

# КЛЕТОЧНО-МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ ДЕГЕНЕРАТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ДИСКА И ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ СТРАТЕГИИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

**А.В. Новикова, Н.Г. Правдюк, Н.А. Шостак**

Кафедра факультетской терапии им. акад. А.И. Нестерова ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

**Контакты:** Анна Владимировна Новикова [anpove2008@mail.ru](mailto:anpove2008@mail.ru)

*Боль в спине — одна из основных мировых проблем здравоохранения, имеющая высокий уровень распространенности и инвалидизации больных. В большинстве случаев она ассоциирована с дегенеративным поражением позвоночника (дегенеративной болезнью диска), дорсопатией, дископатией (M51 и M53 по Международной классификации болезней 10-го пересмотра), затрагивающими все уровни межпозвоночного диска (МПД) как единого целого (цитологического, химического и биохимического) с участием биологических молекул, регулирующих гомеостаз межклеточного вещества диска (ростовых факторов, провоспалительных цитокинов, энзимов). Ключевой момент в дегидратации МПД — преобладание катаболических процессов над анаболическими вследствие изменения экспрессии генов соответствующих биологически активных молекул, явлений ангиогенеза в диске и неоиннервации структур фиброзного кольца и пульпозного ядра. Последнее обуславливает формирование и поддержание хронического болевого синдрома у пациентов.*

*Клетки, поддерживающие гомеостаз в пульпозном ядре, — хондроциты — осуществляют постоянный синтез и восстановление протеогликанов и гиалуроновой кислоты в пульпозном ядре, воспроизводя амортизирующие функции позвоночно-двигательного сегмента. Снижение активности и гибель хондроцитов в аваскулярной структуре диска представляют собой серьезную проблему с точки зрения репаративной медицины. В соответствии с концепцией взаимодействия молекулярно-клеточных механизмов МПД разрабатываются многочисленные подходы к терапии дегенеративной болезни диска, каждый из которых, воздействуя на одно из звеньев патогенеза, оказывает прямое или опосредованное влияние на репарацию МПД.*

*В статье изложены морфологические, патогенетические и генетические основы дегенеративной болезни диска, описаны основные современные стратегии биологической терапии: тканевая инженерия, применение биологически активных субстанций локально в матрице МПД, в том числе PRP-терапия (лечение «богатой тромбоцитами плазмой» — Platelet Rich Plasma), методы генной (с использованием вирусного вектора) и клеточной терапии, а также опыт локального применения генно-инженерных биологических препаратов. Большинство успешных работ представляет комбинацию клеточной и генной терапии с использованием синтезированных матриц.*

**Ключевые слова:** боль в спине, дегенеративная болезнь диска, морфология при дегенеративной болезни диска, межпозвоночный диск, провоспалительные цитокины, биологическая терапия, тканевая инженерия, генная терапия, клеточная терапия, генно-инженерная биологическая терапия, PRP-терапия

**Для цитирования:** Новикова А.В., Правдюк Н.Г., Шостак Н.А. Клеточно-молекулярные аспекты дегенеративной болезни диска и потенциальные стратегии биологической терапии. Клиницист 2020;14(1–2):42–54.

DOI: 10.17650/1818-8338-2020-14-1-2-42-54



## CELLULAR AND MOLECULAR ASPECTS OF DEGENERATIVE DISC DISEASE AND POTENTIAL STRATEGIES OF BIOLOGICAL THERAPY

**A. V. Novikova, N. G. Pravdyuk, N. A. Shostak**

Department of Faculty Therapy named after Academician A. I. Nesterov, Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 Ostrovityanova St., Moscow 117997, Russia

*Back pain is one of the main global health problems with a high level of prevalence and patients' disability. In most cases, it is associated with degenerative spine damage (degenerative disc disease), dorsopathy, discopathy (M51 and M53 according to the International Classification of Diseases, 10<sup>th</sup> revision), affecting all levels of the intervertebral disc (IVD) (cytological, chemical and biochemical) as a whole as well as biological molecules that regulate homeostasis of the disc intercellular substance (growth factors, pro-inflammatory cytokines, enzymes). A key point in IVD dehydration is that catabolic processes predominate over anabolic ones due to changed gene expression in the corresponding biologically active molecules, disc angiogenesis and neoinnervation of the structures of the fibrous ring and pulposus nucleus. The latter is responsible for chronic pain in patients.*

