

На правах рукописи

Строкова Елена Леонидовна

**МОРФО-ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ
ОСОБЕННОСТИ ПЛАСТИНОК РОСТА ТЕЛ ПОЗВОНКОВ
ПРИ ИДИОПАТИЧЕСКОМ СКОЛИОЗЕ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Новосибирск – 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л.Цивьяна» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

Заслуженный деятель науки РФ
доктор медицинских наук, профессор

Зайдман Алла Михайловна

Официальные оппоненты:

Бгатова Наталия Петровна, доктор биологических наук, профессор, НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» (Новосибирск), заведующая лабораторией ультраструктурных исследований.

Сорокина Ирина Васильевна, доктор биологических наук, ФГБУН Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, ведущий научный сотрудник лаборатории фармакологических исследований.

Ведущая организация:

ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2020 г. в _____ час. на заседании совета Д 001.048.05 в ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» по адресу 630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» <http://frcftm.ru>

Автореферат разослан «_____» _____ 2020 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
доктор биологических наук,
профессор

Молодых Ольга Павловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Идиопатический сколиоз – это тяжелейшая патология, поражающая 2–3% детей школьного возраста во всем мире (Sharma S. et al., 2011; Fadzan M., Bettany-Saltikov J., 2017). Заболевание характеризуется прогрессирующей в процессе роста клиновидной и торсионной деформацией позвонков, неизбежно приводящей к искривлению ребер и грудной клетки и, как следствие, к развитию физической неполноценности, сердечно-сосудистой и дыхательной недостаточности. Итогом патологического процесса является инвалидизация и ранняя смерть больных. Средства профилактики этой болезни до сих пор не разработаны. За последние десятилетия стандарт лечения сколиоза не изменился: от начального наблюдения до корсетолечения и хирургической коррекции в качестве последнего средства (Fazal M.A., Edgar M., 2006).

Начиная со времен Гиппократов и по настоящее время идиопатический сколиоз является предметом многочисленных разнонаправленных исследований, однако единого представления относительно этиологии и патогенеза заболевания не сформировано. В качестве этиологических факторов развития данной патологии были предложены нарушение роста позвоночника, параспинальная дисфункция мышц, гормональные нарушения и воспаление (Zhou S. et al., 2012). В соответствии с современными представлениями, в возникновении и развитии идиопатического сколиоза ключевую роль играют наследственные факторы (Chan V. et al., 2002; Sharma S. et al., 2011; Takahashi Y. et al., 2011; Gorman K.F. et al., 2012; Terhune E.A. et al., 2018).

В результате генетических исследований выявлены полиморфные варианты генов (SNPs) и определены несколько локусов, ассоциированных с предрасположенностью к подростковому идиопатическому сколиозу (Zhou S. et al., 2012; Burwell R.G. et al., 2016; Kou I. et al., 2019). Однако, несмотря на многочисленные исследования и большой объем полученных данных, генетические механизмы заболевания остаются не выясненными. При этом выявление генов, гипер- или гипоекспрессия которых приводит к развитию идиопатического сколиоза или ассоциирована с идиопатическим сколиозом, открыло бы пути для ранней диагностики, прогноза, профилактики, и, возможно, коррекции патологии современными методами молекулярной биологии, например, методами редактирования геномов (CRISPR) (Валетдинова К.Р., 2016). Понимание факторов, лежащих в основе заболевания, позволит избежать тяжелых операций и длительной реабилитации определенной категории больных.

В постнатальном периоде рост позвонков происходит за счет пластинки роста – остатка эмбриональной хрящевой ткани, представленного 4-мя слоями клеток. Посредством пролиферации и дифференцировки малодифференцированных хондробластов пластинки роста в гипертрофический хондроцит осуществляется последующий остеогенез формируемой ткани (Kornak U., Mundlos S., 2003). Морфологическими и биохимическими исследованиями (Зайдман А.М. и др., 2004) при идиопатическом сколиозе было показано, что патогенетическим механизмом формирования деформации позвоночника является асимметрия роста. Асимметрия роста связана с нарушением функционирования хондробластов на вогнутой стороне деформации позвоночника. Пластинка роста на вогнутой стороне представлена малодифференцированными клетками, находящимися на ранних стадиях гистогенеза. Структура пластинки роста на выпуклой стороне деформации позвоночника сохранена и представлена хондробластами, проходящими соответствующие стадии дифференцировки до последующего остеогенеза (Зайдман А.М. и др., 2004).

Возможно предположить, что в основе асимметрии роста лежит нарушение генетической регуляции роста позвоночника на вогнутой стороне деформации. Гены, участвующие в регуляции роста и синтетической функции клеток пластинок роста тел позвонков, могут быть вовлечены в формирование патологических изменений хрящевой ткани. Таким образом, логичным является исследование профиля экспрессии генов в хондробластах пласти-

нок роста тел позвонков, т. е. в области локализации патологии. Большинство генетических исследований используют для анализа геномную ДНК пациентов с идиопатическим сколиозом и их родственников (Miller N.H. et al., 2006; Gorman K.F. et al., 2012; Kou I. et al., 2019). Однако структурно-функциональные нарушения костной и хрящевой тканей позвонков могут быть обусловлены не только генетическими, но и эпигенетическими механизмами. В связи с этим предпринято исследование экспрессии генов в хондробластах пластинок роста тел позвонков у детей, больных идиопатическим сколиозом III–IV степени. Ранее было показано, что на ранних стадиях идиопатического сколиоза (Зайдман А.М., 1994) асимметрия роста является общим патогенетическим признаком как для II, так и для III–IV степеней. В настоящее время дети со II степенью сколиоза оперативному лечению не подвергаются.

Степень разработанности темы исследования. В настоящее время широко изучается генетическая основа идиопатического сколиоза. На различных популяционных выборках выявлены локусы и гены восприимчивости к данному заболеванию (Takahashi Y. et al., 2011; Kou I. et al., 2019). Исследованию подвергаются десятки тысяч образцов ДНК детей, больных идиопатическим сколиозом, и их родственников. Однако профиль экспрессии генов в пластинках роста тел позвонков при идиопатическом сколиозе, т.е. в месте локализации патологии, по-прежнему не определен. Имеющиеся данные об экспрессии единичных генов в пластинках роста тел позвонков (Wang S. et al., 2010) не позволяют объяснить патогенетический механизм формирования деформации позвоночника при рассматриваемой патологии. Не выявлена взаимосвязь морфо-гистохимических показателей с экспрессией основных генов, определяющих структурно-функциональные особенности хондробластов и матрикса хряща пластинок роста тел позвонков у детей, больных идиопатическим сколиозом.

В доступной литературе представлены данные о структуре хряща, тогда как по-прежнему не определена взаимосвязь структурно-функциональных особенностей и профиля экспрессии генов в хрящевой ткани разной локализации в критические периоды роста в норме. В связи с вышеизложенным изучение закономерностей и особенностей функционирования клеток и матрикса пластинок роста тел позвонков в разные периоды роста в норме представляет бесспорный научный интерес и может служить основой для исследования патологических процессов в хрящевой ткани.

Цель исследования – изучить зависимость структурно-функциональной организации от профиля экспрессии генов в пластинках роста тел позвонков при идиопатическом сколиозе.

Задачи исследования:

1. Изучить структурно-функциональную организацию и профиль экспрессии генов в пластинках роста тел позвонков в критические периоды роста в норме.
2. Изучить морфо-гистохимические особенности клеток и матрикса пластинок роста тел позвонков при идиопатическом сколиозе.
3. Оценить профиль экспрессии генов, определяющих структурно-функциональные особенности матрикса хряща и сульфатирование протеогликанов пластинок роста тел позвонков при идиопатическом сколиозе.
4. Изучить профиль экспрессии генов регуляции роста позвоночника и хондрогенной дифференцировки клеток пластинок роста тел позвонков при идиопатическом сколиозе.
5. Провести сравнительный анализ профиля экспрессии генов в хондробластах пластинок роста тел позвонков при идиопатическом сколиозе относительно контрольной группы.

Научная новизна. Впервые с помощью комплексного морфологического и ПЦР анализа проведено исследование пластинок роста тел позвонков в норме в критические периоды роста (новорожденность, 2 нед, 1, 3 и 6 мес) на модели мини-свиней. Показано, что структурно-функциональная организация и регуляция роста пластинок роста тел позвон-

ков в разные возрастные периоды различны. В период полового созревания пластинка роста тела позвонка характеризуется интенсивной дифференцировкой хондробластов и соответствует стадии дифференцированного хондроцита.

Впервые в хондробластах пластинок роста тел позвонков при идиопатическом сколиозе в области локализации патологии методами количественной и качественной ПЦР проведено исследование экспрессии генов, принимающих участие в регуляции роста позвоночника, процессе хондрогенной дифференцировки и определяющих структурно-функциональные особенности матрикса хряща и сульфатирование протеогликанов.

Впервые показано, что уровень экспрессии генов *ACAN*, *LUM*, *VCAN*, *COL2A1*, определяющих структурно-функциональные особенности матрикса хряща в пластинках роста тел позвонков при идиопатическом сколиозе, не отличается от контроля. Уменьшение уровня экспрессии гена *HAPLN1* в хондробластах пластинок роста тел позвонков приводит к снижению полимерности протеогликанов. Увеличение экспрессии генов сульфатирования протеогликанов *CHST3* и *SLC26A2* приводит к повышению содержания сульфатсодержащих групп, не связанных с гиалуроновой кислотой, и объясняет низкое полимерное состояние протеогликанов.

Впервые в клетках пластинок роста тел позвонков при идиопатическом сколиозе выявлено нарушение экспрессии генов, играющих ключевую роль в дифференцировке хондробластов. Повышенный уровень экспрессии гена *INH* приводит к замедлению процесса гипертрофии хондроцитов и сохранению клеток в негипертрофическом пролиферативном состоянии. Сбой взаимодействия генов *PAX1* и *PAX9*, высокий уровень экспрессии гена *TGFR1* и снижение экспрессии генов *GHR* и *SOX* приводят к нарушению процессов хондрогенной дифференцировки в пластинках роста тел позвонков при идиопатическом сколиозе.

