

УДК 611.018.4:612.753:616.7(048.8)

DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2017.1.10-16

## Трофические факторы роста костной ткани, их морфогенетическая характеристика и клиническое значение

Р.Е. Костив, С.Г. Калиниченко, Н.Ю. Матвеева

Тихоокеанский государственный медицинский университет (6900950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Обзор литературы, посвященный механизмам регенерации костной ткани. Суммированы данные о топохимии и функции морфогенетических и ростковых факторов, их участии в регуляции регенераторных процессов на различных этапах консолидации переломов костей. Приводится подробный критический анализ технологий изготовления и клинического применения морфогенетических белков на основе рекомбинантных технологий генной инженерии при репаративном остеогенезе. Одним из перспективных направлений повышения остеоиндуктивных свойств биоматериалов и управления процессами регенерации костной ткани является создание различных композитов, обладающих остеоиндуктивными и остеокондуктивными свойствами, содержащих факторы роста и одновременно выполняющих роль остеогенной матрицы.

**Ключевые слова:** морфогенетические молекулы, сращение перелома, репаративная регенерация кости

Костная ткань чрезвычайно пластична и в течение жизни подвергается постоянной перестройке в процессах физиологической и репаративной регенерации. Рост кости можно модулировать с помощью препаратов, обладающих остеоиндуктивными, остеогенными и остеокондуктивными свойствами. Остеогенные материалы – это различного рода аутоаллотрансплантаты и соединения, обогащенные культивируемыми аутогенными костными клетками, способными самостоятельно дифференцироваться в остеобласты. Остеоиндуктивные препараты содержат биологически активные субстанции – трофические факторы роста, способные стимулировать процессы пролиферации и дифференцировки клеток костной ткани. Остеокондуктивные материалы выполняют роль имплантируемой матрицы, на которой в процессе прорастания сосудистого русла формируется новая кость [26].

В 1938 г. Густав Левандер впервые сделал вывод о том, что костная регенерация возникает в результате воздействия некой специфической костно-формирующей субстанции, которая активируется низкодифференцированной мезенхимальной тканью [5]. Он выделял экстракт из костной мозоли перелома бедренной кости кроликов и вводил его в мышечную ткань. Впоследствии на месте инъекции возникали гетеротопические очаги хряща и оссификации. В 1949 г. Пьер Лакруа выдвинул гипотезу об остеоиндуктивной роли костной ткани, обусловленной наличием специфического активатора, названного им «остеогенином» [21].

В 1965 г. калифорнийский ортопед Маршалл Урист открыл феномен индуцированного роста, при котором подсадка деминерализованного костного матрикса в мягкие ткани животных приводила к новообразованию кости [10, 12, 14, 22]. Впоследствии было установлено, что это явление связано с воздействием особых остеоиндуктивных белков, позже названных Уристом «костными морфогенетическими белками»

(BMP – bone morphogenetic proteins). Эти молекулярные факторы способствуют дифференцировке мезенхимальных стволовых клеток в хондро- и остеобласты [14, 22]. В настоящее время выделено и охарактеризовано до 50 представителей данного класса морфогенетических молекул [4, 12, 14, 20, 23]. Их экспрессия происходит на ранних стадиях заживления переломов костей и представляет главный фактор репаративного осте- и хондрогенеза.

Структурно-функциональная характеристика факторов роста

**PDGF** (platelet derived growth factor) – тромбоцитарный фактор роста, димер, состоящий из двух пептидов – А и В. В зависимости от их комбинации молекулярная масса молекулы колеблется от 28 до 35 кДа. PDGF-BB биологически более активен чем два других димера. PDGF-BB и PDGF-AB – системные факторы роста, участвующие во многих метаболических процессах, в то время как PDGF-AA локализован и активен только в костной ткани. В норме костная ткань человека и крысы продуцирует только ген А тромбоцитарного фактора роста, оба гена – А и В – появляются в клетках остеосаркомы. PDGF секретируется тромбоцитами, моноцитами, макрофагами и клетками эндотелия сосудов, а для транспорта фактора необходим  $\alpha 2$ -макроглобулин. Митогенный эффект PDGF-BB распространяется не только на пул клеток костной ткани, но и на фибробласты рыхлой соединительной ткани. PDGF-AA усиливает синтез коллагена 1-го типа. PDGF-BB стимулирует костную резорбцию за счет повышения количества остеокластов. Молекулы PDGF связываются с мишенями по локусам гетерогенных рецепторов  $\alpha$  и  $\beta$ . Полипептид PDGF-A реагирует только с  $\alpha$ -рецепторами, а PDGF-B может взаимодействовать с обоими типами рецепторов [20].