*Cells supporting homeostasis in nucleus pulpous, chondrocytes, continuously synthesize and restore proteoglycans and hyaluronic acid in nucleus pulpous, restoring shock-absorbing functions of the vertebral-motor segment. Decreased activity and death of chondrocytes in the avascular disc structure is a serious problem for reparative medicine. In accordance with IVD molecular-cellular mechanisms, numerous approaches to treat degenerative disc disease are being developed, each of which, influencing one of the links in the pathogenesis, has a direct or indirect effect on IVD repair.*

*The article describes morphology, pathogenesis and genetics of degenerative disc disease, as well as main modern strategies of biological therapy: tissue engineering, biologically active substances locally used in IVD matrix, including PRP therapy (Platelet Rich Plasma therapy), methods of gene (using the viral vector) and cell therapy, as well as experience in the local use of genetically engineered biological products. Most successful studies are a combination of cell and gene therapy with the use of synthesized matrices.*

**Key words:** back pain, degenerative disc disease, morphology of degenerative disc disease, intervertebral disc, pro-inflammatory cytokines, biological therapy, tissue engineering, gene therapy, cell therapy, genetic engineering biological therapy, PRP therapy

**For citation:** Novikova A. V., Pravdyuk N. G., Shostak N. A. Cellular and molecular aspects of degenerative disc disease and potential strategies of biological therapy. *Klinitsist = The Clinician* 2020;14(1–2):42–54. (In Russ.).

## Введение

Боль в спине — одна из основных мировых проблем здравоохранения, имеющая высокий уровень распространенности [1]. К формированию стойкого болевого синдрома ведут как физиологические, так и психологические факторы, включая механизмы центральной сенситизации [2]. Большинство случаев боли в спине приходится на долю дискогенной боли, в частности, из-за обширных разрушительных изменений в позвоночно-двигательном сегменте, которые в конечном итоге приводят к отсутствию движений вплоть до состояния анкилоза неаутоиммунного происхождения [3, 4]. Дискогенная боль в спине обозначает дегенерацию межпозвоночного диска (МПД) при отсутствии грыжевого выпячивания, анатомической деформации позвоночного столба и других состояний, которые могут быть явной причиной боли и инвалидизации больного [5]. Дегенеративная болезнь диска (ДБД) — хроническое расстройство с тенденцией к прогрессированию, которое ассоциируется чаще всего с болевым синдромом в спине. Несмотря на то что до сих пор нет однозначных критериев для разграничения физиологического старения диска и патологической дегенерации, термин ДБД используют и клиницисты, и патологоанатомы для обозначения дезинтеграции межклеточного матрикса диска с нарушением гомеостаза и индукцией воспалительной активности в пространстве диска [4].

## Морфология межпозвоночного диска с позиций терапевтических вмешательств

Межпозвоночный диск — уникальная анатомическая структура опорно-двигательного аппарата, не являющаяся ни истинным суставом, ни синхондрозом. Наличие гелеобразной субстанции — пульпозного ядра (ПЯ) — в центре плотно-волокнистого кольцевидного хрящевого образования — фиброзного кольца (ФК) — несет мощную амортизирующую функцию к осевым, колебательным, вращательным нагрузкам в пределах 1 позвоночно-двигательного сегмента или всего позвоночного столба [6]. Уже на стадии незначительной

дегидратации, при которой еще нет снижения высоты диска и не визуализируется уменьшение интенсивности сигнала на магнитно-резонансных изображениях, происходит первоначальная утрата «нормальной биомеханики» диска: значительно замедляется время восстановления высоты и приобретения первоначальной выпуклости поверхности МПД в сторону замыкающих пластин (ЗП) прилежащих позвонков. Даже небольшая потеря гликозаминогликанов (ГАГ) приводит к изменениям в процессе восстановления МПД [7].

Главные клетки, поддерживающие гомеостаз в ПЯ, — хондроциты. Их количество в МПД не превышает 2 %, остальное пространство занимает межклеточное вещество, представленное соединительной тканью различного качества организации и экстрацеллюлярным матриксом (ЭЦМ). Хондроциты осуществляют постоянный синтез и восстановление протеогликанов и гиалуроновой кислоты, которые обеспечивают высокую вязкость и эластичность ПЯ, обмен межмолекулярной воды (ее содержание в ПЯ достигает 80 %) [8], а также синтез коллагена 2-го типа, являющегося в интактном ПЯ единственным и незаменимым фибриллярным белком, способным противостоять компрессионным нагрузкам [6]. И хотя в ПЯ количество клеток в среднем вдвое меньше, чем в ФК, их метаболическая активность выше в несколько раз. На это оказывают влияние как биомеханические факторы, так и биохимические. Механическое давление существенно влияет на пролиферацию, дифференцировку и функциональную активность клеток МПД. Физиологический уровень нагрузок на МПД оказывает стимулирующее влияние — значительно повышается количество коллагена 2-го типа в ПЯ, но в то же время чрезмерные нагрузки угнетают пролиферацию и количество хондроцитов, приводя к деградации межклеточного матрикса.

