

УДК 616-001.5:616.71-003.93

## Трансформирующий фактор роста (ТФР)- $\beta$ 1 как маркер замедленного сращения переломов\*

G. Zimmermann<sup>1</sup>, P. Henle<sup>2</sup>, M. Kusswetter<sup>1</sup>, A. Moghaddam<sup>1</sup>,  
A. Wentzensen<sup>1</sup>, W. Richte<sup>2</sup>, S. Weiss<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Клиника неотложной и восстановительной хирургии при Гейдельбергском университете. Германия

<sup>2</sup>Ортопедическая университетская клиника Гейдельберга. Германия

Источник: Bone. — 2005. — Vol. 36. — P. 779-785

*The concentration of growth-transforming factor (GTF)  $\beta$ 1 in blood serum was analysed in its dynamics in 103 patients with diaphyseal fractures of long bones depending upon the course of restorative osteogenesis, i.e. with the normal and delayed healing of the fracture. In order to exclude the factors, which could influence the restorative regeneration, the patients in both groups were distributed by their sex, age, type and localization of the fracture, technique of the osteosynthesis performed. Data were received about an early (4-6 weeks after the fracture) reduction in GTF  $\beta$ 1 level in blood serum of the patients with a delayed consolidation. It was found out that GTF  $\beta$ 1 was the main key molecule, which controlled the fracture healing, and could serve as a marker of a delayed consolidation.*

*У 103 пацієнтів з діафізарними переломами довгих кісток проаналізовано в динаміці концентрацію трансформуючого фактору росту (ТФР)- $\beta$ 1 у сироватці крові в залежності від перебігу репаративного остеогенезу, тобто при нормальному та сповільненому загоєнні перелому. Для виключення факторів, що можуть впливати на репаративну регенерацію, пацієнтів обох груп було розподілено за статтю, віком, типом і локалізацією перелому, технікою проведеного остеосинтезу. Отримано дані про раннє (через 4-6 тижнів після перелому) зниження рівня ТФР- $\beta$ 1 в сироватці крові пацієнтів з уповільненою консолідацією. Встановлено, що ТФР- $\beta$ 1 є основною ключовою молекулою, яка регулює загоєння перелому, і може служити маркером сповільненої консолідації.*

### Резюме

В нескольких исследованиях был доказано, что митогены семейства ТФР- $\beta$  (трансформирующих факторов роста) являются ключевыми местными и системными молекулами, которые регулируют заживление переломов. Тем не менее, существует лишь немного информации о системной регуляции регенерации кости факторами роста и отсутствуют данные, сравнительного анализа содержания факторов роста кости в сыворотке крови при нормальном или патологическом заживлении переломов. Мы предположили, что качество заживления переломов может быть связано с системными нарушениями ключевых факторов роста, принимающих участие в формировании и ремоделировании кости.

Таким образом, целью настоящего исследования была оценка возможных различий содержания КМБ-2 (костного морфогенетического белка), КМБ-4 и ТФР- $\beta$ 1 в сыворотке крови у пациентов с нормальным и замедленным течением заживления переломов.

В перспективное исследование были включены 103 пациента с диафізарними переломами длинных костей. Анализ крови был проведен у всех участников исследования в течение 6-месячного периода по стандартизированной схеме. В конце индивидуального периода исследования, факторы роста были исследованы с помощью метода иммуноферментного анализа. Для исключения всех возможных влияющих факторов, пациенты в обеих группах были распределены по полу, возрасту,

\*Материал предоставлен компанией Евромедэкс Франс

Перевод — к.м.н. Романюк М.Г. (ГУ «Институт урологии АМН Украины»)

типу перелома, его локализации, а также по технике проводимого остеосинтеза. В течение периода исследования, через 1 год, было выделено 10 пациентов с атрофическим типом регенерации костей, которых сравнивали с 10 пациентами с нормальным заживлением перелома. Диагноз замедленного сращения перелома был поставлен при отсутствии его полной консолидации в течение 4 месяцев после травмы.

Мы выявили повышение содержания ТФР- $\beta$ 1 в сыворотке крови ко второй неделе после перелома в обеих группах пациентов, которые в течение 6 недель после травмы эти показатели возвращались к референтным значениям. Однако у пациентов с замедленным сращением переломов снижение концентрации в сыворотке крови проходило раньше. Через 4 недели после перелома, уровень ТФР- $\beta$ 1 в сыворотке крови был достоверно ниже у пациентов с замедленным типом сращения.

Уровни КМБ-2 и КМБ-4 в сыворотке крови были ниже минимального определяемого уровня у всех пациентов.

Эти данные подтверждают критическую роль ТФР- $\beta$ 1 в заживлении переломов. По-видимому, течение фазы консолидации зависит от достаточного количества ТФР- $\beta$ 1.

