

## ИССЛЕДОВАНИЕ КОЛЛАГЕНА I ТИПА МЕТОДОМ ИММУНОБЛОТТИНГА В ОБРАЗЦАХ КОСТНОПЛАСТИЧЕСКИХ БИОМАТЕРИАЛОВ

Т.Н. Медведева\*, Л.Т. Волова, Л.Н. Кулагина

Самарский государственный медицинский университет, Научно-исследовательский институт биотехнологий, 443079, Самара, ул. Чапаевская, 89; \*e-mail: tatjana.medv@rambler.ru

С помощью иммуноблоттинга исследовали коллаген I типа в образцах двух видов костнопластических материалов, производимых в Научно-исследовательском институте биотехнологий Самарского государственного медицинского университета. В работе использовали деминерализованные образцы: порошок компактной кости и измельченный материал губчатой костной ткани человека. Коллаген и его полипептиды разделяли в 5 полиакриламидном геле с 3.6 М мочевиной по методу Hayashi, Nagai (1979). Преимуществом метода является разделение в этих условиях коллагена I и III типа, а также цепочек  $\alpha 1(I)$  и  $\alpha 2(I)$  коллагена I типа. Иммуноблоттинг осуществляли диффузионным способом по методу Towbin и соавт. (1979) с использованием нитроцеллюлозных мембран. Установлено, что основная масса белка компактной кости локализована между  $\alpha 1$ - и  $\alpha 2$ - фракциями коллагена. В образцах губчатой костной ткани отмечена молекулярная редукция белка. Выявлены макромолекулы белка с постепенно уменьшающейся молекулярной массой и низкомолекулярные полипептиды, мигрирующие в геле широким фронтом вплоть до линии индикатора. В силу низкой специфичности интегринов остеобластов регенерирующей костной ткани полипептиды коллагена, а также сохраняющиеся в имплантатах молекулы белка, могут проявлять себя в качестве индукторов синтетических процессов, протекающих в ядрах остеобластов. В таком случае полипептиды коллагена можно рассматривать как сигнальные молекулы, запускающие каскады ферментативных реакций и внутриклеточные сигнальные пути.

**Ключевые слова:** компактная и губчатая костная ткань; коллаген I типа; иммуноблоттинг

**DOI:** 10.18097/BMCRM00189

## ВВЕДЕНИЕ

Костнопластические материалы успешно используются в медицинской практике для заполнения дефектов в костной ткани с целью активации репарационных процессов и ускорения восстановления структуры и функции кости. Деминерализованные костные имплантаты способствуют образованию кости путем остеоиндукции. Последняя представляет собой процесс, посредством которого трансплантированная ткань побуждает мезенхимальные клетки реципиента дифференцироваться в клетки остеобластов [1, 2]. Если морфологическая картина регенерации кости описана и вполне понятна, то внутренние механизмы постимплантационного остеогенеза остаются до настоящего времени недостаточно изученными. В связи с этим наряду с иммуногистохимическими важным значение приобретают биохимические и молекулярно-генетические методы исследования как костной ткани, так и интегрированных в нее костнопластических материалов. Так, в ранних работах специалистами Гарвардской школы дентальной медицины на крысах-самцах линии Sprague-Dawley была разработана экспериментальная модель, позволявшая исследовать молекулярно-биологические события на границе контакта ткань-имплантат. Титановые миниимплантаты (2 мм в длину и 1 мм в диаметре) были помещены в просверленные отверстия в альвеолярной кости или вблизи корней первого верхнечелюстного коренного зуба. Фазы регенерации исследовали гистологически через 28 дней и 56 дней после оперативного вмешательства. В первой группе животных начальная остеоинтеграция была

отмечена через 28 дней, зрелая – через 56 дней. Во второй группе животных вокруг имплантатов, размещенных вблизи корней зуба, развивался фиброз. Изучали экспрессию коллагена XII типа, молекулярного маркера, специфичного для зрелой связки периодонта, *in situ* с помощью метода молекулярной гибридизации. Анализ синтезируемой мРНК позволил выявить отсутствие экспрессии коллагена XII типа на поверхности имплантата, в то время как зона экспрессии белка была обнаружена в поверхностных слоях костной ткани. Приведенные результаты свидетельствовали о значительных молекулярных изменениях в области контакта ткань - имплантат [3].

