислений исполь-

зовали пакет статистического анализа и встроенные формулы расчетов компьютерной программы Microsoft® Excell (Microsoft® Office 2007 – Professional Runtime).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гормоны стресс-группы. Кортикотропин. Незамедлительный ответ эндокринной системы на травму или остеотомию (для последующего удлинения) наиболее ярко был выражен в ближайшие часы и приводил к увеличению (в 10 раз) концентрации АКТГ, стимулирующего продукцию гормонов надпочечников. Вследствие этого существенно увеличивалось содержание альдостерона и кортизола. К концу суток концентрация АКТГ несколько уменьшалась (до 9,5 раза). Затем продолжала снижаться, но более интенсивно (рис. 1). К 14-м суткам была выше нормы в 4,6 раза, а к концу первого месяца – в 2 раза. В последующие недели концентрация кортикотропина была изменена очень незначительно. В это время обычно снимали аппарат.

Кортизол. В ближайшие часы после травмы наблюдалось увеличение концентрации в 2,9 раза. К концу суток эта величина составляла 2,6 раза, на 7-й день – 1,9 раза. На 2-3-й неделях снижение концентрации происходило более медленными темпами (рис. 1). Величины, близкие к норме, были в конце месяца. Полная нормализация отмечена на 45-й день.

Высокая концентрация кортизола угнетает синтез клеточных ферментов, биосинтез белка в печени, ускоряются аминотрансферазные реакции и распад некоторых аминокислот. Усиливаются процессы гликогеногенеза в печени, снижается утилизация углеводов в других тканях [3].

Альдостерон. В первые 4-5 часов после травмы концентрация была увеличена в 4,0 раза, но уже к концу суток начинала снижаться до 3,5 раза. На 7-й день была выше нормы в 2,5 раза, на 14-й день – в 1,6 раза. На 3-4-й неделях уменьшение концентрации происходило более медленно (рис. 1). К концу последующих двух недель происходила нормализация.

Повышение концентрации альдостерона приводило к развитию асептической воспалительной реакции. Он усиливал выведение калия из организма, что сопровождалось увеличением гидрофильности тканей и повышением тонуса мышц. Проявлением этого эффекта являлась отечность стопы и голени. У некоторых больных в течение нескольких дней была субфебрильная температура.

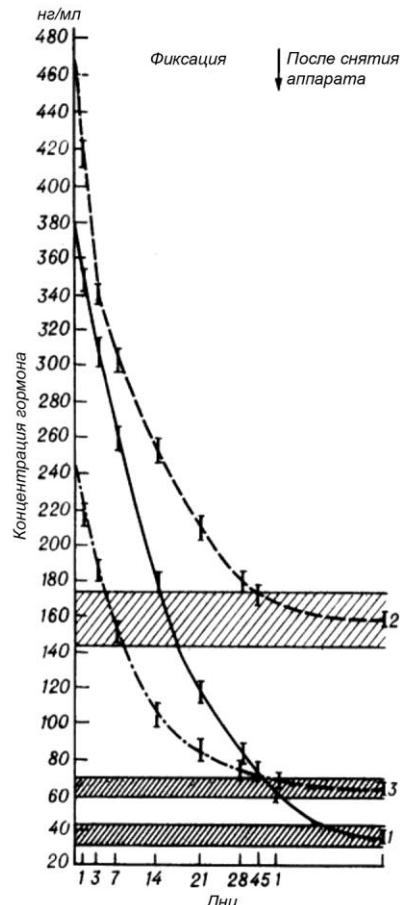


Рис. 1. Изменение концентрации кортикотропина (1), кортизола (2) и альдостерона (3) в процессе лечения переломов костей голени и при удлинении конечности

Регуляторы костеобразования. Паратирин. В течение 1-х суток концентрация возрастала в 6,5 раза. Увеличение происходило вплоть до 14-го дня, однако ежедневный темп прироста концентрации был меньше, чем в 1-е сутки, и составлял 60 % за каждый день. В итоге на 14-й день она была больше нормы в 14,3 раза (рис. 2). На 3-й неделе наблюдалось довольно существенное снижение ее (на 51 % за каждый день). В течение 4-й недели уменьшение концентрации происходило более быстрыми темпами (140 % за каждые сутки) и поэтому на 28-й день она была близка к норме. Полная нормализация отмечалась на 45-й день после перелома.

