## Функциональная роль остеопонтина в развитии и реконструкции костной ткани.

Из приведенного в предыдущей статье (*"Структура и некоторые свойства белка остеопонтина"*) анализа литературных данных следует, что остеопонтин (OP) является секреторным фосфорилированным сиалопротеином, обладающим широким спектром тканевой локализации и биологической активности. В зависимости от характера сплайсинга и посттрансляционной модификации, OP способен вступать в различные белок-белковые взаимодействия и связываться с различными лигандами на поверхности внеклеточного матрикса, опосредуя адгезию и миграцию клеток. Однако, описанные исследования возможных функций OP в изолированных клетках могут служить только как модель. Доказательство биологического значения белок-белковых взаимодействий, например, через демонстрацию солокализации вовлеченных компонентов, действительно только когда предполагаемые участники находятся в ткани. Для изучения возможной роли остеопонтина в процессах реконструкции кости были подготовлены ультратонкие срезы, использованные в ходе иммуногистохимических исследований локализации OP.

Было показано, что OP сильно обогащена поверхность кости, обращенная к "светлой" зоне остеокластов. В этой области содержание OP более чем в десять раз больше, по сравнению с другими участками костной ткани, за исключением поверхностей, обращенных к остеобластам. Последнее наблюдение было вполне ожидаемо, так как OP секретируется остеобластами. В отличие от этого, практически не наблюдалось наличия OP на участках костного матрикса, обращенных к гофрированной поверхности остеокластов, т.е. там, где и имеет место резорбция (Рис. 1).

**Рис. 1. Схема резорбции кости.**

Самый низкий уровень присутствия OP отмечался в центральной части кости. Следовательно, так как OP селективно расположен в зоне прикрепления, он скорее всего вовлечен в связывание остеокластов (Cheng S. et. al 2001). Интересно отметить, что другие белки, присутствующие в костной ткани и способные связывать клетки (фибронектин и BSP), не содержатся в больших количествах в описанных выше участках локализации OP.

Для подтверждения роли OP как якоря для первоначального прикрепления остеокластов к поверхности кости, с помощью иммунохимического окрашивания был локализован avb3-рецептор, содержащийся на плазматической мембране со стороны "светлой" области остеокластов, т.е. напротив места расположения OP. Это служит серьезным доказательством связывания OP с этим типом рецепторов. В то же время, при проведении данных исследований были выявлены хорошо дифференцированные, охарактеризованные остеокласты, которые могут представлять более позднюю стадию дифференцировки, чем присоединившиеся сначала нерезорбирующие остеокласты. Таким образом, полученные результаты не давали однозначного ответа на вопрос о том, является ли OP первичным лигандом для связывания остеокластов (Denhardt, D.T. and Noda M., 1998).

Как показали дальнейшие исследования, у обладающих ограниченной активностью остеокластов больных остеопетрозом крыс существует лишь небольшое развитие гофрированной поверхности. Однако, при этом степень адгезии остеокластов сохраняется. Также в этом случае был показан нормальный уровень присутствия avb3-рецептора преимущественно в районе "светлой" области остеокластов. На следующих стадиях исследований, с использованием приготовленных криомикротомных срезов, было показано отсутствие каких-либо других типов интегриновых рецепторов на их плазматической мембране. Так, не было обнаружено ни b1, ни b5 видов цепей интегринов. Это подтверждает особую роль OP и avb3-интегрина в развитии и присоединении данного типа клеток. Интересно, что avb3-интегрин скорее всего специфичен для остеокластов, т.к. исследования обнаружили крайне низкий уровень накопления этого типа интегрина в остеобластах. Таким образом, обобщенные данные показывают, что остеокласты, по крайней мере, хорошо дифференцированные, присоединяются к кости "светлой" зоной и связываются через avb3-интегрин с локализованным на минерализованном костном матриксе OP. Дополнительным доказательством роли OP в присоединении остеокластов через RGD-зависимое связывание с avb3-интегрином является и установленный факт ингибирования резорбции кости RGD-пептидом, а также содержащим в первичной структуре сайт RGD полипептидом эхистатин (Denhardt D.T. and Noda M., 1998).

Дальнейшие исследования были проведены с помощью *in situ* гибридизации и электронной микроскопии. В поддержку роли OP в резорбции кости говорил высокий уровень накопления мРНК OP в остеобластах в области метафиза, где активность остеокластов наиболее ярко выражена при росте кости. Более того, присутствие мРНК OP часто наблюдается в остеобластах, локализованных рядом с остеокластами. При этом в самих остеокластах присутствия OP мРНК не отмечалось. Интересно, что иммуномеченный OP не детектировался в секреторных везикулах, расположенных со стороны светлой зоны имеющих секреторные дисфункции остеокластов из больных остеопетрозом крыс. Эти наблюдения показывают, что остеокласты, по крайней мере, на стадии дифференциации, не являются существенным источником OP, локализованного на поверхности кости. Было бы также интересно рассмотреть влияние связывания OP с avb3-интегрином на процесс дифференциации остеокластов на ранних стадиях (Denhardt D.T. and Noda M., 1998).

Представляется весьма вероятным, что при связывании через avb3-интегрин с минерализованной поверхностью кости, мононуклеарный предшественник остеокласта получает регуляторный сигнал, приводящий к его поляризации и дифференцировки. Скорее всего, остеокласт присоединяется посредством "светлой" зоны к области взаимодействия. При последующем развитии поляризации появляется регион рифления и зоны резорбции (см. Рис. 1). В поддержку этой версии говорит и сильное развитие "светлой" области остеокластов с нормальным уровнем avb3-интегрина и OP у крыс, больных остеопетрозом. В то же время, гофрированная поверхность не развивается удовлетворительно, как и можно ожидать исходя из ограниченной способности к резорбции остеокластов при этом заболевании.

