© А.М. ЗАЙДМАН И ДР., 2004

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПЛАСТИНКИ РОСТА ТЕЛА ПОЗВОНКА ЧЕЛОВЕКА ПРИ ИДИОПАТИЧЕСКОМ СКОЛИОЗЕ

А.М. Зайдман[1], *А.В. Корель*[1], *А.В. Сахаров*[2], *В.И. Рыкова*[3]
[1]**Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии**
[2]**Новосибирский государственный педагогический университет**
[3] **Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск**

Методами морфологии, биохимии и ультраструктурного анализа исследованы пластинки роста (ПР) вогнутой и выпуклой сторон деформации позвоночника при идиопатическом сколиозе (ИС) III–IV степени. Показано, что на вогнутой стороне кривизны ПР нарушена зональность, снижены синтетические потенции хондробластов, изменена ультраструктурная организация клеток. Наблюдается конверсия синтеза в сторону кератансульфата. На фоне снижения количества хондроитинсульфатов появление в цитоплазме хондробластов и в матриксе кератансульфатсвязанной фракции протеогликанов рассматривается как отражение генетических нарушений регуляции гомеостаза в системе "клетка - матрикс". Патогенетическим механизмом развития деформации является асимметрия роста, связанная с экспрессией мутантного гена, регулирующего морфогенез латеральных зон пластинок роста тел позвонков. Представлена гипотеза о формировании вторичной компенсаторной зоны роста.
Ключевые слова: рост, дифференцировка, хондробласт, протеогликаны, кератансульфатсвязанная фракция.

Vertebral body growth plates of concave and convex sides of a curve in III–IV degree idiopathic scoliosis were studied by methods of morphology, biochemistry, and ultrastructural analysis. The concave side of vertebral body growth plates has shown zonality impairment, decrease in chondroblasts synthetic potentials, and alteration of cells ultrastructural organization. The synthesis conversion to keratansulphate is observed. The appearance of chondroblasts in cytoplasm and of keratansulphate-related fraction of proteoglycans in matrix combined with chondroitinsulphate number decrease is regarded as reflection of genetic disorders in homeostasis regulation in "cell-matrix" system. The growth asymmetry related to the expression of mutant gene, which regulates the morphogenesis of lateral zones of vertebral body growth plates is a pathogenetic mechanism of deformation development. The hypothesis of secondary compensatory growth zone is presented.
Key words: growth, differentiation, chondroblast, proteoglycans, keratansulphate-related fraction.

Многие стороны генеза сколиоза остаются еще не выясненными, и это, прежде всего, относится к выявлению особенностей нарушения роста.

И.М. Мовшович

Введение

Сколиотическая болезнь относится к числу наиболее сложных проблем ортопедии. Это определяется высокой частотой ее проявления и прогрессирующим течением. Хотя о сколиозе известно еще с древних времен, до сих пор патогенез идиопатического сколиоза (ИС) недостаточно исследован. Вопрос о прогрессировании деформации позвоночника рассматривается в литературе весьма противоречиво [4, 6, 9–11, 14, 16]. Многие теории возникновения патогенетического механизма формирования деформации позвоночника при ИС (рахитическая, механическая, гормональная и др.) не выдержали испытания временем. Сейчас общепризнанным является то, что ИС – это генетически детерминированное заболевание. И более того, как показали наши исследования [1], ИС является генетически зависимой, контролируемой майор-геном патологией, которая наследуется по аутосомно-доминантному типу с неполной пенетрантностью генотипов, зависящей от пола и возраста.

Патогенетическим механизмом формирования деформации позвоночника при ИС является асимметричное генетически обусловленное нарушение роста тел позвонков. Структурной основой роста позво-

ночника является пластинка роста (ПР) тела позвонка [3]. Функциональные свойства ПР зависят от структуры межклеточного матрикса, состоящего на 95 % из протеогликанов (ПГ), коллагена и воды. Эти тканеспецифичные макромолекулы играют основную роль в поддержании гомеостаза хрящевых тканей. Протеогликаны обеспечивают обменные процессы, прочность ткани, архитектонику, митогенную активность, рецепторную функцию клеток и межклеточные взаимодействия. Вместе с тем комплексные работы, касающиеся исследования ПГ в ПР тела позвонка при ИС, отсутствуют.

Цель исследования: методами углубленной морфологии и биохимии исследовать метаболические нарушения хондробластов и межклеточного матрикса ПР тел позвонков больных ИС.

Материалы и методы

Пластинки роста тел позвонков выпуклой и вогнутой сторон кривизны деформации были получены в результате оперативной коррекции деформации позвоночника в клинике детской вертебрологии от 20 больных в возрасте 12–16 лет, страдающих ИС III–IV степени. В качестве контроля были использованы ПР тел позвонков здоровых детей в возрасте 14–15 лет (5 случаев), которые были получены на кафедре судебной медэкспертизы.

Препараты фиксировались в 10 % растворе нейтрального формалина. После декальцинации в растворе ЭДТА и парафиновой проводки препараты окрашивались методами традиционной гистологии (гематоксилин-эозин и по Ван-Гизону) и гистохимии (Хейл-реакция, реакция с альциановой и толуидиновой синью при различных значениях pH и Шик-реакция. К реакциям ставились соответствующие контроли).

Для исследования окислительно-восстановительных ферментов – сукцинатдегидрогеназы (СДГ), НАД-Н-диафораз, L-глицерофосфат-ДГГ, щелочной и кислой фосфотаз – использовались креостатные срезы. Гистохимические реакции ставились по прописям Пирса и Кисели.

