

## ВЛИЯНИЕ ВОСПАЛЕНИЯ НА ТЕЧЕНИЕ АСЕПТИЧЕСКОГО НЕКРОЗА ГОЛОВКИ БЕДРЕННОЙ КОСТИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Шабалдин Н.А.<sup>1</sup>, Синицкая А.В.<sup>2</sup>, Богданов Л.А.<sup>2</sup>, Шабалдин А.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Кемерово, Россия

<sup>2</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

**Резюме.** Асептический некроз головки бедренной кости представляет собой стадийный процесс, при котором остеодеструкция сменяется остеорепарацией. Исход данного заболевания может характеризоваться тяжелой дисконгруэнтностью области тазобедренного сустава, инвалидностью больного. В последнее время значительно возрос интерес к изучению молекулярно-клеточных механизмов нарушения костного гомеостаза и способов его коррекции. Ряд исследований продемонстрировали роль неспецифического воспаления в патогенезе асептического некроза, однако требуется более детальное изучение динамики изменения активности сигнальных путей остеогенеза. Целью настоящего исследования являлась оценка роли молекулярных паттернов развития воспаления и остеогенеза в течение асептического некроза головки бедренной кости в модельном эксперименте. Проведена хирургическая индукция асептического некроза головки бедренной кости у 16 крыс, которые выводились из эксперимента по 4 особи каждые 2 недели в течение 8 недель. Исследована экспрессия генов, кодирующих белки, участвующие в регуляции остеогенеза, методом кПЦР с обратной транскрипцией, а также концентрация белков VCAM1, MMP9 методом иммуноблоттинга. Результаты исследования продемонстрировали гетерогенность динамики изменений молекулярно-клеточных нарушений регуляции костного гомеостаза в патогенезе асептического некроза. Так, первые две недели после хирургической индукции в качестве предикторных факторов определялась экспрессия гена *HIF1α* и *TNFα*, а также концентрация белков MMP9 и VCAM1. Через 1 месяц в качестве протекторов выступали концентрация белка VCAM1 и экспрессия гена *TNFα*, а предикторов – ген *IL6* и белок MMP9. Через 6 недель развитию асептического некроза способствовала экспрессия гена *IL4*, а через 8 недель – гена *IL6*. Таким образом, важная роль в регуляции остеорезорбции принадлежит неспецифическому воспалению, триггером которого может служить острая тканевая гипоксия. Значимое влияние процесса воспаления сохраняется до 8 недель после манифестации аваскулярного некроза головки бедренной кости. Патогенез костной деструкции связан не только с усилением активности остеокластогенеза, но и снижением интенсивности остеобластогенеза. При этом ведущий молеку-

### Адрес для переписки:

Шабалдин Никита Андреевич  
ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный  
медицинский университет»  
650056, Россия, г. Кемерово, ул. Ворошилова, 22а.  
Тел.: 8 (950) 576-36-82.  
E-mail: Shabaldin.nk@yandex.ru

### Address for correspondence:

Nikita A. Shabaldin  
Kemerovo State Medical University  
22a Voroshilov St  
Kemerovo  
650056 Russian Federation  
Phone: +7 (950) 576-36-82.  
E-mail: Shabaldin.nk@yandex.ru

### Образец цитирования:

Н.А. Шабалдин, А.В. Синицкая, Л.А. Богданов,  
А.В. Шабалдин «Влияние воспаления на течение  
асептического некроза головки бедренной кости  
в эксперименте» // Медицинская иммунология, 2024.  
Т. 26, № 6. С. 1183-1196.  
doi: 10.15789/1563-0625-TEO-2885

© Шабалдин Н.А. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

N.A. Shabaldin, A.V. Sinitskaya, L.A. Bogdanov,  
A.V. Shabaldin “The effect of inflammation on the course  
of experimental aseptic necrosis of femoral head”, *Medical  
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024,  
Vol. 26, no. 6, pp. 1183-1196.  
doi: 10.15789/1563-0625-TEO-2885

© Shabaldin N.A. et al., 2024

The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-TEO-2885

лярно-клеточный патологический паттерн нарушения костного гомеостаза меняется в зависимости от стадии течения асептического некроза.

*Ключевые слова:* асептический некроз, иммуноблоттинг, молекулярные предикторы, сигнальный путь

## THE EFFECT OF INFLAMMATION ON THE COURSE OF EXPERIMENTAL ASEPTIC NECROSIS OF FEMORAL HEAD

Shabaldin N.A.<sup>a</sup>, Sinitskaya A.V.<sup>b</sup>, Bogdanov L.A.<sup>b</sup>, Shabaldin A.V.<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

<sup>b</sup> Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

**Abstract.** Aseptic necrosis of the femoral head is a staged process in which osteodestruction is replaced by the bone repair. The outcome of this disease may be characterized by severe discongruence of the hip joint area, disability of the patient. Recently, the research interest is drawn to molecular and cellular mechanisms of bone homeostasis disorders and ways of its correction. A number of studies have demonstrated the role of nonspecific inflammation in pathogenesis of aseptic necrosis. However, a more detailed study of dynamic changes in the activity of osteogenesis signaling pathways is required. The aim of this study was to assess the role of molecular patterns of inflammation and osteogenesis during aseptic necrosis of femoral head in experimental model. Surgical induction of aseptic necrosis of the femoral head was performed in 16 rats, which were removed biweekly from experiment (by 4 animals), for 8 weeks. The expression of genes encoding proteins involved in osteogenesis regulation was studied by qPCR with reverse transcription. Concentration of VCAM1, MMP9 proteins was assessed by immunoblotting. The results of our study demonstrated heterogenous dynamics of changes in molecular and cellular disorders associated with bone homeostasis regulation in pathogenesis of aseptic necrosis. For the first two weeks after surgical procedure, the expression of *HIF1 $\alpha$*  and *TNF $\alpha$*  genes, as well as the concentration of MMP9 and VCAM1 proteins, were determined as predictor factors. After 1 month, VCAM1 protein concentration and *TNF $\alpha$*  gene expression acted as protector factors, whereas *IL6* gene and MMP9 protein were considered predictive factors. After 6 weeks, the development of aseptic necrosis was promoted by expression of the *IL4* gene, and after 8 weeks, by *IL6* gene. Thus, an important role in regulation of osteoresorption belongs to nonspecific inflammation, which can be triggered by acute tissue hypoxia. A significant effect of the inflammation process persists up to 8 weeks after induction of avascular necrosis of femoral head. Pathogenesis of bone destruction is associated not only with an increased activity of osteoclastogenesis, but also with a decreased intensity of osteoblastogenesis. In general, the molecular and cellular pattern of bone homeostasis disorders varies depending on the stage of aseptic necrosis.

*Keywords:* aseptic necrosis, inflammation, immunoblotting, molecular predictors, signaling pathway

Исследование выполнено за счет финансирования гранта «Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук», МК-4132.2022.3.

### Введение

Одним из ведущих направлений современной медицины является разработка таргетной терапии, направленной на управление воспалительным процессом. Асептическое воспаление является ведущим звеном патогенеза хронических заболеваний, в том числе костно-мышечной системы человека. Вопрос нарушения регуляции костного гомеостаза при развитии остеодеструкции активно изучается среди широкого круга

специалистов. Одной из тяжелых форм, сопровождающейся прогрессирующей костной резорбцией с развитием дисконгруэнтности в области тазобедренного сустава, стойким болевым синдромом и, как следствие, снижением качества жизни является асептический некроз головки бедренной кости.

Костная ткань под воздействием внутренних и внешних факторов подвергается постоянно-динамическому процессу ремоделирования (обновления), при котором остеорезорбция сменяется формированием кости. Процесс носит стадийный характер и включает в себя фазы активации, резорбции, реверсии, формирования и покоя, каждая из которых регулируется большим количеством медиаторов и сигнальных путей [3].

При этом баланс между резорбцией устаревших участков кости и образованием новых обеспечивается за счет взаимодействия между основными клетками костной ткани: остеобластами, остеокластами, остеоцитами.