Впервые проведен сравнительный анализ профиля экспрессии генов в хондробластах пластинок роста тел позвонков при идиопатическом сколиозе относительно контрольной группы. Показано, что профиль экспрессии генов, регулирующих процесс хондрогенной дифференцировки, определяющих структурно-функциональные особенности матрикса хряща и сульфатирование протеогликанов, при идиопатическом сколиозе имеет принципиальные отличия от профиля экспрессии генов в контрольных хондробластах (по данным факторного анализа).

Теоретическая и практическая значимость работы. Получены новые знания о структурно-функциональной организации пластинок роста тел позвонков и регуляции процесса хондрогенной дифференцировки в критические периоды развития в норме (новорожденность, 2 нед, 1, 3 и 6 мес на модели мини-свиней).

С помощью количественной и качественной ПЦР получены новые данные о нарушении экспрессии генов хондрогенной дифференцировки, рецепторов транскрипционных и ростовых факторов, генов сульфатирования и полимерности протеогликанов в хондробластах пластинок роста тел позвонков при идиопатическом сколиозе. Обнаружены различия в профиле экспрессии генов в хондробластах пластинок роста тел позвонков при идиопатическом сколиозе и в контрольных хондробластах.

Понимание морфо-гистохимических и генетических особенностей пластинок роста тел позвонков при идиопатическом сколиозе является фундаментальной основой для оценки биомеханических условий прогрессирования сколиоза. Полученные данные могут быть использованы в качестве дополнительных критериев при оценке структурно-функциональной организации и регуляции процесса дифференцировки хондроцитов в пластинках роста тел позвонков в норме и при различных патологиях. Результаты исследования могут стать основанием для выявления генетических маркеров идиопатического сколиоза и разработки диагностических систем на основе современных методов молекулярной биологии. Приобретенные сведения могут служить основой для прогноза развития и терапии сколиоза с применением клеточных, молекулярных и фармакологических методов.

Методология и методы исследования. Методология исследования основана на применении общих методов научного познания, таких как описание, сравнение, анализ, синтез, а также на использовании теоретических обобщений, касающихся развития патологических процессов. В работе использованы современные методы морфологического (световая микроскопия, иммуногистохимия) и молекулярно-биологического (ПЦР в реальном времени) анализа и интерпретации полученных результатов. Проведена статистическая обработка полученных данных. Объект исследования – пластинки роста тел позвонков детей, больных идиопатическим сколиозом, пластинки роста тел позвонков мини-свиней в критические периоды роста, позвоночники эмбриона человека 8 – 12 нед развития. Предмет исследования – особенности структурно-функциональной организации и профиля экспрессии генов пластинок роста тел позвонков мини-свиней в критические периоды роста в норме, морфо-гистохимические особенности и профиль экспрессии генов пластинок роста тел позвонков с выпуклой и вогнутой сторон деформации при идиопатическом сколиозе.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Пластинки роста тел позвонков на вогнутой стороне деформации позвоночника при идиопатическом сколиозе имеют отличия от клеток и матрикса пластинок роста на выпуклой стороне: нарушение зональности, беспорядочное расположение редких малодифференцированных хондробластов, отсутствие пролиферативной активности клеток, низкое полимерное состояние протеогликанов матрикса.

2. Экспрессия генов *ACAN*, *LUM*, *VCAN*, *COL1A1*, *COL2A1*, определяющих структурно-функциональные особенности матрикса хряща пластинок роста тел позвонков, при идиопатическом сколиозе не нарушена.

3. Рассогласование функционирования главных генов сульфатирования *CHST3* и *SLC26A2* приводит к синтезу свободных сульфатсодержащих групп, не связанных с гиалуроновой кислотой, и к низкому полимерному состоянию протеогликанов матрикса пластинок роста тел позвонков при идиопатическом сколиозе.

4. Повышение экспрессии гена *INH* сохраняет клетки пластинок роста тел позвонков в негипертрофическом пролиферативном состоянии. Несбалансированная экспрессия *PAX1* и *PAX9* генов, повышение экспрессии гена *TGFR1* и понижение уровней мРНК генов *GHR* и *SOX9* в хондробластах пластинок роста тел позвонков при идиопатическом сколиозе приводят к нарушению хондрогенной дифференцировки клеток пластинок роста.

5. По данным факторного анализа, профиль экспрессии генов в хондробластах пластинок роста тел позвонков при идиопатическом сколиозе достоверно отличается от профиля экспрессии генов в контрольной группе.

Степень достоверности результатов. Полученные результаты имеют высокую степень достоверности, которая подтверждается достаточным объемом исследуемого материала (84 образца пластинок роста тел позвонков от 42 детей, больных идиопатическим сколиозом, 12 контрольных образцов (позвоночники эмбриона человека), 24 образца пластинок роста тел позвонков мини-свиней, используемых в качестве нормы), использованием современных методических приемов и высокоинформативных методов морфологического анализа (иммуногистохимия, электронная и световая микроскопия), молекулярной и клеточной биологии (ПЦР в реальном времени), высокотехнологичного оборудования и адекватных методов для статистической обработки полученных результатов. Сформулированные научные положения и выводы основаны на результатах собственных исследований и не носят характера умозрительных заключений.

Апробация результатов работы. Материалы диссертации были представлены и обсуждены на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием с элементами научной школы для молодежи, посвященной 90-летию со дня рождения Засл. деят. науки РСФСР проф. Я.Л.Цивьяна («Цивьяновские чтения») (Новосибирск, 2010), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием с

элементами научной школы для молодежи, посвященной 65-летию Новосибирского НИИТО («Цивьяновские чтения») (Новосибирск, 2011), V Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых с международным участием «Цивьяновские чтения» (Новосибирск, 2012), симпозиуме «Актуальные вопросы травматологии и ортопедии детского возраста» в рамках XVI Конгресса педиатров России (Москва, 2012), 50-м Международном Зораб Симпозиуме (50TH INTERNATIONAL PHILLIP ZORAB SYMPOSIUM, Лондон, Англия, 2013), Международном конгрессе CRISPR-2018 (Новосибирск, 2018), публичной лекции в ИЦИГ СО РАН (Сколиоз: история болезни) (Новосибирск, 2018), заседании Ученого совета ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л.Цивьяна» Минздрава России (Новосибирск, 2020).

Личное участие автора. Забор материала, его обработка, описание препаратов, иммуногистохимические и морфологические исследования, подбор праймеров, культивирование клеток, ПЦР, анализ и интерпретация результатов, статистическая обработка полученных данных выполнены лично автором.

Внедрение. Результаты диссертационной работы внедрены в научно-исследовательскую работу Федерального государственного бюджетного учреждения «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л.Цивьяна» Минздрава России.

Публикации. По теме диссертации опубликованы 24 работы, из них 3 – в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для публикации материалов диссертационных исследований, в том числе 3 – в рецензируемых научных изданиях, входящих в международные базы данных Web of Science и Scopus.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, главы с изложением материала и методов, глав с результатами собственных исследований, заключения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 124 страницах компьютерного текста, включает 38 рисунков и 9 таблиц. Список литературы включает 195 наименований.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. Объектом исследования служили пластинки роста (ПР) тел позвонков на уровне деформации, а также ниже и выше деформации, полученные в клинике детской ортопедии Новосибирского НИИТО от 42 детей (девочки) в возраст 9 – 15 лет, больных идиопатическим сколиозом (ИС) III – IV степени, в ходе операции мобилизующей дискэктомии и межтелового спондилодеза аутокостью из ребра (anterior releasing and interbody fusion). Письменное информированное согласие родителей всех оперированных детей имеется. В качестве контроля для исследования экспрессии генов были использованы хрящевые структурные компоненты позвоночника эмбриона человека 8 – 12 нед развития (12 образцов), полученные непосредственно после медицинского аборта от клинически здоровых женщин из лицензированных учреждений МЗ РФ в соответствии с утвержденным перечнем медицинских показаний. Разрешение на проведение научно-исследовательской работы было получено на заседании ЛЭК ФГБУ «НИИТО им. Я.Л.Цивьяна» Минздрава России (выписка 069/18-1 из протокола №013/18 от 7.12.2018); все исследования проведены в соответствии с Хельсинкской декларацией (2000 г.).

Исследование профиля экспрессии генов и структурно-функциональных особенностей ПР тел позвонков детей в норме не представляется возможным. В последние годы частым объектом для медико-биологических исследований являются мини-свиньи по причине их значительного сходства с анатомическим строением многих органов и физиологическими функциями у человека (Тихонов В.Н., 2010). Использование свиней в качестве медико-биологической модели обусловлено тем, что анатомия и физиология большинства систем,

абсолютные и относительные размеры органов (по отношению к общей массе тела) наиболее близки к человеческим по сравнению с другими животными, используемыми в лабораторной практике. Для определения профиля экспрессии генов и структурно-функциональных особенностей ПР тел позвонков в норме были использованы ПР тел позвонков от 24 мини-свиней в критические периоды роста (70-дневный эмбрион, новорожденный, 2-недельный, месячный, 3- и 6-месячный).

Морфология, гистохимия, ультраструктурный анализ. Ткани ПР тел позвонков мини-свиней в критические периоды роста и ПР тел позвонков детей, больных ИС, фиксировали в 10% растворе формалина, проводили по общепринятой методике и заливали в парафин. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином-эозином, альциановым синим, ставили реакцию Хейла и ШИК-реакцию. Ко всем реакциям ставили соответствующие контроли. Ультраструктурные исследования проводили после фиксации в 2,5% глутаральдегиде и дофиксации в 1% четырехоксида осмия. Затем образцы после проводки по спиртам заливали в аралдит. Готовили ультратонкие срезы на ультратоме LKB, просматривали и фотографировали в электронном микроскопе «Hitachi-100».

Получение клеток из образцов ткани для проведения ПЦР и иммуногистохимического исследования. Гиалиновый хрящ ПР тел позвонков детей, больных ИС, хрящевые структурные компоненты позвоночника эмбриона человека и ПР тел позвонков новорожденного, 2-недельного и месячного поросенка отмывали в PBS, измельчали до размеров 1 – 2 мм² и помещали в раствор 1,5%-ной коллагеназы. Инкубировали при температуре 37°C в течение 12 – 24 ч. Полученную суспензию клеток пропускали через нейлоновый фильтр и центрифугировали 10 мин при 2000 об./мин. Определяли общее количество клеток в камере Горяева.

