



ЭКТОПИЧЕСКАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ КЛЕТОК НЕРВНОГО ГРЕБНЯ – ЭТИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКТОР СКОЛИОТИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ

А.М. Зайдман¹, Е.Л. Строчкова¹, Е.В. Киселева², Т.А. Агеева³, Л.А. Сульдина², А.А. Струнов², А.И. Шевченко²

¹Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна

²Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

³Новосибирский государственный медицинский университет

Цель исследования. Идентификация фенотипов генотипа клеток пластинок роста тел позвонков больных идиопатическим сколиозом.

Материал и методы. Клетки выделены из пластинок роста тел позвонков выпуклой и вогнутой сторон деформации 50 оперированных больных с идиопатическим сколиозом. Клетки культивированы и идентифицированы методами морфологии, нейроморфологии, иммуногистохимии и ПЦР-анализом.

Результаты. Культивированные клетки выпуклой стороны деформации идентифицированы как хондробласты. Клетки, выделенные из пластинок роста вогнутой стороны деформации, характеризованы как нейро- и глиобласты. Клетки формировали синапсы, содержали нейрофиламенты, экспрессировали нейральные и глиальные белки соответственно.

Заключение. Эктопическая локализация клеток производных нервного гребня в пластинке роста тел позвонков является этиологическим фактором сколиотической болезни.

Ключевые слова: сколиоз, пластинка роста, нервный гребень, экспрессия белков, нейрофиламенты, синапсы, хондрциты.

ECTOPIC LOCALIZATION OF NEURAL CREST CELLS: ETIOLOGICAL FACTOR OF SCOLIOSIS

AM. Zaidman, E.L. Strokova, E.V. Kiselyova, T.A. Ageeva, L.A. Sul'dina, A.A. Strunov, A.I. Shevchenko

Objective. To identify cell phenotypes in vertebral body growth plates from patients with idiopathic scoliosis.

Material and Methods. Cells were isolated from vertebral body growth plates both on convex and concave sides of the deformity in patients operated on for scoliosis. Cells were cultured and identified by methods of common morphology, neuromorphology, electron microscopy, immunohistochemistry, and PCR analysis.

Results. Cultured cells obtained from the convex side of the deformity were identified as chondroblasts. Cells isolated from growth plates on the concave side of the deformity were described as neuro- and glioblasts. Cells formed synapses, contained neurofilaments, and expressed neural and glial proteins, respectively.

Conclusion. Ectopic localization of neural crest-derived cells in vertebral body growth plates is the etiological factor for scoliotic disease.

Key Words: scoliosis, growth plate, neural crest, protein expression, neurofilaments, synapses, chondrocytes.

Please cite this paper as: Zaidman AM, Strokova EL, Kiselyova EV, Ageeva TA, Sul'dina LA, Strunov AA, Shevchenko AI. Ectopic localization of neural crest cells: etiological factor of scoliosis. *Hir. Pozvonoc.* 2015;12(4):88–97. In Russian.

DOI: <http://dx.doi.org/10.14531/ss2015.4.88-97>.

Для цитирования: Зайдман А.М., Строчкова Е.Л., Киселева Е.В., Агеева Т.А., Сульдина Л.А., Струнов А.А., Шевченко А.И. Эктопическая локализация клеток нервного гребня – этиологический фактор сколиотической болезни // Хирургия позвоночника. 2015. Т. 12. № 4. С. 88–97.

DOI: <http://dx.doi.org/10.14531/ss2015.4.88-97>.

Нервный гребень – один из самых замечательных зачатков в теле зародыша.
Б.М. Карлсон

В течение многих столетий этиологический фактор идиопатического сколиоза волнует умы ученых. Несмотря на многочисленные исследования разного уровня, причины развития сколиотической деформации остаются неизвестными [9, 18, 24, 27, 28]. В настоящее время широко обсужда-

ется генетическая природа идиопатического сколиоза [12, 20, 21, 26, 29]. Вместе с тем идентификация и локализация гена/генов, детерминирующих идиопатический сколиоз, не установлены [11].

На основании многолетних и многосторонних исследований дефор-

маций позвоночника, от ранних до выраженных форм [1, 2], установлено, что асимметрия роста позвоночника связана с нарушением функционирования хондробластов пластинки роста на вогнутой стороне деформации позвоночника. В отличие от выпуклой стороны, где хондро-

бласты проходят соответствующие стадии дифференцировки и последующего остеогенеза, хондробласты пластинки роста вогнутой стороны остаются на ранних стадиях гистогенеза, что и является фактором асимметрии роста. С целью выяснения возможной генетической зависимости нарушения гистогенеза хондробластов на вогнутой стороне деформации методом Real-time была исследована экспрессия основных генов, сопряженных с процессом роста: GHR, EGFR, IGFIR, TGFBR1 – гены роста; ACAN, CUM, VCAN, COL1A1, COL2A1, HAPLN1 – гены синтеза и структуры матрикса; DTDST, CHST1, CHST3 – гены сульфатирования и трансмембранного транспорта сульфатов. Анализ полученных данных показал, что на фоне сохранения уровня синтеза белков матрикса и коровых белков протеогликанов в клетках пластинки роста нарушены сульфатирование, синтез линк-белка, функция ростовых транскрипционных факторов, не реагирующих на нормальные сигналы дифференцировки и пролиферации. Факторный анализ выявил выраженные отличия фенотипа хондробластов больных идиопатическим сколиозом в сравнении с нормой. В результате исследований было сделано следующее предположение: обнаруженный профиль экспрессии генов может быть связан с наличием клеток разных фенотипов в пластинке роста тел позвонков больных идиопатическим сколиозом [3].

Цель исследования – идентификация фенотипов клеток пластинки роста тел позвонков больных идиопатическим сколиозом.

Материал и методы

Идентификацию фенотипов клеток пластинки роста тел позвонков больных идиопатическим сколиозом производили методом культивирования клеток пластинки дифференцированно из выпуклой и вогнутой сторон деформации [6].

Объектом исследования были избраны пластинки роста тел позвон-

ков от 50 детей 11–15 лет с идиопатическим сколиозом III–IV ст., оперированных в клинике детской ортопедии Новосибирского НИИТО.

Образцы материала забирали в стерильные пробирки, содержащие 0,9 % физиологический раствор и антибиотик гентамицин в концентрации 20 мкг/мл.

Гиалиновый хрящ пластинок роста отмывали в физиологическом растворе, измельчали в чашке Петри с минимальным объемом среды RPMI до размеров 1–2 мм², затем помещали в раствор 1,5 % коллагеназы в силиконизированной посуде и инкубировали в CO₂ инкубаторе при температуре 37 °С в течение 22–24 ч. Полученную суспензию клеток пропускали через нейлоновый фильтр для удаления кусочков ткани и осаждали клетки центрифугированием в течение 10 мин при 2000 об./мин. Осажденные клетки идентифицировали и определяли общее их количество в камере Горяева.

