

СПОСОБ МОДЕЛИРОВАНИЯ БОЛЕЗНИ БЛАУНТА НА КУРИНОМ ЭМБРИОНЕ

Строкова Е.Л.¹, Пахомова Н.Ю.¹, Черноловская Е.Л.², Корыткин А.А.¹,
Кожевников В.В.¹, Жуков Д.В.³, Гутт А.А.¹, Зайдман А.М.¹

¹ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, e-mail: estrokhova-1985-10-14@mail.ru;

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск;

³ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск

Болезнь Блаунта – прогрессирующая варусная деформация коленных суставов с неустановленной этиологией. Одним из главных препятствий в понимании механизмов развития заболевания является отсутствие экспериментальной модели. Цель исследования: создать модель болезни Блаунта на экспериментальном животном путем ингибирования экспрессии *PAX3* гена интерферирующей siРНК. Моделирование болезни Блаунта основано на гипотезе о роли клеток нервного гребня в индуцировании ортопедической патологии. Материалы и методы. Активность подобранной последовательности siРНК к гену *PAX3* определена на фибробластах эмбриона курицы. Эксперимент по созданию модели болезни Блаунта проводился на куриных эмбрионах. В работу было включено 40 оплодотворенных яиц. Результаты и обсуждение. У экспериментального животного смоделирована болезнь Блаунта. В результате ингибирования экспрессии *PAX3* гена интерферирующей siРНК у куриного эмбриона на начальных этапах формирования почек нижних конечностей (53 часа эмбриогенеза, 16-я стадия эмбрионального развития по классификации Гамбургера и Гамильтона) у цыпленка в постнатальном периоде диагностирована варусная деформация коленных суставов. Заключение. Модель болезни Блаунта получена в эксперименте посредством снижения активности *PAX3* гена. Проведенный эксперимент является пилотным. Исследование продолжается.

Ключевые слова: болезнь Блаунта, экспериментальная модель, интерферирующая siРНК, нервный гребень.

A METHOD FOR MODELING BLOUNT'S DISEASE ON A CHICKEN EMBRYO

Strokhova E.L.¹, Pakhomova N.Yu.¹, Chernolovskaya E.L.², Korytkin A.A.¹, Kozhevnikov V.V.¹,
Zhukov D.V.³, Gutt A.A.¹, Zaidman A.M.¹

¹Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics n.a. Ya.L. Tsivyan, Novosibirsk, e-mail: estrokhova-1985-10-14@mail.ru;

²Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk;

³Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk

Blount's disease is a progressive varus deformity of the knee joints with an unidentified etiology. One of the main obstacles in understanding the mechanisms of disease development is the lack of an experimental model. Objective: to create a model of Blount's disease in an experimental animal by inhibiting the expression of the *PAX3* gene of interfering siRNA. Modeling of Blount's disease is based on the hypothesis of the role of neural crest cells in inducing orthopedic pathology. Materials and methods. The activity of the selected siRNA sequence to the *PAX3* gene was determined on chicken embryo fibroblasts. The experiment to create a model of Blount's disease was conducted on chicken embryos. 40 fertilized eggs were included in the work. Results and discussion. The experimental animal has simulated Blount's disease. As a result of inhibition of the expression of the *PAX3* gene of interfering siRNA in a chicken embryo at the initial stages of lower limb kidney formation (53 hours of embryogenesis, stage 16 of embryonic development according to the Hamburger and Hamilton classification), varus deformity of the knee joints was diagnosed in a chicken in the postnatal period. Conclusion. A model of Blount's disease was obtained experimentally by reducing the activity of the *PAX3* gene. The conducted experiment is a pilot one. The research is ongoing.

Keywords: Blount's disease, experimental model, interfering siRNA, neural crest.