Для изучения макромолекулярной организации межклеточного вещества хрящевой ткани использовали метод поляризационно-оптического анализа [5]. Применение поляризованного света позволяет с высокой чувствительностью выявлять макромолекулы в межклеточном веществе и изучать их упорядоченность по степени рефракции гистохимических реакций. Исследуемые образцы пластинки роста и межпозвонкового диска фиксировали в спирт-формалине (4 : 1), обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в парафин. Срезы после депарафинирования и обезвоживания окрашивали 0,1 % раствором толуидинового синего в течение 10 минут на кератансульфат и хондроитинсульфат при значении pH красителя 1,5 и 2,5 соответственно.

Измерение диаметров и площадей клеток исследуемых препаратов, вычисление ядерно-цитоплазматических отношений и статистическая обработка полученных результатов осуществлялись при помощи пакета программ «Morpho Images» фирмы «Микромед». Были исследованы клетки герминативного и колонкового слоев ПР тел позвонков выпуклой и вогнутой сторон кривизны. Результаты исследования представлены в виде диаграмм.

Глюкозаминогликаны (ГАГ) из хряща выделяли раствором папаина в 0,2 М Na-ацетатном буфере pH 5,8 с добавлением 0,01 М ЭДТА и 0,01 М цистеина в течение 18 ч при 60 °С [17]. Белки осаждали 100 % ТХУ до конечной концентрации 5 %. Затем раствор диализовали 18 ч при температуре 4 °С против 50 mM Na-ацетатного буфера pH 5,0. ГАГ осаждали тремя объемами 96° этанола с 4 % ацетатом калия, осадки растворяли в 0,4 М хлористом гуанидине с 50 мМ ацетатом натрия pH 5,8.

Качественный состав ГАГ ПР тел позвонков исследовался методом разделения электрофорезом в 1 % геле агарозы [12] в 50 mM буфере ацетата бария с pH 5,0. Исследуемые образцы ГАГ перед электрофорезом для удаления отдельных видов ГАГ последовательно обрабатывали хондроитиназами АС, АВС, кератаназой в 50 mM трис-буфере pH 7,5 18 ч при 37 °С. После окончания процедуры гель окрашивали 0,1 % азуром с 50 mM натрий-формиатом и 10 mM хлоридом магния с pH 3,5. Окрашенный гель отмывали 50 mM ацетатным буфером с pH 5,8. Для идентификации ГАГ были использованы метчики – хондроитинсульфаты А, В, С, кератансульфат и гепарансульфат фирмы ICN.

Количественный состав образцов ГАГ на электрофереграммах оценивался при помощи пакета программ «Axion Vision 3» фирмы Carl Zeis. Данные представлены в виде гистограмм.

Результаты исследования

Морфологические данные. На выпуклой стороне кривизны ПР тела позвонка состоит из четырех слоев клеток. Герминативный слой достаточно широкий. По морфологическим признакам в этом слое можно выделить две популяции клеток: клетки, прилежащие к диску, – это малодифференцированные одиночные хондробласты с центрально расположенным круглым ядром и базофильной цитоплазмой. Эти клетки располагаются в интенсивно базофильном матриксе. Вторая популяция представлена крупными округлыми хондробластами, среди которых встречаются митотически делящиеся клетки и клетки, находящиеся в апоптозе. Здесь среди базафильного матрикса клетки располагаются регулярно, с хорошо контурирующимися ядрами и объемной цитоплазмой. Матрикс этой зоны гомогенен и базафилен (рис. 1). Зона пролиферирующих клеток узкая и состоит из 3–4 групп клеток без морфологических признаков дистрофии. В колонковых структурах хондробласты располагаются в виде вертикальных рядов, количество клеток в них до десяти. Зона гипертрофических клеток значительно уже, чем в интактных пластинках роста детей аналогичного возраста. Эта зона представлена двух- и трехклеточными структурами, окруженными базо-

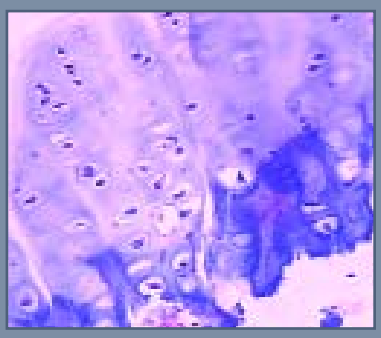


Рис. 1
Выпуклая сторона кривизны деформации ПР тела позвонка больного ИС. Окраска гематоксилинэозин;
10 х 40

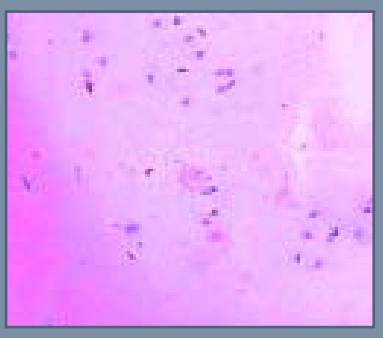


Рис. 2
Вогнутая сторона кривизны деформации ПР тела позвонка больного ИС. Окраска гематоксилинэозин;
10 х 40

фильным матриксом, в который внедряются кровеносные сосуды. Зона остеогенеза состоит из молодой костной ткани с включением фрагментов хрящевой ткани. В межбалочных пространствах располагается миелоидный костный мозг с большим количеством мегакариоцитов.

На вогнутой стороне кривизны ПР тела позвонка узкая, слои клеток дифференцируются с трудом. В камбиальном слое клетки расположены более регулярно, параллельно длинной оси позвонка, здесь встречаются двуядерные хондробласты и клетки, находящиеся в состоянии апоптоза. В матриксе видны зоны дистрофии в виде разволокнения и демаскировки коллагеновых волокон. На фоне разволокненного и дистрофически измененного матрикса видны беспорядочно ориентированные изогенные группы клеток (рис. 2). Границы некоторых клеток нечетко выражены, цитоплазма эозинофильна, ядра пикнотичны, некоторые клетки находятся в апоптозе. Среди изогенных групп клеток встречаются ассоциаты по 5–6 в лакуне с базофильной цитоплазмой и центрально расположенными ядрами. Эти клетки представляют собой типичные клетки изогенных групп, они не формируют колонковых структур. В гипертрофической зоне, представленной одним, двумя слоями клеток, наблюдается фрагментация матрикса, сосудистая инвазия, вплоть до зоны изогенных групп. Местами видны очаги регенерации с формированием волокнистого хряща.