Выделенные клетки культивировали в среде DMEM F12 с добавлением 15 % FBS (эмбриональной телячьей сыворотки) и антибиотиков стрептомицина – пенициллина (250×) и амфотерицина В в условиях CO₂ инкубатора при 37 °С. В качестве культуральной посуды использовали пластиковые чашки Петри (φ 60). На дно культуральной посуды укладывали покровные стекла для последующих морфологических исследований клеток в процессе культивирования. Выделение, посев и культивирование клеток осуществляли дифференцированно в соответствии с указанной высотой и стороной деформации.

Клетки культивировали в течение 21 сут. Смену среды производили один раз в 3 сут. Клетки не пассировали. Для морфологических исследований клетки извлекали за период от 5 до 21 сут; фиксировали в 70° спирте и окрашивали гематоксилином-эозином, ализановым синим, по Кахалу и Нисслю.

Для исследований клеток методом электронной микроскопии на 14-е сут культивирования производили пас-

сирование культуры хондроцитов смесью растворов Трипсина и Версена в соотношении 1:1. Действие веществ инактивировали средой DMEM F12 с добавлением 15 % FBS (эмбриональной телячьей сыворотки) и антибиотиками стрептомицином – пенициллином (250×) и амфотерицином В. Клеточную суспензию центрифугировали 10 мин со скоростью 1200 об./мин. Ресуспензировали в 1 мл среды. В 12-луночной планшете размещали подложки силиконизированные стерилизованные чипсы для электронной микроскопии (по одной в лунку). Клетки сеяли в концентрации 10 мкл на подложки и 5 мкл на чипсы. Адгезию клеток контролировали в течение 2 ч. В лунки с чипсами и пленками добавляли по 2 мл среды, оставляли на сутки.

Образцы на чипсах для сканирующей электронной микроскопии фиксировали в течение 15 мин 2,5 % глутаровым альдегидом, разведенным на среде для культивирования, затем переносили в раствор 2,5 % глутарового альдегида на 0,1 М какодилатном буфере и фиксировали в течение часа. После отмывки в двух сменах 0,1 М какодилатного буфера образцы фиксировали в 1 % тетраоксида осмия, приготовленном на дистиллированной воде, отмывали в двух сменах воды, помещали в специальный держатель, дегидратировали, инкубируя по 10 мин в растворах спиртов возрастающей концентрации (30, 50, 70, 100 %). Затем образцы высушивали по методу критической точки в приборе и исследовали в сканирующем электронном микроскопе до и после напыления хромом толщиной 1 нм в атмосфере аргона. Анализ проводили при увеличении в 1000–30 000 раз и ускоряющем напряжении 30 кВ.

Фиксацию клеток на специальных пластиковых подложках проводили в 2,5 % растворе глутарового альдегида на 0,1 М Na-какодилатном буфере (pH 7,4) в течение 1 ч, после чего материал отмывали в трех сменах 0,1 М Na-какодилатного буфера (pH 7,4). Образцы постфиксировали в 1 % растворе тетраоксида осмия

с добавлением 0,8 % ферроцианата калия на том же буфере в течение 1 ч. После трехкратного отмывания дистиллированной водой клетки оставляли на ночь в холодильнике при температуре 4 °С в 1 % водном растворе уранилацетата. На следующий день образцы отмывали водой и обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации (по 5 мин в 30 и 50 %, по 10 мин в 70, 96 и 100 % растворах этанола соответственно). Затем клетки дополнительно обезвоживали в ацетоне (два раза по 20 мин) и пропитывали смесью смолы, включающей 4 компонента (Epon 812, DDSA, MNA и DMP-30) по следующей схеме: 1 объем смолы на 2 объема ацетона – 1 ч; 1 объем смолы на 1 объем ацетона – 2 ч; 2 объема смолы на 1 объем ацетона – 2 ч; чистая смола – 2 ч; чистая смола – 1 ч. Далее проводили заливку образцов в формы из фольги и инкубацию в течение ночи в эксикаторе с CaCl₂ для удаления пузырьков воздуха из смолы. Для полимеризации образцы помещали в термостат при +60 °С на 3 сут.

Процедуру иммуногистохимического исследования выполняли в соответствии с рекомендациями производителей антител. Перед проведением иммуногистохимического исследования приготовленные срезы депарафинизировали и производили демаскировку антигенов тканей в PT Link-модуле в цитратном буфере (рН 9,0) при температуре 95 °С в течение 60 мин. Затем блокировали эндогенную пероксидазу 3 % раствором H₂O₂, проводили протеиновый блок сывороткой.

Далее при температуре 22 °С в течение 30 мин инкубировали срезы ткани и клетки с антителами; GFAP (клон N1506, rabbit polyclonal, DAKO); S100 (клон IR504, rabbit polyclonal, DAKO); Synaptophysin (клон DAK-SYNAP, mouse monoclonal, DAKO); Neurofilament Protein (NF, клон 2F11, mouse monoclonal, DAKO). Все антитела разводили согласно указаниям фирмы-производителя. Для визуализации иммуноморфологической реакции использовали полимерную систе-

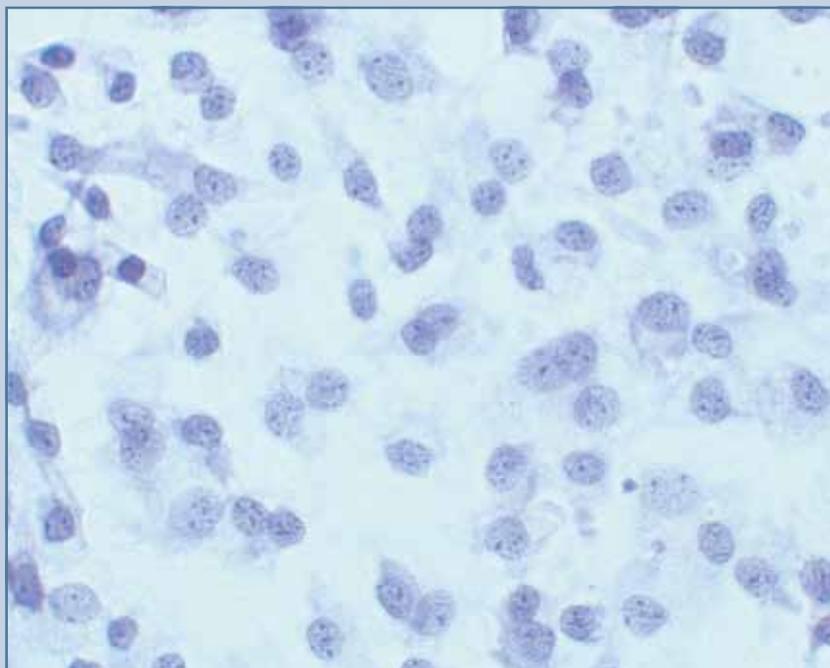


Рис. 1

Монослой культивированных хондробластов на выпуклой стороне деформации позвоночника; гематоксилин-эозин, 10 × 60