**FGF** (fibroblast growth factor) – фактор роста фибробластов, семейство из 9 членов полипептидной структуры. Наиболее многочисленные и активные – кислый фактор роста фибробластов (acidic FGF – FGF-1)

с молекулярной массой 16 кДа и основной фактор роста фибробластов (basic FGF – FGF-2) с молекулярной массой 17 кДа. FGF синтезируется в моноцитах, макрофагах, хондроцитах и остеобластах и активирует большинство клеток мезодермальной и нейроэктодермальной природы [4]. FGF-1 и FGF-2 служат активными участниками хондрогенеза, первыми появляются в гематоме перелома и действуют на ранних стадиях сращения кости. При этом низкие концентрации FGF-2 и костные морфогенетические белки усиливают действие друг друга, а высокие концентрации фактора «работают» как антагонисты [4, 14].

**IGF I и II** (insulin-like growth factor) – инсулиноподобный фактор роста-1 (соматомедин-С, масса 7,5 кДа) и инсулиноподобный фактор роста-2 (скелетный фактор роста, масса 8,7 кДа) секретируются различными клетками, включая остеобласты. IGF-II присутствует в костном матриксе в наибольшей концентрации, но IGF-I в 4–7 раз более активен. IGF-II функционирует уже в плодном периоде развития, а IGF-I включается в постнатальном онтогенезе. Обе формы IGF регулируются IGF-связывающими белками (IGF-БВ). Секретию IGF-I ингибирует кортизол (гидрокортизон), в то время как соматотропин, паратгормон, простагландин E2 и BMP-2 стимулируют его активность. IGF I и II усиливают синтез коллагена и других белков костной ткани, а также активируют пролиферацию и рост остеобластов. Получены данные об их стимулирующем эффекте при образовании хрящевой ткани и сращении переломов в эксперименте [19].

**VEGF** (vascular endothelial growth factor) – сосудистый эндотелиальный фактор роста, играет важную роль при энхондральной оссификации, ответствен за ангиогенез в костной мозоли. VEGF существует в нескольких изоформах. VEGF-A обеспечивает ангиогенез и является прототипом всего семейства. Функция VEGF-B на настоящий момент не изучена. Изоформы VEGF-C и VEGF-D играют главную роль в лимфоангиогенезе. VEGF продуцируется в хондроцитах, эндотелии, макрофагах, фибробластах, остеобластах и гладких мышечных клетках. Это практически единственный из известных ростовых факторов, сохраняющий активность на всех стадиях сращения перелома, начиная с первых часов в межотломковой гематоме и заканчивая спустя несколько месяцев на этапе ремоделирования костной мозоли [20].

**BMP** (bone morphogenetic proteins) – костные морфогенетические белки, трансмембранные димерные макромолекулы, стабилизированные дисульфидными связями (табл. 1). Последние определяют остеиндуктивные свойства BMP, так как при утрате одной дисульфидной связи теряется их биологическая активность. Молекулы BMP состоят из 110–150 аминокислот и существуют в виде гомо- и гетеродимеров. В настоящее время расшифрованы гены, кодирующие структуру 20 видов BMP, среди которых наиболее изученными и нашедшими применение в клинической практике являются BMP 2 и 7. BMP продуцируются остеобластами, хондроцитами и остеопрогениторными клетками. Помимо костной ткани BMP локализуются в дентине,

Таблица 1

Характеристика основных членов семейства BMP

Тип BMP	Характеристика BMP
BMP-1	Не относится к семейству TGF-β. Металлопротеиназа, которая воздействует на проколлаген I–III типов. Участвует в развитии хряща
BMP-2	Воздействует на образование хряща и кости. Играет ключевую роль в дифференцировке остеобластов, апоптозе. Проявляет остеиндуктивные свойства
BMP-3 <sup>1</sup>	Наибольшее количество из всех BMP в костной ткани, ингибирует остеогенез
BMP-4	Остеиндуктивные свойства. Участие в развитии легочной ткани и глазного яблока
BMP-5	Хондрогенез
BMP-6	Дифференциация остеобластов, хондрогенез
BMP-7 (OP-1) <sup>2</sup>	Остеиндуктивные свойства, участие в развитии ренальной системы и глазного яблока
BMP-8 (OP-2) <sup>2</sup>	Остеиндуктивные свойства
BMP-9	Участие в развитии нервной системы, печеночной ткани, ретикулоэндотелиальной системы
BMP-10	Участие в развитии миокарда
BMP-11 (GDF-8) <sup>3</sup>	Нейрогенез, дифференцировка межнейронных связей
BMP-12 (GDF-7) <sup>3</sup>	Участие в образовании сухожилий подвздошной области
BMP-13 (GDF-6) <sup>3</sup>	Образование сухожильно-связочных структур
BMP-14 (GDF-5) <sup>3</sup>	Участвует в образовании костной ткани, ускоряет репарацию сухожильной ткани
BMP-15	Усиливает активность гормонов фолликулярной системы

<sup>1</sup> Остеогенин.<sup>2</sup> OP – osteogenic protein (остеогенный протеин).<sup>3</sup> GDF – growth differentiation factor (ростовой фактор дифференцировки).