Болезнь Блаунта – тяжелая патология опорно-двигательного аппарата у детей, представленная варусной деформацией коленных суставов [1; 2]. В зависимости от формы

(ранняя или поздняя) заболевание выявляется в 3-4-летнем возрасте либо в подростковый период [3]. При отсутствии своевременного лечения происходит прогрессирование деформации вплоть до формирования ранних дегенеративных изменений. Наиболее эффективным вариантом лечения является хирургическая коррекция [4]. Этиология болезни Блаунта не известна [1; 4]. В качестве причин, способствующих возникновению деформации, рассмотрены ранняя ходьба, ожирение, дефицит витамина D, расовая принадлежность, генетическая предрасположенность и другие [1; 4; 5]. Одним из главных препятствий к пониманию механизмов развития болезни Блаунта является отсутствие экспериментальной модели. В научной литературе экспериментальная модель данного заболевания не представлена. Моделирование варусной деформации коленных суставов позволит достичь значительных результатов в понимании этиологии и патогенеза формирующегося нарушения.

Создание модели болезни Блаунта основано на гипотезе о роли клеток нервного гребня в индуцировании ортопедической патологии [6]. Рассматриваемый способ моделирования предполагает формирование варусной деформации коленных суставов у экспериментальных животных путем ингибирования экспрессии *PAX3* гена siРНК [7]. Малые интерферирующие РНК (siРНК) относятся к классу двухцепочечных РНК, длиной от 20 до 25 нуклеотидов, действующих в наномолярных концентрациях и способных избирательно подавлять экспрессию определенных генов [8]. Для моделирования ортопедических заболеваний человека наиболее подходящим объектом исследования выступают двуногие животные. Модели на курах, относящихся к двуногим животным, наиболее точно имитируют вертикальное положение тела и подвержены силам гравитации, аналогичным действующим на человека. Ключевым фактором планирования эксперимента на курином эмбрионе явилось то, что эмбриогенез цыпленка хорошо изучен и аналогичен развитию эмбриона человека [9].

Цель исследования: создать модель болезни Блаунта на экспериментальном животном путем ингибирования экспрессии *PAX3* гена интерферирующей siРНК.

Материал и методы исследования. Проведение исследования одобрено Локальным этическим комитетом ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России (выписка 023/21 из протокола № 009/21 от 06.12.2021).

Подбор и синтез последовательности малой интерферирующей РНК (siРНК), направленной на мРНК гена *PAX3*, выполняли как описано ранее [7]. В исследовании использовалась siРНК к гену *PAX3* (NM_204269.1): смысловая нить 5'-X-GCUmAGAUCmACmAUmGAAGAGUUU-3', антисмысловая 5'-ACUCUUCmAUmGUmGAUCUmAGCUU-3', где Cm, Um – 2'-О-метильные аналоги цитидина и уридина, соответственно, а X – остаток холестерина, присоединенный аминокетильным линкером (n=6). Контрольную siРНК (Ch-siScr), не имеющую значимой гомологии с известными

последовательностями мРНК курицы и человека, применяли для определения специфичности действия siРНК: смысловая нить 5'-X-CCmACUmACmAUmACGA GACUUGUU-3', антисмысловая 5'-CmAAGUCUCGUmAUmGUmAGUGGUU-3' [7]. Последовательности siРНК, направленных к гену *PAX3*, и контрольной siРНК использовали для конструирования холестеринсодержащих конъюгатов, обеспечивающих доставку siРНК в клетки-мишени. 5'-холестериновые конъюгаты siРНК (Ch-siPAX) и Ch-siScr были получены как описано ранее [10]. Дуплексы siРНК с конечной концентрацией 50 мМ хранили при -20 °С.