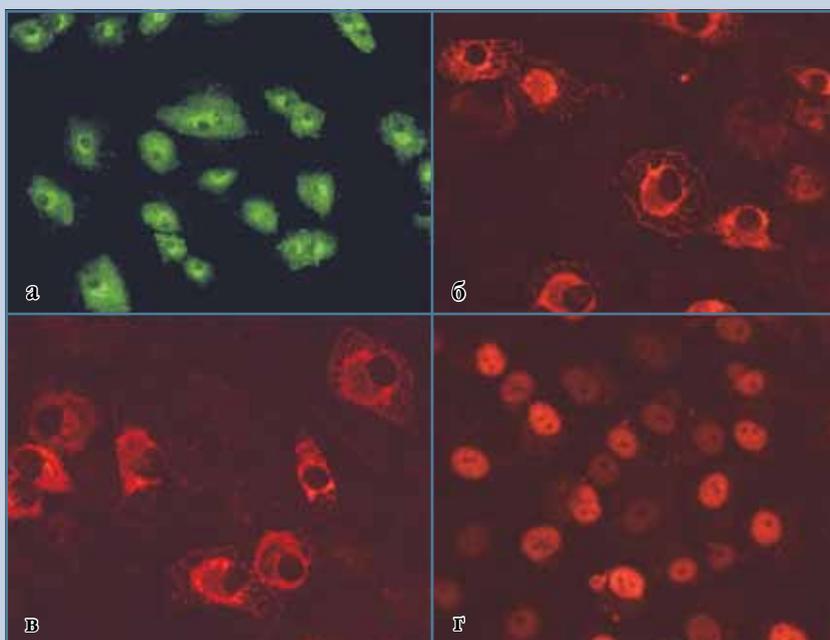


Рис. 2

Иммуногистохимические реакции на белки: а – коллаген I типа (green); б – коллаген II типа (red); в – агрекан (red); г – sox 9 (red)

му детекции EnVision FLEX. Последним этапом докрашивали ядра клеток гематоксилином.

Для исследования культивированных клеток методом флуоресцентной иммуногистохимии производили фиксацию в растворе 4 % формалина в течение 10 мин. Затем промывали от формалина в PBS в течение 10 мин. После отмытки клетки на предметных стеклах держали в растворе тритона X100 4 % в течение 15 мин. Вновь промывали в растворе PBS 30 мин. Гибритизацию проводили раствором BSA (бычий сывороточный альбумин) во влажной камере в течение 5–30 мин. Клетки окрашивали первичными антителами Neuronal Class III β -Tubulin (TUJ1) и Anti-Neurofilament 200. Вторичные антитела, используемые в эксперименте: $\gamma 1$ green λ 488 и $\gamma 2a$ red λ 568. Ядра подкрашивали DAPI.

Результаты

Культивированные клетки, выделенные из наружных отделов пластинок роста, на высоте ниже и выше деформации формировали монослой, состоящий из светлых круглых клеток, прилежащих друг другу (рис. 1). Ядра с 1–2 ядрышками и диспергированным хроматином располагались в центре клетки. В цитоплазме выявлялись хондроитинсульфаты А и С и гранулы гликогена. Иммуногистохимически в клетках наблюдалась экспрессия белков агрекана, Sox 9, хондроитинсульфатов А и С, коллагена I и II типов (рис. 2). Электронно-микроскопически: клетки округлой формы с крупными светлыми ядрами с инвагинатами. Цитоплазма обогащена органеллами и промежуточными микрофиламентами. Митохондрии крупные, преимущественно овальной формы, с короткими поперечными кристами, эндоплазматическая сеть с расширенными цистернами, аппарат Гольджи представлен диктосомами и многочисленными визикулами, расположены вблизи плазматической мембраны. Приядерно наблюдалось скопление промежуточных филаментов (рис. 3).

Клетки, выделенные из пластинки роста с вогнутой стороны деформации (вершина сколиоза), представлены несколькими типами (рис. 4). Крупные мультиполярные клетки с одним длинным аксоном и многочисленными ветвящимися короткими отростками (рис. 5а). В центре такой клет-

ки располагалось ядро округлой формы с 1–2 ядрышками. В цитоплазме и в отростках выявлялась гранулярная сеть – субстанция Ниссля. Определялись клетки овальной формы с крупным центрально расположенным ядром и узким ободком Нисль-позитивной цитоплазмы, переходящей

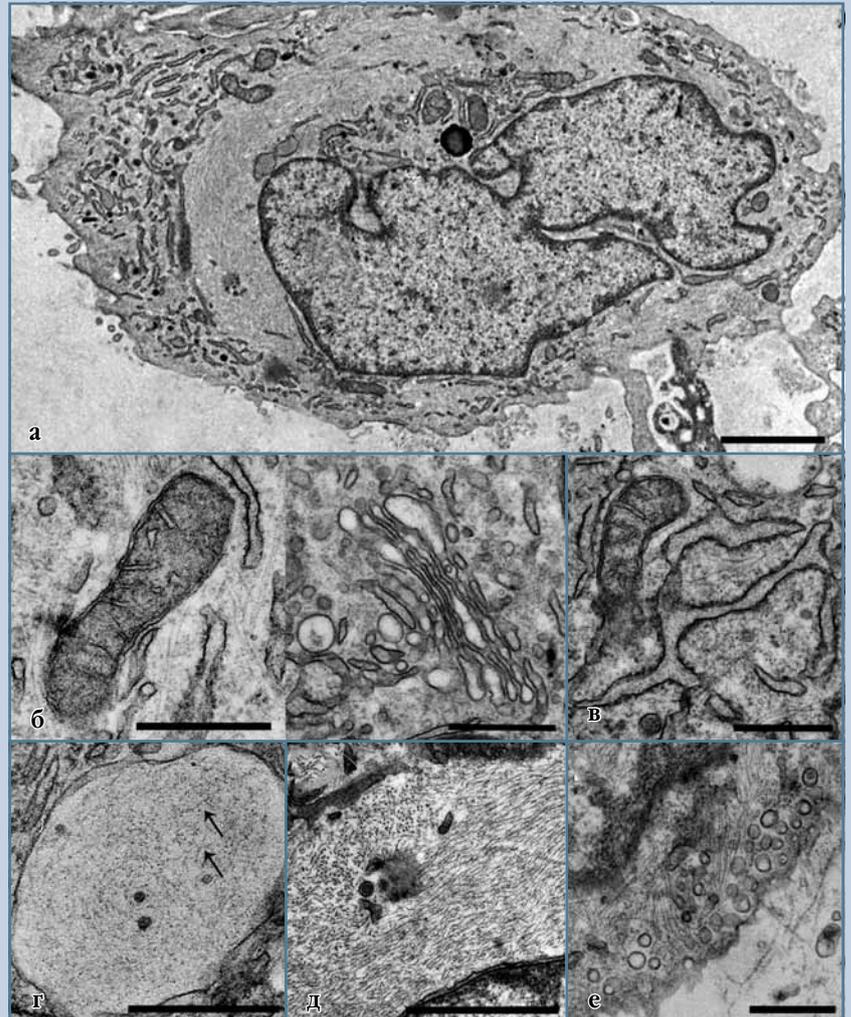


Рис. 3

Ультраструктура хондробласта с выпуклой стороны пластики роста тела позвонка на вершине деформации больного идиопатическим сколиозом (масштаб: а – 2 мкм, б–е – 0,5 мкм): а – общий вид клетки, содержащей ядро с инвагинациями и большое скопление промежуточных филаментов в цитоплазме; б – митохондрии с короткими поперечными кристами, узкие и расширенные цистерны шероховатого эндоплазматического ретикулума; в – диктосомы аппарата Гольджи; г – вакуоль с короткими тонкими филаментами (стрелки) внутри; д – скопление промежуточных филаментов вблизи ядра; е – многочисленные везикулы вблизи плазматической мембраны клетки