пульпе зуба, плаценте, простате. По своей первичной структуре BMP делятся на три подкласса. Подкласс А включает BMP 2 и 4, их аминокислотный состав сходен на 80%. В подкласс В входят BMP 5, 6, 7 и 8, их состав сходен на 78%. Подкласс С включает BMP-3 (также называемый остеогенин), который по составу значительно отличается от остальных членов семейства. Многие BMP по своим структурно-функциональным свойствам относятся к системе молекул трансформирующего фактора роста- $\beta$ , который вместе с простагландином Е, глюкокортикоидами, витамином D и эстрадиолом, усиливает эффекторное действие BMP [14, 24].

**TGF- $\beta$**  (transforming growth factor beta) – трансформирующий фактор роста- $\beta$ , относится к категории цитокинов. Валовое количество TGF- $\beta$  в костной ткани составляет около 200 мкг/кг, что намного больше других факторов. Семейство TGF- $\beta$  включает более 30 дискретных макромолекул и играет основную роль в костном метаболизме, индуцирует пролиферацию клеточного пула и основного вещества костной ткани. В зависимости от доли секретируемого внеклеточного матрикса TGF- $\beta$  может подавлять его деградацию в хряще, и отчасти – в кости. У человека TGF- $\beta$  существует в трех изоформах:  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 и  $\beta$ 3. У животных выделены две изоформы: TGF- $\beta$ 4 (у кур) и TGF- $\beta$ 5

(у земноводных). Все изоформы секретируются остеобластами и остеокластами и всегда присутствуют в латентной форме в костном матриксе. При резорбции костной ткани TGF- $\beta$ 1 активируется остеокластами особенно на ранних стадиях сращения перелома. Уровень TGF- $\beta$ 1 также повышается при различных воспалительных реакциях, фиброзных изменениях печени, почек, миокарда. Имеются данные о том, что эта изоформа TGF может блокировать сигнальные пути некоторых костных морфогенетических белков (BMP-2 и BMP-7), тем самым ингибируя репаративные возможности костной ткани [7] (табл. 2).

#### Факторы роста в регуляции репаративного остеогенеза

Формирование кости происходит двумя основными путями: энхондральная оссификация (когда хрящевая мозоль замещается костной тканью) и интрамембранная оссификация (когда кость формируется непосредственно мезенхимальными клетками, минуя стадию образования хряща). Ремоделирование костной ткани осуществляется на протяжении всей жизни и поддерживается сбалансированным взаимодействием двух основных типов клеток – остеобластов и остеокластов. Эти процессы особенно актуализированы при переломах кости и последующей репарации тканевого дефекта.

Таблица 2

Факторы роста в процессе репаративного остеогенеза

Фаза заживления перелома	Фактор роста	Источник, локализация, функция
Первичный воспалительный ответ	BMP 2 и 4	Локализуются в мезенхимальных клетках гематомы и камбиального слоя надкостницы в зоне перелома. BMP-4 присутствует в остеопрогениторных клетках надкостницы, костно-мозговом канале, близлежащей к перелому мышечной ткани [13, 22]
	TGF- $\beta$	Выделяется тромбоцитами и воспалительными клетками из межотломковой гематомы. Стимулируют пролиферацию мезенхимальных клеток камбиального слоя надкостницы [7]
	PDGF	Выделяется тромбоцитами и воспалительными клетками из межотломковой гематомы. Локализуется в макрофагах, находящихся близ надкостницы в первые 2 суток после перелома, на 3-и сутки экспрессия уменьшается. Стимулируют пролиферацию мезенхимальных клеток камбиального слоя надкостницы [19]
	aFGF	Локализуется в расширенном камбиальном слое и ассоциируется с быстрым ростом в мезенхимальных клетках [19]
Интрамембранная оссификация	BMP 2 и 4	Локализуются в остеобластах низкодифференцированной костной ткани костной мозоли до 6-х суток после перелома. По ходу мозоли к компактной кости количество фактора постепенно снижается [22]
	TGF- $\beta$	Локализуется в пролиферированных мезенхимальных клетках, в остеобластах матрикса и новой кости [7]
	PDGF	Выделяется тромбоцитами, стимулирует интрамембранозную оссификацию [19]
Хондрогенез	BMP 2 и 4	Интенсивно выделяется хондральными клетками-прекурсорами до созревания их в зрелые хондроциты [13]
	TGF- $\beta$	Локализуется в мезенхимальных клетках, юных и зрелых хондроцитах [7]
	IGF-1	Локализуется в юных хондробластах на границе хрящевой ткани костной мозоли с фиброзной тканью [19]
	aFGF	Синтезируется хондроцитами, их предшественниками и макрофагами. Стимулирует пролиферацию хондроцитов [19]
Энхондральная оссификация	BMP 2 и 4	Локализуется в остеобластах кальцинированной хрящевой ткани костной мозоли [13, 22]
	TGF- $\beta$ 1	Локализуется в матриксе, окружающем гипертрофированные хондроциты [7]
	TGF- $\beta$ 2	Локализуется в хондроцитах на границе оссифицированной мозоли [7]
	bFGF	Продуцируется хондроцитами, стимулирует энхондральную оссификацию [19]

