

DOI: 10.7868/S0041377118090102

## АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ХОНДРОБЛАСТАХ ПЛАСТИНОК РОСТА ТЕЛ ПОЗВОНКОВ БОЛЬНЫХ ИДИОПАТИЧЕСКИМ СКОЛИОЗОМ III—IV СТЕПЕНИ

© *Е. Л. Строкова*,<sup>1</sup> *А. М. Зайдман*,<sup>1,\*</sup> *А. О. Степанова*,<sup>2,3</sup> *П. П. Лактионов*<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> *Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я. Л. Цивьяна, Новосибирск, 630091,*

<sup>2</sup> *Национальный медицинский исследовательский центр им. акад. Е. Н. Мешалкина, Новосибирск, 630055,*

<sup>3</sup> *Институт химической биологии фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, 630090;*

\* *электронный адрес: AZaydman@niito.ru*

Идиопатический сколиоз (ИС) известен с древних времен, однако до сих пор не существует единого представления относительно этиологии и патогенеза данного заболевания. Главенствующей является генетическая теория развития сколиоза. Поиск этиологических факторов в большинстве исследований проводится с использованием крови больных ИС. Целью исследования являлся анализ экспрессии генов, регулирующих дифференцировку и функционирование хондробластов пластинок роста (ПР), синтез и формирование компонентов внеклеточного матрикса ПР тел позвонков в области локализации патологии у больных ИС III—IV степени. В результате исследования выявлен профиль экспрессии генов, характерный для хондроцитов ПР тел позвонков при ИС III—IV степени: дисбаланс генов хондрогенной дифференцировки (*PAX1*, *PAX9* и *INH*), рецепторов ростовых и транскрипционных факторов роста (*SOX9*, *TGFR1* и *GHR*) и генов, участвующих в сульфатировании протеогликанов (*SLC26A2* и *CHST3*). Полученные данные согласуются с морфологическими и биохимическими результатами и могут являться маркером патологии.

**Ключевые слова:** идиопатический сколиоз, пластинка роста, экспрессия гена, хондробласт, протеогликан

**Принятые сокращения:** ИС — идиопатический сколиоз, ПР — пластинка роста, ПГ — протеогликан.

Подростковый идиопатический сколиоз (ИС) — это тяжелейшая патология, поражающая 2—3 % детей школьного возраста во всем мире (Sharma et al., 2011). Заболевание характеризуется прогрессирующей в процессе роста клиновидной и торсионной деформацией позвонков, приводящей к искривлению ребер и грудной клетки. Итогом патологического процесса является ранняя смертность больных. Эффективного средства профилактики этой болезни до сих пор не разработано. За последние десятилетия стандарт лечения сколиоза не изменился: от начального наблюдения до корсетолечения и хирургической коррекции в качестве последнего средства (Fazal, Edgar, 2006).

Начиная со времен Гипократа и по настоящее время ИС 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 et al., 2012).

В соответствии с современными представлениями, в возникновении и развитии ИС ключевую роль играют наследственные и генетические факторы (Chan et al., 2002; Sharma et al., 2011; Takahashi et al., 2011; Gorman et al., 2012). В результате генетических исследований больных ИС были выявлены полиморфные варианты генов (*SNPs*) и определено несколько локусов, ассоциированных с предрасположенностью к подростковому ИС (Zhou et al., 2012). Однако несмотря на многочисленные исследования и большой объем полученных данных, генетические механизмы заболевания остаются невыясненными. При этом выявление генов, гипер- или гипоекспрессия которых приводит к развитию ИС или ассоциирована с ИС, открыло бы пути для ранней диагностики, прогноза, профилактики и, возможно, коррекции патологии современными методами молекулярной биологии, например методами редактирования геномов (CRISPR) (Валетдинова, 2016).

В совместном исследовании Новосибирского научно-исследовательского института травматологии и орто-

педии и Института цитологии и генетики СО РАН выявлено, что ИС — генетически зависимая деформация позвоночника, зависящая от мутации в основном гене. Показано, что в отсутствие мутации деформация не развивается (Ахенович et al., 1999). Следовательно, больные сколиозом являются носителями мутантного гена, дисфункция которого приводит к нарушению роста позвоночника. Морфологические и биохимические исследования (Зайдман и др., 2004) при ИС свидетельствуют о том, что патогенетическим механизмом формирования деформации позвоночника является асимметрия роста. Возможно предположить, что в основе асимметрии роста лежит нарушение генетической регуляции роста позвоночника на вогнутой стороне деформации.

В постнатальном периоде тело позвонка подвергается остеогенезу, за исключением узкой хрящевой пластинки (пластинка роста, ПР), за счет которой осуществляется рост позвонков. Этот рост происходит благодаря пролиферации, дифференцировке малодифференцированных хондробластов ПР в гипертрофический хондроцит и остеогенезу формируемой ткани (Kotnak, Mundlos, 2003). Поскольку ПР непосредственно участвует в формировании тела позвонка, логично исследовать экспрессию генов в ПР, т. е. в области локализации патологии, тогда как в большинстве генетических исследований для анализа используют кровь больных (Miller et al., 2006; Marosy et al., 2010). В связи с этим предпринято исследование экспрессии генов в хондробластах ПР тела позвонков больных ИС III—IV степени, у которых признаки заболевания выражены наиболее ярко.

Цель работы заключалась в изучении с помощью метода количественной ПЦР экспрессии генов, регулирующих дифференцировку и функционирование хондробластов ПР, синтез и формирование компонентов внеклеточного матрикса ПР тел позвонков больных идиопатическим сколиозом III—IV степени.

## Материал и методика

ПР тел позвонков на уровне деформации, а также ниже и выше деформации получены в клинике детской ортопедии Новосибирского научно-исследовательского института травматологии и ортопедии от 12 детей в возрасте 11—15 лет, больных 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. Полученные ПР тел позвонков были использованы для морфологических, гистохимических исследований и количественной ПЦР. В качестве контроля при анализе экспрессии генов были использованы хрящевые структурные компоненты позвоночника эмбриона человека 10—12 нед развития (10 образцов), полученные непосредственно после медицинского аборта от клинически здоровых женщин из лицензированных учреждений Министерства здравоохранения РФ в соответствии с утвержденным перечнем медицинских показаний. От всех пациенток имеется письменное информированное согласие на участие в исследовании, эксперименты соответствуют этическим принципам Хельсинкской декларации и стандартам биоэтического комитета ГУ НИИ МББ СО РАМН.