## Введение

Сращение перелома является физиологическим восстановительным процессом, не похожим на другие типы регенерации тканей, приводящим к восстановлению первоначального качества и функции кости. Процесс сращения отражает эмбриональное развитие и рост кости [30]. В течение последнего десятилетия исследования, касающиеся регенерации кости, значительно расширились и интенсифицировались. При помощи иммуногистохимического определения и анализа экспрессии генов была подтверждена необходимость разнообразных биохимических факторов для нормального сращения переломов. Gerstenfeld et al. описали более 50 цитокинов, морфогенов, протеаз и факторов ангиогенеза, которые играют важную роль в сращении переломов [10]. Тем не менее, у большинства из них остаются неизвестными механизмы действия, точки приложения и факторы, регулирующие их действие [16]. Большая часть современных знаний по факторам роста, принимающим участие в сращении переломов, получена на моделях животных или в исследованиях *in vitro* [22]. Среди них КМБ и ТФР- $\beta$ 1, как члены суперсемейства ТФР- $\beta$ , определены как ключевые регуляторные молекулы [2, 15, 16]. Как ТФР- $\beta$ , так и разные

КМБ были найдены в тканях регенерата кости в области перелома как у животных, так и у человека [2, 3, 12, 27, 32]. Кроме того, было обнаружено, что во время сращения перелома повышается регулируемость (увеличивается количество и чувствительность) рецепторов КМБ [14, 21, 23]. В большом перспективном многоцентровом клиническом исследовании Friedlaender et al. смогли показать, что введение остеогенного протеина-1 (ОП-1) (КМБ-7) с носителем коллагена I типа так же эффективно, как и подсадка костного аутооттрансплантата при лечении несрастающихся переломов большеберцовой кости [7]. Позже Einhorn et al. продемонстрировали ускорение заживления перелома после одноразовой перкутанной инъекции КМБ-2 у крыс [6]. Кроме прямой стимуляции остеобластов, хондрокластов и хондроцитов, ТФР- $\beta$  интенсифицирует эффекты других факторов роста кости, таких как КМБ и инсулиноподобный фактор роста (ИФР) [4, 9, 25]. Стимулирующий эффект ТФР- $\beta$  на заживление переломов был продемонстрирован в экспериментах на животных. Однако эти эффекты были достигнуты при использовании нефизиологических высоких доз ТФР- $\beta$  и показали противоречивые конечные результаты [8, 24, 26, 29].

Разные авторы предположили, что не только местное высвобождение факторов роста в месте перелома, но также и системная реакция необходима для запуска местной реакции [1, 5, 8, 11]. Недостаточное системное обеспечение факторов роста приводит к потере костной ткани и уменьшению дифференциации остеобластов [19, 33]. Эта гипотеза подтверждена исследованием Gazit et al., которое показало, что системное применение ТФР- $\beta$  повышает плотность костей у мышей с остеопенией [9]. У пациентов повторные биопсии мест переломов являются незаконными по этическим причинам. Тем не менее, дальнейшие исследования избирательных остеотомий на животных моделях показывали одновременное местное и системное повышение определенных факторов роста [18]. Из этого следует, что локальные концентрации факторов роста отображаются в циркулирующей крови. Следовательно, системные измерения факторов роста являются многообещающим и относительно несложным методом диагностики нормального или патологического сращения переломов у людей *in vivo*. Анализ периферической венозной крови на сегодня считается стандартным методом учета в сыворотке концентрации разных факторов роста после травмы [17, 18, 31].

Мы знаем, что не имеется данных по измере-

**Таблица 1.** Демографические данные пациентов с переломами длинных костей, распределенные на пары с нормальным и замедленным сращением

Сопоставляемые группы											
Замедленное сращение						Нормальное сращение					
№	Пол	Возраст	Тип	Место	Фиксация	№	Пол	Возраст	Тип	Место	Фиксация
1	ж	57	A	бедро	штифт	1	ж	62	A	бедро	штифт
2	м	35	A	голень	штифт	2	м	36	A	голень	штифт
3	м	46	C 1°	голень	штифт	3	м	41	C 1°	голень	штифт
4	м	54	C	голень	пластина	4	м	49	C	голень	пластина
5	м	48	C 1°	голень	пластина	5	м	45	C 1°	голень	пластина
6	ж	45	A	голень	пластина	6	ж	50	A	голень	пластина
7	м	51	C	голень	штифт	7	м	55	C	голень	штифт
8	м	48	C	бедро	пластина	8	м	43	C	бедро	пластина
9	м	48	C 1°	голень	пластина	9	м	48	C 1°	голень	пластина
10	м	34	A	предплечье	пластина	10	м	37	A	предплечье	пластина

Во внимание принимали следующие критерии сопоставления: возраст ( $\pm 5$  лет), пол (ж=женский, м=мужской), локализация перелома (место), тип перелома (разделение на классы А, В и С по классификации ASIF) и метод остеосинтеза (фиксация). В случае открытого перелома учитывали только переломы I типа (1°) по классификации Gustilo.

нию системных факторов роста кости с учетом нормальных сроков или замедления сращения переломов костей у людей. Это исследование направлено не только на сравнение показателей ТФР- $\beta 1$  у пациентов с результатами предыдущих исследований на животных. Скорее, оно проведено для тщательного анализа различий между пациентами с нормальным и патологическим сращением переломов. Возможно, это будет вкладом в исследования по ранней диагностике нарушений процессов заживления кости.

## Материал и методы

### Пациенты

Между январем 2002 и январем 2003 гг., 103 пациента, которым было проведено хирургическое лечение в клинике неотложной и восстановительной хирургии в Людвигсхафен в Гейдельберге (Германия), были включены в исследование.

Возраст пациентов составил от 18 до 80 лет, был доказан рентгенологически перелом длинной кости, у всех было получено согласие на проведение исследования, что являлось критериями включения.

Критериями исключения были: множественная травма, значительное поражение мягких тканей, открытые переломы II и III типов по классификации Gustilo, пребывание на аппарате искусственного дыхания больше 24 часов после операции и более чем два перелома длинных костей.

