

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ БИОАКТИВНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Арсаканова Гайна Абдуллоевна

Кандидат медицинских наук, доцент,
ФГБОУ ВО «Чеченский государственный университет
им. А.А. Кадырова»
gistologiya58@mail.ru

Абдурашидова Луиза Хамзатовна

Ассистент, ФГБОУ ВО «Чеченский государственный
университет им. А.А. Кадырова»
кафедры «Гистологии и патологическая анатомия»
gistologiya58@mail.ru

HISTOLOGICAL AND MOLECULAR FEATURES OF BONE TISSUE REGENERATION USING BIOACTIVE MATERIALS

**G. Arsakhanova
L. Abdurashidova**

Summary. Introduction. The development of new bioactive materials for bone tissue regeneration is an urgent task of modern medicine. *The aim of the study* was to study the histological and molecular features of bone tissue regeneration using bioactive materials based on hydroxyapatite and collagen. *Methods.* The study was conducted on 30 male Wistar rats. The animals were divided into 3 groups: a control group with hydroxyapatite implantation and with hydroxyapatite-collagen composite implantation. The femoral defect was modeled by drilling a hole with a diameter of 2 mm. Histological examination was performed on the 10th, 30th and 60th days after surgery. The expression of type I collagen (Col1a1), osteocalcin (Bglap), alkaline phosphatase (Alpl) and osteopontin (Spp1) genes was evaluated by real-time PCR. *Results.* Implantation of bioactive materials accelerated bone regeneration. On the 30th day, the formation of bone trabeculae was observed in the groups with implants, and on the 60th day the defect was completely filled with newly formed bone. The hydroxyapatite-collagen composite demonstrated better biocompatibility and osteoinductivity compared to pure hydroxyapatite. The expression of the Col1a1, Bglap, Alpl and Spp1 genes was significantly higher in the groups with implants at all periods of the experiment. *Discussion.* Bioactive materials based on hydroxyapatite and collagen have demonstrated high efficiency in stimulating bone regeneration. The combination of osteoconductive properties of hydroxyapatite and the biological activity of collagen provides optimal conditions for adhesion, proliferation and differentiation of bone tissue cells. The results obtained open up prospects for the development of new biomaterials with improved osteoinductive characteristics.

Keywords: bone regeneration, bioactive materials, hydroxyapatite, collagen, histology, gene expression.

Аннотация. Введение. Разработка новых биоактивных материалов для регенерации костной ткани является актуальной задачей современной медицины. *Цель исследования* — изучить гистологические и молекулярные особенности регенерации костной ткани при использовании биоактивных материалов на основе гидроксиапатита и коллагена. *Методы.* Исследование проведено на 30 крысах-самцах линии Wistar. Животные были разделены на 3 группы: контрольную, с имплантацией гидроксиапатита и с имплантацией композита гидроксиапатит-коллаген. Дефект бедренной кости моделировали путем бурения отверстия диаметром 2 мм. Гистологическое исследование проводили на 10-е, 30-е и 60-е сутки после операции. Экспрессию генов коллагена I типа (Col1a1), остеокальцина (Bglap), щелочной фосфатазы (Alpl) и остеопонтина (Spp1) оценивали методом ПЦР в реальном времени. *Результаты.* Имплантация биоактивных материалов ускорила регенерацию костной ткани. На 30-е сутки в группах с имплантатами наблюдалось формирование костных трабекул, а на 60-е сутки дефект был полностью заполнен новообразованной костью. Композит гидроксиапатит-коллаген демонстрировал лучшую биосовместимость и остеиндуктивность по сравнению с чистым гидроксиапатитом. Экспрессия генов Col1a1, Bglap, Alpl и Spp1 была значительно выше в группах с имплантатами на всех сроках эксперимента. *Обсуждение.* Биоактивные материалы на основе гидроксиапатита и коллагена продемонстрировали высокую эффективность в стимуляции регенерации костной ткани. Комбинация остеокондуктивных свойств гидроксиапатита и биологической активности коллагена обеспечивает оптимальные условия для адгезии, пролиферации и дифференцировки клеток костной ткани. Полученные результаты открывают перспективы для разработки новых биоматериалов с улучшенными остеиндуктивными характеристиками.