Получение клеток из образцов ткани. Гиалиновый хрящ ПР и эмбриональный хрящ отмывали в

PBS, измельчали до размеров 1—2 мм<sup>2</sup> и помещали в раствор 1.5%-ной коллагеназы. Инкубировали при 37 °С в течение 22—24 ч. Полученную суспензию клеток пропустили через нейлоновый фильтр и осаждали клетки центрифугированием в течение 10 мин при 200 об/мин. Определяли общее количество клеток в камере Горяева.

Морфологические и гистохимические исследования ПР тел позвонков больных ИС были выполнены в соответствии с протоколами, описанными ранее (Зайдман и др., 2004).

Выделение РНК из клеток и подготовка образцов для полимеразной цепной реакции (ПЦР). Из клеток выделяли суммарную клеточную РНК тризольным методом в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Осажденную РНК растворяли в 30—50 мкл воды (RNase-free). Для удаления геномной ДНК выделенную РНК обрабатывали ДНКазой (RNase-free) согласно рекомендациям фирмы-производителя. кДНК получали в реакции обратной транскрипции из 2 мкг суммарной РНК каждого образца с использованием Oligo (dT)<sub>15</sub>-праймера и M-MLV обратной транскриптазы в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя (200 ед. M-MLV на реакцию, объем реакции 25 мкл).

Определение мРНК тестируемых 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 °С — 3 мин 30 с, затем 40 циклов: 95 °С — 20 с, 58 °С — 15 с, 72 °С — 30 с, 88 °С — 10 с. Объем реакционной смеси составлял 30 мкл: к 15 мкл 2 × буфера (7 mM MgCl<sub>2</sub>, 130 mM Трис-НСl, pH 8.8, 32 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1 % Tween-20, 0.5 mM 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.

Подбор праймеров был осуществлен на основании общедоступных материалов о последовательностях ДНК и мРНК генов в базе данных NCBI с использованием программы Primer-BLAST. Последовательности праймеров приведены в таблице.

Результаты ПЦР оценивали с использованием компьютерной программы iCycler IQ5. Специфичность проводимой реакции определяли с помощью анализа кривой плавления продуктов амплификации в диапазоне от 65 до 95 °С с шагом в 1 градус. Для контроля перекрестного загрязнения ПЦР в выделение РНК была включена вода, не содержащая РНКазы (RNase-free), которую затем использовали как отрицательный контроль. В качестве гена домашнего хозяйства был использован ген глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (*GAPDH*). В качестве стандартов использовали ПЦР-продукты, полученные после амплификации кДНК с использованием специфических праймеров. Для построения калибровочных графиков из полученных стандартов готовили серийные разведения и проводили реакцию Real-Time SYBR Green I PCR. Для оценки относительного уровня экспрессии мРНК целевых генов в качестве нормировочного гена был выбран ген *GAPDH*. Для нормировки среднее значение целевого гена делили на среднее значение гена *GAPDH*. Для представления данных из полученных нормированных данных выбирали наименьшее значение, которое обозначали как калибратор. Для вычисления относительного количества целевого гена нормированные значения целевого гена делили на значение калибратора (согласно рекомендациям Applied Biosystems, <http://www3.appliedbiosys->

Список генов и последовательности праймеров для Real-Time SYBR Green I PCR

Номер	Название гена, номер доступа (GenBank)	Последовательность праймера (5'→3')	Размер продукта (пар нуклеотидов)
1	<i>GAPDH</i> NM_002046.3	F: TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT R: CATCGCCCACTTGATTTGGAGGG	258
2	<i>ACAN</i> NM_013227.3	F: GCGGAGCACTGTAACATAGACCAGG R: CCGATCCACTGGTAGTCTTGGGCAT	206
3	<i>LUM</i> NM_002345.3	F: ACCTGGAGGTCAATCAACTTGAGAAGTTTG R: AGAGTGACTTCGTTAGCAACACGTAGACA	172
4	<i>VCAN</i> NM_004385.4	F: CTGGCAAGTGTGCGGGTCTTTACC R: GGAGCCCGGATGGGATATCTGACAG	278
5	<i>COL1A1</i> NM_000088.3	F: GAAGACATCCCACCAATCACCTGCGTA R: GTGGTTTCTTGGTCGGTGGGTGACT	227
6	<i>COL2A1</i> NM_001844.4	F: AAGGAGACAGAGGAGAAGCTGGTGC R: AATGGGGCCAGGGATTCCATTAGCA	299
7	<i>HAPLN1</i> NM_001884.3	F: GGTAGCACTGGACTTACAAGGTGTGGT R: GGCTCTCTGGGCTTTGTGATGGGAT	222
8	<i>PAX1</i> NM_006192.3	F: AACATCCTGGGCATCCGGACGTTTA R: AGGGTGGAGGCCGACTGAGTGTAT	194
9	<i>PAX9</i> NM_006194.3	F: CTCATCACCGACCAAGTGAGCGA R: GAGCCATGCTGGATGCTGACACAAA	212
10	<i>SOX9</i> NM_000346.3	F: ACTACACCGACCACAGAATCCAG R: AGGTCGAGTGAGCTGTGTAGACG	206
11	<i>IHH</i> NM_002181.3	F: GATGAACCAGTGGCCCGGTGTG R: CCGAGTGCTCGGACTTGACGGA	233
12	<i>GHR</i> NM_000163.2	F: TGCCCCAGTTCCAGTTCCAAAGAT R: AGGTCACAACAGCTGGTACGTCCA	284
13	<i>IGF1R</i> NM_000875.3	F: CGCACCAATGCTTCAGTTCCTTCCA R: CCACACACCTCAGTCTTGGGGTCT	266
14	<i>EGFR</i> NM_005228.3	F: ATAGACGACACCTTCCTCCCAGTGC R: GTTGAGATACTCGGGGTTGCCACT	177
15	<i>TGFBR1</i> NM_001130916.1	F: GGGCGACGGCGTTACAGTGTT R: AGAGGGTGCACATACAAACGGCCTA	179
16	<i>SLC26A2</i> NM_000112.3	F: CCTGTTTTGCAGTGGCTCCCAA R: CCACAGAGATGTGACGGGAGGT	208
17	<i>CHST1</i> NM_003654.5	F: ATACGGCACCGTGCAGAACTCG R: AGGCTGACCGAGGGGTTCTTCA	165
18	<i>CHST3</i> NM_004273.4	F: AGAAAGGACTCACTTTGCCCCAGGA R: TGAAGCTGGGAGAAGGCTGAATCGA	268

tems.com/cms/ groups/mcb\_support/documents/generaldocuments/ cms\_040980.pdf). Полученные данные на рис. 2—5 приведены в форме среднее значение  $\pm$ SD.