При помощи пакета программ «Morpho Images» были проведены измерения диаметров и площадей клеток исследуемых препаратов, вычисление ядерно-цитоплазматических отношений и статистическая обработка полученных результатов. Было установлено, что среднее отношение площадей ядер к площадям клеток для вогнутой стороны герминативного и колонкового слоев ПР тела позвонка при ИС меньше единицы. Среднее отношение площадей ядер к площадям клеток для выпуклой стороны герминативного и колонкового слоев ПР тела позвонка при ИС больше единицы. Полученные результаты свидетельствуют о снижении синтетических потенций хондроцитов вогнутой стороны кривизны по сравнению с клетками выпуклой стороны кривизны деформации (рис. 3, 4).

Гистохимические данные. На выпуклой стороне кривизны ПР тела позвонка выявляется интенсивная Шик-реакция межтерриториального матрикса и цитоплазмы остеобластов «молодых» костных балок. В цитоп-

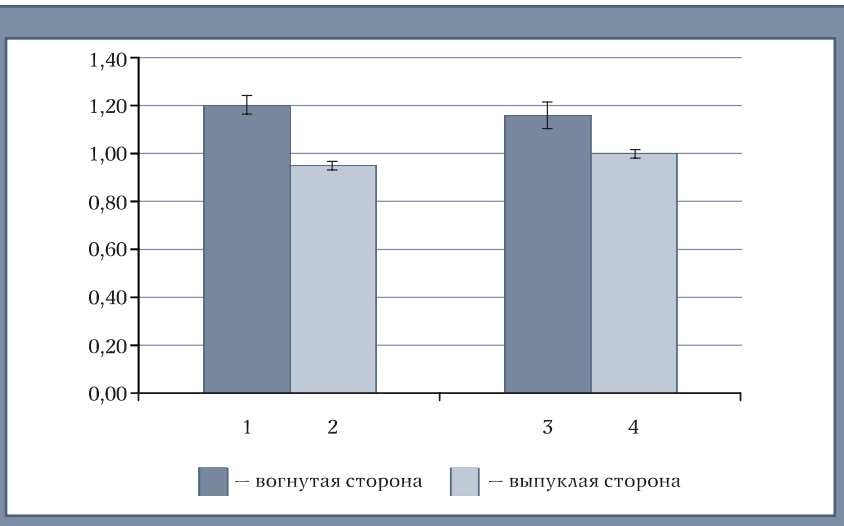


Рис. 3
Ядерно-цитоплазматические отношения клеток герминативного слоя ПР тела позвонка выпуклой и вогнутой сторон кривизны деформации при ИС: по оси OY – микроны в квадрате; 1, 2 – средние отношения площадей ядер к площадям клеток (окраска альциановым синим); 3, 4 – средние отношения площадей ядер к площадям клеток (Шик-реакция)



Рис. 4
Ядерно-цитоплазматические отношения клеток колонкового слоя ПР тела позвонка выпуклой и вогнутой сторон кривизны деформации при ИС: по оси OY – микроны в квадрате; 1, 2 – средние отношения площадей ядер к площадям клеток (окраска альциановым синим); 3, 4 – средние отношения площадей ядер к площадям клеток (Шик-реакция)

лазме герминативных, изогенных и колонковых клеток выявляются гранулярные (рис. 5) мелкие включения, исчезающие под воздействием панкреатической амилазы, идентифицированные нами как гликоген.

При окрашивании альциановым синим препаратов ПР тел позвонков выпуклой стороны кривизны отчетливо прослеживается зональность. Пролиферирующий слой достаточно узкий, препараты взяты в том возрастном периоде, когда процесс роста не интенсивен (рис. 6). Колонковые структуры располагаются параллельно друг другу, межклеточный матрикс и клетки альциан-позитивны. Реакция с тулуидиновой синью при pH-3,0 обнаруживает γ-метахромазию в цитоплазме колонковых и изогенных групп клеток. В этих же структурах Хейл-реакция интенсивна (рис. 7). Реакция β-метахромазии выявляется в цитоплазме гипертрофических клеток. Хондробласты герминативного слоя окрашиваются от γ- до β-метахромазии. Ферментная идентификация позволяет оценить состав ГАГ как хондроитинсульфаты А и С.

Герминативный и пролиферирующий слои обнаруживают интенсивные Хейл-реакции как цитоплазмы хондробластов, так и матрикса (рис. 8). Контрольная обработка срезов тестикулярной гиалуронидазой (2–4–6 ч) позволила идентифицировать в цитоплазме выявляемые ГАГ как гиалуроновую кислоту (цитоплазма хондроцитов герминативного слоя), хондроитинсульфаты А и С и следовые реакции на кератансульфат (изогенные и колонковые структуры, цитоплазма и матрикс).

Ферментная активность (СДГ и НАД-Н диафоразы) в хондробластах и хондроцитах всех слоев интенсивна.