Коллаген является одним из важнейших белков соединительной ткани, обеспечивающих ее характерные биохимические свойства и осуществление связанных с этими свойствами специфических функций. Формирование костной ткани, ее структура, целостность, проявление функциональных свойств в значительной степени зависят от ее главного белкового компонента – коллагена I типа. Актуальными остаются исследования синтеза белка, его посттрансляционной модификации, укладки и сшивок, связи с дифференцировкой остеобластов [4]. Коллаген служит в качестве резервуара, депо морфогенетических белков костной ткани (ВМР) – мультифункциональных цитокинов семейства трансформирующих факторов роста [5].

В связи с использованием в практическом здравоохранении костнопластических материалов, производимых в Научно-исследовательском институте биотехнологий Самарского государственного медицинского университета, представлялось важным дать оценку



состояния сохраняющегося в них белка с помощью современных методов исследования. Существенную долю производимых материалов составляет деминерализованный костный матрикс, который получают из губчатой и компактной костной ткани человека. Один из рабочих этапов предусматривает обработку материала в растворах соляной кислоты слабой концентрации. Стерилизацию проводят с помощью  $\gamma$ -лучей [6].

Целью настоящей работы было исследование методом иммуноблоттинга коллагена I типа в биологических образцах костнопластических материалов, производимых в Научно-исследовательском институте биотехнологий (НИИ Биотех), и обсуждение возможного участия белка в механизмах регенерации костной ткани при остеопластике.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали образцы лиофилизированных деминерализованных костнопластических материалов (регистрационное удостоверение № ФСР 2010/08120 от 24 июня 2010 года Срок действия не ограничен. Приложение к Регистрационному удостоверению на медицинское изделие от 14 марта 2012 года № ФСР 2012/12546, «НИИ Биотех», Россия) – порошок компактной кости и губчатую костную ткань, которую предварительно тщательно измельчали.