Паратирин повышал содержание кальция и снижал количество фосфора в крови [11]. Это происходило в результате активирования резорбтивных процессов. Одновременно с растворением костного минерала происходила резорбция и органического матрикса, состоящего главным

образом из коллагеновых волокон и гликозаминогликанов. В результате этих процессов с первых же дней после перелома наблюдалось повышенное накопление меченого пирофосфата, а также уменьшение количества костного минерала [3, 4].

Под влиянием паратирина и соматотропина активируется пролиферация костномозговых элементов, в том числе и остеогенных, превращение клеток-предшественников в остеобласты. Усиливается биосинтетическая активность их для образования костной ткани [2, 8].

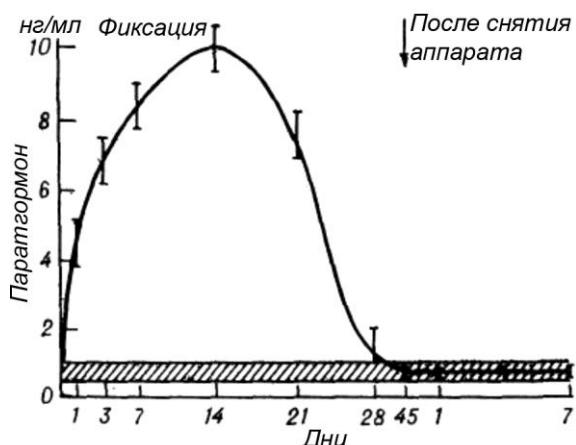


Рис. 2. Изменение концентрации паратиреоидного гормона в процессе лечения больных с переломами и при удлинении конечности

Соматотропин. Этот гормон стимулирует образование органической основы. Концентрация возрастила довольно медленно (1-е сутки – увеличение в 1,3 раза). В дальнейшем (до 21-го дня) концентрация увеличивалась за сутки на 36 % от значений в норме. В конце первого месяца (21-27-й дни) прирост несколько ослабевал (рис. 3). Максимальные значения (9,1 раза) отмечены на 28-45-й дни. Затем очень медленно (по 6 % за сутки) концентрация уменьшалась. Полная нормализация установлена на 135-й день после перелома.

Соматотропин подавляет действие инсулина, стимулирует образование коллагена путем воздействия на биосинтез РНК и ДНК и включение аминокислот в полипептидную цепь, оказывает влияние на минеральный обмен. В результате такого действия во фрагментах прекращалась дальнейшая убыль минералов и их масса начинала нарастать. Об этом свидетельствует увеличение в формирующимся регенерате меченого пирофосфата [5], который имеет сродство к незре-

лому апатиту, а также нарастающее в регенерате количество минеральных веществ [3, 10].

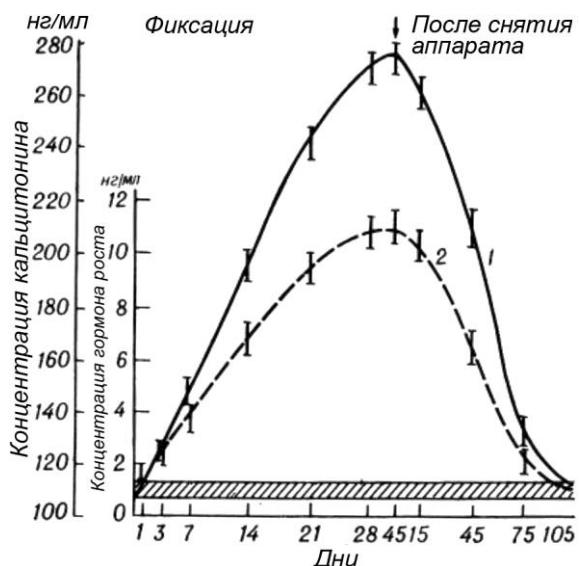


Рис. 3. Изменение концентрации кальцитонина (1) и соматотропина (2) в процессе лечения больных с переломами и при удлинении конечности

Кальцитонин. Изменения развивались однодirectionalno с соматотропином (рис. 3), однако увеличение происходило более медленно: в первый день содержание увеличено на 10 % ($p<0,05$), на 3-й день – на 25 % ($p<0,01$). Прирост в 2 раза отмечен только на 15-й день. Максимальные величины наблюдались на 45-й день (рис. 3). Затем концентрация начинала уменьшаться, нормализация отмечена на 105-й день.

