



ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ В ХОНДРОЦИТАХ ПЛАСТИНКИ РОСТА У ПАЦИЕНТОВ С ИДИОПАТИЧЕСКИМ СКОЛИОЗОМ

А.М. Зайдман¹, Е.Л. Строчкова¹, В.В. Новиков¹, А.С. Васюра¹, М.В. Михайловский¹, М.А. Садовой^{1, 2}

¹Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна

²Новосибирский государственный медицинский университет

Цель исследования — анализ экспрессии генов-кандидатов, предположительно детерминирующих идиопатический сколиоз.

Материал и методы. Исследовали пластинки роста тел позвонков детей в возрасте 11–15 лет, больных идиопатическим сколиозом III–IV ст. Методом ПЦР в режиме реального времени исследовали экспрессию генов регуляции роста, хондрогенной дифференцировки, синтеза и формирования матрикса и сульфатирования и трансмембранного транспорта сульфатов.

Результаты. На фоне репрезентативных морфологических и биохимических данных обнаружили нарушение структурной организации клеток и матрикса на вогнутой стороне деформации, наличие малодифференцированных хондробластов, отсутствие дифференцировки в колонковые и гипертрофические структуры, резкое снижение синтетических потенций клеток, что противоречило данным высокой экспрессии генов IHH, TGFBR1, EGFR, генов основных протеогликанов матрикса ACAN, LUM, VCAN, коллагенов I и II типов, генов сульфатирования и трансмембранного транспорта сульфатов. Была снижена экспрессия гена рецептора гормона роста, генов дифференцировки SOX9, PAX9, гена линк-белка. Факторный анализ исследованных генов показал, что экспрессия генов в хондробластах больных идиопатическим сколиозом и в группе контроля существенно различна.

Заключение. Сложное взаимодействие генов под контролем центральных регуляторных механизмов координирует процесс периодизации включения генов, интегрируя процесс роста позвоночника. Нарушение одного из факторов в сложной системе регуляции морфогенеза приводит к асимметрии роста и формированию сколиотической деформации позвоночника.

Ключевые слова: идиопатический сколиоз, экспрессия генов-кандидатов.

Для цитирования: Зайдман А.М., Строчкова 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.

GENE EXPRESSION IN GROWTH PLATE CHONDROCYTES OF PATIENTS WITH IDIOPATHIC SCOLIOSIS

A.M. Zaidman, E.L. Strokova, V.V. Novikov, A.S. Vasyura, M.V. Mikhailovsky, M.A. Sadovoy

Objective. To analyze the expression of candidate genes presumably responsible for the development of idiopathic scoliosis.

Material and Methods. The study subjects were vertebral body growth plates of children aged 11–15 years suffering from Grade III–IV idiopathic scoliosis. Real-Time SYBR Green PCR assay was used to investigate the expression of genes responsible for growth regulation, chondrogenic differentiation, matrix formation and synthesis, and sulfation and transmembrane transport of sulfates.

Results. Comparative analysis of gene expression did not give a clear answer. On the background of representative morphological and biochemical data including violation of the structural organization of cells and matrix on the concave side of deformity, presence of poorly differentiated chondroblasts, and lack of differentiation in columnar and hypertrophic structures, a sharp decline in synthetic potency of cells contradicted the data on high expression of IHH, TGFBR1, and EGFR genes, matrix proteoglycans genes ACAN, LUM, and VCAN, collagen types I and II, and of sulfation and sulfate transmembrane transport genes DTDST, CHST1, and CHST3. Expression of growth hormone receptor gene, differentiation genes SOX9 and PAX9, and link protein gene was reduced. Factor analysis of the studied genes has shown significant difference between gene expression in chondroblasts of patients with idiopathic scoliosis and that in controls.

Conclusion. Complex interaction of genes under the control of the central regulatory mechanisms coordinates the periodization of gene turning on, thereby integrating the process of the spine growth. Violation of any of the factors in the complex system of morphogenesis regulation causes asymmetric growth resulting in scoliosis development.

Key Words: idiopathic scoliosis, candidate gene expression.

Hir. Pozvonoc. 2014; (4):88–98.

Понимание генетических факторов, лежащих в основе заболевания, помогло бы осуществлять раннюю диагностику, выявление групп риска и принимать более эффективные профилактические и/или терапевтические решения.

K.F. Gorman

Сколиотическая деформация позвоночника – одна из распространенных патологий, поражающих детей и подростков. Со времен Гиппократ и Галена ученые всего мира пытаются выяснить природу заболевания, но, к сожалению, этиологический фактор идиопатического сколиоза остается неизвестным. Вопросы патогенеза также рассматриваются разными авторами противоречиво. По мнению Sharma et al. [14], это объясняется отсутствием достоверной модели, которая повторяла бы этиологию и патогенез идиопатического сколиоза человека. В течение последних десятилетий широко обсуждается генетическая природа идиопатического сколиоза, делаются попытки локализации и идентификации генов-кандидатов, детерминирующих развитие идиопатического сколиоза. К сожалению, полученные данные весьма противоречивы. Gorman et al. [9] подвергли анализу 50 репрезентативных исследований, выполненных в разных регионах мира на различных этнических группах, в которых использованы полногеномные ассоциативные (GWAS) исследования сцепления и т.д. По мнению авторов, отсутствие повторяемости полученных данных зависит от методических неточностей (малые выборки родословных), а главное, от того, что нет четкого определения фенотипа идиопатического сколиоза. Действительно, клинко-рентгенологическими методами первичные (истинные) и вторичные сколиозы иногда трудно различимы. Наш многолетний опыт изучения морфологии сколиоза при различных первичных и вторичных сколиозах (болезни Морфана, дистрофии Дюшена, нейрофиброматозе и т.д.) показал, что в основе развития различных типов сколиоза лежит асимметрия роста, но морфоло-

гия структур позвоночника при этих патологиях отлична. Ярким примером является идиопатическая форма сколиоза при нейрофиброматозе [3, 4].

Настоящее исследование является логическим продолжением предыдущего 35-летнего этапа изучения сколиотической и кифотической деформаций позвоночника. В течение этих лет методами морфологии, гистохимии, электронной микроскопии, иммуногистохимии исследовано более 1000 препаратов – структурных компонентов позвоночника больных идиопатическим сколиозом от начальных до выраженных форм [1]. Совместно с ИЦиГ СО РАН созданы генетически зависимые модели деформации позвоночника [2]. Методом сегрегационного анализа на репрезентативной выборке родословных [7], в которых пробадн болел идиопатическим сколиозом с деформацией позвоночника более 25°, было показано, что идиопатический сколиоз – генетически зависимая патология, контролируемая майор-геном, наследуемая по аутомно-доминантному типу с неполной пенетрантностью генотипов, зависящей от пола и возраста. Показано, что в отсутствие майор-гена идиопатический сколиоз не развивается, следовательно, больные идиопатическим сколиозом II–IV ст. являются носителями майор-гена.

В данном исследовании сделана попытка определить гены, ответственные за развитие идиопатического сколиоза. Были определены маркеры, которые отражают основные патогенетические механизмы развития идиопатического сколиоза.

Цель исследования – анализ экспрессии генов-кандидатов, предположительно детерминирующих идиопатический сколиоз.

Материал и методы

Клинические образцы

Пластинки роста тел позвонков на высоте деформации, ниже и выше неё получены в клинике детской ортопедии Новосибирского НИИТО от 12 детей 11–15 лет, больных идиопатическим сколиозом III–IV ст. Больные подвергались операции anterior releasing and interbody fusion. В качестве контроля были использованы хрящевые структурные компоненты позвоночника эмбриона человека 10–12 недель развития (10 образцов), полученные непосредственно после медицинского аборта от клинически здоровых женщин из лицензированных учреждений Минздрава России в соответствии с утвержденным перечнем медицинских показаний. От всех пациенток имеется письменное информированное согласие на участие в исследовании, эксперименты соответствуют этическим принципам Хельсинской декларации и стандартам биоэтического комитета НИИ МББ СО РАМН.

Получение клеток из образцов ткани

Гиалиновый хрящ пластинок роста и эмбриональный хрящ 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 силиконированной 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 их общее количество в камере Горяева.

Выделение РНК из клеток

Из клеток выделяли суммарную клеточную РНК тризольным методом (TRI reagent) в соответствии с рекомендациями производителя. Осажденную РНК растворяли в 30–50 мкл RNase-free воды.

Обработка выделенной РНК ДНКазой и синтез кДНК

Для удаления возможной примеси геномной ДНК из препарата суммарной клеточной РНК выделенную РНК обрабатывали RNase-free DNase (Fermentas) по рекомендациям производителя. кДНК получали в реакции обратной транскрипции с использованием фермента M-MLV Reverse Transcriptase в присутствии Oligo (dT)15 праймера. Все процедуры проводили в соответствии с рекомендациями производителя. Суммарная РНК (2 мкг) каждого образца была использована для реакции обратной транскрипции в финальном объеме 25 мкл.

Real-time PCR. Все реакции Real-time PCR были выполнены на термоциклере «iCycler IQ 5» в присутствии интеркалирующего флуоресцентного красителя SYBR Green I. Объем реакционной смеси составлял 50 мкл, в том числе 5 мкл кДНК, 3 mM MgCl₂, 65 mM Tris- HCl, pH 8,8, 16 mM (NH₄)₂SO₄, 0,05 % Tween-20, 0,25 mM каждого dNTP, по 2 мкл forward- и reverse-праймера (0,6 μM) и 1 ед. акт. Taq полимеразы (Fermentas). ПЦР в режиме реального времени проводили при следующих условиях: 95 °C – 3 мин. 30 с, затем 40 циклов при 95 °C (20 с), 58–68 °C (15 с), 72 °C (30 с), 82–89,5 °C (10 с), далее при 95 °C (1 мин), 65 °C (30 с.), увеличение температуры с 65 до 95 °C (10 с) – 61 цикл.

Все реакции проводили в тройных независимых повторах, полученные средние значения данных использовали для определения кратности изменений (различий) экспрессии генов. Результаты были оценены с использованием компьютерной программы «iCycler IQ 5». Специфичность проводимой реакции определяли с помощью анализа кривой плавления продуктов амплификации в диапазоне

от 65 до 95 °C с шагом в 1°. Для контроля перекрестного загрязнения ПЦР в выделение РНК включили воду RNase-free, которую затем использовали как отрицательный контроль. В качестве гена домашнего хозяйства был использован ген глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (GAPDH).

Метод стандартной кривой

В качестве стандартов использовали ПЦР-продукты, полученные после амплификации кДНК с использованием специфических праймеров. Для построения калибровочных графиков из полученных стандартов изготавливали серийные разведения и проводили реакцию Real-Time SYBR Green I PCR.

Обработка полученных данных

Для оценки относительного уровня экспрессии мРНК целевых генов ген GAPDH использовали для нормирования образцов: среднее значение целевого гена делили на среднее значение гена GAPDH. Из полученных нормированных данных выбирали наименьшее значение, которое обозначали как калибратор. Для вычисления относительного количества целевого гена нормированные значения целевого гена делили на значение калибратора. Приведены средние значения \pm SD.

Статистический анализ. Статистический анализ результатов выполняли с использованием пакета «Microsoft Office Excel 2007» и стандартного пакета программ «Statistica 6.0». Определяли средние арифметические величины (M), стандартную ошибку средней величины (m). Для выявления вероятности достоверности различий сравниваемых средних величин применяли непараметрический статистический U-критерий Манна – Уитни. Статистически значимыми считали различия при 5 % уровне значимости ($p < 0,05$). Факторный анализ проводили для изучения взаимосвязей между значениями переменных.

Морфология, гистохимия, биохимия, ультраструктурный анализ

Морфологические, гистохимические, биохимические и ультраструктурные исследования клеток и матри-

са пластинок роста тел позвонков больных идиопатическим сколиозом и контрольных образцов выполняли в соответствии с протоколами, описанными ранее [5].

Результаты

Обоснование выбора генов-кандидатов, детерминирующих развитие идиопатического сколиоза

Локализация и идентификация гена/генов предполагает, прежде всего, определение маркера патологии путем сопоставления локальных морфологических и количественных биохимических изменений, связанных с нарушением спектра основных структурных компонентов матрикса хряща. Неоспоримым фактором формирования сколиотической деформации позвоночника является асимметрия роста, что позволило избрать пластинку роста как объект возможной локализации нарушения генетической регуляции роста. К моменту рождения тело позвонка подвергается энхондральному остеогенезу, за исключением хрящевой пластинки, которая генерирует продольный рост позвоночника. Процесс роста в постнатальном периоде – это продолженный морфогенез, состоящий из периодизации пролиферации, дифференцировки от мало- через высокодифференцированные до терминальных хондроцитов, подвергающихся апоптозу и последующему остеогенезу. Регуляция эмбрионального и постнатального эмбриогенеза однотипна [10]. Это позволило в качестве контроля для исследования уровня экспрессии генов избрать эмбриональный позвоночник (12 недель эмбриогенеза).

Морфологические и биохимические критерии асимметрии роста

Структурно-функциональная организация пластинок роста на выпуклой и вогнутой сторонах деформации позвоночника имеет как качественные, так и количественные отличия.

Пластинка роста выпуклой стороны деформации сколиотического позвоночника представлена 4 слоями

(рис. 1). Поверхностный слой, в зависимости от возраста пациента, занимает разный объем, у 4–6-летних это широкий слой, в котором на фоне гомогенного матрикса расположены одиночные хондробласты с крупным ядром и узким ободком цитоплазмы. У 12-летних эта зона значительно уже. В цитоплазме и матриксе определяются хондроитинсульфаты А и С, мелкие гранулы гликогена и ферменты окислительно-восстановительного ряда СДТ; НАДН-диафоразы. В ядре 1–2 ядрышка и диспергированный

хроматин. Ультраструктурная организация этих клеток соответствует стадии дифференцировки. Изогенные группы клеток располагаются горизонтально по отношению к оси позвоночника. В каждой лакуне локализуется 4–5 клеток. Прелакунарное пространство цитоплазмы и матрикса заполнено высокополимерными хондроитинсульфатами (рис. 2). Колонковый слой клеток с вертикально расположенными хондроцитами и интенсивными реакциями метахро-

мазии, альциановым синим цитоплазмы и матрикса (рис. 3).

Перилакунарное пространство представлено гомогенным матриксом. Ультраструктурно определяется четкая хондронная организация хондробластов со сложной микроциркуляторной системой. Хондроциты с центрально расположенным ядром диспергированным и с приядерно расположенным хроматином с одним-двумя ядрышками. В цитоплазме широкая эндоплазматическая сеть с расширенными цистернами. Комплекс Голь-

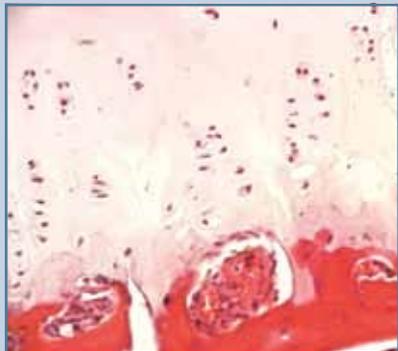


Рис. 1

Выпуклая сторона деформации пластинки роста тела позвонка больного идиопатическим сколиозом; гематоксилин-эозин, ув. 200



Рис. 2

Высокополимерные хондроитинсульфаты в клетках и матриксе пластинки роста выпуклой стороны деформации большого идиопатическим сколиозом; Хейл-реакция, ув. 200

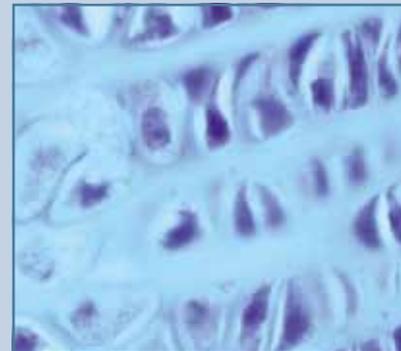


Рис. 3

Колонковый слой клеток пластинки роста выпуклой стороны деформации большого идиопатическим сколиозом; Хейл-реакция, ув. 400

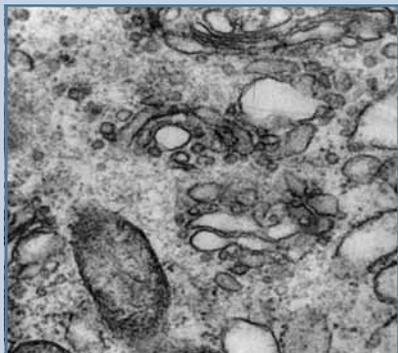


Рис. 4

Ультраструктурная организация хондробласта пластинки роста тела позвонка на выпуклой стороне деформации при идиопатическом сколиозе, ув. 5000



Рис. 5

Вогнутая сторона деформации пластинки роста тела позвонка больного идиопатическим сколиозом; гематоксилин-эозин, ув. 200

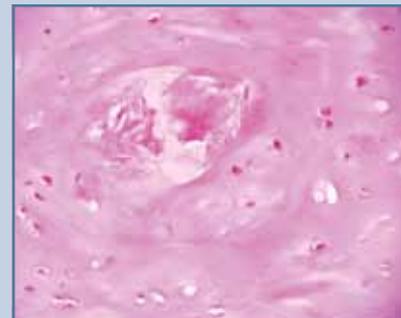


Рис. 6

Дистрофически измененный матрикс и малодифференцированные хондробласты вогнутой стороны деформации пластинки роста тела позвонка больного идиопатическим сколиозом; шик-реакция, ув. 200

джи с большим количеством вакуолей на цис- и трансповерхностях распределен по всей цитоплазме (рис. 4). Вокруг клеток определяются свободные протеогликаны. Коллагеновые волокна, связанные с протеогликанами, ограничивают перилакунарное пространство – своеобразный метаболический барьер. Гипертрофический слой клеток состоит из двух типов хондроцитов: активно синтезирующих и терминальных, часть из которых находится в апоптозе. В эту зону внедряются сосуды с последующим остеогенезом. В клетках колонкового слоя и активных гипертрофических клетках определяются цитоплазматические гранулы СДГ и НАД-диафоразы. Цитоплазма нижних слоев гипертрофических клеток выполнена гранулами щелочной фосфатазы.

Между выпуклой и вогнутой сторонами деформации пластинки роста расположен бесклеточный матрикс, содержащий высокополимерные протеогликаны.

Вогнутая сторона деформации пластинки роста лишена зональной структуры (рис. 5). На фоне дистрофически измененного матрикса беспорядочно располагаются малодифференцированные хондробласты (рис. 6). В нижних слоях локализуются редкие изогенные группы, состоящие из 2–3 клеток, объединенных в лакуне. В матриксе и в клетках отсутствуют высокополимерные хондроитинсульфаты, но в мембранах и в околоклеточных пространствах выявляются низкополимерные хондроитинсульфаты А и С в виде точечных включений (рис. 7). Ультраструк-

тура хондробластов соответствует степени дифференцировки клеток: крупное ядро с приядерно расположенным хроматином и одним ядрышком. В цитоплазме расположена эндоплазматическая сеть с расширенными цистернами. Комплекс Гольджи с единичными вакуолями единичен и расположен в околядерной области (рис. 8). В клетках нижних слоев, прилежащих к костной ткани, цитоплазма хондроцитов выполнена вакуолями, ядро пикнотично. Формирование костной ткани в пластинке роста вогнутой стороны деформации происходит, минуя соответствующие стадии дифференцировки хондроцитов по типу формирования эпифиза тел позвонков в эмбриогенезе.

Как видно из фактических данных, структурная организация пластинки роста на выпуклой и вогнутой сторонах деформации имеет отличия (табл. 1).

Кроме качественных морфогистохимических исследований, методом количественной биохимии определен уровень синтеза протеогликана на выпуклой и вогнутой сторонах вершины деформации (табл. 2).

Идентификацию протеогликанов, выделенных из пластинки роста тел позвонков больных идиопатическим сколиозом, проводили методом электрофореза (рис. 9).

Нарушение структурной организации клеток и матрикса на вогнутой стороне деформации является патогенетическим фактором асимметрии роста, что явилось основанием для выбора возможных генов-кандидатов, детерминирующих идиопатический сколиоз: гены регуляции роста (GHR, EGFR, IGF1R, TGFBR1), гены дифференцировки хондроцитов (ИНН, PAX1, PAX9, SOX9), регуляции синтеза и структуры протеогликанов матрикса

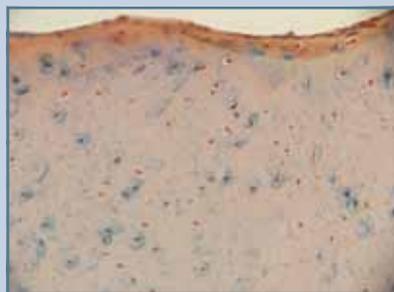


Рис. 7

Низкополимерные хондроитинсульфаты в клетках и матриксе пластинки роста вогнутой стороны деформации большого идиопатическим сколиозом; Хейл-реакция, ув. 200

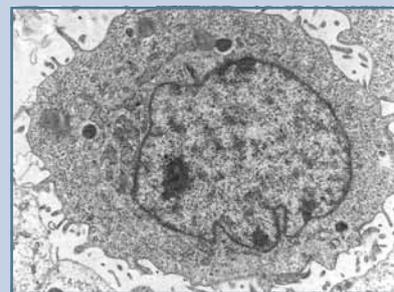


Рис. 8

Ультраструктурная организация хондробласта пластинки роста тела позвонка на вогнутой стороне деформации при идиопатическом сколиозе, ув. 5000

Таблица 1

Структурная организация пластинки роста на выпуклой и вогнутой сторонах деформации

Характеристика	Выпуклая сторона деформации	Вогнутая сторона деформации
Зональность	Сохранена	Отсутствует
Дифференцировка, пролиферация	Сохранена	Отсутствует
Синтез протеогликанов	Сохранен	Нарушен синтез хондроитинсульфата-кератансульфата
Полимерность протеогликанов	Высокая	Низкая
Структура матрикса	Сохранена	Дистрофически изменена

Таблица 2

Характеристика протеогликанов (ПГ) пластинки роста тел позвонков с разных сторон кривизны позвоночника больных идиопатическим сколиозом

Характеристика	Выпуклая сторона деформации (n = 18)		Вогнутая сторона деформации (n = 18)	
	ПГ1	ПГ2	ПГ1	ПГ2
Выход ПГ, мкг на мг сырого веса ткани (относительное количество пула ПГ2, %)	18,40 ± 2,25	38,20 ± 3,89*	10,20 ± 1,56*	28,80 ± 1,74 ^{1,2}
Хондроитинсульфат/ кератансульфат	1,280 ± 0,098	0,750 ± 0,058*	0,810 ± 0,065*	0,590 ± 0,041 ^{1,2}
Степень сульфатирования, %	30,20 ± 2,78	5,70 ± 0,65*	18,40 ± 0,15*	7,70 ± 0,84 ²

ПГ1 – диффузные; ПГ2 – связанные с коллагеном;

*достоверное различие $p < 0,05$;

1 достоверное различие с аналогичным пулом выпуклой стороны;

2 достоверное различие с ПГ вогнутой стороны.

(ACAN, LUM, VCAN, COL1A1, COL2A1, HARLN1), сульфатирования и трансмембранного транспорта сульфатов (DTDST, CHST1, CHST3).

Сравнительный анализ экспрессии генов-кандидатов в хондроцитах пластинок роста больных идиопатическим сколиозом

Экспрессия гена рецептора гормона роста (GHR) в хондроцитах пластинок роста тел позвонков в сравнении с контролем оказалась низкой ($p < 0,05$) (рис. 10). Уровень экспрессии гена рецептора инсулинзависимого фактора роста (IGF1R) между сколиозными образцами и нормой не отличался. К группе регуляторов роста относятся гены EGFR и TGFBR1. Уровень их мРНК рецепторов оказался высоким (рис. 11). EGFR – это трансмембранный гликопротеин, при его взаимодействии с EGF происходит активация тирозинкиназы и запускаются внутриклеточные процессы, в результате которых стимулируется синтез ДНК с последующей пролиферацией хондробластов. В наших исследованиях высокая экспрессия EGFR на фоне крайне низкой пролиферативной активности остается необъяснимой. Высокой оказалась и экспрессия гена TGFBR1. Рецептор TGF – протеогликан мембраны, который при действии с TGF тормозит дифференцировку хрящевых клеток. Периодизация включения перечисленных генов определяет функцию роста. Остается неясным отсутствие

процесса пролиферации хондроцитов в пластинках роста на фоне высокой активности гена TGFBR1. Наиболее вероятным является нарушение взаимодействия этих генов [12, 13].

Так как процесс роста – это продолженный в постнатальном периоде морфогенез, в качестве генов-кандидатов исследованы гены семейства PAX, которые продуцируют ДНК-связывающие белки, являющиеся внутриядерными факторами транскрипции. В развитии аксиального скелета ген PAX1 определяет паттерн сегментации склеротома и развитие межпозвоночного диска [6, 8]. В хондробластах пластинок роста больных идиопатическим сколиозом выявлен высокий уровень экспрессии гена хондрогенной дифференцировки PAX1 и низкий уровень экспрессии гена PAX9 (рис. 12, 13). Несколько неожиданными были результаты высокой экспрессии гена INH, который в норме экспрессируется в прегипертрофических хондроцитах пластинки роста [15]. Наличие единичных гипертрофических клеток в пластинках роста вогнутой стороны деформации больных идиопатическим сколиозом противоречит высокой экспрессии гена INH. Дифференцировка клеток хондрогенного ряда в сомитах и в постнатальном периоде в пластинках роста связана с экспрессией гена SOX9. Низкий уровень экспрессии гена SOX9 при идиопатическом сколиозе может быть одной из причин нарушения



Рис. 9

Фореграмма образцов гликозаминогликанов пластинки роста тела позвонка больного идиопатическим сколиозом, рестриктированных ферментами (вогнутая сторона деформации позвоночника): 1 – стандарт; 2 – нативный образец; 3 – обработанный кератаназой; 4 – обработанный хондроитиназой AC; 5 – обработанный последовательно кератаназой и хондроитиназой AC (кератан-связанная фракция)

дифференцировки и пролиферации хондроцитов в пластинках роста и тем самым нарушения роста.

Отсутствие сосудов в хрящевой ткани, транспорт и элиминация метаболитов путем диффузии определяют роль матрикса в системе «хондроцит – матрикс». Основными структурными компонентами матрикса являются коллаген и протеогликаны. Коллаген выполняет формообразующую и ста-

билизирующую функции. Коллаген I типа локализуется в эмбриональном хряще, а в зоне энхондрального остеогенеза инициирует дифференцировку остеобластов. Коллаген II типа является составной частью матрикса зрелого хряща, образует структурную основу хондрона и в связи с протеогликанами формирует хондрометаболический барьер [1]. Протеогликаны хрящевой ткани несут метаболическую, барьерную, рецепторную и другие функции. Агрекан – самый представительный протеогликан хряща, содержит до 100 цепей хондроитинсульфата, ковалентно связанных с белковым кором. Связь агрекана с гиалуроновой кислотой через линк-белок определяет полимерность последнего. Локализованный на поверхности мембраны агрекан выполняет также рецепторную функцию. Важным составляющим матрикса хряща является версикан – компонент внеклеточного матрикса, содержащий длинные цепи хондроитинсульфата и участвующий в формировании хондрона, стабилизации матрикса, пролиферации клеток, адгезии и миграции в раннем эмбриогенезе. Функции люмикана – организация и связывание коллагеновых волокон. Эти краткие данные явились основанием для исследования генов агрекана, версикана, люмикана, коллагенов I и II типов как возможных генов-кандидатов, ответственных за развитие идиопатического сколиоза. Исследование показало, что экспрессия этих генов на выпуклой и вогнутой сторонах деформации не отличалась от нормы. Вместе с тем экспрессия гена линк-белка (HAPLN1) оказалась низкой (рис. 14), что соответствовало морфологическим данным (низкому полимерному состоянию протеогликанов в пластинках роста больных идиопатическим сколиозом).

Нарушение синтеза гликозаминогликана в пластинках роста тел позвонков на вогнутой стороне деформации явилось основанием для исследования генов, кодирующих процесс сульфатирования: гена сульфотрансферазы 1 (CHST1), сульфотрансферазы 3 (CHST3) и гена транс-

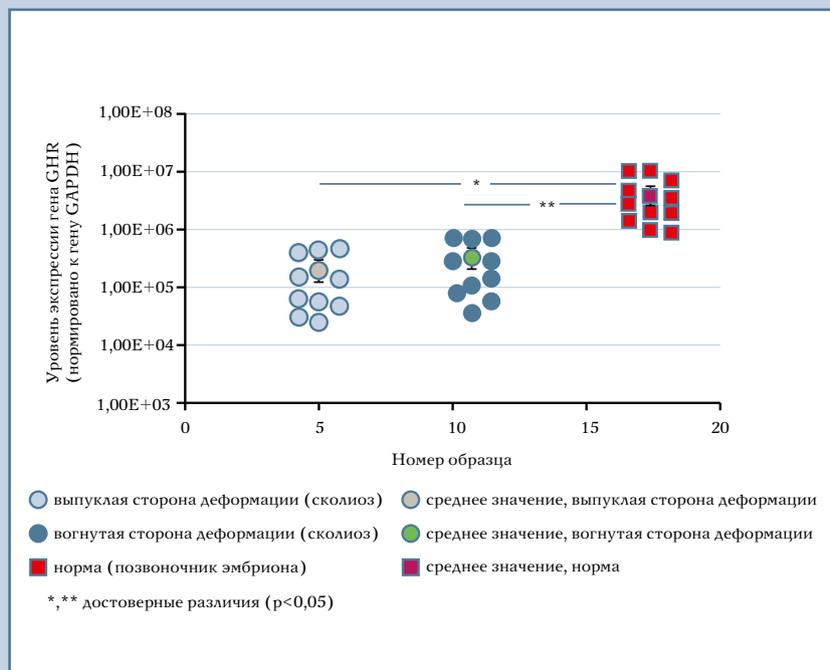


Рис. 10

Уровень экспрессии гена рецептора гормона роста (GHR) в контроле выше по сравнению со сколиозным материалом

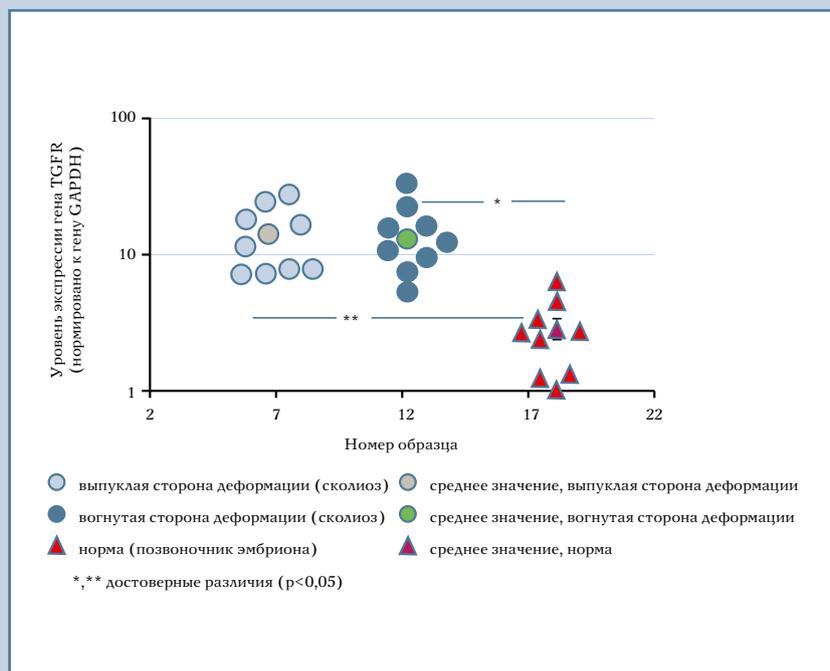


Рис. 11

Уровень экспрессии гена TGFR и гена рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) в сколиозных хондробластах и в контроле

мембранного транспорта сульфатов. Уровень экспрессии гена сульфотрансферазы 1 (CHST1) в хондроцитах больных сколиозом и в норме оказался одинаковым. Уровень экспрессии гена переносчика сульфатов (DTDST) и гена сульфотрансферазы 3 (CHST3), катализирующего сульфатное присоединение протеогликана в межклеточном матриксе, был высоким (рис. 15).

Совокупность экспрессии генов в норме и патологии была исследована методом факторного анализа. Факторный анализ исследованных генов показал, что экспрессия генов регуляции, дифференцировки, пролиферации, синтеза протеогликанов и основных структурных компонентов матрикса в хондробластах больных идиопатическим сколиозом и в группе контроля существенно различна (рис. 16).

Обсуждение

В настоящем исследовании были поставлены два вопроса: являются ли исследованные гены этиологическим фактором идиопатического сколиоза и существует ли зависимость между клиническим фенотипом идиопатического сколиоза и нарушением основных клеточных процессов (пролиферации, дифференцировки, синтеза и формирования дефинитивных структур позвонков в процессе роста)?

Для ответа на эти вопросы была исследована экспрессия генов, регулирующих основополагающие процессы морфогенеза (регуляцию роста, дифференцировку, пролиферации хондробластов, синтез протеогликанов и формирование матрикса хряща). Анализ экспрессии исследованных генов не дал однозначного ответа. На фоне репрезентативных морфологических и биохимических данных (нарушения структурной организации клеток и матрикса на вогнутой стороне деформации, наличия малодифференцированных хондробластов, отсутствия дифференцировки колонковых и гипертрофических структур) резкое снижение синтетических потенций

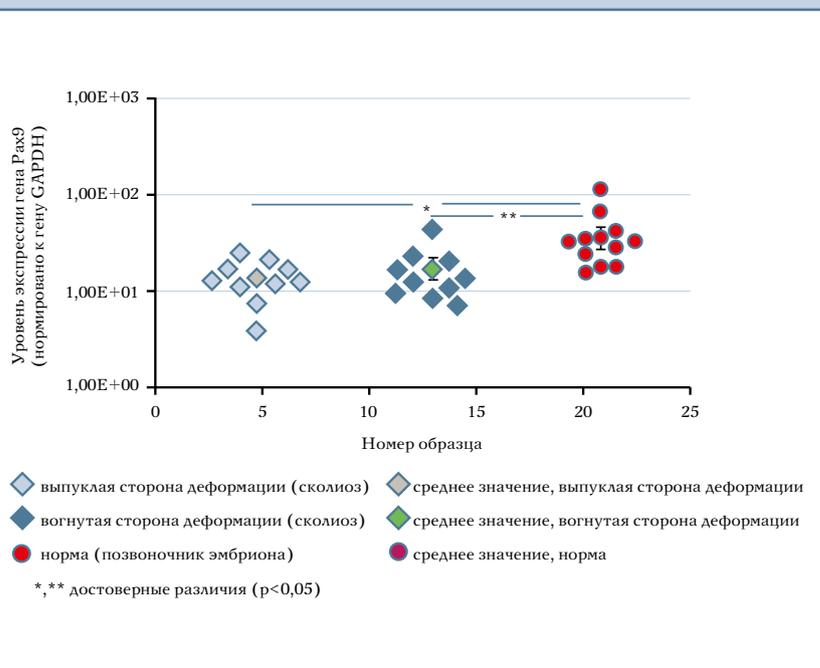


Рис. 12

Уровень мРНК генов Sox9 и Pax9 в норме выше в сравнении со сколиозным материалом

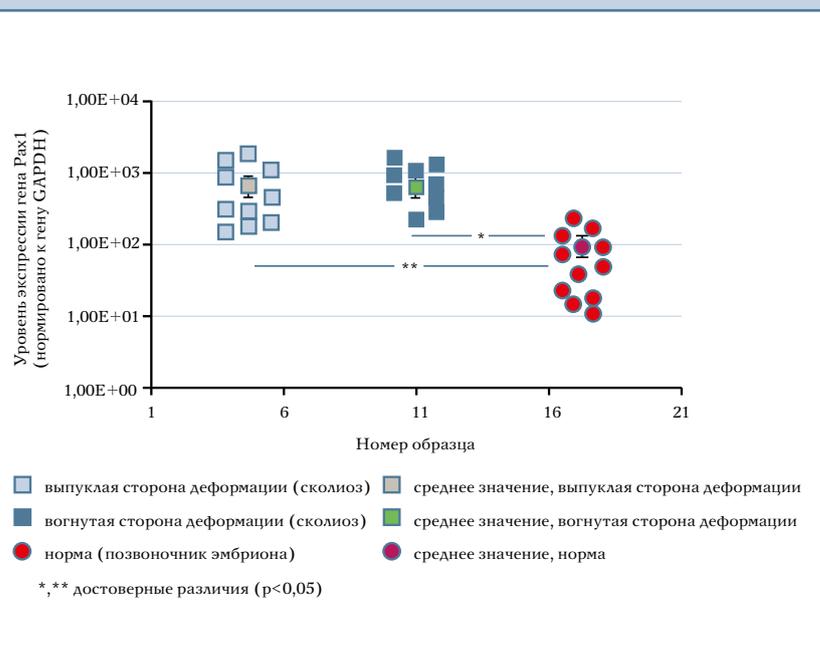


Рис. 13

Высокий уровень экспрессии гена Pax1 и гена ИИИ в хондроцитах больных идиопатическим сколиозом

клеток противоречило данным высокой экспрессии генов IHH, TGFBR1, EGFR, генов основных протеогликанов матрикса ACAN, LUM, VCAN, коллагенов I и II типов, генов сульфатирования и трансмембранного транспорта сульфатов (DTDST, CHST1, CHST3). Экспрессия гена рецептора гормона роста, генов дифференцировки SOX9, PAX9, гена линк-белка (HAPLN1) была снижена. Возникает вопрос о соответствии уровней экспрессии исследованных генов стадии морфогенеза (гистогенеза) хондробластов пластинок роста вогнутой стороны деформации позвоночника. Ответ положительный. На вогнутой стороне деформации пластинок роста наблюдается высокий уровень экспрессии генов Col 1A, Pax1, низкий уровень экспрессии GHR и высокий уровень IGFIR, TGFBR1, что характерно для ранних стадий дифференцировки хондробластов, регуляция которых осуществляется методом индукции (хорда – сомиты). Низкополимерные протеогликаны в цитоплазме хондроцитов и матриксе соответствуют низкому уровню экспрессии HAPLN1. Высокий уровень экспрессии генов сульфатирования и транспорта сульфатов (DTDST, CHST1, CHST3) объясняется нарушением структуры молекул протеогликанов. На фоне синтеза корового белка (высокая экспрессия генов протеогликанов матрикса ACAN, LUM, VCAN, Col2A1) это свидетельствует о нарушении процесса сульфатирования протеогликанов, что характерно для ранних стадий хондрогенеза. Каким образом можно было эти данные трактовать?

Периодизация роста зависит от временного включения генов пролиферации, дифференцировки и последующего остеогенеза. Экспрессия соответствующих генов и определяет нормальный гистогенез (морфогенез). Нарушение цикличности и взаимодействия генов приводит к формированию аномальных структур [11]. Надо полагать, что подобная трактовка вполне объясняет результаты настоящего исследования. Одним из важных аргументов адекватности

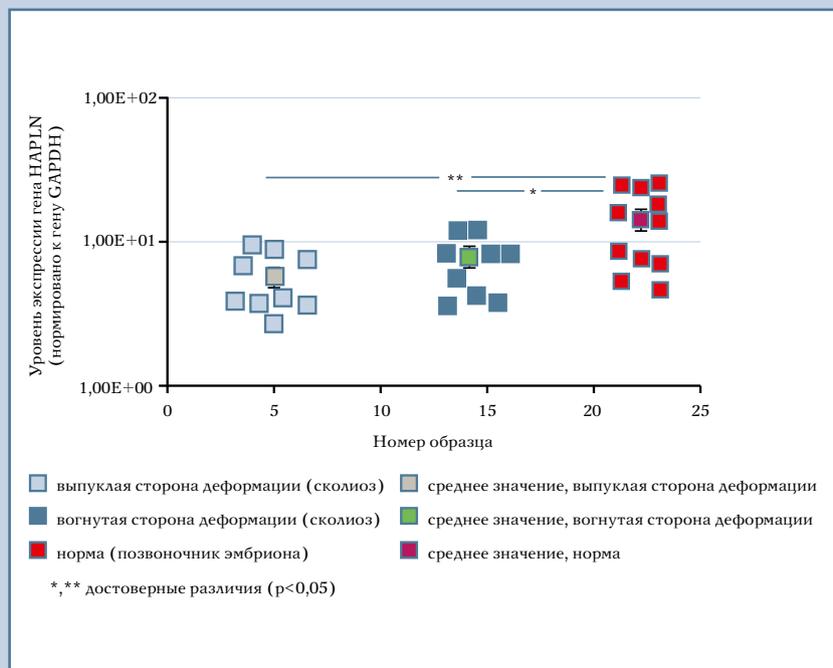


Рис. 14

Уровень мРНК гена линк-белка в эмбриональных хондробластах выше, чем в сколиозных

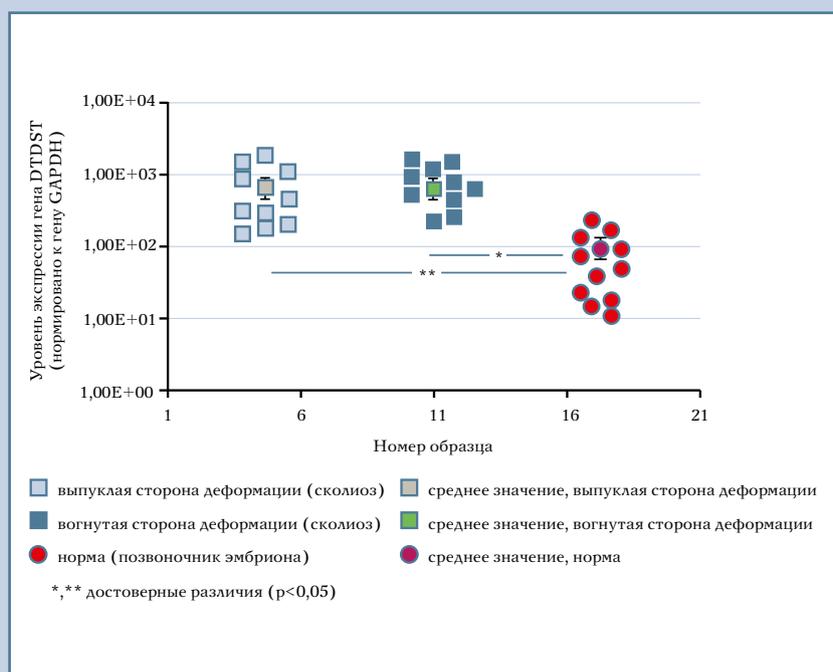


Рис. 15

Уровень экспрессии генов CHST3 и DTDST в сколиозных хондробластах выше, чем в контроле



полученных данных являются статистические данные (факторный анализ), свидетельствующие о достоверном отличии уровней экспрессии

исследуемых генов в контрольных и сколиозных хондробластах.

Остается без ответа вопрос о том, как объяснить отсутствие дифферен-

цировки клеток и последующего остеогенеза на вогнутой стороне деформации позвоночника. На основании факторного анализа высказано предположение об иной природе этих клеток, недетерминированных процессу дифференцировки и последующему остеогенезу. Подобное предположение легло в основу гипотезы о роли депонирования клеток нервного гребня в формирующихся структурах позвоночника. Исследование продолжается.

Заключение

Сложное взаимодействие генов под контролем центральных регуляторных механизмов координирует процесс периодизации включения генов, тем самым интегрирует процесс роста позвоночника. Нарушение одного из факторов в сложной системе морфогенеза позвоночника может быть причиной асимметрии роста и формирования деформации позвоночника. Определение природы клеток (генофенотипа) на вогнутой стороне деформации на основе предложенной гипотезы является следующим этапом исследований.

Литература

1. **Зайдман А.М.** Идиопатический сколиоз: морфология, биохимия, генетика. Новосибирск, 1994. [Zaidman AM. Idiopathic Scoliosis: Morphology, Biochemistry, Genetics. Novosibirsk, 1994. In Russian].
2. **Зайдман А.М., Бородин П.М., Русова Т.В.** Экспериментальная модель наследственной деформации позвоночника // Вестн. травматол. и ортопед. им. Н.Н. Приорова. 2003. № 4. С. 69–73. [Zaidman AM, Borodin PM, Rusova TV. Experimental model of congenital spinal deformity. Vestn. travmatol. i ortoped. im. N.N. Priorova. 2003;(4):69–73. In Russian].
3. **Зайдман А.М., Михайловский М.В., Садовая Т.Н.** Структурно-функциональные особенности деформации позвоночника при нейрофиброматозе NF-1 // Хирургия позвоночника. 2008. №3. С. 73–80. [Zaidman AM, Mikhailovsky MV, Sadovaya TN. Structural and functional peculiarities of spine deformity development in neurofibromatosis NF-1. Hir Pozvonoc. 2008;(3):73–80. In Russian].
4. **Зайдман А.М., Михайловский М.В., Садовой М.А.** Сколиоз и нейрофиброматоз. Новосибирск, 2011. С. 107. [Zaidman AM, Mikhailovsky MV, Sadovoy MA. Neurofibromatosis and Scoliosis. Novosibirsk, 2011. In Russian].
5. **Зайдман А.М., Садовой М.А., Строкова Е.Л. и др.** Морфофункциональные закономерности регуляции хондрогенеза пластинок роста тел позвонков и подвздошной кости // Хирургия позвоночника. 2013. № 3. С. 68–80. [Zaidman AM, Sadovoy MA, Strokova EL, et al. Morphofunctional laws regulating chondrogenesis in vertebral and iliac bone growth plates. Hir Pozvonoc. 2013;(3):68–80. In Russian]. doi: <http://dx.doi.org/10.14531/ss2013.3.68-80>.
6. **Andersen E, Sonnesen L, Kjaer MS, et al.** The prenatal cranial base complex and hand in Turner syndrome. Eur J Orthod. 2000;22:185–194.
7. **Axenovich TI, Zaidman AM, Zorkoltseva IV, et al.** Segregation analysis of idiopathic scoliosis, demonstration of a major gene effect. Am J Med Genetics. 1999;86:389–394.
8. **DiPaola CP, Farmer JC, Manova K, et al.** Molecular signaling in intervertebral disk development. J Orthop Res. 2005;23:1112–1119.
9. **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](https://doi.org/10.1007/s00586-012-2389-6).
10. **James CG, Stanton LA, Agoston H, et al.** Genome-wide analyses of gene expression during mouse endochondral ossification. PLoS ONE. 2010;5:e8693. doi: [10.1371/journal.pone.0008693](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008693).

11. **Kornak U, Mundlos S.** Genetic disorders of the skeleton: a developmental approach. *Am J Hum Genet.* 2003;73:447–474, 2003.
12. **Massague J, Chen YG.** Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev.* 2000;14:627–644.
13. **Miyazono K, Kusanagi K, Inoue H.** Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. *J Cell Physiol* 2001;187:265–276.
14. **Sharma S, Gao X, Londono D, et al.** Genome-wide association studies of adolescent idiopathic scoliosis suggest candidate susceptibility genes. *Hum Mol Genet.* 2011;20:1456–1466. doi: 10.1093/hmg/ddq571.
15. **Vortkamp A, Lee K, Lanske B, et al.** Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science.* 1996;273:613–622.

Адрес для переписки:

Зайдман Алла Михайловна
630091, Новосибирск, ул. Фрунзе, 17,
НИИТО,
AZaydman@niito.ru

Статья поступила в редакцию 20.01.2014

Алла Михайловна Зайдман, д-р мед. наук, проф.; Елена Леонидовна Строчкова, науч. сотрудник; Вячеслав Викторович Новиков, канд. мед. наук; Александр Сергеевич Васюра, канд. мед. наук; Михаил Витальевич Михайловский, д-р мед. наук, проф., Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна; Михаил Анатольевич Садовой, д-р мед. наук, проф., Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна, Новосибирский государственный медицинский университет.

Alla Mikhailovna Zaidman, MD, DMSc, Prof.; Elena Leonidovna Strokova, researcher; Vyacheslav Viktorovich Novikov, MD, PhD; Aleksandr Sergeevich Vasyura, MD, PhD; Mikhail Vitalyevich Mikhailovsky, MD, DMSc, Prof., Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopaedics n.a. Ya.L. Tsiyuan; Mikhail Anatolyevich Sadovoy, MD, DMSc, Prof., Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopaedics n.a. Ya.L. Tsiyuan, Novosibirsk State Medical University.