Иммуногистохимическое исследование. Выделенные клетки ПР тел позвонков новорожденного, 2-недельного и месячного поросят культивировали в среде DMEM F12 с добавлением 15% FBS и антибиотиками в условиях CO₂ инкубатора при 37°C. Культивированные клетки фиксировали в 4% растворе формалина и промывали в PBS. Клетки инкубировали с первичными антителами к коллагену I типа, Sox9 и агрекану. Далее использовали вторичные антитела; все процедуры выполняли в соответствии с рекомендациями производителей антител. Ядра окрашивали DAPI.

Выделение РНК из клеток и синтез кДНК. Из клеток, полученных после центрифугирования, выделяли суммарную клеточную РНК тризольным методом (TRI reagent) в соответствии с рекомендациями производителя. Осажденную РНК растворяли в 30 – 50 мкл RNase-free воды. Для удаления возможной примеси геномной ДНК выделенную РНК обрабатывали RNase-free DNase согласно рекомендациям производителя. Выделение мРНК и отсутствие ДНК в образце контролировали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле до и после обработки RNase-free DNase. Концентрацию выделенной мРНК определяли спектрофотометрически. кДНК получали в реакции обратной транскрипции с использованием фермента M-MLV Reverse Transcriptase в присутствии Oligo (dT)₁₅ праймера: 2 мкг суммарной РНК каждого образца было использовано для реакции в финальном объеме 25 мкл.

Анализ экспрессии генов методом ПЦР. Подбор праймеров для ПЦР был осуществлен на основании общедоступных материалов о последовательностях ДНК и мРНК генов в базе данных NCBI с использованием программы Primer-BLAST. ПЦР проводили на амплификаторе TRIO-Thermoblock (Biometra). В качестве контрольного гена использовался ген *GAPDH* (для человека) и ген *Актин* (для свиньи). ПЦР была выполнена с использованием *Taq*-полимеразы и ген-специфичных праймеров при следующих условиях: 3 мин при 95°C и 30 циклов: 30 с – 95°C, 30 с – 58 – 65°C и 30 с при 72°C. Уровень экспрессии мРНК целевых генов оценивали в относительных единицах как отношение интенсивности амплифицированного фрагмента гена к интенсивности фрагмента гена домашнего хозяйства. Каждая реакция проводилась трижды. Анализ продуктов ПЦР проводили методом гори-

зонтального гель-электрофореза в 1,5% агарозном геле в буфере TAE с содержанием 1 мкг/мл бромистого этидия. Сканирование геля проводили в УФ свете с помощью видеосистемы «DNA Analyzer» (Москва).

Определение мРНК генов методом количественной ПЦР. Все реакции ПЦР в режиме реального времени (Real-Time PCR) были выполнены на термоциклере iCycler IQ5 (Bio-Rad, США) в присутствии красителя SYBR Green I при следующих условиях: 95°C – 3 мин 30 с, затем 40 циклов: 95°C – 20 с, 58 – 68°C – 15 с, 72°C – 30 с, 82 – 89,5°C – 10 с. Объем реакционной смеси составлял 30 мкл: к 15 мкл 2× буфера (7 мМ MgCl₂, 130 мМ Tris-HCl, pH 8.8, 32 мМ (NH₄)₂SO₄, 0.1% Tween-20, 0.5 мМ каждого dNTP) добавляли 8.6 мкл воды, по 0.2 мкл прямого и обратного праймеров (45 мкМ), 1 мкл (5 ед.) Taq полимеразы и 5 мкл кДНК.

Статистика и методы анализа данных. 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 (SD). Для оценки достоверности различий сравниваемых средних величин применяли непараметрический статистический U-критерий Манна-Уитни. Статистически значимыми считали различия при 5%-ном уровне значимости ($P < 0.05$). Факторный анализ выполняли при помощи пакета программ STATISTICA 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование пластинки роста тела позвонка в норме

Основанием для изучения экспрессии генов в ПР тел позвонков при ИС послужили данные, полученные в результате многолетних исследований сколиотического позвоночника в Новосибирском НИИТО. Морфологические и биохимические исследования (Зайдман А.М. и др., 2004, 2016) при ИС свидетельствуют, что патогенетическим механизмом формирования деформации позвоночника является асимметрия роста, которая формируется на фоне изменения состава протеогликанов. На вогнутой стороне деформации наблюдается нарушение структурной организации клеток и матрикса ПР тел позвонков на фоне уменьшения концентрации хондроитинсульфатов (ХС) и нарастания кератансульфата при сохранении нормальной структуры и функций хондробластов на выпуклой стороне (Зайдман А.М. и др., 2004). Так как изменения ПР тел позвонков при ИС представляют собой первичное нарушение роста (Day G. et al., 2008), возможно предположить, что в основе асимметрии роста лежит нарушение генетической регуляции роста позвоночника на вогнутой стороне деформации.

Гены, участвующие в регуляции роста и синтетической функции клеток ПР, могут быть вовлечены в формирование патологических изменений хрящевой ткани. Однако определение профиля экспрессии генов, определяющих структурно-функциональные особенности хондробластов и матрикса ПР тел позвонков у детей, больных ИС, никем ранее не проводилось. Отправным моментом для оценки экспрессии генов при ИС явилось изучение закономерностей и особенностей функционирования клеток и матрикса ПР тел позвонков в норме. Проведенные исследования ПР тел позвонков у клинически здоровых детей немногочисленны и проведены без применения современных молекулярно-биологических методов диагностики (Зайдман А.М., Корель А.В., 2004). В связи с этим исследованы основные структурно-функциональные особенности и профиль экспрессии генов ПР тел позвонков в критические периоды роста в норме.

Пластинка роста тела позвонка новорожденного. Позвоночник новорожденного представлен телами позвонков, состоящими из костных балок с бесклеточными участками хрящевой ткани. Между костными балками располагается красный костный мозг с мегакариоцитами. На стадии остеогенеза тел позвонков остаются участки эмбриональной хрящевой ткани – ПР, генерирующие продольный рост позвоночника. Процесс роста тел

позвонков у новорожденного осуществляется за счет радиально расположенной ПР, в которой можно выделить 4 зоны: поверхностную, зону изогенных групп, зону колонковых структур и гипертрофических клеток, граничащих с зоной остеогенеза. К межпозвонковому диску прилежит поверхностная зона, состоящая из мелких клеток, расположенных параллельно друг другу. Ультраструктурная организация хондробластов однотипна и характерна для малодифференцированных клеток. Зона изогенных групп клеток, составляющая самую обширную площадь ПР, представлена хондробластами, сгруппированными по 2 – 4 клетки, расположенными в одной лакуне и окруженными обширным внеклеточным матриксом. Четко визуализируются слои изогенных групп клеток. Встречаются митотически делящиеся клетки.

Во внеклеточном пространстве находятся кровеносные сосуды с эритроцитами, окруженные интенсивно базофильной и альциан-позитивной «муфтой», состоящей из протеогликанов. Протеогликанов образуют хондрогематический барьер, через который происходит диффузия веществ к клеткам хряща. Хондрогематический барьер сдерживает процесс остеогенеза. Зона колонковых структур представлена параллельно расположенными рядами клеток, между которыми выявляется межклеточный матрикс. В клетках и матриксе этой области, как и в зоне изогенных групп клеток, определяются высокополимерные ПГ. Ультраструктура клеток обнаруживает высокую степень дифференцировки. Зона гипертрофических клеток ПР тела позвонка фенотипически разнородна и представлена 2-мя слоями: поверхностные высокодифференцированные хондроциты и крупные безъядерные клетки, прилежащие к зоне остеогенеза. Вокруг клеток выявляются интенсивные реакции на высокополимерные гликозаминогликаны (ГАГ). Клетки, прилежащие к зоне остеогенеза, находятся на конечной стадии дифференцировки. В этих клетках ядра фрагментированные или отсутствуют. Встречаются клетки в апоптозе. В матрикс хряща внедряются сосуды и происходит формирование примитивной костной ткани. Таким образом, в ПР тела позвонка на стадии новорожденного происходит интенсивный процесс роста, который заключается в пролиферации хондробластов, хондрогенной дифференцировке до стадии гипертрофических клеток и формировании костной ткани, т.е. адекватного остеогенеза.

Для понимания особенностей регуляции рассматриваемых процессов у мини-свиньи определена экспрессия генов и проведен иммунофлуоресцентный анализ. Проанализирована экспрессия следующих групп генов: 1) определяющих структурно-функциональные особенности матрикса хряща: *AGC1*, *LUM*, *COL1A1*, *COL2A1*, *COL10A1*, *HAPLN1*, *MMP9*, 2) регулирующих рост позвоночника: *TGFB1*, *HR*, 3) регулирующих процесс хондрогенной дифференцировки: *PAX1*, *PAX9*, *INH*, *SOX9*. В качестве гена домашнего хозяйства был использован ген актин (*Actin alpha1*).

При анализе экспрессии генов в хондробластах правого и левого отделов ПР тел позвонков 70-дневного эмбриона с помощью ПЦР анализа установлено, что в эмбриональном периоде экспрессируются все рассматриваемые гены. Отличий в экспрессии генов между левой и правой частью ПР не обнаружено.

У новорожденного в хондробластах ПР тел позвонков экспрессируется ген *AGC1*, кодирующий агрекан, а также *LUM*, кодирующий люмикан. Агрекан это самый большой протеогликан, состоящий из кор-белка и гликозаминогликанов. Агрекан вместе с малыми протеогликанами и коллагенами матрикса образуют устойчивую структуру хряща. В анализируемых образцах выявлена экспрессия генов, кодирующих коллагены I, II и X типов матрикса хряща: *COL1A1*, *COL2A1*, *COL10A1*. В хондробластах ПР наблюдается экспрессия гена *HAPLN*, кодирующего гиалуронан, который осуществляет связывание остатков гиалуроновой кислоты и определяет полимерность протеогликанов. Не обнаружено нарушений в экспрессии гена *MMP9*, кодирующего матриксную металлопротеиназу 9, – одного из ферментов, участвующих в ремоделировании структур внеклеточного матрикса и играющих значимую роль в местном протеолизе. Процесс регуляции роста позвоночника

осуществляется под влиянием различных регуляторных факторов, в число которых входят гены *HR* и *TGFB1*. В хондробластах ПР тела позвонка новорожденного определена экспрессия гена *HR*, регулирующего синтез гормона роста, являющегося одним из ключевых гормонов, регулирующих метаболизм клеток хрящевой ткани. Показано отсутствие отклонений в экспрессии гена *HR*, контролирующего скорость пролиферации хондроцитов.