в длинные отростки по обеим полюсам клетки. Здесь же располагались униполярные и псевдоуниполярные клетки. В цитоплазме и отростках этих клеток (рис. 5б) локализовалась субстанция Ниссля. Иммуногистохимически в перечисленных клетках экспрессировались белки NF-200 и β III-tubulin (реакция с антителами Neural crest β III-tubulin и Anti-Neurofilament 200) и ген NF-1 (рис. 6). Второй тип клеток – это крупные клетки с круглыми ядрами и многочисленными разветвленными цитоплазматическими отростками. В этих клетках экспрессировался астроцитарный белок (реакция с антителами S-100) (рис. 7а). В препаратах наблюдались клетки с четкими границами, округлой, овальной формы с несколькими отростками. В центре такой клетки располагалось крупное круглое ядро, окаймленное светлым ободком цитоплазмы. Подобные клетки и их отростки позитивно окрашивались по Кахалу и Гомери (рис. 8). В этих клетках экспрессировался кислый глиальный белок (реакция с антителами GFAP) (рис. 6, 7б).

Ультраструктурно (трансмиссионная микроскопия): первый тип – это клетки вытянутой формы, с круглым ядром и 1–2 электронно-плотными ядрышками (рис. 8). От сомы клетки отходил один длинный отросток (аксон), на котором локализовались выпячивания мембраны (аксонные холмики). Подобные выпячивания-

шипики располагались и на телах клеток. Внутри шипиков наблюдалось большое количество мелких светлых пузырьков (вакуолей). Между аксоном и сомой клеток выявлялись контакты – формирующиеся синапсы. По обеим сторонам синусных мембран локализовались мелкие и крупные вакуоли. Цитоплазма клеток обогащена

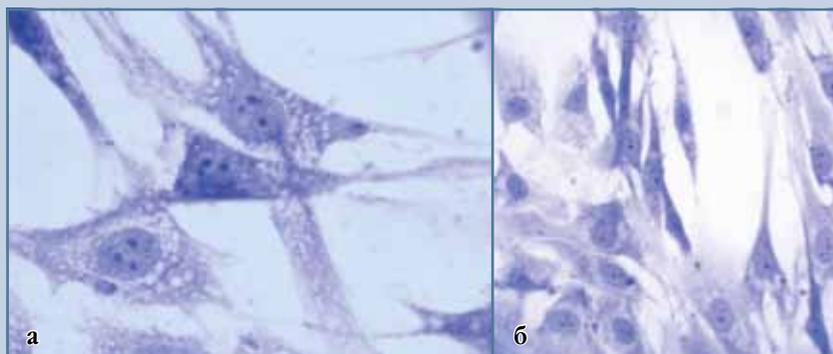


Рис. 5

Культура клеток: идиопатический сколиоз, вогнутая сторона на вершине деформации; окраска по Ниссля; ув. 400 (а) и 200 (б)

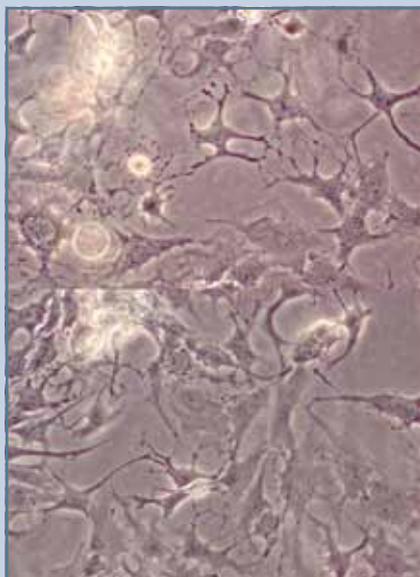


Рис. 4

Клетки нейрального генеза в культуре клеток вогнутой стороны; нативный препарат; 10 × 40

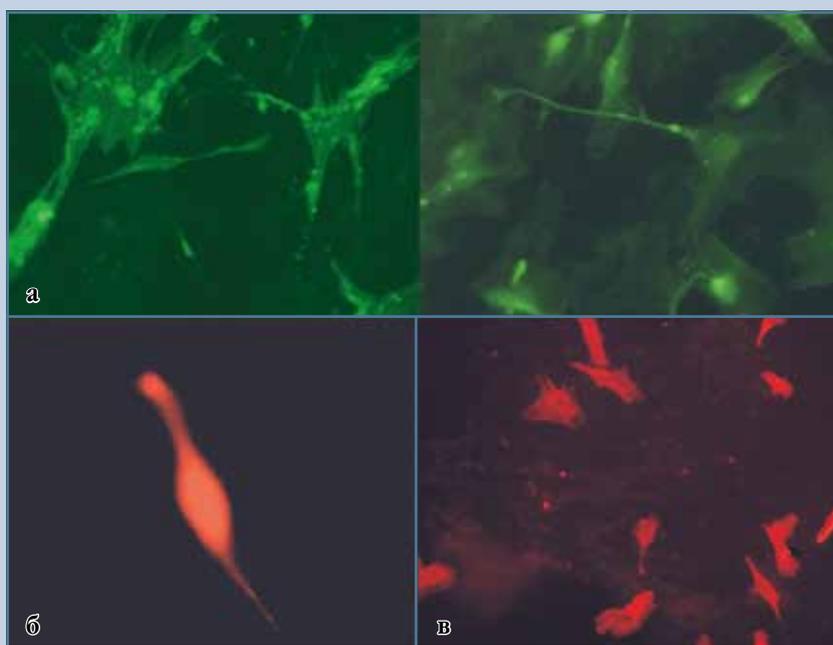
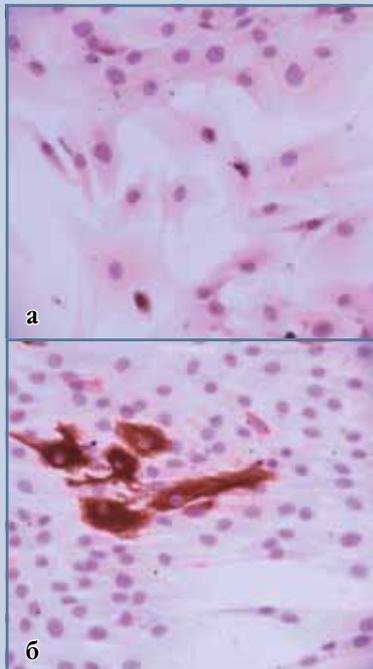
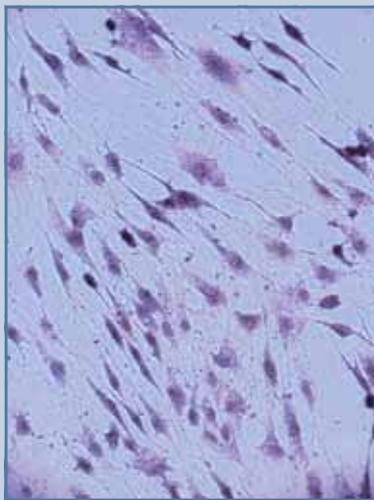