Кальцитонин ослабляет деминерализацию костных фрагментов, тормозит активность остеокластов, рассасывающих кость, способствует увеличению массы формирующегося регенерата.

Остеокальцин. Увеличение концентрации этого белка свидетельствует о повышении активности остеобластов. После переломов она была наибольшей на 28-й день (табл.). Через 2 месяца после снятия аппарата близка к норме. Полная нормализация отмечена через 4 месяца. При удлинении конечности самой высокой концентрацией была на 28-60-е дни дистракции. После снятия аппарата содержание остеокальцина больше нормы в 3,2 раза, на 4-й – в 2,7 раза. В силу активно протекающих перестроек процессов концентрация приближалась к нормальным значениям лишь через год после снятия аппарата.

Таблица

Концентрация остеокальцина (нг/мл) в крови в процессе лечения переломов и удлинении конечности ($M\pm m$)

Номер группы	Дни после перелома или дистракции				После снятия аппарата (месяцы)		
	14	28	45	60	2	4	12
Нормальные значения остеокальцина $6,4\pm 0,4$ нг/мл.							
Перелом	27,3±1,3	36,8±1,6	29,7±1,1	17,2±1,0	8,4±0,6	6,6±1,0	6,3±0,6
Дистракция	26,3±1,9	51,3±3,0	55,3±1,5	48,1±1,8	20,2±1,5	17,3±1,3	6,8±0,7

Циклические нуклеотиды. цАМФ. Через 4-5 часов после травмы наблюдалась самая высокая концентрация ($28,6 \pm 3,1$ пмоль/мл). К концу первых суток отмечалась тенденция к снижению. В последующие дни происходило снижение, и к 14-му дню содержание было близко к норме, а на 21-й день наблюдалась нормализация (рис. 4).

цГМФ. Увеличение содержания данного нуклеотида обнаружено на 3-и сутки. В даль-

нейшем отмечалось стремительное увеличение с максимальными значениями (в 2,2 раза) на 14-й день. Затем она довольно медленно снижалась. На 45-й день – близко к норме.

цАМФ/цГМФ. Отношение нуклеотидов через 4-5 часов после травмы составляло 2,9, а к концу суток уже начинало уменьшаться. На 14-21-е сутки отношение было ниже нормальных колебаний. К 28-м суткам восстанавливалось до нормы (рис. 5).

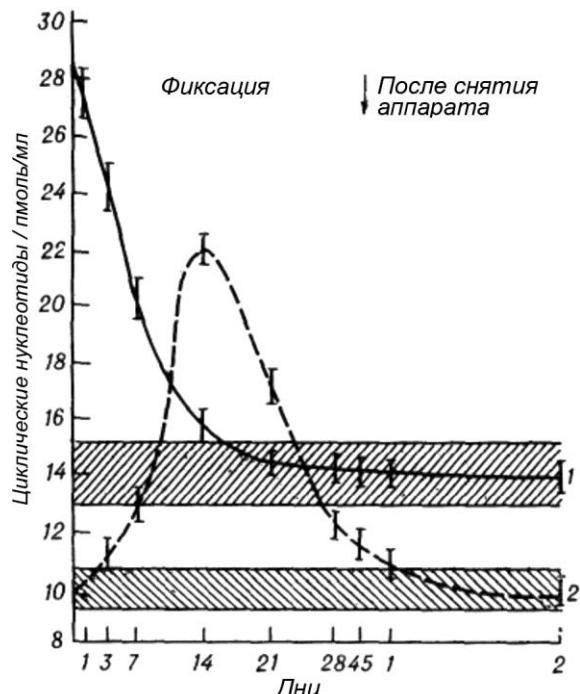


Рис. 4. Концентрация цАМФ (1) и цГМФ (2) при лечении переломов костей голени и при удлинении конечности

