



ЭТИОЛОГИЯ И ПАТОГЕНЕЗ ИДИОПАТИЧЕСКОГО СКОЛИОЗА

А.М. Зайдман¹, А.В. Корель¹, В.И. Рыкова², Э.В. Григорьева³, Т.Ю. Ещенко³, Т.Н. Садовая¹

¹Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии

²Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

³Новосибирский НИИ молекулярной биологии и биофизики СО РАН

Цель исследования. Изучение этиологических факторов и патогенетических механизмов развития сколиотической болезни.

Материал и методы. Исследованы пластинки роста (ПР) тел позвонков выпуклой и вогнутой сторон деформации, межпозвонковые диски (МПД), костная ткань тел позвонков (операционный материал) 100 больных в возрасте 10–14 лет, страдающих идиопатическим сколиозом (ИС) III–IV степени. В качестве контроля использованы структурные компоненты позвоночника детей 12–14 лет, полученные на кафедре судебной медицины. Методами углубленной морфогистохимии, биохимии, ультраструктурного анализа исследовались гликозаминогликаны (ГАГ), окислительно-восстановительные ферменты, щелочная и кислая фосфатазы, РНК, ДНК, качественный и количественный состав ГАГ. Молекулярно-генетическими методами исследовались уровни экспрессии генов основных протеогликанов (ПГ) хрящевой ткани и их белковые продукты.

Результаты. Сформулирован патогенетический механизм формирования деформации позвоночника при ИС. Показано, что в основе развития ИС лежит генетически зависимое нарушение регуляции синтеза и формирования ПГ в ПР тел позвонков. Снижение количества хондроитинсульфатного и увеличение кератансульфатного компонентов ПГ свидетельствуют об изменении спектра ПГ при ИС. Выявленная кератансульфатсвязанная фракция является результатом повышенной экспрессии гена люмикана на фоне резкого снижения экспрессии гена агрекана и снижения количества его белкового продукта в хондробластах больных ИС III–IV степени.

Заключение. Изменение экспрессии гена агрекана на уровне транскрипции и трансляции свидетельствует о его причастности к развитию сколиотической болезни. Представлена концепция развития ИС, дано определение ИС.

Ключевые слова: сколиотическая деформация, протеогликаны, генная экспрессия, этиологический фактор.

ETIOLOGY AND PATHOGENESIS OF IDIOPATHIC SCOLIOSIS

A.M. Zaidman, A.V. Korel, V.I. Rykova, E.V. Grigorieva, T.Yu. Eschenko, T.N. Sadovaya

Objective. To study etiologic factors and pathogenetic mechanisms of scoliosis development.

Material and Methods. We investigated vertebral body growth plates (GP) from convex and concave sides of the curve, intervertebral discs (IVD), and vertebral bone tissue — surgical material obtained from 100 patients at the age from 10 to 14 years with III–IV grade idiopathic scoliosis (IS). Structural components of the spine of 12–14 years old children obtained from the forensic medicine department were used as controls. The methods of morphohistochemistry, biochemistry, and ultrastructural analysis were used to study glycosaminoglycans (GAGs), oxidation-reduction enzymes, alkali and acid phosphatases, RNA, DNA, qualitative and quantitative composition of GAGs. The expression of proteoglycan genes of cartilage tissue and their protein products was investigated with molecular genetic assays.

Results. Pathogenetic mechanism of spine deformity formation in idiopathic scoliosis was formulated. It was shown that idiopathic scoliosis development is predetermined by a disorder in regulation and synthesis of proteoglycans in vertebral GP. The decrease of chondroitin sulphate and increase of keratan sulphate components in proteoglycans indicate the change of proteoglycan spectrum in IS. The revealed keratan sulphate fraction is a result of increased expression of lumikan gene in condition of sharp decrease of aggrecan gene expression and its protein product quantity in chondroblasts of patients with III–IV grade IS.

Conclusion. Alteration in aggrecan gene expression at the level of transcription and translation testifies for its involvement in scoliosis development.

Key Words: scoliotic deformity, proteoglycans, gene expression, etiologic factor.

Hir. Pozvonoc. 2006;(4):84–93.

Необходимо взглянуть на мутацию как на биологический процесс с ее ферментами, мембранами, ростом и метаболизмом

Л.И. Корочкин

От глубокой древности до наших дней этиология и патогенез идиопатического сколиоза (ИС) остаются нерешенными проблемами ортопедии. Существует большое число теорий, но ни одна из них до сих пор не является общепризнанной. Широко обсуждается биомеханическая природа ИС [14–16]. Однако остается неясной причина формирования деформации на ранних стадиях в отсутствие асимметричной нагрузки. Кроме того, снятие нагрузки (корсетотерапия, постельный режим) не предотвращает прогрессирование ИС. Концепция первичного повреждения разных отделов ЦНС вызывает справедливое возражение [1, 4, 5, 21, 22, 32]. Неврологические расстройства у больных выявляются только при грубых деформациях позвоночника, которые сопровождаются стенозом позвоночного канала. Все еще не отвергнута эндокринная природа ИС [4, 5]. Но справедливы замечания оппонентов об отсутствии других симптомов гормональных нарушений у детей с ИС: рост, развитие, концентрация гормонов в крови практически не изменены [24, 28, 29]. В последние десятилетия большинством авторов признается генетическая природа возникновения ИС [2, 13, 18, 19, 26].

Основой настоящего исследования является доказательство генетической детерминации ИС. Исследованиями предыдущих лет на репрезентативных выборках родословных (360 семей), в которых пробанд страдал ИС II–IV степени, доказан майоргенный контроль выраженных форм исследуемой патологии [2]. Следующим логическим этапом был поиск маркеров генной патологии. Подобными маркерами были избраны протеогликаны (ПГ) – важнейшие составляющие части матрикса хряща пластинок роста (ПР).

Цель исследования – изучение этиологических факторов и патогенетических механизмов развития сколиотической болезни.