Манифестация асептического некроза головки бедренной кости связана с возникновением сосудистого коллапса, созданием зоны локальной гипоперфузии, которая рассматривается как триггерный фактор дальнейших патологических процессов [12]. Гипоксия влияет на все биохимические процессы в организме. При этом адаптация к кислородному голоду на клеточном уровне регулируется с помощью протеинкиназы mTOR, играющей фундаментальную роль в физиологии сигнальных внутриклеточных сетей, а также развернутыми белковыми реакциями в эндоплазме, транскрипцией, опосредованной NF-κβ, или семейством транскрипционных факторов, индуцируемых гипоксией (HIF) [21]. Биологическое действие HIF-1α может быть направлено как на усиление остеокластогенеза, так и остеобластогенеза. Так, ряд исследований связывают повышение концентрации HIF-1α с усилением экспрессии провоспалительных цитокинов, в то время как другие работы отображают влияние HIF-1α на усиление синтеза костного морфогенетического белка (BMP2) [11]. Однако механизм межклеточного взаимодействия опосредованный. Так, модельный эксперимент на поросятах показал, что гипоксия индуцировала выработку свободных кислородных радикалов, преобразовывающихся в H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. При этом хондроциты гиалинового хряща в условиях дефицита кислорода усиливали синтез супероксиддисмутазы 2 (SOD<sub>2</sub>). Взаимодействие H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/SOD<sub>2</sub> приводило к увеличению уровня BMP2.

Последующее развитие аваскулярного некроза сопровождается нарушением баланса между остеорезорбцией и остеорепарацией, с усилением остеолитического процесса на ранних стадиях и активацией восстановления костной ткани на более поздних. Особенности молекулярно-клеточной регуляции данных процессов зависят от стадии заболевания [4].

Дифференцировка и активизация остеокластов и остеобластов контролируется несколькими сигнальными путями. Основным сигнальным путем остеокластогенеза является система рецептора активатора ядерного фактора κβ (RANK), его лиганда (RANKL) и остеопротегерина (OPG). Установлено, что экспрессия RANKL регулируется рядом медиаторов, таких как провоспалительные цитокины, белки окислительного, гипоксического стресса, при этом связывание RANKL с RANK через ряд внутриклеточных сигнальных путей, таких как JAK-STAT, MAPK, приводит к

транскрипции ядерного фактора κβ (NF-κβ) в ядро преостеокластов, с дальнейшей дифференцировкой в зрелые остеокласты и их активацией [17]. При этом ряд исследовательских работ рассматривают активацию остеокластогенеза в качестве ключевого компонента прогрессирующей остеодеструкции при развитии асептического некроза головки бедренной кости [18].

Остеобластогенез регулируется локальными факторами роста, внутриклеточными сигнальными путями, в том числе каноническим wnt/β-катенин сигнальным путем. Взаимодействие wnt с трансмембранным белком Frizzled и липопротеидами низкой плотности LRP5/LRP6 на поверхности мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток приводит к угнетению убиквитилирования β-катенина, проникновению последнего в ядро и активацию остеобластогенеза [1].

Одним из актуальных вопросов является роль неспецифического воспаления в процессе развития асептического некроза. Известно, что выброс большого количества медиаторов воспаления приводит к усилению остеокластогенеза, смещению баланса костного гомеостаза в сторону преобладания резорбции [5, 6]. Среди протеинов, участвующих в регуляции остеогенеза при развитии неспецифического воспаления на фоне острой тканевой гипоксии можно выделить белки матриксной металлопротеиназы-9 (MMP9) и молекулы адгезии эндотелия сосудов-1 (VCAM1) [14, 19].

MMP9 играет важную роль в ремоделировании костной ткани и участвует во взаимодействии между процессами неспецифического воспаления и активацией прогениторных клеток остеогенеза [19]. Известно, что металлопротеиназы экспрессируются как в остеокластах, так и в иммунокомпетентных клетках. Экспериментальные работы с мышами, нокаутированными по гену MMP9, показали большее скопление Т-клеток, макрофагов в зонах консолидации переломов, чем у мышей дикого типа [13]. Ряд научно-исследовательских работ выявили влияние молекулы MMP9 на архитектуру костных трабекул. Так, показано, что у мышей, нокаутированных по гену MMP9, плотность связанности костных трабекул увеличена, однако общая масса костной ткани уменьшалась [16].

VCAM1 является иммуноглобулином, участвующим во взаимодействии прогениторных лимфоцитарных клеток со стромальными клетками костного мозга, адгезии лейкоцитов к эндотелию. Известна роль VCAM1 в усилении миграции лимфоцитов в зону воспаления [9]. Кроме того, взаимодействие VCAM1 с интегрином α4β1 приводит

к активации дифференцировки остеокластов из моноцитарных клеток-предшественников [14].

Также ряд научно-исследовательских работ продемонстрировали взаимосвязь между концентрацией белка VCAM1 и функционированием канонического сигнального пути wnt/ $\beta$ -катенин [15]. Передача сигнала wnt в стромальных клетках, через связывание бета-киназа гликогенсинтазы-3 (GSK3b) с лигандом wnt3a, подавляет экспрессию VCAM1. При этом axin, как ингибитор канонического сигнального пути wnt/ $\beta$ -катенин, частично снимает это «блокирование».

Влияние тех или иных молекулярных паттернов на процессы регуляции остеогенеза зависят от стадии патологического процесса. Так, более перспективным представляется изучение динамики изменения маркеров костного гомеостаза по мере развития асептического некроза головки бедренной кости.

**Цель исследования** – оценить роль молекулярных паттернов развития неспецифического воспаления и остеогенеза в течение асептического некроза головки бедренной кости в модельном эксперименте.

## Материалы и методы

Выполнен модельный эксперимент на 16 самцах крыс линии Wistar, массой  $250 \pm 25$  г, возрастом 3 мес. Хирургическая индукция асептического некроза головки бедренной кости проведена путем наложения плотной лигатуры из рассасывающегося шовного материала викрил вокруг шейки бедренной кости, для создания зоны гипоперфузии, а также введения в полость сустава 1,5 мл 2%-ного раствора реополиглюкина, для увеличения внутрисуставного давления. Животные выводились из эксперимента путем декапитации по 4 особи, каждые 2 недели, в течение 2 месяцев. Эксперимент выполнялся 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» на базе ФГБОУ ВО КемГМУ и НИИ КПССЗ г. Кемерово.

### Выделение РНК и белка

После выведения животных из эксперимента выполнялась экстирпация бедренных костей с двух сторон. Бедренная кость после хирургической индукции асептического некроза относилась к основной группе. Интактная бедренная

кость с коллатеральной стороны относилась к группе сравнения.

Для выделения белка была забрана часть головки бедренной кости (50-70 мг), которая помещалась в охлажденный буфер T-PER с ингибиторами протеаз и фосфатаз Halt™ (Thermo Scientific, США) в соотношении 1:100 (10 мкл коктейля ингибиторов на 990 мкл буфера для выделения белка), после чего их гомогенизировали на приборе FastPrep-24 5G (MP Biomedicals, США) с режимом 4 цикла по 40 секунд с интервалом в 300 секунд между циклами. Затем, гомогенат центрифугировали при  $14\,000 \times g$  (Microfuge 20R, Beckman Coulter, Германия) в течение 10 минут. Полученный супернатант центрифугировали при  $200\,000 g$  на ультрацентрифуге Optima MAX-XP (Beckman Coulter, США) в течение 30 мин. Количество белка определяли при помощи набора BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя на спектрофотометре Multiskan Sky (Thermo Scientific, Сингапур). Другая часть головки бедренной кости, как пораженной асептическим некрозом, так и здоровой, использовалась для выделения мРНК коммерческим набором RNeasy MicroKit (QIAGEN, Германия) согласно протоколу производителя. Качество и количество выделенной РНК определяли на спектрофотометре Qubit 4 (Invitrogen, США) путем оценки индекса RIQ (RNA Integrity and Quality) с использованием набора реагентов Qubit RNA IQ Assay Kit (Invitrogen, США).