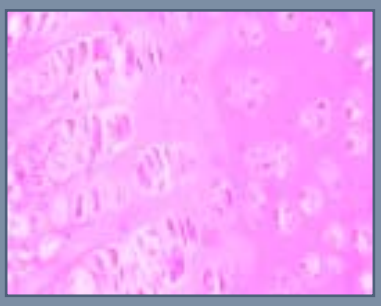


Рис. 5
Выпуклая сторона кривизны деформации, колонковый слой ПР тела позвонка больного ИС.
Шик-реакция;
10 х 40

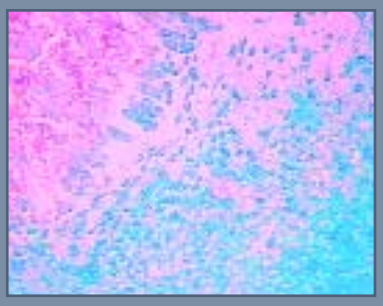


Рис. 6
Выпуклая сторона кривизны деформации ПР тела позвонка больного ИС.
Окраска альциановым синим;
10 х 10

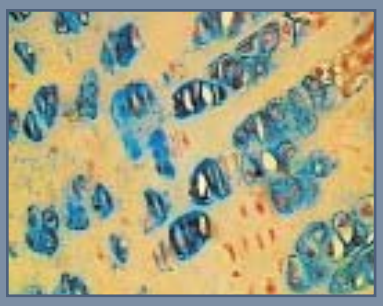


Рис. 7
Интенсивная Хейл-реакция в цитоплазме клеток выпуклой стороны кривизны деформации ПР тела позвонка больного ИС;
10 х 40

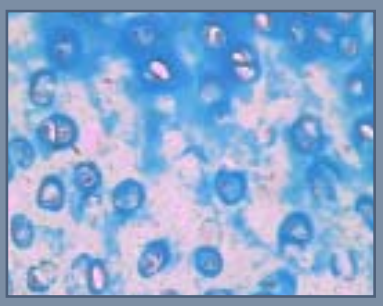


Рис. 8
Выпуклая сторона кривизны деформации ПР тела позвонка больного ИС, граница герминативного и пролиферирующего слоев. Окраска альциановым синим;
10 х 40

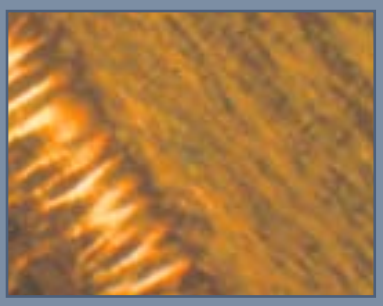


Рис. 9
Рефракция макромолекул кератансульфата в зоне пролиферации выпуклой стороны кривизны ПР тела позвонка больного ИС. Метод поляризационно-оптической микроскопии, окраска толуидиновым синим; pH 2,5;
15 х 20



Рис. 10
Рефракция макромолекул хондроитинсульфата в зоне пролиферации выпуклой стороны кривизны ПР тела позвонка больного ИС. Метод поляризационно-оптической микроскопии, окраска толуидиновым синим; pH 2,5;
15 х 20



Рис. 11
Вогнутая сторона кривизны деформации ПР тела позвонка больного ИС. Шик-реакция;
10 х 10

Гранулы ферментов заполняют всю цитоплазму клеток. Несколько слабее ферментативные реакции наблюдаются в цитоплазме некоторых гипертрофических хондроцитов. Эндотелиальные клетки и остеобласты обнаруживают выраженные реакции цитоплазмы на окислительно-восстановительные ферменты.

Исследование пространственно-упорядоченной организации ГАГ ПР тел позвонков методом поляризационной микроскопии продемонстрировало, что вокруг хондробластов и хондроцитов основное вещество и цитоплазма клеток проявляют интенсивную реакцию метахромазии и имеют высокую степень рефракции макромолекул хондроитинсульфатов в поляризационном свете (рис. 9, 10).

На вогнутой стороне кривизны ПР тела позвонка наблюдается выраженная Шик-реакция матрикса с усилением в зонах разволокнения. В цитоплазме клеток герминативного слоя и редких изогенных групп встречаются мелкие гранулы гликогена (Шик-реакция, контроль амилазой). В некоторых клетках обнаруживаются крупные гранулы, заполняющие всю цитоплазму, что свидетельствует о нарушении утилизации гликогена (рис. 11).

Реакции с альциановой и толуидиновой синью со значениями pH 4,6 и 3,0 наиболее выражены в герминативном слое клеток как в матриксе, так и в цитоплазме хондробластов. Цитоплазма изогенных групп клеток и межтерриториальный матрикс при реакции с толуидиновой синью (pH 3,0) окрашиваются в виде очагов. Более интенсивное окрашивание наблюдается в мембранах хондробластов и зонах репарации и дезорганизации.

Хейл-реакция выявляется только в цитоплазме некоторых гипертрофических хондроцитов. Предварительная обработка гиалуронидазой с последующими реакциями на ГАГ показали, что в цитоплазме хондробластов определяется кератансульфат на фоне резкого уменьшения количества хондроитинсульфатов А и С (реакция с альциановой синью, Хейл-реакция и ферментолиз гиалуронидазой 2–4–6 ч).

Единичные гранулы ферментов (СДГ, НАД-Н-ДГГ) выявляются в цитоплазме редких изогенных групп клеток, гипертрофических хондроцитах и более интенсивно в цитоплазме герминативных хондробластов. Реакция на α-глицерофосфатдегидрогеназу (α-ГДДГ) интенсивна в цитоплазме некоторых хондроцитов изогенных групп на вогнутой стороне кривизны деформации.