Материал и методы

ПР тел позвонков выпуклой и вогнутой сторон деформации, межпозвонковые диски (МПД), костная ткань тел позвонков получены в результате оперативной коррекции деформаций позвоночника в клинике детской вертебрологии Новосибирского НИИТО от 100 больных в возрасте 10–14 лет, страдающих ИС III–IV степени. В качестве контроля были использованы структурные компоненты позвоночника детей 12–14 лет, полученные на кафедре судебной медицины. Ткани фиксировались в 10 % растворе формалина, костная ткань подвергалась декальцинации в холодном трилоне «Б». После депарафинирования срезы окрашивались гистологическими (гематоксилин-эозином по Ван-Лизону и Маллори) и гистохимическими (толуидиновым синим при разных значениях pH, альдиановой синью, Хейл-реакцией, Шик-реакцией, реакцией Грина) методами. Ко всем реакциям ставились соответствующие контроли. Окислительно-восстановительные ферменты определялись на креостатных срезах реакцией Нади и Нахласа. Щелочная и кислая фосфатазы выявлялись методом азосочетания. Для проведения ультраструктурных исследований материал фиксировался в 4 % растворе глутаральдегида, дофиксировался в 1 % растворе OsO₄, обезвоживался в спиртах возрастающей концентрации, заключался в эпон-аралдит. На ультратоме LKB готовились ультратонкие срезы, контрастировались уранилацетатом и просматривались под электронным микроскопом «Hitachi-100».

Измерение диаметров и площадей клеток, вычисление ядерно-цитоплазматических отношений и статистическая обработка полученных результатов осуществлялись при помощи пакета программ «Morpho Images» фирмы «Микромед».

Для выделения ПГ измельченные хрящевые образцы заливались раствором 4 М с ингибиторами (0,1 М аминоксеновая кислота; 0,05 М ЭДТА; 0,01 М N-этиленимид; 0,01 М бензамидин хлористый, раствор был забуферен 0,05 М ацетатом натрия) до конечной концентрации 2 М из расчета 10 мл раствора на 1 г хрящевой ткани; инкубировались 72 ч при температуре 4 °С, далее раствор диализовали против 50 мМ Na-ацетатного буфера pH – 5,8 в течение 18 ч при температуре 4 °С. Белки осаждали добавлением к образцам 100 % ТХУ до конечной концентрации 5 %, центрифугировали, затем раствор диализовали против 50 мМ Na-ацетатного буфера pH – 5,8 в течение 18 ч при температуре 4 °С. ПГ осаждали тремя объемами 96 % этанола с 4 % К-ацетатом и последующим центрифугированием, осадки растворяли в деионизованной воде.

Гликозаминогликаны (ГАГ) из хряща выделялись раствором папаина в 0,2 М Na-ацетатном буфере pH 5,8 с добавлением 0,01 М ЭДТА и 0,01 М цистеина в течение 18 ч при температуре 60 °С [29, 30]. Белки осаждали 100 % ТХУ до конечной концентрации 5 %, раствор диализовали 18 ч при температуре 4 °С против 50 мМ Na-ацетатного буфера pH 5,0. ГАГ осаждали тремя объемами 96 % этанола с 4 % ацетатом калия, осадки растворяли в деионизованной воде.

Качественный состав ГАГ ПР тел позвонков исследовался методом разделения электрофорезом в 1 % геле агарозы [31], в 50 мМ буфере ацетата бария с pH 5,0. Исследуемые образцы ГАГ перед электрофорезом последовательно обрабатывали хондроитиназами АС, АВС, кератаназой в 50 мМ трис-буфере pH 7,5 18 ч при 37 °С для удаления отдельных видов ГАГ. После окончания процедуры гель окрашивали 0,1 % азуром с 50 мМ натрий-формиадом и 10 мМ хлоридом магния с pH 3,5. Окрашенный гель отмывали 50 мМ ацетатным буфером с pH 5,8.

Для идентификации ГАГ были использованы метчики: хондроитинсульфаты (ХС) А, В, С, кератансульфат и гепарансульфат фирмы ICN.

Материалом для исследования уровня экспрессии генов-кандидатов служили клетки, выделенные из ПР тел позвонков больных ИС (операционный материал). В качестве контроля использовались хондробласты, выделенные из хрящевых тел позвонков эмбрионов человека в сроке 10–12 недель гестации, полученные непосредственно после медицинского абортa от клинически здоровых женщин из лицензированных учреждений Росздрава в соответствии с утвержденным перечнем медицинских показаний. Гиалиновый хрящ отмывали в растворе Хенкса с канамицином 1 г/л в течение 15 мин, измельчали в чашке Петри с минимальным объемом среды RPMI до размеров 1–2 мм², а затем помещали в раствор 1,5 % коллагеназы в силиконизированной посуде для инкубирования на шейкере при температуре 37 °С в течение 5–8 ч. Суспензию пропускали через нейлоновый фильтр и центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин. Далее клетки ресуспендировали в ростовой питательной среде. Полученную популяцию клеток культивировали в культуральных флаконах в концентрации 3 × 10⁷/мл в среде ДМЕМ/F12 1:1 (Gibco) с добавлением 20 % фетальной сыворотки крови плодов коровы при температуре 37 °С. Пересев хондробластов осуществлялся два раза в неделю с кратностью посева 1/2–3. Смену среды проводили каждые три дня. Для дальнейших исследований использовались хондробласты 3-го пассажа.

Для полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовались праймеры, синтезированные в компании «Лаборатории Медиген» (Новосибирск). Праймеры подбирали для гена агрекана (NM013227, GI:6995993), декорина (NM001920, GI:19743844), люмикана (NM 002345, GI:21359858), глипикана (NM004484, GI:5360213), синдекана (NM002997, GI:55925657),

GAPDH (NM_002046.2, GI:7669491) человека.

Выделение мРНК из хондроцитов больных ИС и нормальных хондроцитов (двенадцатинедельный эмбрион человека) осуществлялось китом TRIZOL.

Для очистки РНК от ДНК добавляли к 40 мкл выделенного РНК-раствора 1 ед. активности ДНК-азы и соответствующий буфер, доводили до объема 100 мкл. Инкубировали при 37 °С в течение 30 мин. Добавляли 100 мкл фенола, перемешивали. Добавляли 40 мкл хлороформа, центрифугировали 5 мин 7,5 тыс. g. Переносили водную фазу в чистую пробирку, добавляли 100 мкл изопропанола. Инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре, центрифугировали при 12,000 g в течение 10 мин. Образовавшийся осадок промывали 200 мкл 75 % этилового спирта и центрифугировали 7,5 g в течение 5 мин. Высушивали осадок, растворяли в 40 мкл воды и инкубировали при 55 °С в течение 10 мин.

Для проведения обратной транскрипции к 2 мкг выделенной РНК добавляли 10 пмоль праймеров (OligodT или случайные гексануклеотидные праймеры), инкубировали 5 мин при 70 °С, охлаждали на льду в течение 1 мин, встряхивали. Далее добавляли в строгой последовательности 5 мкл буфера для обратной транскрипции, 0,5 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 200 ед. активности обратной транскриптазы М-MTLV, доводили водой до 25 мкл. Инкубировали 1 ч при 37 °С.

