

УДК 616.718.41-002.4-092.4

<https://doi.org/10.23946/2500-0764-2022-7-4-72-82>

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ АСЕПТИЧЕСКОГО НЕКРОЗА ГОЛОВКИ БЕДРЕННОЙ КОСТИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

ШАБАЛДИН Н.А.^{1*}, СИНЦКАЯ А.В.², БОГДАНОВ Л.А.², ЛОБОВ А.А.³, РЕПКИН Е.А.⁴, ШАБАЛДИН А.В.²¹ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Кемерово, Россия²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» г. Кемерово, Россия³ФГБУН Институт цитологии Российской академии наук, г. Санкт-Петербург, Россия⁴ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», г. Санкт-Петербург, Россия

Резюме

Цель. Изучить молекулярные и клеточные особенности развития асептического некроза головки бедренной кости в эксперименте.

Материалы и методы. Проведена хирургическая индукция асептического некроза головки бедренной кости 8 крысам. Наблюдение за животными проводилось в течение 4 недель. У всех животных, после выведения из эксперимента путем декапитации, была забрана кровь для сравнения системных показателей, а также выполнена экстирпация бедренных костей. Состояние головок выделенных бедренных костей оценивалось визуально, рентгенологически. Затем остеотомом выполнялось разделение головок бедренных костей на две равновеликие части. Первая часть исследовалась гистологически, вторая часть использовалась для определения молекулярной массы белков костной ткани с помощью гель-электрофореза.

Результаты. После выполнения хирургических манипуляций во всех исследуемых случаях наблюдалась картина стадии импрессионного перелома при асептическом некрозе головки бедренной кости, подтвержденная при исследовании макропрепарата и рентгенографии. Гистологическое исследование так же подтвердило развитие остеодеструктивных процессов в проксимальном эпифизе бедра. При иммунологическом исследовании крови после индук-

ции асептического некроза головки бедренной кости отмечалось увеличение концентрации провоспалительных цитокинов по отношению к концентрации нативных крыс. Метод квадрупольно-времяпролетной масс-спектрометрии позволил обнаружить несколько мажорных белков, участвующих в поддержании гомеостаза костной ткани, ими оказались белки, отвечающие за кальций-фосфорный обмен, протеины, способствующие ангиогенезу, кроветворению костного матрикса, молекулы передачи межклеточных сигналов, молекулы-шапероны, белки хрящевого матрикса, синтеза коллагена, белки липидного профиля, а также для конечности после хирургической индукции асептического некроза – протеины, регулирующие воспалительный ответ, белки окислительного стресса. Полученные данные при исследовании гель-электрофореза указывают на то, что развитие аваскулярного остеонекроза сопровождалось гиперэкспрессией белков окислительного стресса, гликолитических процессов, неспецифического воспалительного ответа при снижении молекул ангиогенеза, хондрогенеза, способствующих кальций-фосфорному обмену, синтеза коллагена и хрящевого матрикса.

Заключение. Развитие остеонекроза сопровождается значительной гетерогенностью изменений регуляции костного гомеостаза. При этом важную роль в манифестации костной де-

Для цитирования:

Шабалдин Н.А., Синицкая А.В., Богданов Л.А., Шабалдин А.В. Молекулярные и клеточные особенности развития асептического некроза головки бедренной кости в эксперименте. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2022;7(4): 72-82. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2022-7-4-72-82>

*Корреспонденцию адресовать:

Шабалдин Никита Андреевич, 650056, Россия, г. Кемерово, ул. Ворошилова, д. 22а, E-mail: shabaldin.nk@yandex.ru
© Шабалдин Н.А. и др.

струкции играют процессы неспецифического воспаления, окислительного стресса, в том числе перекисного окисления липидов, развивающиеся на фоне гипоксии.

Ключевые слова: асептический некроз, патогенез, протеомный профиль, сигнальные пути.

Конфликт интересов

Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

Источник финансирования

Исследование выполнено за счет финансирования гранта «Президента Российской Фе-

дерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук», МК-4132.2022.3. Работы по протеомному профилированию и анализу протеомных данных выполнены в Ресурсном центре «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Научного парка Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» (СПбГУ) в рамках договора № С-111/26 от 02.08.2021 г. между НИИ КПССЗ и СПбГУ.

ORIGINAL RESEARCH

MOLECULAR AND CELLULAR FEATURES OF FEMORAL HEAD AVASCULAR NECROSIS: IN VIVO STUDY

NIKITA A. SHABALDIN^{1*}, ANNA V. SINITSKAYA², LEO A. BOGDANOV², ARSENIY A. LOBOV³, EGOR A. REPKIN⁴, ANDREY V. SHABALDIN²

¹Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

²Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

³Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

⁴St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract

Aim. To study the molecular and cellular features of femoral head avascular necrosis in the rat model.

Materials and Methods. Femoral head avascular necrosis was surgically induced in 8 rats with the 4-week follow-up. Then, the animals have been euthanised, and we performed gross, radiological, and histological examination of avascular and intact contralateral femoral heads. Systemic inflammation was assessed using enzyme-linked immunosorbent assay, and pro-inflammatory cytokines (interleukin-1 β , interleukin-6, and tumor necrosis factor α). The proteomic profile of healthy and necrotic femoral heads was interrogated using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with ion mobility (TimsToF Pro).

Results. Aseptic necrosis of the femoral head was successfully induced in all rats. Serum lev-

els of pro-inflammatory cytokines (interleukin-1 β and interleukin-6) were higher in rats with femoral head avascular necrosis as compared with healthy rats. Among the major proteins revealed at proteomic profiling were those involved in maintaining bone tissue homeostasis, calcium phosphate metabolism, angiogenesis, hematopoiesis, cell-cell interactions, chaperones, cartilage matrix proteins, collagen synthesis, and lipid metabolism. In bones with avascular necrosis, we have also found proteins regulating the inflammatory response and oxidative stress. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis indicate that the development of avascular osteonecrosis was accompanied by an overexpression of oxidative stress proteins, anaerobic glycolysis, and non-specific inflammatory response along with the downregulation of molecules responsible for angiogenesis, chondrogenesis, calcium phosphate metabolism, collagen synthesis, and cartilage matrix.

