

Научная статья

УДК 616.718.51

doi:10.18499/2225-7357-2025-14-2-79-87

3.3.2 – патологическая анатомия



Фенотипические особенности клеток медиальной эпифизарной пластинки проксимального отдела большеберцовой кости при болезни Блаунта

Е. Л. Строкова¹✉, Н. Ю. Пахомова¹, А. И. Шевченко², В. В. Кожевников¹,
С. В. Залавина³, С. В. Машак³, Д. В. Жуков³, А. А. Корыткин¹

¹Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна, Новосибирск, Россия

²Институт цитологии и генетики, Новосибирск, Россия

³Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск, Россия

Аннотация. Цель исследования – идентифицировать фенотип клеток медиальной эпифизарной пластинки проксимального отдела большеберцовой кости при болезни Блаунта. **Материал и методы.** Исследование выполнено на медиальных эпифизарных пластинках проксимального отдела большеберцовой кости при односторонней болезни Блаунта III–IV степени. Образцы хрящевой ткани получены в клинике детской ортопедии Новосибирского НИИ травматологии и ортопедии от 5 детей (4 девочки, 1 мальчик) в возрасте от 3 до 8 лет. Клетки пластинок роста подвергали культивированию до 4-го пассажа и исследовали с помощью метода иммунофлуоресцентной микроскопии на хондрогенный (Collagen II) и нейральные маркеры (Musashi-1, PAX6, SOX2, NF200). Морфометрический анализ клеток проводили с использованием программы ImageJ. **Результаты.** В медиальных эпифизарных пластинках проксимального отдела большеберцовой кости пациентов с болезнью Блаунта выявлены клетки двух разных фенотипов. Первый тип – хондроциты разной степени дифференцировки с флуоресцентным окрашиванием на коллаген II типа и отрицательной реакцией на нейральные маркеры. Второй тип представлен клетками биполярной и мультиполярной формы с двумя или несколькими длинными отростками. Клетки нейрального фенотипа экспрессировали ранние нейральные маркеры: Musashi-1, PAX6, SOX2 и маркер зрелых нейральных клеток NF200. Площади ядра, цитоплазмы, клеток, а также ядерно-цитоплазматические отношения в выявленных фенотипах статистически значимо различались. **Заключение.** Проведенное исследование свидетельствует о наличии клеток нейрального фенотипа в пластинках роста большеберцовой кости при болезни Блаунта. Для объяснения полученных результатов предложена гипотеза о роли клеток нервного гребня в индуцировании патологии коленных суставов.

Ключевые слова: болезнь Блаунта; большеберцовая кость; эпифизарная пластинка; хондроциты; нервный гребень

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Строкова Е.Л., Пахомова Н.Ю., Шевченко А.И., Кожевников В.В., Залавина С.В., Машак С.В., Жуков Д.В., Корыткин А.А. Фенотипические особенности клеток медиальной эпифизарной пластинки проксимального отдела большеберцовой кости при болезни Блаунта // Журнал анатомии и гистопатологии. 2025. Т. 14, №2. С. 79–87. <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2025-14-2-79-87>

ORIGINAL ARTICLES

Original article

Phenotypic features of medial epiphyseal growth plate cells in the proximal tibia in Blount's disease

Е. Л. Strokov¹✉, N. Yu. Pakhomova¹, A. I. Shevchenko², V. V. Kozhevnikov¹,
S. V. Zalavina³, S. V. Mashak³, D. V. Zhukov³, A. A. Korytkin¹

¹Y.L. Tsvyan Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Novosibirsk, Russia

²Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia

³Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

Abstract. The aim of the study was to identify the phenotype of medial epiphyseal growth plate cells in the proximal tibia in Blount's disease. **Material and methods.** The study was conducted on medial epiphyseal growth plates of the proximal tibia in unilateral Blount's disease of stages III–IV. Cartilage tissue samples were obtained at the Pediatric Orthopedics Clinic of the Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics from 5 children (4 girls, 1 boy) aged 3 to 8 years. Growth plate cells were cultured up to passage 4 and analyzed using immunofluorescence microscopy for chondrogenic (Collagen II) and neural markers (Musashi-1, PAX6, SOX2, NF200). Morphometric measurements were conducted with ImageJ software. **Results.** Two

different cell phenotypes were observed in the proximal tibial growth plates of individuals with Blount's disease. Type 1: Chondrocytes exhibiting a differentiation gradient, with type II collagen positivity and absence of neural marker staining. Type 2: Cells displaying either bipolar or multipolar architecture, with multiple thin processes. Neural-phenotype cells showed positive expression of both early-stage markers (Musashi-1, PAX6, SOX2) and the mature neuronal marker NF200. The nuclear, cytoplasmic, and cellular areas, as well as nuclear-to-cytoplasmic ratios, showed statistically significant differences between the identified phenotypes. **Conclusion.** Neural lineage cells were detected in the dysregulated growth plate microenvironment of Blount's disease. We hypothesize that neural crest-derived cells may contribute to the pathogenesis of knee joint defects in this context.

Keywords: Blount's disease; tibia; growth plate; chondrocytes; neural crest

Conflict of interests: the authors declare no conflict of interests.

For citation: Strokova E.L., Pakhomova N.Yu., Shevchenko A.I., Kozhevnikov V.V., Zalavina S.V., Mashak S.V., Zhukov D.V., Korytkin A.A. Phenotypic features of medial epiphyseal growth plate cells in the proximal tibia in Blount's disease. *Journal of Anatomy and Histopathology.* 2025. V. 14, №2. P. 79–87. <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2025-14-2-79-87>

Введение

Болезнь Блаунта – это нарушение роста и развития метаэпифизарного отдела большеберцовой кости, приводящее к варусной деформации нижней конечности [12, 15]. В зависимости от возраста заболевания выделяют несколько клинических форм. Инфантильная форма характеризуется ранним началом, до 4 лет, ювенильная – проявляется в возрасте от 4 до 10 лет и подростковая – начинается после 10 лет. Последние две часто объединяют в одну форму с поздним началом [13]. Этиология болезни Блаунта не установлена [12]. Относительно причин развития патологии были предложены различные гипотезы, начиная от генетической и расовой предрасположенности и заканчивая экологическими, социальными и поведенческими факторами. Однако консенсус в этом вопросе до сих пор не достигнут [4]. Определены лишь предрасполагающие факторы, такие как избыточный вес, ранняя ходьба и другие. Показана роль ожирения и в прогрессировании варусной деформации [5]. Варианты лечения заболевания определяют тяжестью искривления. Использование ортезов в качестве консервативной терапии результативно для пациентов ясельного возраста с односторонним и легким течением болезни [21]. Наиболее эффективным вариантом остается хирургическая коррекция, направленная на выравнивание длины конечностей и восстановление нормального положения сустава [8]. Оперативное лечение позволяет исправить деформацию и улучшить качество жизни больных, однако подобного рода вмешательств часто сопровождаются не только травматичностью и различными осложнениями, но и высоким процентом послеоперационных рецидивов [2]. Выявление причин болезни Блаунта откроет новые возможности в поиске новых способов диагностики и лечения данной категории пациентов.

Первым шагом в понимании механизмов развития заболевания является исследование структурных особенностей места локализации патологического процесса. Морфоло-

гическим субстратом формирования деформации являются изменения хрящевой ткани медиального отдела ростковой зоны проксимального конца большеберцовой кости. За весь период изучения болезни Блаунта анализу морфологических особенностей колленного сустава посвящены лишь единичные исследования. Морфологические исследования медиального участка зоны поражения обнаружили повреждение пластинки роста, выраженное трещинами, разломами и дезорганизацией хрящевых столбцов. Хондроциты расположены в виде неорганизованных скоплений на фоне обширного межклеточного матрикса [22]. В исследовании, проведенном в 2016 году [10], анализ гистологических данных биоптатов показал нарушение нормального окостенения в медиальной метафизарной области проксимального отдела большеберцовой кости по сравнению с нормальной структурой кортикальной и трабекулярной кости в латеральной области. Что проявляет себя с медиальной стороны наличием внутрикортикальной эндохондральной оссификации и участками, богатыми интракортикальными хондроцитами, а также множественными нерегулярными линиями роста неправильной формы. Проведенные иммуногистохимическое и иммуноцитохимическое исследования [7] образцов хрящевой ткани пациентов с болезнью Блаунта определили повышенную выработку коллагена I типа на фоне снижения выработки коллагена II типа и экспрессию связанных с минерализацией белков остеопонтина, остеонектина, тенасцина и костного сиалопротеина II типа. Выявленные изменения указывают на раннюю минерализацию внеклеточного матрикса хряща.

Таким образом, немногочисленные исследования хрящевой ткани проксимального отдела большеберцовой кости при болезни Блаунта выявили изменение пластинки роста и нарушение эндохондрального окостенения. Однако, полученные данные не дают возможности определить более подробную картину течения патологического процесса. Исследование фенотипических особенностей клеток и понимание изменений, происходящих в

области локализации патологии, даст возможность определить механизмы формирования деформации и развития заболевания.

Цель исследования – идентифицировать фенотип клеток медиальной эпифизарной пластинки проксимального отдела большеберцовой кости при болезни Блаунта.

Материал и методы исследования

Место и время проведения исследования. Исследование проведено в клинике детской ортопедии Новосибирского НИИТО в период с января 2022 г. по декабрь 2023 г.

Характеристика объекта исследования. Образцы хрящевой ткани медиальных эпифизарных пластинок проксимального отдела большеберцовой кости получены от 5 детей (4 девочек и 1 мальчика) с односторонней болезнью Блаунта III–IV степени. Средний возраст на момент операции составлял 5,4 года (от 3 до 8 лет). Основной диагноз по МКБ-10 – (M21.8) Другие уточненные приобретенные деформации конечностей. Пациентам была выполнена корригирующая остеотомия большеберцовой кости, временный гемиепифизиодез (4 левосторонних, 1 правосторонний). У всех детей деформация голени была обнаружена в 1 год и с возрастом прогрессировала. Критериями исключения в исследовании послужило наличие ожирения, аутоиммунных и неврологических патологий, метаболических, инфекционных и хромосомных заболеваний, сахарного диабета.

Способ формирования выборки – неслучайный, отбор основан на МКБ основного диагноза и критериях исключения.

Дизайн исследования. Представленные данные отражают результаты пилотного гипотезопорождающего исследования.

Методы. Метод культуры клеток. Для идентификации фенотипа клеток медиальной эпифизарной пластинки проксимального отдела большеберцовой кости образцы хрящевой ткани размером 5×8 мм в продольном направлении и высотой 1 мм отмывали в фосфатно-солевом буферном растворе Дульбекко (DPBS, ПанЭко, Россия), измельчали и помещали в раствор 1,5% коллагеназы II типа (ПанЭко, Россия). Инкубировали в течение 15–19 ч при температуре 37°C. Выделение и культивирование клеток выполняли как описано ранее [1]. Прижизненную съемку проводили на инвертированном фазово-контрастном микроскопе Zeiss Axiovert 40C (Zeiss, Германия).

Имунофлуоресцентный анализ. Клетки выращивали до 1–4 пассажей на 48-луночных планшетах и фиксировали в течение 15 мин в 4% параформальдегиде (CDH, Индия). Имунофлуоресцентный анализ осуществляли по общепринятому протоколу с пермеабиллизацией в 0,5% растворе Triton X100 (MP Biomedicals, США) в течение

15 мин и инкубацией 30 мин в 1% BSA (бычий сывороточный альбумин, HiMedia Laboratories, Индия) в DPBS (блокирующий буфер). Далее клетки в течение 20 ч при температуре 4°C окрашивали с первичными антителами: Musashi-1 (AB5977, Sigma Aldrich, США, кроличьи поликлональные, 1:200), SOX2 (ab92494, Abcam, Великобритания, кроличьи моноклональные, 1:400), PAX6 (sc-81649, Santa Cruz Biotechnology, США, мышинные моноклональные, 1:50), нейрофиламент 200 (Neurofilament 200, No142, Sigma Aldrich, США, мышинные моноклональные, 1:500), коллаген II типа (Collagen II) (ab307674, Abcam, Великобритания, кроличьи моноклональные, 1:100). Для визуализации первичных антител образцы инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с вторичными антителами: Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) cross-adsorbed (A11008), Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG1 cross-adsorbed (A21124), Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG1 cross-adsorbed (A21121) (Thermo Scientific, США, рабочее разведение – 1:400). По окончании каждого этапа инкубации с антителами клетки промывали 2 раза по 15 мин в DPBS. Для окрашивания ядер использовали DAPI (Thermo Scientific, США). Съемку проводили на инвертированном флуоресцентном микроскопе Eclipse Ti_E (Nikon, Япония) при увеличении ×200 и ×400, используя программное обеспечение NIS-Elements (Nikon, Япония). Для описания полученных результатов интенсивность свечения оценивали на основании визуальной аналоговой шкалы: (+++) – выраженное свечение, (++) – умеренное, (+) – слабое, (–) – сомнительное, (o) – отсутствие свечения.

Морфометрический анализ. После иммуноцитохимического окрашивания с помощью программы ImageJ измеряли длину отростков, площадь ядра, площадь клетки, площадь цитоплазмы, ядерно-цитоплазматическое отношение. Долю иммунопозитивного материала для каждого маркера определяли как отношение положительно окрашенных клеток к общему количеству клеток. Для каждого показателя измерения проводили в 12 полях зрения.

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов осуществляли в программе Microsoft Excel (Microsoft, США). Характер распределения оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка. Выявлено нормальное распределение данных. Показатели приведены в виде значений среднего арифметического (M) и стандартного отклонения (SD). Для сравнения между группами использовали t-критерий Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Этическая экспертиза. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна»

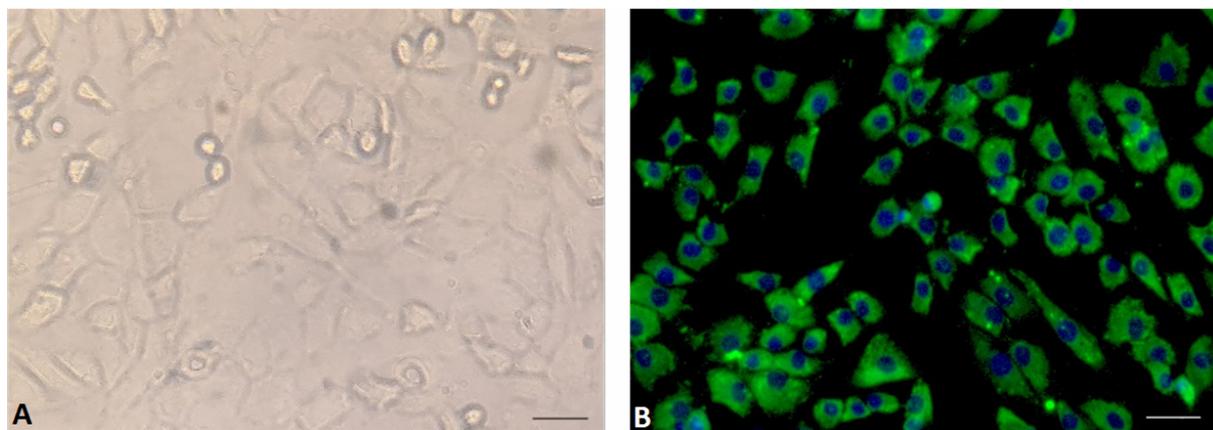


Рис. 1. Культура клеток, выделенных из медиальной эпифизарной пластинки проксимального отдела большеберцовой кости при болезни Блаунта, 2-й пассаж культивирования. А – фазовый контраст, прижизненная съемка; В – иммунофлуоресцентное окрашивание на антитела к коллагену II типа (зеленый цвет). Ядра клеток окрашены DAPI (синий), $\times 200$. Масштабный отрезок – 10 мкм.

Fig. 1. Culture of cells isolated from the medial growth plate of the proximal tibia in Blount's disease, 2nd cultivation passage. A – phase contrast life imaging; B – immunofluorescence staining for antibodies to type II collagen (green). The cell nuclei are stained with DAPI (blue), $\times 200$. Scale bar – 10 μm .

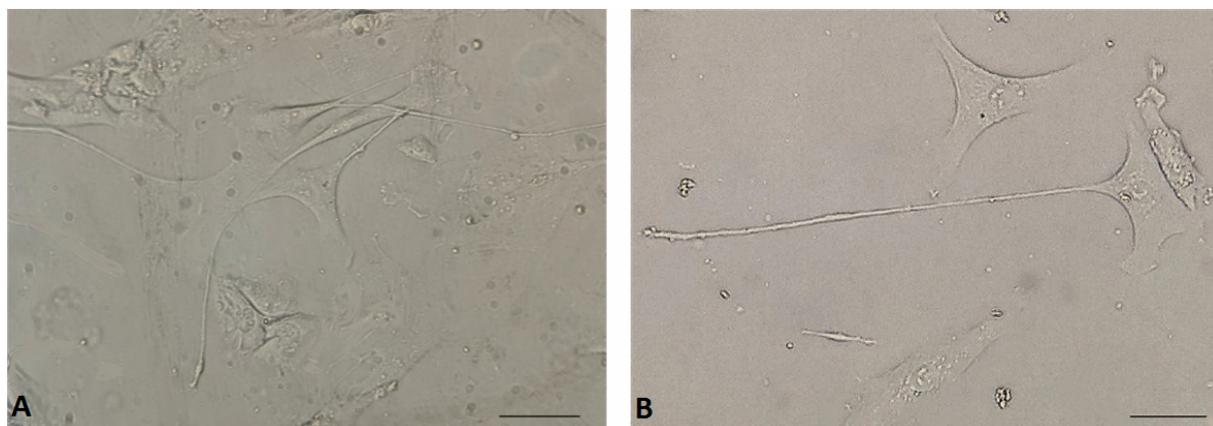


Рис. 2. Культура клеток, выделенных из медиальной эпифизарной пластинки проксимального отдела большеберцовой кости при болезни Блаунта, 2-й пассаж культивирования. Фазовый контраст, прижизненная съемка, $\times 200$ (А), $\times 400$ (В). Масштабный отрезок – 10 мкм.

Fig. 2. Culture of cells isolated from the medial growth plate of the proximal tibia in Blount's disease, 2nd passage of cultivation. Phase contrast life imaging, $\times 200$ (A), $\times 400$ (B). Scale bar – 10 μm .

Минздрава России (протокол №009/21 от 6.12.2021).

Результаты и их обсуждение

Эпифизарная пластинка (зона роста) проксимального отдела большеберцовой кости в норме представлена гиалиновым хрящом, состоящим из хондроцитов разной степени дифференцировки и межклеточного матрикса. У всех пациентов, включенных в исследование, большинство клеток, выделенных из пластинки роста большеберцовой кости при болезни Блаунта, формировали монослой. Прижизненная съемка показала, что с 1-го по 4-й пассажи преобладали клетки полигональной и округлой формы, морфологически соответствующие хондробластам и хондроцитам (рис. 1А).

По центру клетки или эксцентрично вблизи плазмалеммы располагалось крупное ядро округлой или овальной формы, содержащее 1–2 ядрышка. Иммунофлуоресцент-

ный анализ выявил позитивное окрашивание клеток данного фенотипа на основной структурный белок межклеточного матрикса гиалинового хряща – коллаген II типа. Коллагеновые волокна II типа в комплексе с протеогликанами составляют межклеточное вещество гиалинового хряща [14]. Интенсивность свечения на коллаген II типа была умеренная в большинстве хондроцитов (++) , в отдельных клетках отмечалась выраженная (+++) экспрессия. Средне- и мелкогранулярный иммунопозитивный материал равномерно распределялся по цитоплазме (рис. 1В).

У детей с односторонней болезнью Блаунта III–IV степени в пластинках роста среди клеток хондрогенного ряда, формирующих монослой, определялись единичные клетки иного фенотипа с двумя или несколькими длинными отростками (рис. 2А, В). Эти клетки располагались отдельно от хондробластов и хондроцитов и не контактировали с последними. Прижизненная съемка выявила увеличение количества указанных клеток с 1-го по

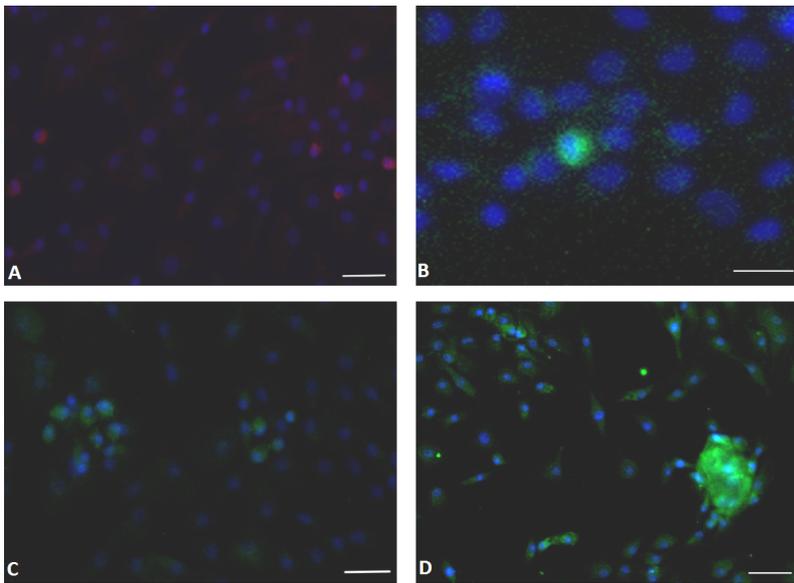


Рис. 3. Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к PAX6 (А, красный цвет), SOX2 (В, зеленый цвет) в ядрах и к Musashi 1 (С, D, зеленый) в цитоплазме клеток пластинки роста большеберцовой кости при болезни Блаунта. Ядра клеток окрашены DAPI (синий). 3-й пассаж культивирования, $\times 200$ (А, С, D), $\times 400$ (В). Масштабный отрезок 10 – мкм.

Fig. 3. Immunofluorescence staining with antibodies to PAX6 (A, red), SOX2 (B, green) in nuclei and to Musashi 1 (C, D, green) in the cytoplasm of tibial growth plate cells in Blount's disease. The cell nuclei are stained with DAPI (blue). 3rd passage of cultivation, $\times 200$ (A, C, D), $\times 400$ (B). Scale bar – 10 μm .

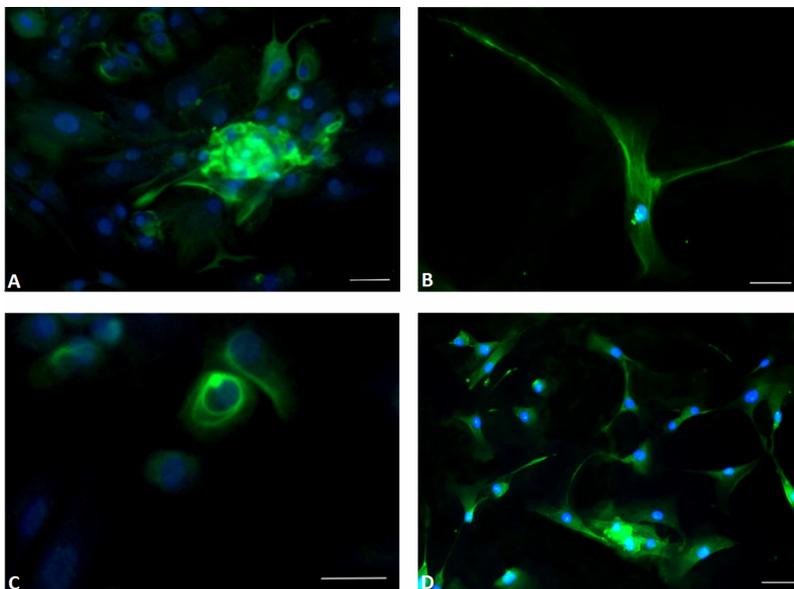


Рис. 4. Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к NF200 в цитоплазме клеток (зеленый цвет) пластинки роста большеберцовой кости при болезни Блаунта. Ядра клеток окрашены DAPI (синий цвет). 4-й пассаж культивирования, $\times 200$ (А, В, D), $\times 400$ (С). Масштабный отрезок 10 – мкм.

Fig. 4. Immunofluorescence staining with antibodies to NF200 in the cytoplasm of cells (green) of the tibial growth plate in Blount's disease. The cell nuclei are stained with DAPI (blue). 4th passage of cultivation, $\times 200$ (A, B, D), $\times 400$ (C). Scale bar – 10 μm .

4-й пассаж и появление контактов «тело–тело», «тело–отросток», «отросток–отросток» между клетками и формирование сети на более поздних пассажах. В центральной части клеток биполярной и мультиполярной формы визуализировалось круглое ядро с 1–2 ядрышками (рис. 2А, В). Морфология клеток позволила сделать предположение об их нейральном происхождении.

Для установления природы клеток иного фенотипа, отличного от хондробластов, проведено флуоресцентное исследование на ранние и поздние нейральные маркеры. Во всех четырех пассажах выявлено позитивное окрашивание клеток на антитела к Рахб. Иммунопозитивный крупно- и среднегранулярный материал визуализировался в ядрах единичных клеток. Наблюдалась умеренная (++) интенсивность свечения (рис. 3А). В окружающих клетках положительная реакция на данный маркер не детектирована. Стоит напомнить, что Рахб представляет собой многофункциональный регулятор нейрогенеза в

эмбриональном и постнатальном периоде. Фактор транскрипции Рахб действует на молекулярном уровне при передаче сигналов и имеет решающее значение в развитии центральной нервной системы, включая формирование нейронных цепей, структуры нервной трубки и миграцию нейронов. Белок Рахб играет значимую роль в дифференцировке нейронов, в формировании компонентов нервной ткани и обеспечивает успешное осуществление процессов нейрогенеза [6, 18].

Иммуноцитохимическим методом в отдельных клетках обнаружена также экспрессия другого белка – SOX2. Крупногранулярный иммунопозитивный материал с небольшим количеством средне- и мелкогранулярных включений с выраженной (+++) и умеренной (++) интенсивностью свечения присутствовал в ядерной области единичных клеток (рис. 3В). SOX2 является одним из самых ранних известных факторов транскрипции, экспрессирующихся в клетках-предшественниках развивающейся центральной

Таблица 1 / Table 1

Сравнение длины отростков у клеток нейрального фенотипа на разных пассажах культивирования, (Mean±SD; min–max)
Comparison of process lengths in cells of the neural phenotype at different culture passages, (Mean±SD; min–max)

Показатель	2-й пассаж культивирования	4-й пассаж культивирования
Длина отростка, мкм	23,73±4,07 (15,9–38,2)	29,59±6,06* (17,9–51,1)

Примечание: * – $p < 0,05$, при сравнении между группами.

нервной системы и в эмбриональных нервных стволовых клетках. Важнейшая роль SOX2 состоит в переключении развития нейронов путем подавления их дифференцировки и сохранения возможности нервным клеткам оставаться в недифференцированном состоянии [3, 9].

В клетках нейрального фенотипа исследована экспрессия нейронного РНК-связывающего белка Musashi-1, который, как и SOX2, относится к маркерам нервного гребня [6, 11]. Musashi играет значимую роль в развитии нервной системы, контролирует судьбу нервных клеток, поддерживает состояние стволовых клеток, их дифференцировку, самообновление, подавляя трансляцию определенных мРНК. Musashi-1 (Msi-1) экспрессируется преимущественно в нервной системе, в эмбриональных и взрослых нервных стволовых клетках [16, 17]. Иммуноцитохимический анализ на антитела к Musashi-1 выявил группы иммунопозитивных клеток округлой, треугольной и веретеновидной формы при отсутствии положительной реакции в окружающих клетках (рис. 3С). Крупногранулярный материал распределялся по цитоплазме равномерно, интенсивность флуоресценции была умеренной (++) и слабой (+) в большинстве окрашенных клеток и сомнительной в единичных клетках (-/+). Визуально выявляемое слияние цитоплазматического свечения свидетельствовало о том, что клетки данного фенотипа соединялись в комплексы из нескольких клеток до более крупных конгломератов неправильной формы с неравномерным свечением (рис. 3D). Отмечалась выраженная яркость (+++) удлинённых тяжей при слабой интенсивности (+) окружающего мелкогранулярного материала.