Диск представляет собой самую большую аваскулярную структуру в теле человека. Транспорт питательных веществ в хондроциты — достаточно трудный процесс, который осуществляется путем диффузии глюкозы, лактата, сульфата и кислорода, а также конвекции

для молекул более крупного размера. Нарушение биохимического гомеостаза диска вследствие сокращения нутритивного транспорта через ЗП из капиллярной сети тела позвонка также ведет к снижению функции хондроцитов. Высокогидратированное ПЯ содержит большое количество протеогликана агрекана, который имеет отрицательный фиксированный заряд на своих сульфатированных ГАГ. Это создает высокое внутреннее давление набухания при нагрузке на диск давлением извне и поддерживает осмотическое давление в МПД [9]. В экспериментальных моделях было продемонстрировано, что гиалуроновая кислота способствует активации и биосинтезу в хондроцитах [10]. Как показали исследования, окклюзия канальцев костного слоя ЗП коррелирует с низким содержанием ГАГ в ПЯ [11]. Кальцификация ЗП и появление растворенных в межучточном веществе ионов кальция активируют фермент агреканазу, расщепляющую основную функциональную составляющую протеогликана матрикса диска, повышается соотношение кератансульфатов (с менее выраженным отрицательным зарядом) по отношению к хондроитинсульфатам, что также способствует дегидратации. Возникающая вследствие этого утечка воды из межучточного вещества замедляет диффузию питательных веществ в диск, замыкая порочный круг нарушения молекулярного обмена. Доказано, что гипоксия МПД, нарушение кислотно-основного состояния (особенно в сторону закисления среды), дефицит глюкозы в течение 3 дней угнетают анаболическую активность хондроцитов ПЯ [9].

Неоднократно было также продемонстрировано, что деградация агрекана является пусковым фактором дегенерации МПД. Она осуществляется с помощью специализированных ферментов (матриксных металлопротеиназ (ММП)) и агреканазы. Роль агрекана в здоровом диске заключается не только в сохранении гидрофильности диска, но и в подавлении роста сосудов и нервов в хрящевой ткани. В норме нервные волокна присутствуют только в наружных отделах ФК. Фрагментация протеогликанов и утрата агрекана сопровождается процессом неоиннервации как в краевых отделах ФК, так и в ПЯ. На растущих нервных волокнах обнаружены рецепторы фактора роста нервов (ФРН), который экспрессируется хондроцитами ФК и ПЯ [6].

#### **Роль воспалительных цитокинов в деградации матрикса. Молекулярный паттерн дегенерации межпозвонкового диска**

Продукты генной экспрессии, которые запускают репаративные процессы в диске или уровни экспрессии которых изменяются в зависимости от степени дегенерации диска, представляют большой интерес с точки зрения разработки биологической терапии [12].

Уменьшение содержания агрекана запускает процесс васкуляризации диска с привлечением в ткань

«доступного диска» иммунокомпетентных клеток — CD68 лимфоцитов, обладающих фагоцитирующей активностью, макрофагов и MAST-клеток. Экспрессия трансмембранных Toll-подобных рецепторов (TLRs) на хондроцитах и фибробластах позволяет идентифицировать фрагменты ЭЦМ (таких как гиалуроновая кислота и фибронектин), одновременно сенсibiliзирует их к продуктам деградации матрикса, активируя продукцию цитокинов иммунокомпетентными клетками, — так называемый ассоциированный с повреждением молекулярный паттерн. Если же выявляется деятельность анаэробных бактерий в ткани диска, то принято говорить о патогенетически ассоциированном молекулярном паттерне. В свою очередь, фактор некроза опухоли  $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ) и интерлейкин  $1\beta$  (ИЛ- $1\beta$ ) активируют ММП, усугубляя деградацию матрикса МПД, тромбоспондин и дизинтегрин [4]. В экспериментальных моделях на тканях здорового диска введение провоспалительных цитокинов в ПЯ вызывало экспрессию нейротрофинов ФРН и нейротрофического фактора мозга [13].