В хондробластах изогенных групп и гипертрофических хондроцитах гранулы кислой фосфатазы заполняют всю цитоплазму. Гранулы щелочной фосфатазы выявляются преимущественно в гипертрофических хондроцитах, эндотелиальных клетках и наиболее интенсивно в остеобласт-



Рис. 12
Гранулы щелочной фосфатазы. Выпуклая сторона кривизны деформации ПР тела позвонка больного ИС. Реакция с α-нафтил-фосфа-том;
10 х 40

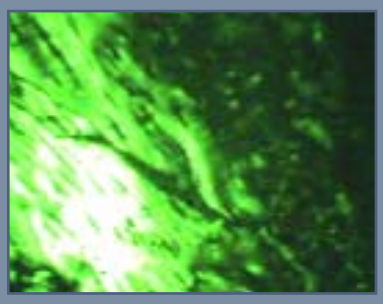


Рис. 13
Рефракция макромолекул кератансульфата в зоне пролиферации вогнутой стороны кривизны деформации ПР тела позвонка больного ИС. Метод поляризационно-оптической микроскопии, окраска толуидиновым синим; pH 1,5; зеленый фильтр;
15 х 20

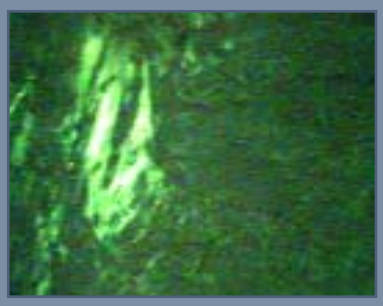


Рис. 14
Рефракция макромолекул хондроитинсульфата в зоне пролиферации вогнутой стороны кривизны деформации ПР тела позвонка больного ИС. Метод поляризационно-оптической микроскопии, окраска толуидиновым синим; pH 1,5; зеленый фильтр;
15 х 20



Рис. 15
Ультраструктура хондробласта вогнутой стороны кривизны деформации ПР тела позвонка больного ИС; х500

тах (рис. 12).

Исследование пространственно упорядоченной организации ГАГ межклеточного вещества пластинки роста методом поляризационной микроскопии показало, что макромолекулы сульфатированных ГАГ проявляют выраженную рефракцию только вокруг некоторых изогенных групп клеток и кальцифицирующихся хондроцитов ПР тела позвонка вогнутой стороны кривизны. Причем интенсивность двойного лучепреломления кератансульфата на 37 % выше, чем хондроитинсульфата (рис. 13, 14).

Ультраструктурные данные. Ультраструктурная организация клеток на вогнутой стороне кривизны ПР тела позвонка значительно изменена (рис. 15). Встречаются безъядерные клетки с полным отсутствием органелл (клетки-тени) как в герминативном, так и в пролиферирующем слоях. Наряду с этим выявляются клетки с относительно сохранившейся ультраструктурой. У этих клеток комплекс Гольджи единичный и расположен приядерно, вакуоли уплощены. Эндоплазматическая сеть с расширенными цистернами, заполненными бесструктурными массами. Митохондрии отечны, единичны. Внеклеточный матрикс представлен отечными волокнистыми коллагеновыми фибриллами и тонкими, ветвящимися фрагментами, идентифицированными нами как протеогликаны.

На выпуклой стороне кривизны ПР тела позвонка хондроциты и хондробласты с хорошо выраженной шероховатой эндоплазматической сетью, с обилием рибосом, активным комплексом Гольджи (рис. 16). В окружающем матриксе коллагеновые волокна с поперечной исчерченностью, между которыми расположены нитевидные разветвленные структуры – молекулы протеогликанов.

Результаты биохимических исследований. При исследовании качественного состава препаратов ГАГ ПР тел позвонков больных ИС были сформированы три группы больных по составу ГАГ ПР тел позвонков. К первой группе мы отнесли больных ИС с преобладанием хондроитинсульфатов в составе образцов ГАГ ПР тел позвонков и с низким содержанием кератансульфатов. Ко второй группе были отнесены больные ИС с умеренным количеством кератансульфатов и хондроитинсульфатов. К третьей группе были отнесены больные ИС с преобладанием кератансульфа-



Рис. 16
Ультраструктура хондробласта выпуклой стороны кривизны деформации ПР тела позвонка больного ИС;
х500

тов и низким содержанием хондроитинсульфатов в образцах ГАГ ПР тел позвонков.

При рестрикции хондроитиназой АС нативных образцов ГАГ ПР тел позвонков больных ИС, отнесенных нами к первой группе, и последующем электрофорезе в геле агарозы выявляется очень слабая или отсутствует фиолетовая кератансульфатная полоса (рис. 17). Полученный факт свидетельствует о том, что в образцах содержится малое количество кератансульфатов, которые плохо регистрируются данным методом. При рестрикции кератаназой нативных образцов ГАГ ПР тел позвонков больных ИС первой группы и последующем электрофорезе в геле агарозы выявляются две полосы: менее электрофоретически подвижная широкая синяя полоса хондроитинсульфата и более подвижная, в виде следовых количеств, розовая – кератансульфатсвязанная фракция (рис. 17). Данная фракция – это составляющая хрящевой ткани ПР тел позвонков, ранее не описанная в литературе и обнаруженная нами впервые. Мы назвали ее кератансульфатсвязанная фракция, поскольку она выявляется на гель-электрофорезе после обработки нативных образцов ГАГ ПР тела позвонка кератаназой и не выявляется при аналогичной реакции с хондроитиназой АС. Данная фракция обладает уникальными свойствами – она устойчива к действию хондроитиназы, кератаназы, гепариназы, гиалуронидазы, протеиназы К. Кератансульфатсвязанная фракция может быть охарактеризована как самая подвижная, этот ГАГ имеет относительно небольшой молекулярный вес, высокий заряд и не является ни хондроитинсульфатом, ни дерматансульфатом, ни кератансульфатом. При последовательной рестрикции образцов ГАГ обеими рестриктазами (хондроитиназой АС и кератаназой) в агарозном геле выявляется тонкая полоска кератансульфатсвязанной фракции, почти незаметная, а в некоторых случаях эта полоса не регистрируется.