Флуоресцентное исследование клеток, выделенных из пластинки роста большеберцовой кости при болезни Блаунта, выполнено на поздний нейральный маркер нейрофиламент 200 (NF200). Среди клеток с отрицательной реакцией на окрашивание визуализировались NF200-позитивные клетки овальной, треугольной и веретеновидной формы с отростками (рис. 4А-Д). Длина отростков на 4-м пассаже была статистически значимо выше по сравнению со 2-м пассажем (табл. 1).

Интенсивность свечения варьировала в клетках от выраженной (+++) до умеренной (++) на фоне отсутствия свечения в окружаю-

щих клетках. Преобладал мелкогранулярный иммунопозитивный материал с цитоплазматическими включениями в отдельных клетках в виде длинных тонких нитей вдоль цитоплазматической мембраны, вокруг ядра и в отростках. Как и в реакции с Musashi-1, исследованием на NF200 детектированы конгломераты неопределённой формы, состоящие из клеток с неравномерным свечением (рис. 4А). Нейрофиламент 200 представляет собой нитевидное образование в теле и отростках нейрона диаметром около 10 нм и молекулярной массой 200 кДа, состоящее из белка. NF200 относится к группе промежуточных филаментов IV типа, являющихся ключевыми составляющими цитоскелета нейронов. Нейрофиламент 200 – маркер зрелых нейронов, экспрессируется в нейрональных клетках и необходим для аксонального транспорта [19, 20].

Морфометрический анализ клеток нейрального фенотипа выявил различия в проценте окрашенных клеток в зависимости от исследуемого маркера. На 2-м пассаже культивирования доля флуоресцирующих клеток для транскрипционных факторов SOX2 и Pax6 составила менее 2% (1,7 и 1,1% соответственно) и практически не изменялась с увеличением пассажей (1,6% для SOX2, 1,3% для Pax6). Сохранялась на прежнем уровне и доля позитивных клеток для маркера Musashi-1, на 2-м пассаже она составляла 3,5%, а на 4-м – 4,2%. Для маркера NF200 с увеличением пассажа регистрировалось увеличение доли положительно окрашенных клеток более чем в 2 раза – с 5,7 до 12,2%.

Сравнение морфометрических характеристик клеток хондрогенного ряда и клеток нейрального фенотипа на 4-м пассаже культивирования выявило различия всех исследуемых параметров (табл. 2). В клетках, позитивно окрашивающихся на нейральные маркеры, площадь ядра, цитоплазмы и клетки были статистически значимо меньше по сравнению аналогичными показателями в клетках хондроцитов. Ядерно-цитоплазматическое отношение в исследуемых группах также обнаружилось статистически значимые различия ($p < 0,05$).

Проведенное исследование свидетельствует о наличии двух типов клеток, выделенных из медиальной эпифизарной пластинки проксимального отдела большеберцовой кости при болезни Блаунта. Первый тип иденти-

Таблица 2/ Table 2

Сравнение морфометрических показателей клеток хондрогенного ряда и клеток нейрального фенотипа, (Mean±SD)
Comparison of morphometric parameters of chondrogenic cells and cells of neural phenotype, (Mean±SD)

Группы сравнения	Площадь ядра, мкм ²	Площадь цитоплазмы, мкм ²	Площадь клетки, мкм ²	Ядерно-цитоплазматическое отношение
Клетки хондрогенного ряда	31,16±3,05	104,37±11,32	135,53±12,17	0,298±0,05
Клетки нейрального фенотипа	7,35±0,98*	38,37±4,36*	45,72±5,53*	0,191±0,09*

Примечание: * – $p < 0,05$, при сравнении между группами.

фицирован как клетки хондрогенного ряда, представленного хондроцитами разной степени дифференцировки. Полученные данные подтверждаются прижизненной съемкой и позитивным иммунофлуоресцентным окрашиванием на маркер хрящевой ткани – коллаген II типа и отрицательной реакцией на нейральные маркеры. Второй тип составили отростчатые фенотипически нейроноподобные клетки, положительно окрашивающиеся на ранние нейральные маркеры Musashi-1, PAX6 и SOX2, а также маркер зрелых нейральных клеток NF200. Количество позитивных клеток на нейрофиламент 200 увеличилось от 2-го к 4-му пассажу культивирования. На выявление клеток двух фенотипов указывают морфометрические показатели. Площади ядра, цитоплазмы, клетки, а также ядерно-цитоплазматическое отношение достоверно различались в описанных типах клеток. Полученные данные идентичны у всех пациентов с односторонней болезнью Блаунта III–IV степени, включенных в исследование.

Представленные результаты показывают, что в эпифизарной пластинке большеберцовой кости при болезни Блаунта присутствуют клетки нейрального фенотипа. В норме гиалиновый хрящ, формирующий пластинку роста, лишен нервной ткани. Возникает вопрос: каким образом нервные клетки могли оказаться в хрящевой ткани? Для объяснения данного феномена нами предложена гипотеза о роли клеток нервного гребня в индуцировании патологии коленных суставов. Суть которой состоит в следующем: в эмбриональном периоде возникающее нарушение миграции стволовой популяции клеток нервного гребня вызывает их частичное депонирование в зачатках нижних конечностей, являющихся основой для развития малоберцовой и большеберцовой костей. Эктопическая локализация мигрирующих клеток из туловищного отдела эмбриона, не способных дифференцироваться в хрящ, приводит к изменению нормального хондрогенеза. В результате в пластинке роста большеберцовой кости при болезни Блаунта происходит дезорганизация структурных компонентов на фоне обширного межклеточного матрикса [22]. Возникшие в эмбриогенезе нарушения обуславливают патологические процессы в хрящевой ткани в постнатальном

периоде и приводят к деформации коленных суставов.