Связь ДБД с асептическим воспалением исследуется на протяжении последних 20 лет. Асептическое воспаление включает присутствие провоспалительных медиаторов (простагландин Е<sub>2</sub>, индуцируемой синтазы оксида азота, циклооксигеназы 2) и хемокинов (CCL2, CCL3, CCL5, CCL7, CCL8), повышающих уровень экспрессии цитокинов ФНО- $\alpha$  и ИЛ- $1\beta$ , синтезируемых клетками деградируемого МПД, а также экспрессию факторов роста фибробластов, трансформирующего фактора роста  $\beta 1$  (ТФР- $\beta 1$ ), ФРН и нейротрофического фактора мозга [4]. Сигнальными путями для активации клеток МПД являются интрацеллюлярные протеинкиназы (intracellular proteinkinases) и факторы транскрипции (NF $\kappa$ B, c-JUN, MAPK) [4]. В исследованиях было установлено, что именно хондроцитоподобные клетки ПЯ в дисках, претерпевших выраженную дегенерацию, являются источником медиаторов воспаления. Таким образом, механические сигналы, проходящие сквозь ЭЦМ, изменения осмотического давления, биохимический стресс повышают экспрессию определенных генов клеток ПЯ, ФК и ЗП как напрямую, так и опосредованно с участием широкого спектра воспалительных биомолекул.

#### **Баланс анаболических и катаболических процессов в межпозвонковом диске**

Для сохранения матрикса МПД и его функций в клетках ПЯ и ФК существует синергичный ответ на стимуляцию в физиологических и патологических условиях. Во-первых, анаболический ответ клеток регулируется генами синтеза агрекана, коллагена, бигликана, декорина и ингибиторов энзимов (тканевый ингибитор металлопротеиназы 1). В анаболической активности принимают огромное и, вероятно, определяющее участие факторы роста, вырабатываемые

хондроцитами ПЯ. Так, ТФР- $\beta$ 1 стимулирует пролиферацию самих клеток МПД и синтез протеогликанов, ингибируя параллельно ММП [14]. Основным фактором роста фибробластов продуцируется в ткани диска и обладает высокой ангиогенной активностью, обнаруживается в большинстве образцов грыж, изъятых после дискэктомии. Эту же функцию в меньшей степени выполняет фактор роста эндотелия сосудов. Ему отводится ведущая роль во внутридисковом ангиогенезе, что обуславливает определенные терапевтические подходы. ФРН не проявляет пролиферативных или анаболических функций на клетках диска, но проявляет нейротрофические свойства, что объясняет болевую ноцицепцию у пациентов с хронической болью в спине.

Во-вторых, антикатаболические реакции реализуются посредством уменьшения экспрессии энзимов ММП и воспалительных медиаторов – ингибитора оксида азота и циклооксигеназы 2 [4]. Тканевые ингибиторы металлопротеиназы 1, 2, 3 определяют количество свободных активных протеиназ [15]. Дисбаланс между ММП-3 и тканевыми ингибиторами металлопротеиназы 1 может быть дополнительной составляющей дегенерации диска [16]. Как бы то ни было, подверженность клеток чрезмерным нагрузкам индуцирует их катаболическую активность, представленную повышением ферментов деградации ММП и воспалительных факторов – ингибитора оксида азота и циклооксигеназы 2.

Один из активных участников катаболического процесса, направленный на деградацию агрекана, – агреканиназа 1, или ADAMTS4 (адизинтегрин, металлопротеиназа и тромбоспондин 4). Как показано в исследованиях, количество этого комплекса возрастает с увеличением дегенерации и коррелирует с низкой экспрессией генов матрикса – агрекана и коллагена [12]. Катепсины D, L, K и G, ферменты, разрушающие коллаген и протеогликаны, также участвуют в деградации матрикса, и наибольшая их активность выявлена в дезорганизации структуры ЗП и ФК. В регуляции синтеза катепсинов также участвуют провоспалительные цитокины и факторы роста.

Что касается снижения анаболической активности, интересно отметить, что депривация гравитационной нагрузки во время космического полета также усиливает катаболические процессы в связи со снижением синтеза протеогликанов, ГАГ и коллагенов клетками зон ПЯ и ФК. Вследствие уменьшения внутридискового давления ядерные хондроциты начинают синтезировать коллаген 1-го типа, нехарактерный для этой зоны диска, что приводит к фиброзу ПЯ и продукции оксида азота, который, в свою очередь, уменьшает синтез ГАГ и усугубляет клеточный апоптоз. Это подтверждает существенный вклад механической нагрузки в поддержание гомеостаза и сохранение выпуклой формы МПД [12].

### Возможности биологической терапии при боли в спине

Общая цель методов биологической терапии – устойчивая доставка в диск биологически активных факторов, которые должны стимулировать регенерацию или сохранять статус-кво пораженной ткани [12]. На сегодняшний день палитра биологического воздействия на МПД включает:

- стратегии тканевой инженерии;
- введение активных субстанций в пространство ПЯ;
- генную терапию с изменением уровня экспрессии генов клеток МПД;
- клеточную терапию;
- комбинации этих методов;
- антицитокиновую терапию (генно-инженерные биологические препараты).

### Стратегии тканевой инженерии для лечения дегенеративной болезни диска

Многочисленные исследования проводятся для восстановления отдельных структур МПД (ПЯ, ФК) и подавления ангиогенеза в МПД с целью предотвращения ассоциированной с неоангиогенезом дегенерации МПД [17] (табл. 1).

В качестве замещающей и одновременно восстанавливающей терапии для структуры ПЯ при снижении его гидрофильности, частичной или полной утрате ионного заряда применяются синтетические гидрогели с различными молекулярными и биохимическими свойствами, структура которых позволяет воспроизводить механические функции сжатия и восстановления при нагрузке натурального ПЯ [18]. Создание гидрогелей на основе натуральных веществ (гидрогель дигидразида гиалуроновой кислоты и желатин-адипиновой кислоты) позволило рабочей группе из Китая придать гидрогелю иммунологическую активность, подавляющую воспаление и повышающую, как выяснилось, пролиферацию и экспрессию генов коллагена 2-го типа и агрекана. Недавно обнародован опыт комбинированного подхода генной и тканевой терапии: были использованы полимеры нановолокон для доставки высокоплазмидной ДНК в ткань диска у животных, ДНК сохраняла возможность самосборки в условиях синтетического матрикса [19].

Для регенерации ФК в качестве монотерапии ранее применялись коллаген, гиалуроновая кислота, хитозан, альгинат, фибрин шелка и хондроитинсульфат [20]. Сегодня можно достичь восстановления ФК, в частности повышения продукции коллагена 1-го типа, являющегося основным структурным компонентом ФК, с помощью синтетических природных материалов, вводимых непосредственно в ткань волокнистого хряща. К ним относятся политриметиленкарбонат, полилактид-ко-гликолид, поли- $\epsilon$ -капролактон, поли-DL-лактид, поли-L-лактид, полиуретан и полиэтиленгликоль на основе гиалуроновой кислоты [21, 22]. Интересен также опыт по созданию биоразлагаемого матрикса,

**Таблица 1.** Стратегии тканевой инженерии для лечения дегенеративной болезни диска (сводные данные на основании источников [18, 20–28])  
**Table 1.** Tissue engineering strategies to treat degenerative disc disease (summary data based on sources [18, 20–28])