Рис. 6

Иммуногистохимические реакции на нейтральные антитела в культивируемых клетках вогнутой стороны деформации позвоночника при идиопатическом сколиозе: а – NF-1 (green); б – III β -tubuline (red); в – NF-200 (red)

**Рис. 7**

Иммуногистохимические реакции на глиальные белки: **а** – S-100 астроцитарный белок, ув. 200; **б** – GFAP – глиальный белок, ув. 200

**Рис. 8**

Культура клеток: идиопатический сколиоз, вогнутая сторона на вершине деформации; окраска по Кахалу, ув. 200

органеллами. Эндоплазматический ретикулум состоял из длинных узких цистерн с расширенными участками. Развитый аппарат Гольджи представлен многочисленными диктосомами и пузырьками. Встречались экзоцитозные пузырьки. Митохондрии вытянутые с разветвленными тонкими кристами и плотным матриксом. В отростках клеток обнаружались нейрофиламенты. В цитоплазме и в отростках выявлялись гранулы, вероятно белковой природы. Кроме того, обнаружены стопки шероховатого эндоплазматического ретикулума, напоминающие тельца Ниссля. Второй тип – клетки с большим количеством отростков, формирующих связи. Эти клетки содержали светлое ядро с 1–2 ядрышками и глыбками гетерохроматина. В цитоплазме эндоплазматический ретикулум представлен разветвленными каналами. Аппарат Гольджи с многочисленными везикулами и экзоцитозными пузырьками. Митохондрии разной формы с расширенными кристами. В цитоплазме большое количество (скопление) промежуточных филаментов. Нейрофиламенты в этих клетках не определялись (рис. 9).

Сканирующая электронная микроскопия клеток, полученных из пластинки роста вогнутой стороны деформации: клетки имеют вытянутую форму и длинные отростки, формирующие контакты. Между клетками сформирован синапс и крупный шипик. В цитоплазме клеток и отростках присутствуют плотные гранулы от 300 до 500 нм в диаметре (рис. 10, 11). Многочисленные шипики на отростках нейронов (не напыленный препарат).

Обсуждение

Результаты фактических данных показали, что в пластинке роста тел позвонков больных идиопатическим сколиозом в зависимости от локализации выявлены клетки разных фенотипов. Культивированные клетки пластинки роста выпуклой стороны деформации идентифицированы как хондробласты. Критериями оценки хондроген-

ной дифференцировки клеток служили морфологическая структура, в том числе ультраструктурная организация, синтез органоспецифических протеогликанов и экспрессия генов, сопряженных с процессом роста [3].

Культивированные клетки, выделенные из пластинки роста вогнутой стороны деформации позвоночника больных идиопатическим сколиозом, идентифицированы как нейро- и глиобласты. Морфологически нейробласты – это мульти-, уни-, биполярные и псевдоуниполярные клетки, формирующие множественные контакты как с отростками, так и с телами клеток. В цитоплазме клеток определялась субстанция Ниссля, экспрессировались нейроспецифические белки β III-tubulin, NF-1 и ген NF-200.

О нейральном генезе исследованных клеток свидетельствовали данные электронной микроскопии: протяженная сеть нейрофиламентов, формирующиеся и сформированные синусы с везикулами, характерные вытянутые митохондрии. В отростках и телах клеток располагались многочисленные аксонные холмики-шипики, содержащие везикулы. Между отростками и клетками выявлялись множественные контакты. Второй тип – это клетки округлой формы, содержащие большое количество отростков, формирующих связи. В отростках и клетках, окрашивающихся по Гомери и Кахалу, экспрессировались глиальные белки. Этот тип клеток по морфологическим и ультраструктурным данным отнесен к глиобластам. Естественно, возникает вопрос, каким образом клетки нейрального генеза могли быть локализованы в пластинке роста больных идиопатическим сколиозом? Для ответа следует обратиться к ранним стадиям эмбриогенеза.

Известно, что позвоночник формируется из мезенхимы [5]. Вместе с тем на стадии формирования нервной трубки из нее отделяются клетки нервного гребня, которые мигрируют по трем путям [4, 6].

Один из путей миграции клеток нервного гребня – это туловищный путь, который проходит через перед-