В культуре фибробластов кур по способности подавлять экспрессию гена-мишени была определена биологическая активность Ch-siPAX и контрольной siРНК. Фибробласты цыпленка выделяли из 8-11-дневных куриных эмбрионов и культивировали в среде DMEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) и антибиотика стрептомицин – пенициллин (100 мг/мл) в условиях CO₂ инкубатора при температуре 37 °С. Для эксперимента эмбриональные фибробласты куриц высевали в 24-луночные планшеты с плотностью 5×10^5 клеток на лунку. Через 24 ч питательную среду заменяли свежей DMEM, не содержащей сыворотки (200 мкл/лунка). Ch-siPAX и контрольную siРНК (Ch-siScr) добавляли к клеткам в 50 мкл Opti-Mem до конечной концентрации 5 µМ. Альтернативно, клетки трансфицировали siРНК (200 нМ) с использованием Липофектамина 2000 (Lipofectamine 2000, Invitrogen, США, (siPAX+Lf)) согласно рекомендациям производителя (1 мкл на лунку). Через три дня после трансфекции из клеток выделяли суммарную РНК с использованием Trizol (Thermo Fisher Scientific, США). Реакцию обратной транскрипции (RT) проводили с использованием набора RT2 First Strand (QIAGEN, Германия) в соответствии с протоколом производителя. Полученную кДНК амплифицировали на термоциклере iCycler IQ5 (Bio-Rad, США) в реакционной смеси объемом 25 мкл, содержащей 5 мкл кДНК, 0,25 µМ специфические праймеры (*PAX3* прямой 5'-ТААССАТGGTGGTGTGCCTC-3'; обратный 5'-GTGGTGCTАТАGGTСGGTGG-3') и смесь мастер-микс Biomaster HS-qPCR SYBR Blue (2×) (BioLab Mix, Россия) с ДНК-полимеразой горячего старта и флуоресцентным красителем SYBR-Green. Схема ПЦР в режиме реального времени (Real-Time PCR): один цикл 95 °С – 3 мин., 40 циклов: 95 °С – 30 с, 58 °С – 30 с, 72 °С – 30 с. Уровень мРНК *PAX3* гена определяли относительно уровня мРНК гена «домашнего хозяйства» *GAPDH* (прямой 5'-AGATGCAGGTGCTGAGTATG-3'; обратный 5'-СТGAGGGAGCTGAGATGATAAC-3'). Все измерения были выполнены в трех повторах.

Эксперимент по ингибированию *PAX3* гена проводили на яйцах кур породы Росс-308 (ROSS-308 – мясная порода бройлеров). Яйца инкубировали при температуре 37.5-38 °С и влажности 50-55% в инкубаторе БИ2 «Несушка» на 104 яйца (в соответствии с руководством по эксплуатации). Масса одного яйца составляла 60-70 г. В исследование было включено 40

оплодотворенных яиц, разделенных на 4 группы (в каждой группе 10 яиц): экспериментальная, контрольная и 2 группы сравнения. В нервную трубку куриного эмбриона вводили siРНК к мРНК гена *PAX3* (Ch-siPAX, экспериментальная группа) или siScr (Ch-siScr, контрольная группа). Для визуализации вводимого раствора использовали трипановый синий ($C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$). Первую группу сравнения составили интактные яйца, во второй группе сравнения в нервную трубку куриного эмбриона производился укол стеклянным капилляром без введения вещества. Эксперимент выполнен на куриных эмбрионах, соответствующих 16-й стадии (53 часа) эмбрионального развития цыпленка по классификации Гамбургера - Гамильтона. Все манипуляции проведены в стерильных условиях и с использованием стерильного инструментария. В ходе эксперимента яйца дезинфицировали 70% спиртом. С острого конца яйца через специальный прокол отбирали 0.5 мл белка и вырезали отверстие размером 1.5x1.0 см. После вскрытия яйца визуально контролировали развитие эмбриона, наличие сердцебиения и определяли стадию эмбрионального развития. При соответствии развития цыпленка 16-й стадии по классификации Гамбургера - Гамильтона в нервную трубку куриного эмбриона вводили siРНК к мРНК гена *PAX3* или siScr [7]. Введение веществ производили при помощи инъекторного шприца и стеклянного капилляра (Narishige Scientific Instrument Lab., Япония) под стереомикроскопом SteREO Discovery V12 (Carl Zeiss, Германия). Визуально оценивали сохранение анатомической целостности эмбриона (рис. 1).



Рис. 1. Микрофотография куриного эмбриона на 16-й стадии эмбрионального развития по Гамбургеру и Гамильтону после введения в полость нервной трубки, интерферирующей siРНК к гену PAX3. Визуализация трипановым синим, ув. х60

После проведения экспериментальных процедур для закрытия отверстия

эмпирического яйца у яйца-донора вырезали участок скорлупы овальной формы размером 2.5x2.0 см. Фиксировали вырезанный фрагмент при помощи яичного белка. Первые сутки после эксперимента яйца не подвергали какому-либо физическому воздействию, в последующие дни инкубации ротировали в соответствии с руководством по эксплуатации инкубатора и физиологией развития куриного эмбриона. Инкубацию яиц контролировали до вылупления птенцов (рис. 2).