Аmplификацию фрагментов генов декорина, синдекана, люмикана, глипикана, агрекана, GAPDH проводили методом мультиплексной ПЦР на амплификаторе. В качестве контрольного гена использовался ген GAPDH. Объем реакционной смеси составлял 20 мкл, с добавлением ~200 нг кДНК, 2 мкл 10x ПЦР-буфера (10 мМ Tris-HCl, 1,5 мМ MgCl₂, 50 мМ KCl, pH 8,3), 20 пМ каждого праймера, 0,2 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата и 1 ед. активности. Таq-ДНК-полимеразы. Реакционную смесь покрывали

равным объемом минерального масла. ПЦР проводили при следующих условиях: начальная денатурация 5 мин при 95 °С, далее 32 цикла при следующих условиях: денатурация 30 с при 95,0 °С, отжиг праймеров 30 с при 55,0 °С, элонгация 60 с при 72 °С, 10 мин при 72 °С.

Анализ продуктов ПЦР проводили методом горизонтального гель-электрофореза в 0,9 % агарозном геле в буфере TAE (0,04 М Tris-HCl, 0,05 М EDTA, pH 8,0) с содержанием 1 мкг/мл бромистого этидия. Проводили электрофорез в течение 20 мин. Напряженность электрического поля 6–8 В/см. Для нанесения на гель раствор ДНК смешивали с 50 % глицерином, содержащим 0,1 % бромфеноловый синий, 0,1 % ксиленицианол в соотношении 1:10. Сканирование геля проводили в УФ-свете с помощью видеосистемы. В качестве стандарта молекулярной массы использовали ДНК плазмиды pBlueScript/SK, обработанную эндонуклеазой рестрикции MspI, маркерную ДНК 100 bp и 1 kb.

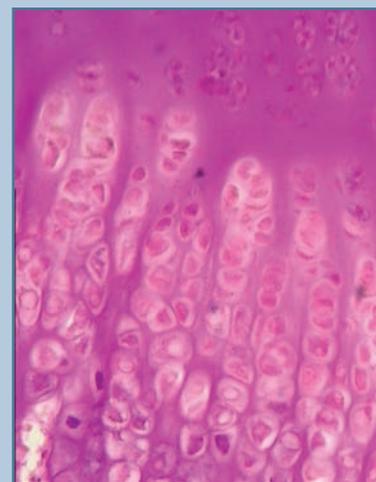


Рис. 1

Пластика роста тела позвонка: выпуклая сторона кривизны; Шик-реакция, 20 × 20

Результаты исследований

Выпуклая сторона кривизны. На выпуклой стороне кривизны ПР тела позвонка сохраняет свою структуру и представлена четырьмя зонами (рис. 1).

Герминативный слой по-прежнему занимает 1/3 объема ПР тела позвонка. Хондробласты овальной и вытянутой формы располагаются в интенсивно базофильном матриксе. Базофильная реакция усиливается вокруг клеток. Здесь же и в цитоплазме выявляются гранулярные Шик-позитивные структуры, идентифицированные как гликоген. В цитоплазме хондробластов определяются ХС С и гиалуроновая кислота, гранулы СДГ и НАД-Н-диафоразы. Реакция Грина интенсивно позитивна в ядрах и цитоплазме клеток. Ультраструктурная организация клеток не изменена.

Зона пролиферирующих хондробластов широкая, но клетки располагаются несколько реже, чем в той же зоне ПР тела позвонка при II степени ИС [6], вместе с тем количество клеток в лакунах до 10–12. Вокруг клеток в лакунах, и особенно вокруг самих лакун, базофилия матрикса более интенсивная. Здесь же выявляются ХС, преимущественно С, в меньшей степени – А, кератансульфаты в следо-

вых количествах. Матрикс в этих зонах гомогенный, обнаруживает интенсивные реакции на сульфатированные ГАГ (S-ГАГ). В некоторых клетках встречаются фигуры митоза. Индекс пролиферации клеток высокий. Ядерно-цитоплазматические отношения меньше единицы. В хондробластах сохраняется высокая ферментативная активность СДГ и НАД-Н-диафораз и незначительная активность α -глицерофосфатдегидрогеназы (рис. 2). Ультраструктурная организация клеток свидетельствует об их активном функционировании. Широкая сеть эндоплазматического ретикулула, митохондрии с хорошо контурирующимися кристами. Активный комплекс Гольджи (КГ) расположен по разным полюсам клетки, многочисленные вакуоли, контактирующие с эндоплазматической сетью (ЭПС).

Колонковый слой клеток четко прослеживается (рис. 1). Фигуры митоза здесь встречаются редко. Индекс пролиферации значительно ниже – 12 %. Внутри лакун выявляются преимущественно ХС. Реакция Грина интенсивна в цитоплазме и ядрах. Обилие митохондрий в цитоплазме хорошо согласуется с интенсивными реакциями на ферменты цикла Крепса (СДГ, НАД-Н-диафоразы). Щелочная

фосфатаза и α -глицерофосфатдегидрогеназа определяются в виде редких цитоплазматических гранул. Матрикс без признаков дистрофии, интенсивно базофилен. Ядерно-цитоплазматические отношения больше единицы. Высокополимерные ГАГ (Хейл-реакция) концентрируются вокруг лакун. На некотором расстоянии от лакун Хейл-реакция несколько слабее, но усиливается альциан-позитивная реакция. Ультраструктура клеток (рис. 3) этой зоны характеризуется высоким уровнем организации – эксцентрично расположенное ядро с преимущественно диффузным хроматином, с 1–2 ядрышками. КГ расположен по всей цитоплазме с хорошо выраженными цис- и транс-полюсами, с многочисленными вакуолями. ЭПС широкая, с обилием рибосом. Митохондрии с гомогенным матриксом и хорошо выраженными кристами. Вокруг клеток располагаются коллагеновые волокна с поперечной исчерченностью, в прослойках хорошо контурируются ПП.

Гипертрофический слой клеток представлен преимущественно крупными клетками с вакуолизированной цитоплазмой. Часть клеток, особенно в области, граничащей с зоной остеогенеза, находится в состоянии апоптоза. Несколько выше клетки на границе с колонковым слоем содержат центрально расположенные ядра и базофильную цитоплазму. Об активном синтезе клетками этой зоны свидетельствует выявляемая цитоплазматическая РНК (реакция Грина), ХС и значительное количество гранул гликогена. В клетках этой зоны определяются кератансульфаты (реакция с альциановым синим, контроль гиалуронидазой).