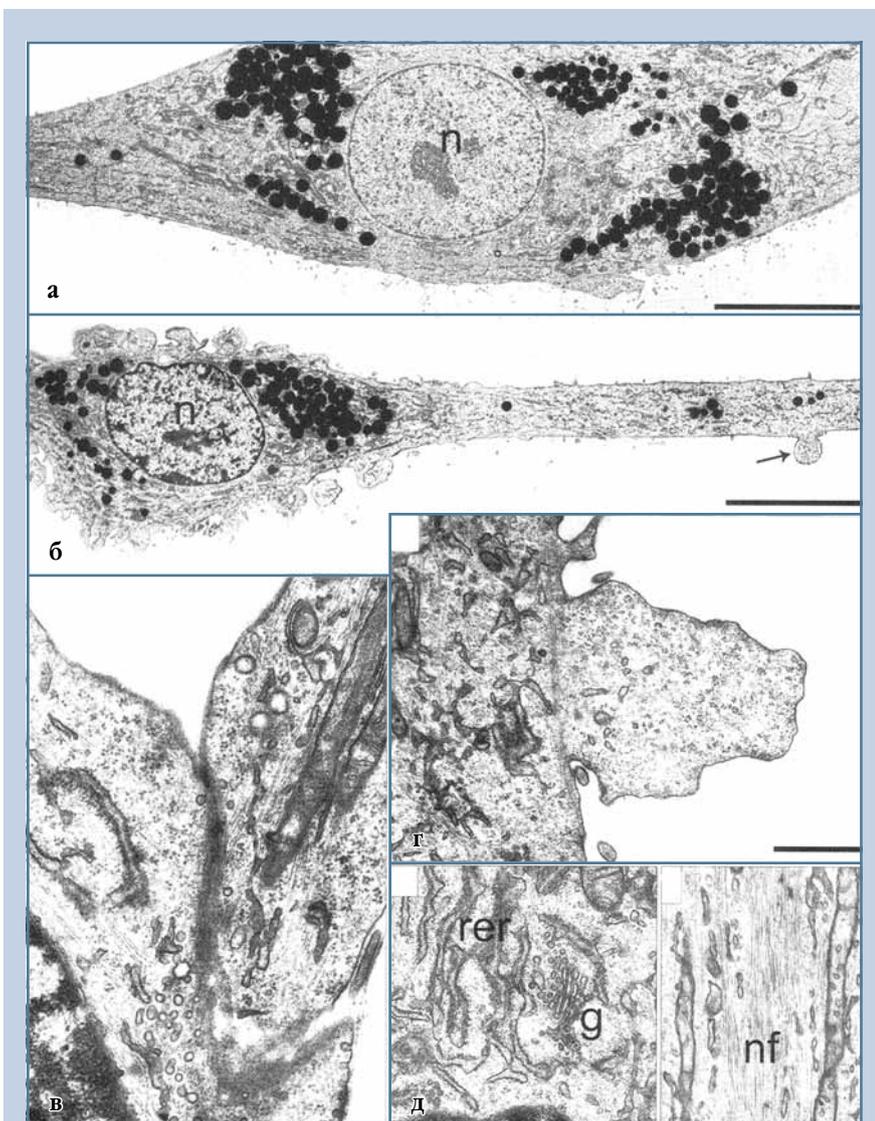


Рис. 9

Микрофотография культивированных клеток, выделенных из пластинки роста тел позвонка (вогнутая сторона вершины деформации) большого идиопатическим сколиозом (масштаб: **а** – 10 мкм, **б–д** – 1 мкм): **а** – нейроноподобные клетки вытянутой формы с длинным отростком (аксоном), многочисленные электронно-плотные гранулы вокруг ядер и в цитоплазме клеток, формирующиеся на аксонах шипики (стрелка); **б** – фрагмент цитоплазмы одной из клеток культуры, с развитым шероховатым эндоплазматическим ретикулумом и комплексом Гольджи; **в** – фрагмент аксона с обширной сетью нейрофиламентов, пронизывающих отростки клеток, а также вытянутые митохондрии; **г** – формирующийся контакт между отростком одной клетки и телом другой, многочисленные везикулы в месте контакта; **д** – шипики, формирующиеся на теле и отростках клеток

ний (ростральный) отдел сомитов, и, в конечном итоге, эти клетки формируют чувствительные ганглии [25]. Мигрирующие клетки претерпевают эпите-

лиомезенхимальную трансформацию путем переключения экспрессии нейтральных белков клеточной адгезии на белки мезенхимной адгезии [7].

Клетки нервного гребня, округляясь, приобретают фенотип мезенхимальных клеток и не отличаются от окружающих клеток [22]. Этот процесс обусловлен последующей миграцией клеток нервного гребня по мезенхимальному субстрату, выстилающему путь от нервной трубки к сомитам. Формирование субстрата связано с экспрессией гена *Rax 3* и соответственно синтезом двух изоформ версикана (*V1, V0*) [13]. Траектория движения клеток нервного гребня определяется асимметричным распределением факторов индукции (*V0, V1* версиканы) и ингибиции [19]. Ингибирование движения клеток нервного гребня осуществляется высокополимерным протеогликаном-агтреканом, что связано с ограничением диспергирования клеток нервного гребня за счет боковых цепей гликозаминогликанов [23]. В процессе миграции клеток нервного гребня происходит хондрогенная дифференцировка мезенхимальных клеток в сомитах. Эти данные свидетельствуют о взаимозависимости процессов хондро- и ганглиогенеза [16]. Более того, удаление сомита влечет за собой неспособность к формированию чувствительных ганглиев, а нарушение сегментации сомитов приводит к формированию уродливых ганглиев [8]. Следовательно, миграция клеток нервного гребня через сомиты – закономерность и, более того, наблюдается сопряженная во времени регуляция морфогенеза позвоночника и чувствительных ганглиев [14].

Миграция клеток нервного гребня через сомиты – это один из этапов формирования позвоночника и чувствительных ганглиев. С учетом тропизма этих двух структур остается не ясным, в какой мере нарушается функция чувствительных ганглиев при идиопатическом сколиозе. Ответ на этот вопрос ждет исследователей. Наличие клеток производных нервного гребня в пластинке роста тел позвонков больных идиопатическим сколиозом является, несомненно, нарушением одного из этапов морфогенеза позвоночника.

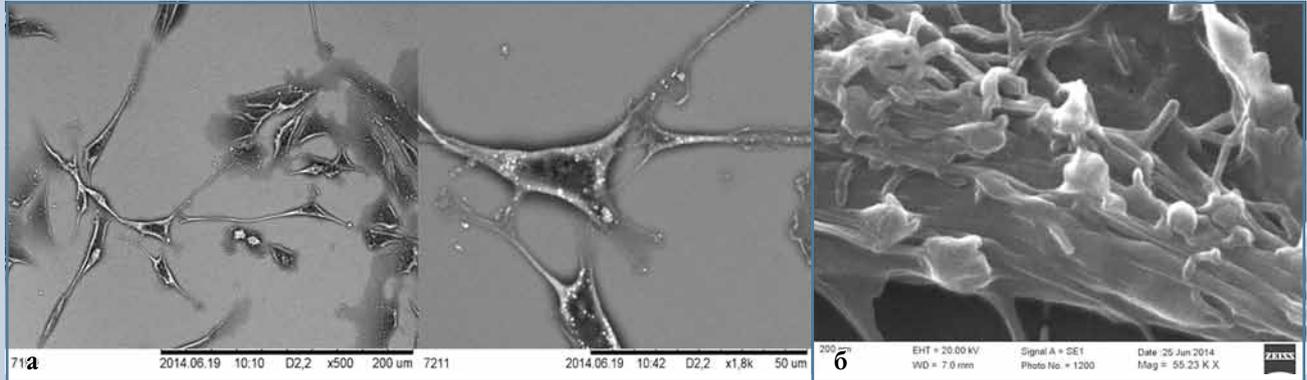


Рис. 10

Сканирующая микроскопия: нейроны в культуре клеток, полученных из пластики роста тела позвонка (вогнутая сторона вершины деформации) большого идиопатическим сколиозом, не напыленный препарат: **а** – общий вид клеток на малом увеличении, клетки имеют вытянутую форму и длинные отростки, масштаб 200 мкм; **б** – сформированные контакты между двумя клетками, видны синапс и крупный шипик, в цитоплазме нейронов, а также в отростках присутствуют небольшие плотные гранулы от 300 до 500 нм в диаметре, масштаб 50 мкм

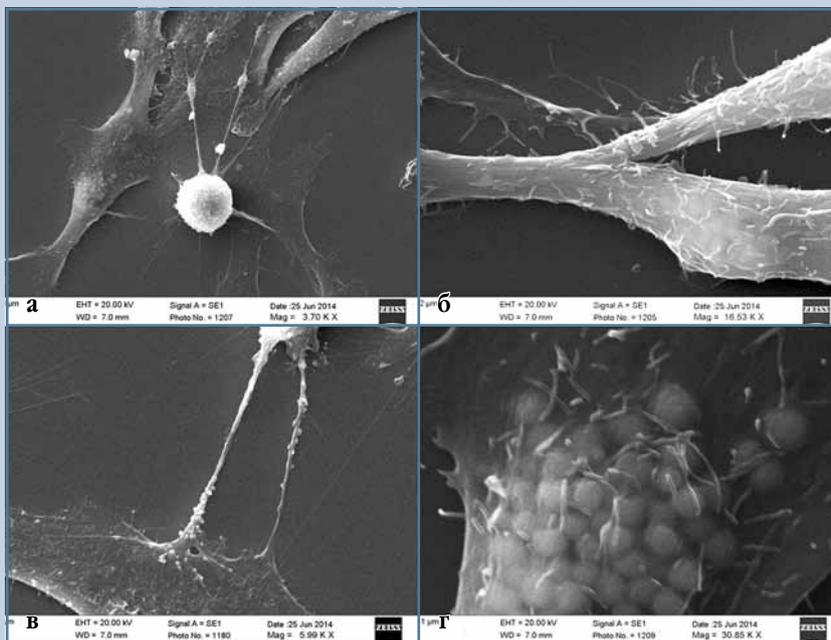


Рис. 11

Сканирующая микроскопия: вид нейронов в культуре клеток, полученных из пластики роста тела позвонка (вогнутая сторона вершины деформации) большого идиопатическим сколиозом в сканирующем электронном микроскопе, напыленный препарат (масштаб: **а** – 1 мкм, **б–г** – 2 мкм): **а** – общий вид клеток; **б** – фрагмент отростка нейрона на большом увеличении; **в** – отросток нейрона (аксон) с шипиками; **г** – фрагмент нейрона на большом увеличении, поверхность содержит короткие отростки, через плазматическую мембрану просвечивают содержащиеся в цитоплазме гранулы