Рис. 2. Экспериментальные яйца из экспериментальной, контрольной групп и групп сравнения в период вылупления

Вылупившимся цыплятам для исключения возможности развития ожирения были обеспечены специальные условия содержания и сбалансированное питание на основе комбикормов, соответствующих возрасту птицы и обогащенных белково-витаминными-минеральными комплексами. В 2,5 и 4 месяца животным из экспериментальной и контрольной групп и групп сравнения было проведено рентгенологическое исследование нижних конечностей на цифровой рентгенографической системе GE Discovery XR656 (США). Диагностическое обследование в более раннем возрасте не информативно в связи со значительной долей хрящевой ткани в проксимальном отделе большеберцовой кости.

Результаты исследования и их обсуждение. Для проведения эксперимента на развивающихся куриных эмбрионах эффективность и специфичность ингибирующего действия подобранной Ch-siPAX и контрольной siPНК (Ch-siScr) была определена на культуре фибробластов цыпленка (рис. 3). Через три дня после инкубации клеток с Ch-siPAX уровень экспрессии гена *PAX3* составил 50% по сравнению с уровнем экспрессии данного гена в контрольных фибробластах (Control). В контроле – без введения siPНК, экспрессия гена *PAX3* была принята за 100%. В клетках, трансфицированных siPНК с использованием Липофектамина 2000 (siPAX+Lf), уровень экспрессии гена *PAX3* соответствовал 44%. Экспрессия гена *PAX3* в клетках, инкубированных с Ch-siScr, не отличалась от контроля.

Таким образом, в фибробластах, обработанных siPНК (Ch-siPAX), уровень экспрессии

гена *PAX3* достоверно не отличался от уровня экспрессии в клетках, обработанных этой же siРНК в комплексе с Липофектаминоном (siPAX+Lf), и был ниже по сравнению с контрольными образцами. Проведенные авторами контрольные исследования показали, что применение siРНК в комплексе с Липофектаминоном при введении в нервную трубку эмбриона оказывает токсическое действие и препятствует развитию и вылуплению цыпленка, поэтому для дальнейших экспериментов была выбрана Ch-siPAX. Ch-siPAX в культуре клеток понижает уровень экспрессии гена *PAX3* на 50% без помощи трансфекционного агента и может быть использована для проведения эксперимента.

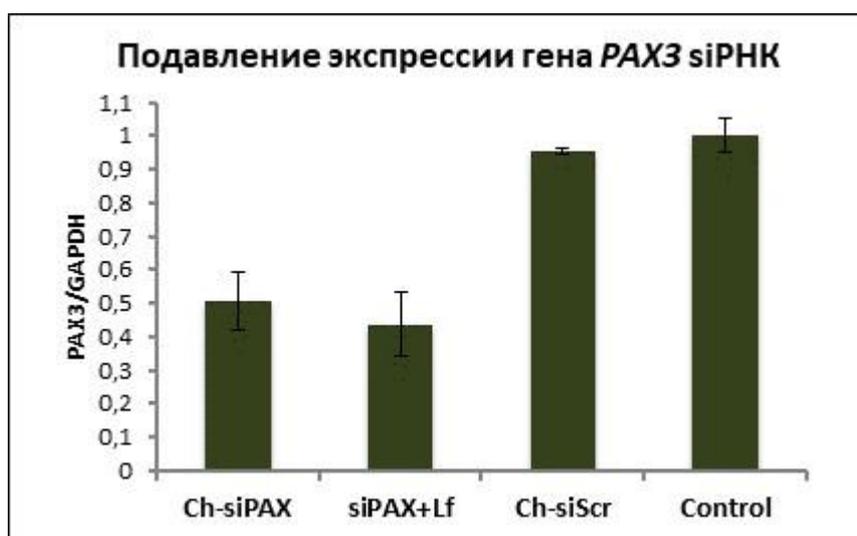


Рис. 3. Уровень экспрессии *PAX3* гена в культуре клеток куриного эмбриона. Результаты ПЦР в реальном времени в фибробластах, обработанных: siРНК к гену *PAX3* (Ch-siPAX), siРНК к гену *PAX3* вместе с Липофектаминоном (siPAX + Lf), контрольной siРНК (Ch-siScr) и необработанные клетки (Control)