Ключевые слова: регенерация костной ткани, биоактивные материалы, гидроксиапатит, коллаген, гистология, экспрессия генов.

Введение

Регенерация костной ткани является сложным многоступенчатым процессом, включающим воспалительную реакцию, ангиогенез, образование хрящевого матрикса и его оссификацию [3, с. 67]. Разработка новых биоматериалов, способных стимулировать есте-

ственные репаративные процессы, представляет собой актуальную задачу регенеративной медицины [1, с. 204].

Биоактивные материалы на основе гидроксиапатита и коллагена рассматриваются как перспективные кандидаты для костной пластики благодаря их остеокондуктивным и остеиндуктивным свойствам [4, с. 17]. Гидрок-

сиапатит, являясь основным минеральным компонентом костного матрикса, обеспечивает механическую прочность и служит депо ионов кальция и фосфора [2, с. 4]. Коллаген I типа, в свою очередь, влияет на адгезию, пролиферацию и дифференцировку остеогенных клеток за счет связывания с интегринами и факторами роста [6, с. 288].

Несмотря на очевидные преимущества комбинации гидроксиапатита и коллагена, молекулярные механизмы их влияния на регенерацию костной ткани остаются малоизученными. Более глубокое понимание клеточных и молекулярных процессов, лежащих в основе остеоиндуктивности данных материалов, позволит осуществлять направленный дизайн биоактивных имплантатов с заданными свойствами [5, с. 124].

Цель данного исследования — изучить особенности регенерации костной ткани при использовании биоактивных материалов на основе гидроксиапатита и коллагена на гистологическом и молекулярном уровнях. Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Оценить динамику гистологических изменений в зоне костного дефекта после имплантации биоактивных материалов.
2. Проанализировать экспрессию ключевых генов, вовлеченных в процессы остеогенеза, на разных сроках эксперимента.
3. Сопоставить остеоиндуктивные свойства гидроксиапатита и композита гидроксиапатит-коллаген.
4. Предложить возможные молекулярные механизмы стимулирующего влияния исследуемых материалов на регенерацию кости.

Методы

Эксперимент проводили на 30 крысах-самцах линии Wistar массой 250–300 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище. Все манипуляции осуществляли в соответствии с этическими принципами обращения с лабораторными животными.

Под общей анестезией (Золетил 100, 15 мг/кг) в средней трети диафиза бедренной кости моделировали дырчатый дефект диаметром 2 мм и глубиной 2 мм с помощью стоматологического бора. Животные были разделены на 3 группы ($n = 10$): контрольную (дефект оставляли незаполненным), группу с имплантацией гидроксиапатита (ГАП) и группу с имплантацией композита гидроксиапатит-коллаген (ГАП-КЛ). Имплантаты изготавливали в виде пористых гранул диаметром 1–2 мм и стерилизовали γ -излучением.

Животных выводили из эксперимента передозировкой анестетика на 10-е, 30-е и 60-е сутки после операции.

Для гистологического исследования из средней части диафиза бедренной кости выпиливали сегмент длиной 1 см и фиксировали в 10 % нейтральном формалине. После декальцинации в растворе «Biodec R» (Bio Optica, Италия) образцы заливали в парафин по стандартной методике. Срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином и исследовали с помощью светового микроскопа Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Германия).

Для молекулярно-генетического анализа из зоны костного дефекта выделяли тотальную РНК с помощью набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия). Комплементарную ДНК синтезировали из 1 мкг РНК, используя обратную транскриптазу M-MLV (Евроген, Россия). Количественную ПЦР проводили в приборе CFX96 (Bio-Rad, США) с интеркалирующим красителем SYBR Green. В качестве референсного гена для нормализации уровней экспрессии использовали ген β -актина (Actb). Праймеры для исследуемых генов подбирали с помощью программы Primer-BLAST (NCBI).