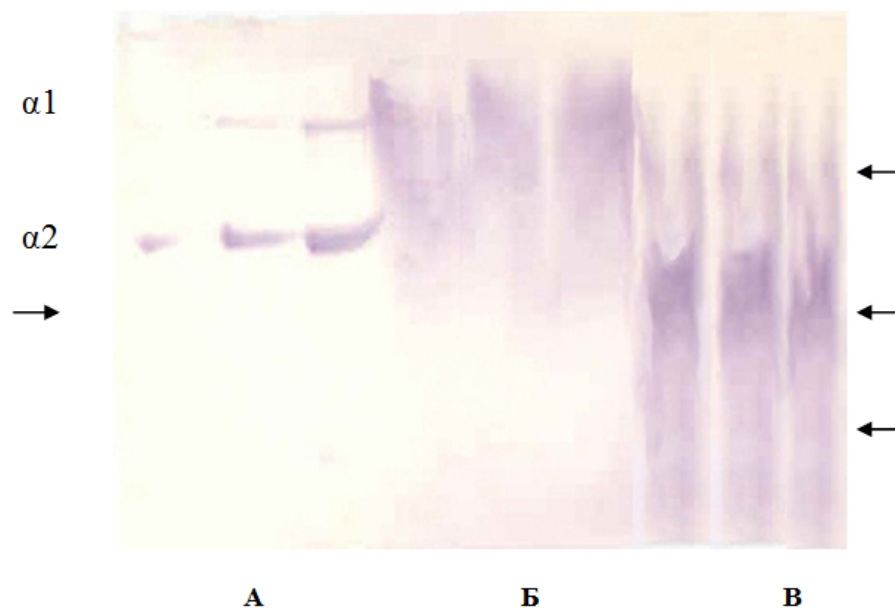
Электрофорез белков проводили в 5% (масса/объем) полиакриламидном геле (ПААГ) с додецилсульфатом натрия (ДДС) по методу Hayashi, Nagai [7]. Использовали стандартную камеру производства «Хеликон» (Россия) с размерами стекол 20×20 см. Электродный буфер содержал 324 г мочевины, 43.2 г глицина, 9 г триса и 1.5 г ДДС в 1500 мл раствора. ПААГ включал 3.6 М мочевины. Для солюбилизации белков исследуемого образца применяли 0.5 М трис-НСl буфер (рН 6.8), который включал 50% (объем/объем) глицерин, 4 М мочевины, 1% (масса/объем) ДДС, 0.5% (объем/объем)  $\beta$ -меркаптоэтанол. В качестве стандарта сравнения использовали коллаген I+III типа из кожи теленка (0.5 мг/мл) («Имтек», Россия), приобретенный для исследовательской работы с образцами костной ткани и кожи. Белки, ассоциированные с костнопластическими материалами, солюбилизировали в указанном буферном растворе в соотношении 50 мкг в 200-300 мкл. Перед нанесением на гель образцы выдерживали на кипящей водяной бане: коллаген I+III типа – 1 мин, опытные образцы – 5 мин. К каждому образцу добавляли каплю индикатора 0.05% (масса/объем) раствора бромфенолового синего. На дорожки наносили по 10 мкл, 15 мкл и 20 мкл раствора коллагена и по 25-50 мкл раствора исследуемых белков. Электрофорез проводили в два этапа. Первый в течение 1.5 ч при силе тока 1 мА на дорожку и напряжении 80 В. Второй – 3.5 ч при силе тока 3 мА и напряжении 120 В. По окончании электрофореза один гель окрашивали на белок в растворе 7% (объем/объем) уксусной кислоты, 10% (объем/объем) этилового спирта, 0.05% (масса/объем) Кумасси G-250 в течение ночи и в последующем отмывали в водном растворе 7.5% (объем/объем) уксусной кислоты, 5% (объем/объем) этилового спирта. Второй гель использовали для иммуноблоттинга, который осуществляли по методу Towbin и соавт. [8]. Для этой цели вырезали средний участок геля, в котором происходит разделение молекул коллагена, размером 5×10 см. Гель выдерживали 5-10 мин в буфере для переноса белка на

нитроцеллюлозную мембрану (25 мМ трис, 192 мМ глицин, 0.02% (масса/объем) ДДС, 20% (объем/объем) этиловый спирт, рН 8.3). За 30 мин до окончания электрофореза в этот же раствор помещали нитроцеллюлозную мембрану («Santa Cruz», США) с размером пор 0.45 мкм, фильтровальную бумагу и Super Thick Blot Paper («Sigma»). Блоттинг осуществляли посредством диффузии под грузом в течение ночи. На следующий день мембрану отделяли от фильтровальной бумаги и геля и инкубировали 1 ч при 4°С в блокирующем буфере: 5% (масса/объем) обезжиренное сухое молоко («Biorad», США) в 50 мМ трис-НСl буфере (рН 7.5), 200 мМ NaCl, 0.1% (объем/объем) Tween 20. В буферный раствор вносили первичные козы поликлональные антитела к денатурированному коллагену («Millipore», США) в разведении 1: 500. Инкубацию продолжали при 4°С 18-19 ч. После промывки мембрану инкубировали 2 ч при комнатной температуре в буфере с молоком, содержащем вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой (мышинные против козы) («Sigma») в разведении 1:80000. Затем мембрану отмывали от буферного раствора с антителами согласно стандартной схеме. Белковые полосы выявляли с помощью субстрата для проявления активности пероксидазы тетраметилбензидина преципитирующего для блоттов. Эксперименты для выявления молекул коллагена на мембране проводили свыше трех раз.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Существенным преимуществом применяемой в работе системы электрофоретического анализа белков является возможность разделения коллагена I и III типа, а также коллагена I типа в виде двух цепочек:  $\alpha 1(I)$  и  $\alpha 2(I)$  [7]. Известно, что  $\alpha 2(I)$ -цепь коллагена из кожи теленка, содержащая 1029 аминокислотных остатков (а.о.), является более короткой за счет неспирализованных концевых участков молекулы, а  $\alpha 1(I)$ -цепь, состоящая из 1055 а.о., на N-конце содержит 16 а.о. и на C-конце 25 а.о. В нашей работе доступность коллагена для исследовательских целей обеспечивалась предварительным удалением значительной части минеральных соединений из костной ткани. Однако следует обратить внимание на то, что подобная обработка, а также стерилизация материала  $\gamma$ -лучами приводят к денатурации белка, нарушению его конформации и, возможно, высвобождению части а.о.