Надо полагать, что в результате нарушения пространственно-временных закономерностей миграции клеток нервного гребня часть из них оседает и депонируется в сомите. Это может происходить в результате мутации гена *Rax 3* с последующим нарушением синтеза версиканов вдоль миграционного пути [13]. Подобные данные были подтверждены исследованиями Knull [14]. Нарушение секреции и ингибирование сульфатирования версиканов приводило к остановке миграции клеток нервного гребня. Известно, что взаимодействие клеток нервного гребня с интерстициальным матриксом осуществляется по принципу «клетка – клетка – матрикс» [10]. Любые нарушения синтеза и/или взаимодействия рецептора (интегрин) клеток нервного гребня с молекулами миграционного субстрата могут быть причиной нарушения дальнейших морфогенетических событий в сомите [25].

Ингибирование миграции клеток нервного гребня может быть связано со многими факторами, но в таком случае возникает вопрос: почему в пластинках роста тел позвонков, в зонах депонирования клеток нервного гребня, определяются малодифференцированные хондробласты? Известно,

что клетки нервного гребня на месте своей конечной миграции приобретают фенотип клеток той среды, в которую они мигрируют, но генотип соответствует исходному [17]. Вполне объяснимо, что клетки нейрогенного ряда, располагаясь в пластинках роста тел позвонков, не детерминированы к процессу роста. Этим объясняется отсутствие хондрогенной дифференцировки клеток в пластинке роста и в участках их локализации, что приводит к асимметрии и локальному нарушению роста с последующим формированием деформации позвоночника. В конечном итоге заложенные в эмбриогенезе нарушения морфогенеза позвоночника в периодах роста реализуются в сколиотическую болезнь со всеми присущими клиническими и морфологическими признаками.

На основании полученных собственных и литературных данных нам представляется возможным высказать некоторые предположения о вариабельности клинических проявлений сколиотической болезни. Прежде всего, о причинах прогрессирования деформации позвоночника и преимущественном формировании искривления грудного отдела позвоночника при идиопатическом сколиозе.

В связи с тем, что миграция клеток нервного гребня осуществляется с интервалами 10–1 м и расстояние между ними составляет один диаметр клетки [15], количество депонированных клеток может быть разным, что и определяет степень нарушения хондрогенеза и асимме-

трию роста. При незначительном количестве депонированных клеток на стадии интенсивного роста (I фаза роста) возникает деформация позвоночника, которая в последующем нивелируется за счет неизменной пластинки роста или остается на начальной стадии развития (I–II ст. идиопатического сколиоза). Эти данные основываются на предыдущих экспериментальных исследованиях А.М. Зайдман (неопубликованные данные). При точечном повреждении пластинки роста у растущего животного возникала незначительная деформация, которая в последующем, в процессе линейного роста, нивелировалась и не прогрессировала. При повреждении половины пластинки роста у животного возникала выраженная деформация, прогрессирующая до окончания роста.

Один из необъяснимых вопросов вертебрологии – причины преимущественного формирования деформации грудного отдела позвоночника при идиопатическом сколиозе. Ответ на этот вопрос может быть получен из анализа траектории миграции клеток нервного гребня. В связи с тем, что миграция клеток нервного гребня по туловищному пути проходит только через грудные сомиты, нарушение движения и депонирование клеток в последующем реализуется в асимметрии роста и формировании деформации именно грудного отдела позвоночника. Формирование поясничной кривизны, надо полагать, связано с нарушением миграции клеток нервного гребня по II миграционному

пути и формированию двигательных ганглиев.

Таким образом, анализ дифференцированного культивирования клеток пластинки роста тел позвонков 50 больных идиопатическим сколиозом III–IV ст. позволил обнаружить причины нарушения роста и формирования деформации позвоночника, и высказать предположение о вариабельности клинических проявлений идиопатического сколиоза в зависимости от степени нарушения, морфогенетических процессов в пластинке роста тел позвонков.

Выводы

1. Этиологическим фактором сколиотической болезни является эктопическая локализация в пластинке роста тел позвонков клеток производных нервного гребня, генетически не детерминированных к хондрогенной дифференцировке и к процессу роста.

2. Локальное нарушение хондрогенеза в пластинке роста тел позвонков больных идиопатическим сколиозом является причиной асимметрии роста и формирования деформации позвоночника при идиопатическом сколиозе.

3. Степень структурных изменений позвоночника и прогноз прогрессирования деформации зависят от уровня нарушения морфогенетических процессов в пластинке роста тел позвонков, заложенных в эмбриогенезе.

Литература/References

1. **Зайдман А.М.** Идиопатический сколиоз. Морфология, биохимия, генетика. Новосибирск, 1993. [Zaidman AM. Idiopathic Scoliosis. Morphology, Biochemistry, Genetics. Novosibirsk, 1994. In Russian].
2. **Зайдман А.М., Михайловский М.В., Садовой М.А.** Нейрофиброматоз и сколиоз. Новосибирск, 2011. [Zaidman AM, Mikhailovsky MV, Sadovoy MA. Neurofibromatosis and Scoliosis. Novosibirsk, 2011. In Russian].
3. **Зайдман А.М., Строкова Е.Л., Новиков В.В., Васюра А.С., Михайловский М.В., Садовой М.А.** Экспрессия генов в хондроцитах пластинки роста у пациентов с идиопатическим сколиозом // Хирургия позвоночника. 2014. № 4. С. 88–98. [Zaidman AM, Strokovaya EL, Novikov VV, Vasyura AS, Mikhailovsky MV, Sadovoy MA. Gene expression in growth plate chondrocytes of patients with idiopathic scoliosis. Hir Pozvonoc. 2014;(4):88–98. In Russian].
4. **Карлсон Б.М.** Основы эмбриологии по Пэттену. М., 1983. [Carlson BM. Patten's Foundations of Embryology. Moscow, 1983. In Russian].
5. **Кнорре А.Г.** Эмбриональный гистогенез. Л., 1971. [Knorre AG. Embryonic Histogenesis. Leningrad, 1971. In Russian].
6. **Токин Б.П.** Общая эмбриология. М., 1977. [Tokin BP. General Embryology. Moscow, 1977. In Russian].