Использованные реактивы: тризол (Sigma, США), RNase-free вода RNase-free DNase, *Taq*-полимераза (Fermentas, Латвия), фермент M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, США), коллагеназа, краситель SYBR Green I (Thermo Fisher Scientific, США), Oligo (dT)<sub>15</sub>-праймер, праймеры (БИОСЕТ, Россия).

Статистический анализ результатов выполняли с использованием пакета Microsoft Office Excel 2007 и стандартного пакета программ STATISTICA 6.0. Определяли средние арифметические величины (M) и 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 и обсуждение

Основанием для выбора генов, регулирующих функционирование ПР тел позвонков при ИС, явились биохимические (Зайдман и др., 2004) и морфологические данные о нарушении структурной организации клеток и матрикса ПР на вогнутой стороне деформации позвоночника. Структура ПР на выпуклой стороне деформации сохранена, колонковый слой представлен высокодифференцированными клетками (рис. 1, а). Вогнутая сторона деформации ПР лишена зональной структуры и представлена беспорядочно расположенными малодифференцированными хондробластами на фоне дистрофически измененного матрикса (рис. 1, б).

Методом ПЦР в режиме реального времени исследовали экспрессию 17 генов. В число этих генов входили гены *TGFRI*, *EGFR*, *IGF1R* и *GHR*, принимающие участие в процессе регуляции роста позвоночника, гены *SOX9*, *PAX1*, *PAX9* и *IHH*, регулирующие процесс хондрогенной дифференцировки, гены *ACAN*, *LUM*, *VCAN*,

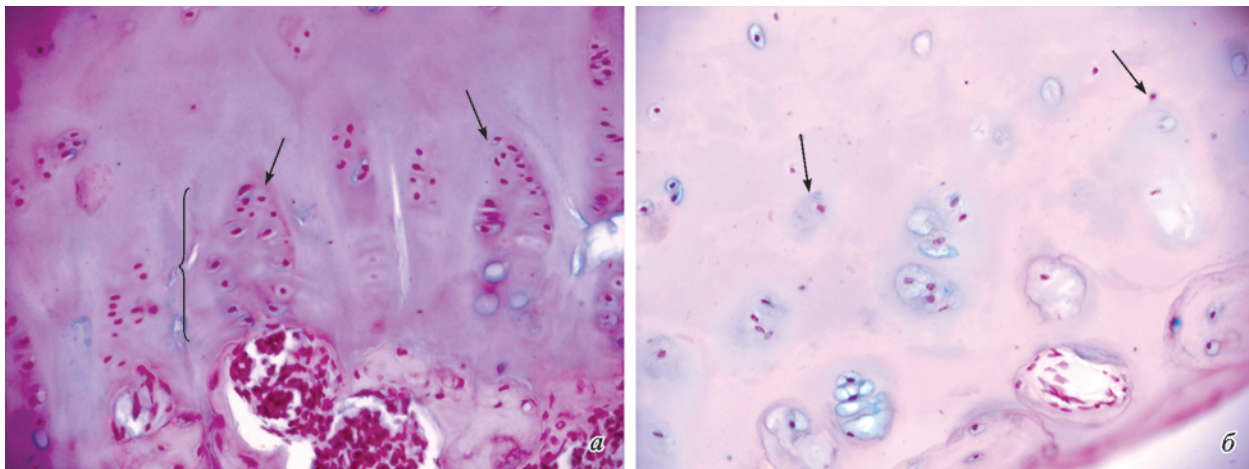


Рис. 1. Пластинка роста тела позвонка больного идиопатическим сколиозом III—IV степени

*а* — выпуклая сторона деформации: структура пластинки роста сохранена, колонковый слой (фигурная скобка) представлен высокодифференцированными клетками (указаны стрелками); позитивная Хейл-реакция свидетельствует о высокой полимерности протеогликанов в цитоплазме и матриксе. *б* — вогнутая сторона деформации: нарушение зональности, беспорядочное расположение малодифференцированных клеток (указаны стрелками); незначительно выраженная Хейл-реакция. Увел. 20×.

*COL1A1*, *COL2A1* и *HAPLN1*, определяющие структурно-функциональные особенности матрикса хряща, и гены сульфатирования протеогликанов (ПГ) *SLC26A2*, *CHST1* и *CHST3*, т. е. процесса, принципиально важного для формирования внеклеточного матрикса.

Исследование экспрессии генов, участвующих в процессе регуляции роста позвоночника выявило высокий уровень мРНК гена рецептора трансформирующего фактора роста (*TGFR1*) в сколиозных хондробластах по сравнению с контролем ( $P < 0.05$ ) (рис. 2). *TGFR1* — это ПГ мембраны, который функционирует как корецептор с *TGFβ*-рецептором. Внутриклеточные субстраты активированных рецепторов участвуют в транскрипционной регуляции генов, вовлеченных в формирование хряща и кости (Massague, Chen, 2000; Miyazono et al., 2001). Основная роль *TGFR* в хрящевой ткани заключается в отрицательной регуляции дифференцировки хондроцитов.

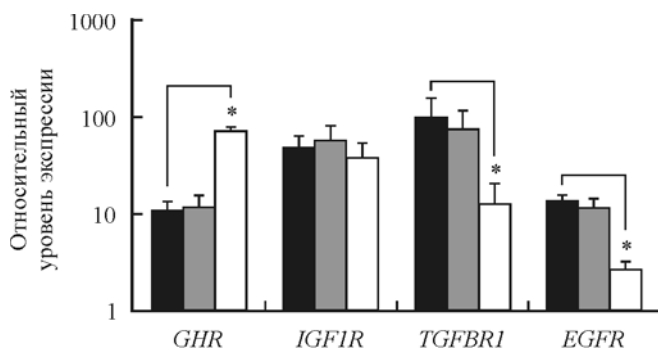


Рис. 2. Относительный уровень экспрессии генов, участвующих в процессе регуляции роста позвоночника, в хондробластах пластинок роста тел позвонков больных идиопатическим сколиозом и хондробластах позвоночника эмбриона.