Так как концентрацию ТФР- $\beta 1$  могли оказывать влияние разные медикаменты или системные нарушения, из исследования исключали пациентов: с почечной недостаточностью, заболеваниями

печени, злокачественными новообразованиями, коллагенозами, воспалительными заболеваниями толстой кишки, гематологическими заболеваниями. Также исключали пациентов, получающих длительную терапию стероидными и нестероидными противовоспалительными препаратами или другими иммуносупрессивными агентами. Всех включенных пациентов наблюдали как



**Рис. 1.** Фоторентгенограммы костей голени подобранной пары. Пример пары № 6 из таблицы 1. Сходный тип перелома (42 А 1.1) с одинаковым типом внутренней фиксации. Рентгенограмма (а) показывает отсутствие сращения через 6 месяцев после операции, рентгенограмма (b) — соответствующего пациента-партнера с консолидацией кости через то же время после операции

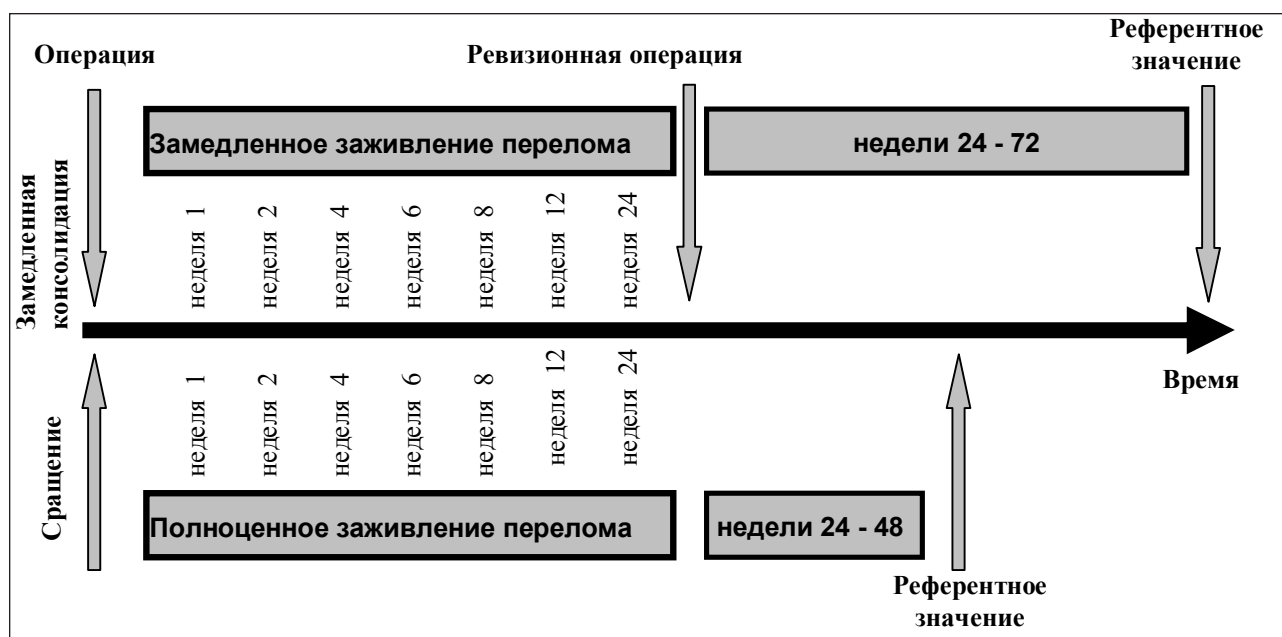


Рис. 2. Схема забора образцов крови

минимум 1 год. При контрольных визитах пациенты являлись в клинику для клинического и радиологического обследования каждые две недели в течение первых 3 месяцев после травмы, ежемесячно в течение последующих 3 месяцев, и, наконец, через год после последней операции. Если в течение 4 месяцев после травмы по рентгенологическим данным не наблюдалось консолидации перелома и пациент отмечал боль при физических упражнениях, пациентам проводили рентгенологическое исследование для подтверждения диагноза нарушения сращения перелома.

Каждому пациенту с замедленной консолидацией соответствовал пациент с нормальным сращением кости, с которым и проводили сравнение. Демографические данные пациентов и критерии сопоставления представлены в табл. 1. Из 103 отобранных пациентов у 14 развился атрофический тип замедленного сращения перелома, что было подтверждено радиологическим методом и во время хирургической ревизии. 4 из этих пациентов были исключены из исследования, так как не было соответствующих пациентов-партнеров с нормальным заживлением аналогичного перелома. Таким образом, в конечный анализ могли быть включены только 10 пациентов с замедленным и 10 пациентов с нормальным сращением переломов. На рис. 1 представлен показательный пример соответствующей пары с одинаковым типом перелома и остеосинтеза с нормальным сращением костей и с замедленным процессом.