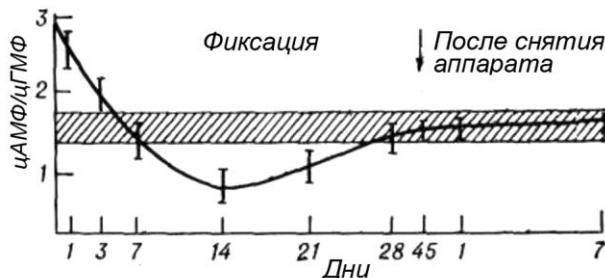


Рис. 5. Изменение отношения цАМФ/цГМФ в процессе лечения больных с переломами и при удлинении конечностей

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами установлено, что в ответ на травму, прежде всего, следует реакция со стороны гипофиз-адреналовой системы и отмечается увеличение активности парашитовидных желез. Под влиянием этих гормонов в мембренах клеток активируется аденилатцилаза [2]. В результате этого возрастало образование цАМФ, что отражало напряжение адренергических механизмов и являлось одной из первых ответных реакций организма. Но концентрация цАМФ в крови зависит в основном от секреции паратгормона. Характерный его эффект, сводящийся к снижению реабсорбции фосфатов и увеличению обратного всасывания кальция, достигается путем активации цАМФ в клетках почечных канальцев. Под влиянием этого нуклеотида лимитировалось и ингибировалось деление клеток, клональная пролиферация, замедлялось прохождение клеток через фазу митоза [1, 6]. Нуклеотид цАМФ осуществляет функцию посредника действия гормонов белковой природы (АКТГ,

адреналин, глюкагон) внутри клетки. Будучи неспособными проникнуть в клетку вследствие нерастворимости их молекул в липидном слое наружной плазматической мембранны, указанные гормоны оказывали влияние на расположенный в этом слое клетки рецептор, связанный с аденилатцилазой, что приводило к его активации. В результате вблизи внутреннего слоя мембранны происходило образование из АТФ не обычного, а циклического аденоzinмонофосфата, который и выполнял роль вторичного посредника («мессенджера») влияния гормона на клетку, как бы «распространяя» его действие на внутриклеточные структуры; цАМФ проявлял действие и в ядре клетки. Под влиянием цАМФ повышалась активность протеинкиназ – ферментов, осуществляющих фосфорилирование многих белков, в частности фосфорилаз, в результате чего усиливался распад гликогена, образование глюкокортикоидов, липолиз и синтез белка. Особенности проявления эффекта цАМФ

обусловлены набором ферментов в клетке. Но концентрация цАМФ в клетке зависит не только от активности аденилатциклизы, но и от фосфодиэстеразы, разрушающей цАМФ. Эффект же действия гормонов – от соотношения в клетке цАМФ и цГМФ.

Концентрация кортикотропина и кортикостероидов быстро снижалась и начинало нарастать содержание соматотропина и кальцитонина, а также цГМФ. Под влиянием соматотропина и паратирина активизируется пролиферация костномозговых элементов, в том числе и остеогенных, превращение клеток-предшественников в остеобласти, усиливается их биосинтетическая активность для образования костной ткани [1, 7].

Вслед за первоначальным повышением концентрация цАМФ снижалась, что приводило в движение клеточный пул, стимулировало пролиферацию клеток костного мозга. В период образования органического матрикса цАМФ осуществлял положительную регулирующую роль в пролиферативном ответе стволовых клеток-предшественников костного мозга [1]. При исследовании его после травмы с меченым серным коллоидом нами обнаружено повышение его функционального состояния в условиях чрескостного остеосинтеза.