При непрямом сращении перелома, как наиболее часто встречающейся форме регенерации, происходит образование параоссальной костной мозоли. Эта форма сращения не требует анатомической репозиции отломков и абсолютной (жесткой) стабильной фиксации, происходит при консервативном лечении и некоторых видах остеосинтеза, в основном интрамедуллярном. Такие внешние факторы, как микроподвижность в зоне перелома и дозированная нагрузка весом тела усиливают не прямое сращение, но при достижении некоторых критических величин, наоборот, приводят к несращению и формированию гипертрофированных ложных суставов.

Непрямое сращение отломков происходит за счет обоих типов оссификации – энхондрального и внутримембранного. В этом случае тотчас после травмы вокруг костных отломков формируется гематома, состоящая из элементов периферической и интрамедуллярной крови, а также клеток костного мозга. Повреждение инициирует острый воспалительный ответ, необходимый для формирования костной мозоли. Воспалительная реакция вызывает коагуляцию гематомы, создавая форму будущей костной мозоли. Пик развития острого воспалительного ответа приходится на первые 24 часа после травмы, а завершается в течение 7 суток [2].

Первичная воспалительная реакция включает мигрирующие в очаг повреждения макрофаги, которые секретируют широкий спектр провоспалительных цитокинов, интерлейкинов (1, 6, 11 и 18), фактора некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Эти молекулы вовлекают в процесс провоспалительные клетки и способствуют ангиогенезу в зоне сращения. Пик действия TNF- $\alpha$  приходится на первые 24 часа и постепенно уменьшается через 72 часа после травмы. Также TNF- $\alpha$  способствует дифференцировке мезенхимальных стволовых клеток в остеогенные. Эта реакция обеспечивается активацией двух типов рецепторов (TNFR1 и TNFR2), присутствующих в остеобластах и остеокластах. В то время как первый тип рецепторов (TNFR1) проявляет постоянную активность в клетках костной ткани, второй тип (TNFR2) активируется только после травмы и играет специфическую роль в регенерации кости. Среди интерлейкинов основную функцию в сращении перелома выполняют интерлейкины 1 и 6. Интерлейкин-1 продуцируется макрофагами в острой фазе воспаления, инициирует выработку остеобластами интерлейкина-6, участвует в формировании хрящевой (мягкой) мозоли. Интерлейкин-6 стимулирует ангиогенез за счет активации VEGF и способствует дифференциации остеобластов и остеокластов [8].

В процессе регенерации поврежденной костной ткани происходит пролиферация и дифференцировка мезенхимальных стволовых клеток в остеогенные. Остается открытым вопрос, какие молекулярные механизмы инициируют этот процесс. Известно, что основную роль здесь играют костно-морфогенетические

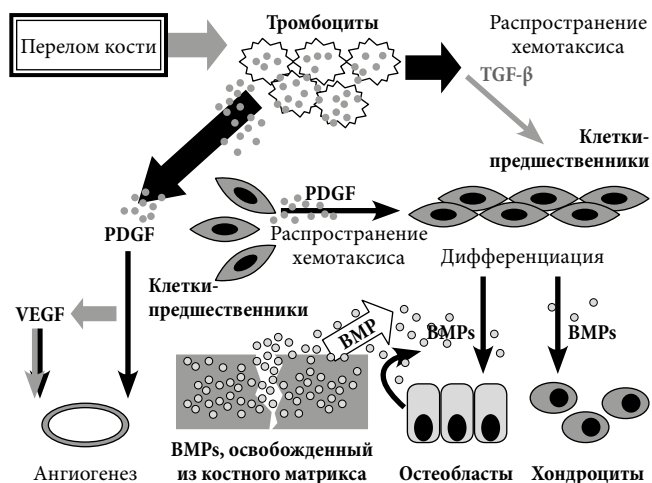


Рис. Схема взаимодействия факторов роста в остеогенезе [13]. Сигнальный путь клеточной пролиферации и хемотаксиса в процессе репаративных процессов остеогенеза: тромбоцитарный фактор роста (PDGF), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), и трансформирующий фактор роста- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) занимают особое место в сигнальном каскаде, ответственном за хемотаксис и миграцию клеток при заживлении перелома. Остеопрогениторные клетки пролиферируют в клетки-мишени для костных морфогенетических белков (BMP).

белки BMP-2 и BMP-7. По некоторым данным [13], содержание фактора стромальных клеток-1 (SDF-1) существенно повышается в зоне перелома, особенно в периостальной ткани и в межотломковом пространстве. SDF-1 ответственен за привлечение мезенхимальных стволовых клеток в зону энхондрального сращения [14].