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

Уровень мРНК гена *EGFR* в сколиозных образцах оказался выше контрольных значений (рис. 2). *EGFR* — это белок поверхности клетки, который связывает эпидермальный фактор роста. Ген рецептора эпидермального фактора роста осуществляет позитивную регуляцию пролиферации клеток. *EGFR*-сигнализация играет важную роль в ремоделировании внеклеточного матрикса хряща ПР в кость в процессе энхондрального остеогенеза. Уменьшение уровня экспрессии *EGFR* приводит к уменьшению ответа клеток на EGF, нарушает дифференцировку клеток ПР и в результате приводит к замедлению роста (Zhang et al., 2011).

Экспрессия гена рецептора гормона роста (*GHR*), функция которого заключается в позитивной регуляции дифференцировки клеток (Gevers et al., 2002), в сколиозных клетках была ниже по сравнению с контрольными хондробластами (рис. 2). Поскольку гормон роста является одним из ключевых гормонов, регулирующих метаболизм клеток хрящевой ткани, это может свидетельствовать о пониженной интенсивности метаболизма в клетках при ИС.

Таким образом, нарушение процессов дифференцировки хондробластов в ПР тел позвонков при сколиотической болезни 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 контрольных хондробластах по сравнению с хондробластами больных сколиозом, возможно, связан с периодом эмбрионального развития, когда процесс энхондрального остеогенеза еще не начался и активной пролиферации клеток ростовой пластинки не требуется. Уровень экспрессии гена рецептора инсулин-зависимого фактора роста (*IGF1R*) в клетках больных сколиозом и в контрольных образцах был одинаков



(рис. 2). *IGF1R* действует непосредственно на инсулиноподобный фактор роста 1, который продуцируется пролиферирующими и гипертрофическими хондроцитами и индуцирует их пролиферацию (Ohlsson et al., 1992). Поскольку для гена *IGFR* не было обнаружено достоверных различий уровня экспрессии в хондробластах больных сколиозом, можно предположить, что *IGFR* не вовлечен в нарушения пролиферации клеток ПР.

Анализ экспрессии генов, регулирующих процесс хондрогенной дифференцировки, показал, что уровень экспрессии генов *PAX1* и *INH* в клетках ПР больных сколиозом достоверно выше, а уровень экспрессии генов *SOX9* и *PAX9* ниже по сравнению с контрольными образцами (рис. 3). Транскрипционный фактор *SOX9* экспрессируется как в эмбриональном периоде (в хрящевых уплотнениях), так и на более поздних стадиях в хондроцитах ПР. *SOX* принимает участие в процессе хондрогенеза, индуцируя дифференцировку хондробластов и эндохондральный остеогенез (Ballock, O'Keefe, 2003; Topol et al., 2009). Одной из его регуляторных целей является *COL2A1* — ген, кодирующий основной коллаген в хряще (Lefebvre et al., 1998). Таким образом, нарушение дифференцировки хондроцитов в ПР при сколиозе может быть связано с низким уровнем экспрессии гена *SOX9*.

*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 et al., 1999). *PAX1* и *PAX9* необходимы для поддержания экспрессии *Varx1* и как результат — для индукции хондрогенеза в склеротоме. Важную роль при этом в хондрогенной дифференциации клеток склеротома играет уровень экспрессии этих генов (Rodrigo et al., 2003). Поскольку рассматриваемые гены действуют взаимозависимо, а в хондробластах 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.

Ген *INH* в норме экспрессируется в регипертрофических хондроцитах и играет ключевую роль в дифференциации хондроцитов ПР (Kobayashi et al., 2002). Посредством обратной связи он регулирует паратиреоидный гормонсвязанный 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 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 сколиотической болезни может быть обусловлено особенностями экспрессии генов-регуляторов хондрогенной дифференцировки — повышенным уровнем гена *INH*, низким уровнем гена *SOX9* и нарушением взаимодействия генов *PAX1* и *PAX9*.

В результате исследования экспрессии генов, определяющих структурно-функциональные особенности матрикса хряща, было обнаружено, что уровень мРНК генов, кодирующих синтез основных протеогликанов хрящевой

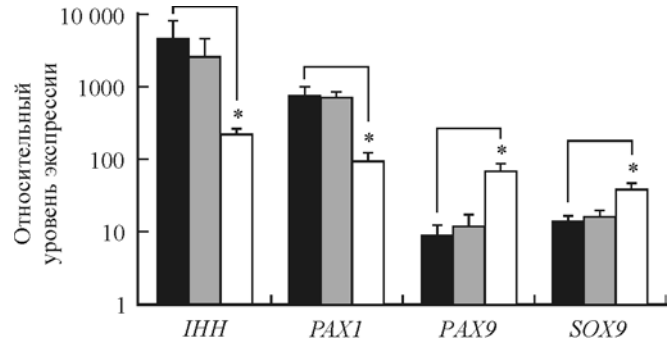


Рис. 3. Относительный уровень экспрессии генов, регулирующих процесс хондрогенной дифференцировки, в хондробластах пластинок роста тел позвонков больных идиопатическим сколиозом и хондробластах позвоночника эмбриона.

Обозначения те же, что и на рис. 2.

ткани (*ACAN*, *LUM* и *VCAN*), и генов коллагенов I и II типов (*COL1A1* и *COL2A1*) в сколиозных и контрольных образцах достоверно не различается (рис. 4). Ген *ACAN*, имеющий альтернативные транскрипционные варианты, кодирует агрекан — самый представительный хондроитинсульфатсвязанный ПГ, составляющий основную часть внеклеточного матрикса в хрящевой ткани. Агрекан участвует в связывании гиалуроновой кислоты и белков и вместе с коллагеном II типа формирует матрикс хряща (Ballock, O'Keefe, 2003). Версикан (кодируется геном *VCAN*) — большой хондроитинсульфатсвязанный ПГ — также представлен во внеклеточном матриксе, принимает участие в связывании гликозаминогликанов и гиалуроновой кислоты, вовлечен в адгезию, пролиферацию и миграцию клеток. Ген *LUM* кодирует главный кератансульфатсвязанный ПГ — люмикан, который относится к семейству лейцин-богатых протеогликанов. Люмикан является составной частью структурного внеклеточного матрикса и осуществляет связывание коллагена, организацию и регуляцию коллагеновых фибрилл. Формирующей фибриллы коллаген I типа характерен для малодифференцированной хрящевой ткани и преимущественно представлен в кости и сухожилиях. Коллаген I типа является составной частью структурного внеклеточного матрикса и участвует в эндохондральной оссификации. Ген *COL2A1* кодирует альфа-1 цепь коллагена II типа, специ-