Для коллагена I типа из кожи теленка, использованного в нашей работе в качестве стандарта сравнения, характерно четкое разделение  $\alpha 1(I)$  и  $\alpha 2(I)$  белковых полос в 5%-ном полиакриламидном геле (рис. 1). Основная масса белка, выделенного из порошка компактной кости, локализована между фракциями  $\alpha 1$ - и  $\alpha 2$ - коллагена I типа. Интенсивно окрашена верхняя часть выявляемой области, что свидетельствует о преобладании фракции  $\alpha 1$  в коллагене I типа компактной кости. Можно сказать, что процесс получения имплантата в этом случае сопровождается незначительной редукцией молекулярной формы белка. Мы полагаем, что определенная часть коллагена компактной кости может сохранять свойства исходного белка, в то же время значительная его доля претерпевает изменения в экспериментальных условиях. Под денатурированным коллагеном в данном случае понимается размытость фракций, изменение их подвижности и одновременное появление полипептидов, мигрирующих в геле со скоростью, большей



**Рисунок 1.** Иммуноблоттинг коллагена I типа (белка и полипептидов), выделенного из костно-пластических материалов. Электрофорез образцов в 5% ПААГ (Hayashi, Nagai; 1979). **А** – коллаген I типа из кожи телянка; **Б** – белки компактной кости; **В** – белки губчатой костной ткани. Выявляемые в геле полипептиды показаны стрелками. Нанесения: **А** – 10, 15 и 20 мкл (5, 7.5 и 10 мкг белка); **Б** и **В** – 25 (1), 50 (2) и 25 (3) мкл. Образцы первых двух треков обоих опытных образцов перед нанесением на гель выдерживали 5 мин при комнатной температуре, затем, также 5 мин, на кипящей водяной бане. На третью дорожку наносили белки, которые подвергали только термической обработке.

таковой у  $\alpha 1$ - и  $\alpha 2$ -цепочек коллагена I типа, и сохраняющих при этом способность реагировать с антителами. Наиболее вероятным нам представляется отщепление части молекулы белка в области N- и C-терминальных участков. в условиях обработки биологического материала Свидетельством этого является постепенно уменьшающаяся масса выявляемых молекул, а также появление фракций, мигрирующих в геле с большей скоростью, чем это характерно для  $\alpha 2$ -цепи коллагена I типа.

Иная картина наблюдается для коллагена, выделенного из губчатой костной ткани. Отмечается наличие серии полипептидов (показаны на рис. 1 стрелками как для белка компактной кости, так и для полипептидов губчатой кости). Один из них занимает промежуточное положение между  $\alpha 1(I)$ - и  $\alpha 2(I)$ -цепями коллагена. Выявляются интенсивно окрашенная полоса с подвижностью, меньшей таковой  $\alpha 2(I)$ , а также еще несколько полос с постепенно уменьшающейся молекулярной массой, мигрирующих в геле практически единым размытым фронтом до конца дорожки. Следует отметить, что редукция молекулярных форм коллагена в этом случае не сопровождается утратой антигенных свойств белка – реакция наблюдается как для денатурированного коллагена, так и для выявляемых полипептидов.