Зона остеогенеза узкая, внедрение сосудов в хрящевую ткань не наблюдается. К гипертрофическим клеткам прилежат костные структуры, которые перекрывают зону вплоть до центральных отделов ПР тела позвонка, до границы с вогнутой стороной кривизны.

МПД. Наружные отделы диска представлены пересекающимися под углом коллагеновыми волокнами,

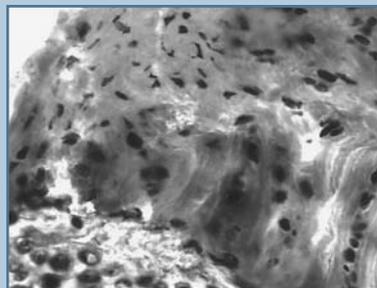


Рис. 2

Гранулы окислительно-восстановительных ферментов: выпуклая сторона кривизны; реакция на сукцинатдегидрогеназу, 20 x 20

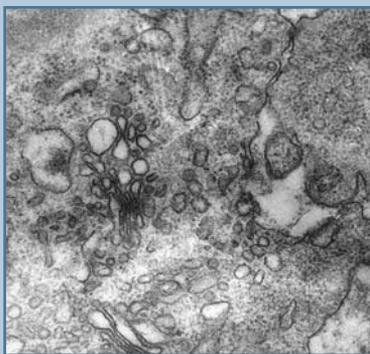


Рис. 3

Ультраструктурная организация хондробластов колонкового слоя выпуклой стороны кривизны, x1000

между которыми видны узкие базофильные прослойки основного вещества. Ближе к центральным отделам диска пучки коллагеновых волокон более тесно расположены и теряют присущую им архитеконику. Прослойки основного вещества практически не выявляются. Рыхловолокнистая часть диска представлена коллагеновыми волокнами. В прослойках и цитоплазме хондроцитов и фибробластов выявляется ХС А и С в незначительных количествах кератансульфаты. Реакции Грина интенсивны как в цитоплазме (РНК), так и в ядре (ДНК). В этих клетках активны окислительно-восстановительные процессы, о чем свидетельствуют интенсивные реакции на СДГ и НАД-Н-диафразу. Пульпозное ядро и остатки хорды содержат ХС С и гиалуроновую кислоту в высокополимерном состоянии.

Вогнутая сторона кривизны. ПР тела позвонка значительно сужена, представлена узким герминативным, пролиферирующим и гипертрофическими слоями. Матрикс местами с очагами разволокнения, местами представлен волокнистым хрящом (зоны репарации).

Герминативный слой (рис. 4) состоит из 1–2 слоев хондробластов. Следует отметить отсутствие границ между замыкательной пластинкой

и герминативным слоем. Фигуры митоза в хондробластах отсутствуют, встречаются апоптозные тела. Пролиферативная активность резко снижена. Индекс пролиферации – 5 %. В цитоплазме и вокруг клеток выявляются ХС и гиалуроновая кислота. Гликоген в виде редких гранул обнаруживается в единичных хондробластах. В матриксе встречаются зоны разволокнения. Ультраструктурная организация хондробластов (рис. 5) – единичный КГ со спаившимися вакуолями. Митохондрии лишены крист. Эндоплазматическая сеть с широкими каналами, заполненными электронно-плотным содержимым. Между тем, в ряде клеток ультраструктурная организация сохранена. В ядрах выявляются эухроматин, хорошо контурирующиеся ядрышки. В цитоплазме этих клеток широко представлены КГ и ЭПС. КГ с расширенными цистернами, вакуоли находятся преимущественно в центре клетки. Лизосомы и редкие фагосомы расположены в основном примембранно. Митохондрии с хорошо контурирующимися матриксом и кристами.

В изогенном слое клеток хондробласты расположены на значительном расстоянии друг от друга по 3–4, а иногда и по 1–2 в лакуне. Вокруг лакун матрикс слабо базофилен. Внутри лакун между хондробластами, как и в цитоплазме клеток, обнаруживаются следовые реакции на низкополимерные ХС. В этих зонах, особенно вокруг лакун, определяются кератансульфаты (рис. 6). СДГ и НАД-Н-диафараза выявляются в виде редких гранул только в цитоплазме редких хондробластов. Цитоплазматическая реакция Грина резко снижена. Реакции на кислую фосфатазу и α -глицерофосфатдегидрогеназу интенсивны. Пролиферативный индекс резко снижен – 5 %. Реакция на апоптоз интенсивна. В матриксе этой зоны наблюдаются зоны кальцификации, распространяющиеся вплоть до герминативного слоя. Выявляются очаги пролиферации клеток и формирование волокнистого хряща – зоны регенерации. Сосудистые элементы проникают в зону пролиферирующих клеток. В цитоплазме эндотелиальных клеток интенсивны реакции на СДГ и НАД-Н-диафаразу. Ультраструктура хондроцитов значительно изменена: в редких клетках выявляют-

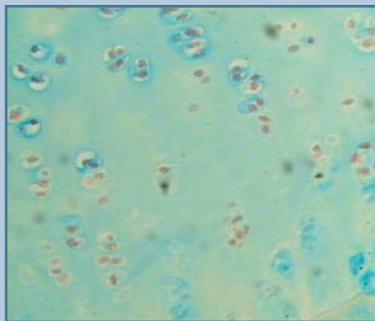


Рис. 4

Герминативный слой пластинки роста тела позвонка: вогнутая сторона кривизны; окраска альциановым синим, 20 x 10

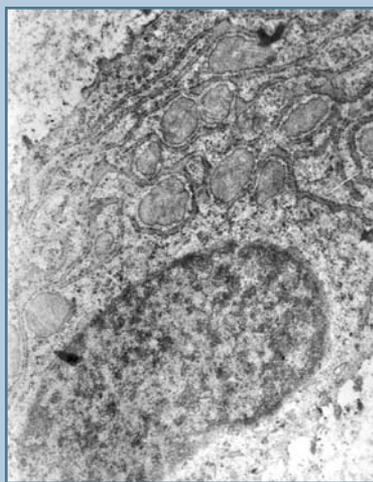


Рис. 5

Ультраструктурная организация хондробластов герминативного слоя вогнутой стороны кривизны, x1000



Рис. 6

Кератансульфат в клетках и матриксе изогенного слоя клеток пластинки роста тела позвонка вогнутой стороны кривизны; окраска альциановым синим, 20 x 10

ся КГ, в других клетках этой зоны – глубокие дистрофические изменения, отсутствуют ядра. Цитоплазма заполнена некротическими массами или кальцификатами. Органоиды отсутствуют или находятся в состоянии глубокой дистрофии. Гликоген выявляется в виде крупных глыбок.