Conclusion. Femoral head avascular necrosis is

◀ English

For citation:

Nikita A. Shabaldin, Anna V. Sinitskaya, Leo A. Bogdanov, Andrey V. Shabaldin. Molecular and cellular features of femoral head avascular necrosis: in vivo study. *Fundamental and Clinical Medicine*. (In Russ.). 2022;7(4): 72-82. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2022-7-4-72-82>

*Corresponding author:

Dr. Nikita A. Shabaldin, 22a, Voroshilova Street, Kemerovo, 650056, Russian Federation, E-mail: shabaldin.nk@yandex.ru

© Nikita A. Shabaldin, et al.

accompanied by non-specific inflammation, oxidative stress, and lipid peroxidation all presumably developed because of hypoxia and together contributing to bone destruction.

Keywords: avascular necrosis, pathogenesis, proteomic profile, signaling pathways.

Conflict of Interest

None declared.

Funding

The research was carried out by funding the grant of the "President of the Russian Federation for state support of young Russian scientists – Candidates of Sciences", MK-4132.2022.3. Proteomics analysis was conducted in the Centre for Molecular and Cell Technologies, St. Petersburg State University Research Park.

Введение

Заболевания с прогрессирующими остеодеструктивными процессами в их патогенезе, такие как остеохондропатии различной локализации, асептический некроз, ювенильный идиопатический артрит и другие, вносят существенный вклад в общую инвалидность от хронических заболеваний. Частота данной патологии не имеет тенденции к снижению, а методы таргетной терапии продолжают разрабатываться [1, 2, 3]. В последнее время, на фоне развития теоретических представлений о процессах регуляции костного гомеостаза и его нарушениях, возрос интерес к изучению патогенеза остеонекроза на молекулярном и клеточном уровне. Такой подход открывает новые диагностические возможности прогнозирования течения костно-некротических процессов, разработку вариантов таргетного медикаментозного воздействия на процессы костной деструкции и ремоделирование при помощи генно-инженерных препаратов. В первую очередь, данные стратегии лечения основаны на коррекции межклеточных, внутриклеточных сигнальных путей активации остеокластогенеза, остеобластогенеза. При этом внедрение новых алгоритмов терапии, диагностики базируется на теоретических представлениях о развитии костно-деструктивных процессов на разных стадиях.

Поддержание костного гомеостаза является динамическим процессом, обеспеченным равновесием в остеогенных и остеолитических процессах. Однако пролонгированное течение артропатий может сопровождаться смещением баланса в сторону усиления биологической активности остеокластов и, как следствие, прогрессирования разрушения костной, хрящевой тканей. При этом процесс развития асептического некроза стадийный, и проходит последовательно стадии от дорентгенологической, импрессионного перелома, фрагментации до репарации с восстановлением костных

балок. На начальной стадии субхондрального перелома наиболее активно изучаются механизмы нарушения молекулярных и клеточных связей, приводящих к усилению остеокластогенеза [4].

Процессы дифференцировки и активации остеокластов и остеобластов осуществляются за счет функционирования ряда межклеточных, внутриклеточных сигнальных путей молекулярного взаимодействия, таких как сигнальные пути с активацией бета-катенина, фермента JAK-киназы, рецептора активатора ядерного фактора каппа- β (RANK-RANKL-OPG, wnt – β катенин, JAK-STAT). Этот сигналинг регулируются разнообразными медиаторами (цитокины, костные морфогенные белки, и ряд других медиаторов) [5]. Цитокины – сигнальные полипептидные молекулы, биологическое действие на клетку-мишень у которых осуществляется за счет высокоаффинных мембранных рецепторов. Изменение концентрации различных групп цитокинов может влиять на костный гомеостаз опосредованно через сигнальный путь RANK-RANKL-OPG [6]. Так, увеличение экспрессии провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин 1 бэты (IL-1b), фактора некроза опухоли альфа (TNF- α), интерлейкина-6 (IL-6), приводит к усилению выработки лиганда рецептора активатора ядерного транскрипционного фактора (RANKL) на Т-лимфоцитах [7]. Связывание рецептора активатора ядерного транскрипционного фактора (RANK) с его лигандом (RANKL) ведет через серию внутриклеточных сигнальных путей к транскрипции ядерного фактора $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) в ядро клетки с последующим индуцированием дифференцировки и активации зрелых остеокластов. Таким образом, биологическое действие провоспалительных цитокинов может способствовать усилению остеокластогенеза. Тем не менее механизмы, приводящие к нарушению регуляции костного гомеостаза, остаются до конца не изученными.

Цель исследования

Изучить молекулярные и клеточные особенности развития асептического некроза головки бедренной кости в эксперименте.

Материалы и методы

Исследование выполнено согласно «Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей», принятой Советом Европы (Strasbourg, Франция, 1986) и Директивой Совета 86/609/ ЕЕС от 24.11.1986 «По согласованию законов, правил и административных распоряжений стран участниц в отношении защиты животных, используемых в экспериментальных и научных целях».

Модельный эксперимент выполнен на малых животных (крысы линии Wistar) массой тела 250 г, в возрасте 3 месяцев. Проведена хирургическая индукция асептического некроза головки бедренной кости 8 крысам. Наблюдение за животными проводилось в течение 4 недель. Выведение животных из эксперимента проводилось путем декапитации гильотинным способом. Для подтверждения наличия факта остеонекроза головки бедренной кости проводились клиническое, рентгенологическое, гистологическое, биохимические и иммунологические исследования.

Для индукции асептического некроза головки бедренной кости у крыс под общим ингаляционным наркозом раствором изофлюрана (99,9%) выполнялся хирургический доступ длиной до 3 см в проекции тазобедренного сустава по наружной поверхности одной тазовой конечности. Тупо разводились мягкие ткани в области большого, верхней трети третьего вертела бедренной кости. Распатором производилась круговая отслойка с последующим иссечением надкостницы в проксимальной трети третьего вертела. Визуализировалась шейка бедренной кости, вокруг которой накладывалась плотная лигатура из викрила диаметром 35 мм. В полость тазобедренного сустава под визуальным контролем вводилось 1,5 мл. 2% раствора реополиглюкина, что увеличивало внутрисуставное давление и создавало предпосылки для формирования коллапса головки бедренной кости. Послойно швы на рану.