### Иммуноблоттинг

Одинаковое количество белка (15 мкг на образец) смешивали с буфером для денатурации NuPAGE (NP0007, Thermo Fisher Scientific, США) в соотношении 4:1 и восстановителем NuPAGE (NP0009, Thermo Fisher Scientific, США) в соотношении 10:1, денатурировали при  $99\text{ }^\circ\text{C}$  в течение 5 минут и далее загружали на 1,5 мм гель NuPAGE 4-12% Bis-Tris (NP0335BOX, Thermo Fisher Scientific, США). В качестве маркера молекулярных масс использовали смесь белковых стандартов Novex Sharp Pre-Stained (LC5800, Thermo Fisher Scientific, США) и MagicMark XP Western в соотношении 1:1 (LC5602, Thermo Fisher Scientific, США).

Разделение белков выполняли путем электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) при напряжении 150 В в течение 1,5 часов в буфере NuPAGE MES SDS (NP0002, Thermo Fisher Scientific, США). С использованием мембран из поливинилдендифторида (PVDF) (IB24001, Thermo Fisher Scientific, США) и прибора для сухого переноса iBlot 2 (Thermo Fisher Scientific, США) проводили перенос белка, в соответствии с протоколом производителя. Далее в растворе

iBind Flex (SLF2020, Solution Kit Thermo Fisher Scientific, США) в течение 1 часа инкубировали мембраны для предотвращения неспецифического связывания.

Иммуноблоттинг проводили с использованием первичных антител к матриксной металлопротеиназе-9 (MMP9, ab38898, разведение 1:1000), васкулярной молекуле клеточной адгезии 1 (VCAM1, ab134047, разведение 1:1000), Bone Morphogenetic Protein Receptor 1A (BMPRI1A, PAA015Ra01, разведение 1:1000), Receptor Activator of Nuclear Factor kappa B Ligand (RANKL, PAA855Ra01, разведение 1:1000), фактор роста эндотелия сосудов А (VEGFA, PAA143Ra01, разведение 1:1000) и вторичными конъюгированными с пероксидазой хрена антителом козла против кролика (7074, Cell Signaling Technology) применяли в разведении 1:400.

С использованием набора iBind Flex (SLF2020, Solution Kit Thermo Fisher Scientific, США) и карточек iBind Flex (SLF2010, Thermo Fisher Scientific, США) проводили инкубацию с антителами на приборе iBind Flex Western Device (SLF2000, Thermo Fisher Scientific, США) в течение 3 часов в соответствии с протоколом производителя. Хемилюминесцентную детекцию проводили с использованием субстрата SuperSignal

West Pico PLUS (34580, Thermo Fisher Scientific, США) и цифрового сканера блотов C-DiGit (LI-COR Biosciences, США). Денситометрию полученных результатов иммуноблоттинга проводили в программе ImageJ (National Institutes of Health).

#### Определение уровня мРНК

Уровень экспрессии генов определяли методом количественной полимеразной реакции с обратной транскрипцией, используя набор High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (4368814, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США). Праймеры синтезированы компанией ЗАО «Евроген» (Москва, Россия) (табл. 1). Результаты кПЦР нормировали с помощью трех референсных генов *actb*, *thp*, *b2m* в соответствии с имеющимися рекомендациями. Экспрессию изучаемых генов рассчитывали по методу  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  и выражали в виде кратного изменения относительно контрольных образцов, далее обозначенных как коэффициенты экспрессии исследуемых генов.

#### Гистологическое исследование

Для подтверждения факта течения асептического некроза выполнено гистологическое исследование препаратов головки бедренной кости с покраской гематоксилин эозином. Для подготовки образцов использована стандартная мето-

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПРАЙМЕРОВ, ИСПОЛЬЗОВАННЫХ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF THE PRIMERS USED IN THE EXPERIMENT

Ген Gene	Forward	Reverse
<i>IL4</i>	5'-TGTACCGGGAACGGTATCCA-3'	5'-GTTGCCGTAAGGACGTCTGG-3'
<i>IL6</i>	5'-AGCCCACCAGGAACGAAAGTC-3'	5'-AGGGAAGGCAGTGGCTGTCA-3'
<i>IL1β</i>	5'-CCTCGTGCTGTCTGACCCAT-3'	5'-GGTGGGTGTGCCGTCTTCA-3'
<i>TNFα</i>	5'-AGAGCCCCAATCTGTGTCC-3'	5'-CCGCAATCCAGGCCACTACT-3'
<i>Tgfb</i>	5'-ACTCCCGTGGCTTCTAGTGC-3'	5'-GGGACTGGCGAGCCTTAGTT-3'
<i>Sp7</i>	5'-ACCCGAAGCGACCACTTGAG-3'	5'-GCTTCTTCTCCCGACGCT-3'
<i>Runx2</i>	5'-GCTTCATTCGCCTCACAAACA-3'	5'-TGGTCTCGGTGGCTGGTAGT-3'
<i>Opn/spp1</i>	5'-AAGCCAGCCAAGGACCAACTA-3'	5'-GCTTCTGAGATGGGTCAGGCT-3'
<i>Bmp2</i>	5'-ACCCGCTGTCTTCTAGTGTTC-3'	5'-AGCAGCCTCAACTCAAACCTCG-3'
<i>Bglap</i>	5'-GTCCAAGCAGGAGGGCAGTAA-3'	5'-GCTCACACACCTCCCTGTGA-3'
<i>Rankl</i>	5'-TGGAAGGTTTCGTGGCTCGAT-3'	5'-ATGGGAACCCGATGGGATGT-3'
<i>Alpl</i>	TGCCTACTTGTGTGGCGTGA-3'	5'-ATGGACGTGACCTCGTTCCC-3'
<i>HIF1α</i>	5'-AACAAAACACGCAGCGAAGC-3'	5'-GCACCAAGCACGTCATAGGC-3'
<i>b2m</i>	5'-GGTGACCGTGATCTTCTGGTG-3'	5'-TGAGGAAGTTGGGCTTCCCATT-3'
<i>actb</i>	5'-ACAACCTTCTTGCAGCTCCTC-3'	5'-CCATACCCACCATCACACCCT-3'
<i>thp</i>	5'-TGCCAAGTGTGAGCCTCTCC-3'	5'-TGGGTTATCGCACGCACCAT-3'

дика декальцинации с использованием этилендиаминотетрауксусной кислоты с последующей заливкой препаратов парафином.

#### Статистический анализ

Статистическую обработку полученных результатов проводили в пакетах программ Statistica for WINDOWS фирмы StatSoft Inc. (США), версия 10.0, по правилам вариационной статистики. В исследовании были использованы крысы линии Wistar, содержащиеся в одинаковых оптимальных условиях, поэтому W-теста Шапиро–Уилка показал нормальное распределение. Основным методом была логистическая пошаговая регрессия (статистический метод классификации с использованием линейного дискриминанта Фишера). Зависимой переменной было наличие или отсутствие асептического некроза (сравнивались две головки бедренной кости: 1 балл — головка бедренной кости с индуцированным асептическим некрозом, 0 баллов — интактная головка бедренной кости), а независимыми — уровни экспрессии исследуемых протеинов и коэффициенты экспрессии исследуемых генов. Вероятность ошибки первого рода была принята за 5%, а второго уровня — за 20%, соответственно уровень статистической значимости выявлялся при  $p < 0,05$ , что соответствует стандартным требованиям.

## Результаты

#### Гистологическое исследование

Гистологическое исследование отобразило прогрессирующее развитие признаков остеодеструкции по мере течения асептического некроза от 2-й к 6-й неделе. Первые две недели после хирургической индукции асептического некроза сопровождались в первую очередь изменениями структуры и положения хондроцитов, ядра хондроцитов теряли эллипсоидную форму, отмечались признаки деструкции. Костная архитектура приобретала волнообразный характер, однако плотность костных трабекул сохранялась без изменений по сравнению с условно-здоровой стороной (рис. 1, см. 3-ю стр. обложки).