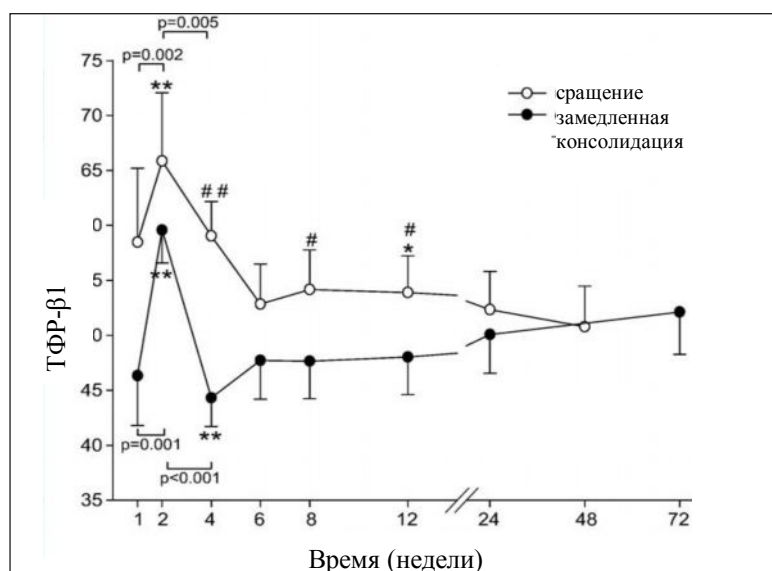
В группе с нормальным заживлением перелома дополнительных оперативных вмешательств не требовалось во время периода исследования. Пациенты группы с замедленной консолидацией перенесли в среднем 1,3 ревизионных операции (от 1 до 2 операций) до полной консолидации костей. Ни одну повторную операцию не проводили ранее 4 месяцев после первичной.

#### *Исследование крови*

У всех пациентов были проведены анализы периферической крови с интервалами в соответствии с расписанием контрольных визитов (рис. 2). Каждую пробу набирали с 8 до 11 утра натощак и образцы крови сохраняли до тестирования при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Если сращение перелома было замедленным, образцы крови собирали периодически до достижения полного сращения перелома. В течение 12 месяцев после хирургического вмешательства, мы ожидали нормализацию системного уровня ТФР- $\beta 1$ . Таким образом, его концентрация в сыворотке крови через 1 год после первичной операции у пациентов с нормальным течением заживления перелома и через 1 год после ревизионного оперативного вмешательства у пациентов с замедленным сращением перелома принималась как базовое, или референтное значение содержания белка.

#### *Измерение ТФР- $\beta 1$ , КМБ-2 и КМБ-4.*

Для количественного определения в сыворотке ТФР- $\beta 1$ , КМБ-2 и КМБ-4 использованы наборы для иммунного анализа (Quantikine, RD Systems,



**Рис. 3.** Диаграмма уровней ТФР-β1 в сыворотке крови в виде абсолютных показателей концентраций. Динамика показателей ТФР-β1 (среднее ± SD) у пациентов после операций по поводу переломов длинных костей с нормальным или замедленным течением. Достоверные изменения по сравнению с референтными значениями (48-недельными для сращения; 72-недельными для замедленных сращений) указаны звездочками (\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ ). # указывает на достоверную разницу в конкретный момент времени между нормальным и замедленным сращением переломов (# $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$ ).

Миннеаполис, МН, США). Все этапы анализа проводили в соответствии с рекомендованным протоколом производителя. Анализ ТФР-β1 определяет специфическую биологически активную форму фактора с чувствительностью 7 пг/мл. Минимальная определяемая доза КМБ-2 варьирует от 4,3 до 29 пг/мл, для КМБ-4 — от 0,43 до 3,68 пг/мл. Концентрации представлены как среднее от двух измерений. Для избегания вариабельности результатов в разных диагностических наборах образцы крови соответствующего пациента-партнера были проанализированы таким же диагностическим набором после окончания индивидуального времени наблюдения.

#### Статистический анализ

Содержание определяемых веществ в сыворотке крови выражается в виде абсолютной концентрации ± стандартное отклонение на 10 пациентов в определенный период времени. Референтными значениями считаются средние показатели как минимум двух измерений в течение 1 недели и через год после первичной операции (сращение переломов) или ревизионной операции (замедленная консолидация).

Для определения достоверных изменений в течение времени за весь период исследования применяли непараметрический тест Фридмана. Для парных значений для определения статистической значимости различий между референтным уровнем и посттравматическими результатами внутри двух групп применяли двухвыборочный критерий Вилкоксона. Временные зависимые различия в группах лечения также определяли при помощи критерия Вилкоксона и t-критерия Стьюдента.

Для статистического сравнения показателей

содержания веществ в сыворотке крови в конкретный период времени у пациентов с нормальным сращением переломов и подобранных пациентов с замедленной консолидацией использовали непараметрический U-тест Манн-Уитни для непарных значений. Доверительный интервал был определен предварительно в виде показателя  $\alpha = 0,05$ . Статистический анализ проводили при помощи программы SPSS для Windows 11,0 (Norusis SPSS GmbH Inc.).

Исследование проводили в соответствии с Хельсинской декларацией. Протокол был официально одобрен этическим комитетом медицинского факультета Гейдельберга № 157/2002.

#### Результаты

##### Референтные значения

Послеоперационная концентрация ТФР-β1 в сыворотке, выраженная в абсолютных значениях, представлена на рис. 3.

Референтные значения ТФР-β1 у пациентов с нормальным сращением переломов ( $50,8 \pm 9,3$  нг/мл) и с замедленной консолидацией ( $52,1 \pm 9,3$  нг/мл) достоверно не отличались друг от друга ( $P = 0,971$ ). Все полученные референтные значения ТФР-β1 были в пределах диапазона, характерного для здорового человека.

Концентрации КМБ-2 и КМБ-4 в сыворотке были ниже границ определения диагностических наборов, использованных в исследовании, даже после увеличения рекомендованного времени инкубации, длящегося более 24 часов. Результаты положительных контролей стандартной сыворотки доказали правильность проведения методики.