После выведения животных из эксперимента проводилась экстирпация бедренных костей. Бедренная кость после индукции асептического некроза проксимального эпифиза относи-

лась к основной группе. Интактная бедренная кость с контралатеральной стороны относилась к группе сравнения.

У всех животных после декапитации была забрана кровь. Для сравнения системных показателей в крови декапитированы 4 интактные крысы без хирургической индукции асептического некроза (группа сравнения для системных показателей).

Состояние головок выделенных бедренных костей основной и группы сравнения было оценено визуально, а также выполнено их рентгенологическое исследование. Далее отсекался проксимальный эпифиз бедренной кости и разрезался остеотомом на две равные части (50–70 мг). Первая часть головки бедренной кости фиксировалась в 10% растворе формалина для дальнейшего проведения гистологического анализа, а другая – в аликвоту с предварительно охлажденным (4°C) T-PER буфером (78510, Thermo Fisher Scientific) с коктейлем ингибиторов протеаз и фосфатаз (78444, Thermo Fisher Scientific) для выделения белка.

Первая часть головки бедренной кости использовалась для гистологического исследования. Декальцинация препарата проводилась бескислотным способом. Гистологические препараты окрашивались гематоксилин-эозином и микроскопировались при увеличении x50, x100, x200.

Для определения молекулярной массы белков костной ткани со стороны хирургической индукции асептического некроза головки бедренной кости и с интактной стороны проводили гель-электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE). Одинаковое количество белка и маркер молекулярных масс Novex Sharp Pre-Stained (LC5800, Thermo Fisher Scientific) загружали в коммерческий 1,5 мм гель NuPAGE 4-12% Bis-Tris (NP0009, Thermo Fisher Scientific) Окрашка геля проводилась с помощью Coomassie brilliant blue (Кумасси G-250) (O120, ПанЭко). Интенсивность окрашивания белковых пятен (бендов) анализировалась с использованием программного обеспечения ImageJ. Для полуколичественной оценки использовали процентное отношение к отдельной интенсивности окрашивания к общей суммарной интенсивности окрашивания всех бендов электрофореза.

Для предварительной оценки протеома головки бедренной кости была выполнена ква-

друпольно-времяпролетная масс-спектрометрия образцов, полученных от 1 особи, методом ионизации электрораспылением (ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»). Получена информация по моноизотопной массе идентифицированных белков.

Из всех образцов крови, полученных после декапитации, выделялась сыворотка методом центрифугирования свернувшейся крови на 1,5 тысячи оборотов в минуту (LMC-56, Biosan) в течении 10 минут. Определение концентрации в сыворотке крови провоспалительных цитокинов IL-1b (SEA563Ra, Cloud-clone), TNF-a (SEA133Ra, Cloud-clone), IL-6 (SEA079Ra, Cloud-clone) проводили с использованием коммерческих наборов согласно прилагаемым инструкциям. На биохимическом анализаторе (Architect 4000C, Abbott, USA) определялись концентрации кальция, фосфора и щелочной фосфатазы.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica for Windows фирмы Stat Soft Inc (США), версия 10.0. Нормальность распределения выборок оценивали с помощью W-теста Шапиро-Уилка. Проверка на нормальность распределения показала, что данные в исследовании имеют нормальное распределение. Поэтому в дальнейшем расчеты производились методами параметрической статистики. Номинальные данные описывались с указанием абсолютных значений, процентных долей (%). Количественные

данные представляли в виде средней и стандартной ошибки ($M \pm m$). Сравнение значений уровней метрических показателей в несвязанных выборках проводили с помощью критерия Стьюдента.

Результаты

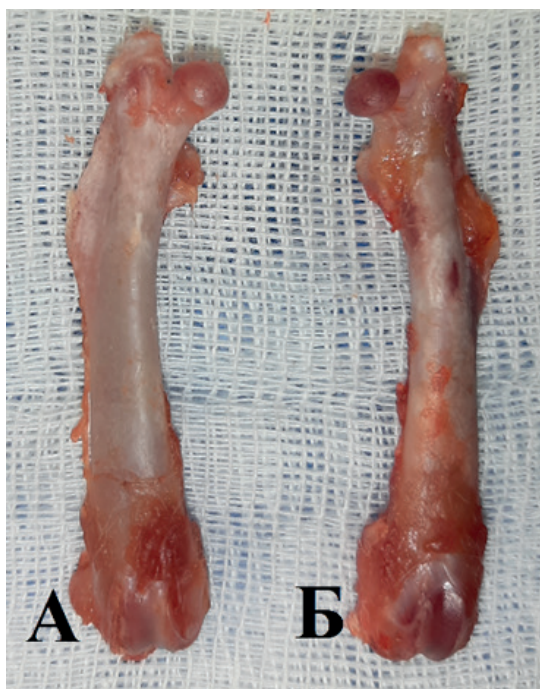
После выполнения представленных хирургических манипуляций во всех исследуемых случаях (100%) наблюдалось развитие асептического некроза головки бедренной кости. При этом при выведении животных из эксперимента на 4-й неделе течения аваскулярного некроза головки бедренной кости соответствовало стадии импрессионного перелома. Так, при макроскопическом исследовании головки бедренной кости со стороны индукции асептического некроза были выявлены: эллипсоидная форма, отчетливо выраженное склерозирование со снижением высоты эпифиза, шейка бедра была истончена и уменьшена в размере, в то время как с контрлатеральной, условно-здоровой, стороны патологических изменений, характерных для аваскулярного некроза, не обнаруживалось ни в одном случае, то есть в 100% головка бедра была интактной (**рисунок 1**).

При рентгенологическом исследовании бедренных костей основной и группы сравнения были выявлены изменения в основной группе в 100%. Так, в проксимальном отделе бедренной кости отмечались выраженные явления остеопороза. При этом головка бедренной кости была значительно уплощена, что отображалось в уменьшении эпифизарного индекса со стороны хирургического вмешательства по отношению к условно-здоровой контрлатеральной стороне. Так, эпифизарный индекс на стороне индукции асептического некроза составил $38,06 \pm 2,31\%$, на интактной стороне – $47,75 \pm 3,08\%$ ($p < 0,05$). В целом рентгенологическая и макроскопическая картина после хирургической индукции асептического некроза соответствовала стадии импрессионного перелома (**рисунок 2**).