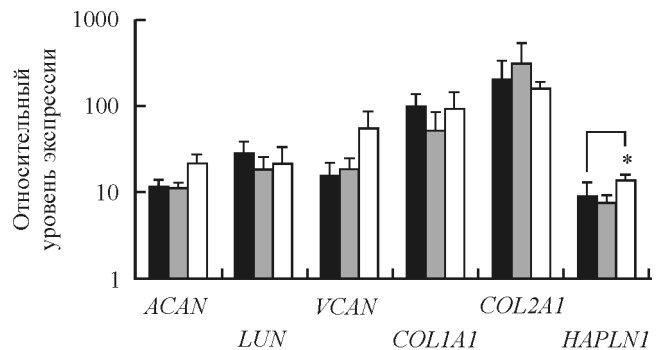


Рис. 4. Относительный уровень экспрессии генов, определяющих структурно-функциональные особенности матрикса хряща, в хондробластах пластинок роста тел позвонков больных идиопатическим сколиозом и хондробластах позвоночника эмбриона.

Обозначения те же, что и на рис. 2.

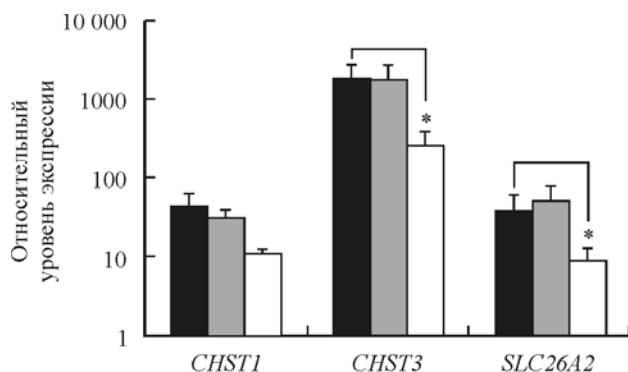


Рис. 5. Относительный уровень экспрессии генов сульфатирования протеогликанов в хондробластах пластинок роста тел позвонков больных идиопатическим сколиозом и хондробластах позвоночника эмбриона.

Обозначения те же, что и на рис. 2.

фичного для зрелой хрящевой ткани. Являясь важнейшей составной частью внеклеточного матрикса, коллаген II типа имеет существенное значение для нормального функционирования хрящевой ткани, обеспечивая ее прочность и эластичность (Thur et al., 2001; Ballock, O'Keefe, 2003). Поскольку различия в экспрессии генов коллагенов и генов, кодирующих ПГ матрикса хряща, в сколиозных и в контрольных образцах не обнаружено, можно предположить, что нарушений в функционировании рассматриваемых генов при сколиозе не происходит.

Уровень мРНК гена *HAPLN1* в сколиозных клетках оказался ниже по сравнению с контролем. Низкий уровень экспрессии гена *HAPLN1* может свидетельствовать о снижении полимерности ПГ в ПР при ИС (продукт гена *HAPLN1* связывает остатки гиалуроновой кислоты (Aspberg, 2012)), что согласуется с морфологическими данными (низкое полимерное состояние ПГ) (Зайдман и др., 2004).

Биохимические данные (Зайдман и др., 2004) о нарушении синтеза гликозаминогликанов в ПР тел позвонков на вогнутой стороне деформации у детей, больных сколиозом, явились основанием для исследования генов, кодирующих процесс сульфатирования ПГ: гена сульфотрансферазы 1 (*CHST1*), сульфотрансферазы 3 (*CHST3*) и гена трансмембранного транспорта сульфатов (*SLC26A2*). Показано, что недостаточное сульфатирование ПГ может происходить из-за инактивации генов, кодирующих переносчики сульфатов, в результате нарушаются структура матрикса и процесс роста (Karniski, 2001). Нарушения в процессе сульфатирования ПГ могут приводить к различным патологиям (Rossi, Superti-Furga, 2001). Анализ экспрессии генов, участвующих в сульфатировании ПГ, показал, что уровни мРНК генов *CHST3* и *SLC26A2* в образцах, полученных от больных сколиозом, выше, а уровень экспрессии гена *CHST1* не отличается от контроля (рис. 5). Переносчик сульфатов (*SLC26A2*) — это трансмембранный гликопротеин, вовлеченный в патогенез нескольких хондродисплазий. *SLC26A2* играет критическую роль в сульфатировании ПГ хряща и организации матрикса, обеспечивая транспорт сульфатов в хондроциты и адекватное сульфатирование. Отмеченное ранее нарушение сульфатирования ПГ (Зайдман и др., 2004) с вогнутой стороны деформации при ИС противоречит высокой экспрессии гена *SLC26A2*. Однако вполне вероятно, что нарушение сульфатирования происходит не на этапе

транспорта сульфата. *CHST3* кодирует фермент, который катализирует сульфатирование хондроитина ПГ, находящихся во внеклеточном матриксе и в большинстве дифференцирующихся клеток. Данные, полученные с помощью биохимических методов, об уменьшении количества хондроитинсульфатов на фоне увеличения кератансульфатов на вогнутой стороне деформации при сколиотической болезни (Зайдман и др., 2004) не согласуются с данными об уровне экспрессии генов *CHST1* и *CHST3*. Однако вполне возможно, что регуляция функции этих генов осуществляется на уровне транскрипции и (или) в этих клетках активированы и гены, осуществляющие альтернативные реакции.

Несмотря на различия между вогнутой и выпуклой сторонами деформации позвоночника, выявленные с помощью морфологических и биохимических методов (Зайдман и др., 2004), уровень экспрессии всех исследуемых генов достоверно не различался в клетках, локализованных на выпуклой и вогнутой сторонах деформации.

Полученные данные по экспрессии всех исследуемых генов были подвергнуты статистическому анализу. Проведенный факторный анализ показал принципиальное различие в профиле экспрессии генов при ИС относительно контрольной группы (рис. 6).