Формирование хрящевой и периостальной форм костного сращения проходит путем интрамембранозного и энхондрального остеогенеза. Следом за образованием первичной гематомы происходит преобразование ее в богатую фибрином соединительную ткань, так называемую мягкую мозоль (энхондральный остеогенез). В эксперименте на животных мягкая мозоль полностью формируется на 7–9-е сутки после травмы. Далее происходит активация интрамембранозной оссификации в субпериостальной зоне, и мягкая мозоль постепенно приобретает ригидность. На этой стадии проявляют активность мезенхимальные стволовые клетки, находящиеся как в окружающих мягких тканях, кортикальной кости, надкостнице, костном мозге, так и мобилизованные током крови из отдаленных очагов гемопоэза. Молекулярные сигнальные механизмы запускают продукцию коллагенов I и II типов. В этом процессе основное значение приобретает суперсемейство TGF- $\beta$ , и BMP. При этом белки TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3 участвуют в процессах хондрогенеза и энхондральной оссификации, а BMP-5 и BMP-6 индуцируют клеточную пролиферацию в интрамембранозной оссификации (рис.).

Реваскуляризация и ангиогенез костной мозоли при энхондральной оссификации сопровождаются апоптозом хондроцитов и деградацией внеклеточного матрикса. Этот процесс регулируют ангиопоэтины, но ключевым фактором здесь выступает VEGF, который экспрессируют остеобласты и гипертрофированные

хондроциты. Поскольку VEGF способствует первичному вращению сосудистой сети в зону мозоли, можно полагать, что мишенью его со стороны надкостницы служат адвентициальные и эндотелиальные клетки. Избыточное введение VEGF в эксперименте ускоряет сращение перелома, а блокада его рецепторов замедляет регенерацию [17].

Минерализация и резорбция хрящевой мозоли представляет собой следующую стадию остеогенеза. В зоне перелома происходит гипертрофия хондроцитов и кальцификация внеклеточного матрикса. Этот процесс регулируется колониестимулирующим фактором макрофагов (M-CSF), лигандом рецептора-активатора ядерного фактора  $\kappa$ B (RANKL), остепротегерином (OPG) и TNF- $\alpha$ . Функция M-CSF, RANKL и OPG заключается в регуляции остеобластов и остеокластов в формировании новой кости, а TNF- $\alpha$  играет основную роль в инициации апоптоза хондроцитов мягкой мозоли и привлечении мезенхимальных стволовых клеток с остеогенным потенциалом. Митохондрии гипертрофированных хондроцитов кумулируют гранулы кальция, которые выходят во внеклеточный матрикс, где соединяются с фосфатами, формируя первичные минеральные отложения. Эти отложения создают очаги гомогенных скоплений кристаллов апатита. Пик формирования твердой мозоли у животных приходится на 14-е сутки после травмы. Вследствие окончательной кальцификации хрящевой ткани перелома и замены ее на костную, мозоль становится более жесткой и механически упругой [8].

Перестройка костной мозоли завершает процесс непрямого сращения перелома. Хотя сформированная костная мозоль обладает биомеханической прочностью, достаточной для стандартных нагрузок, ее гистологическая структура отличается от нормальной кости. В дальнейшем начинается фаза вторичной резорбции мозоли остеокластами, а остеобласты ремоделируют ее в пластинчатую кость с формированием костномозгового канала. Развитие этой фазы регулируют TNF- $\alpha$  и интерлейкин-1. Одновременно происходит угнетение активности большинства молекул суперсемейства фактора TGF- $\beta$ , кроме некоторых костно-морфогенетических белков, в частности BMP-2. Начало ремоделирования костной мозоли приходится на 3–4-ю неделю после травмы, но может полностью завершиться в течение нескольких лет. Ключевыми моментами в процессе костного ремоделирования являются полноценное кровоснабжение зоны перелома и наличие стабильной фиксации. При отсутствии адекватного кровоснабжения наиболее вероятным исходом регенерации будет развитие атрофического фиброзного сращения. В случае сохранения кровоснабжения без стабильной фиксации отломков формируется гипертрофический (гиперваскулярный) ложный сустав [9].

Для возникновения прямого сращения перелома необходим ряд условий: наличие анатомической репозиции концов отломков («зубец в зубец»), отсутствие

микродвижности в зоне перелома, абсолютная стабильность фиксации на весь период сращения. Поэтому прямое сращение практически не встречается при консервативном лечении и возможно лишь при открытой репозиции и внутренней фиксации некоторых типов переломов (чаще с одной линией излома). Процесс такого сращения заключается в прямом remodelировании межотломковой щели в пластинчатую кость, прорастании в нее кровеносных сосудов и гаверсовых каналов. Прямое сращение занимает больше времени, чем не прямое, и длится обычно от 2–3 месяцев до нескольких лет.