Уменьшение концентрации цАМФ являлось естественным и целесообразным механизмом относительного повышения цГМФ-зависимых реакций метаболизма клетки, то есть подключения холинергических механизмов и указывало на устойчивость организма к такому остройшему воздействию, как травма или операция. В итоге отношение этих нуклеотидов становилось ниже нормы и именно в это время начиналась интенсивная клеточная пролиферация. Индукторы пролиферации стволовых клеток, взаимодействуя с рецепторами мембран, усиливали транспорт ионов кальция внутрь клетки. Количество цГМФ прямо зависит от концентрации кальция, поэтому и происходило повышение его уровня. Противоположная зависимость цАМФ от содержания кальция обусловливало реципрокные отношения между этими циклическими нуклеотидами. Значительный уровень цГМФ стимулировал также освобождение химических медиаторов: лизосомальных энзимов и гистамина. Установлено, что вещества, способствующие росту и ускоряющие клеточную пролиферацию (инсулин, соматомедин), оказывают влияние на интраклеточный уровень цГМФ [2].

Можно предположить, что в период образования регенерата факторы микроокружения стволовых кроветворных клеток костного мозга реализуют свое действие через индукцию синтеза цГМФ, который в свою очередь изменял межклеточные контакты в дифференцирующихся тканях остеогенного аппарата.

После операции на клетки воздействовал целый ряд гормонов. Значительное увеличение паратирина в начальном периоде после операции, кальцитонина и цГМФ на более поздних этапах согласуется с мнением H. Rasmussen [9] о том, что происходит активация мезенхимальных клеток, усиление пролиферации клеток костного мозга и резорбции костной ткани.

Существенно изменилось функциональное состояние паразитовидных желез, о чем мы судили по концентрации паратирина. После переломов наибольшие значения были на 14-16-е дни, а в процессе удлинения на 14-19-е дни. Уровень достаточно велик в течение всей дистракции и только на 60-й день фиксации отмечена нормализация. Усиливает действие этого гормона повышенная концентрация цАМФ в крови. На начальном этапе действия паратирина, как и других белково-пептидных гормонов, принимают участие специфические рецепторы плазматической мембранны клеток-мишеней – ферменты аденилатциклизаза и протеинкиназа, расщепляющие белки. Вот почему в первые две недели в регенерате мало минералов, а к 21-му дню у концов костных фрагментов видна деминерализация.

Функциональное состояние щитовидной железы изменилось значительно медленнее, чем паразитовидных. После травмы наибольшая продукция кальцитонина отмечена на 25-28 дни, при удлинении укороченной голени – в начале фиксации. Его действие противоположно паратормону и витамину D₃. Кальцитонин угнетает резорбцию кальция из костей и усиливает отложение в них минерализованного кальция, тормозит всасывание Ca⁺⁺ и фосфатов из кишечника, а также увеличение экскреции кальция почками. Действие кальцитонина на обмен обусловлено снижением проницаемости мембран клеток для Ca⁺⁺. Усиление отложения нерастворимых солей кальция в остеоцитах тесно связано с влиянием на его обмен витамина D₃.

Секреция кальцитонина регулируется содержанием кальция в крови: увеличение его усиливает, а уменьшение – подавляет секрецию кальцитонина. Повышенная концентрация кальцитонина создавала условия для начала интенсивного формирования органической основы регенерата. Кальцитонин тормозил также и активность остеокластов, рассасывающих кость. Поэтому ослаблялась деминерализация костных фрагментов.

При дистракции длительное время повышена концентрация гормона передней доли гипофиза – соматотропина, стимулирующего анаболические процессы. При удлинении укороченной конечности наибольшая его продукция приходилась на конец дистракции – начало фиксации. Соматотропин стимулировал синтез инсулиноподобного фактора роста, усиливал биосинтез

матрикса, обмен веществ в кости и мышцах и увеличивал их массу, оказывал влияние на минеральный обмен, активнее происходил процесс минерализации регенерата. У концов костных фрагментов уменьшалась остеопения.

Под влиянием одновременного действия этого гормона и паратирина активизировались пролиферация костномозговых элементов, в том числе и остеогенных, превращение клеток-предшественников в остеобласти, усиливалась биосинтетическая активность для образования костной ткани.

Существенное значение имела стимуляция паратирином образования в почках активного метаболита витамина D-1,25-диоксихолекальциферола (витамин D₃), который существенно увеличивал всасывание кальция из кишечника и отложение его в костях. Абсорбцию кальция в кишечнике уменьшал кортизол. Для компенсации этого состояния в организме стимулировалась деятельность парасщитовидных желез – увеличивался уровень иммунореактивного паратирина, ускоряющего деминерализацию и, следовательно, больше становился уровень остеокальцина в сыворотке (одного из белков костной ткани), который освобождался из кости в силу ухода кальция.