Заключение

Болезнь Блаунта – тяжелая патология нижних конечностей, требующая в большинстве случаев хирургической коррекции. Этиология заболевания неизвестна. Первым шагом в понимании механизмов развития варусной деформации нижних конечностей является исследование структурных особенностей места локализации патологического процесса. Проведенное исследование свидетельствует о том, что в медиальных эпифизарных пластинках проксимального отдела большеберцовой кости при болезни Блаунта присутствуют клетки двух разных фенотипов. Первый тип – хондроциты разной степени дифференцировки. Второй тип представлен нейроноподобными клетками с двумя или несколькими длинными отростками. Методом иммунофлуоресценции выявлено позитивное окрашивание клеток данного фенотипа на ранние нейральные маркеры: Musashi-1, локализованный в цитоплазме и PAX6, SOX2, визуализирующиеся в ядрах клеток, и маркер зрелых нейральных клеток NF200, детектированный в цитоплазме и отростках. Морфометрические характеристики описанных типов клеток имеют статистически значимые различия. Наличие клеток нейрального генеза в хрящевой ткани большеберцовой кости при болезни Блаунта, с нашей точки зрения, объясняется нарушением миграции клеток нервного гребня. Их частичное депонирование в зачатках нижних конечностей в эмбриогенезе вызывает патологию хрящевой ткани в постнатальном периоде и развитие деформации коленных суставов.

Список источников/ References

1. Строкова Е.Л., Пахомова Н.Ю., Шевченко А.И., Корыткин А.А., Кожевников В.В., Зайдман А.М. Фенотипические особенности клеток реберного хряща при воронкообразной деформации грудной клетки. Сибирский научный медицинский журнал. 2023;43(6):197–203. doi: 10.18699/SSMJ20230624. Strokovaya E.L., Pakhomova N.Yu., Shevchenko A.I., Korytkin A.A., Kozhevnikov V.V., Zaidman A.M. Fenotipicheskie

- osobnosti kletok rebernega khryashcha pri voronkoobraznoi deformatsii grudnoi kletki. Sibirskii nauchnyi meditsinskii zhurnal. 2023;43(6):197–203. (In Russ.). doi: 10.18699/SSMJ20230624.
2. Adulkasem N, Wongcharoenwatana J, Ariyawatkul T, Chotigavanichaya C, Eamsobhana P. A Predictive Score for Infantile Blount Disease Recurrence After Tibial Osteotomy. *J Pediatr Orthop.* 2023 Apr 1;43(4): 299–304. doi: 10.1097/BPO.0000000000002345.
 3. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 2003 Jan 1;17(1):126–40. doi: 10.1101/gad.224503.
 4. Banwarie RR, Hollman F, Meijs N, Arts JJ, Vroemen P, Moh P, et al. Insight into the possible aetiologies of Blount's disease: a systematic review of the literature. *J Pediatr Orthop B.* 2020 Jul;29(4):323–36. doi: 10.1097/BPB.0000000000000677.
 5. Benes G, Ghanem D, Badin D, Greenberg M, Honcharuk E. The Effect of Socioeconomic Deprivation on Radiographic Deformities in Children With Blount Disease. *J Pediatr Orthop.* 2024 Apr 1;44(4):254–9. doi: 10.1097/BPO.0000000000002608.
 6. Chen SY, Cheng AMS, Zhang Y, Zhu YT, He H, Mahabole M, et al. Pax 6 Controls Neural Crest Potential of Limbal Niche Cells to Support Self-Renewal of Limbal Epithelial Stem Cells. *Sci Rep.* 2019 Jul 5;9(1):9763. doi: 10.1038/s41598-019-45100-7.
 7. Cigala F, Montagnani S, D'Anna M, Di Meglio F, Cigala M, Del Gaizo C. Immunohistochemical and immunocytochemical findings in Blount's disease. *J Orthopaed Traumatol.* 2003;4:84–9. doi: 10.1007/s10195-003-0015-4.
 8. De Pablos J, Arbeloa-Gutierrez L, Arenas-Miquelez A. Update on treatment of adolescent Blount disease. *Curr Opin Pediatr.* 2018 Feb;30(1):71–7. doi: 10.1097/MOP.0000000000000569.
 9. Ferri AL, Cavallaro M, Braida D, Di Cristofano A, Canta A, Vezzani A, et al. Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development.* 2004 Aug;131(15):3805–19. doi: 10.1242/dev.01204.
 10. Hollman F, Korpisah J, Ismail AH, Rompa P, Moh P, van Rhijn LW, et al. W/M serrated osteotomy for infantile Blount's disease in Ghana: Short-term results. *Niger J Clin Pract.* 2016 Jul-Aug;19(4):443–8. Doi: 10.4103/1119-3077.183305.
 11. Jandial R, Singec I, Ames CP, Snyder EY. Genetic modification of neural stem cells. *Mol Ther.* 2008 Mar;16(3):450–7. doi: 10.1038/sj.mt.6300402
 12. Janoyer M. Blount disease. *Orthop Traumatol Surg Res.* 2019 Feb;105(1S):111–21. doi: 10.1016/j.otsr.2018.01.009.
 13. Klyce W, Badin D, Gandhi JS, Lee RJ, Horn BD, Honcharuk E. Racial differences in late-onset Blount disease. *J Child Orthop.* 2022 Jun;16(3):161–6. Doi: 10.1177/18632521221091501.
 14. Luo Y, Sinkeviciute D, He Y, Karsdal M, Henrotin Y, Mobasher A, et al. The minor collagens in articular cartilage. *Protein Cell.* 2017 Aug;8(8):560–72. doi: 10.1007/s13238-017-0377-7.
 15. Miraj F, Ajiantoro, Arya Mahendra Karda IW. Step cut V osteotomy for acute correction in Blount's disease treatment: A case series. *Int J Surg Case Rep.* 2019 Apr 6;58:57–62. doi: 10.1016/j.ijscr.2019.03.044.
 16. Okano H, Imai T, Okabe M. Musashi: a translational regulator of cell fate. *J Cell Sci.* 2002 Apr 1;115(Pt 7):1355–9. doi: 10.1242/jcs.115.7.1355.
 17. Okano H, Kawahara H, Toriya M, Nakao K, Shibata S, Imai T. Function of RNA-binding protein Musashi-1 in stem cells. *Exp Cell Res.* 2005 Jun 10;306(2):349–56. doi: 10.1016/j.yexcr.2005.02.021.
 18. Osumi N, Shinohara H, Numayama-Tsuruta K, Maekawa M. Concise review: Pax6 transcription factor contributes to both embryonic and adult neurogenesis as a multifunctional regulator. *Stem Cells.* 2008 Jul;26(7):1663–72. doi: 10.1634/stemcells.2007-0884.
 19. Pelegri NG, Gorrie CA, Santos J. Rat Hippocampal Neural Stem Cell Modulation Using PDGF, VEGF, PDGF/VEGF, and BDNF. *Stem Cells Int.* 2019 Mar 18;2019:4978917. doi: 10.1155/2019/4978917.
 20. Porseva VV, Smirnova VP, Korzina MB, Emanuilov AI, Masliukov PM. Age-associated changes in sympathetic neurons containing neurofilament 200 kDa during chemical deafferentation. *Bull Exp Biol Med.* 2013 Jun;155(2):268–71. doi: 10.1007/s10517-013-2129-x.
 21. Sabharwal S, Sabharwal S. Treatment of Infantile Blount Disease: An Update. *J Pediatr Orthop.* 2017 Sep;37 Suppl 2:26–31. doi: 10.1097/BPO.0000000000001027.
 22. Wenger DR, Mickelson M, Maynard JA. The evolution and histopathology of adolescent tibia vara. *J Pediatr Orthop.* 1984 Jan;4(1):78–88. doi: 10.1097/01241398-198401000-00016

