

Министерство здравоохранения Российской Федерации

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НОВОСИБИРСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
ТРАВМАТОЛОГИИ И ОРТОПЕДИИ ИМ. Я.Л.ЦИВЬЯНА»  
(ФГБУ «ННИИТО ИМ. Я.Л. ЦИВЬЯНА» МИНЗДРАВА РОССИИ)

УДК 61:57.086

№ госрегистрации 115071510020

Инв.№

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГБУ «ННИИТО  
им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России,  
д.м.н., проф.

  
М.А.Садовой

15.01 2018 г.



ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

по теме:

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК  
ХОНДРОГЕННОГО РЯДА И ПРОИЗВОДНЫХ НЕРВНОГО ГРЕБНЯ И ИХ РОЛЬ В  
ПАТОГЕНЕЗЕ ИДИОПАТИЧЕСКОГО СКОЛИОЗА. КОРРЕКЦИЯ ОРТОПЕДИЧЕСКОЙ  
ПАТОЛОГИИ МЕТОДОМ КЛЕТОЧНОЙ И ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ  
(В ЭКСПЕРИМЕНТЕ)

(заключительный)

Заместитель директора  
по научной работе, д.м.н.



И.А. Кирилова

Научный руководитель,  
Заслуженный деятель науки РФ,  
д.м.н., профессор



А.М. Зайдман

Новосибирск 2018

## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

*Научный руководитель и ответственный исполнитель НИР*

Главный научный сотрудник, руководитель группы патоморфологии и теоретических исследований в вертебрологии лабораторно-экспериментального отдела, заслуженный деятель науки РФ, профессор, д.м.н.

  
\_\_\_\_\_  
12.01.18

А.М. Зайдман

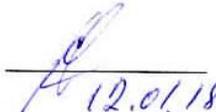
*Исполнители темы:*

Старший научный сотрудник группы патоморфологии и теоретических исследований в вертебрологии лабораторно-экспериментального отдела, к.б.н

  
\_\_\_\_\_  
12.01.18

А.В. Корель

Научный сотрудник группы патоморфологии и теоретических исследований в вертебрологии лабораторно-экспериментального отдела

  
\_\_\_\_\_  
12.01.18

Е.Л. Строкова

Научный сотрудник группы патоморфологии и теоретических исследований в вертебрологии лабораторно-экспериментального отдела

  
\_\_\_\_\_  
12.01.18

Е.И. Щелкунова

*При участии сотрудников кафедры стоматологии НГМУ (выполнение экспериментальных работ):*

Зав. кафедрой стоматологии НГМУ

  
\_\_\_\_\_  
14.01.18

Н.А. Иванова

## РЕФЕРАТ

Отчет 23 с., 8 рис., 5 источников, 1 прил.

ТРЕХМЕРНЫЙ ТРАНСПЛАНТАТ, ОСТЕОТРАНСПЛАНТАТ, ХРЯЩЕВАЯ ТКАНЬ, КОСТНАЯ ТКАНЬ, РЕГЕНЕРАЦИЯ, НЕРВНЫЙ ГРЕБЕНЬ, ТРАНСДИФФЕРЕНЦИРОВКА, ДЕФОРМАЦИЯ ПОЗВОНОЧНИКА, УЛЬТРАСТРУКТУРА, ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ, ИММУНОГИСТОХИМИЯ, ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКОВ, КЛЕТОЧНАЯ И ТКАНЕВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Объектом исследования являются экспериментальные животные (мини-свиньи, крысы); культура клеток; трансплантаты.

Цель работы: на основе исследования молекулярных механизмов нарушения процессов клеточной дифференцировки хондроцитов пластинок роста тел позвонков установить этиологию идиопатического сколиоза. На основе полученных данных обосновать методы ранней диагностики, прогноз прогрессирования деформации позвоночника и разработать методы коррекции путем клеточной и тканевой инженерии (в эксперименте).

Впервые исследована методом Real-time PCR экспрессия 17 генов кандидатов в хондробластах пластинок роста тел позвонков больных идиопатическим сколиозом. Впервые исследован гено-фенотип клеток пластинок роста тел позвонков больных идиопатическим сколиозом III-IV степени. Впервые в мире установлена роль клеток нервного гребня в этиологии и патогенезе деформации позвоночника при идиопатическом сколиозе.

Впервые был создан трехмерный остеотрансплантат на основе хондротрансплантата и исследованы регенераторные потенциалы этих конструкций в эксперименте.

Степень внедрения: разработан экспериментальный образец трехмерного остеотрансплантата и обоснована его эффективность.

Эффективность: регенерация костной ткани происходит ангиогенным первичным остеогенезом на основе остеотрансплантата; иммунотолерантность остеотрансплантата позволяет использовать его при ксенотрансплантации.

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение .....	5
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ .....	11
Заключение .....	20
Список использованных источников .....	21
Приложение А.....	22

## ВВЕДЕНИЕ

Идиопатический сколиоз по-прежнему остается малоизученной проблемой. Несмотря на обилие работ, касающихся генетики сколиоза разного уровня, до сих пор не удалось определить ген/гены при идиопатическом сколиозе [1]. Многолетние исследования идиопатического сколиоза и болезни Шейермана определили дальнейшую стратегию исследования этих патологий. На основе этих исследований в течение предыдущих лет (2015-2017 гг.) была предложена гипотеза о депонировании клеток нервного гребня в формирующихся телах позвонков – этиологического фактора идиопатического сколиоза. В результате нами впервые в мировой практике доказана на молекулярно-генетическом уровне зависимость развития идиопатического сколиоза от депонирования клеток нервного гребня в формирующемся позвоночнике.

В настоящее время широкое распространение получили методы клеточной терапии, основанные на применении остеогенных клеток, полученных из различных тканевых источников: костного мозга, жировой ткани, пульпы зуба, периферической крови и т.д. [2]. По мере накопления и анализа данных, касающихся клеточной инженерии, формируется новое направление: разработка различных конструкций по своим биологическим свойствам, приближающимся к нативной костной ткани [3].

Совершенно очевидно, что использование тканеинженерных конструкций должно быть четко аргументировано в зависимости от характера, типа и локализации повреждения [4]. В связи с этим, накопленный в настоящее время достаточно обширный материал нуждается в дальнейших экспериментальных и клинических подтверждениях эффективности конструкций и выработке четких показаний к их использованию. Одним из требований к пластическому материалу при ортопедической и любой другой патологии является тканеспецифичность, отсутствие токсичности, высокий регенераторный потенциал и формирование органоспецифической ткани в зоне трансплантации.

Подобным требованиям отвечает трехмерный остеотрансплантат, разработанный в ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России. Структурная композиция трехмерного остеотрансплантата представлена клетками, матриксом и сосудами, что обеспечивает быструю адаптацию в условиях трансплантации.

Преимуществом остеотрансплантата является отсутствие антигенной активности, что позволяет производить ксенотрансплантацию.

### **1 Цель**

На основе исследования молекулярных механизмов нарушения процессов клеточной дифференцировки хондроцитов пластинок роста тел позвонков установить этиологию идиопатического сколиоза. На основе полученных данных обосновать методы ранней диагностики, прогноз прогрессирования деформации позвоночника и разработать методы коррекции путем клеточной и тканевой инженерии (в эксперименте).

### **2 Задачи**

2.1 Методом ПЦР в реальном времени исследовать экспрессию генов-кандидатов в хондробластах больных идиопатическим сколиозом.

2.2 Исследовать гено-фенотип клеток ПР тел позвонков больных сколиозом методами флуоресцентной иммуногистохимии, сканирующей и трансмиссионной микроскопии.

2.3 На основе хондрогенных клеток получить хондро- и остеотрансплантаты.

2.4 Провести трансдифференцировку трехмерного хондротрансплантата в остеогенный трансплантат при культивировании путем добавления в питательную среду факторов роста.

2.5 На экспериментальных моделях искусственных дефектов травматического повреждения: костей черепа, нижней челюсти, спинного мозга осуществить трансплантацию соответствующих тканеинженерных конструкций.

2.6 Оценить эффективность регенераторных процессов при применении соответствующих тканеинженерных конструкций в эксперименте.

### **3 Научная новизна исследования**

Впервые в мире установлена этиология сколиотической болезни: депонирование клеток нервного гребня приводит к нарушению роста на вогнутой стороне деформации и формированию сколиотической болезни.

На основе культуры хондробластов произведена трансдифференцировка трехмерного хондротрансплантата в тканеспецифичный остеотрансплантат. В 2017 году комплексом современных методов: электронной микроскопией, иммуногистохимией, гистохимическими методами и ПЦР анализом тканеспецифичных генов была подтверждена органоспецифичность остеотрансплантата. Основными компонентами остеотрансплантата являются преостеобласты, синтезирующие костные белки: остеоонектин, коллаген I типа, фибронектин и CD 44. В цитоплазме преостеобластов определяется щелочная фосфотаза и окаймленные матричные везикулы. В матриксе встречаются кальцификаты, сосудистые полости, высланные эндотелиоцитами, экспрессирующими изолейцин В4 и фактор Виллебранда. Отсутствие белков хондрогенной дифференцировки в клетках остеотрансплантата свидетельствует об остеогенной природе полученной тканевой конструкции.

### **4 Материалы и методы**

#### **4.1 Экспрессия генов-кандидатов в хондробластах пластинок роста тел позвонков больных идиопатическим сколиозом**

Пластинки роста тел позвонков на высоте деформации, ниже и выше получены в клинике детской ортопедии Новосибирского НИИТО от 12 детей в возрасте 11-15 лет, больных идиопатическим сколиозом III-IV степени. Больные подвергались операции: anterior Releasing and interbody fusion. В качестве контроля были использованы хрящевые структурные компоненты позвоночника эмбриона человека 10-12 недель развития (10 образцов), полученные непосредственно после медицинского аборта от клинически здоровых женщин из лицензированных учреждений МЗ 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 (протокол заседания локального этического комитета ФГБУ «НИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России № 019/15 от 28 декабря 2015 г.).

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

Из клеток, полученных после центрифугирования, выделяли суммарную клеточную РНК тризольным методом (TRI reagent (Sigma)) в соответствии с рекомендациями производителя. Осажденную РНК растворяли в 30-50 мкл RNase-free воды. Для удаления возможной примеси геномной ДНК из препарата суммарной клеточной РНК выделенную РНК обрабатывали RNase-free DNase (Fermentas) 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 (Promega, США) в присутствии Oligo (dT)<sub>15</sub> праймера (БИОССЕТ, Россия). Все процедуры проводили в соответствии с рекомендациями производителя. 2 мкг суммарной РНК каждого образца было

использовано для реакции обратной транскрипции в финальном объеме 25 мкл. Для измерения концентрации искомым мРНК полученный раствор кДНК разводили в 10 или 100 раз в зависимости от используемой аналитической системы. Все реакции Real-Time PCR были выполнены на термоциклере iCycler IQ 5 (Bio-Rad) в присутствии интеркалирующего флуоресцентного красителя SYBR Green I. Объем реакционной смеси составлял 50 мкл, содержащей 5 мкл кДНК, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 65 mM Tris-HCl, pH 8.8, 16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,05% Tween-20, 0,25 mM каждого dNTP, по 2 мкл forward и reverse праймера (0,6 μM) и 1 ед. акт. *Taq* полимеразы (Fermentas). ПЦР в режиме реального времени проводили при следующих условиях: 95 °C – 3 мин. 30 сек., затем 40 циклов: 95 °C – 20 сек., 58-68 °C – 15 сек., 72 °C – 30 сек., 82-89,5 °C – 10 сек., далее 95 °C – 1 мин., 65 °C – 30 сек., увеличение температуры с 65 до 95 °C – 10 сек. – 61 цикл. Все реакции проводились в тройных независимых повторах, полученные средние значения данных использовались для определения кратности изменения (различий) экспрессии генов. Результаты были оценены с использованием компьютерной программы iCycler IQ 5. Специфичность проводимой реакции определялась с помощью анализа кривой плавления продуктов амплификации в диапазоне от 65 °C до 95 °C с шагом в 1 градус. Для контроля перекрестного загрязнения ПЦР в выделение РНК была включена RNase-free water, которая затем использовалась как отрицательный контроль. Для определения уровня экспрессии каждого из исследуемых генов применялись оптимизированные для метода Real-Time PCR пары праймеров. ПЦР продукты анализировали электрофорезом в полиакриламидном геле в 1x буфере TBE. 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, очищения ПЦР-продуктов на микроколонках и спектрофотометрического измерения их концентрации. Для построения калибровочных графиков из полученных стандартов приготавливали серийные разведения и проводили реакцию Real-Time SYBR Green I PCR. Для проверки работоспособности Real-Time SYBR Green I PCR на каждый ген калибровку повторяли дважды и, если полученные калибровочные графики не отличались по углу наклона, а значения C<sub>t</sub> стандартов отличались не более чем на 0,15-0,58 цикла, количественную ПЦР в этих условиях использовали для определения концентрации искомого гена в анализируемых образцах.

#### **4.2 Исследование гено-фенотипа клеток пластинок роста тел позвонков больных сколиозом**

Идентификация фенотипов клеток пластинок роста тел позвонков больных идиопатическим сколиозом производилась методом культивирования клеток пластинок роста тел позвонков дифференцированно из выпуклой и вогнутой сторон деформации. Основанием для подобного подхода были данные Кнорре «Клетки в процессе культивирования проходят ранние стадии дифференцировки».

Объектом исследования были избраны пластинки роста тел позвонков от 50 детей 11-15 лет с идиопатическим сколиозом III-IV степени, оперированных в клинике детской ортопедии Новосибирского НИИТО.

Образцы материала забирали в стерильные пробирки, содержащие 0,9% физиологический раствор (ОАО Красфарма) и антибиотик гентамицин в концентрации 20 мкг/мл (Микроген)

Гиалиновый хрящ пластинок роста отмывали в физиологическом растворе, измельчали в чашке Петри с минимальным объемом среды RPMI (Биолот) до размеров 1-2 мм<sup>2</sup>, затем помещали в раствор 1,5% коллагеназы (Gibco) в силиконизированной посуде (TRP) и инкубировали в CO<sub>2</sub> инкубаторе при температуре 37°C в течение 22-24 часов. Полученную суспензию клеток пропускали через нейлоновый фильтр (Nylon) для удаления кусочков ткани и осаждали клетки центрифугированием в течение 10 минут при 2000 об./мин. Осажденные клетки идентифицировали и определяли их общее количество в камере Горяева.

Выделенные клетки культивировали в среде DMEM F12 (Invitrogene) с добавлением 15% FBS (эмбриональной телячьей сыворотки) (Gibco) и антибиотиками стрептомицин – пенициллин (250х) (Биолот) и амфотерицин В (Биолот) в условиях CO<sub>2</sub> инкубатора при 37° С. В качестве культуральной посуды использовали пластиковые чашки Петри (d 60) (TRP). На дно культуральной посуды укладывали покровные стекла для последующих морфологических исследований клеток в процессе культивирования. Выделение, посев и культивирование клеток осуществляли дифференцированно в соответствии с указанной высотой и стороной деформации.

Клетки культивировали в течение 14 суток. Смена среды производилась 1 раз в 3-е суток. Клетки не пассировали. Для морфологических исследований клетки извлекали в период от 5 до 21 суток; фиксировали в 70° спирте и окрашивали: гематоксилин – эозин, альциановым синим, по Кохалу и Нисслю.

Для исследований клеток методом электронной микроскопии на 14 сутки культивирования производили пассирование культуры хондроцитов смесью растворов Трипсина (Биолот) и Версена (Биолот) в соотношении 1:1. Действие веществ инактивировали средой DMEM F12 (Invitrogene) с добавлением 15% FBS (эмбриональной телячьей сыворотки) (Gibco) и антибиотиками стрептомицин – пенициллин (250х) (Биолот) и амфотерицин В (Биолот). Клеточную суспензию центрифугировали 10 минут со скоростью 1 200 об./мин. Ресуспензировали в 1 мл среды. В 12-ти-луночной планшете размещали подложки и на силиконизированные стерилизованные чипсы (Agar, Germany) для электронной микроскопии (по одной в лунку). Клетки сеяли в концентрации 10 мкл – на подложки и 5 мкл – на чипсы. Адгезию клеток контролировали в течение 2-х часов. В лунки с чипсами и пленками добавляли по 2 мл среды, оставляли на сутки.

Образцы на чипсах для сканирующей электронной микроскопии фиксировали 2,5% глутаровым альдегидом, разведенным на среде для культивирования в течение 15 минут, после чего переносили в раствор 2,5% глутарового альдегида на 0,1М какодилатном буфере и фиксировали в течение часа. После отмывки в 2-х сменах 0,1М какодилатного буфера образцы фиксировали в 1% тетраоксида осмия, приготовленном на дистиллированной воде, отмывали в 2-х сменах воды, помещали в специальный держатель и дегидратировали, инкубируя по 10 мин. в растворах спиртов возрастающей концентрации (30%, 50%, 70%, 100%). Затем образцы высушивали по методу критической точки в приборе (CriticalPointDryer, BAL-TEC, Liechtenstein) и исследовали в сканирующем электронном микроскопе (Zeiss, Germany) до и после напыления хромом толщиной 1нм в атмосфере аргона (CoatingUnit, LeicaMicrosystems.Austria). Анализ проводили при увеличении x 1000-30000 и ускоряющем напряжении 30kV.

Фиксацию клеток на специальных пластиковых подложках проводили в 2,5 % растворе глутарового альдегида на 0,1 М Na-какодилатном буфере (pH 7,4) в течение 1 ч., после чего материал отмывали в трёх сменах 0,1 М Na-какодилатного буфера (pH 7,4). Образцы постфиксировали в 1 %-ном растворе тетраоксида осмия с добавлением 0,8 % ферроцианата калия на том же буфере в течение 1 ч. После трёхкратного отмывания дистиллированной водой клетки оставляли на ночь в 1 % водном растворе уранилацетата при температуре 4°С в холодильнике. На следующий день образцы отмывали водой и обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации (по 5 мин. в 30 % и 50 %, по 10 мин. в 70 %, 96 % и 100 % растворах этанола соответственно). Затем клетки дополнительно обезвоживали в ацетоне (2 раза по 20 мин) и пропитывали смесью смолы, включающей 4 компонента (Epon 812, DDSA, MNA и DMP-30) по следующей схеме: 1 объём смолы: 2 объёма ацетона – 1 ч; 1 объём смолы: 1 объём ацетона – 2 ч; 2 объёма смолы: 1 объём ацетона – 2 ч; чистая смола – 2 ч; чистая смола – 1 ч. Далее проводилась заливка образцов в формы из фольги и инкубация в течение ночи в эксикаторе с CaCl<sub>2</sub> (для удаления пузырьков воздуха из смолы). Для полимеризации образцы помещались в термостат на +60°С на 3 сут.

Процедуру иммуногистохимического исследования выполняли в соответствии с рекомендациями производителей антител. Перед проведением иммуногистохимического исследования приготовленные срезы депарафинизировали и производили демаскировку антигенов тканей в PT Link модуле (Dako, Дания) в цитратном буфере (pH 9,0) при темпе-

ратуре 95°C в течение 60 минут. Затем блокировали эндогенную пероксидазу 3% раствором H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, проводили протеиновый блок сывороткой.

Далее при температуре 22°C в течение 30 минут инкубировали срезы ткани и клетки с антителами; GFAP (клон N1506, rabbit polyclonal, «ДАКО»); S100 (rabbit polyclonal, «ДАКО»); Synaptophysin (клон DAK-SYNAP, mouse monoclonal, «ДАКО»); Neurofilament Protein (NF, клон 2F11, mouse monoclonal, «ДАКО»). Все антитела разводили согласно указаниям фирмы-производителя. Для визуализации иммуноморфологической реакции использовали полимерную систему детекции EnVision FLEX Systems (Dako, Дания). Последним этапом докрашивали ядра клеток гематоксилином.

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

### **4.3 Регенерация костной ткани в эксперименте трехмерным остеотрансплантатом**

Исследование по регенерации костной ткани в эксперименте трехмерным остеотрансплантатом выполнено на новорожденных мини-поросятах весом до 2,5 кг и крысах SPF-вивария линии Wistar. Все эксперименты выполнены с соблюдением положений Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации и Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (утв. Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 19.03.2003 г. № 266). Разрешение на проведение работ было одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л.Цивьяна» Минздрава России (протокол заседания № 019/15 от 28 декабря 2015 года).

Материалом для культивирования служили хондробласты позвоночника новорожденного мини-поросенка. Гиалиновый хрящ отмывали в растворе Хенкса с канамицином 1 г/л в течение 15 минут, измельчали в чашке Петри, затем подвергали ферментной обработке 1,5% раствором коллагеназы при температуре 37°C в течение 5-8 часов. Суспензию центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин. Далее клетки ресуспендировали в ростовой питательной среде. Полученную популяцию клеток культивировали в культуральных флаконах в концентрации  $3 \times 10^5$ /мл в среде ДМЕМ/F12 1:1 (Gibco) с добавлением 20% фетальной сыворотки крови плодов коровы при 37°C. После достижения концентрации клеток в 60 млн. производили пассирование клеток с помощью смеси растворов 0,25% трипсина и 0,02% ЭДТА, далее клетки центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 минут. Полученный клеточный агрегат перемещали в 6-луночный планшет с питательной средой RPMI – 1640 с добавлением 10% FBS, культивировали в течение 4-6 недель. Смену среды осуществляли 2 раза в неделю до получения хондротрансплантата [5].

В процессе культивирования клеток стекла с первичной клеточной культурой помещали для фиксации в этанол для проведения морфологических исследований. Клетки монослоя на стекле и в осадке при снятии клеток с монослоя окрашивали гематоксилин-эозином, ализановым синим, толуидиновым синим при разных значениях pH красителя.

Направленную дифференцировку полученного хондротрансплантата в остеогенном направлении осуществили путем культивирования его в питательной среде, содержащей индукторы остеогенной дифференцировки клеток, до получения трехмерного остеотрансплантата.

В качестве питательной среды для остеогенной дифференцировки использовали питательную среду ДМЕМ F12, содержащую 15% FBS, стрептомицин-пенициллин, амфотерицин В и индукторы остеогенной дифференцировки клеток: 10 миллимоль/л  $\beta$ -глицерофосфа, 100 наномоль/л дексаметазона и 0,2 миллимоль/л аскорбиновой кислоты. Трехмерные трансплантаты с остеогенным потенциалом дифференцировки культивирова-

ли в течение от 3 до 6 недель. Смену питательной среды производили каждые 3-е суток. Состав и количество добавляемых веществ в культуральную среду не менялись.

Хондрогенную и остеогенную дифференцировку клеток остеотрансплантата подтверждали методами традиционной морфологии. Гистохимические реакции альциановый, толуидиновый синий при разных значениях pH, Шик-реакция. Ко всем реакциям ставились соответствующие контроли.

Для исследований методом иммуногистохимии, хондротрансплантаты и клетки на предметных стеклах окрашивали антителами к Collagen I (ab34710, Abcam; разведение 1:200), Collagen II (ab3092, Abcam; 1:100), Aggrecan (ab3778-1, Abcam; 1:100), Fibronectin (ab6328, Abcam; 1:200), фактору фон Виллебранда (ab6994, Abcam; 1:100) и остеоонектину (NCL-O-NESTIN, Leica Biosystems; 1:50). Детекцию данных антител осуществляли с помощью флуоресцентно меченных конъюгатов Alexa Fluor®568 и Alexa Fluor® 488 с антителами к иммуноглобулинам кролика или мыши. Кроме того, для выявления эндотелиальных клеток использовали флуоресцентно меченый Alexa Fluor® 594 изолектин B4, (I21413, Thermo Fisher Scientific, 1:75). Препараты анализировали на флуоресцентном микроскопе Nikon Ti-E.

Для ультраструктурного анализа клеток и матрикса, хондротрансплантат фиксировали в 4% растворе параформа с дофиксацией раствором OsO<sub>4</sub>, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, заключали в эпон-аралдин. На ультратоме «Riacht» готовили ультратонкие срезы, контрастировали уранилацетатом и изучали под электронным микроскопом «Hitachi-600».

РНК из клеток и трансплантатов выделяли с помощью TRIzol Reagent (Ambion). Синтез к ДНК проводили обратной транскриптазой MMLV (Promega). Относительный уровень экспрессии генов определяли с помощью полуколичественной ПЦР в режиме реального времени, используя реакционную смесь с интеркалирующим красителем SYBR Green I (№ M-427, «Синтол») на приборе Lyght Cycler 480 II (Roche). Уровень экспрессии целевых генов относительно гена домашнего хозяйства Gapdh рассчитывался методом  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , затем полученные значения нормировали на значение уровня экспрессии гена Col2 в хондробластах.

Экспериментальная проверка регенераторных потенциалов остеотрансплантата выполнена на 10 самцах крыс линии Wistar, возрастом 1 месяц. Под общим наркозом скальпелем произвели разрез 5 мм в проекции угла нижней челюсти. Распатором отслоили жевательную мышцу – обнажили кость. При помощи твердосплавного шаровидного бора с вестибулярной поверхности ветви нижней челюсти на расстоянии 3 мм выше угла нижней челюсти сформировали трепанационное отверстие диаметром 1 мм. Животным I группы дефект заполняли трехмерным остеотрансплантатом диаметром 1,2 мм. За счет трехмерной структуры и упруго эластических свойств остеотрансплантат плотно прилегал к стенкам искусственного дефекта. Замещенный трехмерный остеотрансплантатом дефект закрывали фасцией и жевательной мышцей. 10 животным контрольной группы формировали трепанационное отверстие диаметром 1 мм и закрывали фасцией и жевательной мышцей, не заполняя дефект. Рану ушили материалом «Vicryl».

Животных выводили из эксперимента через 2 недели, 1, 3, 6 месяцев. Визуально оценивали наличие остаточного дефекта и выраженность гипертрофии мягких и костных тканей в области трансплантации. Зону трансплантации исследовали рентгенологически. Препараты нижней челюсти фиксировали в 10% нейтральном формалине, декальцинировали в трилоне «Б», после проводки заливали в парафин и окрашивали гематоксилинэозином и по Ван Гизону. Оценку процесса репаративного остеогенеза проводили под микроскопом «Carl Zeiss».

## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

На предыдущих этапах исследования (2015-2016 гг.) была предложена гипотеза о депонировании клеток нервного гребня в формирующихся телах позвонков – этиологического фактора идиопатического сколиоза (2016 г.). В 2017 году эта гипотеза была подтверждена.

Идентификация фено-генотипов клеток ПР выпуклой и вогнутой сторон деформации больных ИС показала, что на выпуклой стороне деформации локализуются клетки мезенхимального генеза – хондробласты. На вогнутой стороне деформации – клетки нейрального генеза: нейро- и глиобласты, производные нейроэктодермы. Об этом свидетельствуют нейроморфологические данные – ультраструктурная организация клеток, экспрессия тканеспецифических белков и протеогликанов. Наличие нейральных клеток в ПР больных ИС выявлено нами впервые. В доступной мировой литературе подобных данных не обнаружено. Эти данные свидетельствуют о достоверности предложенной гипотезы. В продолжение этих исследований планируется выполнить исследования по созданию экспериментальной модели ИС на курином эмбрионе путем депонирования клеток нервного гребня в склеротоме.

Вторым направлением исследования было создание трехмерного остеотрансплантата на основе хондротрансплантата и исследование регенераторных потенциалов созданных конструкций в эксперименте. Способ получения трехмерного остеотрансплантата путем направленной дифференцировки хондротрансплантата обеспечивает дифференцировку клеток хондрогенного ряда в остеогенном направлении, изменение их фенотипа, и синтетической активности. Причем, дифференцировка пластического материала в данном случае является эволюционно закрепленным механизмом формирования кости (мезенхима-хрящ-кость) как при регенерации, так и в эмбриогенезе.

Основными структурными компонентами трехмерного остеотрансплантата являются остеогенные клетки и предкостный матрикс, содержащий гидроксиапатит и коллаген I типа. Отличительной особенностью является наличие сосудов и капилляров, высланных эндотелеоцитами.

Благодаря данным особенностям трехмерный остеотрансплантат (рисунок 1) обладает потенциальными возможностями к формированию дефинитивной костной ткани.

Получен патент на изобретение: RU № 2580754 «Способ восстановления дефекта костной ткани» (2016).

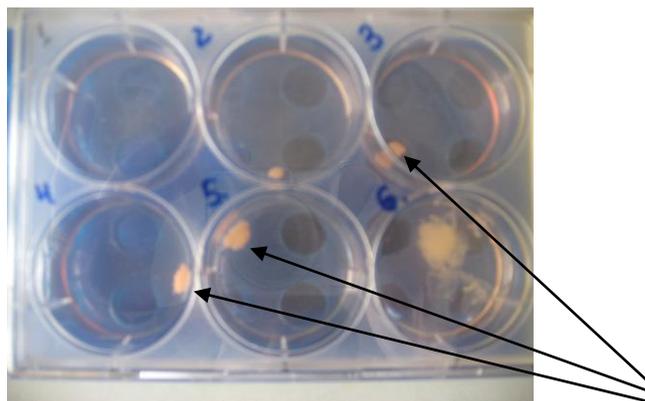


Рисунок 1 - Трехмерный остеотрансплантат в культуральной среде (внешний вид экспериментальных образцов).

Идентификация остеогенной принадлежности, полученной тканеспецифичной конструкции, исследована методами иммуногистохимии (экспрессия специфических белков), морфологическими, методом ПЦР-анализа и ультраструктурного анализа. Процесс трансдифференцировки хондротрансплантата в остеотрансплантат исследован экспрессией соответствующих тканеспецифических генов методами Real Time.

Эксперимент по регенерации дефекта костной ткани тела позвонка остеотрансплантатом осуществляли на мини-свиньях (возраст 6 месяцев). Под общим наркозом выполняли передний забрюшинный доступ к телам поясничных позвонков. При помощи бо-

ра формировали костный дефект в вентральном отделе тела позвонка размерами в глубину и ширину, соответствующий размерам трансплантата (около 5 мм.). В сформированный дефект укладывали с плотным прилеганием к материнскому ложу трехмерный остеотрансплантат. В качестве контроля использовали незаполненный, сформированный при помощи бора стандартный костный дефект в теле позвонка Животных выводили из эксперимента через 1, 3 месяца. Фиксацию, проводку материалов и изготовление морфологических препаратов проводили по традиционной методике. Препараты окрашивали гематоксилин – эозином, по Ван-Гизону.

Эксперимент по регенерации дефекта нижней челюсти выполняли на 10 самцах крыс линии Wistar, возрастом 1 месяц. Под общим наркозом, скальпелем производили разрез 5 мм в проекции угла нижней челюсти. Распатором отслаивали жевательную мышцу – обнажалась кость. При помощи твердосплавного шаровидного бора с вестибулярной поверхности ветви нижней челюсти на расстоянии 3 мм выше угла нижней челюсти формировали трепанационное отверстие диаметром 1 мм. Животным I группы дефект заполняли трехмерным остеотрансплантатом диаметром 1,2 мм. За счет своей трехмерной структуры и упруго эластических свойств остеотрансплантат плотно прилегал к стенкам искусственного дефекта. Замещенный трехмерный остеотрансплантат дефект закрывали фасцией и жевательной мышцей, 10 животным контрольной группы формировали трепанационное отверстие диаметром 1 мм и закрывали фасцией и жевательной мышцей, не заполняя дефект. Рану ушивали материалом «Vicryl».

Животных выводили из эксперимента через 1, 3, 6 месяцев. Визуально оценивали наличие остаточного дефекта и выраженность гипертрофии мягких и костных тканей в области трансплантации. Выделенные препараты фиксировали, декальцинировали, изготавливали парафиновые блоки, окрашивали методом гематоксилин-эозином и по Ван Гизону.

## **1 Полученные результаты**

### **1.1 Анализ экспрессии генов-кандидатов в хондробластах пластинок роста тел позвонков больных идиопатическим сколиозом**

Асимметричное изменение функции хондробластов в органе роста позвоночника – основного патогенетического признака ИС – предположительно могло быть обусловлено нарушением генетической регуляции функционирования клеток. Логично предположить, что асимметрия роста связана с нарушением экспрессии гена/генов, регулирующих процессы, связанные с функционированием хондробластов на вогнутой стороне деформации. С этой целью методом Real-time предпринято исследование экспрессии основных генов, сопряженных с ростом (IHH, Pax1, Pax 9, Sox 9), участвующих в процессе регуляции роста позвоночника (TGFR, EGFR, IGFR, GHR), синтезом матрикса и метаболизмом (ACAN, LUM, VCAN, COL1, COL2, HALPN1), генов сульфатирования и трансмембранного транспорта (DTDST, CHST1, CHST3). Тем более что, огромное количество генетических исследований крови больных, проводимых на самом высоком методическом уровне, не выявили связи с этиологией ИС. Анализ экспрессии 17 генов в ПР показал, что синтез коровых белков протеогликанов (ПГ) сохранен, но нарушен синтез линк-белка. Функция ростовых транскрипционных факторов, не реагирующих на сигналы пролиферации и дифференцировки, были также нарушены (рисунок 2). Факторный анализ выявил выраженные отличия фенотипа хондробластов ПР больных ИС от нормы. Возникла необходимость в идентификации фено-генотипа этих клеток.

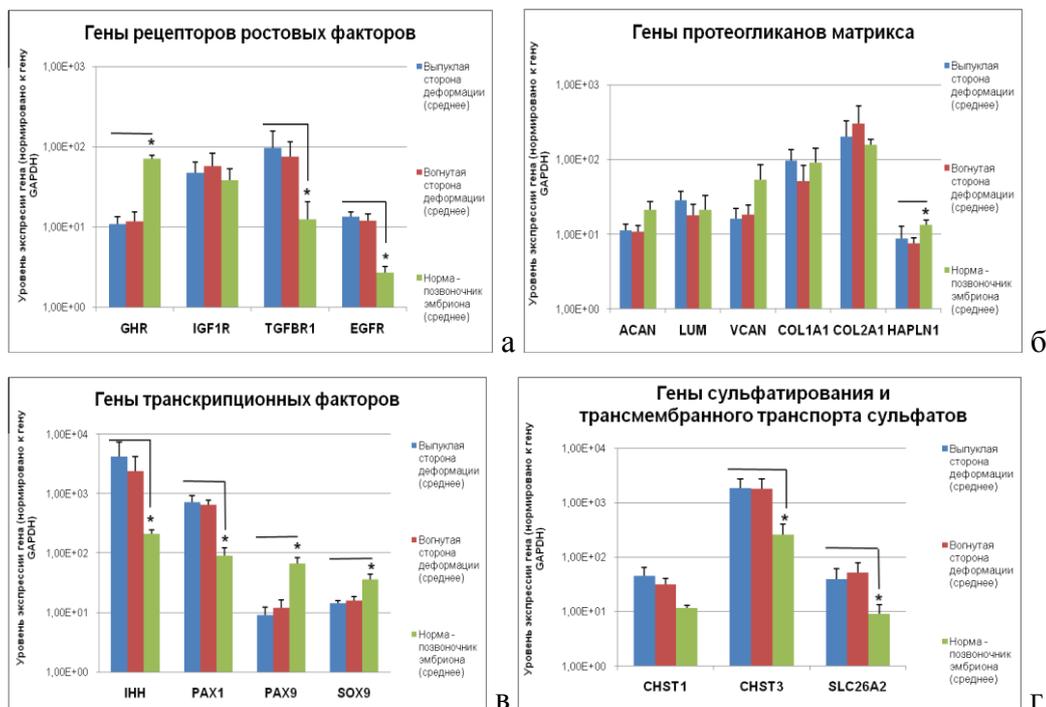


Рисунок 2 - Уровень экспрессии генов-кандидатов в хондробластах пластинок роста тел позвонков больных идиопатическим сколиозом: а) гены рецепторов ростовых факторов; б) гены протеогликанов матрикса; в) гены транскрипционных факторов; г) гены сульфатирования и трансмембранного транспорта сульфатов.

## 1.2 Исследование гено-фенотипа клеток пластинок роста тел позвонков больных сколиозом

Клетки были выделены из пластинок роста (ПР) тел позвонков с выпуклой и вогнутой сторон деформации от 50-ти оперированных больных с ИС (проведение исследований было одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России, протокол заседания № 019/15 от 28 декабря 2015 г.), подвергнуты культивированию. Культивированные клетки были идентифицированы методами морфологии, нейроморфологии, иммуногистохимии, ПЦР анализом и ультраструктурным анализом. Установлено: клетки выпуклой стороны деформации идентифицированы как хондробласты. Клетки, выделенные из пластинок роста вогнутой стороны деформации, охарактеризованы как нейро- и глиобласты (рисунок 3 а,б). Показано, что культивированные клетки с вогнутой стороны деформации экспрессируют нейральные белки: тубулин (рисунок 3 в), белки глиальной природы, окрашивающиеся по Нисслю и Кохалу (рисунок 4 а,б). Особенно доказательными явились данные сканирующей микроскопии: наличие нейрофиламентов в цитоплазме клеток, соответствующая морфология, аксонные холмики и сформированные синапсы (рисунок 4 в).

Анализ дифференцированного культивирования клеток ПР тела позвонков 50-ти больных ИС позволил выявить причины нарушения роста и формирования деформации позвоночника при ИС и предложить гипотезу, объясняющую варианты клинических проявлений ИС, дать определение сколиотической болезни.

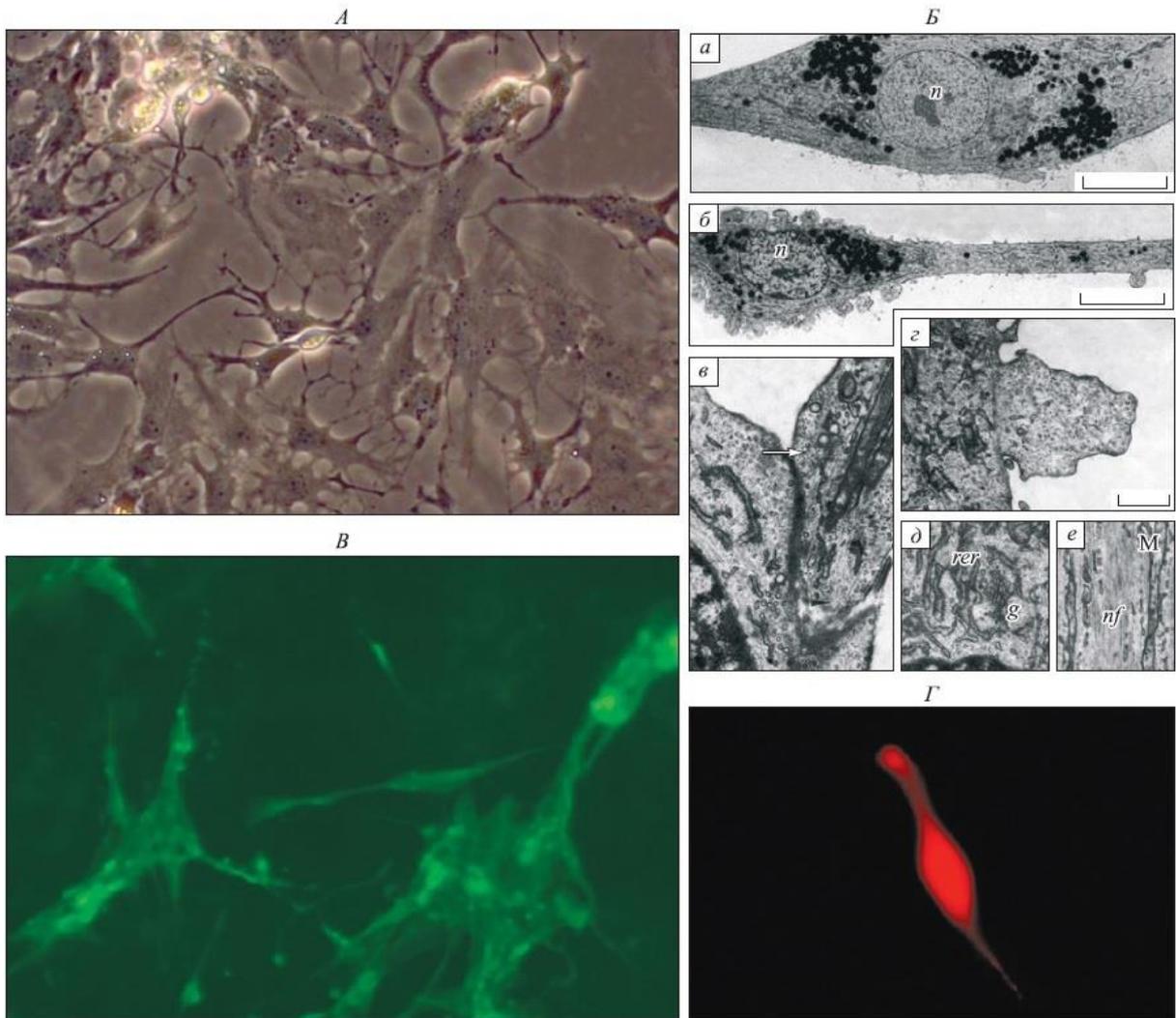


Рисунок 3 - Микрофотографии культивированных клеток ПР тел позвонков: А – клетки нейрального генеза в культуре клеток вогнутой стороны (нативный препарат, ув.  $10 \times 40$ ). Б – микрофотография культивированных клеток, выделенных из ПР тел позвонка (вогнутая сторона вершины деформации) больного ИС: а, б – нейроноподобные клетки вытянутой формы и длинным отростком (аксоном), многочисленные электронноплотные гранулы вокруг ядер (n) и в цитоплазме клеток, формирующиеся на аксонах шипики; в – формирующийся контакт между отростком одной клетки и телом другой, многочисленные везикулы в месте контакта (стрелка); г – шипики, формирующиеся на теле и отростках клеток; д – фрагмент цитоплазмы одной из клеток культуры с развитым шероховатым ретикулумом (rer) и комплексом Гольджи (g); е – фрагмент аксона с обширной сетью нейрофиламентов (nf), пронизывающих отростки клеток, а также вытянутые митохондрии (M). Масштаб: а, б – 10 мкм, в–е – 1 мкм. Иммуногистохимические реакции на нейральные антитела в культивированных клетках вогнутой стороны деформации позвоночника (ИС): В – NF 200 (зеленый), Г –  $\beta$ -тубулин III (красный)

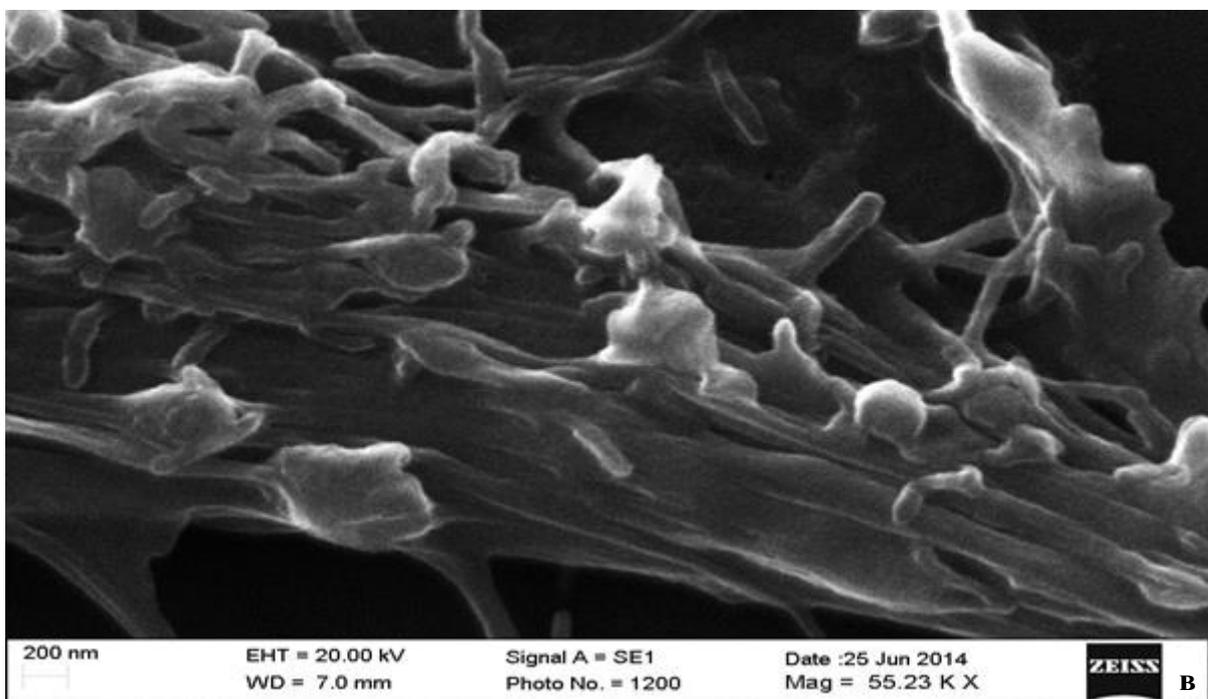
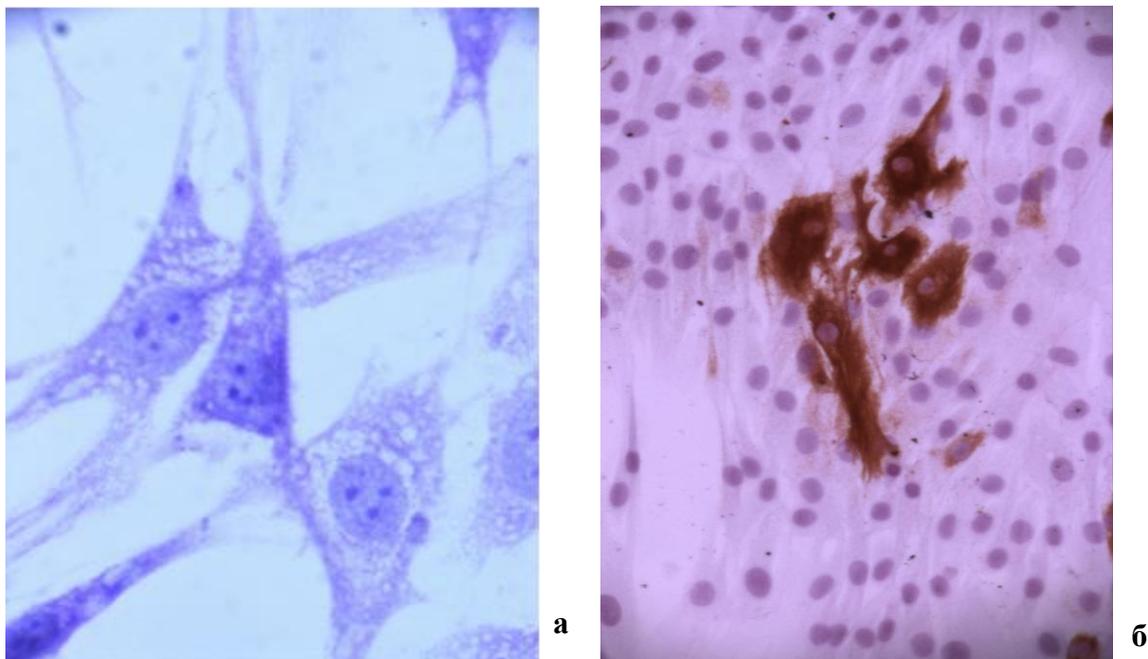


Рисунок 4 - Микрофотографии результатов культивирования клеток ПР тел позвонков на вогнутой стороне вершины деформации (идиопатический сколиоз): а) культура клеток; окраска по Ниссля, х 400; б) иммуногистохимическая реакция на глиальные белки (х200); в) сканирующая микроскопия: нейроны в культуре клеток (не напыленный препарат); сформированные контакты между двумя клетками; масштабная линейка 200 мкм.

### 1.3 Эксперимент по регенерации дефекта костной ткани тела позвонка мини-поросенка

Через 14 дней область дефекта тел позвонков заполнена остеотрансплантатом. Последний плотно прилежит к краям дефекта. Более того, из периферических отделов остеотранспланта в межбалочные пространства ложа внедряются примитивные костные структуры и остеогенная ткань. На поверхности костных балок реципиента расположены вновь образованная костная ткань, исходящая из остеотрансплантата. В центре остеотрансплантата сформированы примитивные костные балки. Остеобласты с

базофильными ядрами и базофильной цитоплазмой, располагаются вокруг трабекулярных структур (рисунок 5 а).

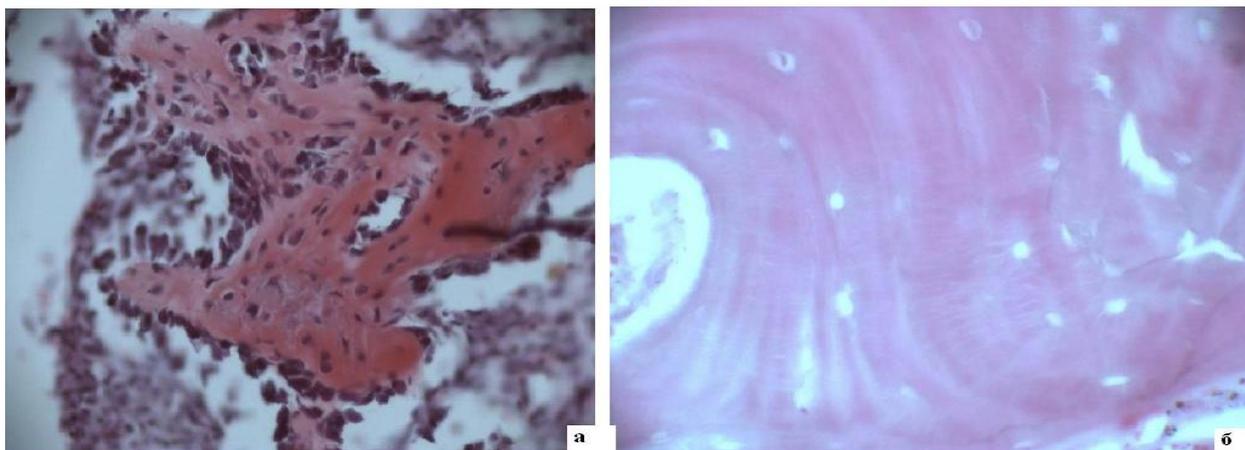


Рисунок 5 - Микрофотографии зоны замещения дефекта костной ткани остеотрансплантатом и аутооттрансплантатом (14 дней): а) сформирована примитивная костная ткань (гематоксилин-эозин; x200); б) безостеоцитный аутооттрансплантат в зоне дефекта костной ткани тела позвонка (гематоксилин-эозин; x200).

Внутри костных балок остеобласты расположены в лакунах. Промежутки между трабекулярными костными структурами заполнены сосудами и остеогенной тканью. На периферии остеотрансплантата, прилежащего к ложу реципиента располагаются более зрелые костные трабекулы, формирующие анастомозы. Трабекулы окружены активными двурядными остеобластами. Гемопоэтическая ткань между трабекулами отсутствует.

Через 14 дней в области дефекта тела позвонка плотно прилежит аутооттрансплантат. В некоторых участках аутооттрансплантата поверхность узурирована и подвергается остеокластической резорбции. Активация остеогенеза отсутствует (рисунок 5 б).

Через 30 дней полость дефекта, заполненная остеотрансплантатом, полностью замещена сформированной примитивной костной тканью. Костные трабекулы широкие, нерегулярного строения, с большим количеством хаотично расположенных остеобластов, трабекулярные линии не регулярны. Вокруг костных балок большое скопление активно синтезирующих остеобластов – клетки треугольной формы с округлым базофильным, экцентрично расположенным ядром и интенсивно базофильной, альциан-позитивной цитоплазмой (рисунок 6 а).

Между костными балками выявляется остеогенная ткань с большим количеством клеток, комитированных к остеогенезу и кровеносные сосуды; заполненные эритроцитами. В области контакта с ложем реципиента на поверхности безостеоцитных балок сформированы костные структуры, внедряющиеся из остеотрансплантата (рисунок 6 б). В трансплантате, как по периферии, так и в центральных отделах располагается примитивная костная ткань, которая занимает все пространство. Между трабекулами располагается тонкостенные сосуды и остеогенная ткань. В некоторых участках наблюдается процесс трансформации в более зрелую костную ткань.

Через 30 дней зона дефекта, замещенная аутокостью, содержит крупные фрагменты аутооттрансплантата. В некоторых участках в расслоившиеся зоны аутооттрансплантата из ложа реципиента проникают кровеносные сосуды, и формируется костный регенерат (рисунок 6 в).

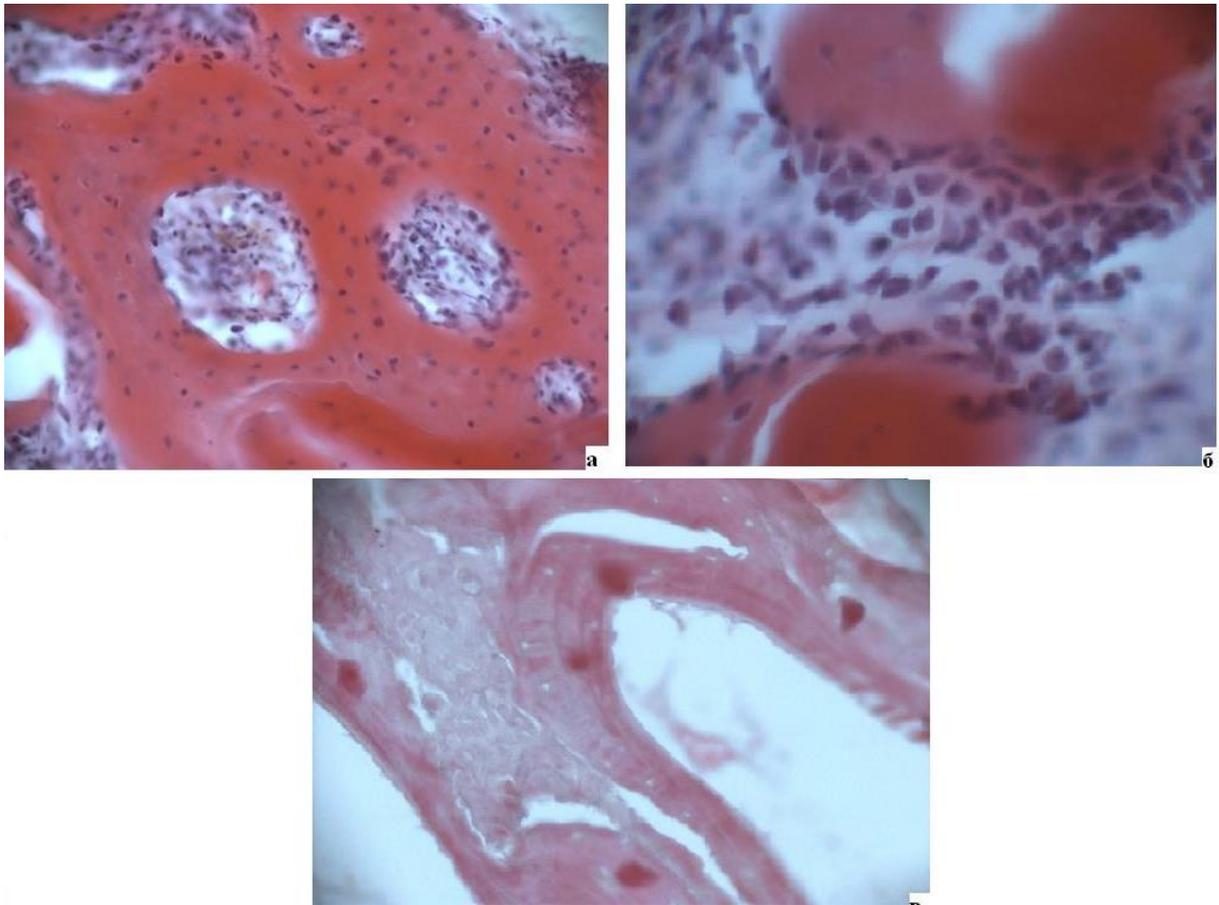


Рисунок 6 - Микрофотографии зоны замещения дефекта костной ткани остеотрансплантатом и аутоотрансплантатом (30 дней): а) примитивная костная ткань в зоне замещения дефекта тела позвонка остеотрансплантатом (гематоксилин-эозин; x200); б) на поверхности безостеоцитных балок сформированы костные структуры, внедряющиеся из остеотрансплантата (гематоксилин-эозин; x400); в) зона дефекта содержит крупные фрагменты аутоотрансплантата (гематоксилин-эозин; x200).