Последующие 4-я и 6-я неделя сопровождались признаками прогениторного течения остеодеструктивных процессов. Хондроциты в гиалиновом хряще большей частью находились в наружном слое, при этом промежуточный слой характеризовался разряжением. Прогрессировало волнообразное расположение наружной костной пластинки, костных трабекул губчатого вещества, что характерно для процессов деминерализации. От 4-й к 6-й недели отмечалось увеличение концентрации активных остеокластов, чаще определялись лакуны костной резорбции (рис. 2, см. 3-ю стр. обложки).

Через 2 месяца течения асептического некроза участки костной ткани замещались плотной фиброзной тканью, часть остеоцитов слабо окрашивалась, плотность костных трабекул снижалась. При этом определялось большое количество активных остеобластов, что может свидетельствовать об активации остеорепаративных процессов (рис. 3, см. 3-ю стр. обложки).

#### Особенности экспрессии генов и белков

Исследования экспрессии белков на этапах развития асептического некроза показали, что только MMP9 и VCAM1 выявлялись с помощью иммуоблоттинга. Это может указывать на усиление неспецифического воспаления за счет межклеточных контактов, значимость ангиогенеза в регулирование ремоделирования головки бедренной кости при развитии асептического некроза.

В первые 2 недели модельного эксперимента были получены следующие результаты, представленные в таблице 2. Необходимо отметить, что полученные в представленном классификаторе (логистическая регрессия)  $\beta$ -коэффициенты отражают относительное влияние фактора на зависимую переменную, а  $B$ -коэффициенты показывают его прогностическую значимость и могут быть использованы в уравнении, описывающем логистическую функцию. Кроме того, можно оценивать и влияние отдельных факторов: протекторное влияние со знаком (+) или в таблице просто без знака перед коэффициентом; и предикторное влияние со знаком (-).

Как видно из таблицы 2, на второй неделе эксперимента все значимые ассоциации были отрицательными, т. е. повышение экспрессии генов и белков способствовало развитию асептического некроза, что вполне логично с позиции нарушения регуляции костного гомеостаза, вызванного хирургически созданной гипоперфузией головки бедренной кости. В этот период определялась значимость концентрации белков MMP9 и VCAM1, а также экспрессии генов *HIF1 $\alpha$*  и *TNF $\alpha$* . Причем наибольшим предикторным влиянием обладала экспрессия гена *HIF1 $\alpha$* .

Так как из всех изучаемых протеинов только экспрессия MMP9 и VCAM1 была значимо ассоциирована с развитием асептического некроза, то оценили влияние активности изучаемых генов на MMP9 и VCAM1 (табл. 3 и 4 соответственно).

Из таблицы 3 видно, что экспрессия гена *runx2* ассоциировалась в качестве протектора роста концентрации MMP9. Т. е. чем выше была его активность, тем сильнее угнетался синтез исследуемой металлопротеиназы. В то время как экспрессия таких генов, как *alpl*, *rankl*, *HIF1 $\alpha$* , напротив, способствовали увеличению выработки протеина MMP9.

**ТАБЛИЦА 2. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПРЕДИКТОРЫ И ПРОТЕКТОРЫ АСЕПТИЧЕСКОГО НЕКРОЗА В 2 НЕДЕЛИ МОДЕЛЬНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА**

TABLE 2. MOLECULAR PREDICTORS AND PROTECTORS OF ASEPTIC NECROSIS IN 2 WEEKS OF THE MODEL EXPERIMENT

Предикторы / протекторы Predictors / protectors	Бета ассоциация Beta association	Std. Err. Бета Std. Err. Beta	В-предиктор / протектор B predictors / protectors	Std. Err. B	p-level
Отрезок Section			2,374	0,005	0,001*
<b>MMP9</b>	-0,533	0,002	-0,001	< 0,001	0,003*
<b>VCAM1</b>	-0,829	0,004	-0,001	< 0,001	0,003*
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	-0,207	0,004	-0,008	0,000	0,013*
<b>HIF1<math>\alpha</math></b>	-0,060	0,003	-0,013	0,001	0,032*

Примечание. \* – значимый уровень достоверности ( $p < 0,05$ ).

Note. \* is a significant confidence level ( $p < 0.05$ ).

**ТАБЛИЦА 3. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДИКТОРЫ И ПРОТЕКТОРЫ АКТИВНОСТИ MMP9 В 2 НЕДЕЛИ МОДЕЛЬНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА**

TABLE 3. GENETIC PREDICTORS AND PROTECTORS OF MMP 9 ACTIVITY IN 2 WEEKS OF THE MODEL EXPERIMENT

Предикторы / протекторы Predictors / protectors	Бета ассоциация Beta association	Std. Err. Бета Std. Err. Beta	В-предиктор / протектор B predictors / protectors	Std. Err. B	p-level
Отрезок Section			10734,504	6,606	0,000
<b>runx2</b>	2,030	0,001	2424,281	1,047	0,000
<b>alpl</b>	-0,829	0,001	-611,057	0,675	0,001
<b>rankl</b>	-0,663	0,001	-1354,379	2,909	0,001
<b>HIF1<math>\alpha</math></b>	-0,103	0,001	-279,641	1,811	0,004

**ТАБЛИЦА 4. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДИКТОРЫ И ПРОТЕКТОРЫ АКТИВНОСТИ VCAM1 В 2 НЕДЕЛИ МОДЕЛЬНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА**

TABLE 4. GENETIC PREDICTORS AND PROTECTORS OF VCAM ACTIVITY 1 IN 2 WEEKS OF THE MODEL EXPERIMENT

Предикторы / протекторы Predictors / protectors	Бета ассоциация Beta association	Std. Err. Бета Std. Err. Beta	В-предиктор / протектор B predictors / protectors	Std. Err. B	p-level
Отрезок / Section			45385,274	6233,392	0,002
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	-0,869	0,247	-1185,451	336,717	0,024

Из таблицы 4 видно, что синтез VCAM1 усиливался синтезом гена *TNF $\alpha$* .

Дальнейшие 4 недели течения асептического некроза характеризовались прогрессирующим развитием воспаления. По аналогии с исследованиями на 2-й неделе проведена оценка связей с помощью логистической регрессии (табл. 5, 6). Как видно из таблицы 5, на 4-й неделе после индукции асептического некроза протекторны-

ми свойствами стали обладать количество мРНК *TNF $\alpha$*  и степень экспрессии молекулы VCAM1. В то же время экспрессия гена *IL6* и MMP9 способствовала развитию асептического некроза.

Экспрессия генов *bglap* и *runx2* ассоциировалась в качестве протекторов изменения концентрации белка MMP9. В то же время экспрессия таких генов, как *alpl*, *HIF1 $\alpha$* , напротив, выступала в качестве предикторов увеличения concentra-

**ТАБЛИЦА 5. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПРЕДИКТОРЫ И ПРОТЕКТОРЫ АСЕПТИЧЕСКОГО НЕКРОЗА В 4 НЕДЕЛИ МОДЕЛЬНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА**

TABLE 5. MOLECULAR PREDICTORS AND PROTECTORS OF ASEPTIC NECROSIS IN 4 WEEKS OF THE MODEL EXPERIMENT

Предикторы / протекторы Predictors / protectors	Бета ассоциация Beta association	Std. Err. Бета Std. Err. Beta	В-предиктор / протектор B predictors / protectors	Std. Err. B	p-level
Отрезок Section			1,229	0,001	< 0,001
MMP9	-1,079	0,002	-0,001	< 0,001	0,001*
IL6	-0,207	0,001	-0,002	< 0,001	0,004*
TNF $\alpha$	0,111	0,002	0,001	< 0,001	0,009*
VCAM1	0,076	0,002	0,001	< 0,001	0,014*

Примечание. \* – значимый уровень достоверности ( $p < 0,05$ ).