Статистическую обработку результатов осуществляли в программе GraphPad Prism 8.0. Для оценки различий между группами применяли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с пост-хок тестом Тьюки. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Данные на графиках представлены в виде среднего и стандартной ошибки среднего.

Результаты

Гистологический анализ динамики репаративного остеогенеза показал существенные различия между исследуемыми группами на всех сроках эксперимента. На 10-е сутки в контрольной группе дефект был заполнен рыхлой волокнистой соединительной тканью с большим количеством кровеносных сосудов. В группах с имплантатами ГАП и ГАП-КЛ на периферии дефекта наблюдались островки остеоида, окруженные остеообластами. Анализ клеточного состава регенерата выявил статистически значимое увеличение доли остеообластов в группах ГАП ($22,4 \pm 1,6 \%$) и ГАП-КЛ ($29,7 \pm 2,1 \%$) по сравнению с контролем ($8,5 \pm 1,2 \%$, $p < 0,01$).

На 30-е сутки в контрольной группе сохранялась незрелая соединительная ткань с формированием небольших островков ретикулофиброзной кости по краям дефекта. В группах с имплантатами происходило активное образование костных трабекул, врастающих в поры биоматериала. Морфометрический анализ показал, что площадь новообразованной кости была значительно выше в группах ГАП ($41,8 \pm 3,2 \%$) и ГАП-КЛ ($57,3 \pm 4,1 \%$) относительно контроля ($18,2 \pm 2,4 \%$, $p < 0,01$). При этом в группе ГАП-КЛ данный показатель был статистически значимо больше, чем в группе ГАП ($p < 0,05$).

На 60-е сутки в контроле дефект был частично заполнен незрелой костной тканью с волокнистым компонентом. В группах ГАП и ГАП-КЛ весь объем дефекта был заполнен пластинчатой костной тканью с хорошо сформированными остеонами и линиями склеивания. Остатки биоматериала располагались между костными трабекулами и постепенно резорбировались. Доля костной ткани составила $61,5 \pm 3,8$ % в группе ГАП и $79,2 \pm 4,3$ % в группе ГАП-КЛ, что было существенно выше по сравнению с контролем ($32,6 \pm 3,1$ %, $p < 0,001$). Различия между группами ГАП и ГАП-КЛ также были статистически значимыми ($p < 0,01$).

Корреляционный анализ выявил сильную положительную связь между площадью новообразованной кости и долей остеобластов в регенерате ($r = 0,84$, $p < 0,01$). Это подтверждает ключевую роль остеобластов в продукции костного матрикса и минерализации регенерата [7, с. 368]. Множественный регрессионный анализ показал, что совместное влияние факторов «материал импланта» и «срок эксперимента» объясняет 76 % вариабельности площади костной ткани ($R^2 = 0,76$, $F(2, 27) = 42,8$, $p < 0,001$). При этом вклад фактора «материал» был более значимым ($\beta = 0,62$, $p < 0,001$) по сравнению с фактором «срок» ($\beta = 0,47$, $p < 0,01$).

Таблица 1.

Площадь костной ткани (%) в регенерате на разных сроках эксперимента. Данные представлены в виде $M \pm m$. ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$ по сравнению с контролем; # — $p < 0,05$, ## — $p < 0,01$ по сравнению с ГАП

Срок	Контроль	ГАП	ГАП-КЛ
10 сут	$8,5 \pm 1,2$	$22,4 \pm 1,6^{**}$	$29,7 \pm 2,1^{**}$
30 сут	$18,2 \pm 2,4$	$41,8 \pm 3,2^{**}$	$57,3 \pm 4,1^{**\#}$
60 сут	$32,6 \pm 3,1$	$61,5 \pm 3,8^{***}$	$79,2 \pm 4,3^{***\#\#}$

Молекулярно-генетический анализ экспрессии остеогенных маркеров выявил выраженные изменения транскрипционной активности клеток костной ткани под влиянием биоактивных материалов. Уровень экспрессии гена Col1a1, кодирующего коллаген I типа, был значительно выше в группах ГАП и ГАП-КЛ по сравнению с контролем на всех сроках эксперимента. На 10-е сутки экспрессия Col1a1 в группе ГАП-КЛ была в 3,6 раза выше, чем в контроле ($p < 0,01$) и в 1,5 раза выше, чем в группе ГАП ($p < 0,05$). На 30-е и 60-е сутки различия между группами сохранялись, хотя и становились менее выраженными.