Костная ткань. Костная ткань с признаками продолжающегося остеогенеза (рис. 7) – неравномерно расположенные широкие костные балки, окруженные остеоидом и цепочками остеобластов. Многие костные балки склерозированы, со следами перестроек. На поверхности многих костных балок видны лакуны Гаушипта с остеокластами. Костный мозг миелоидно-жировой.

МПД. Структура межпозвонокового диска резко изменена. Пучки коллагеновых волокон наружных отделов диска (фиброзное кольцо) теряют присущую им фигуру «елочка» и формируют плотные сухожильно-подобные структуры. Основное вещество морфологически не выявляется. Местами видны очаги дистрофии. Клетки вытянутой формы и по морфологическим характеристикам могут быть отнесены к фиброцитам. Во внутренних отделах диска также наблюдается фибротизация пульпозного ядра. Здесь иммуногистохимическими методами выявляется коллаген II типа.

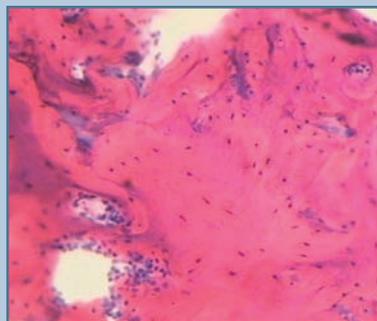


Рис. 7
Костная ткань выпуклой стороны кривизны; окраска гематоксилин-эозином, 20 x 10

Хондроциты крупные, округлой формы, с четко очерченными границами, с мелким центрально расположенным ядром и концентрическими структурами, которые заполняют всю цитоплазму. Как и в наружных отделах диска, здесь выявляются очаги дистрофии: разволокнение, распад коллагеновых волокон. В этих участках интенсивны реакции на ХС и кератансульфаты. Иммуногистохимическими методами установлен высокий индекс апоптоза. Индекс пролиферации равен нулю. Ферментные системы в клетках этой зоны не выявляются. Реакция Грина сохраняется только в ядрах. В некоторых участках интенсивна реакция Косса.

Биохимические исследования

При исследовании качественного состава препаратов ГАГ ПР тел позвонков больных ИС выявлялись кератансульфат, ХС и кератансульфатзависимая фракция. При рестрикции нативных образцов ГАГ ПР тел позвонков больных ИС и последующем электро-

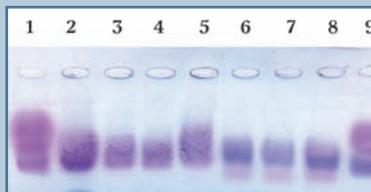


Рис. 8
Фореграмма образцов гликозаминогликанов пластинки роста (ГАГ ПР) тела позвонка и межпозвонокового диска больного с III степенью идиопатического сколиоза: 1 – стандарт; 2 – нативный образец ГАГ ПР; 3, 4, 5 – образцы ГАГ ПР, фиброзного кольца (ФК) и пульпозного ядра (ПЯ) соответственно, обработанные хондроитиназой АС; 6, 7, 8, 9 – образцы ГАГ ПР, ФК и ПЯ соответственно, обработанные кератаназой

форезе в геле агарозы было установлено, что количество кератансульфатсвязанной фракции возрастает по мере увеличения деформации (рис. 8, 9б, 9в). С увеличением деформации позвоночника увеличивается кератансульфатная и уменьшается хондроитинсульфатная составляющие хрящевой ткани ПР тел позвонков и МПД. В образцах ГАГ вогнутой стороны деформации регистрируется значительно большее количество кератансульфатсвязанной фракции и меньшее количество ХС, чем в образцах ГАГ с выпуклой стороны деформации (рис. 10). При исследовании качественного и количественного состава препаратов ГАГ, выделенных из МПД, была установлена следующая закономерность в ряду: ГАГ пульпозного ядра (ПЯ), ГАГ ПР, ГАГ фиброзного кольца (ФК). Наблюдается уменьшение количества ХС и увеличение количества кератансульфатов, увеличивается количество кератансульфатсвязанной фракции (рис. 9). Были обнаружены отличия образцов ГАГ, выделенных из ПР, ФК, ПЯ выше и ниже высоты деформации и на высоте деформации; на высоте деформации было обнаружено наибольшее количество кератансульфатсвязанной фракции, наименьшее – выше деформации.

Полученные данные хорошо согласуются с морфологическими данными.

Молекулярно-генетические исследования

Для изучения изменения спектра ПГ в матриксе и клетках ПР тела позвонка при ИС было предпринято молекулярно-генетическое исследование следующих генов: агрекана, люминикана и бигликана в хондробластах 15 больных ИС III-IV степени. Из ПР тел позвонков были выделены и культивированы *in vitro* хондробласты (операционный материал). Методом РТ-ПЦР в клетках и культуральных средах исследовались гены ПГ: бигликан, агрекан, люминикан и др. (рис. 11–13). По сравнению с нормой (0, 1, 2, 3 пассажи эмбриональных

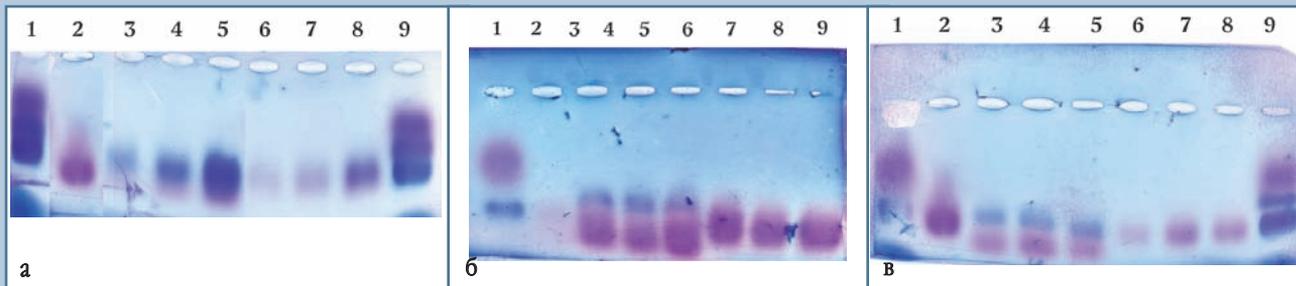


Рис. 9

Фореграмма образцов гликозаминогликанов пластинки роста (ГАГ ПР) тела позвонка и межпозвонкового диска больного с IV степенью идиопатического сколиоза (1 – стандарт; 2 – нативный образец ГАГ ПР; 3, 4, 5 – образцы ГАГ ПР, фиброзного кольца (ФК) и пульпозного ядра (ПЯ) соответственно, обработанные кератаназой; 6, 7, 8 – образцы ГАГ ПР, ФК и ПЯ соответственно, обработанные хондроитиназой АС; 9 – стандарт):