При проведении гистологического исследования головки здоровой бедренной кости было выявлено, что в диафизе имело место плотное параллельное расположение костных пластинок, ядра остецитов были овоидные нормохромные. В костно-мозговом канале обнаруживался обильный клеточный костный мозг.

Рисунок 1.
Макропрепарат. А – интактная кость, Б – асептический некроз.

Figure 1.
Gross examination. A – intact bone, B – avascular necrosis.



В патологически измененной головке бедренной кости в диафизе прослеживалась волнообразность расположения костных пластинок, а ядра остеоцитов были пикнотичны (уменьшены и гиперхромны), а также отмечалась потеря части остеоцитов. Имелось разрастание плотной неоформленной соединительной ткани на поверхности головки бедренной кости по очаговому и неравномерному типам. Пластика роста на патологической стороне была с явным дистрофическим изменением в виде разрежения межклеточного вещества и образования в нем полостей с беспорядочным расположением ядер хондроцитов (рисунок 3).

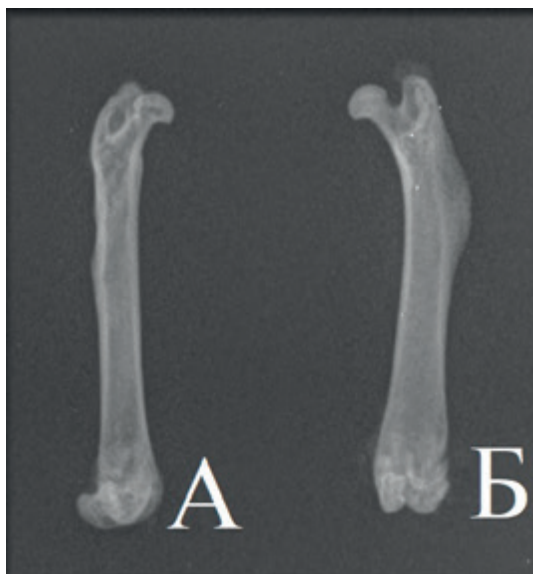


Рисунок 2. Рентгенологическое исследование. А – асептический некроз, Б – интактная кость.

Figure 2. X-ray examination. А – avascular necrosis, Б – intact bone.

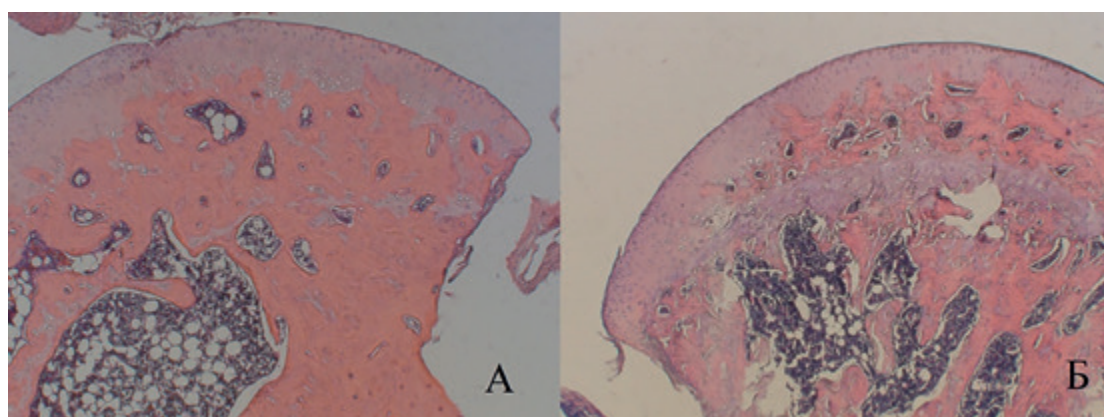


Рисунок 3. Гистологическое исследование. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 50$. А – асептический некроз, Б – интактная кость.

Figure 3. Histological examination. Hematoxylin and eosin staining, $\times 50$ magnification. А – avascular necrosis, Б – intact bone.

При исследовании протеинового профиля (по молекулярной массе) головок бедренных костей с помощью гель-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) обнаружено распределение белков по молекулярной массе от 20 до 260 кДа. Построение количественных профилей осуществлялись посредством анализа бендов с использованием программного обеспечения ImageJ. Данный подход позволил выявить некоторые особенности экспрессии протеинов в стадии импрессионного перелома головки бедренной кости. Манифестация асептического некроза головки бедренной кости сопровождалась значимым усилением (по отношению к группе сравнения) экспрессии белков с молекулярной массой 27–28 кДа, 33 кДа, 53 кДа. Также со стороны костной деструкции отмечалось снижение, по отношению к группе сравнения, протеинов молекулярной массы 30 кДа, 41–45 кДа, 95 кДа, 260 кДа (рисунок 4).

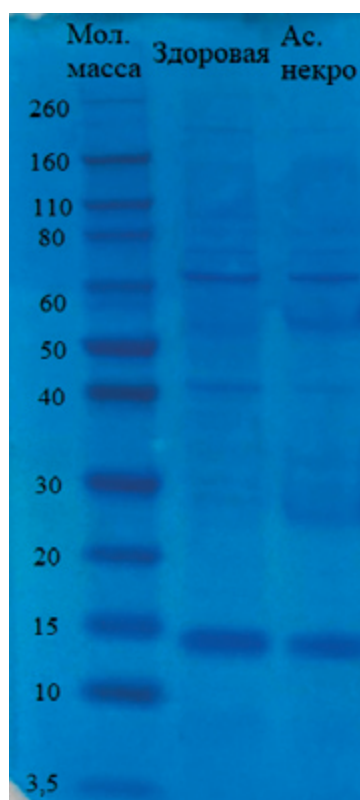


Рисунок 4. Результаты гель электрофореза в денатурирующих условиях (SDS-ПААГ), окраска Coomassie brilliant blue.

Figure 4. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, Coomassie brilliant blue staining.