7. **Bronner-Fraser M, Garcia-Castro M.** Manipulations of neural crest cells or their migratory pathways. *Methods Cell Biol.* 2008;87:75–96. DOI: 10.1016/S0091-679X(08)00204-5.
8. **Bundy J, Rogers R, Hoffman S, Conway SJ.** Segmental expression of aggrecan in the non-segmented perinotochordal sheath underlies normal segmentation of the vertebral column. *Mech Dev.* 1998;79:213–7.
9. **Dayer R, Haumont T, Belaieff W, Lascombes P.** Idiopathic scoliosis: etiological concepts and hypotheses. *J Child Orthop.* 2013;7:11–16. DOI: 10.1007/s11832-012-0458-3.
10. **Erickson CA, Perris R.** The role of cell-cell and cell-matrix interactions in the morphogenesis of the neural crest. *Dev Biol.* 1993;159:60–74. DOI: 10.1006/dbio.1993.1221.
11. **Gorman KF, Julien C, Moreau A.** The genetic epidemiology of idiopathic scoliosis. *Eur Spine J.* 2012;21:1905–1919. DOI: 10.1007/s00586-012-2389-6.
12. **Guo X, Chau WW, Hui-Chan CW, Cheung CS, Tsang WW, Cheng JC.** Balance control in adolescents with idiopathic scoliosis and disturbed somatosensory function. *Spine.* 2006;31:E437–E440. DOI: 10.1097/01.brs.0000222048.47010.bf.
13. **Henderson DJ, Ybot-Gonzalez P, Copp AJ.** Over-expression of the chondroitin sulphate proteoglycan versican is associated with defective neural crest migration in the Pax3 mutant mouse (splotch). *Mech Dev.* 1997;69:39–51. DOI: 10.1016/S0925-4773(97)00151-2.
14. **Krull CE.** Inhibitory interactions in the patterning of trunk neural crest migration. *Ann NY Acad Sci.* 1998;857:13–22.
15. **Krull CE, Collazo A, Fraser SE, Bronner-Fraser M.** Segmental migration of trunk neural crest: time-lapse analysis reveals a role for PNA-binding molecules. *Development.* 1995;121:3733–3743.
16. **Le Douarin NM, Teillet MA.** Experimental analysis of the migration and differentiation of neuroblasts of the autonomic nervous system and of neuroectodermal mesenchymal derivatives, using a biological cell marking technique. *Dev Biol.* 1974;41:162–184. DOI: 10.1016/0012-1606(74)90291-7.
17. **Logan M, Martin JF, Nagy A, Lobe C, Olson EN, Tabin CJ.** Expression of Cre Recombinase in the developing mouse limb bud driven by a Prxl enhancer. *Genesis.* 2002;33:77–80. DOI: 10.1002/gene.10092.
18. **Machida M, Dubouset J, Yamada T, Kimura J.** Serum melatonin levels in adolescent idiopathic scoliosis prediction and prevention for curve progression – a prospective study. *J Pineal Res.* 2009;46:344–348. DOI: 10.1111/j.1600-079X.2009.00669.x.
19. **McGonnell IM, Graham A.** Trunk neural crest has skeletogenic potential. *Curr Biol.* 2002;12:767–771. DOI: 10.1016/S0960-9822(02)00818-7.
20. **Miller NH.** Idiopathic scoliosis: cracking the genetic code and what does it mean? *J Pediatr Orthop.* 2011;31(1 Suppl):S49–S52. DOI: 10.1097/BPO.0b013e318202bfe2.
21. **Ogilvie JW.** Update on prognostic genetic testing in adolescent idiopathic scoliosis (AIS). *J Pediatr Orthop.* 2011;31(1 Suppl):S46–S48. DOI: 10.1097/BPO.0b013e3181fd87eb.
22. **Peris R, Perissinotto D.** Role of the extracellular matrix during neural crest cell migration. *Mech Dev.* 2000;95:3–21. DOI: 10.1016/S0925-4773(00)00365-8.
23. **Pettway Z, Domowicz M, Schwartz NB, Bronner-Fraser M.** Age-dependent inhibition of neural crest migration by the notochord correlates with alteration in the S103L chondroitin sulfate proteoglycan. *Exp Cell Res.* 1996;255:195–206. DOI: 10.1006/excr.1996.0170.
24. **Porter RW.** The pathogenesis of idiopathic scoliosis: uncoupled neuro-osseous growth? *Eur Spine J.* 2001;10:473–481.
25. **Roffers-Agarwal J, Gammill LS.** Neuropilin receptors guide distinct phases of sensory and motor neuronal segmentation. *Development.* 2009;136:1879–1888. DOI: 10.1242/dev.032920.
26. **Salehi LB, Mangino M, De Serio S, De Cicco D, Capon F, Semprini S, Pizzuti A, Novelli G, Dallapiccola B.** Assignment of a locus for autosomal dominant idiopathic scoliosis (IS) to human chromosome 17p11. *Hum Genet.* 2002;111:401–404. DOI: 10.1007/s00439-002-0785-4.
27. **Stokes IA, Burwell RG, Dangerfield PH.** Biomechanical spinal growth modulation and progressive adolescent scoliosis – a test of the “vicious cycle” pathogenetic hypothesis: summary of an electronic focus group debate of the IBSE. *Scoliosis.* 2006;1:16. DOI: 10.1186/1748-7161-1-16.
28. **Veldhuizen AG, Wever DJ, Webb PJ.** The aetiology of idiopathic scoliosis: biomechanical and neuromuscular factors. *Eur Spine J.* 2000;9:178–184. DOI: 10.1007/s005860000142.
29. **Wise CA, Gao X, Shoemaker S, Gordon N, Herring JA.** Understanding genetic factors in idiopathic scoliosis, a complex dislase of childhood. *Curr Genomics.* 2008;9:51–59. DOI: 10.2174/138920208783884874.

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

Address correspondence to: Zaidman Alla Mikhaylovna
NNIITO, Frunze str., 17,
Novosibirsk, 630091, Russia,
AZaydman@niito.ru

Статья поступила в редакцию 31.08.2015

Алла Михайловна Зайдман, д-р мед. наук, проф.; Елена Леонидовна Строчкова, научный сотрудник, Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна; Татьяна Августовна Агеева, д-р мед. наук, Новосибирский государственный медицинский университет; Елена Владимировна Киселева, канд. биол. наук; Антон Александрович Струнов, канд. биол. наук; Любовь Александровна Сульдина, аспирант; Александр Игоревич Шевченко, канд. биол. наук, Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск.

Alla Mikhaylovna Zaidman, MD, DMSc, Prof.; Elena Leonidovna Strokova, researcher, Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopaedics n.a. Ya.L. Tsiyuan; Tatyana Avgustovna Ageeva, MD, DMSc, Novosibirsk State Medical University; Elena Vladimirovna Kiseleva, PhD in Biology; Anton Aleksandrovich Strunov, PhD in Biology; Lyubov Aleksandrovna Sul'dina, MD fellow; Shevchenko Aleksander Igorevich, PhD in Biology, Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia.