

# Структурно-функциональные особенности деформации позвоночника при нейрофиброматозе *NF-1*

Зайдман А.М., Михайловский М.В., Завьялова Е.Л., Суздалов В.А., Садовой М.А.

## Structural and functional peculiarities of spine deformity development in neurofibromatosis *NF-1*

Zaidman A.M., Mikhailovsky M.V., Zaviyalova Ye.L., Suzdalov V.A., Sadovoy M.A.

Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии Росмедтехнологий, г. Новосибирск

© Зайдман А.М., Михайловский М.В., Завьялова Е.Л. и др.

Представлено изучение патогенетических механизмов формирования деформации позвоночника при нейрофиброматозе. Исследованы структурные компоненты позвоночника, полученные в ходе коррекции деформации от 10 детей с III—IV степенью сколиоза на почве нейрофиброматоза.

Этиологическим фактором формирования деформации позвоночника при нейрофиброматозе является мутация в клетках ганглиозной пластинки гена *NF-1*. Миграция клеток, несущих мутантный ген в одну из зон склеротома, приводит к активации онкогена и интенсивной пролиферации хондро-, остео- и фибробластов в пластинке роста, межпозвоночном диске и теле позвонка.

Продолженный процесс деформации позвоночника после оперативного вмешательства объясняется пролиферацией хондро- и фибробластов в теле позвонка и межпозвоночном диске и нарушением экспрессии генов люмикана и *NF-1*.

**Ключевые слова:** нейрофиброматоз, пластинка роста, склеротом, деформация позвоночника, экспрессия гена.

To study pathogenetic mechanisms of the development of spinal deformity in neurofibromatosis. Structural components of the spine were presented as specimens obtained after surgical correction of spinal deformity performed in 10 children with III—IV grade scoliosis associated with neurofibromatosis.

Etiologic factor of the development of spinal deformity in neurofibromatosis is a mutation of the *NF-1* gene in cells of ganglionic lamella. Migration of cells carrying mutant gene into one of the sclerotome zones results in oncogene activation and intensive proliferation of chondro-, osteo-, and fibroblasts in the growth plate, intervertebral disc, and vertebral body.

Progressive development of the spinal deformity after surgical intervention is accounted both for proliferation of chondro- and fibroblasts in the vertebral body and intervertebral disc and for disturbance of the *NF-1* and lumican genes expression.

**Key words:** neurofibromatosis, growth plate, sclerotome, spinal deformity, gene expression.

УДК 616.833-006.38.03-02:616.711-007.5

### Введение

Нейрофиброматоз I типа — тяжелое системное наследственное заболевание с преимущественным поражением кожи, нервной, мышечной и костной систем. Наследуется по аутосомно-доминантному типу с высокой пенетрантностью генотипов и вариабельной экспрессивностью [18]. Этиологическим фактором заболевания является мутация гена *NF-1*, локализуемого в 17q-хромосоме [19, 24].

Мутация гена *NF-1* вызывает повышенную активность онкобелков Ras, что приводит к пролиферации клеток и формированию опухолей. Среди кост-

ных повреждений на почве нейрофиброматоза наиболее часто (до 69%) встречаются деформации позвоночника — кифозы и сколиозы с грудной локализацией [7—11, 13, 14, 19, 21, 22].

Механизм деформации позвоночника остается неизвестным. По мнению А.И. Tsirikos, деформация позвоночника возникает вследствие давления опухоли (нейрофибромой) на тела позвонков [23]. Не исключаются и первичная дисплазия мезодермы, остеомаляция и эндокринный дисбаланс [17, 20]. Но ни одна из теорий не имеет достоверных доказательств. Особенно труднообъяснимой является идиопатическая фор-

ма, которая по клиническому течению и рентгенологическим данным неотличима от идиопатического сколиоза и диагностируется на основании сопутствующих симптомов [14—16, 20].

В настоящее время в литературе отсутствуют данные, касающиеся морфологических изменений в структурных компонентах позвоночника при нейрофиброматозе. В связи с этим цель предпринятого исследования — изучить патогенетические механизмы формирования деформации позвоночника при нейрофиброматозе.

## Материал и методы

Пластинки роста, межпозвонковые диски, фрагменты тел позвонков на высоте деформации, ниже и выше ее получены в клинике детской ортопедии Новосибирского НИИ травматологии и ортопедии от 15 детей в возрасте 10—14 лет с деформациями позвоночника (от 90 до 180°) на почве нейрофиброматоза *NF-1*. Больные подвергались операции anterior Releasing and interbody fusion. В качестве контроля были использованы структурные компоненты позвоночника детей (12—14 лет) без патологии позвоночника, полученные на кафедре судебной медицины Новосибирского государственного медицинского университета.

Ткани фиксировались в 10%-м растворе формалина, костная ткань подвергалась декальцинации в холодном трилоне «Б». После депарафинирования срезы окрашивались гистологическими методами (гематоксилином и эозином по ван Гизону и Маллори), гистохимическими методами (толуидиновым синим при разных значениях pH, альциановой синью, Хейл-реакцией, ШИК-реакцией).

Материалом для исследования уровня экспрессии генов — аггрекана, люмикана и *NF-1* методом ПЦР-анализа служили клетки, выделенные из пластинок роста (ПР) тел позвонков (операционный материал). В качестве контроля использовались хондробласты, выделенные из ПР тел позвонков человека в возрасте 12—14 лет. Гиалиновый хрящ отмывали в растворе Хенкса с канамицином концентрацией 1 г/л в течение 15 мин, измельчали в чашке Петри с минимальным объемом среды RPMI до размеров 1—2 мм<sup>2</sup>, затем помещали в раствор 1,5%-й коллагеназы в силиконизированной посуде для инкубирования на шейкере при температуре 37 °С в течение 18—22 ч. Суспензию пропускали через нейлоновый фильтр и центрифугировали 10 мин при 1 500 об/мин.

Суммарную РНК выделяли с использованием реагента PureLink Total RNA Purification System (Invitrogen, США) согласно рекомендациям производителя. Для очистки РНК от ДНК использовали реагент DNA-free™ DNase Treatment and Removal Reagents (Ambion, США).

Для проведения обратной транскрипции использовали реагент M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, США). Все процедуры проводили в соответствии с рекомендациями производителя. Для синтеза кДНК брали по 6 мкг РНК на пробу.

Для ПЦР использовались праймеры

F: 5'-GTGCAGCAGGATGCAGCGGA-3' и

R: 5'-GCACACTCCCCCAAGGGCAC-3' для гена *NF-1* человека с размером целевого фрагмента 548 bp,

F: 5'-ATCGTCACCCCGAGGAGCAG-3' и

R: 5'-GGCGCTGGACAAACCCCTCTG-3' (379 bp)

для гена аггрекана человека,

F: 5'-GTGACTGGGCTGGGTCTC CCC-3' и

R: 5'-GGCACTTGGGTAGCTTTCAGGGC-3' для ге-

на люмикана человека (329 bp), а также праймеры

F: 5'-GGGCGCTGGTACCAG-3'

R: 5'-AACATGGGGGCATCAGCAGAG-3' (350 bp)

для гена *GAPDH*.

Аmplификацию фрагментов генов *GAPDH*, аггрекана, люмикана и *NF-1* проводили методом ПЦР на амплификаторе «Терцик» (компания «ДНК Технологии», Россия). Ген *GAPDH* использовался в качестве эндогенного внутреннего контроля. Объем реакционной смеси составлял 20 мкл с добавлением приблизительно 200 нг к ДНК, 2 мкл 10x ПЦР-буфера (10 ммоль Tris-HCl, 1,5 ммоль MgCl<sub>2</sub>, 50 ммоль KCl, pH 8,3), 20 пмоль каждого праймера, 0,2 ммоль каждого дезоксинуклеозидтрифосфата и 1 ед. акт. Taq-ДНК-полимеразы. Реакционную смесь покрывали равным объемом минерального масла. ПЦР проводили при следующих условиях: начальная денатурация 5 мин при температуре 95 °С, отжиг праймеров 30 с при 58—60 °С, элонгация 30 с при 72 °С, 5 мин при 72 °С. Для гена *GAPDH* амплификация проводилась в течение 25 циклов, для генов аггрекана и *NF-1* в течение 30 циклов.

Продукты ПЦР анализировали электрофорезом в 1,5—2%-м агарозном геле в буфере TAE (0,04 моль Tris-HCl, 0,05 моль EDTA, pH 8,0) с содержанием 1 мкг/мл бромистого этидия. Сканирование геля проводили в ультрафиолетовом свете с помощью видеосистемы DNA Analyzer (г. Москва).

## Результаты и обсуждение

Морфологические исследования структурных компонентов позвоночника показали, что на вогнутой стороне кривизны ПР представлена мелкими, без определенной ориентации, плотно расположенными клетками, местами в дистрофически измененном матриксе (рис. 1).

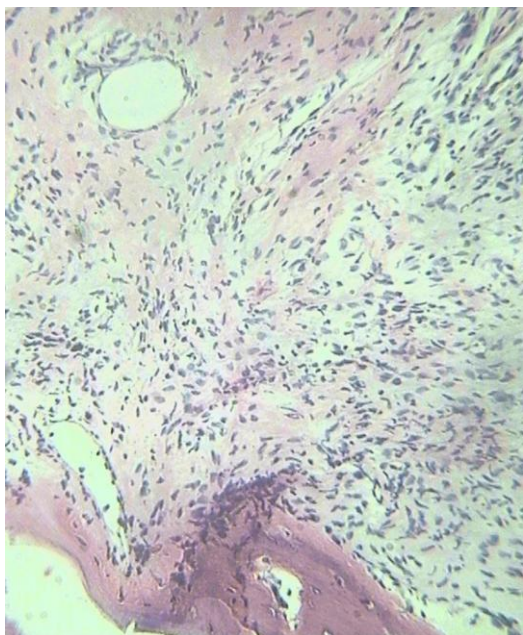


Рис. 1. Пролiferация низкодифференцированных хондробластов в пластинке роста тела позвонка на вогнутой стороне кривизны. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200

По своим фенотипическим признакам это мало-дифференцированные хондробласты эмбрионального типа, о чем свидетельствует как ультраструктурная

организация, так и морфологическая характеристика этих клеток. Возникают вопросы: каким образом в ПР сохраняются клетки эмбрионального типа? Почему процесс дифференцировки и становления органной специфичности клеток не происходит? Для ответа на эти вопросы следует рассмотреть прежде всего происхождение названных клеток и причину активной примитивной их пролиферации.

Известно, что нейрофиброматоз — аутосомно-доминантная патология, в основе которой лежит мутация в клетках ганглиозной пластинки гена *NF-1*. Клетки ганглиозной пластинки на ранних стадиях гаструляции, являясь производными нейроэктодермы, расселяются между экто- и энтодермой и формируют нервные ганглии, мозговое вещество надпочечников, вегетативную нервную систему, кости, хрящевые образования лицевого и головного черепа, дентин и т.д. (рис. 2). Надо полагать, что клетки ганглиозной пластинки мигрируют и в зачатки сегментированной мезодермы. Подтверждением подобного предположения выступает болезнь Реклингаузена (наличие множественных нейрофибром в дерме — производной сегментированной мезодермы). Кроме того, пролиферация хроматофоров в эпидермис является фактором формирования кофейных пятен — одного из ведущих симптомов нейрофиброматоза. Полученные факты свидетельствуют о возможности миграции клеток ганглиозной пластинки в дерматом и склеротом, что согласуется с классическим высказыванием Дриша: «Если процесс движения клеток идет однотипно, то траектории клеток могут быть в известной степени случайными» [1].

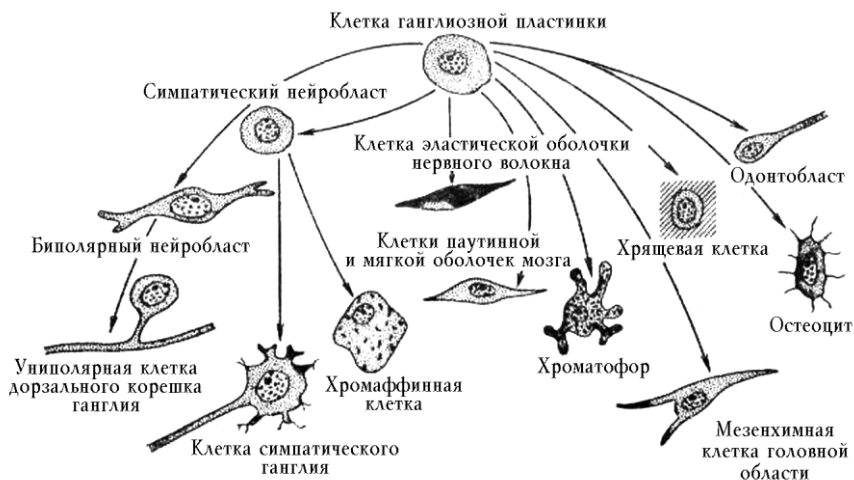


Рис. 2. Судьба клеток ганглиозной пластинки (по А.Г. Кнорре)

Миграция клеток глиальной пластинки, несущих мутацию гена *NF-1*, в склеротом приводит к изменению фенотипа этих клеток, что согласуется с основным положением эмбриологии. «Мигрирующие клетки нервного гребня приобретают фенотип той среды, в которую они перемещаются, так как судьба клеток нервного гребня еще не детерминирована» [2]. На стадии хондрогенной дифференцировки склеротома клетки ганглиозной пластинки приобретают фенотип эмбриональных хондробластов, но генотип (мутация в гене *NF-1*) сохраняется. Ген *NF-1* является опухолевым супрессором, экспрессирующим белок нейрофибромин. Этот ген контролирует активность онкобелков семейства Ras, переводя их в ГДФ-связанное состояние. Мутации в одном из аллелей гена *NF-1* вызывает гиперэкспрессивность онкобелков Ras, что приводит к неконтролируемой стимуляции клеток и формированию опухолей. В пластинке роста это хаотично, местами радиально расположенные низкодифференцированные хондробласты, сохраняющие «компетентность эмбрионального материала». Эти клетки «лишены специализированных структур и не выполняют специальных частных функций, а обладают лишь органоидами общего значения, свойственными всякой клетке, и несут лишь общие всем клеткам функции питания, дыхания, выделения, перемещения, растут, размножаются» [2]. На ранних стадиях развития большое количество клеток обеспечивают формирование матрикса и тканеспецифической структуры — это синтезы, направленные на образование тканеспецифических органоидов и рецепторного аппарата клеток. На смену аутопаракринной регуляции формируется соответствующая иерархическая регуляция, при которой возникают межтканевые взаимодействия, обеспечивающие гомеостаз функционирующего органа. Тканеспецифичность — это предшествующая стадия органоспецифичности клеток. Нарушения процесса формирования органоспецифической функции хондробластов пластинки роста на вогнутой стороне кривизны приводят к асимметрии роста. Примитивные хондробласты не проходят стадий дифференцировки: не интегрируются в хондроны, не формируют специфических рецепторов, способных к восприятию регулирующих сигналов гормональной и других систем. «Одиночные клетки не воспринимают действия индуктора и не способны к синтезу специфических фер-

ментов» [3]. Мутация гена *NF-1* приводит к разрыву необходимой цепочки формообразовательного процесса клетка — ткань — орган. Нарушение специфической пролиферации и дифференцировки хондробластов сопровождается и резким нарушением остеогенеза. Так же как и в ПР на фоне пролиферации остеобластов и остеокластов наблюдается беспорядочное формирование неминерализованных балочных структур (рис. 3).

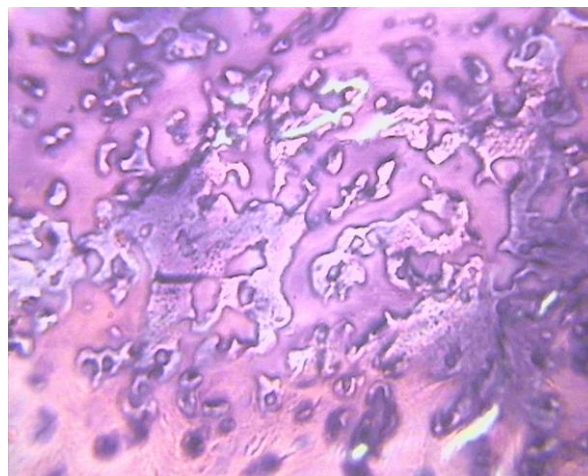


Рис. 3. Беспорядочное расположение костных балок на стадии минерализации (вогнутая сторона кривизны). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 100

Интенсивная пролиферация хондробластов выходит за пределы пластинки роста. Проллифераты внедряются в тело позвонка и ограничиваются тонкими костными пластинками, что обуславливает фистончатость тел позвонков — один из рентгенологических симптомов рассматриваемой патологии. Нарушение структурной организации костной ткани связано с активностью Ras-белков, стимулирующих митотическую активность остеобластов, на фоне низкой экспрессивности гена люмикана и высокой экспрессии гена аггрекана (рис. 4).

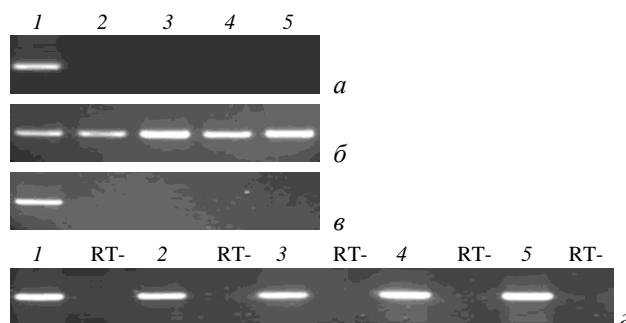




Рис. 4. ПЦР-анализ экспрессии генов: *NF-1* (а), аггрекана (б), люмикана (в), *GAPDH* (г); 1 — образец пластинки роста здорового ребенка; 2—5 — образцы пластинок роста детей, больных нейрофиброматозом *NF-1*; RT — отрицательный контроль

Эти гены регулируют разные стадии остеогенеза, поэтому не исключено и двойное влияние этих генов.

Значительный интерес представляют изменения в межпозвоновом диске. На вогнутой стороне кривизны в разных отделах диска встречаются как отдельные пролифераты, состоящие из малодифференцированных хондробластов, так и образования, подобные нейрофибромам (рис. 5). В некоторых препаратах наблюдается формирование полисадных структур. Полученные результаты подтверждают положение о том, что клетки ганглиозной пластинки в зависимости от места миграции приобретают соответствующий фенотип. Один из главных вопросов — это процесс формирования деформации позвоночника на фоне нейрофиброматоза.

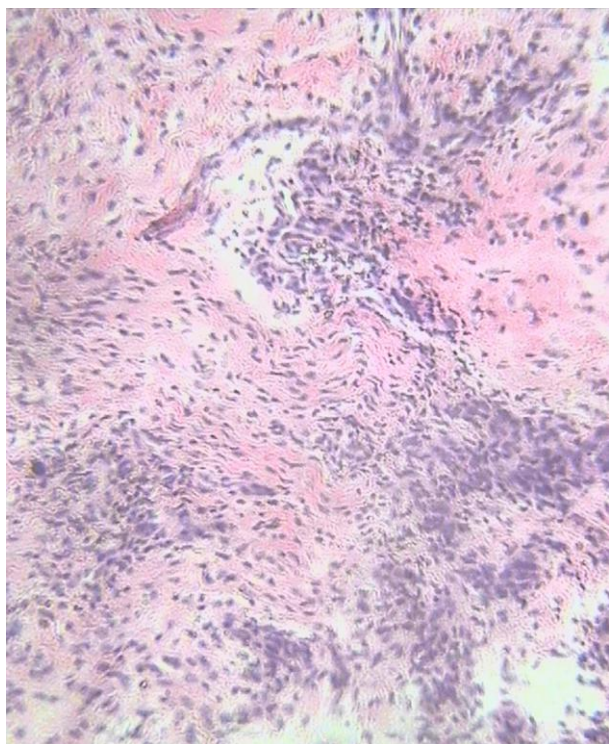


Рис. 5. Проплиферация хондро- и фибробластов в межпозвоновом диске. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200

Морфологические исследования свидетельствуют о нарушении структурной организации пластинки роста на вогнутой стороне кривизны, тогда как на выпуклой сохраняются закономерности и стадийность дифферен-

цировок хондробластов и адекватного остеогенеза (рис. 6). Закономерности независимого развития разных отделов тел позвонков и дифференцированная генная регуляция этих зон подтверждают возможность миграции клеток ганглиозной пластинки в один из зачатков формирующихся структурных компонентов позвоночника. Об этом свидетельствует четкая граница между выпуклой и вогнутой сторонами кривизны (рис. 7).

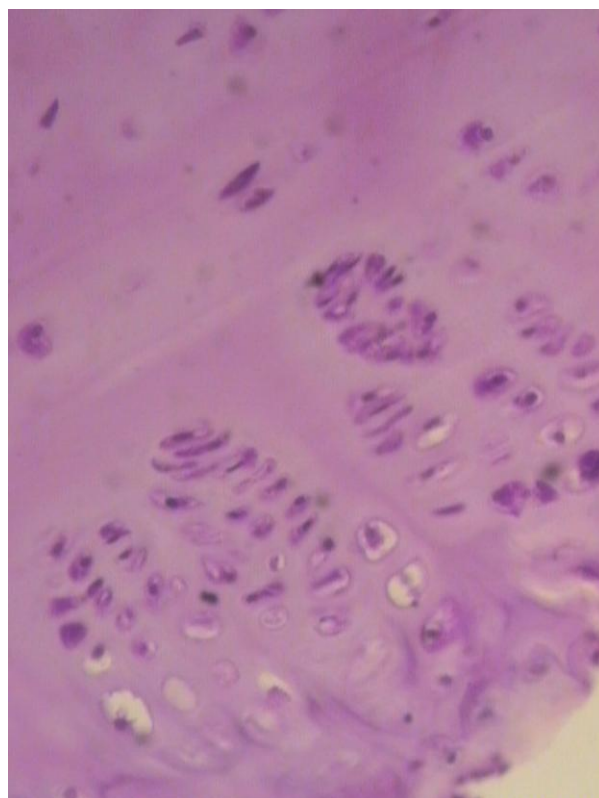


Рис. 6. Гранулы гликогена в цитоплазме клеток пластинки роста вогнутой стороны кривизны. ШИК-реакция. Ув. 400

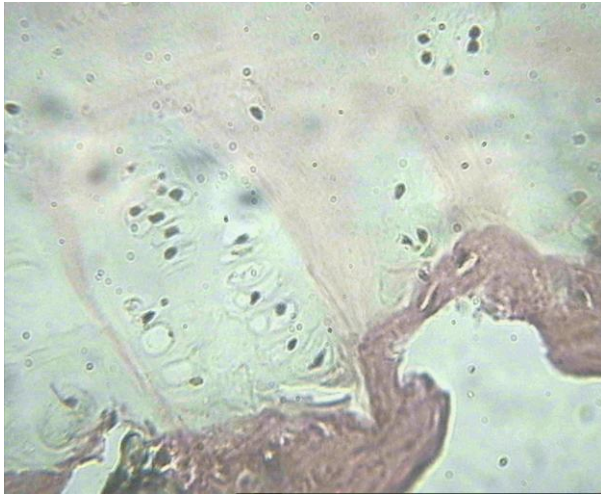


Рис. 7. Граница между вогнутой и выпуклой сторонами деформации. Пластинка роста тела позвонка на высоте деформации. Окраска по ван Гизону. Ув. 400

Продолженный рост — адекватная пролиферация, дифференцировка и остеогенез на выпуклой стороне кривизны и грубое нарушение функции роста на вогнутой стороне кривизны — является причиной асимметрии роста и формирования деформации позвоночника. Патогенетические механизмы деформации позвоночника при нейрофиброматозе и идиопатическом сколиозе отличны, хотя обе патологии возникают в результате генетических нарушений роста.

Одной из особенностей сколиоза на фоне нейрофиброматоза является прогрессирование деформации после оперативного вмешательства [5]. Прогрессирование деформаций (модуляцию) [6] следует рассматривать в связи с продолжающейся пролиферативной активностью в структурных компонентах позвоночника — межпозвоночном диске, теле позвонка и хрящевой ткани. Патологический процесс при исследуемой патологии распространяется на все структурные компоненты позвоночника, а не только на пластинку роста, как это происходит при идиопатическом сколиозе.

Пролиферацию клеток в теле позвонка, пластинке роста и диске необходимо рассматривать как бластоматозный процесс. В таком случае прогрессирование деформации позвоночника и ложные суставы после оперативного вмешательства можно объяснить как продолжающейся пролиферацией хондро- и фибробластов в межпозвоночном диске и теле позвонка, так и нарушением остеохондрогенеза [4], регуляция которых в результате мутации гена *NF-1* нарушена.

## Заключение

Этиологическим фактором формирования деформации позвоночника при нейрофиброматозе является мутация в клетках ганглиозной пластинки гена *NF-1*. Миграция клеток, несущих мутантный ген в одну из зон склеротома, приводит к активации онкогена и интенсивной пролиферации хондро-, osteo- и фибробластов в ПР, межпозвоночном диске и теле позвонка. В связи с тем что мутация затрагивает самые ранние стадии эмбриогенеза, становление дефинитивных структурных компонентов позвоночника в патологически измененных зонах нарушается.

Продолженный процесс деформации позвоночника (модуляция) после оперативного вмешательства объясняется пролиферацией хондро- и фибробластов в теле позвонка и межпозвоночном диске и нарушением процесса остеохондрогенеза в результате мутации гена *NF-1*.

## Литература

1. Белоусов Л.В. Введение в общую эмбриологию. М.: МГУ, 1980. 216 с.
2. Кнорре А.Г. Эмбриональный гистогенез. Л.: Медицина, 1971. 431 с.
3. Корочкин Л.И. Взаимодействие генов в развитии. М.: Наука, 1977.
4. Aegeter E. The possible relation-ship of neurofibromatosis, congenital pseudoarthrosis and fibrous dysplasia // J. Bone Joint. Surg. 1950. V. 32. 618 p.
5. Akbarnia B.A., Gabriel R.R., Beckman E., Chal D. Prevalence of scoliosis in neurofibromatosis // Spine. 1992. V. 17. P. 244—248.
6. Betz R.R., Iorio Lombardi A.V., Clancy M., Steel H.H. Scoliosis surgery in neurofibromatosis // Clin. Orthop. 1989. V. 245. P. 53—56.
7. Biesecker L.G. The multifaceted challenges of Proteus syndrome // JAMA. 2001. V. 285. P. 2240—2243.
8. Bunyatov R. Clinical roentgenographic characteristics of scoliosis in neurofibromatosis // Pediatrics. 1983. V. 5. P. 49—51.
9. Calvert P.T., Edgar M.A., Webb P.J. Scoliosis in neurofibromatosis. Natural history without operation // J. Bone Joint. Surg. 1989. V. 71. P. 246—251.
10. Cawthon R.M., Weiss R., Xu G.F. et al. A major segment of the neurofibromatosis type 1 gene: cDNA sequence, genomic structure, and point mutations // Cell. 1990. V. 62. P. 193—201.
11. Chaglassian J.H., Ristborough E.J., Hall J.E. Neurofibromatous scoliosis // J. Bone Joint. Surg. 1976. V. 58. P. 695—702.
12. Cnossen M.N., de Goede-Bolder A., van den Broek K.M. et al. A prospective 10 years follow up study of patients with neurofibromatosis type 1 // Arch. Dis. Child. 1998. V. 78. P. 408—412.