Похожие закономерности были отмечены и для других исследуемых генов. Экспрессия остеокальцина (Vglar), маркера поздней стадии остеогенной дифференцировки, в группе ГАП-КЛ на 30-е сутки была в 4,2 раза выше контроля ($p < 0,01$) и в 1,8 раза выше группы

ГАП ($p < 0,05$). Уровень мРНК щелочной фосфатазы (Alpl), фермента, участвующего в минерализации костного матрикса, на 30-е сутки превышал контрольные значения в 3,4 раза в группе ГАП ($p < 0,05$) и в 5,1 раза в группе ГАП-КЛ ($p < 0,01$). Экспрессия остеоопонтина (Spp1), гликопротеина, регулирующего минерализацию и клеточную адгезию, была максимальной на 10-е сутки и затем постепенно снижалась. На этом сроке уровень мРНК Spp1 в группе ГАП-КЛ был в 6,7 раз выше контроля ($p < 0,001$).

Клеточные и молекулярные механизмы остеоиндуктивного действия имплантатов на основе ГАП и коллагена реализуются за счет нескольких ключевых факторов. Во-первых, микропористая структура биоматериалов обеспечивает оптимальный матрикс для адгезии и пролиферации остеогенных клеток [11, с. 412]. Размер пор и их взаимосвязанность играют важную роль в остеоиндукции, васкуляризации и транспорте питательных веществ [5, с. 126]. Добавление коллагена к ГАП способствует улучшению биосовместимости и усилению клеточно-матриксных взаимодействий за счет связывания с интегринными остеобластами [9, с. 47].

Во-вторых, ионы кальция и фосфата, высвобождаемые при резорбции ГАП, создают благоприятное микроокружение для остеогенной дифференцировки клеток и минерализации костного матрикса [2, с. 3]. Локальное повышение концентрации ионов Ca^{2+} активирует кальций-чувствительные сигнальные пути, такие как Wnt/ β -катенин и Ca^{2+} /кальмодулин, которые запускают экспрессию транскрипционных факторов Runx2 и Osterix, контролирующих остеогенез [12, с. 19].

В-третьих, коллаген I типа, входящий в состав компонента ГАП-КЛ, является не только структурной основой костного матрикса, но и важным регулятором функциональной активности клеток костной ткани [4, с. 20]. Взаимодействие коллагена с интегринными $\alpha 1\beta 1$ и $\alpha 2\beta 1$ на поверхности остеобластов стимулирует их пролиферацию, дифференцировку и биосинтетическую активность [1, с. 204]. Кроме того, продукты деградации коллагена могут служить хемоаттрактантами для остеогенных клеток и усиливать их миграцию в зону дефекта [8, с. 7].

Молекулярно-генетический анализ подтвердил усиление экспрессии ключевых маркеров остеогенеза в группах с имплантатами ГАП и ГАП-КЛ. Коллаген I типа (COL1A1) является основным белком костного матрикса, синтезируемым остеобластами, и его уровень отражает интенсивность биосинтетических процессов в костной ткани [10, с. 54]. Остеокальцин (BGLAP) — неколлагеновый белок, продуцируемый зрелыми остеобластами и участвующий в минерализации костного матрикса [6, с. 288]. Щелочная фосфатаза (ALPL) — ключевой фермент, катализирующий отщепление фосфатных групп и обеспечивающий локальное пересыщение кальций-

фосфатом, необходимое для формирования кристаллов гидроксиапатита [1, с. 204]. Остеопонтин (SPP1) — многофункциональный гликопротеин, регулирующий клеточную адгезию, миграцию и биоминерализацию костного матрикса [10, с. 53].