Молекула коллагена I типа состоит из трех полипептидных цепей, переплетенных в виде палочковидной спирали, и включает C- (карбоксии) и N- (амино) концевые участки. Полипептидную цепь коллагена можно представить как последовательность повторяющихся триплетов Gly-X-Y, где X и Y могут быть любыми а.о., но чаще в положении X стоит остаток пролина или аланина, а в положении Y – гидроксипролина или гидроксизина. Коллаген содержит 33% глицина, около 11% аланина и примерно четверть пролина или гидроксипролина. Глицин обеспечивает прочность укладки трех полипептидных цепей, так как эта аминокислота не имеет боковой группы

и находится внутри тройной спирали. Аминокислотный остаток пролина вызывает изгибы полипептидной цепи.

В связи с высокой степенью упорядоченности организации молекулярной формы коллагена, фактической повторяемостью его субъединиц, логично предположить наличие однотипных маркеров антител на поверхности как исходной молекулы белка, так и на поверхности его редуцированных форм, что мы и наблюдаем при иммуноблоттинге. Таким образом, полипептиды коллагена сохраняют антигенные детерминанты, присущие исходному белку.

Известно, что катепсин К, экспрессируемый остеокластами или остеоцитами, разрушает коллаген I типа и образует фрагменты, такие как N- и C-телопептиды, которые могут быть определены количественно с помощью ИФА [9]. Исследование природы выявляемых полипептидов и их количественная оценка в задачи настоящей работы не входили. Впервые техника получения денатурированного коллагена II типа из хрящевой ткани человека и быка была описана канадскими специалистами из хирургического отделения университета в Монреале [10]. В работе описаны способы анализа разрушения коллагена II типа с применением поликлональной антисыворотки, специфично реагирующей с нерасплетенными  $\alpha$ -цепями и пептидами, происходящими из коллагенов типа II человека и быка под воздействием бромистого циана. Получаемые антитела специфично реагируют с фрагментированным и денатурированным коллагеном II типа и не реагируют с нативным спирализованным белком. Авторы [10] использовали два вида камер: 16×18 см (10% ПААГ) для разделения пептидов и 7×8 см (7.5% ПААГ) для исследования гетерогенности белка. В последующие годы поликлональные антитела, которые специфически реагировали с размотанными  $\alpha$ -цепями и производными CNBr-пептидами человеческого коллагена II типа,

применяли для выявления деградации волокон коллагена II типа в суставном хряще.

Перегруженность дорожек белком позволяла выявить минорные компоненты, сохраняющиеся в имплантате после химической обработки и применения физических факторов, которые могли оставаться скрытыми в варианте оптимального нанесения белка.

Выполненная работа является частью комплексной программы Научно-исследовательского института биотехнологий Самарского государственного медицинского университета по изучению микроструктуры, химического состава, физических характеристик получаемых из костной ткани пластических материалов (в основном аллоимплантатов) с целью изучения их остеоиндуктивных свойств и более эффективного применения в регенеративной медицине. В контексте этой программы получены результаты экспериментальных исследований образцов донорской костной ткани крысы, кролика и человека с различной степенью минерализации, выполненных с помощью метода комбинационного рассеяния (КР). Получены спектры КР для полос комбинационного рассеяния  $950-962\text{ см}^{-1}$  ( $\text{PO}_4^{3-}$ ),  $1065-1070\text{ см}^{-1}$  ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) и  $1665\text{ см}^{-1}$  (амид I). В деминерализованной костной ткани наблюдается резкий (до 98%) спад интенсивностей пиков  $950-962$  и  $1065-1070\text{ см}^{-1}$ , который сопровождается появлением полосы  $1079-1090\text{ см}^{-1}$ , соответствующей гидратированному состоянию  $\text{CO}_3^{2-}$  [11]. Также получены спектры КР для образцов кортикальной и губчатой костных тканей человека в зависимости от степени деминерализации. Исследована зависимость соотношения интенсивностей пиков КР  $950-962$  ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) и  $1665\text{ см}^{-1}$  (амид I) от времени деминерализации, которая характеризует ее степень [12].