Прямое сращение возможно при полном контакте отломков между собой и наличии щели между ними. Для возникновения контактного типа прямого сращения перелома, помимо абсолютной стабильности фиксации, необходимо, чтобы щель между отломками не превышала 0,01 мм. В данном случае на верхушке остеона, находящегося в зоне контакта костных отломков, формируется «режущий конус», состоящий преимущественно из остеокластов, которые пересекают линию перелома и образуют полости, параллельные оси кости. Затем эти полости заполняются костной тканью, продуцируемой остеобластами в основании «режущего конуса». Скорость образования такой полости колеблется от 50 до 100 нм в сутки. Таким образом формируется гаверсова система костной ткани, которую пенетрирует вновь созданная сосудистая сеть. Позднее остеоны созревают и преобразуются в пластинчатую кость без формирования периостальной мозоли [8].

Если контакт между отломками отсутствует и размер щели не превышает 1 мм, сращение перелома происходит путем его постепенного заполнения пластинчатой костью, ориентированной перпендикулярно длинной оси органа. Этот процесс протекает гораздо медленнее, а зона сращения по своей прочности уступает контактному и тем более не прямому типам сращения.

#### Получение факторов роста и их применение в клинической практике

Исследования показали исключительную функцию BMP, как главного стимулятора остеогенеза. Возможности BMP сопоставимы, а иногда и превосходят регенераторные способности аутологичной кости – «золотого стандарта» стимуляции процессов заживления переломов.

Следует отметить, что получение BMP достаточно трудоемкий процесс. Биохимические технологии, разработанные в 70-х годах XX века М. Urist, заключались в деминерализации солянокислым гуанидином в течение 48 часов замороженного при температуре 4 °C костного матрикса, затем обезжиривании хлороформ-метанолом и длительной очистке препарата при помощи электрофореза. Из 1 кг деминерализованной кости таким способом можно получить около 1–2 мг BMP [22].

Другим методом получения BMP является генная инженерия. Впервые рекомбинантный костный морфогенетический белок (rhBMP) был синтезирован в 1988 г. J.M. Wozney [23]. Технологический процесс состоял из нескольких этапов [3]:

- 1) генноинженерная сборка гена молекулы белка с известной последовательностью аминокислот;
- 2) введение созданной молекулы в клетки бактерии *Escherichia coli*;
- 3) выращивание достаточного объема бактериальной массы для получения необходимого количества белка;
- 4) выделение белка из бактериальной массы и его биохимическая очистка.

В настоящее время для клинического применения доступны рекомбинантный человеческий BMP-2 (rhBMP-2, торговое название InFuse – производитель Medtronic Sofamor Danek, Memphis, USA), и BMP-7 (rhBMP-7, торговое название Ossigraft – производитель Stryker Biotech, Massachusetts, USA) [6].

В 2011 г. сотрудниками НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи была запатентована уникальная технология получения рекомбинантных нативных белков BMP-2 и BMP-7 с использованием бактериального продуцента [1]. На основе данной технологии созданы инновационные пластиковые материалы с остеоиндуктивными свойствами. В частности, разработаны препараты серии «Гамалант», основу которых составляют синтетический нанокристаллический гидроксипатит и высокоочищенный коллаген I типа. Эти компоненты выполняют остеокондуктивную функцию – роль матрицы, заполняющей костные дефекты, и обеспечивают адгезию и дифференцировку мезенхимальных клеток. В качестве остеоиндуктивного компонента выступает rhBMP-2, получаемый микробиологическим синтезом в *E. coli*. В настоящее время разработаны и тестируются в экспериментах *in vitro* препараты «ГАМАЛАНТ-паста-ФОРТЕ Плюс» и «ГАМАЛАНТ-крошка Плюс», содержащие рекомбинантные факторы роста.

Эффективность рекомбинантных BMP находит подтверждение в нескольких областях травматологии и ортопедии. Как правило, это связано с проблемами, возникающими при регенерации костной ткани – несращения и ложные суставы, открытые и инфицированные переломы, создание спондилодеза и артродеза.

Самое масштабное на сегодняшний день мультицентровое слепое рандомизированное контролируемое исследование при открытых переломах большеберцовой кости – BESTT (the BMP Evaluation in Surgery of Tibial Trauma) [11]. 450 человек с открытыми переломами костей голени были пролечены стандартным протоколизированным способом – первичная хирургическая обработка раны и интрамедуллярная фиксация. Все пациенты разделены на три равные группы, открытые переломы классифицировались по Gustilo–Anderson, при этом в каждой группе было равное количество пациентов с тяжелыми переломами

III ст. Представителям 1-й группы перед ушиванием раны в зону перелома вводили 0,75 мг/мл (0,75 мг белка на 1 мл кондуктора – коллагеновой губки) rhBMP-2, пациентам 2-й группы вводили 1,5 мг/мл rhBMP-2, в контрольной группе выполняли обычное ушивание раны. Отслежены результаты в течение 12 месяцев после травмы. Отмечено значительное улучшение результатов лечения во 2-й группе с двойной дозировкой rhBMP-2. Так, в контроле повторное вмешательство в связи с несращением потребовалось 46 % пациентов, а во 2-й группе – 26 %. Также отмечен и более низкий уровень инфекционных осложнений в раннем послеоперационном периоде во 2-й группе по сравнению с контрольной – 24 и 44 %, соответственно.