Вид биологической стратегии Type of biological strategy	Структура, подлежащая терапевтическому воздействию Structure subjected to therapeutic treatment	Название вводимой субстанции Injected substance	Свойства вещества и функциональные характеристики Substance properties and functional characteristics
Введение натуральных биологических полимеров Injection of natural biological polymers	ПЯ NP	Гидрогель с декстраном и гидрогель с полиэтиленгликолем Dextran hydrogel and polyethylene glycol hydrogel	Восстановление структуры ПЯ. Создают трехмерную сетевую структуру, воссоздавая биомеханические характеристики, присущие природному МПД NP structure restoring. Create a three-dimensional network, reconstructing native biomechanical characteristics of IVD
	ФК FR	Коллаген, гиалуроновая кислота (НА), хитозан, альгинат, фибрин шелка и хондроитина сульфат Collagen, hyaluronic acid (HA), chitosan, alginate, silk fibrin and chondroitin sulfate	Восполнение дефицита деградированных структур матрикса диска Supplementing the deficit of degraded disc matrix structures
Введение синтетических полимерных материалов Injection of synthetic polymeric materials	ПЯ NP	Гидрогель дигидразида гиалуроновой кислоты и желатин-адипиновой кислоты (окси-HAG-ADH) Oxidated hyaluronic acid/adipic acid dihydrazide hydrogel (oxi-HAG-ADH)	Высокая молекулярная масса, вязкоупругие свойства, сходные с нативной тканью. Противовоспалительное и иммуносупрессивное действие. Поддержание фенотипа клеток ПЯ и их пролиферации. Индукция экспрессии генов коллагена 2-го типа, агрекана, Sox-9 и HIF-1A-ЭЦМ ПЯ High molecular weight, viscoelastic properties similar to native tissue. Anti-inflammatory and immunosuppressive effects. Maintaining NP cells phenotype and proliferation. Induction of gene expression of type 2 collagen, aggrecan, Sox-9, and HIF-1A- and ECM genes of NP
		Ламининсодержащие гидрогели и самоорганизующиеся пептидные гидрогели Laminin-containing hydrogels and self-organizing peptide hydrogels	Высокая эластичность субстанции по сравнению в натуральным ПЯ. Повышение экспрессии маркеров ПЯ KRT8, KRT18 и FOXF1, синтеза коллагена 2-го типа и агрекана High substance elasticity compared to native NP. Increased expression of NP markers KRT8, KRT18 and FOXF1, synthesis of type 2 collagen and aggrecan
		Высокоплазмидная ДНК, соединенная с гиперразветвленным полимером (pDNA-HP) High-plasmid DNA combined with hyperbranched polymer (pDNA-HP)	Тонкие губчатые микросферы, в которые помещается ДНК. Способ генной терапии. Подавление фиброза и способствование регенерации ПЯ Thin spongy microspheres where DNA is placed. The method of gene therapy. Fibrosis suppression and facilitating NP regeneration
	ФК Применяется в качестве биоматрикса <i>in vitro</i> для культивирования МСК FR Used as an <i>in vitro</i> biomatrix to cultivate MSCs	Политриметиленкарбонат Полилактид-ко-гликолид поли-ε-капролактон; поли-DL-лактид; поли-L-лактид; полиуретан и НА-полиэтиленгликоль Poly (trimethylene carbonate); poly (lactide-co-glycolide); poly-ε-caprolactone; poly-DL-lactide; poly-L-lactide; polyurethane and HA-polyethylene glycol Полиэфиркарбонатуретан мочевины poly (ester-carbonate urethane) urea	Композитный материал для СК. Повышает высоту МПД, протекция от грыжи. Являются матрицей для МСК, повышается экспрессия коллагена 5-го типа. Для выращивания фиброцитов из МСК. Composite material for SC. Increases IVD height, protection from a hernia. Matrix for MSCs; increases expression of type 5 collagen. For fibrocytes growth from MSCs. Биоразлагаемый материал Biodegradable material

Окончание таблицы 1

The end of table 1

Вид биологической стратегии Type of biological strategy	Структура, подлежащая терапевтическому воздействию Structure subjected to therapeutic treatment	Название вводимой субстанции Injected substance	Свойства вещества и функциональные характеристики Substance properties and functional characteristics
	Блокирование ангиогенеза Angiogenesis blocking	Гель альбумина, соединенный с полиэтиленгликолем Albumin gel combined with polyethylene glycol	Снижает адгезию эндотелиоцитов к гелю и пролиферацию эндотелия Reduces endotheliocyte adhesion to gel and endothelial proliferation
		Гидрогель на основе галангана. Гидрогель, содержащий блокатор фактора роста эндотелия сосудов Gellangan based hydrogel. Hydrogel containing vascular endothelial growth factor blocker	Снижает рост капилляров и приводит к редукции уже имеющегося капиллярного русла на границе ПЯ и ФК Reduces capillaries growth and leads to reduction of the existing capillary bed at the border of the NP and FR
Замена отсутствующего ПЯ Replacing a missing NP	Ядро протезного диска Prosthetic disc nucleus	Гидрогели полигидратированные с расширенными механическими возможностями Polyhydrated hydrogels with enhanced mechanical capabilities	Частота протрузий и экструзий искусственного ПЯ – 20–30 % Frequency of protrusion and extrusion of artificial NP is 20–30 %
Пластика дефектов ФК Plasty of FR defects	ПЯ NP	Плотная субстанция на основе коллагена 1-го типа. Аллотрансплантат из ткани перикарда Dense substance based on type 1 collagen. Pericardial tissue allograft	Подавляет прогрессирование ДБД Suppresses DDD progression
Тканевая инженерия – цельный имплант МПД Tissue engineering – one-piece IVD implant	ПЯ и ФК-комплекс NP and FR complex	ПЯ из геля хитозана. ФК из волокон полибутилена сукцината-терефталата сополиэфира (PBST) и твердого PBST NP from chitosan gel. FR from Poly (butylene succinate-co-butylene terephthalate) (PBST) copolyester fibers and solid PBST	Заместительная терапия МПД. Содержит МСК. Внешний слой ФК обеспечивает механическую поддержку всего импланта IVD replacement therapy. Contains MSCs. Outer FR layer provides mechanical support for the entire implant

**Примечание.** ПЯ – пульпозное ядро; МПД – межпозвоноковый диск; ФК – фиброзное кольцо; СК – стволовые клетки; МСК – мезенхимальные стволовые клетки; ЭЦМ – экстрацеллюлярный матрикс; ДБД – дегенеративная болезнь диска.  
**Note.** NP – nucleus pulposus; IVD – intervertebral disc; FR – fibrous ring; SC – stem cells; MSCs – mesenchymal stem cells; ECM – extracellular matrix; DDD – degenerative disc disease.