В хондробластах ПР детектирована экспрессия гена *TGFB1*. *TGFB1* регулирует белок, который контролирует пролиферацию, клеточную дифференцировку и другие функции в большинстве клеток. Анализ экспрессии генов, регулирующих процесс хондрогенной дифференцировки, показал, что в клетках ПР экспрессируются гены *PAX1* и *PAX9*, играющие критическую роль в образовании осевого скелета во время эмбрионального развития. *PAX1* осуществляет контроль процесса пролиферации и позитивной дифференцировки клеток. Не выявлено нарушений в экспрессии гена *ИНН*, играющего ключевую роль в дифференцировке хондроцитов ПР, и в норме экспрессирующегося в регипертрофических хондроцитах. ПЦР анализ выявил, что в хондробластах ПР экспрессируется ген *SOX9*, принимающий участие в процессе хондрогенеза и индуцирующий дифференцировку хондробластов.

Иммуногистохимическим методом идентифицирован белковый продукт транскрипционного фактора *Sox9*, экспрессированный преимущественно в ядрах клеток. В хондробластах ПР тела позвонка иммуногистохимически выявлена положительная реакция на антитела к агрекану, расположенному в цитоплазме клеток. В качестве маркера малодифференцированной хрящевой ткани была исследована реакция на антитела к коллагену I типа. Показано, что коллаген I типа детектируется в цитоплазме клеток. Наиболее интенсивная экспрессия наблюдается вблизи ядер. Данные иммуногистохимического окрашивания согласуются с данными по экспрессии генов.

Таким образом, исследование клеток и матрикса ПР тела позвонка новорожденного методами морфологии, гистохимии, ПЦР, ультраструктурного и иммуногистохимического анализа показало, что ПР представляет собой участок эмбриональной хрящевой ткани, о чем свидетельствует экспрессия гена коллагена I типа и большая доля малодифференцированных клеток. Широкий слой изогенных групп клеток в ПР указывает на интенсификацию процесса пролиферации и на высокие потенции процессов роста. Экспрессия генов *PAX1*, *PAX9*, *ИНН* и *SOX9* согласуется с данными морфологии о значительной доле колонковых структур и гипертрофических клеток и определяет интенсивность дифференцировки хондробластов ПР.

Пластика роста тела позвонка в возрасте 2-х недель сохраняет прежнюю архитектуру и деление на 4 зоны в зависимости от степени дифференцировки хондробластов.

Как и в предыдущий срок, герминативный слой клеток все еще достаточно выражен, что свидетельствует о высокой потенции роста. В базофильном матриксе располагаются единичные малодифференцированные вытянутые хондробласты с узким ободком цитоплазмы и крупным ядром. Ультраструктура клеток усложнилась по сравнению с предыдущим сроком наблюдения. Хондробласты зоны пролиферации расположены группами по 2–4 клетки в гомогенном базофильном матриксе. Наблюдается резкое снижение интенсивности реакции на ПГ вокруг хондрогематического барьера и внедрение сосудов в матрикс хряща. Клетки колонкового слоя структурно не отличаются от клеток ранних стадий постнатального развития, но наблюдается интенсификация синтетических процессов. Ультраструктура клеток усложняется. В гипертрофическом слое клеток ПР наблюдаются реакции на хондроитинсульфаты-4-6, гиалуроновую кислоту и гликоген. Интенсивная Хейл-реакция мембран хондроцитов и окружающего матрикса свидетельствует о формировании высокополимерных ПГ. Сосуды пенетрируют матрикс, формируется примитивная костная ткань. Ультраструктурная организация высокодифференцированных хондроцитов разнообразна: типичные апоптозные тельца, безъядерные клетки и хондроциты, находящиеся на разной стадии дистрофии.

Иммуногистохимическая реакция не выявила отличий по сравнению с предыдущим периодом развития. Методом ПЦР показано, что в данный период экспрессируются гены, определяющие структурно-функциональные особенности матрикса хряща и принимающие участие в процессе регуляции роста позвоночника. Отсутствие экспрессии гена *ИНН* свидетельствует о некотором замедлении стадии дифференцировки. Надо полагать, что процесс дифференцировки в гипертрофические хондроциты происходит более отсрочено, хотя сам процесс внутри ПР синхронизован.

Таким образом, ПР тела позвонка в возрасте 2 нед соответствует стадии пролиферации. Исследование структурно-функциональных особенностей ПР показало, что для данной стадии характерно: большая доля митотически активных малодифференцированных клеток, преобладание синтетических процессов, обеспечивающих митотическое деление клеток, интенсивный синтез гликозаминогликанов, гиалуроновой кислоты и гликогена.

В возрасте 1-го месяца постнатального развития пластинки роста тела позвонка полностью сформирована и расположена между эпифизом и телом позвонка. Хондроциты и матрикс находятся в прежней зональности: на поверхности малодифференцированные единичные хрящевые клетки, затем изогенные группы клеток, которые переходят в колонковые структуры и слой гипертрофических клеток. Зона малодифференцированных клеток поверхностного слоя значительно сужена. Основную часть ПР составляют зоны клеток изогенного и колонкового слоев. Широкая зона колонковых структур свидетельствует об активной пролиферации. Высокополимерные сульфатированные гликозаминогликаны наиболее интенсивны вокруг клеточных групп и в межтерриториальном матриксе колонковых структур и зоне изогенных групп клеток. Определяются хондробласты с ультраструктурной организацией, соответствующей высокой степени дифференцировки.

Иммуногистохимически в хондробластах ПР выявляются агрекан, коллаген I типа и SOX9. Экспрессируются все исследуемые гены, за исключением *ИНН*, что свидетельствует об интенсивности процесса роста, но некотором снижении скорости дифференцировки хондробластов. Таким образом, ПР тела позвонка в возрасте 1 месяц соответствует начальным этапам стадии дифференцировки, для ПР характерно преобладание клеток с высокой ультраструктурной организацией, накопление вокруг них высокополимерных сульфатированных гликозаминогликанов. Наибольшую площадь ПР составляют дифференцированные митотически активные клетки, формирующие колонки.

В возрасте 3-х месяцев постнатального развития пластинка роста тела позвонка значительно сужена по сравнению с предыдущими периодами. Зональность ПР сохранена, матрикс однородный. Зона изогенных групп сужена, расширена зона колонковых структур. На этом фоне активизировалась синтетическая активность клеток: реакции на высокополимерные ПГ интенсивны в матриксе и в цитоплазме клеток. Этот период может быть охарактеризован как период линейного роста. Зона роста «перекрывается» костной пластинкой, препятствующей инвагинации сосудов в хрящевую ткань. Все исследуемые гены экспрессируются в данном периоде, в том числе ген *ИНН*, что может свидетельствовать об интенсификации процесса дифференцировки хондробластов.

Пластинка роста тела позвонка в возрасте 6-ти месяцев представлена узкой линейной зоной хрящевой ткани, расположенной между эпифизом и телом позвонка. Апикальная поверхность ПР отделена от эпифиза узкой поверхностной зоной. Зона изогенных групп практически отсутствует. Вся площадь ПР заполнена колонковыми структурами. Клетки этой зоны находятся на разной стадии дифференцировки. Цитоплазма клеток и межклеточный матрикс выполнены высокополимерными ПГ. Зона остеогенеза широкая, внедряющиеся сосуды лизируют матрикс между гипертрофированными клетками, которые находятся на разной стадии дифференцировки. Ультраструктурно – это высокодифференцированные клетки с крупным ядром и с обогащенной органеллами цитоплазмой. Визуализируются безъядерные клетки и хондроциты с пикнотичным ядром и редуцированными органеллами. Таким образом, в возрасте 6-ти месяцев постнатального развития

ПР тела позвонка соответствует стадии дифференцированного хондроцита. Колонковые структуры, составляющие основную часть ПР, представлены высокодифференцированными хондроцитами, теряющими способность к митотическому делению и сохраняющими способность к интенсивному синтезу ГАГ.

Таким образом, методами морфологии, гистохимии, иммуногистохимии, ПЦР и ультраструктурного анализа были исследованы ПР тел позвонков в постнатальном периоде от новорожденного до 6-ми месячного возраста. Анализ полученных данных показал, что ключевыми являются следующие вопросы: структурно-функциональная организация ПР тел позвонков, особенности метаболизма и специфических синтезов, регуляция процессов роста на различных стадиях онтогенеза. Процесс роста представляет собой цепочку морфогенетических событий, продолжающихся до достижения половой зрелости. Регуляция процесса роста и морфофункциональная организация ПР в разные периоды онтогенеза различны. В раннем постнатальном периоде рост тел позвонков осуществляется радиально расположенной зоной роста, представленной хрящевой тканью (ПР). Популяция клеток ПР неоднородна: от малодифференцированного хондробласта – через высокодифференцированный – к деградирующему хондроциту.

Сравнение структурно-функциональных особенностей ПР тела позвонка мини-свиней и человека (Зайдман А.М., Корель А.В., 2004) в разные периоды онтогенеза показало, что процессы пролиферации и дифференцировки хондроцитов ПР идентичны. В формировании ПР тела позвонка можно выделить несколько этапов. Первый этап – ранний онтогенез от новорожденного до месячного возраста у мини-свиней и от новорожденного до 5 – 6-месячного возраста у человека – период «взрывного» роста, характеризуется интенсивной пролиферацией хондробластов. В поверхностной и пролиферирующей зонах ПР сохраняется широкий слой малодифференцированных клеток, составляющих наибольшую площадь ПР. О замедлении процесса дифференцировки в данные периоды свидетельствует отсутствие экспрессии гена *ИНН*. Особенности этого периода развития позвоночника заключаются в наличии сосудов в провизорной хрящевой ткани.