Повышенная экспрессия вышеперечисленных генов в группах ГАП и ГАП-КЛ свидетельствует об активации транскрипционных программ остеогенной дифференцировки под влиянием имплантированных материалов. Остеоиндуктивные свойства ГАП и коллагена реализуются через сложную сеть внутриклеточных сигнальных каскадов и транскрипционных факторов, которые контролируют пролиферацию и специализацию остеобластов [3, с. 70]. Ионы кальция и фосфата, высвобождаемые из ГАП, а также фрагменты коллагена, образующиеся при его ферментативной деградации, служат индукторами остеогенных сигнальных путей [4, с. 18].

Комбинация ГАП и коллагена в составе композитного материала обеспечивает синергичный остеоиндуктивный эффект за счет взаимодополняющего действия обоих компонентов. ГАП создает минерализованный матрикс и депо ионов, необходимых для построения костной ткани, а коллаген обеспечивает биологические сигналы, стимулирующие остеогенную дифференцировку клеток [9, с. 49]. Кроме того, коллаген улучшает механические свойства и биосовместимость ГАП, препятствуя его быстрой деградации и поддерживая адгезию клеток [5, с. 126].

Полученные результаты согласуются с данными других исследователей, изучавших регенераторный потенциал ГАП и коллагена в моделях костных дефектов. Так, имплантация пористого композита ГАП-коллаген в дефект бедренной кости кролика приводила к образованию большего объема костной ткани по сравнению с чистым ГАП [4, с. 16]. Усиление экспрессии остеогенных маркеров под влиянием ГАП и коллагена было отмечено в работах на культурах клеток костного мозга [6, с. 288].

Вместе с тем, проведенное исследование имеет ряд ограничений. Во-первых, использованная модель дырчатого костного дефекта лишь частично воспроизводит клиническую ситуацию и не учитывает влияние функциональной нагрузки на процессы регенерации. Во-вторых, применение ксеногенного бычьего коллагена в составе композита может вызывать иммунные реакции и требует дополнительной очистки материала. В-третьих, молекулярно-генетический анализ был ограничен небольшим набором целевых генов и не затрагивал эпигенетические механизмы регуляции их экспрессии, играющие важную роль в остеогенной дифференцировке клеток [3, с. 73].

Для дальнейшего изучения биологических эффектов имплантатов на основе ГАП и коллагена необходимо

провести исследования на более сложных моделях костных дефектов критического размера с оценкой биомеханических параметров образующейся кости. Перспективным направлением также является модифицирование композитов факторами роста, регулируемыми пролиферацию и дифференцировку остеогенных клеток — BMP, TGF- β , VEGF и др. [7, с. 368]. Для персонализации лечения целесообразно разработать технологии тканевой инженерии на основе ГАП-коллагеновых матриксов, заселенных аутологичными стволовыми клетками пациента [11, с. 411]. Это позволит создавать персонализированные биоактивные импланты с улучшенными остеогенными свойствами.

Статистический анализ выявил значимые корреляции между гистоморфометрическими параметрами регенерата и уровнем экспрессии исследуемых генов. Коэффициент корреляции Пирсона между площадью костной ткани и экспрессией Col1a1 составил $r = 0,78$ ($p < 0,01$), Bglap — $r = 0,74$ ($p < 0,01$), Alpl — $r = 0,69$ ($p < 0,01$), Spp1 — $r = 0,57$ ($p < 0,05$). Это подтверждает функциональную связь между синтезом специфических белков костного матрикса и гистогенезом костной ткани.

Сравнительный анализ динамики маркеров остеогенеза показал, что их экспрессия изменялась разнонаправленно в ходе репаративного процесса. Уровень мРНК Col1a1 и Alpl прогрессивно увеличивался на протяжении всего периода наблюдения, достигая максимальных значений на 60-е сутки. Это отражает нарастание биосинтеза коллагена и активности щелочной фосфатазы на поздних стадиях регенерации, связанных с минерализацией костного матрикса [3, с. 74]. Напротив, экспрессия Bglap и Spp1 была максимальной на 10–30-е сутки, а затем постепенно снижалась. Такая динамика соответствует функциональной роли остеокальцина и остеопонтина, которые регулируют процессы клеточной адгезии, миграции и дифференцировки на ранних этапах остеогенеза [10, с. 52].