Метод квадрупольно-времетрающей масс-спектрометрии образцов позволил определить с моноизотопной массой и изоэлектрической точкой протеинов из патологической и здоровой головок бедренных костей. Было выделено несколько мажорных белков: белки, отвечающие за кальций-фосфорный обмен (Anxa1, Calr, S100a8, S100a9), протеины, способствующие ангиогенезу, кроветворению костного матрикса (Ahsg, Mfge8), молекулы трансдукции, транскрипции, передачи межклеточных сигнала

лов (Fn1, Vim, Ppia, Taldo1, Hpx, Eef2), молекулы-шапероны, участвующие в активации экспрессии генов (Hsp90ab1), белки хрящевого матрикса, синтеза коллагена (Col2a1, Fmod, Dcn), белки липидного профиля (Apoa1). Для конечности после хирургической индукции асептического некроза были дополнительно обнаружены протеины, регулирующие воспалительный ответ (Ywhae, Rhoa, Igg-2a, Pdzk1, A1bg), белки окислительного стресса (Pgam1, A1m, Ca1, Ca3). Данные представлены в **таблице 1**.

Таблица 1.
Группы мажорных белков костной ткани.

Table 1.
Major protein groups within the rat femoral heads.

Функция / Function	Наименование / Name	Моноизотопная масса / Monoisotopic mass
Участие в кальций-фосфорном обмене / Calcium phosphate metabolism	Аннексин A1 / Annexin A1 (Anxa1)	157114
	Кальретикулин / Calreticulin (Calr)	114334
	Кальгранулин A8 / Calgranulin A8 (S100a8)	127397
	Кальгранулин A9 / Calgranulin A9 (S100a9)	130587
	Альфа-2-HS-гликопротеин / Alpha-2-HS-glycoprotein (Ahsg)	309231
Ангиогенез, кроветворение костного матрикса / Angiogenesis and hematopoiesis	Лактадгерин / Lactadherin (Mfge8)	65181
Передача межклеточных сигналов, трансдукция, трансляция / Cell-cell interactions, signal transduction, and translation	Виментин / Vimentin (Vim)	166535
	Пептидилпролизомераза A / Peptidylprolyl isomerase A (Ppia)	104124
	Трансальдоза-1 / Transaldolase-1 (Taldo1)	112391
	Гемопексин / Hemopexin (Hpx)	355637
	Эукариотический фактор элонгации 2 / Eukaryotic elongation factor 2 (EEF2)	271845
	Фибронектин / Fibronectin (Fn1)	105574
Молекулярные шапероны / Chaperones	Белок теплового шока 90 / heat shock protein 90 (Hsp90ab1)	82924
Синтез коллагена, образование хрящевого матрикса / Collagen synthesis, cartilage matrix formation	Коллаген II типа класса альфа-1 / Type II collagen of class alpha-1 (Col2a1)	139297
	Фибромодулин / Fibromodulin (Fmod)	152872
	Декорин / Decorin (Dcn)	126350
Регулировка воспалительного ответа / Regulation of the inflammatory response	Белок 14-3-3 эпсилон (ε) / 14-3-3 epsilon (ε) protein (Ywhae)	264003
	ГТФаза / GTPase protein (Rhoa)	116249
	Альфа 1-B гликопротеин / Alpha 1-B Glycoprotein (A1bg)	107667
	Иммуноглобулин G / Immunoglobulin G (Igg-2a)	167788
	Домен, содержащий белок 1 / Domain containing protein 1 (Pdzk1)	136994
Окислительный стресс / Oxidative stress	Фосфоглицерат-мутаза / Phosphoglycerate mutase (Pgam1)	139506
	Альфа-1-Микроглобулин / Alpha-1-Microglobulin (A1m)	112536
	Карбоангидраза 1 / Carbonic Anhydrase 1 (Ca1)	123026
	Карбоангидраза 3 / Carbonic Anhydrase 3 (Ca3)	152496
Белки липидного профиля / Lipid metabolism	Аполипопротеин A1 / Apolipoprotein A1 (Apoa1)	112785

С учетом данных гель электрофореза в денатурирующих условиях (SDS-ПААГ), где оценивалась молекулярная масса протеинов и их полуколичественное содержание, а также результатов масс спектрометрии, где идентифицировались белки и рассчитывалась их моноизотопная масса, провели сравнительный анализ протеиновых профилей в патологических и здоровых головках бедренных костей (таблица 2). Было выявлено, что при развитии асепти-

ческого некроза усиливалась (по отношению к группе сравнения) экспрессия белков с молекулярной массой 27-28 кДа (Apoa1), 33 кДа (Akr1a1, Akr1b1, Pgaml, Krt1, Taldo1), 53 кДа (Cap1, A1bg, Igg2a). В то же время в патологической головке бедренной кости было значительно меньше, чем в здоровой конечности, протеинов с молекулярной массой 30 кДа (Mfge8), 41-45 кДа (Bgn, Fmod, Calr), 95 кДа (Fn1, Ahsg), 260 кДа (Col2a1, Comp) (таблица 2).

Молекулярная масса / Molecular weight	Здоровая головка бедренная, интенсивность окрашивания бэнда, в % (M±m) / Healthy femoral head, band staining intensity, % (M ± m)	Асептический некроз головки бедренная, интенсивность окрашивания бэнда, в % (M ± m) / Femoral head avascular necrosis, band staining intensity, % (M ± m)	Значимое различие, p / Significant differences, p value
260 (Col2a1, Comp)	3,039514 ± 0,017561	0,351865 ± 0,013849	< 0,05*
210	6,079027 ± 0,125739	5,629838 ± 0,359247	
155	4,255319 ± 0,024183	2,111189 ± 0,015396	
95 (Fn1, Ahsg)	3,647416 ± 0,035517	0,70373 ± 0,007347	< 0,01*
80	3,039514 ± 0,017269	2,111189 ± 0,018294	
75	5,775076 ± 0,274396	5,700211 ± 0,329164	
62	12,76596 ± 1,037429	14,0746 ± 3,216438	
53 (Cap1, A1bg, Igg2a)	1,823708 ± 0,002695	10,55595 ± 0,015319	< 0,01*
45 (Fmod, Calr)	3,647416 ± 0,14692	0,70373 ± 0,002175	< 0,05*
41 (Bgn)	8,510638 ± 1,007541	4,926108 ± 0,918372	< 0,05*
33	0,607903 ± 0,001427	5,629838 ± 0,729416	< 0,01*
30 (Mfge8)	5,471125 ± 0,217349	0,70373 ± 0,008431	
27 (Apoa1)	0,303951 ± 0,000948	10,55595 ± 2,416739	< 0,001*
26	1,215805 ± 0,082462	0,351865 ± 0,027413	
21	1,215805 ± 0,053429	0,351865 ± 0,0152287	
14	36,00304 ± 5,613275	34,48276 ± 6,091246	
8,1	2,59878 ± 0,053162	0,351865 ± 0,013392	
Сумма по средним значениям / Average values	100	100	

Примечание: Отмечены * только различия с $p < 0,05$; Название белков и их функция представлены в таблице 3.