Для реализации персонализированного подхода в лечении пациентов с различными костными дефектами необходимо учитывать и воссоздавать их индивидуальные особенности. Проведены доклинические испытания персонализированных костных имплантатов с применением культур клеток человека при использовании различных технологий обработки первичного материала [13]. Экспериментально показано, что метод конфокальной флуоресцентной микроскопии обеспечивает динамический контроль процесса интеграции различных типов клеток в костный имплантат с разрешением не хуже  $400\text{ нм}$ . Предложена оптическая методика оценки качества костных имплантатов и технологии их изготовления. Данный метод позволит проводить дооперационное тестирование и контроль различных имплантатов с прогнозированием их качества [14].

Внедренная в производство биоимплантатов технология обеспечивает сохранение полного комплекса биологически активных компонентов используемых тканей. Микроструктурные и биохимические свойства трансплантата анализировали с помощью сканирующей электронной микроскопии, микрокомпьютерной томографии, рамановской спектроскопии и протеомного анализа. Свойство клеточной адгезии трансплантата оценивали с использованием клеточных культур и флуоресцентной микроскопии. Микроструктурный анализ выявил иерархическую пористую структуру трансплантата с полным удалением клеточного дебриса и компонентов костного мозга. Протеомный анализ подтвердил сохранение коллагена и внеклеточных белков, стимулирующих и

ингибирующих клеточную адгезию, пролиферацию и дифференцировку. Спектроскопия комбинационного рассеяния позволила установить, что коллаген является основным белковым компонентом костной ткани и образует фибриллярный каркас костного матрикса. Аминокислотная последовательность коллагена особенно богата пролином, около половины которого гидроксиглицируется во время распада коллагена с образованием гидроксипролина. Протеомный анализ деминерализованной губчатой ткани человека показал наличие коллагена и белков внеклеточного матрикса. Выявлены пять основных типов коллагена (I, IV, VI, XII, XIV), фибронектин, витронектин, остеоопонтин, матричный Gla-белок, трансформирующий фактор роста  $\text{TGF-}\beta 1$ , мимекан, костный сиалопротеин 2 и ряд других белков в органическом матриксе спонгиозы человека. Примечательна способность этих белков стимулировать и ингибировать клеточную адгезию, пролиферацию и дифференцировку [15].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные возможности лечения дегенеративной патологии костной и хрящевой ткани направлены на усиление регенерации посттравматических и послеоперационных дефектов с использованием различных биологических или синтетических препаратов. Аллогенные продукты включают в себя идентичные структурные и биологические компоненты и обеспечивают оптимальные условия для генетически запрограммированной физиологической регенерации в организме человека. Исследование химического состава костнопластических материалов проводится с целью изучения их остеоиндуктивных свойств, лежащих в основе процессов регенерации [15]. Применение в экспериментальных условиях клеточных технологий определяет направление современного поиска: взаимодействие компонентов биологических материалов с клетками костной ткани, изучение соединений, обладающих активирующими и ингибирующими свойствами, оптимизация процессов регенерации при использовании культур клеток.

Результаты проведенных экспериментальных исследований в совокупности с данными литературы позволяют сделать следующее заключение. На этапе получения образцов костнопластических материалов белок коллаген I типа, составляющий более 90% органического матрикса костной ткани, претерпевает ряд изменений, которые рассматриваются нами как благоприятные для инициации процессов восстановления кости в области дефекта. В образцах компактной кости значительная часть белка локализована между фракциями  $\alpha 1(\text{I})$ - и  $\alpha 2(\text{I})$ - коллагена. Обнаружены также молекулярные формы, мигрирующие в геле с большей скоростью, чем это характерно для цепи  $\alpha 2(\text{I})$ . В образцах, полученных из губчатой костной ткани, между цепями  $\alpha 1$ - и  $\alpha 2$ - коллагена I типа обнаружена единичная фракция. Выявлена также серия полос с постепенно уменьшающейся молекулярной массой вплоть до низкомолекулярных полипептидов. В целом это свидетельствует о более выраженной редукции молекулярных форм коллагена в биологических материалах, которые получают из губчатой костной ткани.