Нормальный морфогенез любой ткани определяется экспрессией соответствующих генов. Нарушение взаимодействия генов или сбои в цепи ген—конечный продукт приводит к образованию аномальных структур (Kornak, Mundlos, 2003). Строение хрящевой ткани, равно как и энхондральная оссификация, определяются согласованным функционированием клеток и матрикса, состоящего из коллагеновых волокон и ПГ, зависящих от экспрессии генов, регулирующих синтез, транспорт и присоединение составных частей молекул ПГ. Анализ экспрессии генов, определяющих структурно-функциональные особенности матрикса хряща, показал отсутствие различий в уровнях мРНК генов в контроле и при сколиозе. В клетках ПР тел позвонков, так же как в клетках позвоночника эмбриона, экспрессируются гены, кодирующие главные компоненты матрикса хряща (агрекан, версикан, люмикан и коллаген II типа). Полученные данные находятся в согласии с тем фактом, что ПР — это участок хрящевой ткани, представленный межклеточным веществом и хондробластами разной степени дифференцировки, причем доля малодифференцированных клеток достаточно высока, о чем свидетельствует высокий уровень коллагена I типа. Полученные данные подтверждают тот факт, что ПР представляет собой дериват эмбрионального хряща, все процессы дифференцировки клеток в ПР являются продолжением эмбрионального морфогенеза в постнатальном периоде, что делает допустимым использование клеток позвоночника эмбриона в качестве контроля (James et al., 2010).

Комплексный анализ экспрессии генов, регулирующих дифференцировку и функционирование хондробластов и компонентов внеклеточного матрикса ПР тел позвонков больных ИС III—IV степени, выявил гены, экспрессия которых не отличается от контроля. Следовательно, можно предположить, что выявленные нарушения при сколиотической болезни не связаны с функционированием генов *IGF1R*, *ACAN*, *LUM*, *VCAN*, *COL1A1*, *COL2A1* и *CHST1*. С другой стороны, определены гены с повышенным или пониженным уровнем экспрессии при сколиозе. Из морфологических данных (рис. 1, б) следует, что на вогнутой стороне деформации позвоночника

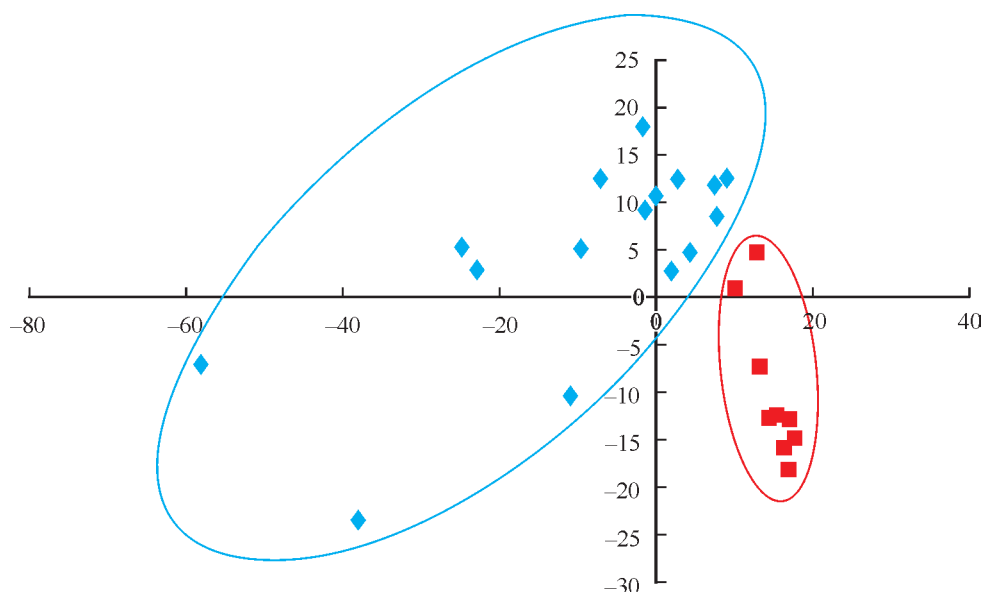


Рис. 6. Результаты факторного анализа: профили экспрессии генов, участвующих в процессе регуляции роста позвоночника (*TGFR1*, *EGFR*, *IGF1R* и *GHR*), регулирующих процесс хондрогенной дифференцировки (*SOX9*, *PAX1*, *PAX9* и *IHH*), определяющих структурно-функциональные особенности матрикса хряща (*ACAN*, *LUM*, *VCAN*, *COL1A1*, *COL2A1* и *HAPLN1*), и генов сульфатирования протеогликанов (*SLC26A2*, *CHST1* и *CHST3*) в хондробластах пластинок роста тел позвонков больных идиопатическим сколиозом III—IV степени (синий цвет) и хондробластах позвоночника эмбриона (красный цвет), имеют достоверные различия ( $P < 0.01$ ).

По вертикали и по горизонтали — факторные координаты переменных, основанных на корреляциях.

структурная организация клеток и матрикса ПР резко изменена, наблюдаются нарушение зональности, беспорядочное расположение редких малодифференцированных хондробластов, отсутствие пролиферативной активности и синтетических потенций, дистрофические изменения матрикса. Подобные изменения могут быть обусловлены снижением экспрессии генов *GHR*, *PAX9* и *SOX9*, играющих ключевые роли в дифференцировке хондробластов. Снижение степени сульфатирования ПГ (Зайдман и др., 2004), вероятно, обусловлено низким уровнем экспрессии гена *HAPLN1* при сколиозе. Высокий уровень экспрессии генов *TGFR1* и *EGFR* по сравнению с контролем и гипоэкспрессия *SOX9* и *GHR* свидетельствуют о нарушении нормального функционирования рецепторов ростовых и транскрипционных факторов в сколиозных клетках. Наблюдаемая разбалансировка может указывать на недостаток ростовых факторов или молекул посредников, а также может быть связана с формированием клеток смешанного фенотипа, не реагирующих на нормальные сигналы дифференцировки.

Среди всех исследуемых генов при сколиозе особое место занимают гиперэкспрессированные гены *CHST3*, *PAX1* и *IHH*. Вклад этих генов в развитие патологических изменений в ПР тел позвонков при ИС кажется наиболее значимым. Несбалансированная экспрессия генов *PAX*, вероятно, приводит к нарушению хондрогенной дифференцировки клеток, а *IHH* замедляет процесс гипертрофии хондроцитов, сохраняя клетки в негипертрофическом пролиферативном состоянии. Тем самым можно объяснить характерную морфологическую картину на вогнутой стороне деформации при ИС.