При рестрикции кератаназой нативных образцов ГАГ ПР тел позвонков больных ИС, объединенных нами во вторую группу, и последующем электрофорезе в геле агарозы выявляются две четкие полосы: менее электрофоретически подвижная синяя полоса хондроитинсульфата и более подвижная розовая – кератансульфатсвязанная фракция, причем обе полосы выявляются в достаточных количествах. При рестрикции образцов ГАГ хондроитиназой АС и последующем электрофорезе в геле агарозы выявляется кератансульфат. При последовательной рестрикции образцов ГАГ обеими рестриктазами (хондроитиназой АС и кератаназой) в агарозном геле в достаточном коли-

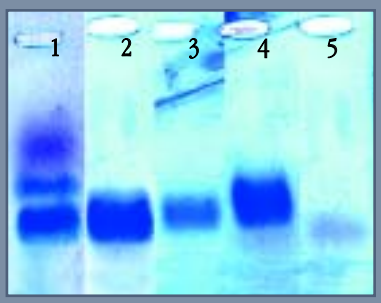


Рис. 17
Фореграмма образцов ГАГ ПР тела позвонка больного ИС (группа 1), рестриктированных ферментами: 1 – стандарт (хондроитинсульфаты А, В, С, кератансульфат и гепарансульфат); 2 – нативные образцы ГАГ; 3 – образцы ГАГ, рестриктированные хондроитиназой АС; 4 – образцы ГАГ, рестриктированные кератаназой; 5 – образцы ГАГ, рестриктированные последовательно хондроитиназой АС и кератаназой

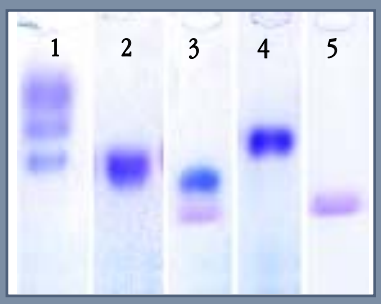


Рис. 18
Фореграмма образцов ГАГ ПР тела позвонка больного ИС (группа 2), рестриктированных ферментами: 1 – стандарт (хондроитинсульфаты А, В, С, кератансульфат и гепарансульфат); 2 – нативные образцы ГАГ; 3 – образцы ГАГ, рестриктированные кератаназой; 4 – образцы ГАГ, рестриктированные хондроитиназой АС; 5 – образцы ГАГ, рестриктированные последовательно хондроитиназой АС и кератаназой

честве выявляется кератансульфатсвязанная фракция (рис. 18). Количество кератансульфатсвязанной фракции, характерное для второй группы больных, значительно превышает таковое для первой группы больных.

При рестрикции кератаназой нативных образцов ГАГ ПР тел позвонков больных ИС, объединенных нами в третью группу, и последующем электрофорезе в геле агарозы выявляются две четкие полосы: менее электрофоретически подвижная синяя полоса хондроитинсульфата и более подвижная розовая – кератансульфатсвязанная фракция, причем обе полосы выявляются в достаточных количествах (рис. 19). Нужно отметить, что хондроитинсульфаты в образцах ГАГ ПР тел позвонков данных больных обнаруживаются в следовых количествах, тогда как кератансульфатсвязанная фракция присутствует в достаточно большом количестве. При рестрикции образцов ГАГ хондроитиназой АС и последующем электрофорезе в геле агарозы выявляется большое количество кератансульфатов, сильно превышающее количество таковых во второй группе. При последовательной рестрикции образцов ГАГ обеими рестриктазами (хондроитиназой АС и кератаназой) в агарозном геле в большом количестве выявляется кератансульфатсвязанная фракция (рис. 19).

При исследовании электрофоретической подвижности в агарозном геле образцов ГАГ ПР тел позвонков больных ИС был выявлен следующий градиент количественного состава исследуемых образцов: с увеличением количества кератансульфатов нарастает количество кератансульфатсвязанной фракции и соответственно уменьшается количество хондроитинсульфатов (рис. 20).

Сравнительный анализ количества кератансульфатсвязанной фракции и хондроитинсульфатной составляющей образцов ГАГ тел позвонков больных ИС в сравнении с нормой проводился по уровню интенсивности цвета при помощи пакета программ «Axion Vision 3» фирмы Carl Zeis.

Параметр «интенсивность цвета» описывает интенсивность цвета объекта в уровнях градации «серого» от 0 до 255 [13]. Абсолютно темному (непрозрачному) объекту соответствует значение 0, а полностью прозрачному объекту – значение 255. Программа вычленяет три цветовые составляющие (красную, зеленую и синюю) цвета исследуемого объекта. Известно, что составляющие образцов ГАГ в геле агарозы окрашиваются азуром следующим образом: кератансульфаты – сиреневым, хондроитинсульфаты – синим, кератансульфатсвязанная фракция – розовым. Поэтому при обработке полученных данных (рис. 20) была исключена зеленая составляющая параметра «интенсивность цвета». Обобщенные данные представлены в виде гистограммы (рис. 21). Для построения гистограммы были использованы красная составляющая для кератансульфатсвязанной фракции и синяя составляющая для хондроитинсульфатов.

Полученные данные подтверждают обоснованность нашего деления обследованных на три группы по преобладанию кератансульфатов или хондроитинсульфатов в образцах ГАГ тел позвонков. Гистограмма наглядно выявляет обнаруженный ранее градиент количественного состава исследуемых образцов: с увеличением количества кератансульфатов нарастает количество кератансульфатсвязанной фракции и соответственно уменьшается количество хондроитинсульфатов.