В свете вышеизложенного можно предположить следующий механизм взаимодействия имплантатов,

производимых в Научно-исследовательском институте биотехнологий Самарского государственного медицинского университета, с костной тканью. Область размещения костнопластических материалов рассматривается нами как ареал насыщения природным и денатурированным коллагеном, продуктами костной резорбции, низкомолекулярными полипептидами, которые могут проявлять себя в качестве неспецифических лигандов к рецепторам остеобластов кости. В отличие от рецепторов гормонов, обладающих высоким сродством к собственным лигандам и присутствующих в тканях в небольшом количестве, интегрин связывают свои лиганды с низким сродством и встречаются в большой концентрации. Это означает, что они могут слабо связываться с различными, но сходными молекулами матрикса [16]. Костные имплантаты, таким образом, могут служить источником биологически активных соединений, важных для ранней остеоинтеграции. В силу низкой специфичности интегринов остеобластов полипептиды коллагена, а также сохраняющиеся в имплантатах макромолекулы белка могут проявлять себя в качестве индукторов синтетических процессов в ядрах остеобластов, а также обеспечивать трансформацию остеопрогениторных клеток. Продукты фрагментации белка в имплантате в таком случае могут проявлять себя как сигнальные молекулы, запускающие каскады ферментативных реакций и внутриклеточные сигнальные пути. Представленные в статье результаты дополняют разрабатываемую общую модель взаимодействия соединений биологических материалов с клетками кости при остеопластике и могут служить объяснением эффективности применения костнопластических биологических материалов в процессах регенерации костной ткани. Возможно, что в будущем, изучая протекающие в костной ткани процессы, мы сможем выявить что-то подобное сопряженному сочетанию разных уровней наблюдаемых явлений. Такие представления могут привести к реализации новых научных идей.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не связана с исследованиями, в которых в качестве объекта выступают люди или животные. Использование биологического материала осуществлялось в соответствии с методическими рекомендациями и на основании предусмотренных документов.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена без привлечения внешнего финансирования.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Glowacki, J., Mulliken, J.B. (1985) Demineralized bone implants. Clin. Plast. Surg., **12**(2), 233-241.
2. Goldberg, V.M., Stevenson, S. (1993) The biology of bone grafts. Semin. Arthroplasty, **4**(2), 58-63.
3. Karimbux, N.Y., Shirakian, A., Weber, H.P., Nishimura, I. (1995) A new animal model for molecular biological analysis of the implant-tissue interface: spatial expression of type XII collagen mRNA around a titanium oral implant. J. Oral Implantol., **21**(2), 107-113.
4. Forlino, A., Marini, J.C. (2016) Osteogenesis imperfecta. Lancet, **387**(10028), 1657-1671. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)00728-X
5. Suzawa, M., Tamura, Y., Fukumoto, S., Miyazono, K., Fujita, T., Kato, S., Takeuchi, Y. (2002) Stimulation of Smad1 transcriptional activity by Ras-extracellular signal-regulated kinase pathway: a possible mechanism for collagen-dependent osteoblastic differentiation. J. Bone Miner. Res., **17**(2), 240-248. DOI: 10.1359/jbmr.2002.17.2.240
6. Volova, L.T., Krivoshechekov, E.P., Grigoriev, S.G., Krupyshev, I.A., Trunin, D.A. (1987) Procurement and preservation of biological tissues and their use in practical public health. Guidelines, KPO "ZIM", Kuibyshev, 19 p.
7. Hayashi, T., Nagai, Y. (1979) Separation of the  $\alpha$  chains of Type I and III collagens by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biochem., **86**(2), 453-459.
8. owbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979) Electroforetic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Biochemistry, **76**(9), 4350-4354.
9. Dodge, G.R., Poole, A.R. (1989) Immunohistochemical detection and immunochemical analysis of type II collagen degradation in human normal, rheumatoid and osteoarthritic articular cartilages and in explants of bovine articular cartilage cultured with interleukin 1. J. Clin. Invest., **83**, 647-661.
10. Jansen, I.D.C., Papapoulos, S.E., Bravenboer, N., de Vries, T.J., Appelman-Dijkstra, N.M. (2021) Increased bone resorption during lactation in pycnodysostosis. Int. J. Mol. Sci., **22**(4), 18. DOI: 10.3390/ijms22041810
11. Timchenko, E.V., Timchenko, P.E., Volova, L.T., Ponomareva, Yu.V., Taskina, L.A. (2014) Raman scattering study of the organomineral structure of bone implants. Quantum Electronics, **44**(7), 696-699.
12. Timchenko, E.V., Timchenko, P.E., Volova, L.T., Milyakova, M.N., Maksimenko, N.A., Taskina, L.A. (2015) Application of the Raman spectroscopy method to assess the demineralization of bone grafts during their preparation. Optical Journal, **82**(3), 30-36.
13. Kolsanov, A.V., Volova, L.T., Trunin, D.A., Popov, N.V., Ponomareva, Yu.V. (2017) Conducting preclinical trials of personalized bone implants using human cell cultures. Postgraduate Physician, **85**(6.3), 367-377.
14. Timchenko, P.E., Zakharov, V.P., Volova, L.T., Boltovskaya, V.V., Timchenko, E.V. (2011) Microscopic control of the implant osseointegration process. Computer Optics, **35**(2), 183-188.
15. Tsiklin, I.L., Pugachev, E.I., Kolsanov, A.V., Timchenko, E.V., Boltovskaya, V.V., Timchenko, P.E., Volova, L.T. (2022) Biopolymer material from human spongiosa for regenerative medicine application. Polymers, **14**(5), 941. DOI: 10.3390/polym14050941.
16. Fuller, G.M., Shields, D. (1998) Molecular Basis of Medical Cell Biology. First Edition. Appleton and Lange. Stamford, Connecticut.