а – выше деформации;

б – на высоте деформации;

в – ниже деформации

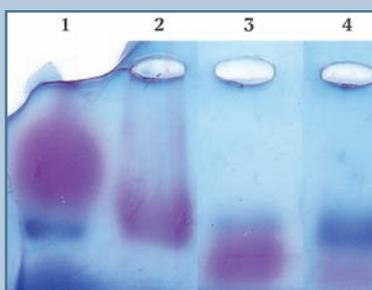


Рис. 10

Фореграмма образцов гликозаминогликанов пластинки роста (ГАГ ПР) тела позвонка с вогнутой и выпуклой сторон деформации больного идиопатическим сколиозом:

1 – стандарт; 2 – нативный образец ГАГ ПР; 3 – образец ГАГ ПР тела позвонка с вогнутой стороны деформации, обработанный кератаназой; 4 – образец ГАГ ПР тела позвонка с выпуклой стороны деформации, обработанный кератаназой

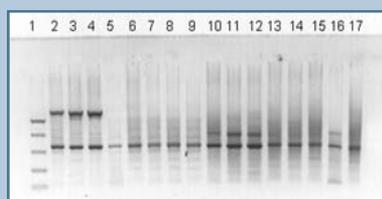


Рис. 11

Результат мультиплексной ПЦР с праймерами для генов декарина (2–9), гликана (10–17) и GAPDH (доместес-ген): 1 – маркер; 2, 3, 4, 5 – 0, 1, 2, 3 соответственно пассажи культивированных эмбриональных хондробластов; 6, 7, 8, 9 – хондробласты больных идиопатическим сколиозом; 10, 11, 12, 13 – 0, 1, 2, 3 соответственно пассажи культивированных эмбриональных хондробластов; 14, 15, 16, 17 – хондробласты больных идиопатическим сколиозом

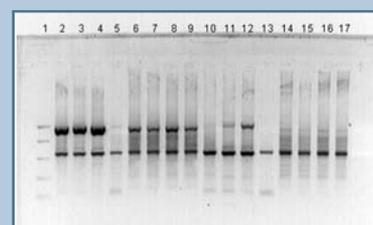


Рис. 12

Результат мультиплексной ПЦР с праймерами для генов люмикана (2–9), синдекана (10–17): 1 – маркер; 2, 3, 4, 5 – 0, 1, 2, 3 соответственно пассажи культивированных эмбриональных хондробластов; 6, 7, 8, 9 – хондробласты больных идиопатическим сколиозом; 10, 11, 12, 13 – 0, 1, 2, 3 соответственно пассажи культивированных эмбриональных хондробластов; 14, 15, 16, 17 – хондробласты больных идиопатическим сколиозом

хондробластов) экспрессия гена агрекана (рис. 12) в клетках и в культуральных средах была резко снижена. На этом фоне (рис. 13) регистрирует-

ся повышенная экспрессия гена люминикана. Методом вестерн-блот были исследованы белковые продукты этих ПГ. В результате было установле-

но, что коровий белок агрекана регистрируется в следовых количествах. Полученные результаты хорошо согласуются с морфологическими

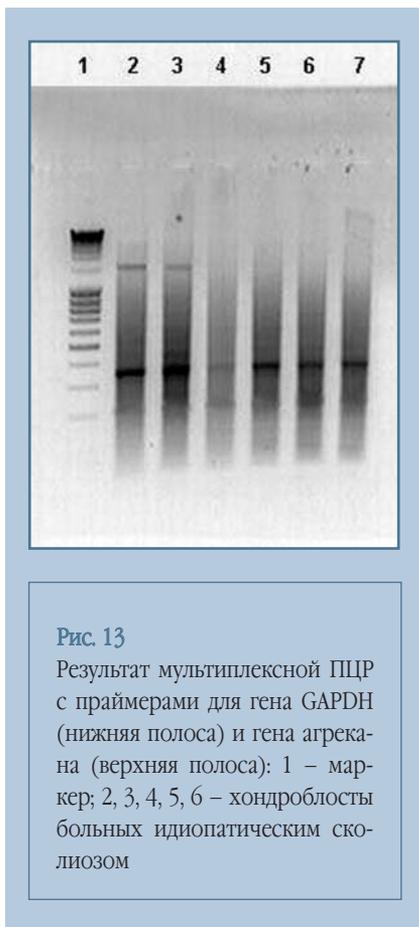


Рис. 13

Результат мультиплексной ПЦР с праймерами для гена GAPDH (нижняя полоса) и гена агрекана (верхняя полоса): 1 – маркер; 2, 3, 4, 5, 6 – хондроблосты больных идиопатическим сколиозом

и биохимическими данными и дополняют общую картину возникновения и развития ИС.

Обсуждение

При обсуждении полученных данных следует выделить следующие основополагающие положения:

- этиологический фактор развития ИС;
- патогенетические механизмы формирования деформаций позвоночника;
- концепция ИС.

Этиологический фактор развития ИС. Морфогистохимическими методами показано, что в хондробластах ПР вогнутой стороны деформации на фоне снижения количества сульфатированных ГАГ увеличивается количество кератансульфата, это подтверждает резко сниженная в цитоплазме хондробластов реакция на РНК. Ферментативная идентификация ПР

с последующим методом электрофореза в агарозном геле не только подтвердила нарастание кератансульфата в матриксе ПР тел позвонков больных ИС, но и позволила выявить фракцию, которая ранее не фигурировала в литературе, – кератансульфатсвязанную [7, 8]. Возникает вопрос, за счет каких процессов происходит конверсия синтетических процессов в сторону кератансульфата. Причем эти изменения наиболее выражены в самом активно синтезирующем слое – зоне пролиферации. Можно было предположить, что изменения касаются структуры агрекана (самого представительного ПР в хрящевой ПР тела позвонка) – уменьшение цепей ХС и увеличение количества цепей кератансульфатов. Подобная ситуация наблюдается при возрастных изменениях в МПД [27]. Антиаргументом может быть следующее положение: ПР представлена провизорным хрящом, и инволютивные процессы для такого типа ткани мало вероятны. Следует подчеркнуть, что закономерности изменений, выявленные ранее при II степени ИС [12], сохраняются и при поздних III–IV степенях, что свидетельствует о патогмоничности этих изменений при ИС.