13. Crawford A.H. Neurofibromatosis // The pediatric spine / Weinstein S.L. (ed.). New York: Raven Press, 1994. P. 619—649.
14. Crawford A.H. Neurofibromatosis // The pediatric spine: principles and practice, 2<sup>nd</sup> edn. / Weinstein S.L. (ed.) Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. P. 471—490.
15. Durrani A., Crawford A.H., Choudhry S.N. et al. Modulation of spinal deformities in patients with neurofibromatosis type 1 // Spine. 2000. V. 25. P. 69—75.
16. Flood B.M., Butt W.P., Dickson R.A. Rib penetration of the intervertebral foraminae in neurofibromatosis // Spine. 1986. V. 11. P. 172—174.
17. Funasaki H., Winter R.B., Lonstein J.B., Denis F. Pathophysiology of spinal deformities in neurofibromatosis // J. Bone Joint Surg. 1994. V. 76. P. 692—700.
18. Goldberg N.S., Collins F.S. The hunt for the neurofibromatosis gene // Arch. Dermatol. 1991. V. 124. P. 1701—1707.
19. Goldberg N.S., Collins F.S. The hunt for the neurofibromatosis gene // Arch. Dermatol. 1991. V. 127. P. 1705—1709.
20. Kim H.W., Weinstein S.L. Spine update: the management of scoliosis in neurofibromatosis // Spine. 1997. V. 22. P. 2770—2776.
21. North K. Neurofibromatosis type 1: review of the first 200 patients in an Australian clinic // J. Child. Neurol. 1993. V. 8. P. 395—402.
22. Sirois J.L., Drennan J.C. Dystrophic spinal deformity in neurofibromatosis // J. Pediatr. Orthop. 1990. V. 10. P. 522—526.
23. Tsirikos A.I., Saifuddin A., Noordeen M.H. Spinal deformity in neurofibromatosis type 1: diagnosis and treatment // Eur. Spine J. 2005. V. 14. P. 427—439.
24. Vitale M. J., Juha A., Skaggs D.J. Ophthodaedic manifestation of neurofibromatosis in children: update // Clin. Orthop. 2002. V. 401. P. 107—118.

Поступила в редакцию 18.03.2010 г.

Утверждена к печати 28.09.2010 г.

#### Сведения об авторах

**А.М. Зайдман** — заслуженный деятель науки РФ, д-р мед. наук, профессор, руководитель отдела морфологии и теоретических исследований вертебральной патологии НИИТО Росмедтехнологий (г. Новосибирск).

**М.В. Михайловский** — д-р мед. наук, профессор, руководитель клиники детской и подростковой вертебрологии НИИТО Росмедтехнологий (г. Новосибирск).

**Е.Л. Завьялова** — мл. науч. сотрудник отдела морфологии и теоретических исследований вертебральной патологии НИИТО Росмедтехнологий (г. Новосибирск).

**В.А. Суздолов** — аспирант клиники детской и подростковой вертебрологии НИИТО Росмедтехнологий (г. Новосибирск).

**М.А. Садовой** — д-р мед. наук, профессор, директор НИИТО Росмедтехнологий (г. Новосибирск).

#### Для корреспонденции

Зайдман Алла Михайловна, тел. (383) 224-45-66, факс (383) 224-55-70; e-mail: AZaydman@niito.ru, <http://www.niito.ru>

---

## Уважаемые читатели!

### Предлагаем вам подписаться на наш журнал с любого номера

В 2011 году стоимость подписки на полугодие — 1500 рублей, на год — 3000 рублей.

**Как оформить подписку на журнал «Бюллетень сибирской медицины»**

**На почте во всех отделениях связи**

Подписной индекс **46319** в каталоге агентства Роспечати «Газеты и журналы 2011, 1-е и 2-е полугодие».

**В редакции**

- Без почтовых наценок.
- С любого месяца.

- Со своего рабочего места.

По телефону (382-2) 51-41-53; факс (382-2) 51-53-15.

На сайте <http://bulletin.tomsk.ru>

Если вы являетесь автором публикаций или хотите приобрести наш журнал, он будет выслан вам наложенным платежом при заполнении заявки. Стоимость приобретения одного номера 400 рублей.

Заявку на приобретение журнала нужно выслать по адресу редакции:

634050, г. Томск, пр. Ленина, 107,

Научно-медицинская библиотека Сибирского государственного медицинского университета,

редакция журнала «Бюллетень сибирской медицины»,

тел. (8-3822) 51-41-53. E-mail: [bulletin@bulletin.tomsk.ru](mailto:bulletin@bulletin.tomsk.ru)