Другим ключевым моментом при сколиотической болезни является нарушение сульфатирования ПГ в ПР. Ввиду того что в последнее время подчеркивается важность гена *CHST3* в заболеваниях опорно-двигательного аппарата (Song et al., 2013), нельзя исключить влияние

этого гена на развитие сколиоза. Поскольку сульфатирование ПГ регулируется комплексом генов, а при сколиозе наблюдаются нарушения экспрессии генов *CHST3* и *SLC26A2* по сравнению с контролем, можно предположить, что происходит рассогласование функционирования главных генов сульфатирования, что приводит к синтезу сульфатсодержащих групп, не связанных с гиалуроновой кислотой, и в конечном итоге к низкому полимерному состоянию ПГ.

Таким образом, комплексный анализ экспрессии 17 генов не выявил нарушений в экспрессии генов, кодирующих синтез коллагенов и протеогликанов ПР тел позвонков при ИС. В то же время были обнаружены гены, экспрессия которых нарушена при сколиотической болезни. Сбои в функционировании генов дифференцировки хондроцитов (*PAX1*, *PAX9* и *IHH*), рецепторов транскрипционных и ростовых факторов роста (*SOX9*, *TGFR1* и *GHR*) и генов сульфатирования ПГ (*SLC26A2* и *CHST3*) приводят к появлению характерных морфологических и функциональных изменений в ПР тел позвонков на вогнутой стороне деформации при сколиозе. Выявленные нарушения морфогенеза и роста могут свидетельствовать о наличии клеток иного фенотипа, нехарактерных для исследуемой ткани и неспособных реагировать на нормальные сигналы дифференцировки в ПР. Подтверждением данного заключения служит факторный анализ, который демонстрирует, что клетки ПР и контрольные хондробласты формируют отдельные группы, т. е. принципиально различаются по экспрессии исследуемых генов.

Отсутствие различий в экспрессии генов на выпуклой и вогнутой сторонах деформации может быть связано с тем, что свой вклад в формирование структуры и прочности ткани вносят и другие гены, регулирующие как свойства внеклеточного матрикса, так и его своевременный и правильным образом организованный остеогенез.



Таким образом, в результате исследования выявлен профиль экспрессии генов, характерный для хондроцитов ПР тел позвонков при ИС III—IV степени: дисбаланс генов хондрогенной дифференцировки, рецепторов ростовых и транскрипционных факторов роста и генов, участвующих в сульфатировании ПГ. Полученные данные согласуются с морфологическими и биохимическими результатами и могут являться маркером патологии. Нарушение морфогенеза ПР на вогнутой стороне деформации у больных сколиотической болезнью обусловлено комплексным сбоем функционирования генов. Причины выявленных изменений являются предметом дальнейших исследований.