Информация об авторах

✉ Строчкова Елена Леонидовна – канд. биол. наук, старший научный сотрудник научно-исследовательского отдела организации научных исследований; Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна; ул. Фрунзе, 17, Новосибирск, 630091; estrokova-1985-10-14@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5789-6982>
 SPIN 7647-1088

Пахомова Наталья Юрьевна – канд. мед. наук, доцент, ведущий научный сотрудник научно-исследовательского отдела организации научных исследований; Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна; ssi-proekt@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9575-4096>
 SPIN 1340-3340

Information about the authors

✉ Elena L. Strokova – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Research Department of Scientific Research Organization; Y.L. Tsiyvan Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics; ul. Frunze, 17, Novosibirsk, 630091
estrokova-1985-10-14@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5789-6982>
 SPIN 7647-1088

Natal'ya Yu. Pakhomova – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Leading Researcher Research Department of Scientific Research Organization; Y.L. Tsiyvan Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics; ssi-proekt@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9575-4096>
 SPIN 1340-3340

Шевченко Александр Игоревич – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории эпигенетики развития; Институт цитологии и генетики;
epigene@bionet.nsc.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6535-1627>
SPIN 6965-8607

Кожевников Вадим Витальевич – канд. мед. наук, зав. отделением детской ортопедии; Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна; vadim-barnaul@bk.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2556-3347>
SPIN 5097-0039

Залавина Светлана Васильевна – д-р. мед. наук, доцент, зав. кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии; Новосибирский государственный медицинский университет; zalavinasv@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3405-5993>
SPIN 8950-8517

Машак Светлана Владимировна – д-р. мед. наук, профессор, профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии; Новосибирский государственный медицинский университет; svetlana_mashak@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0008-4290-1938>
SPIN 2950-2765

Жуков Дмитрий Викторович – д-р. мед. наук, доцент, доцент кафедры травматологии и ортопедии; Новосибирский государственный медицинский университет; zhukdvzhukov@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4334-217X>
SPIN 1425-6403

Корыткин Андрей Александрович – канд. мед. наук, доцент, директор; Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна; niito@niito.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9231-5891>
SPIN 2273-2241

Aleksandr I. Shevchenko – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher of Developmental Epigenetics Laboratory; Institute of Cytology and Genetics;
epigene@bionet.nsc.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6535-1627>
SPIN 6965-8607

Vadim V. Kozhevnikov – Cand. Sci. (Med.), Head of Pediatric Orthopedics Department; Y.L. Tsivyan Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics;
vadim-barnaul@bk.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2556-3347>
SPIN 5097-0039

Svetlana V. Zalavina – Doct. Sci. (Med.), Associate Professor, Head of Histology, Embryology and Cytology Department; Novosibirsk State Medical University;
zalavinasv@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3405-5993>
SPIN 8950-8517

Svetlana V. Mashak – Doct. Sci. (Med.), Professor of Histology, Embryology and Cytology Department; Novosibirsk State Medical University;
svetlana_mashak@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0008-4290-1938>
SPIN 2950-2765

Dmitrii V. Zhukov – Doct. Sci. (Med.), Associate Professor of Traumatology and Orthopedics Department; Novosibirsk State Medical University;
zhukdvzhukov@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4334-217X>
SPIN 1425-6403

Andrei A. Korytkin – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Head of Y.L. Tsivyan Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics;
niito@niito.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9231-5891>
SPIN 2273-2241

Статья поступила в редакцию 12.12.2024; одобрена после рецензирования 2.06.2025; принята к публикации 30.06.2025.
Submitted 12.12.2024; Revised 2.06.2025; Accepted 30.06.2025.