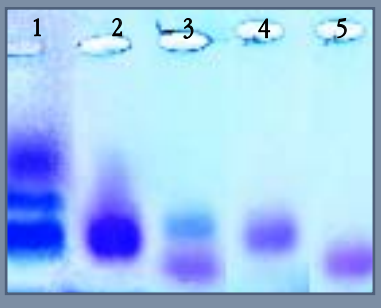


Рис. 19
Фореграмма образцов ГАГ ПР тела позвонка больного ИС (группа 3), рестриктированных ферментами: 1 – стандарт (хондроитинсульфаты А, В, С, кератансульфат и гепарансульфат); 2 – нативные образцы ГАГ; 3 – образцы ГАГ, рестриктированные кератаназой, 4 – образцы ГАГ, рестриктированные хондроитиназой АС; 5 – образцы ГАГ, рестриктированные последовательно хондроитиназой АС и кератаназой

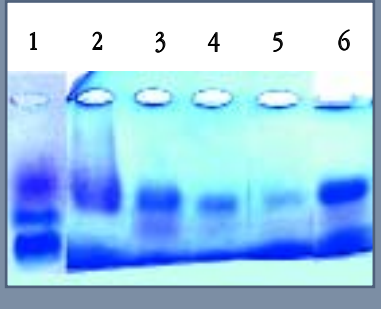


Рис. 20
Фореграмма образцов ГАГ ПР тела позвонка больных ИС (1, 2, 3-й групп), обработанных кератаназой, в сравнении с образцом ГАГ нормальной ПР тела позвонка: 1 – стандарт (хондроитинсульфаты А, В, С, кератансульфат и гепарансульфат); 2 – нативные образцы ГАГ; 3 – образец ГАГ, обработанный кератаназой (3-я группа больных); 4 – образец ГАГ, обработанный кератаназой (норма); 5 – образец ГАГ, обработанный кератаназой (1-я группа больных); 6 – образец ГАГ, обработанный кератаназой (2-я группа больных)

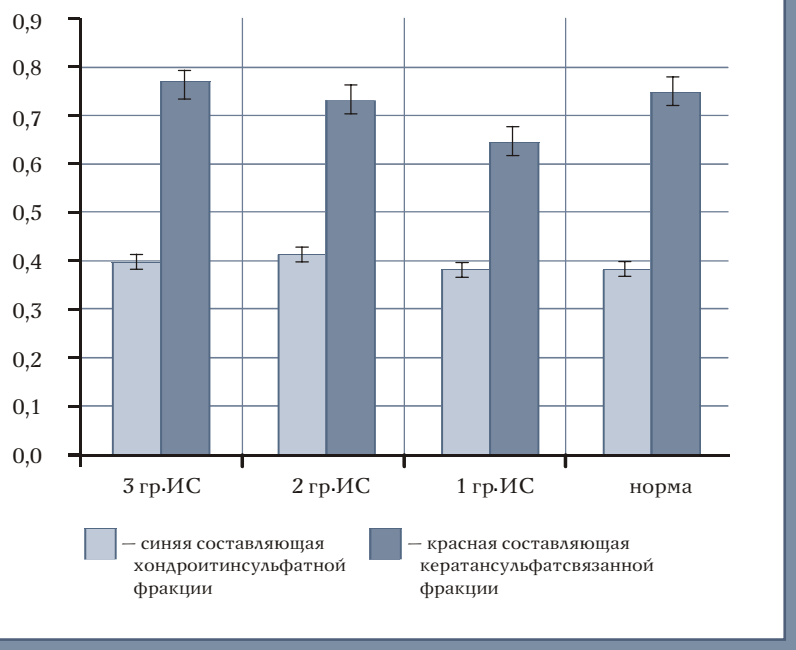


Рис. 21
Количество кератансульфатсвязанной фракции и хондроитинсульфатной составляющей образцов ГАГ ПР тел позвонков больных ИС в сравнении с нормой. По оси OY отложены значения интенсивности цвета в единицах «серого» при пересчете по формуле 100/x, где x – значение уровня интенсивности цвета

Обсуждение

Ранее было показано, что ИС II–IV степени не возникает при отсутствии мутации в гене [1]. «Чтобы выяснить, как реализуется в онтогенезе информация, содержащаяся в генах, влияющих на «поведение» клеток, важно установить, какие биохимические процессы затрагиваются этими генами, в определении каких структур эти гены участвуют...» [2]. Надо полагать, что основные морфологические изменения – хаотичное распределение хондробластов, нарушение синтетических потенций клеток (редукция эндоплазматической сети, нефункциональные вакуоли комплекса Гольджи, изменение ядерно-цитоплазматических отношений), нарастание количества кератансульфата на фоне снижения выявляемых сульфатированных ГАГ и появление кератансульфатсвязанной фракции – являются отражением генетических нарушений. Известно, что процесс роста обеспечивается адекватной пролиферацией и дифференцировкой хондробластов на фоне интенсивных синтезов ПГ [3]. Молекулы ПГ формируют микроокружение (матрикс), которое выполняет барьерную, информационную, трофическую функции. Все это укладывается в понятие гомеостаз – «клетка – матрикс»: динамическое равновесие между процессами синтеза и деградации. Регуляция этих процессов осуществляется экспрессией генного аппарата клеток, обеспечивающих интенсивность роста. В случае экспрессии мутантного гена происходит нарушение гомеостаза в стройной системе процессов: дифференцировки, пролиферации, остеогенеза, что приводит к развитию деформации позвоночника, основой которой является асимметрия роста.

Вопрос об асимметрии роста рассмотрен нами следующим образом. Тело позвонка в онтогенезе формируется из четырех зачатков, регуляция которых осуществляется экспрессией разных генов [7]. Экспрессия мутантного гена, регулирующего формирование латеральных зон тел позвонков, приводит к развитию сколиотической деформации [4]. Возникает, казалось бы, противоречие: на фоне нарушения пролиферации и дифференцировки хондробластов ПР процесс остеогенеза остается без изменений. Известно, что процессы остео- и хондрогенеза контролируются разными группами генов [18]. Это согласуется с исследованиями V. Putti: «Позвонок следует рассматривать не как простую однородную морфологическую единицу, но как совокупность частей. Все части связаны между собой, но генетически и морфологически друг от друга не зависят» [15].