### Список литературы

- Валетдинова К. Р. 2016. Применение системы CRISPP/Cas9 для создания и исследования клеточных моделей наследственных заболеваний человека. *Гены и клетки*. XI (2) : 10—20. (Valetdinova K. R. 2016. Application of CRISPP/Cas9 system for developing and studying cellular models of inherited disease. *Genes & Cells*. XI (2) : 10—20.)
- Зайдман А. М., Корель А. В., Сахаров А. В., Рыкова В. И. 2004. Структурно-функциональные особенности пластинки роста тела позвонков человека при идиопатическом сколиозе. *Хирургия позвоночника*. 2 : 64—73. (Zaidman A. M., Korel A. V., Sakharov A. V., Rykova V. I. 2004. Structural and functional features of human vertebral body growth plate in idiopathic scoliosis. *Hirurgiâ pozvonočnika*. 2 : 64—73.)
- Aspberg A. 2012. The different roles of aggrecan interaction domains. *J. Histochem. Cytochem.* 60 : 987—996.
- Axenovich T. I., Zaidman A. M., Zorkoltseva I. V., Tregubova I. L., Borodin P. M. 1999. Segregation analysis of idiopathic scoliosis, demonstration of a major gene effect. *Amer. J. Med. Genet.* 86 : 389—394.
- Ballock R. T., O'Keefe R. J. 2003. Current concepts review: the biology of the growth plate. *J. Bone Joint Surg. Ser. A*. 85 : 715—726.
- Chan V., Fong G. C. Y., Luk K. D. K., Yip B., Lee M. K., Wong M. S., Lu D. D. S., Chan T. K. 2002. A genetic locus for adolescent idiopathic scoliosis linked to chromosome 19p13.3. *Amer. J. Hum. Genet.* 71 : 401—406.
- Fazal M. A., Edgar M. 2006. Detection of adolescent idiopathic scoliosis. *Acta Orthop. Belg.* 72 : 184—186.
- Gevers E. F., van der Eerden B. C., Karperien M., Raap A. K., Robinson I. C., Wit J. M. 2002. Localization and regulation of the growth hormone receptor and growth hormone-binding protein in the rat growth plate. *J. Bone Miner. Res.* 17 : 1408—1419.
- Gorman K. F., Julien C., Moreau A. 2012. The genetic epidemiology of idiopathic scoliosis. *Eur. Spine J.* 21 : 1905—1919.
- James C. G., Stanton L. A., Agoston H., Ulici V., Underhill T. M., Beier F. 2010. Genome wide analyses of gene expression during mouse endochondral ossification. *PLoS ONE*. 5 : e8693. Doi: 10.1371/journal.pone.0008693.
- Karniski L. P. 2001. Mutations in the diastrophic dysplasia sulfate transporter (*DTDST*) gene: correlation between sulfate transport activity and chondrodysplasia phenotype. *Hum. Mol. Genet.* 10 : 1485—1490.
- Kobayashi T., Chung U. I., Schipani E., Starbuck M., Karsenty G., Katagiri T., Goad D. L., Lanske B., Kronenberg H. M. 2002. PTHrP and Indian hedgehog control differentiation of growth plate chondrocytes at multiple steps. *Development*. 129 : 2977—2986.
- Kornak U., Mundlos S. 2003. Genetic disorders of the skeleton: a developmental approach. *Amer. J. Hum. Genet.* 73 : 447—474.
- Lefebvre V., Li P., de Crombrughe B. 1998. A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are co expressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J.* 17 : 5718—5733.
- Marosy B., Justice C. M., Vu C., Zorn A., Nzegwu N., Wilson A. F., Miller N. H. 2010. Identification of susceptibility loci for scoliosis in FIS families with triple curves. *Amer. J. Hum. Genet.* 152A : 846—855.
- Massague J., Chen Y. G. 2000. Controlling TGF-beta signaling. *Gen. Develop.* 14 : 627—644.
- Miller N. H., Marosy B., Justice C. M., Novak S. M., Tang E. Y., Boyce P., Pettengil J., Doheny K. F., Pugh E. W., Wilson A. F. 2006. Linkage analysis of genetic loci for kyphoscoliosis on chromosomes 5p13, 13q13.3, and 13q32. *Amer. J. Med. Genet. A*. 140 : 1059—1068.
- Miyazono K., Kusanagi K., Inoue H. 2001. Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. *J. Cell. Physiol.* 187 : 265—276.
- Ohlsson C., Nilsson A., Isaksson O., Lindahl A. 1992. Growth hormone induces multiplication of the slowly cycling germinal cells of the rat tibia growth plate. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 89 : 9826—9830.
- Peters H., Wilm B., Sakai N., Imai K., Maas R., Balling R. 1999. Pax1 and Pax9 synergistically regulate vertebral column development. *Development*. 126 : 5399—5408.
- Rodrigo I., Hill R. E., Balling R., Munsterberg A., Imai K. 2003. Pax1 and Pax9 activate Bapx1 to induce chondrogenic differentiation in the sclerotome. *Development*. 130 : 473—482.
- Rossi A., Superti-Furga A. 2001. Mutations in the diastrophic dysplasia sulfate transporter (*DTDST*) gene (*SLC26A2*): 22 novel mutations, mutation review, associated skeletal phenotypes, and diagnostic relevance. *Hum. Mutat.* 17 : 159—171.
- Sharma S., Gao X., Londono D., Devroy S. E., Mauldin K. N., Frankel J. T., Brandon J. M., Zhang D., Li Q. Z., Dobbs M. B., Gurnett C. A., Grant S. F., Hakonarson H., Dormans J. P., Herring J. A., Gordon D., Wise S. A. 2011. Genome-wide association studies of adolescent idiopathic scoliosis suggest candidate susceptibility genes. *Hum. Mol. Genet.* 20 : 1456—1466.
- Song Y. Q., Karasugi T., Cheung K. M. C., Chiba K., Ho D. W. H., Miyake A., Kao P. Y. P., Sze K. L., Yee A., Takahashi A., Kawaguchi Y., Mikami Y., Matsumoto M., Togawa D., Kanayama M., Shi D., Dai J., Jiang Q., Wu C., Tian W., Wang N., Leong J. C. Y., Luk K. D. K., Yip S., Cherny S. S., Wang J., Mundlos S., Kelempisoti A., Eskola P. J., Männikkö M., Mäkelä P., Karppinen J., Järvelin M. R., O'Reilly P. F., Kubo M., Kimura T., Kubo T., Toyama Y., Mizuta H., Cheah K. S. E., Tsunoda T., Sham P. C., Ikegawa S., Chan D. 2013. Lumbar disc degeneration is linked to a carbohydrate sulfotransferase 3 variant. *J. Clin. Invest.* 123 (1) : 4909—4917.
- Takahashi Y., Kou I., Takahashi A., Johnson T. A., Kono K., Kawakami N., Uno K., Ito M., Minami S., Yanagida H., Taneichio H., Tsuji T., Suzuki T., Sudo H., Kotani T., Watanabe K., Chiba K., Hosono N., Kamatani N., Tsunoda T., Toyama Y., Kubo M., Matsumoto M., Ikegawa S. 2011. A genome-wide association study identifies common variants near *LBX1* associated with adolescent idiopathic scoliosis. *Nat. Genet.* 43 : 1237—1240.
- Thur J., Rosenberg K., Nitsche D. P., Pihlajamaa T., Ala-Kokko L., Heinegård D., Paulsson M., Maurer P. 2001. Mutations in cartilage oligomeric matrix protein causing pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia affect binding of calcium and collagen I, II, and IX. *J. Biol. Chem.* 276 : 6083—6092.
- Topol L., Chen W., Song H., Day T. F., Yang Y. 2009. Sox9 inhibits Wnt signaling by promoting catenin phosphorylation in the nucleus. *J. Biol. Chem.* 284 : 3323—3333.
- Vortkamp A., Lee K., Lanske B., Segre G. V., Kronenberg H. M., Tabin C. J. 1996. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science*. 273 : 613—622.
- Zhang X., Siclari V. A., Lan S., Zhu J., Koyama E., Dupuis H. L., Enomoto-Iwamoto M., Beier F., Qin L. 2011. The critical role of the epidermal growth factor receptor in endochondral ossification. *J. Bone Miner. Res.* 26 (11) : 2622—2633.
- Zhou S., Qiu X. S., Zhu Z. Z., Wu W. F., Liu Z., Qiu Y. 2012. A single-nucleotide polymorphism rs708567 in the *IL-17RC* gene is associated with a susceptibility to and the curve severity of adolescent idiopathic scoliosis in a Chinese Han population: a case-control study. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 13 : 181.



## ANALYSIS OF GENE EXPRESSION IN CHONDROBLASTS OF VERTEBRAL BODY GROWTH PLATES IN PATIENTS WITH GRADE III—IV IDIOPATHIC SCOLIOSIS

*E. L. Strokova*,<sup>1</sup> *A. M. Zaidman*,<sup>1,\*</sup> *A. O. Stepanova*,<sup>2,3</sup> *P. P. Laktionov*<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopaedics named after Ya. L. Tsivyan, Novosibirsk, 630091,  
<sup>2</sup> E. N. Meshalkin National Medical Research Center, Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, 630055,  
and <sup>3</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, 630090;  
\* e-mail: AZaydman@niito.ru

Idiopathic scoliosis (IS) has been known since ancient times, but there is still no unified conception of the etiology and pathogenesis of this disease. The genetic theory of the scoliosis development is predominant. The search for etiological factors in most studies is carried out using the blood of patients with IS. The aim of the study was to analyze the expression of the genes regulating the differentiation and functioning of the chondroblasts of the growth plates (GP), the synthesis and formation of extracellular matrix components of the GP of vertebral bodies in the pathology localization area in patients with IS of Grade III—IV. As a result of the study, the following profile of gene expression peculiar for chondrocytes of vertebral body GP at Grade III—IV IS was revealed: the disbalance of chondrogenic differentiation genes (*PAX1*, *PAX9*, *IHH*), receptors of the growth and transcription growth factors (*SOX9*, *TGFR1*, *GHR*), and genes participating in the sulfation of proteoglycans (*SLC26A2*, *CHST3*). The data obtained are consistent with morphological and biochemical results and may be a marker of pathology.

Key words: idiopathic scoliosis, growth plate, gene expression, chondroblasts, proteoglycans