Через 60 дней в области пластического замещения дефекта костной ткани остеотрансплантатом сформирована костная ткань пластинчатого строения, заполнившая все пространство бывшего дефекта. Между костными структурами располагается остеогенная ткань и сосуды (рисунок 7 а).

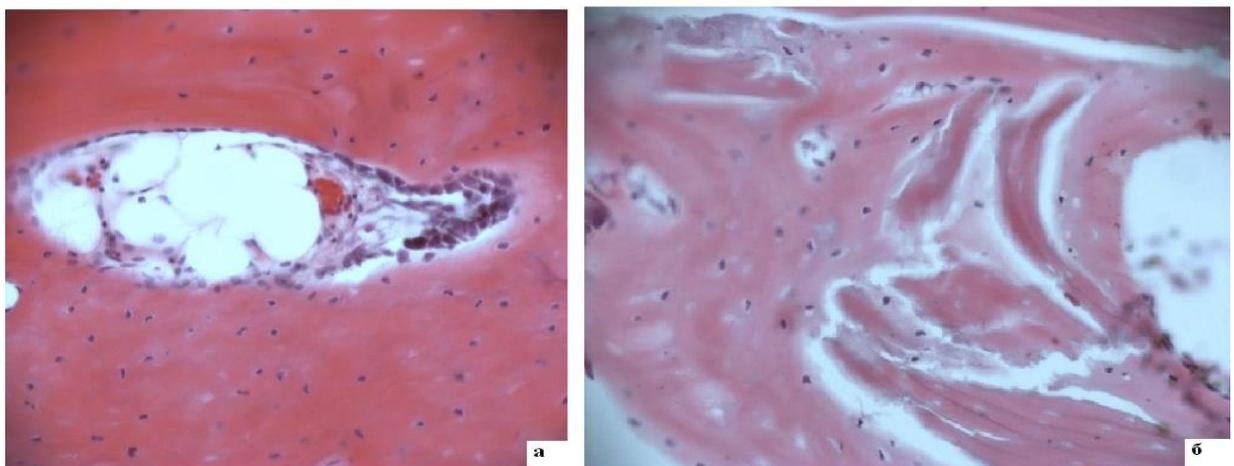


Рисунок 7 - Микрофотографии зоны замещения дефекта костной ткани остеотрансплантатом и аутоотрансплантатом (60 дней): после замещения дефекта костной ткани остеотрансплантатом и аутоотрансплантатом: а) в зоне замещения дефекта остеотрансплантатом сформирована костная ткань пластинчатого строения (гематоксилин-эозин, x200); б) в центре дефекта расположены крупные фрагменты аутоотрансплантата (гематоксилин-эозин, x200).

Через 60 дней в центре дефекта, заполненного аутоотрансплантатом, все еще встречаются крупные костные фрагменты. В местах прилегания к материнскому ложу сформирована новообразованная костная ткань примитивного строения (рисунок 7 б).

Через 90 дней в области пластического замещения дефекта костной ткани остеотрансплантатом располагается костная ткань трабекулярного строения с морфологическими признаками перестройки: нерегулярным расположением трабекулярных линий и остеоцитов. Между костными структурами располагаются миелоидный костный мозг. Наблюдается полная интеграция с ложем реципиента – границы удается установить только по степени «зрелости» костной ткани (рисунок 8 а).

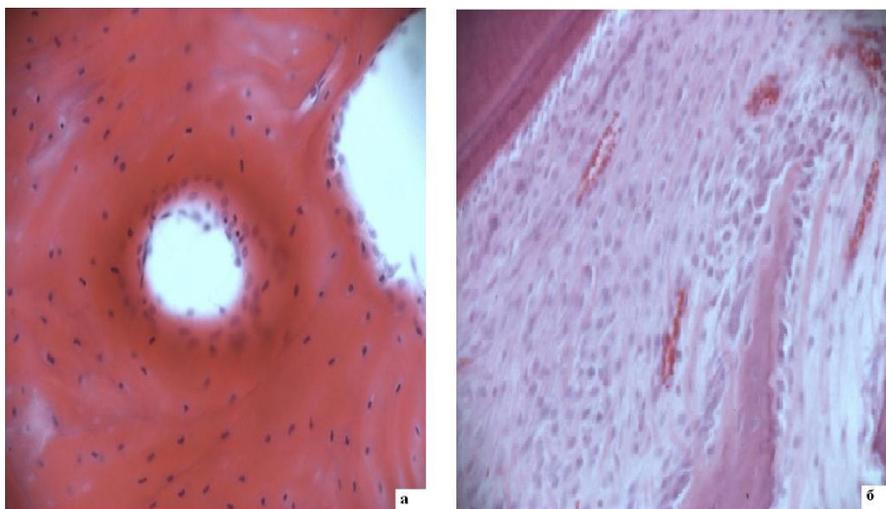


Рисунок 8 - Микрофотографии зоны замещения дефекта костной ткани остеотрансплантатом и аутоотрансплантатом (90 дней): а) дефект тела позвонка, замещенный остеотрансплантатом, заполнен костной тканью трабекулярного строения (гематоксилин-эозин; x200); б) расслоившиеся фрагменты аутоотрансплантата заполнены рыхловолокнистой тканью (гематоксилин-эозин; x200).

Через 90 дней в области пластического замещения дефекта аутоотрансплантатом располагаются отдельные костные включения в виде фрагментов незрелой костной ткани, не формирующих между собой контактов. В центральных отделах дефекта все еще находятся фрагменты аутоотрансплантата. Процесс образования органоспецифической костной ткани все еще не происходит (рисунок 8 б).

Идентификация остеогенной принадлежности, полученной тканеспецифичной конструкции, исследована методами иммуногистохимии и морфологии. Процесс трансдифференцировки хондротрансплантата в остеотрансплантат исследован экспрессией соответствующих тканеспецифических генов методом Real-time ПЦР. Показано, что в остеотрансплантате, по сравнению с исходными хондробластами, наблюдается статистически значимое увеличение уровня мРНК генов транскрипционного фактора *Runx2*, щелочной фосфатазы (*Alp*), остеонектина (*On*), остеопонтина (*Opn*) и *Bsp*, экспрессия которых характерна для клеток, дифференцирующихся в остеогенном направлении. Наличие экспрессии щелочной фосфатазы (*Alp*) и остеонектина (*On*) свидетельствует о том, что клетки находятся на ранних стадиях остеогенной дифференцировки. Кроме того, в остеотрансплантате, по сравнению с исходными клетками, статистически значимо снижается экспрессия генов, характерных для хряща: транскрипционного фактора *Sox9*, агрегана (*Acan*) и коллагена второго типа (*Col2*). Экспрессия *Sox9* снижается в 3 раза, *Col2* – в 7,5 раз, *Acan* – в 24 раза. Уровень транскрипции коллагена первого типа (*Col1*), являющегося основным белком внеклеточного матрикса в костной ткани, возрастает в клетках остеотрансплантата в 5 раз.

Таким образом, анализ полученных результатов исследования позволил сделать следующие основные выводы:

- процесс регенерации дефекта костной ткани тел позвонков на основе остеотрансплантата осуществляется по типу первичного ангиогенного остеогенеза;

- регенерация дефекта костной ткани и интеграция с ложем реципиента происходит за счет структурных компонентов остеотрансплантата;

- оптимальные сроки регенерации дефекта тел позвонков связаны с прохождением первого этапа минерализации остеотрансплантата в процессе трансдифференцировки в остеогенной среде;

- процесс регенерации костной ткани разного генеза (производного клеток нервного гребня – нижней челюсти и позвоночника (производного мезенхимы) происходит однотипно и завершается формированием органотипической костной ткани, что свидетельствует об иммунотолерантности остеотрансплантата.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Этиологическим фактором сколиотической болезни является эктопическая локализация клеток нервного гребня в ПР тел позвонков, генетически не детерминированных к хондрогенной дифференцировке и процессу роста. Локальное нарушение хондрогенеза в ПР тел позвонков больных ИС является причиной асимметрии роста и формирования деформации позвоночника. В настоящее время создается экспериментальная модель деформации позвоночника, на которой будут подтверждены или отвергнуты представленные гипотезы.

В результате проведенных исследований разработан экспериментальный образец трехмерного остеотрансплантата и получено экспериментальное обоснование его эффективности.

Впервые путем трансдифференцировки трехмерного хондротрансплантата в остеогенном направлении получен пластический материал, способный без предварительной перестройки к формированию дефинитивной костной ткани.

Полученные трансплантаты и их апробация в экспериментах являются основой для дальнейшей разработки методов коррекции дефектов костной и хрящевой ткани и их использования в клинической практике.

Список работ по теме исследования указан в приложении А.