**Таблица 2.** Концентрации ТФР-β1 (нг/мл) в сыворотке у пациентов с нормальным и замедленным сращением переломов через 4 недели после первой операции и через год после первой (при нормальном сращении при референтном значении через 48 недель) или ревизионной операции (при замедленной консолидации при референтном значении через 48 недель)

Сопоставляемые пары							
Замедленная консолидация				Нормальное сращение			
№	Референтное значение (через 72 недели)	Через 4 недели	Процент изменений	№	Референтное значение (через 48 недель)	Через 4 недели	Процент изменений
1	76,9	58,5	-23,9	1	57,3	55,5	-3,1
2	45,2	43,1	-4,6	2	30,0	54,3	+81,0
3	40,0	35,5	-9,7	3	67,0	65,0	-3,0
4	43,4	41,8	-3,7	4	57,9	77,1	+33,2
5	37,9	30,3	-20,1	5	37,5	71,7	+91,2
6	50,2	44,3	-11,8	6	44,8	60,5	+35,0
7	66,7	53,2	-20,2	7	44,5	59,4	+33,5
8	55,7	49,7	-10,8	8	51,3	46,1	-10,1
9	55,8	46,1	-17,4	9	56,7	49,9	-12,0
10	49,6	40,7	-17,9	10	64,7	51,1	-21,0

### *Динамика во времени*

В обеих группах пациентов была максимальная концентрация ТФР-β1 в сыворотке через две недели после травмы. В то время как в группе пациентов с замедленной консолидацией максимальное снижение отмечалось в течение первой недели, у пациентов с нормальным заживлением переломов показано постоянное повышение с момента операции.

После второй недели уровень ТФР-β1 начал резко снижаться у пациентов с замедленной консолидацией. На 4-й неделе после операции концентрация ТФР-β1 была значительно ниже референтного значения в этой группе ( $P < 0,005$ ). После спада отмечено медленное возрастание концентрации, и показатели достигли референтных через 6 месяцев после травмы.

У пациентов с нормальным сращением переломов концентрация в сыворотке ТФР-β1 также снижалась спустя вторую неделю после травмы. Однако в этой группе сывороточные уровни не понижались ниже референтного порога и были достоверно выше через 12 недель после операции, и через 6 месяцев почти достигли референтных значений.

Анализ изменений системных значений ТФР-β1 во времени выявил достоверные различия между 1-й и 2-й неделями ( $P = 0,002$ ) и со 2-й по 4-ю неделю ( $P < 0,005$ ) в группе пациентов с нормальной консолидацией. В группе пациентов с замедленной консолидацией достоверные изменения определялись в те же временные промежутки (недели 1-2;  $P = 0,001$  и недели 2-4;  $P = 0,001$ ).

### *Сравнение нормальной и замедленной консолидации переломов*

При сравнении концентраций ТФР-β1 в сыворотке

через 1 неделю после операции не было найдено достоверных различий между пациентами с нормальной и замедленной консолидацией перелома ( $58,46 \pm 14,79$  нг/мл против  $46,33 \pm 12,58$  нг/мл;  $P = 0,052$ ).

Через две недели после операции не было найдено достоверных различий между абсолютными концентрациями и относительным приростом между двумя группами.

На 4-ю неделю определялась достоверная разница как между абсолютными, так и между относительными концентрациями ( $P_{\text{абс.}} = 0,002$  и  $P_{\text{отн.}} = 0,004$ ). У пациентов с замедленной консолидацией перелома наблюдалась достоверно более низкая концентрация ТФР-β1 по сравнению с группой пациентов с нормальным заживлением перелома. Индивидуальные концентрации ТФР-β1 в сыворотке на 4-ю неделю после первичной операции по сравнению с референтными значениями для каждого пациента сопоставляемых пар показаны в табл. 2. Различия между нормальным и замедленным сращением перелома были также статистически значимыми на 8-й и на 12-й неделе после травмы.

### **Обсуждение**

Это исследование демонстрирует достоверные различия в динамике значений ТФР-β1 в сыворотке крови между пациентами с нормальным заживлением переломов и замедленной консолидацией в течение 6 месяцев. КМБ-2 и КМБ-4 не определялись в кровеносном русле.

В течение 1-й недели после травмы, когда кровь и клетки воспаления заполняют межотломковую щель, не определяется никаких различий в абсолютных и относительных уровнях ТФР-β1. В течение 2-й недели с началом образования

мягкой костной мозоли увеличивается количество остеобластов, хондробластов и незрелых клеток-предшественников, мигрирующих в область перелома. Этот период характеризуется достоверно повышенным уровнем концентрации ТФР- $\beta$ 1 в сыворотке, как в группе пациентов с нормальным сращением костей, так и в группе пациентов с замедленной консолидацией по сравнению с их референтными значениями. В это время не наблюдается достоверных различий между двумя группами. Это указывает на неизменный механизм регуляции в первой фазе сращения перелома.

Между 2 и 4 неделями после травмы начинает формироваться костный регенерат. В этот период пациенты с замедленной консолидацией перелома демонстрируют более выраженное снижение системных уровней ТФР- $\beta$ 1. Можно предположить, что в этот период механическая стимуляция формирующих кость клеток, таких как остеобласты и другие предшественники остеогенеза, связана с повышением концентрации ТФР- $\beta$ 1. Если механической стимуляции не происходит вследствие нарушения замещения межотломковой щели твердой костной мозолью, синтез ТФР- $\beta$ 1 большинством клеток может снизиться или даже прекратиться.

Необходимость наличия ТФР- $\beta$  в формировании кости и остеогенной дифференцировке показана нашими ранними исследованиями и другими клиническими наблюдениями пациентов, которым проводили distraction, жесткое сопоставление фрагментов кости или накладывали полужесткие внешние фиксаторы. Концентрация ТФР- $\beta$  была повышена у пациентов с постоянным механическим влиянием на область межотломковой щели, таким как постоянные растягивающие силы, возникающие при наложении вытяжения, или перемежающиеся компрессионные и растягивающие силы при наложении внешних фиксаторов, но не у пациентов с первичным наложением жестких фиксирующих устройств. У последних костный регенерат практически не формируется. Из этого следует, что формирование костного регенерата индуцируется механическим стимулирующим влиянием при микроподвижности в области перелома [13, 17, 31].

В противоположность этим данным, недавно опубликованный анализ показал, что экспрессия гена ТФР- $\beta$  у старых крыс с замедленным сращением переломов бедренной кости происходит так же, как и у молодых с нормальным сращением перелома [20]. Авторы сделали заключение, что замедление консолидации переломов у старых крыс не было связано с недостаточной экспрес-

сией какого-то конкретного фактора роста или цитокинов, а вследствие невозможности старых крыс поддерживать высокие уровни экспрессии генов остеоиндуктивных факторов до полной консолидации кости.

Эти данные поддерживают полученные нами данные о раннем снижении, через 4–6 недель после перелома, уровня ТФР- $\beta$ 1 в сыворотке у пациентов с замедленной консолидацией по сравнению с пациентами с нормальным заживлением переломов.

Однако авторы подчеркнули сложность проведения исследования и проблему выбора контроля. Кроме того, проводили только сравнение взрослых крыс с замедленной консолидацией переломов со сравнительно молодыми крысами с нормальным сращением, в течение периода исследования, 6 недель после возникновения травмы, что приводило к значительному разбросу в возрасте. Все-таки остается спорным вопрос, заживают ли переломы у старых крыс в течение 3–4 месяцев после травмы.

Другим вопросом, поставленным в нашем исследовании, был следующий: может ли концентрация ТФР- $\beta$ 1 в сыворотке быть возможным маркером замедленного сращения или несращения переломов? Это могло бы стать хорошим способом диагностики для проведения профилактики или ранних терапевтических мероприятий, что значительно улучшило бы выздоровление пациентов. Вследствие небольшого количества пациентов в нашей популяции мы не можем утверждать, что одноразовое измерение ТФР- $\beta$ 1 является достоверной диагностической процедурой для определения неадекватного сращения перелома. Но некоторые интересные факты могут быть выделены из наших данных.

Если гипотетический порог значения на 4 неделе установить на уровне 45 нг/мл, анализ бы выявил замедленное заживление перелома у 8 из 10 пациентов нашей группы без единого ложноположительного результата. Также, учитывая межличностную вариабельность уровней ТФР- $\beta$ 1, может быть полезным оценивать относительные изменения послеоперационных показателей по сравнению с референтным значением, что должно отражать индивидуальную физиологическую концентрацию ТФР- $\beta$  в сыворотке. Вопреки нашим ожиданиям этот метод не дал улучшения качества диагностики несращения переломов по сравнению с данными абсолютных концентраций через 4 недели. Данное несоответствие может быть связано с заместительным референтным значением, которое мы использовали в этом исследовании. Для анализа относительных изменений мы определяли

уровни в сыворотке крови, полученной через 1 год после последней операции, что устанавливали как референтное значение. Мы предположили, что к этому времени уже должно произойти ремоделирование после сращения перелома, а метаболические нарушения — нормализоваться. Эта гипотеза подтверждается данными нашего предыдущего исследования по заживлению после остеотомии, которое показало, что концентрации ТФР- $\beta$  в сыворотке возвращаются к предоперационным базовым значениям на 10–12 неделю после операции [31].

Эти данные свидетельствуют в пользу возможности использования показателей, полученных после лечения, в виде референтных значений. Хотя обычно предоперационные анализы мы не проводили, у 8 пациентов с нормальным заживлением перелома образцы сыворотки были взяты в течение 12 часов после травмы. Вследствие отсутствия соответствующего пациента-партнера эти пациенты не были включены в исследование. Интересно, что измерение концентраций ТФР- $\beta$  в сыворотке крови выявило статистически более низкие значения для анализов, проведенных после травмы ( $44,7 \pm 14,9$  нг/мл), по сравнению с анализами, выполненными через 1 год после операции ( $55,21 \pm 11,5$  нг/мл;  $P = 0,043$ , тест Вилкоксона для парных значений).

Исходя из этого, мы предположили, что физиологические базовые значения ТФР- $\beta$  в сыворотке должны быть еще ниже, чем полученные нами показатели через 1 год после операции, а различия между базовыми и послеоперационными показателями в динамике скорее недооценены, чем переоценены.

В дальнейших исследованиях концентрации ТФР- $\beta$  в сыворотке у пациентов после травмы образцы, собранные в течение 12 часов, могут быть приняты за более подходящие базовые значения, чем анализы, полученные через 1 год после операции. И, конечно, необходимы расширенные исследования по физиологическим или посттравматическим концентрациям ТФР- $\beta$  в сыворотке крови для подтверждения наших результатов и дальнейшего выяснения, как быстро и в каком диапазоне изменяется уровень ТФР- $\beta$  после полученной травмы.