Способ моделирования болезни Блаунта основан на гипотезе о роли клеток нервного гребня в индуцировании варусной деформации коленных суставов. Нервный гребень – уникальная временная структура у эмбрионов позвоночных, формирующаяся из краевых отделов нервного желобка во время его замыкания в нервную трубку [11]. Мультипотентная популяция клеток, составляющая нервный гребень, обладает мощной способностью мигрировать по всему развивающемуся эмбриону и давать начало различным структурам [12; 13]. Образование гребня происходит вдоль оси тела в соответствии с rostrocaudальным градиентом. Клетки претерпевают переход от эпителия к мезенхиме, что позволяет им свободно двигаться по определенным маршрутам, кульминацией которых является их остановка и фенотипическая дифференцировка [14]. Выделение клеток из нервного гребня и их миграция происходит волнообразно и следует непосредственно за волной сегментации

сомитов от передней к задней части тела эмбриона. Сомиты – это первые сегментированные структуры, представленные парными блоками мезодермы и расположенные по обе стороны от нервной трубки и хорды [9]. В процессе эмбрионального развития осуществляется дифференцировка каждого сомита на миотом, склеротом и дерматом, из склеротома в дальнейшем образуются хрящи и кости скелета позвоночных. Склеротом развивается из вентральной области каждого сомита. Формирование почек нижних конечностей происходит на уровне 26-32 пар сомитов и соответствует 16-й и 17-й стадиям эмбрионального развития по классификации Гамбургера и Гамильтона (52-64 часа эмбриогенеза) [9]. В нервном гребне в соответствии с отделами зародыша выделяют две основные популяции клеток: краниальную и стволовую (туловищный отдел эмбриона). Краниальные клетки являются плюрипотентными, образуют большое разнообразие производных и могут дифференцироваться во все основные типы клеток, включая такие виды соединительной ткани, как хрящ и кость [15]. В окончательной дифференцировке этих клеток критическую роль играет микроокружение. При пересадке краниальные клетки могут отказаться от своей предполагаемой судьбы и дифференцироваться в соответствии с новой средой. Исключением являются клетки стволового нервного гребня, не обладающие способностью формировать хрящ и кость и дающие начало нейронам и глии периферической нервной системы, меланоцитам и секреторным клеткам эндокринной системы [9; 13]. Из туловищной области эмбриона клетки нервного гребня мигрируют по трем путям: дорсолатеральному, между эктодермой и сомитами, вентромедиальному, между нервной трубкой и задним склеротомом и вентролатеральному, когда клетки движутся между сомитами и через различные части самого сомита. Таким образом, пути и конечные пункты миграции клеток туловищного отдела эмбриона находятся под критическим влиянием сигнальных молекул, присутствующих в данной ткани. Ключевым фактором миграции клеток нервного гребня является ген *PAX3*. *PAX3* посредством регуляции экспрессии *CXCR4* контролирует дифференцировку, миграцию, адгезию клеток-предшественников нервного гребня и мутации гена *PAX3* приводят к нарушению миграции движущихся клеток [12].

В результате эксперимента на курином эмбрионе на 21-е сутки инкубации из яиц вылупились жизнеспособные птенцы. В возрасте 2.5 месяцев (75 дней) и 4 месяцев (122 дня) постнатального развития всем экспериментальным животным было проведено исследование нижних конечностей на цифровой рентгенографической системе. У цыплят из первой группы сравнения, вылупившихся из интактных яиц, в результате диагностики не было детектировано каких-либо структурных нарушений тазобедренных и коленных суставов. Аналогичные данные были получены и у цыплят из второй группы сравнения, которым в нервную трубку производился укол стеклянным капилляром без введения вещества. Деформации суставов не

выявлено в 2,5 и 4 месяца постнатального развития и у цыплят из контрольной группы, которым в эмбриональном периоде в нервную трубку была произведена инъекция siScr, не имеющей значимой гомологии с известной последовательностью мРНК курицы и человека (рис. 4).