Note. \* is a significant confidence level ( $p < 0.05$ )

**ТАБЛИЦА 6. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДИКТОРЫ И ПРОТЕКТОРЫ АКТИВНОСТИ MMP9 В 4 НЕДЕЛИ МОДЕЛЬНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА**

TABLE 6. GENETIC PREDICTORS AND PROTECTORS OF MMP 9 ACTIVITY IN 4 WEEKS OF THE MODEL EXPERIMENT

Предикторы / протекторы Predictors / protectors	Бета ассоциация Beta association	Std. Err. Бета Std. Err. Beta	В-предиктор / протектор B predictors / protectors	Std. Err. B	p-level
Отрезок Section			21464,797	4,265	< 0,001
HIF1 $\alpha$	-1,355	< 0,001	-6935,855	2,057	< 0,001
bglap	1,136	0,001	454,882	0,277	< 0,001
alpl	-1,303	0,001	-101,847	0,081	0,001
runx2	0,390	0,001	39,086	0,052	0,001

**ТАБЛИЦА 7. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПРЕДИКТОРЫ И ПРОТЕКТОРЫ АСЕПТИЧЕСКОГО НЕКРОЗА В 6 НЕДЕЛЬ МОДЕЛЬНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА**

TABLE 7. MOLECULAR PREDICTORS AND PROTECTORS OF ASEPTIC NECROSIS IN 6 WEEKS OF THE MODEL EXPERIMENT

Предикторы / протекторы Predictors / protectors	Бета ассоциация Beta association	Std. Err. Бета Std. Err. Beta	В-предиктор / протектор B predictors / protectors	Std. Err. B	p-level
Отрезок Section			3,732	0,246	0,042*
IL4	-1,238	0,036	-0,005	< 0,001	0,019*

Примечание. \* – значимый уровень достоверности ( $p < 0,05$ ).

Note. \* is a significant confidence level ( $p < 0.05$ ).

ции MMP9, как и в первые две недели индукции асептического некроза (табл. 6).

Стоит отметить, что на четвертой неделе после индукции асептического некроза головки бедренной кости возможные регуляторные ассо-

циации между концентрацией VCAM1 и экспрессией исследуемых генов исчезают.

На 6-й неделе течения асептического некроза выявлена в качестве предиктора только экспрессия гена IL4 (табл. 7).

**ТАБЛИЦА 8. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДИКТОРЫ И ПРОТЕКТОРЫ АКТИВНОСТИ ММР9 В 6 НЕДЕЛЬ МОДЕЛЬНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА**

TABLE 8. GENETIC PREDICTORS AND PROTECTORS OF MMP 9 ACTIVITY IN 6 WEEKS OF THE MODEL EXPERIMENT

Предикторы / протекторы Predictors / protectors	Бета ассоциация Beta association	Std. Err. Бета Std. Err. Beta	В-предиктор / протектор B predictors / protectors	Std. Err. B	p-level
Отрезок Section			33880,410	1435,417	0,027*
<i>bglap</i>	-0,817	0,036	-8662,957	379,162	0,028*
<i>IL1β</i>	0,303	0,036	60631,435	7143,794	0,075

Примечание. \* – значимый уровень достоверности (p < 0,05).

Note. \* is a significant confidence level (p < 0.05).

**ТАБЛИЦА 9. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПРЕДИКТОРЫ И ПРОТЕКТОРЫ АСЕПТИЧЕСКОГО НЕКРОЗА В 8 НЕДЕЛЬ МОДЕЛЬНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА**

TABLE 9. MOLECULAR PREDICTORS AND PROTECTORS OF ASEPTIC NECROSIS IN 8 WEEKS OF THE MODEL EXPERIMENT

Предикторы / протекторы Predictors / protectors	Бета ассоциация Beta association	Std. Err. Бета Std. Err. Beta	В-предиктор / протектор B predictors / protectors	Std. Err. B	p-level
Отрезок Section			-0,019	< 0,001	< 0,001*
<i>IL6</i>	-1,000	0,001	20,381	0,010	< 0,001*

Примечание. \* – значимый уровень достоверности (p < 0,05).

Note. \* is a significant confidence level (p < 0.05).

**ТАБЛИЦА 10. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДИКТОРЫ И ПРОТЕКТОРЫ АКТИВНОСТИ ММР9 В 8 НЕДЕЛЬ МОДЕЛЬНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА**

TABLE 10. GENETIC PREDICTORS AND PROTECTORS OF MMP 9 ACTIVITY IN 8 WEEKS OF THE MODEL EXPERIMENT

Предикторы / протекторы Predictors / protectors	Бета ассоциация Beta association	Std. Err. Бета Std. Err. Beta	В-предиктор / протектор B predictors / protectors	Std. Err. B	p-level
Отрезок Section			23929,992	654,269	0,017*
<i>spp1</i>	-0,998	0,043	-2776,168	118,611	0,027*
<i>runx2</i>	-0,082	0,043	-17394,652	9040,838	0,305

Примечание. \* – значимый уровень достоверности (p < 0,05).

Note. \* is a significant confidence level (p < 0.05).

С экспрессией ММР9 был положительно значимо ассоциирован уровень мРНК гена *IL1β*. В то же время ассоциативная связь экспрессии гена *bglap* перешла за 6 недель эксперимента в отрицательные значения. Это указывает на цикличность генетического влияние в отношении экспрессии ММР9 (табл. 8).

Значимых ассоциаций между экспрессией VCAM1 и исследуемых генов не получено.

К восьмой неделе эксперимента единственным значимым предиктором асептического некроза головки бедренной кости являлась экспрессия гена провоспалительного цитокина *IL6*, которая проявляла себя при выполнении логи-

стической регрессии с учетом всех исследуемых генетических и протеомных маркеров (табл. 9).

Исходя из этого, можно утверждать о пролонгированном по времени влиянии неспецифического воспаления в патогенезе асептического некроза. Как видно из таблицы 9, никаких других взаимосвязей не получено. Это доказывает доминирующую роль экспрессии гена *IL6* через 2 месяца течения асептического некроза головки бедренной кости.

К 8-й неделе развития асептического некроза головки бедренной кости экспрессия генов *spp1* и *runx2* способствовала увеличению концентрации MMP9 (табл. 10). Учитывая взаимосвязь активности гена *runx2* на 2-й и 4-й неделе эксперимента можно сделать вывод, что данный ген может играть ключевое значение в отношении синтеза MMP9 на этапах формирования асептического некроза головки бедренной кости.

## Обсуждение

Развитие неспецифического воспаления играет важную роль в регуляции остеогенеза и, как правило, направлено на усиление остеокластогенеза, активацию зрелых остеокластов и развитие остеолитических процессов. Представленная работа продемонстрировала гетерогенность иммунорегуляции воспалительного процесса при манифестации и дальнейшем течении аваскулярного некроза головки бедренной кости, при этом молекулярно-клеточные механизмы патогенеза остеодеструкции связаны как с изменениями в профиле мРНК, так и концентрациями некоторых регуляторных белков в головке бедренной кости на фоне хирургически созданного очага гипоперфузии.

Хирургически созданная локальная гипоперфузия в выполненной экспериментальной работе приводит к дефициту кислорода на определенном участке головки бедренной кости. Экспрессия генов *HIF1α*, *TNFα* в первые две недели после хирургически индуцированного асептического некроза выступала в качестве предикторного фактора. Вполне вероятно, что изменение экспрессии гена *HIF1α* связано с созданием зоны гипоперфузии и последующей активацией экспрессии гена *TNFα*, как одного из основных провоспалительных цитокинов. Известно, что ген *HIF1α* кодирует одноименный белок, изменение концентрации которого связано с острой тканевой гипоксией. При этом биологическое действие HIF-1α может быть направлено на модификацию воспалительного ответа, в том числе через его влияние на ген *TNFα*, который связан с активацией центрального сигнального пути остеокластогенеза RANK-RANKL-OPG. Представленные данные свидетельствуют об индук-

ции неспецифического воспаления уже на самых ранних сроках патогенеза асептического некроза головки бедренной кости, при этом триггерным фактором может выступать дефицит кровоснабжения проксимального отдела бедренной кости.