Учитывая, что уровни циркулирующих ТФР- $\beta$  являются относительно непостоянной величиной с большим количеством факторов, влияющих на них, для нашего исследования необходим был жесткий отбор и исключение таких факторов. Это требовало исключения пациентов с ожидаемым повышенным уровнем клеточной пролиферации, к примеру, с ревматоидным артритом или незавершенным ростом скелета, а

также пациентов с иммуносупрессией, вызванной, например, применением кортизона. Во избежание погрешностей, связанных с суточными вариациями концентрации ТФР- $\beta$ 1, анализы крови проводили утром, практически в одно и то же время, натощак.

Сопоставление пациентов из обеих групп окончательно исключило возможные погрешности и факторы, влияющие на уровень ТФР- $\beta$ 1 в сыворотке. Переломы костей голени намного чаще приводят к несращению, чем переломы других локализаций. Вдобавок формирование костного регенерата различается при разных типах переломов и методиках остеосинтеза, что тоже находится среди критериев сопоставления пациентов-партнеров разных групп. Повреждение интрамедуллярного канала, например, при введении штифтов, уже само может вызвать системный остеогенный ответ [5]. Поэтому мы выясняли разницу концентраций ТФР- $\beta$  в сыворотке у пациентов, которым репозицию осколков проводили путем введения интрамедуллярных штифтов, и тех, у кого был проведен остеосинтез пластинами, как среди пациентов с замедленной консолидацией перелома, так и в другой группе. Достоверных различий между пациентами этих двух групп лечения найдено не было. Так как атрофический и гипертрофический псевдоартрозы имеют совершенно разные патофизиологические механизмы, в анализ включали только пациентов с атрофическим типом замедленного сращения перелома. Более ранние исследования показали снижение концентрации ТФР- $\beta$  в сыворотке с возрастом или у женщин [28]. Для минимизации влияния возраста и пола сопоставляли только пациентов одного пола и возраста.

Невозможность определить КМБ в системном кровотоке в нашем исследовании может быть обусловлена несколькими причинами. Чувствительность используемых наборов для иммуноанализа может быть слишком низкой для определения минимальных концентраций КМБ в крови. Также иммунореактивные сайты молекул КМБ могут быть заняты связывающими белками сыворотки крови. И, наконец, КМБ-2 и КМБ-4 могут не секретироваться в виде белков в кровеносное русло. По нашим сведениям, в литературе нет данных о системном определении костных морфогенетических белков.

Преимуществами данного исследования являются его перспективный характер, жесткие критерии соответствия, по которым пациентов с замедленной консолидацией переломов сопоставляли со сходными пациентами с нормальным сращением. Насколько мы знаем, это является пер-



вым исследованием, в котором сравнивали уровни ТФР- $\beta$ 1 у пациентов с замедленной консолидацией и нормальным сращением переломов. Уже после анализа 20 пациентов были найдены достоверные различия между двумя группами пациентов, что указывает на то, что ТФР- $\beta$ 1 является основной ключевой системной молекулой, которая регулирует адекватное заживление перелома, что может служить предиктором заживления перелома.