* $p < 0.05$. Names and functions of the proteins are presented in Table 3.

В целом полученные результаты указывают на то, что развитие аваскулярного остеонекроза сопровождалось гиперэкспрессией белков окислительного стресса, гликолитических процессов, неспецифического воспалительного ответа, при снижении молекул ангиогенеза, хондрогенеза, способствующих кальций-фосфорному обмену, синтеза коллагена и хрящевого матрикса. Концентрация белков трансдукции сигналов не изменялась.

При биохимическом исследовании крови определялось значимое увеличение концентрации щелочной фосфатазы, что свидетельствует о нарушении костного гомеостаза (таблица 3). Как видно из

таблицы, кальциевый и фосфорный обмены при индукции асептического некроза не изменялись.

При иммунологическом исследовании крови у крыс основной и группы сравнения были отмечены следующие изменения (таблица 4). Так, после индукции асептического некроза головки бедренной кости отмечалось увеличение концентрации провоспалительных цитокинов по отношению к концентрации в крови нативных крыс. Значимо усилился синтез IL-1b и IL-6. Полученные данные в целом соответствуют результатам большинства исследований и подтверждают значимость воспалительного звена в патогенезе остеодеструкции.

Таблица 2. Результаты анализа экспрессии групп белков с помощью программы ImageJ и их идентификации методом масс-спектрометрии.

Table 2. Expression of protein groups in rat femoral heads with and without avascular necrosis (mass spectrometry identification combined with ImageJ densitometry analysis).

Таблица 3.
Результаты
биохимического
исследования крови
у лабораторных
животных.

Table 3.
Results of the
biochemical profiling
in rats with and
without femoral head
avascular necrosis.

Аналиты / Analytes	Асептический некроз, n = 8 / Femoral head avascular necrosis, n = 8	Нативные крысы, n = 4 / Intact rats, n = 4	Значимое различие, p / Significant differences, p value
Щелочная фосфатаза, ед/л / Alkaline phosphatase, IU/L	235,76 ± 28,79	164,5 ± 12,3	p < 0,05*
Кальций, моль/л / Calcium, mol/L	2,17 ± 0,09	2,15 ± 0,09	
Фосфор, моль/л / Phosphate, mol/L	4,32 ± 0,64	2,7 ± 0,54	

Примечание: Отмечены * только различия с p < 0,05

*p < 0.05

Таблица 4.
Результаты
иммунологического
исследования крови
у лабораторных
животных.

Table 4.
Results of cytokine
measurement in rats
with and without
femoral head
avascular necrosis.

Аналиты / Analytes	Асептический некроз, n = 8 / Femoral head avascular necrosis, n = 8	Нативные крысы, n = 4 / Intact rats, n = 4	Значимое различие, p / Significant differences, p value
IL-1β, пг/мл / pg/mL	169,66 ± 34,15	123,06 ± 4,37	p < 0,05*
TNF-α, пг/мл / pg/ mL	50,44 ± 9,37	51,17 ± 2,41	
IL-6, пг/мл / pg/mL	95,72 ± 41,18	60,41 ± 3,38	p < 0,01*

Примечание: Отмечены * только различия с p < 0,05

*p < 0.05

Тем самым проведенное обследование показало индукцию асептического некроза головки бедренной кости малых экспериментальных животных с помощью хирургического метода. При манифестации асептического склероза меняется протеиновый профиль головки бедренной кости и имеют место системные изменения в виде увеличения щелочной фосфатазы и провоспалительных цитокинов (IL-1b и IL-6).

Обсуждение

Выполненная исследовательская работа отобразила гетерогенность процесса развития асептического некроза головки бедренной кости с активацией большого количества медиаторов межклеточных взаимодействий. При этом важная роль принадлежит способу моделирования остеодеструктивных процессов. Предложенный метод хирургической индукции асептического некроза головки бедренной кости способствует формированию очага гипоперфузии как предрасполагающего фактора и увеличению внутрисуставного давления, как производящего фактора в генезе деструктивного коксартроза. В результате выполнения представленных хирургических манипуляций у всех крыс удалось достичь манифестации аваскулярного некроза, который был подтвержден на основании данных рентгенографии, макроскопически и гистологическом исследовании. При этом рентгенологическая картина и макротрепарат соответствовали стадии импрессионного перелома.

Биохимическое исследование подтверждает нарушения метаболизма костной ткани. Известно, что увеличение концентрации ЩФ развивается на фоне заболеваний костной ткани, таких как болезнь Педжета, различные формы остеомалиции, рахит, опухоли костей. Значимо большая концентрация ЩФ у крыс после хирургической индукции асептического некроза по отношению к интактным крысам может свидетельствовать об активной стадии развития остеодеструкции, увеличении активности остеокластов. При этом значимых изменений в концентрации кальция и фосфора отмечено не было.

Цитокиновый статус при остеодеструкции, по данным иммунологического исследования, характерен для развития неспецифического воспаления. Увеличение концентрации провоспалительных цитокинов обуславливает усиление биологического действия последних. Особенности цитокинового коктейля при течении остеонекроза могут приводить к индукции остеокластогенеза, по средствам сигнального пути RANK-RANKL-OPG. Ряд исследований асептического некроза головки бедренной кости также подтверждает усиление экспрессии медиаторов воспаления в патогенезе остеодеструкции [8, 9]. Однако концентрация различных групп провоспалительных цитокинов различалась в зависимости от стадии аваскулярного некроза. Так, требуется дальнейшее изучение механизмов, приводящих к смещению баланса цитокинового статуса в сторону преобладания экспрессии провоспалительных пептидов.

В выполненном исследовании проведен анализ белкового профиля с помощью гель-электрофореза и масс-спектрометрии. Квадрупольно-времяпролетная масс-спектрометрия использована на образцах, полученных от 1 особи. Тем не менее, данное исследование помогло в идентификации белков на гель-электрофорезе, а также позволило выделить ряд мажорных белков, которыми оказались протеомы, способствующие межклеточной передаче сигналов, хондрогенезу, ангиогенезу.