Поступила: 14.03.2022  
 После доработки: 11.04.2023  
 Принята к публикации: 20.04.2023

## THE STUDY OF TYPE I COLLAGEN BY IMMUNOBLOTTING IN SAMPLES OF BONE-PLASTIC BIOMATERIALS

*T.N. Medvedeva\*, L.T. Volova, L.N. Kulagina*

Samara State Medical University, Biotech Research Institute, 89 Chapaevskaya str., Samara, 443079 Russia;

\*e-mail: [tatjana.medv@rambler.ru](mailto:tatjana.medv@rambler.ru)

The type I collagen was studied in samples of two types of osteoplastic materials produced in the Biotech Research Institute of the Samara State Medical University using immunoblotting. The demineralized samples used in the work were compact bone powder and crushed material of human cancellous bone tissue. Collagen and its polypeptides were separated in a 5% polyacrylamide gel with 3.6 M urea according to the method of Hayashi and Nagai (1979). The advantage of the method is the separation under these conditions of type I and III collagen, as well as the  $\alpha 1(I)$  and  $\alpha 2(I)$  chains of type I collagen. Immunoblotting was carried out by diffusion method according to the method of Towbin et al. (1979) using nitrocellulose membranes (Santa Cruz, USA). Primary goat polyclonal antibodies to denatured collagen, 1:500 dilution (Millipore) were used. Peroxidase-conjugated secondary antibodies (mouse vs. goat), 1:80000 dilution (Sigma) were used also. It has been established that the bulk of the compact bone protein is localized between the  $\alpha 1$ - and  $\alpha 2$ -fractions of collagen. In samples of cancellous bone tissue, a molecular reduction of the protein is noted. Protein macromolecules with a gradually decreasing molecular weight and low molecular weight polypeptides migrating in the gel with a wide front up to the indicator line are detected. Due to the low specificity of osteoblast integrins in regenerating bone tissue, collagen polypeptides, as well as protein molecules retained in implants, can act as inducers of synthetic processes occurring in osteoblast nuclei. Protein fragmentation products in the implant can act as signaling molecules that trigger cascades of enzymatic reactions and intracellular signaling pathways.

**Key words:** compact and spongy bone; type I collagen; immunoblotting

### FUNDING

No additional funding.

Received: 14.03.2022, revised: 11.04.2023, accepted: 20.04.2023