Второй этап – от 1 до 3 мес у мини-свиней и от полугода до 5 – 8 лет у человека – характеризуется интенсивной пролиферацией и дифференцировкой хондробластов ПР тела позвонка. В рассматриваемый временной период происходит интенсивный рост организма. К возрасту 3 мес и 5 – 8 лет, соответственно, ПР сформирована и представлена высокодифференцированными хондробластами. В сформированном теле позвонка осуществляется линейный рост, который характеризуется периодизацией дифференцировки и остеогенеза в ПР.

Третий этап – от 3 до 6 мес у мини-поросят и от 5 – 8 до 11 – 14 лет у человека (Зайдман А.М., Корель А., 2004) – характеризуется интенсивной дифференцировкой хондробластов ПР тела позвонка. В период полового созревания (11 – 14 лет у человека) ПР соответствует стадии дифференцированного хондроцита. Колонковые структуры, составляющие основную часть ПР, представлены высокодифференцированными клетками, теряющими способность к митотическому делению.

Исследование пластинки роста тела позвонка при идиопатическом сколиозе

Морфо-гистохимические исследования и ультраструктурный анализ ПР тел позвонков были выполнены дифференцированно с выпуклой и вогнутой сторон деформации позвоночника при ИС.

Выпуклая сторона деформации. ПР тела позвонка на выпуклой стороне деформации позвоночника при ИС состоит из четырех слоев клеток: резервного, зоны изогенных групп клеток, колонкового и гипертрофического слоев. Поверхностный резервный слой клеток в зависимости от возраста пациента занимает разный объем, у детей 11 – 12 лет широкий слой, в 15-летнем возрасте значительно сужен. По морфологическим признакам в этом слое можно выделить малодифференцированные одиночные хондробласты и крупные

округлые хондробласты. Зона пролиферирующих клеток узкая, представлена изогенными группами, состоящими из 3 – 4 клеток, и расположенными горизонтально по отношению к оси позвоночника. Прелакунарное пространство представлено гомогенным матриксом, цитоплазма клеток заполнена высокополимерными хондроитинсульфатами. Зона колонковых структур – высокодифференцированные хондробласты, формирующие «стопки» из 7 – 10 клеток. Зона гипертрофических клеток узкая, состоит из двух- и трехклеточных структур, окруженных базофильным матриксом, в который внедряются кровеносные сосуды. Гипертрофический слой состоит из 2-х типов клеток: активно синтезирующих и терминальных, часть из которых находится в апоптозе. Зона остеогенеза представлена молодой костной тканью с включением фрагментов хрящевой ткани. Между выпуклой и вогнутой сторонами деформации ПР расположен бесклеточный матрикс, содержащий высокополимерные протеогликаны.

На выпуклой стороне ПР тела позвонка ультраструктурно определяется четкая хондронная организация хондробластов со сложной микроциркуляторной системой. Клетки с центрально расположенным ядром, диспергированным или приядерно расположенным хроматином с 1 – 2 ядрышками. В цитоплазме широкая эндоплазматическая сеть с расширенными цистернами. Комплекс Гольджи с большим количеством вакуолей на цис- и транс-поверхностях рассредоточен по всей цитоплазме.

Вогнутая сторона деформации. ПР тела позвонка на вогнутой стороне деформации позвоночника узкая, лишена зональной структуры. В резервном слое регулярно, параллельно оси позвонка расположены двуядерные хондробласты и клетки, находящиеся в состоянии апоптоза. Зона изогенных групп клеток представлена беспорядочно ориентированными малодифференцированными хондробластами на фоне разволокненного и дистрофически измененного матрикса. Границы некоторых клеток выражены нечетко, цитоплазма эозинофильна, ядра пикнотичны, часть клеток в состоянии апоптоза. Слой колонковых структур не сформирован. Среди редких изогенных клеток встречаются ассоциаты по 5 – 6 в лакуне с базофильной цитоплазмой и центрально расположенным ядром. В матриксе и в клетках отсутствуют высокополимерные хондроитинсульфаты, но в мембранах и в околоклеточных пространствах выявляются низкополимерные хондроитинсульфаты в виде точечных включений. Гипертрофическая зона представлена одним-двумя слоями клеток на фоне фрагментирующегося матрикса и сосудистой инвазии. В некоторых местах видны очаги регенерации с формированием волокнистого хряща. Формирование костной ткани происходит по типу формирования эпифиза тел позвонков, минуя соответствующие стадии дифференцировки хондроцитов.

Структурно-функциональная организация ПР на выпуклой и вогнутой сторонах деформации позвоночника имеет качественные и количественные отличия (табл. 1).

Таблица 1. Сравнительный анализ структурной организации пластинки роста на выпуклой и вогнутой сторонах деформации при идиопатическом сколиозе

Характеристика (признак)	Выпуклая сторона деформации	Вогнутая сторона деформации
1. Зональность	Сохранена	Отсутствует
2. Дифференцировка, пролиферация	Сохранена	Отсутствует
3. Синтез протеогликанов	Сохранен	Нарушен синтез хондроитинсульфатов и кератансульфата
4. Полимерность протеогликанов	Высокая	Низкая
5. Структура матрикса	Сохранена	Дистрофически изменена

Ультраструктура хондробластов вогнутой стороны деформации соответствует степени дифференцировки клеток: крупное ядро с маргинально расположенным хроматином и одним ядрышком. В цитоплазме расположена эндоплазматическая сеть с расширенными цистернами. Комплекс Гольджи единичен и расположен в околоядерной области. В клет-

ках нижних слоев, прилежащих к костной ткани, цитоплазма хондроцитов выполнена вакуолями, ядро пикнотично.

Таким образом, структура ПР на вогнутой стороне деформации представлена беспорядочно расположенными малодифференцированными хондробластами на фоне дистрофически измененного матрикса, тогда как в норме онтогенетический период от 8 до 14 лет характеризуется интенсивной дифференцировкой хондробластов ПР тела позвонка.

Экспрессия генов в хондробластах пластинки роста тел позвонков при идиопатическом сколиозе. Нарушение структурной организации клеток и матрикса ПР тел позвонков на вогнутой стороне деформации позвоночника на фоне сохранной структуры ПР на выпуклой стороне при ИС явилось основанием для исследования экспрессии генов, регулирующих процесс хондрогенной дифференцировки и принимающих участие в процессе регуляции роста позвоночника.

Исследование экспрессии генов в хондробластах пластинки роста тел позвонков методом ПЦР. В процессе роста происходит пролиферация, дифференцировка малодифференцированных хондробластов ПР в гипертрофический хондроцит с последующим остеогенезом и формированием костной ткани. На первом этапе работы исследовалась экспрессия генов, регулирующих пролиферацию и дифференцировку клеток. В хондробластах ПР тел позвонков детей, больных ИС, методом ПЦР была определена экспрессия 12 генов: *ACAN*, *LUM*, *VCAN*, *COL1A1*, *COL2A1*, *HAPLN1*, *PAX1*, *PAX9*, *INH*, *SOX9*, *TGFR1*, *GHR*. В соответствии с морфологическими и биохимическими данными (Зайдман А.М. и др., 2004) экспрессию генов определяли с выпуклой и вогнутой сторон деформации.

Исследование экспрессии генов показало, что в хондробластах ПР тел позвонков у детей, больных ИС, с выпуклой и вогнутой сторон деформации экспрессируются гены *ACAN*, *VCAN*, *LUM*, кодирующие основные протеогликаны хрящевой ткани: агрекан, вместе с коллагеном II типа, формирующий матрикс хряща, версикан, принимающий участие в связывании гликозаминогликанов и гиалуроновой кислоты, люмикан, осуществляющий связывание коллагена и организацию коллагеновых фибрилл. В анализируемых образцах не выявлено нарушений экспрессии генов, кодирующих коллагены I и II типов, а также гена *HAPLN1*. Таким образом, в хондробластах ПР тел позвонков при ИС не обнаружено нарушений в экспрессии генов, определяющих структурно-функциональные особенности матрикса хряща.

Анализ экспрессии генов, регулирующих процесс хондрогенной дифференцировки, показал, что в клетках ПР при ИС экспрессируются гены *INH*, *PAX1* и *SOX9* (табл. 2), однако в 2 случаях из 10 наблюдается снижение экспрессии транскрипционного фактора *SOX9* с вогнутой стороны деформации. В 30% исследуемых образцов выявлено снижение экспрессии гена *PAX9* с выпуклой и вогнутой сторон деформации при ИС. Изучение методом ПЦР экспрессии гена *TGFR1* показало, что рассматриваемый ген представлен во всех образцах ПР тел позвонков у детей, больных ИС. Экспрессия гена *GHR* в хондробластах при ИС снижена с выпуклой и вогнутой сторон деформации в 2-х случаях из 10, также в одном случае выявлено отсутствие экспрессии *GHR* с вогнутой стороны деформации, на фоне снижения экспрессии на выпуклой стороне.

Таким образом, методом ПЦР показано, что в хондробластах ПР тел позвонков у детей, больных ИС, с выпуклой и вогнутой сторон деформации не наблюдается нарушений экспрессии следующих генов: *ACAN*, *VCAN*, *LUM*, *COL1A1*, *COL2A1*, *HAPLN1*, *PAX1*, *INH*, *TGFR1*. В то же время в одном случае выявлено отсутствие экспрессии гена *GHR* и в ряде образцов снижение экспрессии гена *SOX9* с вогнутой стороны, а генов *GHR* и *PAX9* с выпуклой и вогнутой сторон деформации. Из анализа экспрессии всех исследуемых генов можно сделать вывод, что при ИС наблюдаются сбои в экспрессии генов, регулирующих процесс хондрогенной дифференцировки (*SOX9*, *PAX9*), и гена *GHR*, принимающего участие в процессе регуляции роста позвоночника.