Значительный интерес представляет выявленный факт пролиферации хондробластов в латеральных отделах рыхловолокнистой части диска (вогнутая сторона кривизны). Между коллагеновыми волокнами располагаются клетки типа колонковых структур, тесно прилежащие друг к другу. Цитоплазма хондробластов интенсивно базофильна, содержит гранулы гликогена. Вокруг клеток и в цитоплазме выявляются хондроитинсульфаты А и С. Вопросы о природе этих клеток и побудительных причинах их пролиферации могут быть объяснены следующим образом. В связи с торсией тел позвонков возникает напряжение волокнистых структур диска, подобно тому, что происходит при действии аппарата Илизарова, – формирование атипичной зоны роста (рис. 22). Пролиферация клеток, синтез тканеспецифических ПГ являются факторами, определяющими продолжающийся процесс роста, даже при удалении ПР тела позвонка.

Логично возникает вопрос: почему «компенсаторная» ПР возникает в рыхловолокнистой части диска, а не в замыкательной пластинке? Объяс-

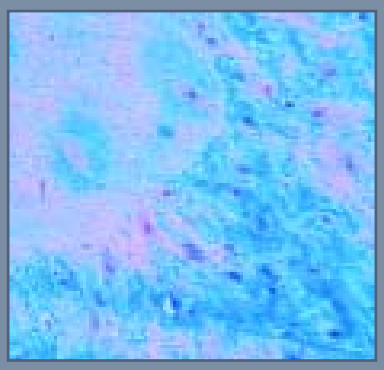


Рис. 22
Формирование вторичной пластинки роста. Окраска альциановым синим; 10 х 40

нение может быть следующим: хондробласты замыкательной пластинки относятся к третьему типу клеток. Они, дифференцированные и утратившие способность к делению, выполняют специфические функции поддержания местного гомеостаза. Кроме того, если признать, что процесс тракции является одним из побудительных мотивов пролиферации (репродукции клеток), то волокнистые структуры диска в процессе торсии подвергаются напряжению. В этих зонах диска, как показали наши исследования, выявлены малодифференцированные хондробласты, способные к репродукции [3]. Вероятно, на фоне глубоких деструктивных процессов в пластинке роста происходит своеобразная агрегация жизнеспособных и функционально активных клеток, способствующая их взаимодействию и активному синтезу специфических биополимеров. Исследование макромолекулярной организации основного вещества вокруг таких хондроцитов показало, что вновь образованные агрегаты клеток синтезируют высокоупорядоченные сульфатированные ГАГ.

Ультраструктурные исследования этих зон позволяют либо подтвердить, либо отвергнуть предложенную гипотезу. Полученные факты объясняют феномен продолжения роста детей после оперативного вмешательства на передних отделах тел позвонков.

Заключение

В работе представлены морфологические и биохимические изменения в ПР тел позвонков при ИС. С генетических позиций сделаны попытки объяснить природу асимметрии роста. Предложена гипотеза о формировании компенсаторной вторичной ПР. Сопоставление углубленных морфологических и биохимических данных позволило объяснить некоторые закономерности морфогенеза ИС.

Литература

1. **Аксенович Т.И., Зайдман А.М., Зоркольцева И.В. и др.** Новые модели наследования сложных признаков и их исследования при сегрегационном анализе идиопатического сколиоза // Генетика. 1999. Т. 35. № 2. С. 255–262.
2. **Гершензон С.М.** Основы современной генетики. Киев, 1979.
3. **Зайдман А.М.** Идиопатический сколиоз. Новосибирск, 1994.
4. **Казьмин А.И., Кон И.И., Беленький В.Е.** Сколиоз. М., 1981.
5. **Керн М., Модиш Л., Дедух Н.В.** Принципы поляризационно-оптического анализа в изучении соединительной ткани // Архив анат. гистол. и эмбриол. 1985. Т. 88. № 6. С. 5–12.
6. **Кон И.И.** Сколиоз. М., 1974.
7. **Корочкин Л. И.** Взаимодействие генов в развитии. Новосибирск, 1977.
8. **Мовшович И.А.** Оперативная ортопедия. М., 1983.
9. **Ashworth M.A., Hancock J.A., Ashworth L. et al.** Scoliosis screening: An approach to cost-benefit analysis // Spine. 1988. Vol. 20. P. 1187–1188.
10. **Bunnell W.P.** Outcome of spinal screening // Spine. 1993. Vol. 18. P. 1572–1580.
11. **Burwell R.G.** The 1989 report on school screening for scoliosis: the relation to the etiology // J. Bone Jt Surg. Br. 1990. Vol. 77. P. 333–334.
12. **Dietrich C.P., Nader H.B., Britto L.R.G. et al.** Chemical composition heparitin sulfate: Fractionation and characterization of four acitic mucopolysaccharides in heparitin sulfate from beef lung tissue // Biochim. Biophys. Acta. 1971. Vol. 237. P. 430–441.
13. **Ihrig S., Ihrig E.** Preparing Digital Images for Print. Osborne Mc. Craw-Hill, 1995. P. 55-79.
14. **James J.** Idiopathic scoliosis: The prognosis, diagnosis and operative indications related to cure patterns and the age of onset // J. Bone Jt Surg. Br. 1954. Vol. 36. P. 36–49.
15. **Putti V.** Die angeborne deformitaten der Wirbelsaule. Fort. a. d. Geb. d. Rontgenstr., 1910.
16. **Stirling A.J., Howell D., Millner P.A. et al.** Late-onset idiopathic scoliosis in children six to fourteen years old // J. Bone Jt Surg. Br. 1996. Vol. 78. P. 1330–1336.
17. **Theocharis A.D., Tsara M.E., Papageorgakopoulou N. et al.** Characterization of glycosaminoglycans from human normal and scoliotic nasal cartilage with particular reference to dermatan sulfate // Biochim. Biophys. Acta. 2001. Vol. 1528. P. 81–88.
18. **Trippel S.B., Coutts R.D., Einhorn T.A. et al.** Growth factors as therapeutic agents // J. Bone Jt Surg. Am. 1996. Vol. 78. P. 1272–1285.

Адрес для переписки:
Корель Анастасия Викторовна
630091, Новосибирск,
ул. Фрунзе, 17, НИИТО,
AKorel@niito.ru