в котором культивируются стволовые клетки (СК), производные ФК [23].

Известно, что ангиогенез в диске тесно связан с процессом дегенерации и неоиннервации диска, а также с появлением ноцицептивной чувствительности в диске в связи с активностью ФРН и мозгового нейротрофического фактора. Исследователями был поставлен вопрос, возможно ли остановить процесс васкуляризации диска неиммунным способом.

Результатом поиска стал синтез геля с антиангиогенезной активностью [24]. Введение геля альбумина, соединенного с полиэтиленгликолем, в ФК снижает адгезию эндотелиальных клеток к поверхности геля и пролиферацию эндотелия. Другой субстанцией, направленной против появления эндотелиальных клеток

в матриксе ПЯ, стал гидрогель на основе галангана [25]. Использование блокатора фактора роста эндотелия сосудов в матрице геля позволило остановить врастание капилляров и даже вызвать редукцию уже имеющегося микроциркуляторного русла на границе ФК и ПЯ [26].

Кроме подвижных субстанций, для стабилизации различных свойств ПЯ диска и его оболочки были разработаны биологические импланты – аналоги ПЯ или всего диска с механической прочностью и степенью гидратации, близкой к натуральному биоматериалу. Ядро протезного диска создано на основе гидрогеля с учетом анионного заряда внутри. Были предприняты успешные попытки имплантации такого рода протеза (одобренного Food and Drug Administration,

Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США) [27]. Известно также наложение биологической заплатки на дефекты ФК из материалов на основе коллагена и аллотканей (перикарда) [28].

Таким образом, методы тканевой инженерии применимы и при начальной дегенеративной болезни диска, и на более поздних стадиях. Однако, несмотря на успехи дискзамещающей терапии и пластики ФК с помощью аллогенных материалов, перспективным остается направление, при котором биологические материалы будут обладать репаративной способностью. Необходимы технологии для изготовления материалов, которые не только обеспечивают механическую прочность, но и создают благоприятную среду для стимуляции пролиферации клеток и диффузии функциональных белков [17].

#### **Использование биологически активных субстанций локально в матрице межпозвонкового диска**

На сегодняшний день применяется как прямое введение активного вещества в матрицу МПД, так и введение аутологичной плазмы, обогащенной факторами роста, и биологически активными веществами.

Введение факторов роста, анаболических ферментов может осуществляться непосредственно в ткань поврежденного диска либо изначально в матрицу в условиях *in vitro*, затем такая матрица инъецируется также во внутридискное пространство, являясь субстратом для медленного высвобождения активных веществ.

Такой метод предполагает наличие в ткани диска достаточного количества жизнеспособных клеток, которые способны реагировать на кратковременную биологическую стимуляцию. Это возможно у пациентов с начальными стадиями дегенерации МПД (I, II, III стадии по Пфиррманну), сопровождающейся болевым синдромом. В исследованиях на животных метод применяли на кроликах с использованием суперсемейства ТФР- $\beta$ -остеогенного белка 1. Результаты показали значительный синтез протеогликана, восстановление высоты диска, которая сохранялась около 8 нед после введения [29]. Более перспективным оказалось введение не 1 фактора, обладающего анаболической активностью, а смеси биологически активных агентов, полученных из компонентов матрицы и из вспомогательных составляющих, — так называемого раствора диска [30]. В течение 13 мес наблюдения за пациентами интенсивность боли в спине у них снизилась согласно визуально-аналоговой шкале, расширился двигательный режим. Это предполагает, что такое многокомпонентное введение эффективно даже на «продвинутых» стадиях ДБД, стимулируя остаток жизнеспособных клеток к секреции факторов роста и поддержанию матрицы. Отметим, что для указанных методов репарации диска общим является их кратковременный эффект вследствие истощения поставляемых агентов либо их утечки из дискового пространства.