Изучение результатов гель-электрофореза позволило определить некоторые закономерности изменений концентрации отдельных групп белков при развитии остеонекроза. Остеодеструкция сопровождалась снижением пептидов ангиогенеза, кровоснабжения костного матрикса (Mfge8, Ahsg), хондрогенеза (Fmod), синтеза коллагена (Col2a1), хрящевого матрикса (Comp) на фоне роста регуляторов воспаления (Igg2a), окислительного стресса (Apoa1), глюколитических процессов (Taldo1, Pgam1). Исследование транскриптома при развитии асептического некроза головки бедренной кости у крыс, выполненное Adapala NS и Kim HKW, отобразило стадийность экспрессии генов в зависимости от времени, прошедшего с момента хирургической индукции остеонекроза [10]. Так, через 2 недели наиболее активными были гены деминерализации белков, окислительных реакций, ангиогенеза, образование хрящевого матрикса. Через 1 месяц при сохраняющейся активности генов

ишемически-гипоксического повреждения усиливалась экспрессия генов, кодирующих медиаторы воспаления, при этом снижалась концентрации генов остеогенеза. В целом результаты проведенного исследования также подтверждают гетерогенность межклеточных взаимодействий в патогенезе развития остеодеструкции, при котором ишемический фактор играет ключевую роль в развитии нарушения костного гомеостаза с преобладанием анаэробного гликолиза, перекисного окисления липидов и развитием неспецифического воспаления с последующим угнетением ангиогенеза, хондрогенеза.

Заключение

Развитие остеонекроза на стадии импрессионного перелома характеризуется значительной гетерогенностью изменений регуляции костного гомеостаза и сопровождается снижением концентрации белков ангиогенеза, кровоснабжения костного матрикса (Mfge8, Ahsg), хондрогенеза (Fmod), синтеза коллагена (Col2a1), хрящевого матрикса (Comp) на фоне роста регуляторов воспаления (Igg2a), окислительного стресса (Apoa1), глюколитических процессов (Taldo1, Pgam1). Так, важную роль в манифестации костной деструкции играют процессы неспецифического воспаления, окислительного стресса, в том числе перекисного окисления липидов, развивающиеся на фоне гипоксии.

Литература:

1. Шостак Н.А., Клименко А.А., Демидова Н.А., Андрияшкина Д.Ю., Ратьев А.П., Чирков А.В., Аветисян Г.Р., Михеева Е.П. Остеонекроз головки бедренной кости, не связанный с травмой: хирургические и консервативные методы лечения (часть 2). *Лечебное дело*. 2021;2:4-16. <https://doi.org/10.24412/2071-5315-2021-12387>
2. Zhao H, Yeersheng R, Xia Y, Kang P, Wang W. Hypoxia Enhanced Bone Regeneration Through the HIF-1 α / β -Catenin Pathway in Femoral Head Osteonecrosis. *Am J Med Sci*. 2021;362(1):78-91. <https://doi.org/10.1016/j.amjms.2021.03.005>
3. Adapala NS, Yamaguchi R, Phipps M, Aruwajoye O, Kim HKW. Necrotic Bone Stimulates Proinflammatory Responses in Macrophages through the Activation of Toll-Like Receptor 4. *Am J Pathol*. 2016;186(11):2987-2999. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.06.024>
4. Нуруллина Г.М., Ахмадуллина Г.М. Костное ремоделирование в норме и при первичном остеопорозе: значение маркеров костного ремоделирования. *Архив внутренней медицины*. 2018;8(2):100-110. <https://doi.org/10.20514/2226-6704-2018-8-2-100-110>
5. Yamaguchi R, Kamiya N, Adapala NS, Drissi H, Kim HK. HIF-1-Dependent IL-6 Activation in Articular Chondrocytes Initiating Synovitis in Femoral Head Ischemic Osteonecrosis. *J Bone Joint Surg Am*. 2016;98(13):1122-1131. <https://doi.org/10.2106/JBJS.15.01209>
6. Kamiya N, Kim HK. Elevation of Proinflammatory Cytokine HMGB1 in the Synovial Fluid of Patients with Legg-Calvé-Perthes Disease and Correlation With IL-6. *JBMR Plus*. 2020;5(2):e10429. <https://doi.org/10.1002/jbm4.10429>
7. Chen B, Du Z, Dong X, Li Z, Wang Q, Chen G, Zhang G, Song Y. Association of Variant Interactions in RANK, RANKL, OPG, TRAF6, and NFATC1 Genes with the Development of Osteonecrosis of the Femoral Head. *DNA Cell Biol*. 2019;38(7):734-746. <https://doi.org/10.1089/dna.2019.4710>
8. Lechner J, Rudi T, von Baehr V. Osteoimmunology of tumor necrosis factor- α , IL-6, and RANTES/CCL5: a review of known and poorly understood inflammatory patterns in osteonecrosis. *Clin Cosmet Investg Dent*. 2018;10:251-262. <https://doi.org/10.2147/CCIDE.S184498>
9. Adapala NS, Yamaguchi R, Phipps M, Aruwajoye O, Kim HKW. Necrotic Bone Stimulates Proinflammatory Responses in Macrophages through the Activation of Toll-Like Receptor 4. *Am J Pathol*. 2016;186(11):2987-2999. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.06.024>
10. Adapala NS, Kim HKW. Comprehensive Genome-Wide Transcriptomic Analysis of Immature Articular Cartilage following Ischemic Osteonecrosis of the Femoral Head in Piglets. *Plos One*. 2016;11(4):e0153174. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153174>

References:

1. Shostak NA, Klimenko AA, Demidova NA, Andriyashkina DYU, Rat'ev AP, Chirkov AV, Avetisyan GR, Miheeva EP. Non-traumatic osteonecrosis of the femoral head: surgical and conservative treatment (part 2). *Lechebnoe delo*. 2021;2:4-16. (In Russ). <https://doi.org/10.24412/2071-5315-2021-12387>
2. Zhao H, Yeersheng R, Xia Y, Kang P, Wang W. Hypoxia Enhanced Bone Regeneration Through the HIF-1 α / β -Catenin Pathway in Femoral Head Osteonecrosis. *Am J Med Sci*. 2021;362(1):78-91. <https://doi.org/10.1016/j.amjms.2021.03.005>
3. Adapala NS, Yamaguchi R, Phipps M, Aruwajoye O, Kim HKW. Necrotic