Известно, что ангиогенез и остеогенез тесно связаны [8]. В выполненной работе определена зависимость концентрации протеина VCAM1 на течение асептического некроза. В первые 2 недели эксперимента представленный белок выступал в качестве предикторного фактора аваскулярного некроза. Концентрация протеина VCAM1 влияет на синтез белков окислительного стресса, пролиферацию иммунокомпетентных клеток, а также адгезию их к эндотелию сосудов в ответ на повреждающий факторы, и увеличивается под воздействием провоспалительных цитокинов [9]. Так, предикторное влияние концентрации VCAM1 в первые две недели после хирургически индуцированного аваскулярного некроза подтверждает инициирование неспецифического воспаления с участием сосудистого компонента.

В то же время через 1 месяц после хирургической индукции асептического некроза концентрация регуляторного белка VCAM1 выступала в качестве протекторного фактора. Кроме того, на четвертой неделе развития аваскулярного некроза влияние экспрессии гена *HIF1α* также менялось на протекторное. Полученные данные могут указывать на активацию ангиогенеза и опосредованное усиление остеогенеза [20]. Ряд авторов указывает на возможное участие VCAM1 и HIF-1α в усиление остеогенной дифференцировки прогениторных клеток остеобластогенеза [10, 11]. Однако, по данным гистологического исследования первые две и последующий четыре и шесть недель отображали прогрессирующие хондродеструктивные, остеодеструктивные процессы с увеличением числа активных остеокластов.

При этом одним из ключевых белков, играющих важную роль в развитии остеодеструкции по данным представленного исследования, является MMP9, значимость концентрации которого определяется уже на вторую неделю течения эксперимента. MMP представляет собой семейство протеолитических ферментов, участвующих в деструкции внеклеточного матрикса различных тканей, в том числе и костной, и индуцирующих костную резорбцию [7]. MMP9 высоко экспрессируется как на ранних стадиях остеокластогенеза, так и в зрелых остеокластах. Так, определение роста концентрации белка MMP9 на второй и четвертой неделе эксперимента в качестве предиктора развития асептического некроза, может указывать на активацию дифференцировки зрелых остеокластов и усиление за счет этого осте-

олитических процессов. Синергичное предикторное действие концентрации белков MMP9 и VCAM1 на течение асептического некроза головки бедренной кости в течение первых двух недель патогенеза свидетельствует о развитии воспалительной реакции на фоне сосудистого коллапса. Представленное биологическое действие данных медиаторов при острой тканевой гипоксии также подтверждено в ряде научных работ [2]. Учитывая гистологическую картину, представленные результаты изучения молекулярно-клеточных взаимодействий могут указывать на нарушение баланса ремоделирования костной ткани на 4-й неделе развития асептического некроза головки бедренной кости, на фоне более интенсивного остеокластогенеза по сравнению с остеобластогенезом.

Определены протекторные и прогениторные взаимосвязи между концентрацией белка MMP9 и экспрессией генов, кодирующих протеины участвующих в регуляции костного гомеостаза. Так, в первые две недели после хирургической индукции асептического некроза головки бедренной кости на усиление синтеза MMP9 влияли гены *HIF1α*, *rankl*, *alpl*, при этом прогениторное влияние генов *HIF1α* и *alpl* сохранялось и через 1 месяц после манифестации асептического некроза. В то же время протекторное влияние на синтез протеина MMP9 в первые 2 и 4 недели эксперимента оказывал ген *runx2*. Такие результаты могут быть связаны с увеличением концентрации протеина MMP9 в первый месяц развития аваскулярного некроза в ответ на усиление экспрессии генов, участвующих в активации остеокластогенеза, и в то же время снижении на фоне экспрессии генов остеобластогенеза. Представленные данные могут подтверждать зависимость между функционированием сигнального пути RANK/RANKL/OPG и белком MMP9 и указывать на усиление остеокластогенеза на самых ранних стадиях аваскулярного некроза.

Интерес вызывает изменение влияния гена *runx2* через 8 недель после начала эксперимента. Так, экспрессия данного гена оказывала прогениторное влияние, т. е. способствовала росту концентрации MMP9. При этом на усиление синтеза MMP9 также оказывал влияние ген *sppl*. Таким образом, через 2 месяца после хирургической индукции асептического некроза на увеличение концентрации протеина MMP9 влияли гены моделирования костной ткани. Возможно, такие результаты связаны с изменением биологического действия протеина MMP9 на более поздних стадиях асептического некроза головки бедренной кости. Противовоспалительное биологическое действие MMP9, влияние на дифференцировку хондрогенных и остеогенных клеток

продемонстрировано в ряде исследований [22]. Однако значимого влияния на патогенез аваскулярного некроза концентрации MMP9 через 2 месяца после начала экспериментальной работы не получено. Тем не менее стоит отметить, что по данным гистологического исследования через два месяца после начала эксперимента в препаратах головки бедренной кости определялись признаки усиления остеобластогенеза.

Выполненная работа показала изменения ассоциативного действия экспрессии генов, кодирующих цитокины, при этом ведущий молекулярный паттерн менялся по мере развития асептического некроза. Усиление экспрессии гена *TNFα* выступало в качестве предиктора развития асептического некроза головки бедренной кости на 2-й неделе, гена *IL6* – на 4-й и 8-й неделях, гена *IL4* – на 6-й неделе. Провоспалительные цитокины TNFα, IL-6 рассматриваются рядом авторов как одни из ключевых молекул, способствующих усилению остеокластогенеза [18]. Известно, что биологическое действие провоспалительных цитокинов направлено на увеличение концентрации RANKL, активации дифференцировки зрелых остеокластов. Так, подтверждение предикторной связи между экспрессией генов *TNFα*, *IL6* и развитием аваскулярного некроза на 2-й и 4-й неделе эксперимента, соответственно, указывает на влияние неспецифического воспаления на остеодеструкцию. Стоит отметить сетевой принцип действия цитокинов, при котором экспрессия одного цитокина способствует синтезу другого. Так, на 6-й неделе развития аваскулярного некроза в качестве предикторного фактора выступал ген *IL4*. Некоторые исследователи относят цитокин IL-4 к антиостеокластогенным медиаторам, однако его биологическое действие является провоспалительным. IL-4 способствует альтернативной активации макрофагов, стимуляции пролиферации активированных Т-клеток, В-клеток. О дальнейшем прогрессирующем развитии воспаления свидетельствует факт определения в качестве прогенитора течения асептического некроза гена *IL6* через 2 месяца после начала эксперимента.

Полученные данные указывают на развитие каскадности и синергичности биологического действия цитокинов и их влияния на активность сигнальных путей, регулирующих костный гомеостаз. Существует большое количество научных работ, подтверждающих влияние цитокинового статуса на регуляцию остеокластогенеза. Так, прогрессирующее развитие остеодеструкции в представленном эксперименте связано с сохраняющимися активными процессами неспецифического воспаления на фоне изменений цитокинового коктейля вплоть до 2 месяцев после

хирургических манипуляций по созданию зоны гипоперфузии головки бедренной кости.

Таким образом, регуляция активности сигнальных путей, участвующих в поддержании костного гомеостаза, менялась по мере течения аваскулярного некроза. Патогенез костной деструкции связан не только с усилением активности остеокластогенеза, но и снижением интенсивности остеобластогенеза. Одним из способствующих факторов нарушения костного гомеостаза может являться неспецифическое воспаление, ведущие молекулярные паттерны которого менялись в зависимости от времени, прошедшего с момента манифестации аваскулярного некроза, однако значимость медиаторов

воспаления на патогенез остеодеструкции сохранялась до 8 недели эксперимента.