Таблица 2. Схематическое представление экспрессии генов на основе ПЦР в хондробластах пластинок роста тел позвонков с выпуклой и вогнутой сторон деформации у детей, больных идиопатическим сколиозом

Пациент / ген		<i>GAPDH</i>	<i>Acan</i>	<i>Lum</i>	<i>Vcan</i>	<i>HAPLN1</i>	<i>COL1A1</i>	<i>COL2A1</i>	<i>SOX9</i>	<i>PAX1</i>	<i>PAX9</i>	<i>INH</i>	<i>GHR</i>	<i>TGFR1</i>
I	1 вып.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++	++	++
	2 вогн.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
II	3 вып.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++
	4 вогн.	++	++	++	++	++	++	++	+	++	++	++	—	++
III	5 вып.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++	+	++
	6 вогн.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++
IV	7 вып.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	8 вогн.	++	++	++	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++
V	9 вып.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++	+	++
	10 вогн.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++	+	++
VI	11 вып.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	12 вогн.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
VII	13 вып.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	14 вогн.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
VIII	15 вып.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	16 вогн.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
IX	17 вып.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++	++	++
	18 вогн.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++	++	++
X	19 вып.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	20 вогн.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

Примечание. Для каждого гена среднее значение интенсивности пикселей каждой полосы было измерено и нормализовано до среднего пикселя интенсивности полосы *GAPDH*. Результаты представлены на основе нормированных интенсивностей: + – минимум экспрессии, ++ – максимум экспрессии, (–) – отсутствие экспрессии. Вып. – выпуклая, вогн. – вогнутая сторона деформации.

Исследование уровней экспрессии генов в хондробластах ПР тел позвонков у детей, больных ИС методом ПЦР в режиме реального времени. Методом ПЦР в хондробластах ПР тел позвонков у детей, больных ИС выявлено нарушение экспрессии ряда генов. Однако полученные данные не позволили ответить на вопрос о том, насколько значительны отклонения от нормы в уровнях экспрессии ключевых генов хондрогенной дифференцировки и какие гены вносят наибольший вклад в формирование деформации позвоночника. Задачей второго этапа исследования явилось изучение методом ПЦР в режиме реального времени уровней экспрессии генов, регулирующих процессы пролиферации, дифференцировки и функционирования хондробластов и матрикса ПР тела позвонка при ИС. В число этих генов входили гены, 1) принимающие участие в процессе регуляции роста позвоночника: ген рецептора трансформирующего фактора роста (*TGFR1*), ген рецептора эпидермального фактора роста (*EGFR*), ген рецептора инсулинзависимого фактора роста (*IGF1R*), ген рецептора гормона роста (*GHR*); 2) регулирующие процесс хондрогенной дифференцировки: *PAX1*, *PAX9*, *INH*, *SOX9*; 3) определяющие структурно-функциональные особенности матрикса хряща: *ACAN*, *LUM*, *VCAN*, *COL1A1*, *COL2A1*, *HAPLN1* и 4) гены сульфатирования ПГ: *SLC26A2*, *CHST1*, *CHST3*, т.е. процесса принципиально важного для формирования внеклеточного матрикса.

Для изучения уровня экспрессии исследуемых генов в качестве контроля были использованы хрящевые структурные компоненты позвоночника эмбриона человека 10 – 12 недель развития. К моменту рождения ребенка тело позвонка подвергается энхондрально-

му остеогенезу, за исключением хрящевой пластинки (т.е. ПР), которая генерирует продольный рост позвоночника. Процесс роста в постнатальном периоде – это продолженный морфогенез, состоящий из периодизации пролиферации, дифференцировки от недифференцированных хондроцитов к высокодифференцированным до терминальных хондроцитов и последующего остеогенеза. Поскольку регуляция эмбрионального и постнатального хондрогенеза однотипна (James C.G. et al., 2010), это позволило избрать позвоночник эмбриона в качестве контроля уровня экспрессии генов.

Экспрессия генов, определяющих структурно-функциональные особенности матрикса хряща. В результате исследования экспрессии генов, определяющих структурно-функциональные особенности матрикса хряща, обнаружено, что уровень мРНК генов *ACAN*, *LUM*, *VCAN*, кодирующих синтез основных ПГ хрящевой ткани и генов *COL1A1*, *COL2A1* в образцах при ИС и контрольных образцах достоверно не различался (рис. 1). Поскольку различия в экспрессии генов, кодирующих коллагены и ПГ матрикса хряща, в хондробластах ПР тел позвонков детей с ИС и в контроле не обнаружено, можно предположить, что нарушений в функционировании рассматриваемых генов при развитии деформации позвоночника не происходит. Уровень мРНК гена *HAPLN1* в клетках ПР при ИС оказался в 1,6 раз ниже ($P < 0.05$) по сравнению с контролем (см. рис. 1). Низкий уровень экспрессии *HAPLN1* может свидетельствовать о снижении полимерности ПГ в ПР при сколиозе (продукт гена *HAPLN1* связывает остатки гиалуроновой кислоты) (Aspberg A., 2012), что согласуется с морфогистохимическими данными (низкое полимерное состояние ПГ) (Зайдман А.М. и др., 2004).

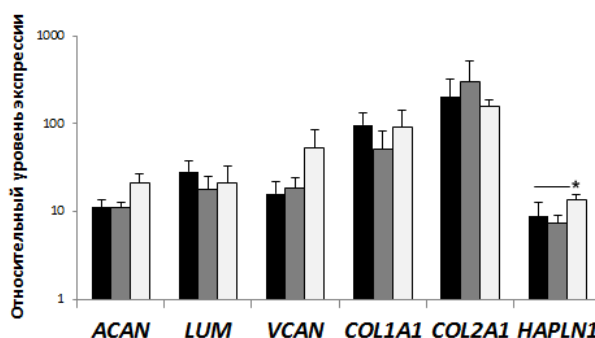


Рис. 1. Относительный уровень экспрессии генов, определяющих структурно-функциональные особенности матрикса хряща, в хондробластах ПР тел позвонков детей, больных ИС, и в контроле.

Черные столбики – выпуклая сторона, темно-серые столбики – вогнутая сторона деформации, светлые столбики – контроль (позвоночник эмбриона). Данные представлены в форме среднее значение $\pm$ SD. * обозначены достоверные различия между образцами ПР при ИС и контрольными образцами ($P < 0.05$). Относительный уровень экспрессии рассчитывался по отношению к гену GAPDH.

Экспрессия генов, принимающих участие в процессе регуляции роста позвоночника. Исследование экспрессии генов, участвующих в процессе регуляции роста позвоночника, выявило высокий уровень мРНК генов *TGFR1* и *EGFR* в хондробластах ПР тел позвонков детей, больных ИС. Экспрессия гена рецептора трансформирующего фактора роста, основная роль которого в хрящевой ткани заключается в отрицательной регуляции дифференцировки хондроцитов (Massague J., Chen Y.G., 2000), была в 6,8 раз ($P < 0.05$) выше по сравнению с контролем (рис. 2). Уровень экспрессии гена рецептора эпидермального фактора роста, осуществляющего позитивную регуляцию пролиферации клеток, а также играющего важную роль в ремоделировании внеклеточного матрикса хряща ПР в кость в процессе энхондрального остеогенеза (Zhang X. et al., 2011), в ПР при сколиозе был в 4,7 раз выше ($P < 0.05$) по сравнению с контрольными хондробластами (см. рис. 2). *IGF1R* действует непосредственно на инсулинподобный фактор роста 1, который продуцируется

пролиферирующими и гипертрофическими хондроцитами и индуцирует их пролиферацию (Ohlsson C. et al., 1992).

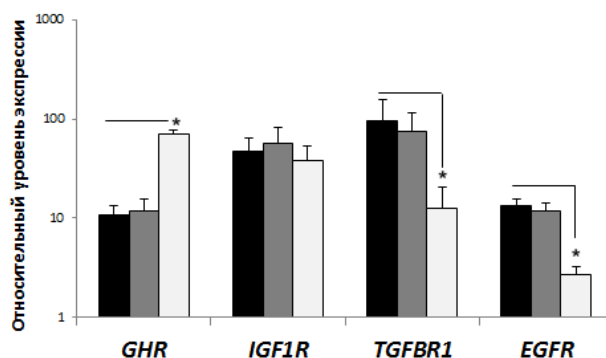


Рис. 2. Относительный уровень экспрессии генов, участвующих в процессе регуляции роста позвоночника, в хондробластах ПР тел позвонков детей, больных ИС, и хондробластах позвоночника эмбриона. Обозначения те же, что и на рис. 1.

Уровень экспрессии гена рецептора инсулинзависимого фактора роста (*IGF1R*) в клетках ПР тел позвонков детей, больных ИС, и в контрольных образцах достоверно не различался (см. рис. 2), следовательно, можно предположить, что *IGFR* не вовлечен в нарушения пролиферации клеток ПР. Экспрессия гена рецептора гормона роста (*GHR*), функция которого заключается в позитивной регуляции дифференцировки клеток (Gevers E.F. et al., 2002), в хондробластах ПР тел позвонков при ИС была в 6 раз ниже по сравнению с контролем (см. рис. 2). Полученные результаты согласуются с данными ПЦР о снижении или отсутствии экспрессии в ряде образцов. Поскольку гормон роста является одним из ключевых гормонов, регулирующих метаболизм клеток хрящевой ткани, уменьшение экспрессии *GHR* может свидетельствовать о пониженной интенсивности метаболизма в клетках при ИС.

Таким образом, нарушение процессов дифференцировки хондробластов в ПР тел позвонков при ИС может быть обусловлено высоким уровнем экспрессии гена рецептора *TGF* и низким уровнем мРНК гена *GHR*, т.е. в клетках ПР наблюдается замедление дифференцировки, метаболизма и роста, что согласуется с результатами морфологических исследований. Повышение уровня экспрессии гена *EGFR*, вероятно, способствует пролиферации хондроцитов, а одновременное изменение экспрессии генов *TGFR1* и *GHR* приводит к накоплению малодифференцированных клеток и (или) нарушению дифференцировки клеток ПР. Низкий уровень экспрессии *EGFR* в контроле по сравнению с экспрессией в хондробластах при ИС, возможно, связан с периодом эмбрионального развития, когда процесс энхондрального остеогенеза еще не начался и активной пролиферации клеток ростовой пластинки не требуется.