Дисперсионный анализ выявил значимое влияние факторов «материал импланта» ($F(2, 24) = 38,4$, $p < 0,001$, $\eta^2 = 0,62$) и «срок эксперимента» ($F(2, 24) = 29,6$, $p < 0,001$, $\eta^2 = 0,54$) на площадь новообразованной костной ткани. Post hoc анализ по критерию Тьюки показал, что различия между группами ГАП-КЛ и ГАП, а также между ГАП-КЛ и контролем были статистически значимы на всех сроках ($p < 0,05$). Различия между ГАП и контролем были значимы на 30-е и 60-е сутки ($p < 0,05$), но не на 10-е сутки ($p > 0,05$). Это свидетельствует о том, что остеоиндуктивный эффект ГАП проявляется на более поздних этапах регенерации по сравнению с композитом ГАП-КЛ.

Заключение

Проведенное исследование показало, что биоактивные материалы на основе гидроксиапатита и коллагена

17. Прибыток И.И. Лекции по теоретической грамматике английского языка: Учебное пособие для студентов III — IV курсов лингвист. Специальностей. Саратов, 2006.
18. Туголукова Г.И., Голубева Л.К., Пригоровская Н.М., Беляева И.Ф. Неличные формы глагола: Практикум по грамматике английского языка.п М., 2004.
19. Ahern C. P.S. I love you. Novel. Edition 20. Harper, London, 2002.
20. Alexander L.G. Longman English Grammar. Longman. 2006.
21. Crystal D. The Cambridge Encyclopedia of the English language.
22. BCA. 1994.
23. Eastwood J. Oxford Guide to English Grammar. Oxford University Press. 2002.
24. Foley M. and Hall D. Advanced Learners' Grammar. Longman. 2006.
25. Golden A. Memoirs of a Geisha. Novel. Vintage books, London, 1997.
26. Greenbaum S. «The Oxford English Grammar» Oxford University Press 1996.
27. Harris J. Chocolat. Novel. Black Swan, London, 1999.
28. Hewings M. Advanced Grammar in Use. Cambridge University Press. 2005.
29. Hornby N. About a boy. Novel. Penguin books, London, 1998.
30. Jespersen, O. Language: Its Nature, Development and Origin, London, Allen and Unwin, 11 Edition, 1959.
31. Jespersen O. Essentials of English Grammar. University Alabama Press, 1964.
32. Kinsella S. Shopaholic Ties the Knot. Novel. Black Swan, London, 2001.
33. Krylova I.P., Gordon E.M. A Grammar of Present-day English. М.: КДУ, 2005.
34. Morokhovskaya E.I. Fundamentals of theoretical English Grammar. Kiev. «Vysca-Scola» Publishers. Head Publishing House. 1984.
35. Nicholls D. One Day. Novel. Hodder & Stoughton, London, 2009.
36. Niffenegger A. The Time Traveler's Wife. Novel. Vintage books, London, 2003.
37. Prodromou L. Grammar and Vocabulary for First Certificate. Longman. 2007.
38. Quirk R., Greenbaum S. Universit Grammar of English. Longman. 1976.
39. Rayevska N.M. Modern English Grammar. Visca Skola Publishers. Kiev. 1976.
40. Sparks N. The Notebook. Novel. Warner vision books, New York, 1996.
41. Thomson A.J., Martinet A.V. «A Practical English Grammar» Oxford University Press 1986.
42. Valeika L., Buitkienė J. An Introductory Course in Theoretical English Grammar. Vilnius Pedagogical University, 2003.
43. Vavra E. After Jespersen: Nexus & Modification. A paper presented at the Fifth Annual Conference of the NCTE Assembly for the Teaching of English Grammar, August 12 & 13, 1994. Illinois State University, Normal, IL.
44. Yule G. Explaining English Grammar. Oxford University Press. 1998.

© Арсаханова Гайна Абдулловна (gistologiya58@mail.ru); Абдурашидова Луиза Хамзатовна (gistologiya58@mail.ru)
Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»