## Литература

- Bab I. Regenerating bone marrow produces a potent growth-promoting activity to osteogenic cells / I. Bab, D. Gazit, A. Muhlrad, A. Shteyer // *Endocrinology*. — 1988. — Vol. 123. — P. 345–352.
- Bostrom M.P. Expression of bone morphogenetic proteins in fracture healing / M.P. Bostrom // *Clin. Orthop.* — 1998. — Vol. 355. — P. 116–123.
- Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing / M.P. Bostrom, J.M. Lane, W.S. Berberian [et al.] // *J. Orthop. Res.* — 1995. — Vol. 13. — P. 357–367.
- Bonewald L.F. Role of active and latent transforming growth factor beta in bone formation / L.F. Bonewald, S.L. Dallas // *J. Cell Biochem.* — 1994. — Vol. 55. — P. 350–357.
- The osteogenic response to distant skeletal injury / T.A. Einhorn, G. Simon, V.J. Devlin [et al.] // *Bone Joint Surg. Am.* — 1990. — Vol. 72. — P. 1374–1378.
- A single percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates fracture repair / T.A. Einhorn, R.J. Majeska, A. Mohaideen [et al.] // *J. Bone Joint Surg. Am.* — 2003. — Vol. 85(8). — P. 1425–1435.
- Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions: a prospective, randomized clinical trial comparing rhOP-1 with fresh bone autograft / G.E. Friedlaender, C.R. Perry, J.D. Cole [et al.] // *J. Bone Joint Surg. Am.* — 2001. — Vol. 83-A. — P. 151–158.
- Regenerating marrow induces systemic increase in osteo- and chondrogenesis / D. Gazit, M. Karmish, L. Holzman, I. Bab // *Endocrinology*. — 1990. — Vol. 126. — P. 2607–2613.
- Recombinant TGF- $\beta$ 1 stimulates bone marrow osteoprogenitor cell activity and bone matrix synthesis in osteopenic, old male mice / D. Gazit, Y. Zilberman, G. Turgeman [et al.] // *J. Cell Biochem.* — 1999. — Vol. 73. — P. 379–389.
- Fracture healing as a postnatal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation / L.C. Gerstenfeld, D.M. Cullinane, G.L. Barnes [et al.] // *J. Cell Biochem.* — 2003. — Vol. 88. — P. 873–884.
- Groeneveld E.H. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration / E.H. Groeneveld, E.H. Burger // *Eur. J. Endocrinol.* — 2000. — Vol. 142. — P. 9–21.
- Effects of bone morphogenetic protein and transforming growth factor-beta on biomechanical property for fracture healing in rabbit ulna / X.B. He, W.Z. Lu, K.L. Tang [et al.] // *Zhongguo XiuFu Chongjian Waike Zazhi*. — 2003. — Vol. 17. — P. 185–188.
- Ilizarov callus distraction produces systemic bone cell mitogens / O. Holbein, C. Neidlinger-Wilke, G. Suger [et al.] // *J. Orthop. Res.* — 1995. — Vol. 13. — P. 629–638.
- Enhanced expression of type I receptors for bone morphogenetic proteins during bone formation / Y. Ishidou, I. Kitajima, H. Obama [et al.] // *J. Bone Miner. Res.* — 1995. — Vol. 10. — P. 1651–1659.
- Joyce M.E. Transforming growth factor-beta in the regulation of fracture repair / M.E. Joyce, S. Jingushi, M.E. Bolander // *Orthop. Clin. North Am.* — 1990. — Vol. 21. — P. 199–209.
- Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur / M.E. Joyce, A.B. Roberts, M.B. Sporn, M.E. Bolander // *J. Cell Biol.* — 1990. — Vol. 110. — P. 2195–2207.
- Mitogens are increased in the systemic circulation during bone callus healing / D. Kaspar, C. Neidlinger-Wilke, O. Holbein [et al.] // *J. Orthop. Res.* — 2003. — Vol. 21. — P. 320–325.
- Distraction bone healing versus osteotomy healing: a comparative biochemical analysis / J. Lammens, Z. Liu, J. Aerssens, J. Dequeker // *J. Bone Miner. Res.* — 1998. — Vol. 13. — P. 279–286.
- Manolagas S.C. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis / S.C. Manolagas, R.L. Jilka // *N. Engl. J. Med.* — 1995. — Vol. 332. — P. 305–311.
- Gene expression in older rats with delayed union of femoral fractures / R.A. Jr. Meyer, M.H. Meyer, M. Tenholder [et al.] // *J. Bone Joint Surg. Am.* — 2003. — Vol. 85-A. — P. 1243–1254.
- Miyazono K. Positive and negative regulation of TGF- $\beta$  signaling / K. Miyazono // *J. Cell Sci.* — 2000. — Vol. 113. — P. 1101–1109.
- Nunamaker D.M. Experimental models of fracture repair / D.M. Nunamaker // *Clin. Orthop. Relat. Res.* — 1998. — Vol. 355S. — P. 56–65.
- Distinct and overlapping patterns of localization of bone morphogenetic protein (BMP) family members and a BMP type II receptor during fracture healing in rats / T. Onishi, Y. Ishidou, T. Nagamine [et al.] // *Bone*. — 1998. — Vol. 22. — P. 605–612.
- Park S.H. Interaction between active motion and exogenous transforming growth factor Beta during tibial fracture repair / S.H. Park, K.M. O'Connor, H. McKellop // *J. Orthop. Trauma*. — 2003. — Vol. 17. — P. 2–10.
- Synergistic effect of IGF-I and TGF- $\beta$ 1 on fracture healing in rats: single versus combined application of IGF-I and TGF- $\beta$ 1 / G. Schmidmaier, B. Wildemann, T. Gabelein [et al.] // *Acta Orthop. Scand.* — 2003. — Vol. 74. — P. 604–610.
- Improvement of fracture healing by systemic administration of growth hormone and local application of insulinlike growth factor-1 and transforming growth factor-beta1 / G. Schmidmaier, B. Wildemann, J. Heeger [et al.] // *Bone*. — 2002. — Vol. 31. — P. 165–172.
- Expression of BMP-2 and TGF- $\beta$ 1 mRNA during healing of the rabbit mandible / X. Si, Y. Jin, L. Yang [et al.] // *Eur. J. Oral. Sci.* — 1997. — Vol. 105. — P. 325–330.
- The angiogenic response to skeletal injury is preserved in the elderly / T.J. Street, J.H. Wang, Q.D. Wu, E. Ai // *J. Orthop. Res.* — 2001. — Vol. 19. — P. 1057–1066.
- The effect of transforming growth factor-beta1, released from a bioabsorbable self-reinforced polylactide pin, on a bone defect / L. Tieline, P. Puolakkainen, T. Pohjonen [et al.] // *Biomaterials*. — 2002. — Vol. 23. — P. 3817–3823.
- Recapitulation of signals regulating embryonic bone formation during postnatal growth and in fracture repair / A. Vortkamp, S. Pathi, G.M. Peretti [et al.] // *Mech. Dev.* — 1998. — Vol. 71. — P. 65–76.
- Systemic regulation of distraction osteogenesis: a cascade of biochemical factors / S. Weiss, R. Baumgart, M. Jochum [et al.] // *J. Bone Miner. Res.* — 2002. — Vol. 17. — P. 1280–1289.
- Colocalization of noggin and bone morphogenetic protein-4 during fracture healing / Y. Yoshimura, S. Nomura, S. Kawasaki [et al.] // *J. Bone Miner. Res.* — 2001. — Vol. 16. — P. 876–884.
- Early period of fracture healing in ovariectomized rats / S.W. Xu, R. Yu, G.F. Zhao, J.W. Wang // *Chin. J. Traumatol.* — 2003. — Vol. 6. — P. 160–166.