Анализ экспрессии генов, регулирующих процесс хондрогенной дифференцировки, показал, что уровень экспрессии гена *SOX9* в хондробластах ПР тел позвонков детей, больных ИС, в 2 раза ниже ($P < 0.05$) по сравнению с контрольными хондробластами (рис. 3). Полученные данные согласуются с результатами ПЦР о снижении экспрессии гена *SOX9* в нескольких исследуемых образцах. Транскрипционный фактор *SOX9* принимает участие в процессе хондрогенеза, индуцируя дифференцировку хондробластов и эндохондральный остеогенез (Ballock R.T., O'Keefe R.J., 2003; Torol L. et al., 2009). Нарушение дифференцировки хондроцитов в ПР при ИС может быть связано с низким уровнем экспрессии гена *SOX9*. Уровень экспрессии гена *PAX1* в клетках ПР у детей, больных сколиозом, был достоверно выше (в 7,5 раза) ($P < 0.05$) по сравнению с контрольными образцами, в то время как экспрессия гена *PAX9* в хондробластах при ИС была снижена в 6 раз по сравнению с контролем (см. рис. 3).

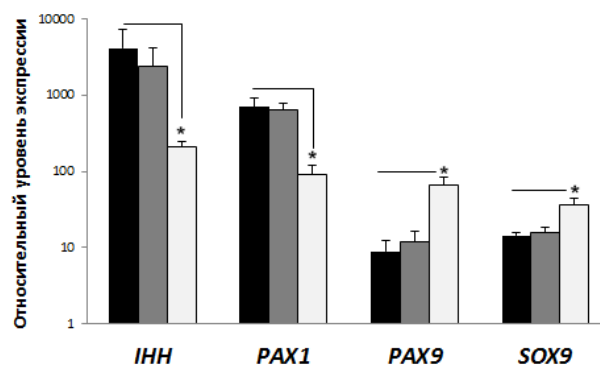


Рис. 3. Относительный уровень экспрессии генов, регулирующих процесс хондрогенной дифференцировки, в хондробластах ПР тел позвонков при ИС и в контроле. Обозначения те же, что и на рис. 1.

Полученные результаты согласуются с данными ПЦР о снижении экспрессии гена *PAX9* в нескольких образцах. *PAX* – это семейство генов, кодирующих ДНК-связывающие белки, которые являются внутриядерными факторами транскрипции. Гены *PAX1* и *PAX9* играют критическую роль в образовании осевого скелета во время эмбрионального развития, контролируют процессы дифференцировки и пролиферации клеток на ранней стадии формирования склеротома (Peters H. et al., 1999). *PAX1* и *PAX9* необходимы для поддержания экспрессии *Varx1* и, как результат, для индукции хондрогенеза в склеротоме. Важную роль в хондрогенной дифференцировке клеток склеротома играет уровень экспрессии этих генов (Rodrigo I. et al., 2003). Поскольку рассматриваемые гены действуют взаимозависимо, а в хондробластах ПР детей, больных сколиозом, выявлена пониженная экспрессия гена *PAX9* при значительном повышении экспрессии гена *PAX1* ($P < 0.05$), это может указывать на нарушение регуляции генов хондрогенной дифференцировки.

Уровень мРНК гена *INH* в клетках ПР при ИС был в 16 раз выше ($P < 0.05$) по сравнению с контрольными образцами (см. рис. 3). Ген *INH* в норме экспрессируется в прегипертрофических хондроцитах и играет ключевую роль в дифференциации хондроцитов ПР (Kobayashi T. et al., 2002). Посредством обратной связи он регулирует паратиреоидный гормон-связанный пептид (PTHrP), который в свою очередь подавляет дифференциацию пролиферирующих хондроцитов. Причем *INH* индуцирует синтез PTHrP, тем самым косвенно замедляя процесс гипертрофии хондроцитов и сохраняя клетки в негипертрофическом пролиферативном состоянии (Vortkamp A. et al., 1996). Путь *INH*-пептид, связанный с паратиреоидным гормоном, является одним из двух основных сигнальных путей, которые контролируют пролиферацию и дифференцировку хондроцитов. Таким образом, нарушение процесса дифференцировки хондроцитов в ПР тел позвонков при ИС может быть обусловлено особенностями экспрессии генов-регуляторов хондрогенной дифференцировки: повышенным уровнем гена *INH*, низким уровнем гена *SOX9*, нарушением взаимодействия генов *PAX1* и *PAX9*.

Экспрессия генов, определяющих сульфатирование протеогликанов матрикса пластинки роста тела позвонка. Биохимические данные о нарушении синтеза гликозаминогликанов в ПР тел позвонков на вогнутой стороне деформации у детей, больных ИС (Зайдман А.М. и др., 2004), явились основанием для исследования генов, кодирующих процесс сульфатирования протеогликанов: гена сульфотрансферазы 1 (*CHST1*), сульфотрансферазы 3 (*CHST3*) и гена трансмембранного транспорта сульфатов (*SLC26A2*). Показано, что недостаточное сульфатирование протеогликанов может происходить из-за инактивации генов, кодирующих переносчики сульфатов, в результате чего нарушается как структура матрикса, так и процесс роста (Karniski L.P., 2001). Нарушения в процессе сульфатирования ПГ могут приводить к различным патологиям (Rossi A., Superti-Furga A., 2001). Анализ экспрессии генов, участвующих в сульфатировании ПГ показал, что уро-

вень мРНК гена *CHST3* в хондробластах ПР тел позвонков при ИС в 7 раз выше ($P < 0.05$), а уровень экспрессии гена *SLC26A2* в 5 раз выше ($P < 0.05$) по сравнению с контролем (рис. 4). Уровень экспрессии гена *CHST1* в клетках при ИС и в контрольных хондробластах не различался (см. рис. 4).

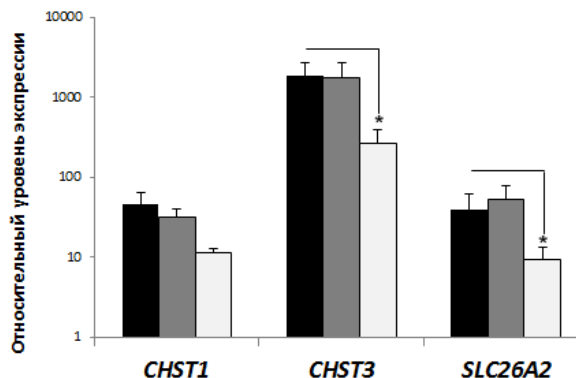


Рис. 4. Относительный уровень экспрессии генов сульфатирования ПГ в хондробластах ПР тел позвонков при ИС и в контроле. Обозначения те же, что на рис. 1.

Переносчик сульфатов (*SLC26A2*) – это трансмембранный гликопротеин, вовлеченный в патогенез нескольких хондродисплазий. *SLC26A2* играет критическую роль в сульфатировании протеогликанов хряща и организации матрикса, обеспечивая транспорт сульфатов в хондроциты и адекватное сульфатирование. Отмеченное ранее нарушение сульфатирования протеогликанов (Зайдман А.М. и др., 2004) с вогнутой стороны деформации при ИС противоречит высокой экспрессии гена *SLC26A2*. Вероятно, нарушение сульфатирования происходит не на этапе транспорта сульфата. *CHST3* кодирует фермент, который катализирует сульфатирование хондроитина ПГ, находящихся во внеклеточном матриксе и большинстве клеток, которые находятся в состоянии дифференцировки. Данные биохимии об уменьшении количества ХС на фоне увеличения кератансульфатов на вогнутой стороне деформации при ИС (Зайдман А.М. и др., 2004) не согласуются с данными об уровне экспрессии генов *CHST1* и *CHST3*. Можно предположить, что в ПР тел позвонков при ИС высокий уровень экспрессии рассматриваемых генов приводит к синтезу сульфатсодержащих групп, не связанных с гиалуроновой кислотой и в конечном итоге к низкому полимерному состоянию ПГ. Возможно, регуляция функции этих генов осуществляется на уровне транскрипции и(или) в этих клетках активированы и гены, осуществляющие альтернативные реакции.

Несмотря на морфологические и биохимические различия между вогнутой и выпуклой сторонами деформации позвоночника при ИС (Зайдман А.М. и др., 2004), уровень экспрессии всех исследуемых генов достоверно не различался в клетках, локализованных на выпуклой и вогнутой сторонах деформации. Отсутствие различий в экспрессии генов может быть связано с тем, что свой вклад в структуру и прочность ткани вносят и гены, регулирующие как свойства внеклеточного матрикса, так и его своевременный и правильным образом организованный остеогенез. Значительное влияние на отсутствие различий также оказало исследование экспрессии генов в хондробластах, полученных из нескольких ПР на выпуклой/ вогнутой стороне деформации, поскольку методические возможности не позволили дифференцированно определить уровни экспрессии на вершине деформации, выше и ниже.

Факторный анализ. Полученные данные по экспрессии всех исследуемых генов были подвергнуты статистическому анализу. Факторный анализ показал принципиальное отличие в профиле экспрессии генов при ИС относительно контрольной группы (рис. 5).

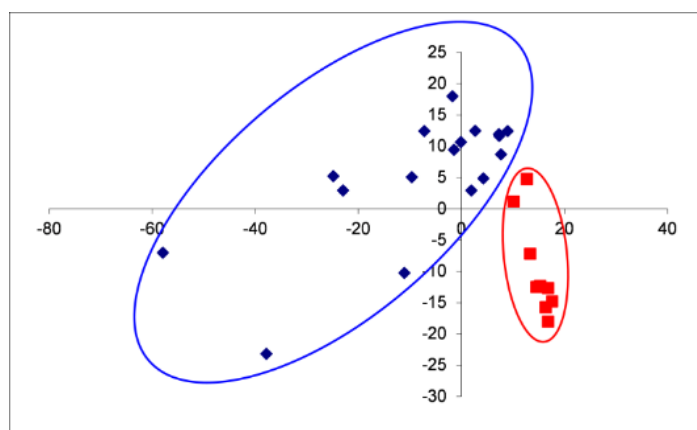


Рис. 5. Результаты факторного анализа: профили экспрессии генов, участвующих в процессе регуляции роста позвоночника, регулирующих процесс хондрогенной дифференцировки, определяющих структурно-функциональные особенности матрикса хряща и генов сульфатирования ПГ в хондробластах ПР тел позвонков при ИС (*слева*) и в контроле (*справа*) имеют достоверные различия ($P < 0.01$). По вертикали и по горизонтали: факторные координаты переменных, основанные на корреляциях.