- Bone Stimulates Proinflammatory Responses in Macrophages through the Activation of Toll-Like Receptor 4. *Am J Pathol.* 2016;186(11):2987-2999. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.06.024>
4. Nurullina GM, Ahmadullina GM. Bone remodeling in norm and in primary osteoporosis: the significance of bone remodeling markers. *Arkhir' vnutrenney meditsiny.* 2018;8(2):100-110. (In Russ). <https://doi.org/10.20514/2226-6704-2018-8-2-100-110>
 5. Yamaguchi R, Kamiya N, Adapala NS, Drissi H, Kim HK. HIF-1-Dependent IL-6 Activation in Articular Chondrocytes Initiating Synovitis in Femoral Head Ischemic Osteonecrosis. *J Bone Joint Surg Am.* 2016;98(13):1122-1131. <https://doi.org/10.2106/JBJS.15.01209>
 6. Kamiya N, Kim HK. Elevation of Proinflammatory Cytokine HMGB1 in the Synovial Fluid of Patients With Legg-Calvé-Perthes Disease and Correlation With IL-6. *JBM Plus.* 2020;5(2):e10429. <https://doi.org/10.1002/jbm4.10429>
 7. Chen B, Du Z, Dong X, Li Z, Wang Q, Chen G, Zhang G, Song Y. Association of Variant Interactions in RANK, RANKL, OPG, TRAF6, and NFATC1 Genes with the Development of Osteonecrosis of the Femoral Head. *DNA Cell Biol.* 2019;38(7):734-746. <https://doi.org/10.1089/dna.2019.4710>
 8. Lechner J, Rudi T, von Baehr V. Osteoimmunology of tumor necrosis factor-alpha, IL-6, and RANTES/CCL5: a review of known and poorly understood inflammatory patterns in osteonecrosis. *Clin Cosmet Investig Dent.* 2018;10:251-262. <https://doi.org/10.2147/CCIDE.S184498>
 9. Adapala NS, Yamaguchi R, Phipps M, Aruwajoye O, Kim HKW. Necrotic Bone Stimulates Proinflammatory Responses in Macrophages through the Activation of Toll-Like Receptor 4. *Am J Pathol.* 2016;186(11):2987-2999. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.06.024>
 10. Adapala NS, Kim HKW. Comprehensive Genome-Wide Transcriptomic Analysis of Immature Articular Cartilage following Ischemic Osteonecrosis of the Femoral Head in Piglets. *Plos One.* 2016;11(4):e0153174. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153174>

Сведения об авторах

Шабалдин Никита Андреевич, кандидат медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой детских хирургических болезней ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (650056, Россия, г. Кемерово, ул. Ворошилова, д. 22а).
Вклад в статью: проведение хирургических манипуляций, написание всех разделов статьи.
ORCID: 0000-0001-8628-5649

Синицкая Анна Викторовна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (650002, Россия, г. Кемерово, б-р Сосновский, д. 6).
Вклад в статью: проведение экспериментальной части, обсчет результатов.
ORCID: 0000-0002-4467-8732

Богданов Лев Александрович, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (650002, Россия, г. Кемерово, б-р Сосновский, д. 6).
Вклад в статью: подготовка гистологических препаратов, анализ полученных данных.
ORCID: 0000-0003-4124-2316

Лобов Арсений Андреевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории регенеративной биомедицины ФГБНУ Институт цитологии Российской академии наук (194064, Россия, г. Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, д. 4).
Вклад в статью: проведение протеомного анализа и биоинформатического анализа протеомных данных.
ORCID: 0000-0002-0930-1171

Репкин Егор Алексеевич, специалист ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» научного парка ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет» (199034, Россия, г. Санкт-Петербург, Университетская набережная, д. 7/9).
Вклад в статью: проведение протеомного анализа и биоинформатического анализа протеомных данных.
ORCID: 0000-0002-8599-3173

Шабалдин Андрей Владимирович, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (650002, Россия, г. Кемерово, б-р Сосновский, д. 6).
Вклад в статью: обсчет результатов, статистический анализ данных.
ORCID: 0000-0002-8785-7896

Authors

Dr. Nikita A. Shabaldin, MD, PhD, Head of the Department of Pediatric Surgery, Kemerovo State Medical University (22a, Voroshilova Street, Kemerovo, 650056, Russian Federation).
Contribution: conceived and designed the study; performed the surgery; wrote the manuscript.
ORCID: 0000-0001-8628-5649

Dr. Anna V. Sinitskaya, PhD, Junior Research Fellow, Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Research Institute of Complex Problems of Cardiovascular Diseases (6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation).
Contribution: conducted the experiments; performed the data analysis.
ORCID: 0000-0002-4467-8732

Mr. Leo A. Bogdanov, MSc, Junior Research Fellow, Laboratory of Molecular, Translational and Digital Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation).
Contribution: carried out the histological analysis.
ORCID: 0000-0003-4124-2316

Dr. Arseniy A. Lobov, PhD, Senior Research Fellow, Laboratory of Regenerative Biomedicine, Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation (4, Tikhoretskiy Prospekt, St. Petersburg, 194064, Russian Federation).
Contribution: conducted the proteomic analysis.
ORCID: 0000-0002-0930-1171

Mr. Egor A. Repkin, Technician, Resource Centre for Development of Molecular and Cell Technologies, Research Park, St. Petersburg State University (7/9, Universitetskaya Embankment, St. Petersburg, 199034, Russian Federation).
Contribution: conducted the proteomic analysis.
ORCID: 0000-0002-8599-3173

Prof. Andrey V. Shabaldin, MD, DSc, Leading Research Fellow, Laboratory of Congenital Heart Disease, Department of Cardiovascular Surgery, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation).
Contribution: performed the data analysis.
ORCID: 0000-0002-8785-7896

Статья поступила: 04.09.2022 г.

Принята в печать: 30.11.2022 г.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

Received: 04.09.2022

Accepted: 30.11.2022

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.