Большое количество работ посвящено изучению влияния BMP при различных видах спондилодеза. J.K. Burkus et al. в рандомизированном мультицентровом сравнительном исследовании 279 человек, оперированных передним поясничным спондилодезом, сообщили о более высоком уровне наступления спондилодеза через 2 года после вмешательства в группе, где костный аутографт был насыщен rhBMP-2, против обычного аутографта (94 и 88,7 %) [18]. J.R. Ditmar в сравнительном исследовании с аналогичным дизайном при заднем поясничном спондилодезе у 98 пациентов отметил через два года более высокий уровень сращения (90,9 %) у лиц, получавших rhBMP-2, против контрольной группы (73,3 %) [19].

G. Zimmermann et al. [25] сопоставили эффективность применения rhBMP-7 и аутографтов в лечении ложных суставов и несращений большеберцовой кости. 82 пациентам была выполнена только костная аутопластика, из них у 28 % через 4 месяца после вмешательства не было отмечено рентгенологических признаков консолидации, что потребовало повторных вмешательств. В аналогичной группе лиц с несращениями (26 человек) был использован имплантат с rhBMP-7 и сращение через 4 месяца наступило в 92 % наблюдений.

N.K. Kanakaris et al. [15] в 4-летнем многоцентровом исследовании у 30 пациентов с несращениями переломов бедренной кости выполняли имплантацию 4 мл rhBMP-7 на коллагеновом носителе. Сращения удалось добиться в 26 случаях через 6 месяцев после вмешательства. При этом в исследование включались только лица, перенесшие одно или несколько безуспешных вмешательств по поводу данной патологии стандартными способами с применением костных ауто- и аллотрансплантатов. Эти же авторы в 3-летнем исследовании сообщали о проведении оперативных вмешательств для достижения артродеза крупных суставов с имплантацией rhBMP-7 у 19 человек [16]. Пациенты оперированы по поводу посттравматического артроза различных анатомических областей – голеностопного, подтаранного суставов, мелких суставов стопы и лонного сочленения. Выполнялись различные модификации металлодеза с имплантацией 3,5 мг

rhBMP-7 на коллагеновом носителе без использования аутокости. Через 15 месяцев артродез состоялся у 17 человек (89,5%) и не состоялся у 2 пациентов с повреждением лонного симфиза – наиболее неблагоприятной для сращения области.

#### Заключение

Исследования молекулярно-клеточных механизмов влияния трофических и ростковых факторов на основе рекомбинантных морфогенетических белков являются определяющими в решении проблемы регенерации поврежденной кости. Перспективы развития данных технологий связаны с разработкой оптимального кондуктора (матрицы для фактора роста), дозы и концентрации BMP. Необходимо установить пути доставки белка в донорскую зону и в сочетании с другими факторами роста, а также с тромбоцитарно-обогащенной плазмой, мезенхимальными стволовыми клетками и различными аллогraftами. Фундаментальные и экспериментально-клинические исследования по этим направлениям представляют перспективу для дальнейшего решения одной из важнейших задач – создания фармакотерапевтической системы управляемой регенерации костной ткани.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, научный проект № 14-33-00009.*