ВЫВОДЫ

1. По данным комплексного морфологического и ПЦР анализа, структурно-функциональная организация и регуляция процесса роста пластинок роста тел позвонков в норме различаются в критические периоды роста. В период полового созревания пластинки роста тела позвонка характеризуются интенсивной дифференцировкой хондробластов и соответствуют стадии дифференцированного хондроцита.

2. Структура пластинки роста тела позвонка на выпуклой стороне деформации позвоночника при идиопатическом сколиозе сохранена и представлена четырьмя слоями клеток, синтез высокополимерных протеогликанов не нарушен. Пластинка роста на вогнутой стороне деформации узкая, лишена зональной структуры и представлена беспорядочно расположенными малодифференцированными хондробластами на фоне разволокненного и дистрофически измененного матрикса, содержащего низкополимерные протеогликаны.

3. Уровень экспрессии генов *ACAN*, *LUM*, *VCAN*, *COL2A1*, определяющих структурно-функциональные особенности матрикса хряща, в клетках пластинок роста тел позвонков при идиопатическом сколиозе не отличается от контроля. Уменьшение в 1,6 раз ($P < 0.05$) уровня мРНК гена *HAPLN1* в хондробластах пластинок роста при сколиозе приводит к снижению полимерности протеогликанов. Рассогласование функционирования главных генов сульфатирования протеогликанов – увеличение экспрессии гена *CHST3* в 7 раз ($P < 0.05$), гена *SLC26A2* в 5 раз ($P < 0.05$) – приводит к повышению содержания сульфатсодержащих групп, не связанных с гиалуроновой кислотой, и объясняет низкое полимерное состояние протеогликанов в пластинках роста при идиопатическом сколиозе.

4. В клетках пластинок роста тел позвонков при идиопатическом сколиозе наблюдается нарушение экспрессии генов, играющих ключевую роль в дифференцировке хондробластов. Повышение экспрессии гена *PAX1* в 7,5 раза, *TGFR1* в 6,8 раз ($P < 0.05$) на фоне снижения экспрессии генов *GHR* и *PAX9* в 6 раз, гена *SOX9* в 2 раза ($P < 0.05$), соответственно, по сравнению с контролем приводит к нарушению хондрогенной дифференцировки и накоплению малодифференцированных клеток в пластинках роста. Гиперэкспрессия гена *INH* (повышение уровня экспрессии в 16 раз, $P < 0.05$) замедляет процесс гипертрофии хондроцитов, способствуя сохранению клеток в негипертрофированном пролиферативном состоянии.

5. Профиль экспрессии генов при идиопатическом сколиозе принципиально отличается от профиля экспрессии генов в контрольной группе (по данным факторного анализа).

Нарушение экспрессии генов *TGFR1*, *GHR*, *SOX9*, *PAX1*, *PAX9*, *INH* при идиопатическом сколиозе приводит к изменению структурной организации клеток и матрикса пластинок роста тел позвонков на вогнутой стороне деформации позвоночника и формированию асимметрии роста.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Зайдман А.М., Завьялова Е.Л., Михайловский М.В., Суздалов В.А. Сколиоз и нейрофиброматоз // Материалы всероссийской научно-практической конференции «Илизаровские чтения». – Курган, 2010. – С. 123.
2. Зайдман А.М., Завьялова Е.Л., Русова Т.В. Генетическая регуляция хондрогенной дифференцировки провизорного хряща в критические периоды развития // Тезисы IX съезда травматологов-ортопедов России. – Саратов, 2010. – Т. 1. С. 389-390.
3. Завьялова Е.Л., Щелкунова Е.И. Многоуровневая регуляция дифференцировки хондробластов на этапах хондрогенеза пластинок роста тел позвонков // Материалы Всероссийской научно-практ. конф. с международ. участием с элементами научной школы для молодежи, посвященной 90-летию со дня рождения Засл. деят. науки РСФСР проф. Я.Л.Цивьяна («Цивьяновские чтения»). – Новосибирск, 2010. – С. 37-38.
4. Строкова Е.Л., Щелкунова Е.И. Особенности генетической регуляции роста больных идиопатическим сколиозом III–IV степени // Материалы Всероссийской научно-практ. конф. с международ. участием с элементами научной школы для молодежи, посвященной 65-летию Новосибирского НИИТО («Цивьяновские чтения»). – Новосибирск, 2011. – С. 91-93.
5. Зайдман А.М., Строкова Е.Л., Корель А.В., Михайловский М.В. Генетическая детерминация сколиотической болезни // Материалы Третьего съезда хирургов-вертебрологов России с международным участием: «Современные технологии хирургического лечения деформаций и заболеваний позвоночника». – Санкт-Петербург, 2012. – С. 62-63.
6. Строкова Е.Л., Зайдман А.М. Нарушение генетической регуляции роста больных сколиотической болезнью III–IV степени // Сборник материалов XVI Конгресса педиатров России с международным участием «Актуальные проблемы педиатрии» (Москва, 24-27 февраля 2012 г.). – Москва, 2012. – С. 721.
7. Строкова Е.Л. Генетическая регуляция роста позвоночника в норме и при сколиотической болезни // Материалы V Всероссийской научно-практ. конф. молодых ученых с международ. участием «Цивьяновские чтения». – Новосибирск, 2012. – С. 165-168.
8. Зайдман А.М., Садовой М.А., Строкова Е.Л., Корель А.В., Русова Т.В. Морфофункциональные закономерности регуляции хондрогенеза пластинок роста тел позвонков и подвздошной кости // Хирургия позвоночника. – 2013. – № 3. – С. 68-80.
9. Zaidman A.M., Strokov E.L., Shchekunova E.I. Ectopic localization of neural crest cells – a pathogenetic factor in the idiopathic scoliosis development // 50th International Phillip Zorab Symposium. – London, 2013. – P. 39.
10. Строкова Е.Л., Зайдман А.М., Щелкунова Е.И. Сравнительный анализ уровней экспрессии генов – регуляторов роста и развития позвоночника в нативных и культивированных хондробластах эмбрионального позвоночника // Тезисы докладов и сообщений, представленных на всероссийский симпозиум и школу-конференцию для молодых ученых по биологии клетки в культуре. Цитология. – 2013. – Т. 55, № 9. – С. 657.
11. Строкова Е.Л., Корель А.В., Русова Т.В., Зайдман А.М. Молекулярно-генетические критерии периодизации роста позвоночника в разные периоды онтогенеза // Материалы VI Всероссийской научно-практ. конф. молодых ученых с международ. участием «Цивьяновские чтения». – Новосибирск, 2013. – С. 260-264.
12. 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.

13. Зайдман А.М., Строкова 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. – № 4. – С. 88-97.
14. Зайдман А.М., Корель А.В., Строкова Е.Л. Морфологические критерии периодизации роста позвоночника // Сибирский научный медицинский журнал. – 2016. – Т. 36, № 2. – С. 12-18.
15. Зайдман А.М., Строкова Е.Л., Гусев А.Ф., Пахомова Н.Ю. По следам генетических исследований идиопатического сколиоза // Современные проблемы науки и образования. – 2017. – № 6. – URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=27162>.
16. Зайдман А.М., Садовой М.А., Строкова Е.Л. Сколиотическая болезнь: 50-летний опыт исследований // Сибирский научный медицинский журнал. – 2017. – Т. 37, № 6. – С. 76-85. – УДК 616.711-007.55:616-071.
17. Zaydman A.M., Strokov E.L., Kiseleva E.V., Suldina L.A., Strunov A.A., Shevchenko A.I., Laktionov P.P., Subbotin V.M. A New Look at Etiological Factors of Idiopathic Scoliosis: Neural Crest Cells // **International Journal of Medical Sciences**. – 2018. – Vol. 15, № 5. – P. 436-446. doi:10.7150/ijms.22894.
18. Зайдман А.М., Пахомова Н.Ю., Строкова Е.Л., Черноловская Е.Л., Шевченко А.И., Лактионов П.П., Субботин В.М. Ингибирование Pax3 гена липофильными siРНК в склеротоме – модель идиопатического сколиоза на курином эмбрионе // Материалы Международного конгресса CRISPR-2018. Гены & Клетки. Приложение. – Новосибирск, 2018. – № 2. – С. 67-68.
19. Strokov E.L., Zaydman A.M., Stepanova A.O., Laktionov P.P. Analysis of Gene Expression in Hondroblasts of Vertebral Body Growth Plates in Patients with Grade III–IV Idiopathic Scoliosis // **Cell and Tissue Biology**. – 2019. – Vol. 13, № 2. – P. 120-129. doi: 10.1134/S1990519X19020123
20. Zaydman A.M., Strokov E.L., Stepanova A.O., Laktionov P.P., Shevchenko A.I., Subbotin V.M. A New Look at Causal Factors of Idiopathic Scoliosis: Altered Expression of Genes Controlling Chondroitin Sulfate Sulfation and Corresponding Changes in Protein Synthesis in Vertebral Body Growth Plates // **International Journal of Medical Sciences**. – 2019. – Vol. 16, № 2. – P. 221-230. doi: 10.7150/ijms.29312.
21. Строкова Е.Л., Пахомова Н.Ю., Зайдман А.М. Нарушение функций гена PAX3 липофильной siРНК на экспериментальной модели деформации позвоночника у куриного эмбриона // Материалы XI Всероссийской научно-практ. конф. с международ. участием «Цивьяновские чтения». – Новосибирск, 2019. – С.178-179.
22. Пахомова Н.Ю., Строкова Е.Л., Зайдман А.М. Миграция клеток нервного гребня, формирующийся позвоночник и идиопатический сколиоз // Материалы XI Всероссийской научно-практ. конф. с международ. участием «Цивьяновские чтения». – Новосибирск, 2019. – С.145-148.

Соискатель

Е.Л.Строкова