## Выводы

Развитие асептического некроза головки бедренной кости крайне гетерогенный процесс. Важная роль в регуляции остеорезорбции принадлежит неспецифическому воспалению, триггером которого может служить острая тканевая гипоксия. Значимое влияние процесса воспаления сохраняется до 8 недель после манифестации аваскулярного некроза головки бедренной кости. При этом ведущий молекулярно-клеточный патологический паттерн нарушения костного гомеостаза меняется в зависимости от стадии течения асептического некроза.

## Список литературы / References

1. Гребенникова Т.А., Белая Ж.Е., Рожинская Л.Я., Мельниченко Г.А. Канонический сигнальный путь Wnt/ $\beta$ -катенин: от истории открытия до клинического применения // *Терапевтический архив*, 2016. № 10. С. 74-81. [Grebennikova T.A., Belaya Zh.E., Rozhinskaya L.Ya., Melnichenko G.A. The canonical Wnt/ $\beta$ -catenin pathway: From the history of its discovery to clinical application. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*, 2016, no. 10, pp. 74-81. (In Russ.)]
2. Заковряшина И.Н., Суредов В.А., Хаишева Л.А., Шлык С.В., Самакаев, А.С. Изучение маркеров системного воспаления (матриксной металлопротеиназы-9, молекул адгезии сосудистого эндотелия I-го типа) у пациентов с инфарктом миокарда с подъемом сегмента st на госпитальном и амбулаторном этапах // *CardioСоматика*, 2021. Т. 12, № 3. С. 124-131. [Zakovryashina I.N., Kuroedov V.A., Khaisheva L.A., Shlyk S.V., Samakaev A.S. Study of markers of systemic inflammation (matrix metalloproteinase-9, adhesion molecules of vascular endothelium type 1) in patients with myocardial infarction with st segment elevation at the hospital and outpatient stages. *CardioSomatika = CardioSomatics*, 2021, Vol. 12, no. 3, pp. 124-131. (In Russ.)]
3. Камиллов Ф.Х., Фаршатов Е.Р., Еникеев Д.А. Клеточно-молекулярные механизмы ремоделирования костной ткани и ее регуляция // *Фундаментальные исследования*, 2014. № 7. С. 836-842. [Kamilov F.K., Farshatova E.R., Enikeev D.A. Cellular and molecular mechanisms remodeling of bone tissue and regulation. *Fundamentalnye issledovaniya = Fundamental Research*, 2014, no. 7, pp. 836-842. (In Russ.)]
4. Adapala N.S., Kim H.K.W. Comprehensive genome-wide transcriptomic analysis of immature articular cartilage following ischemic osteonecrosis of the femoral head in piglets. *PLoS One*, 2016, Vol. 11, no. 4, e0153174. doi:10.1371/journal.pone.0153174.
5. Adapala N.S., Yamaguchi R., Phipps M., Aruwajoye O., Kim H.K.W. Necrotic bone stimulates proinflammatory responses in macrophages through the activation of toll-like receptor 4. *Am. J. Pathol.*, 2016, Vol. 186, no. 11, pp. 2987-2999. doi: 10.1016/j.ajpath.2016.06.024.
6. Amarasekara D.S., Yun H., Kim S., Lee N., Kim H., Rho J. Regulation of osteoclast differentiation by cytokine networks. *Immune Netw*, 2018, Vol. 18, no. 1, e8. doi: 10.4110/in.2018.18.e8.
7. Chen D., Zhang X., Guo Y., Shi S., Mao X., Pan X., Cheng T. MMP-9 inhibition suppresses wear debris-induced inflammatory osteolysis through downregulation of RANK/RANKL in a murine osteolysis model. *Int. J. Mol. Med.*, 2012, Vol. 30, no. 6, pp. 1417-1423.
8. Guo Q., Yang J., Chen Y., Jin X., Li Z., Wen X., Wang Y. Salidroside improves angiogenesis-osteogenesis coupling by regulating the HIF-1 $\alpha$ /VEGF signalling pathway in the bone environment. *Eur. J. Pharmacol.*, 2020, Vol. 884, 173394. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173394.
9. Gkouveris I., Hadaya D., Soundia A., Bezouglaia O., Chau Y., Dry S.M., Pirih F.Q., Aghaloo T.L., Tetradis S. Vasculature submucosal changes at early stages of osteonecrosis of the jaw (ONJ). *Bone*, 2019, Vol. 123, pp. 234-245.
10. Hatori A., Fujii Y., Kawase-Koga Y., Ogasawara T., Chikira J., Minami S., Chikazu D. VCAM-1 and GFPT-2: Predictive markers of osteoblast differentiation in human dental pulp stem cells. *Bone*, 2023, Vol. 166, 116575. doi: 10.1016/j.bone.2022.116575.
11. Kamiya N., Shafer S., Oxendine I., Mortlock D.P., Chandler R.L., Oxburgh L., Kim H.K. Acute BMP2 upregulation following induction of ischemic osteonecrosis in immature femoral head. *Bone*, 2013, Vol. 53, no. 1, pp. 239-247.

12. Kim H.K.W., Wiesman K.D., Kulkarni V., Burgess J., Chen E., Brabham C., Ikram H., Du J., Lu A., Kulkarni A.V., Dempsey M., Herring J.A. Perfusion MRI in early stage of legg-calvé-perthes disease to predict lateral pillar involvement: a preliminary study. *J. Bone Joint Surg.*, 2014, Vol. 96, no. 14, pp. 1152-1160.
13. Lieu S., Hansen E., Dedini R., Behonick D., Werb Z., Miclau T., Colnot C. Impaired remodeling phase of fracture repair in the absence of matrix metalloproteinase-2. *Dis. Model. Mech.*, 2011, Vol. 4, no. 2, pp. 203-211.
14. Lu X., Mu E., Wei Y., Riethdorf S., Yang Q., Yuan, M., Yan J., Kang, Y. VCAM-1 promotes osteolytic expansion of indolent bone micrometastasis of breast cancer by engaging  $\alpha 4\beta 1$ -positive osteoclast progenitors. *Cancer Cell*, 2011, Vol. 20, no. 6, pp. 701-714.
15. Malhotra S., Kincade P.W. Canonical Wnt pathway signaling suppresses VCAM-1 expression by marrow stromal and hematopoietic cells. *Exp. Hematol.*, 2009, Vol. 37, no. 1, pp. 19-30.
16. Nyman J.S., Lynch C.C., Perrien D.S., Thiolloy S., O'Quinn E.C., Patil C.A., Mundy G.R. Differential effects between the loss of MMP-2 and MMP-9 on structural and tissue-level properties of bone. *J. Bone Miner. Res.*, 2011, Vol. 26, no. 6, pp. 1252-1260.
17. Samara S., Dailiana Z., Chassanidis C., Koromila T., Papatheodorou L., Malizos K.N., Kollia P. Expression profile of osteoprotegerin, RANK and RANKL genes in the femoral head of patients with avascular necrosis. *Exp. Mol. Pathol.*, 2014, Vol. 96, no. 1, pp. 9-14.
18. Sun Z., Zeng J., Wang W., Jia X., Wu Q., Yu D., Mao Y. Magnoflorine suppresses MAPK and NF- $\kappa$ B signaling to prevent inflammatory osteolysis induced by titanium particles in vivo and osteoclastogenesis via RANKL in vitro. *Front. Pharmacol.*, 2020, Vol. 11, 389. doi: 10.3389/fphar.2020.00389.
19. Wang X., Yu Y. Y., Lieu S., Yang F., Lang J., Lu C., Werb Z., Colnot C. MMP9 regulates the cellular response to inflammation after skeletal injury. *Bone*, 2013, Vol. 52, no. 1, pp. 111-119.
20. Xiang X., Pathak J.L., Wu W., Li J., Huang W., Wu Q., Xin M., Wu Y., Huang Y., Ge L., Zeng, S. Human serum-derived exosomes modulate macrophage inflammation to promote VCAM1-mediated angiogenesis and bone regeneration. *J. Cell. Mol. Med.*, 2023, Vol. 27, no. 8, pp. 1131-1143.
21. Yellowley C.E., Genetos D.C. Hypoxia signaling in the skeleton: implications for bone health. *Curr. Osteoporos. Rep.*, 2019, Vol. 17, pp. 26-35.
22. Zhang H., Liu L., Jiang C., Pan K., Deng J., Wan C. MMP9 protects against LPS-induced inflammation in osteoblasts. *Innate Immun.*, 2020, Vol. 26, no. 4, pp. 259-269.