Всасывающиеся в желудочно-кишечном тракте минеральные вещества поступают в кровь и лимфу. Ионы кальция, например, уже в процессе или после всасывания соединяются со

специфическим белком – остеокальцином. Основной причиной деминерализации костей и слабой оссификации является недостаток половых гормонов. Их эффект яснее выявляется у женщин, так как у них на 30 % меньше масса скелета, они меньше употребляют кальция. У них больше, чем у мужчин, концентрация паратирина и меньше кальцитонина. Половые гормоны защищают кость от воздействия паратирина и усиливают образование кальцитонина [5]. При уравнивании длины конечности, укороченной вследствие полиомиелита голени, снижение концентрации эстрadiола было заметно в наибольшей мере. Удерживалась с 45-го дня дистракции и до 90-го – фиксации. У мужчин уровень тестостерона был снижен в течение меньшего времени: с 60-го дня дистракции и до 30-го дня фиксации. Эффективность снижения его менее заметна, чем от убыли эстрогенов. Устранение дефицита гормонов изменяло метabolизм в костной ткани за счет снижения резорбции.

Определение концентрации циклических нуклеотидов, их соотношения может лежать в основе диагностических и прогностических критериев степени тяжести состояния после операции, выраженности компенсаторных реакций и эффективности лечения.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, проект № 07-04-96033.

ЛИТЕРАТУРА

1. Илизаров, Г. А. Костномозговое кроветворение при остеосинтезе в условиях дистракции / Г. А. Илизаров, Л. А. Палиенко, А. А. Шрейнер // Экспериментально-теоретические и клинические аспекты разрабатываемого в КНИИЭКОТ метода чрескостного остеосинтеза : материалы Всесоюз. симпозиума с междунар. участием - Курган, 1983. - С. 38-39.
2. Кожемякин, Л. А. Циклические нуклеотиды в клинической и экспериментальной медицине / Л. А. Кожемякин, Д. С. Коростовцев, Т. Р. Королева // Циклические нуклеотиды : сб. науч. тр. - М. : Наука, 1979. - С. 92-135.
3. Свешников, А. А. Изменение минерального компонента кости при переломах / А. А. Свешников, Н. В. Офицерова // Пат. физиология. – 1984. - № 3. – С. 53-57.
4. Свешников, А. А. Материалы к разработке комплексной схемы корректировки функциональных изменений в органах при чрескостном остеосинтезе / А. А. Свешников // Гений ортопедии. - 1999. - № 1. - С. 48-52.
5. Свешников, А. А. Менструальный цикл после травм и при удлинении конечностей / А. А. Свешников, Н. В. Офицерова, Л. В. Прояева // Гений ортопедии. – 1997. - № 3. – С. 78-83.
6. Свешников, А. А. Роль циклических нуклеотидов в репаративном костеобразовании / А. А. Свешников, Н. В. Офицерова, С. В. Ральникова // Вопросы мед. химии. – 1989. - № 4. - С. 9-11.
7. Федоров, Н. А. Биологическое и клиническое значение циклических нуклеотидов / Н. А. Федоров. - М. : Медицина, 1979. - 280 с.
8. Physical activity and bone density / H. J. Montoye, J. F. McCabe, H. L. Metzner, S. H. Garn // Human Biology. - 1976. - Vol. 48. - P. 599-610.
9. Rasmussen, H. Cell communication calcium ion and cyclic monophosphate / H. Rasmussen // Science. - 1970. - Vol.170. - P. 404-412.
10. Russel, W. The noninvasive determination of bone mineral content by photon absorptiometry / W. Russel, I. Chesney, V. Shore // Am. J. Dis. Child. – 1982. – Vol.136. – P. 578-580.
11. Sveshnikov, A. A. Mineralstoffwechsel bei Knochenbrüchen nach den Ergebnissen der Photonen Absorptionsmessung / A. A. Sveshnikov, N. V. Oficerova // Radiol. Diagn. - 1985. – Bd. 26. - S. 407-412.

Рукопись поступила 20.03.07.