В таком случае наиболее вероятным представляется изменение спектра ПР в матриксе и клетках ПР тела позвонка при ИС. С целью проверки высказанной гипотезы было предпринято исследование агрекана, люминикана, бигликана и других генов ПР в хондробластах 15 больных ИС III–IV степени. Из ПР тел позвонков были выделены и культивированы *in vitro* хондробласты (операционный материал). Методом РТ-ПЦР в клетках и культуральных средах исследовались гены ПР: бигликан, агрекан, люминикан и др. Экспрессия гена агрекана была резко снижена как в клетках, так и в культуральных средах. На этом фоне регистрируется повышенная экспрессия гена люминикана. Методом вестерн-блот были исследованы белковые продукты этих ПР. Коровий белок агрекана также выявлял-

ся в незначительных количествах. Изменения гена агрекана на уровне транскрипции и трансляции свидетельствуют о причастности гена агрекана к развитию ИС. Вместе с тем выявленный высокий уровень экспрессии гена люминикана объясняет увеличение количества кератансульфата и нарастание количества кератансульфатсвязанной фракции. Известно, что люминикан содержит три цепи кератансульфата, ХС в нем отсутствует [23]. В связи с этим кератансульфатсвязанная фракция может являться маркером развития ИС. Следующим этапом исследования является секвенирование последовательности гена агрекана для выяснения точной локализации мутации в этом гене.

Патогенетические механизмы развития ИС. В основе развития деформации позвоночника лежит асимметричное нарушение роста. Рост – продолженный во времени процесс, который заключается в интенсивном синтезе, репродукции матрикса и клеток ПР. Параллельно происходит дифференцировка хондробластов и подготовка к остеогенезу. Этот процесс сопровождается экспрессией разных генов. Во всех зонах ПР экспрессируется ген агрекана, в зонах гипертрофических клеток и остеогенеза – ген люминикана [17]. Изменение экспрессии гена агрекана приводит к нарушению основных функций ПР – диффузии метаболитов, барьерной [6] и рецепторной функций (осуществление связи с гормональной системой и трансдукции сигналов), контактных взаимодействий хондробластов, а также регуляции репродукции клеток и матрикса по типу контактного ингибирования или стимуляции пролиферативной активности [3, 11].

На морфологическом уровне эти нарушения проявляются резким падением реакций на ХС в клетках и матриксе, изменением архитектоники хондробластов и разволокнением матрикса, нарушением ультраструктурной организации клеток. На этом фоне увеличивается количество кератансульфата как в матриксе, так и в цитоплазме клеток. Пролифера-

тивная активность хондробластов резко снижена. Процесс остеогенеза на фоне нарушения репродукции клеток и матрикса не только не изменен, но и активизируется. Сосуды проникают в зону пролиферации, где формируется костная ткань, что объясняется, с одной стороны, отсутствием барьерной функции, нарушением синтеза антиинвазивного фактора, с другой стороны, повышенной экспрессией люминикана – фактора остеогенеза в глубоких слоях ПР. Прогрессирование процесса приводит к асимметрии роста и сколиотической деформации позвоночника. Вопрос об асимметрии роста может быть объяснен следующим образом: каждый из зачатков тел позвонков формируется автономно, генная регуляция также осуществляется автономно [25]. В зависимости от локализации экспрессии мутантного гена формируются право- или левосторонние сколиотические деформации.

Один из сложных вопросов патогенеза сколиотической болезни – манифестация деформации позвоночника в периоды интенсивного роста, то есть временные параметры включения мутантного гена. Известно, что в процессе развития существует многоуровневая система клеточной специализации [9, 10]. На ранних стадиях хондрогенной дифференцировки тел позвонков в хондробластах транскрибируются сходные последовательности ДНК. В результате создается общая метаболическая основа для последующей специфической дифференцировки клеток. В этот период синтезируются рецепторные белки, распознающие индуцирующие субстанции. Во втором периоде транскрибируются участки генома, кодирующие белки, специфичные для определенных органов и клеток. На данном этапе формируются различные клеточные клоны и складывается сложная система пролиферации и взаимодействия. Каскадная, многоуровневая система генетического контроля клеточной специализации требует специальных механизмов для инициации процессов транскрипции

[10]. Применительно к процессу формирования структурных ансамблей в ПР – это прежде всего вторичные посредники (малые РНК, ц-АМФ), которые включаются под влиянием взаимодействия гормона роста и мембранных рецепторов хондробластов.

Концепция ИС. Исходя из концепции многоуровневого включения генов, можно предположить, что нарушение транскрипции гена агрекана происходит в периоды интенсивного роста, в связи с чем нарушается репродукция клеток и матрикса. На этом фоне, в связи с повышенной экспрессией гена люминикана, интенсифицируется остеогенез. Если ген агрекана не экспрессируется и в других структурных компонентах позвоночника, то почему структурные изменения в диске и в костной ткани выражены в меньшей степени? Следующая трактовка нам кажется убедительной: диск и ПР несут разные функциональные нагрузки. МПД (ФК и пульпозное кольцо) выполняет амортизирующую и биомеханичес-

кую функции. Для него характерны следующие структурные особенности: эластин, большое количество коллагена и связанные с ним малые ПП (бигликан, фибронектин и др.), агрекан же обеспечивает диффузию метаболитов. Нарушение диффузии метаболитов результирует фибротизацию и дистрофические изменения в диске, характерные для ИС.

Заключение

Результаты исследования позволили сформулировать следующее определение: ИС – это генетически зависящая деформация позвоночника, наследуемая по аутосомно-доминантному типу, с неполной пенетрантностью генотипа, зависящей от пола и возраста. Патогенетическим механизмом (рис. 14) формирования деформации позвоночника является мутация в гене агрекана, программирующего синтез и модификацию латеральных отделов ПР тел позвонков.