---

**Авторы:**

**Шабалдин Н.А.** — к.м.н., доцент, заведующий кафедрой детских хирургических болезней ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Кемерово, Россия

**Синицкая А.В.** — к.б.н., научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

**Authors:**

**Shabaldin N.A.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Pediatric Surgical Diseases, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

**Sinitskaya A.V.**, PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

**Богданов Л.А.** — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

**Шабалдин А.В.** — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»; профессор кафедры поликлинической педиатрии, пропедевтики детских болезней и последипломной подготовки ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Кемерово, Россия

**Bogdanov L.A.**, Junior Research Associate, Laboratory of Molecular, Translational and Digital Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

**Shabalдин A.V.**, PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cell and Tissue Engineering, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases; Professor, Department of Polyclinic Pediatrics, Propaedeutics of Childhood Diseases and Postgraduate Training, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

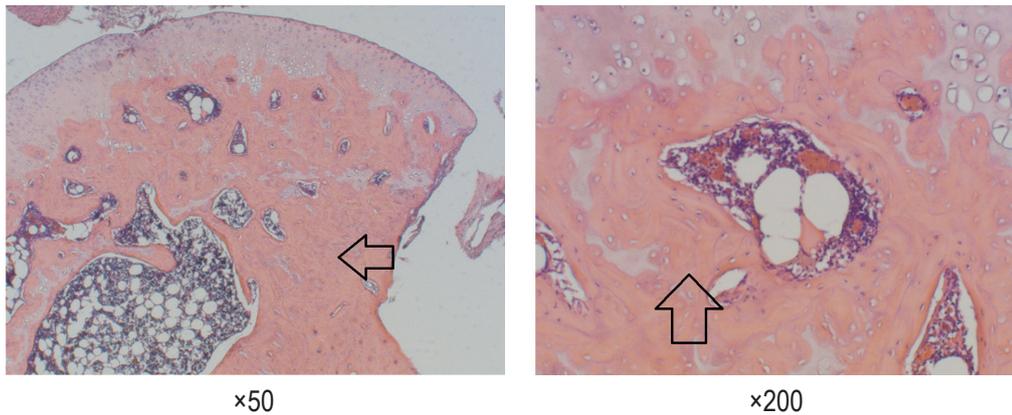
---

Поступила 22.06.2023  
Принята к печати 05.10.2023

Received 22.06.2023  
Accepted 05.10.2023

**ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «ВЛИЯНИЕ ВОСПАЛЕНИЯ НА ТЕЧЕНИЕ АСЕПТИЧЕСКОГО НЕКРОЗА ГОЛОВКИ БЕДРЕННОЙ КОСТИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ» (АВТОРЫ: ШАБАЛДИН Н.А., СИНИЦКАЯ А.В., БОГДАНОВ Л.А., ШАБАЛДИН А.В. [с. 1183-1196])**

ILLUSTRATIONS FOR THE ARTICLE "THE EFFECT OF INFLAMMATION ON THE COURSE OF EXPERIMENTAL ASEPTIC NECROSIS OF FEMORAL HEAD" (AUTHORS: SHABALDIN N.A., SINITSKAYA A.V., BOGDANOV L.A., SHABALDIN A.V. [pp. 1183-1196])

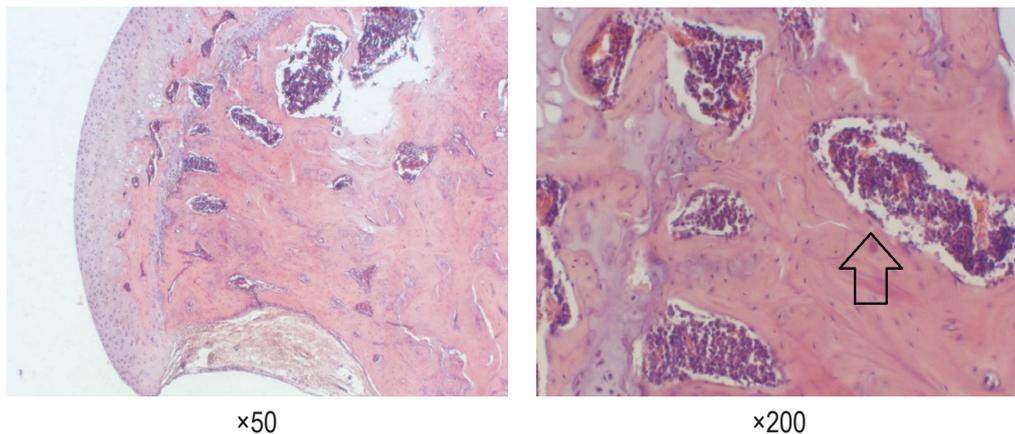


**Рисунок 1. Гистологическое исследование 2 недель**

**Примечание. Окраска гематоксилин-эозин (×50; ×200). Начальные признаки волнообразного расположения костных трабекул (указаны стрелочкой).**

Figure 1. Histological examination for 2 weeks

Note. Hematoxylin-eosin staining (×50; ×200). The initial signs of a wave-like arrangement of bone trabeculae (indicated by an arrow).

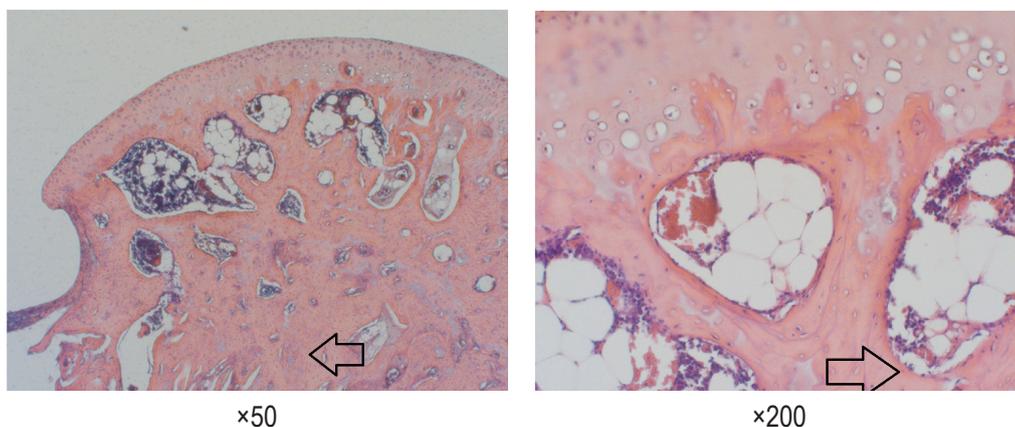


**Рисунок 2. Гистологическое исследование 6 недель**

**Примечание. Окраска гематоксилин-эозин (×50; ×200). Активные остеокласты, лакуны костной резорбции (указаны стрелочкой)**

Figure 2. Histological examination of 6 weeks

Note. Hematoxylin-eosin staining (×50; ×200). Active osteoclasts, lacunae of bone resorption (indicated by an arrow)



**Рисунок 3. Гистологическое исследование 8 недель**

**Примечание. Окраска гематоксилин-эозин (×50; ×200). Активные остеобласты, замещение фиброзной тканью (указаны стрелочками).**

Figure 3. Histological examination of 8 weeks

Note. Hematoxylin-eosin staining (×50; ×200). Active osteoblasts, replacement with fibrous tissue (indicated by arrows).