Рис. 4. Рентгенограмма цыпленка из контрольной группы без деформации нижних конечностей, 75 дней постнатального развития. Угол ММВ 108.9°, угол МДА 6.6°

У цыплят из экспериментальной группы с введением Ch-siPAX в нервную трубку куриного эмбриона на 16-й стадии эмбриогенеза по Гамбургеру и Гамильтону рентгенологическое исследование показало формирование варусной деформации коленных суставов при отсутствии изменений в тазобедренных суставах. На переднезадних скрининговых рентгенограммах детектировано расширение и смещение медиального метафиза проксимального отдела большеберцовой кости с образованием выпуклости, напоминающей клюв. Величина угла медиального метафизарного клюва (ММВ) может служить потенциальным рентгенографическим параметром при диагностике стадии болезни Блаунта [2]. По мере роста цыплят угол ММВ увеличивался. В возрасте 2,5 месяцев данный показатель составлял 115-120°, в 4 месяца повышался до 122-125°. Аналогично изменялись значения метафизарно-диафизарного угла (МДА), являющегося основой для определения болезни Блаунта [1]: от 8-10° до 11-14° в 2,5 и 4 месяца соответственно (рис. 5). Измеряемые углы у животных из контрольных групп в процессе роста цыплят не менялись, угол ММВ был равен 95-109°, МДА 5-7° (рис. 4). У всех экспериментальных животных диагностировано искривление обеих нижних конечностей, сочетающееся с нарушением походки,

переваливанием с ноги на ногу на фоне быстрой утомляемости при движении и невозможностью прохождения более 2 метров без перерыва. Ограничение движений, хромота и переломы костей не зарегистрированы. Таким образом, рентгенологическим исследованием коленных суставов детектированы изменения медиального отдела большеберцовой кости, характерные для болезни Блаунта. Полученные данные по увеличению углов MMB и MDA в процессе роста и развития цыпленка могут свидетельствовать о прогрессировании деформации.



Рис. 5. Рентгенограмма цыпленка с варусной деформацией коленных суставов, 122 дня постнатального развития. Угол MMB 124.8°, угол MDA 13.7°

Экспериментальные данные показывают, что в результате ингибирования у куриного эмбриона экспрессии гена *PAX3* интерферирующей siРНК на начальных этапах формирования почек нижних конечностей (53 часа эмбриогенеза, 16-я стадия эмбрионального развития по классификации Гамбургера и Гамильтона) в постнатальном периоде у цыпленка развивается варусная деформация коленных суставов. Механизм формирования деформации может быть представлен следующим образом. Введенная в нервную трубку siРНК приводит к снижению активности *PAX3* гена, и процесс миграции клеток нервного гребня нарушается. В 53 часа эмбриогенеза клетки, мигрирующие из туловищного отдела эмбриона и проходящие по вентролатеральному пути, оседают в той части сомита, из которой в дальнейшем развиваются анатомические структуры коленного сустава. Поскольку клетки стволовой популяции нервного гребня не способны формировать хрящ и кость, осевшие клетки не подвергаются

хондрогенной дифференцировке и вызывают нарушение роста в данной области. Нарушение роста в зоне депонирования клеток в проксимальном отделе большеберцовой кости приводит к дезорганизации хрящевых и костных структур и выражается развитием болезни Блаунта.

Таким образом, рассматриваемый способ моделирования болезни Блаунта основан на депонировании клеток нервного гребня в формирующемся склеротоме куриного эмбриона путем ингибирования экспрессии *PAX3* гена siРНК в 53 часа эмбрионального развития. Нарушения морфогенеза коленных суставов, заложенные в эмбриогенезе, в постнатальном периоде реализуются в болезнь Блаунта со всеми клиническими признаками.

Заключение. Модель болезни Блаунта получена в эксперименте путем ингибирования экспрессии *PAX3* гена интерферирующей siРНК на 16-й стадии эмбрионального развития цыпленка по классификации Гамбургера и Гамильтона в период формирования почек нижних конечностей. Проведенное исследование является пилотным. Первые результаты диагностированы рентгенологическим методом и свидетельствуют о варусной деформации коленных суставов. Экспериментальные данные позволили прийти к обоснованному выводу о роли клеток нервного гребня в развитии болезни Блаунта. Создание экспериментальной модели с запрограммированной ортопедической патологией в будущем позволит исследовать этиологический фактор и патогенетические механизмы рассматриваемого заболевания.