Литература

1. **Абальмасова Е.А.** К этиологии боковых искривлений позвоночника у детей и подростков // I Все-союз. съезд травматологов-ортопедов: Тез. докл. М., 1965. С. 218–220.
2. **Аксенович Т.И., Зайдман А.М., Зоркольева И.В. и др.** Новые модели наследования сложных признаков и их исследования при сегрегационном анализе идиопатического сколиоза // Генетика. 1999. Т. 35. № 2. С. 255–262.
3. **Васильев Ю.М., Маленков А.Г.** Клеточная поверхность и реакция клетки. Л., 1968.
4. **Дудин М.Г.** Идиопатический сколиоз и директивные системы организма // Адаптация различных систем организма при сколиотической деформации позвоночника: Методы лечения: Тез. докл. Междунар. симпозиума. М., 2003. С. 26–27.
5. **Дудин М.Г.** Идиопатический сколиоз: Фронтальная дуга // Адаптация различных систем организма при сколиотической деформации позвоночника: Методы лечения: Тез. докл. Междунар. симпозиума М., 2003. С. 23–25.
6. **Зайдман А.М.** Идиопатический сколиоз. Новосибирск, 1994.
7. **Зайдман А.М., Корель А.В., Сахаров А.В. и др.** Структурно-функциональные особенности пластинки роста тела позвонка человека при идиопатическом сколиозе // Хирургия позвоночника. 2004. № 2. С. 64–73.
8. **Зайдман А.М., Корель А.В., Сахаров А.В. и др.** Морфогенез болезни Шейерманна – Мау // Хирургия позвоночника. 2005. № 2. С. 73–83.
9. **Конюхов Б.В.** Биологическое моделирование наследственных болезней человека. М., 1969.
10. **Корочкин Л.И.** Взаимодействие генов в развитии. М., 1977.
11. **Нейфах А.А., Тимофеева М.Я.** Молекулярная биология процессов развития. М., 1977.
12. **Цивьян Я.Л., Зайдман А.М.** Морфогенез сколиоза. Новосибирск, 1978.
13. **Bonaiti C., Feingold J., Briard M.L., et al.** [Genetics of idiopathic scoliosis] // *Helv. Paediatr. Acta.* 1976. Vol. 31. P. 229–240. French.
14. **Burwell R.G.** The consortium approach: A problem too big for any one of us // *Research into Spinal Deformities I: First Biannual Meeting of International Research Society of Spinal Deformities.* IOS Press. 1997. P. 499–502.
15. **Burwell R.G., Dangerfield P.H.** A multifactorial concept of the causation of idiopathic scoliosis // *10th International Philip Zorab Symposium: Programme and abstracts.* Oxford, 1998. P. 48.
16. **Burwell R.G., Dangerfield P.H.** How does skeletal growth affect the onset and progression of adolescent idiopathic scoliosis? The Red Queen concept applied to trunk growth and 3D balance. A speculation // *10th International Philip Zorab Symposium: Programme and abstracts.* Oxford, 1998. P. 47–48.
17. **Byers S., van Rooden J.C., Foster B.K.** Structural changes in the large proteoglycan aggrecan, in different zone of the ovine growth plate // *Calcified Tissue Int.* 1997. Vol. 60. P. 71–78.
18. **Cowell H.R., Hall J.N., MacEwen G.D.** Genetic aspects of idiopathic scoliosis: A Nicholas Andry award essay, 1970 // *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1972. N 86. P. 121–131.
19. **Dickson R.A., Lawton J.O., Archer I.A., et al.** The pathogenesis of idiopathic scoliosis. Biplanar spinal asymmetry // *J. Bone Joint Surg. Br.* 1984. Vol. 66. P. 8–15.
20. **Dietrich C.P., Nader H.B., Britto L.R.G., et al.** Chemical composition of heparitin sulfate. Fractionation and characterization of four acidic mucopolysaccharides in heparitin sulfate from beef lung tissue // *Biochim. Biophys. Acta.* 1971. Vol. 237. P. 430–441.
21. **Herman R., Maulucci R., Stuyck J., et al.** Vestibular functioning in idiopathic scoliosis // *Orthop. Trans.* 1979. Vol. 3. P. 218.
22. **Kapetanios G., Potoupanis M., Markou K., et al.** Vestibular system evaluation in patients with idiopathic scoliosis by caloric stimulation // *6th Congress of the European Federation of National Associations of Orthopaedics and Traumatology: Abstract Book.* Finland, 2003. P. 126.
23. **Lozzo R.V.** The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. P. 18843–18846.
24. **Misol S., Ponseti I.V., Samaan N., et al.** Growth hormone blood levels in patients with idiopathic scoliosis // *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1971. N 81. P. 122–125.
25. **Putti V.** Die angeborene deformität(en) der wirbels? // *Fort. A. d. Geb. D. Röntgentr.* 1910. P. 14–15.
26. **Riseborough E.J., Wynne-Davies R.** A genetic survey of idiopathic scoliosis in Boston, Massachusetts // *J. Bone Joint. Surg. Am.* 1973. Vol. 55. P. 974–982.
27. **Roughley P.J.** Biology of intervertebral disc aging and degeneration // *Spine.* 2004. Vol. 29. P. 2691–2699.
28. **Skogland L.B., Miller J.A.** Growth related hormones in idiopathic scoliosis. An endocrine basis for accelerated growth // *Acta Orthop. Scand.* 1980. Vol. 51. P. 779–780.
29. **Skogland L.B., Miller J.A., Skottner A., et al.** Serum somatomedin A and non-dialyzable urinary hydroxyproline in girls with idiopathic scoliosis // *Acta Orthop. Scand.* 1981. Vol. 52. P. 307–313.
30. **Theocharis A.D., Tsara M.E., Papageorgakopoulou N., et al.** Characterization of glycosaminoglycans from human normal and scoliotic nasal cartilage with particular reference to dermatan sulfate // *Biochim. Biophys. Acta.* 2001. Vol. 1528. P. 81–88.
31. **Van de Lest C.H., Versteeg E.M., Veerkamp J.H., et al.** Quantification and characterization of glycosaminoglycans at the nanogram level by a combined azure A-silver staining in agarose gels // *Anal. Biochem.* 1994. Vol. 221. P. 356–361.
32. **Yamada K., Yamamoto H., Nakagawa Y., et al.** Etiology of idiopathic scoliosis // *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1984. N 184. P. 50–57.

Адрес для переписки:
 Зайдман Алла Михайловна
 630091, Новосибирск, ул. Фрунзе, 17,
 НИИТО,
 AZaydman@niito.ru