#### Литература

1. Бартов М.С., Карягина А.С., Громов А.В. [и др.]. Остеопластические препараты нового поколения «Гамалант», содержащие факторы роста и регенерации костной ткани // Кафедра травматологии и ортопедии. 2012. № 2. С. 21–25.
2. Берченко Г.Н. Биология заживления переломов кости и влияние биокомпозиционного наноструктурированного материала Коллапан на активизацию репаративного остеогенеза. // Медицинский алфавит. Больница. 2011. № 1. С. 14–19.
3. Зайцев В.В., Карягина А.С., Лунин В.Г. Костные морфогенетические белки (BMP): общая характеристика, перспективы клинического применения в травматологии и ортопедии. // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. 2009. № 4. С. 79–84.
4. Калинин С.Г., Щава С.П., Матвеева Н.Ю. Ангиогенное и цитопротективное влияние основного фактора роста фибробластов в фокусе экспериментальной церебральной ишемии // Тихоокеанский медицинский журнал. 2009. № 2. С. 66–69.
5. Balaji A., Alam N. Bone morphogenetic proteins. LAP LAMBERT Academic Publishing, 2012. 60 p.
6. Bishop G.B., Einhorn T.A. Current and future clinical applications of bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery // International Orthopaedics. 2007. Vol. 31. P. 721–727.
7. Chen G., Deng C., Li Y.P. TGF- $\beta$  and BMP Signaling in osteoblast differentiation and bone healing // Int. J. Biol. Sci. 2012. Vol. 8. P. 272–288.
8. Einhorn T.A. Bone healing: little secrets. // Clinical cases in mineral and bone metabolism. 2011. Vol. 8. P. 17–20.
9. Fassbender M., Minkwitz S., Strobel C. et al. Stimulation of bone healing by sustained BMP-2 delivery // Int. J. Mol. Sci. 2014. Vol. 15. P. 8539–8552.
10. Giannoudis P.V., Einhorn T.A. Bone morphogenetic proteins: applications in orthopaedic and trauma surgery. Elsevier, 2010. 177 p.
11. Govender S., Csimma C., Genant H.K. [et al.]. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: A prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients // J. Bone Jt. Surg. Am. 2002. Vol. 84. P. 2123–2134.
12. Granjeiro J.M., Oliveira R.C., Bustos-Valenzuela J.C. [et al.]. Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use // Braz. J. Med. Biol. Res. 2005. Vol. 38. P. 1463–1473.
13. Hollinger J.O., Hart C.E., Hirsch S.N. [et al.]. Recombinant human platelet-derived growth factor: biology and clinical applications // J. Bone Joint Surg. (Am). 2008. Vol. 90. P. 48–54.
14. Jain A.P., Pundir S., Sharma A. Bone morphogenetic proteins: the anomalous molecules // Journal of Indian Society of Periodontology. 2013. Vol. 17, No. 5. P. 583–586.
15. Kanakaris N.K., Calori G.M., Verdonk R. [et al.]. Application of BMP-7 to tibial non-unions: A 3-year multicenter experience // Injury. 2008. Vol. 39. P. 83–90.
16. Kanakaris N.K., Mallina R., Calori G.M. [et al.]. Use of bone morphogenetic proteins in arthrodesis: clinical results // Injury. 2009. Vol. 40 (Suppl. 3). P. 62–66.
17. Marsell R., Einhorn T.A. The biology of fracture healing // Injury. 2011. Vol. 42, No. 6. P. 551–555.
18. Nauth A., Ristiniemi J., McKee M.D. [et al.]. Bone morphogenetic proteins in open fractures: past, present and future // Injury. 2009. Vol. 40 (Suppl. 3). P. 27–31.
19. Shimer A.L., Oner F.C., Vaccaro A.R. Spinal reconstruction and bone morphogenetic proteins: open questions // Injury. 2009. Vol. 40 (Suppl. 3). P. 32–38.
20. Simpson A.H.R.W., Mills L., Noble B. The role of growth factors and related agents in accelerating fracture healing // JBJS (Br). 2006. Vol. 88, No. 6. P. 701–705.
21. Solheim E. Growth factors in bone. // International Orthopaedics. 1998. Vol. 22. P. 410–416.
22. Urist M.R. Bone: formation by autoinduction // Sciens. 1965. Vol. 150. P. 893–899.
23. Wozney J.M., Rosen V. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair // Clin. Orthop. Relat. Res. 1998. Vol. 346. P. 26–37.
24. Yu Y.Y., Lieu S., Lu C., Colnot C. BMP 2 stimulates endochondral ossification by regulating periosteal cell fate during bone repair // Bone. 2010. Vol. 47, No. 1. P. 65–73.
25. Zimmermann G., Wagner C., Scheckenbecher K. [et al.]. Treatment of tibial shaft non-unions: bone morphogenetic proteins versus autologous bone graft // Injury. 2009. Vol. 40 (Suppl. 3). P. 50–53.
26. Zwingenberger S., Nich C., Valladares R.D. [et al.]. Recommendations and considerations for the use of biologics in orthopedic surgery // Bio Drugs. 2012. Vol. 26, No. 4. P. 245–256.

*Поступила в редакцию 22.12.2016.*

#### TROPIC FACTORS OF BONE GROWTH, THEIR MORPHOGENETIC CHARACTERIZATION AND CLINICAL SIGNIFICANCE

R.E. Kostiv, S.G. Kalinichenko, N.Yu. Matveeva  
Pacific State Medical University (2 Ostryakova Ave. Vladivostok 6900950 Russian Federation)

**Summary.** The literature review dedicated to regeneration mechanisms of bone tissue. Summarized the data on topochemistry and functions of morphogenetic and growth factors, their participation in the regulation of the regenerative processes on different levels of the fracture union. Given the detailed critical overview of the technologies of production and clinical use of morphogenetic proteins on the basis of recombinant technologies of gene engineering with reparative osseogenesis. One of the most promising ways of increasing the osteoinductive properties of biomaterials and bone tissue regeneration control process is the creation of various composites having osteoinductive and osteoconductive properties, containing growth factors, and at the same time performing the role of the osteogenic matrix.

**Keywords:** morphogenetic molecule, fracture healing, reparative bone regeneration.

Pacific Medical Journal, 2017, No. 1. p. 10–16.