Список литературы

1. Janoyer M. Blount disease // Orthop Traumatol Surg Res. 2019. Vol. 105. Is. 1S. P. 111-121. DOI: 10.1016/j.otsr.2018.01.009.
2. Wongcharoenwatana J., Kaewpornawan K., Chotigavanichaya C., Eamsobhana P., Laoharajanaphand T., Musikachart P., Ariyawatkul T. Medial Metaphyseal Beak Angle as a Predictor for Langenskiöld Stage II of Blount's Disease // Orthop Surg. 2020. Vol. 12. Is. 6. P. 1703-1709. DOI: 10.1111/os.12760.
3. DMTS S., Taqi M., De Leucio A. Blount Disease. 2024. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560923/>. (дата обращения: 02.04.2024).
4. Birch J.G. Blount Disease // J. Am. Acad. Orthop. Surg. 2013. Vol. 21. Is. 7. P. 408-418. DOI: 10.5435/JAAOS-21-07-408.
5. Banwarie R.R., Hollman F., Meijjs N., Arts J.J., Vroemen P., Moh P., Staal H.M. Insight into the possible aetiologies of Blount's disease: a systematic review of the literature // J. Pediatr. Orthop. B. 2020. Vol. 29. Is. 4. P. 323-336. DOI: 10.1097/BPB.0000000000000677.
6. Zaydman A.M., Strokova E.L., Pahomova N.Y., Gusev A.F., Mikhaylovskiy M.V., Shevchenko A.I., Zaidman M.N., Shilo A.R., Subbotin V.M. Etiopathogenesis of adolescent

idiopathic scoliosis: review of the literature and new epigenetic hypothesis on altered neural crest cells migration in early embryogenesis as the key event // *Medical Hypotheses*. 2021. Vol. 151: 110585. DOI: 10.1016/j.mehy.2021.110585.

7. Строкова Е.Л., Пахомова Н.Ю., Корыткин А.А., Черноловская Е.Л., Гутт А.А., Мелешко Е.М., Шило О.В., Шило А.Р., Зайдман А.М. Способ моделирования болезни Блаунта на курином эмбрионе // Патент РФ на изобретение № 2798219 С1 от 19.06.2023. Заявка № 2022118896 от 11.07.2022.

8. Черников И.В. Влияние структуры липофильных конъюгатов малых интерферирующих РНК на их накопление в клетках и биологическую активность *in vitro* и *in vivo*: дис. ... канд.биол.наук. Новосибирск, 2019. 162 с.

9. Bellairs R., Osmond M. *The Atlas of Chick Development*. Third Edition. USA: Academic Press, 2014. 692 p.

10. Petrova N.S., Chernikov I.V., Meschaninova M.I., Dovydenko I.S., Venyaminova A.G., Zenkova M.A., Vlassov V.V., Chernolovskaya E.L. Carrier-free cellular uptake and the gene-silencing activity of the lipophilic siRNAs is strongly affected by the length of the linker between siRNA and lipophilic group // *Nucleic Acids Res*. 2012. Vol. 40. Is. 5. P. 2330-2344. DOI: 10.1093/nar/gkr1002.

11. Hall B.K. *The neural crest and neural crest cells in vertebrate development and evolution*. USA: Springer Science+Business Media, LLC, 2010. 400 p. DOI: 10.1007/978-0-387-09846-3.

12. Xu M., Li Y., Du J., Lin H., Cao S., Mao Z., Wu R., Liu M., Liu Y., Yin Q. PAX3 Promotes Cell Migration and CXCR4 Gene Expression in Neural Crest Cells // *J Mol Neurosci*. 2018. Vol. 64. P. 1-8. DOI: 10.1007/s12031-017-0995-9.

13. Etchevers H.C., Dupin E., Le Douarin N.M. The diverse neural crest: from embryology to human pathology // *Development*. 2019. Vol. 146. Is. 5. dev169821. DOI: 10.1242/dev.169821.

14. Le Douarin N.M., Kalcheim C. *The Neural Crest*. Developmental and Cell Biology Series. Second Edition. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1999. 445 p.

15. Kerosuo L., Bronner-Fraser M. What is bad in cancer is good in the embryo: importance of EMT in neural crest development // *Semin Cell Dev Biol*. 2012. Vol. 23. Is. 3. P. 320-332. DOI: 10.1016/j.semcdb.2012.03.010.