Нормально локализованные и дифференцированные остеокласты секретируют тартрат-устойчивую кислую фосфатазу (TRAP), присутствие которой было установлено с помощью иммунного окрашивания золотом (Ihara H. et. al, 2001). TRAP наиболее обогащена гофрированная поверхность, но она практически не проявляется в светлой зоне (см. Рис. 1). Это согласуется с ранними данными о секреции этого фермента остеокластами. При этом возник вопрос о возможной роли этой фосфатазы вне клетки. Впоследствии, были проведены поиски возможных субстратов этого фермента среди доступных фосфопротеинов клеточного матрикса. Было показано, что TRAP может дефосфорилировать *in vitro* три костных белка: OP, BSP и остеонектин. При изучении последствий дефосфорилирования OP было обнаружено, что дефосфорилированный OP не способен поддерживать связывание остеокластов. Это наблюдение может свидетельствовать о потенциальном механизме отсоединения клеток при переходе к следующей стадии резорбции. На этой стадии число уже дефосфорилированных и, следовательно, не способных поддерживать связывание молекул OP составляет большую часть общего количества этого белка. Следовательно, суммарное взаимодействие остеокластов и OP оказывается слишком слабым, чтобы они оставались в связанном состоянии. Таким образом, полученные за последние время факты убедительно доказывают, что OP является одним из важных белков, вовлеченных в резорбцию кости (Ishijima M. et al., 2001).

Представляется возможным, что OP, как и другие белки, может иметь более чем одну функцию в костной ткани (Boskey A. et al., 2000). Так, ранее с помощью иммуногистохимического окрашивания тканей было показано, что OP накапливается у минерализованного фронта кости. Интересно отметить, что хотя OP и BSP и имеют схожие общие свойства, при проведении аналогичного исследования образец среза с окрашиванием BSP существенно отличался: этот белок не показал подобного распределения. Возможно, что локализованный на данном участке OP служит для регуляции процесса минерализации. Полученные ранее группой Goldberg с сотр. (Hunter G., Kyle C., Goldberg H., 1994) результаты показали, что OP может ингибировать рост кристаллов гидроксиапатита в модельных системах. Интересно, что дефосфорилированный щелочной фосфатазой OP не ингибирует формирование гидроксиапатита в этих системах *in vitro*. Данное наблюдение позволяет сделать вывод о потенциально различных ролях дефосфорилированного OP c интактным в процессе превращения кости. Возможно, что OP действительно имеет несколько функций: как в регуляции минерализации скелета, так и в резорбции уже сформированного костного матрикса.

Интересно, что исследования роли OP в реконструкци кости, проведенные на модельных животных (мыши OP-), показали принципиальную возможность использования рекомбинантного OP для активизации процессов резорбции и восстановления костной ткани (Ishijima M. et al., 2001), что крайне важно при лечении травм или наследственно обусловленных нарушений развития кости. К сожалению, целый ряд вопросов, связанных со структурно-функциональными аспектами исследования OP, остаются неизученными. Это, прежде всего, касается механизмов внутриклеточной регуляции биосинтеза различных изоформ данного белка и молекулярных основ их функционирования.

Следует особо подчеркнуть, что изучение структуры и функций OP, его локализации представляет важный этап в исследовании процессов остеогенеза. Полученная при этом информация может реально помочь при лечении заболеваний, сопровождающихся такими явлениями как остеопения и остеомаляция (остеосаркомы, остеопороз, остеопетроз) через использование специальных конкурентных аналогов OP или, наоборот, модуляторов экспрессии гена OP.

**Список литературы:**

1. Cheng S., Lai C., Blystone S., Avioli L. Bone mineralization and osteoblast differentiation are negatively modulated by integrin avb3.// J. Bone Miner Res., 2001., V. 16., P. 277-288.
2. Denhardt, D.T., and Noda, M. Osteopontin expression and function: role in bone remodeling.// J. Cell. Biochem. Suppl.,1998, V.30, V. 92-102.
3. Ihara H, Denhardt DT, Furuya K, Yamashita T, Muguruma Y, Tsuji K, Hruska KA, Higashio K, Enomoto S, Nifuji A, Rittling SR, Noda M. Parathyroid hormone-induced bone resorption does not occur in the absence of osteopontin.// J. Biol. Chem., 2001, V. 276, P. 13065 - 13071.
4. Ishijima M, Rittling S, Yamashita T, Tsuji K, Kurosawa H, Nifuji A, Denhardt D,Noda M.Enhancement of osteoclastic bone resorption and suppression of osteoblastic bone formation in response to reduced mechanical stress do not occur in the absence of osteopontin.// J. Exp. Med., 2001, V. 193, P. 399 - 404.
5. Boskey A, Spevak L, Tan M, Doty SB, Butler WT.Dentin sialoprotein (DSP) has limited effects on in vitro apatite formation and growth.// Calcif. Tissue Int., 2000, V. 67., P. 472 - 478.
6. Hunter G., Kyle C., Goldberg H. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: structural specificity of the osteopontin-mediated inhibition of hydrixyapatite formation// Biochemistry J., 1994., V. 300., P. 723 - 728.