### Список используемых источников

1. Gorman K.F. The genetic epidemiology of idiopathic scoliosis // Euro Spine 2012, P. 21, 1905-1909.
2. Деев Р.В. Клеточные технологии в травматологии и ортопедии: пути развития / Р.В. Деев, А.А. Исаев, А.Ю. Кочиш, Р.М. Тихилов // Клеточные технологии и тканевая инженерия. - 2007. - Том II. - №4. - С. 18-30.
3. Деев Р.В. Тканеинженерный эквивалент кости: методологические основы создания и биологические свойства / Р.В. Деев, Н.В. Цупкина, И.Я. Бозо, М.С. Калинин, А.Р. Гребнев, А.А. Исаев, Г.П. Пинаев // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2011. - Том 6. - №1. - С. 62-67.
4. Бурматов Н.А., Сергеев К.С., Консервативные и оперативные методы лечения компрессионных переломов тел нижних грудных и поясничных позвонков // Медицинская наука и образование Урала. - 2007. - Т.8. - №3. - С.4-7.
5. Зайдман А.М., Щелкунова Е.И., Строкова Е.Л., Корель А.В., Рахматиллаев Ш.Н., Шевченко А.И. Трехмерный хондротрансплантат – пластический материал для замещения дефектов костной ткани // Хирургия позвоночника. - 2012. - № 4. - С. 65-72.

## Приложение А

Список работ по теме исследования за период 2015-2017 гг.

### *Статьи:*

1. Зайдман А.М. Эктопическая локализация клеток нервного гребня – этиологический фактор сколиотической болезни / А.М. Зайдман, Е.Л. Строкова, Е.В. Киселева, Т.А. Агеева, Л.А.Сулдына, А.А. Струнов, А.И. Шевченко // Хирургия позвоночника. - 2015 (т. 12). - № 4. - С. 88-97.
2. Зайдман А.М. Морфогенез межпозвонкового остеохондроза / А.М. Зайдман, Ю.И. Бородин // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. - 2015. - № 11 (ч. 4). - С. 523-526.
3. Osteograft, plastic material for regenerative medicine / A. M. Zaidman, A. V. Korel, A.I. Shevchenko, E. I. Shchelkunova, K. M. Sherman, Yu. A. Predein and O. S. Kosareva // AIP Conf. Proc. 1760, 020071 (2016); <http://dx.doi.org/10.1063/1.4960290>
4. Зайдман А.М. Экспериментальное обоснование применения трехмерного остеотрансплантата для регенерации костной ткани различной локализации и гистогенеза / Зайдман А.М., Косарева О.С., Щелкунова Е.И., Корель А.В., Строкова Е.Л., Иванова Н.А., Рерих В.В., Предеин Ю.А., Ластевский А.Д., Агеева Т.А., Гусев А.Ф. // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 6. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25582>
5. Зайдман А.М. Что же такое идиопатический сколиоз? // Хирургия позвоночника. - 2016. - Т. 13. - № 4. - С. 104-110.
6. Зайдман А.М. Морфологические критерии периодизации роста позвоночника / А.М. Зайдман, А.В. Корель, Е.Л. Строкова // Сибирский научный медицинский журнал. - 2016. - Т. 36. - №2. - С. 12-18.
7. Зайдман А.М., Садовой М.А., Строкова Е.Л. Сколиотическая болезнь: 50-летний опыт исследований // Сибирский научный медицинский журнал. 2017. № 6. С. 76-85.
8. 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: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=27162> (дата обращения: 20.11.2017).
9. Зайдман А.М. Особенности регенерации костной ткани тел позвонков на основе остеотрансплантата в эксперименте / Зайдман А.М., Предеин Ю.А., Корель А.В., Щелкунова Е.И., Строкова Е.И., Ластевский А.Д., Рерих В.В., Шевченко А.И. // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2017. № 4. С. 95-102.
10. Zaidman A.M., Strokova E.L., Lebedeva A.O., Lactionov P.P. Analisis of Expression Candidate Gens – on Etiologic Factor of Idiopathic scoliosis (в издательстве PLOS ONE).
11. Zaidman A.M., Strokova E.L., Kiseleva E.V., Soldina L.A., Strunov A.A., Shevchenko A.I. Ectopic localization of Neural crest Cell etiological factor of scoliosis (в издательстве International Journal of Medical Science and Clinical Invention).

### *Патенты:*

1. Патент № 2574942 10.02.2016 Бюл. № 4 А61L 27/24 А61L 27/38 А61К 35/28 А61Р 19/00 «Способ получения трехмерного остеотрансплантата» по заявке № 2014145384 от 11.11.2014. Авторы: Зайдман А.М., Корель А.В., Щелкунова Е.И., Иванова Н.А.
2. Патент № 2580754 от 10.04.2016 Бюл. № 10 А61В 17/58 «Способ восстановления дефекта костной ткани» по заявке № 2015106506 от 25.02.2015. Авторы: Зайдман А.М., Садовой М.А., Корель А.В., Рерих В.В., Щелкунова Е.И., Иванова Н.А., Косарева О.С.

*Материалы конференций:*

1. Зайдман А.М. Анализ экспрессии генов-кандидатов этиологического фактора идиопатического сколиоза / А.М. Зайдман, Е.Л. Строкова // Цивьяновские чтения: мат. VIII Всерос. науч.- практ. конф. молодых ученых с междунар. участием, 26-28 ноября 2015 г., г. Новосибирск: в 2-х т. - т. 1. - Новосибирск, 2015. - с. 196-203.

2. Шерман К.М. Перспективы применения клеток нервного гребня в регенераторной медицине / К.М. Шерман, А.М. Зайдман // Цивьяновские чтения: мат. VIII Всерос. науч.- практ. конф. молодых ученых с междунар. участием, 26-28 ноября 2015 г., г. Новосибирск: в 2-х т. - т. 2. - Новосибирск, 2015. - с. 330-333.

3. Косарева О.С. Особенности регенерации костной ткани нижней челюсти остеотрансплантатом / О.С. Косарева, Н.А. Иванова, А.В. Сухих, А.В. Корель, Е.И. Щелкунова, А.М. Зайдман // IX Всерос. науч.- практ. конф. молодых ученых с междунар. уч. "Цивьяновские чтения", г. Новосибирск, 25-26 ноября 2016 г.: мат. конф. в 3-х т. / под общ. ред. М.А. Садового, Е.В. Мамоновой. - т. III. - Новосибирск, 2016. - с. 833-837.

4. Шерман К.М. Применение метода электропорации для исследования клеток нервного гребня / К.М. Шерман, А.М. Зайдман // IX Всерос. науч.- практ. конф. молодых ученых с междунар. уч. "Цивьяновские чтения", г. Новосибирск, 25-26 ноября 2016 г.: мат. конф. в 3-х т. / под общ. ред. М.А. Садового. Е.В. Мамоновой. - т. III. - Новосибирск, 2016. - с. 928-932.

5. Щелкунова Е.И. Регенерация артифициального перелома тела позвонка при использовании трехмерного остеотрансплантата / Е.И. Щелкунова, Ю.А. Предеин, А.В. Корель, А.М. Зайдман // IX Всерос. науч.- практ. конф. молодых ученых с междунар. уч. "Цивьяновские чтения", г. Новосибирск, 25-26 ноября 2016 г.: мат. конф. в 3-х т. / под общ. ред. М.А. Садового. Е.В. Мамоновой. - т. III. - Новосибирск, 2016. - с. 932-935.

6. Корель А.В. Регенерация дефекта костной ткани на основе остеотрансплантата в эксперименте / А.В. Корель, Е.И. Щелкунова, К.М. Шерман, Ю.А. Предеин, А.М. Зайдман // IX Всерос. науч.- практ. конф. молодых ученых с междунар. уч. "Цивьяновские чтения", г. Новосибирск, 25-26 ноября 2016 г.: мат. конф. в 3-х т. / под общ. ред. М.А. Садового, Е.В. Мамоновой. - т. III. - Новосибирск, 2016. - с. 830-833.

7. Предеин Ю.А. Результаты использования остеотрансплантата в эксперименте *in vivo* / Ю.А.Предеин, В.В. Рерих, А.М. Зайдман, Е.В. Мамонова // IX Всерос. науч.- практ. конф. молодых ученых с междунар. уч. "Цивьяновские чтения", г. Новосибирск, 25-26 ноября 2016 г.: мат. конф. в 3-х т. / под общ. ред. М.А. Садового, Е.В. Мамоновой. - т. III. - Новосибирск, 2016. - с. 864-868.

8. Предеин Ю.А. Результаты использования клеточного остеотрансплантата как пластического материала при вентральном спондилодезе / Ю.А. Предеин, В.В. Рерих, А.Д. Ластевский, А.М. Зайдман // X Всерос. науч.-практ. конф. молодых ученых с междунар. уч. "Цивьяновские чтения", г. Новосибирск, 24-25 ноября 2017 г.: мат. конф. в 2-х т. / под общ. ред. М.А. Садового, Е.В. Мамоновой. - т. 2. - Новосибирск, 2017. - с. 354-360.

9. Сухих А.В. Морфофункциональная характеристика поверхностных шейных лимфатических узлов в условиях регенерации нижней челюсти при трансплантации костнозамещающего материала / А.В. Сухих, А.М. Зайдман, С.В. Залавина, Н.А. Иванова, О.С. Косарева // X Всерос. науч.-практ. конф. молодых ученых с междунар. уч. "Цивьяновские чтения", г. Новосибирск, 24-25 ноября 2017 г.: мат. конф. в 2-х т.т./под. общ. ред. М.А. Садового, Е.В. Мамоновой. - т. 2. - Новосибирск, 2017. - с. 430-435.