Кроме перечисленных методов поддержки анаболических свойств МПД, к биологическим методам лечения присоединилась новая минимально инвазивная стратегия, которая заключается во введении в ткань диска аутологичной плазмы, обогащенной факторами роста и биологически активными веществами. Накоплен богатый клинический опыт назначения PRP-терапии (терапия плазмой, богатой тромбоцитами, (Platelet Rich Plasma)) при начальных стадиях остеоартрита (I–II стадии по классификации Келлгрена–Лоуренса) и других нозологических формах патологии костно-мышечной системы (включая патологию околоуставных мягких тканей), особенно с учетом хондропротективного эффекта плазмы и стимуляции репаративных процессов в суставном хряще, субхондральной кости, синовиальной оболочке. Разработаны отечественные методические рекомендации по применению данной методики при остеоартрите крупных суставов [31]. Плазма, обогащенная тромбоцитами и представляющая собой сложную биологически активную среду, вводилась в дегенерированные МПД как *in vitro*, так и *in vivo* на модели кроликов, будучи помещенной в желатиновые гидрогелевые микросферы [32, 33]. Вследствие стимуляции тромбоцитов плазмы выделяются ТФР- $\beta$ , фактор роста тромбоцитов, фактор роста эндотелия сосудов, фактор роста фибробластов, ФРН, эпидермальный фактор роста (ЭФР), инсулиноподобный фактор роста 1, фактор роста гепатоцитов, нейротрофический фактор мозга, костный морфогенетический белок, хемокины и цитокины. Многие из этих субстанций осуществляют центральную роль в реализации сигнальных путей при повреждении тканей для стимуляции репаративных процессов [34]. Было продемонстрировано, что применение PRP-терапии наряду с усилением синтеза ЭЦМ оказывает противовоспалительный, антиапоптозный и анальгетический эффекты. Это безопасный и эффективный терапевтический подход по отношению и к другим костно-мышечным дегенеративным заболеваниям [4]. Внутридискное введение обогащенной плазмы у людей было проведено в 6 исследованиях различного формата, в том числе в рамках двойного слепого рандомизированного контролируемого исследования с оценкой клинических данных у больных с болью в нижней части спины в течение 8 нед после введения [35, 36].

Новые данные опубликованы относительно семейства факторов роста и дифференцировки (Growth/differentiation factor, GDF). При ДБД продемонстрирована особая перспектива в регенерации диска на моделях *in vitro* и *in vivo* из-за их решающей роли в хондрогенезе и гомеостазе хрящевой ткани, в том числе в сочетании с клеточной терапией. Семейство GDF, являясь частью семейства костного морфогенетического белка BMP, в дополнение к BMPs2 увеличивает продукцию ЭЦМ и BMPs7, усиливает синтез протеогликанов

и пролиферацию клеток ПЯ и ФК человека [37]. Части этого семейства, а именно GDF5 (BMP-14, морфогенетический белок хряща-1, CDMP-1); GDF6 (BMP-13, CDMP-2) и GDF7, могут быть идеальными молекулами для регенерации МПД [38]. В сравнительных исследованиях с использованием комбинации мезенхимальных СК, СК из жировой ткани и различных компонентов семейства GDF из всего комплекса белков именно GDF6 показал наибольшую активность в регенерации диска, обеспечивая процесс дифференцировки в хондроциты ПЯ [39].

**Генная терапия**

Цель данного метода – модифицирование генетического аппарата оставшихся дисковых клеток, для того чтобы осуществлялась экспрессия полезных генов.

На современном этапе применяются методы доставки генетического элемента (ДНК) в любой тип клетки-мишени. Генетический элемент содержит ген, кодирующий желаемый продукт, и элемент управле-

ния, модулирующий экспрессию соответствующего гена. Различают прямую (*in vivo*) и непрямую (*ex vivo*) генную терапию (табл. 2):

- 1) прямая генная терапия (*in vivo*) – прямое введение интересующего гена в резидентные клетки *in situ*;
- 2) непрямая генная терапия (*ex vivo*) – выделение клеток-мишеней из естественной биологической среды пациента, введение интересующего гена *in vitro* и реимплантация трансформированных клеток обратно в дисковое пространство.

Интеграция чистой ДНК в ядро клеток-хозяев не реализуется на необходимом уровне спонтанно, поэтому осуществляется с помощью специального носителя, так называемого вектора [40]. Ранее предпринимались попытки использовать в качестве векторов молекулярные комплексы ДНК, лиганды, липосомы, содержащие ДНК, либо опосредованный перенос гена частицами золота («генный переносчик») [41–43]. К сожалению, это дает ограниченное количество модифицированных

**Таблица 2.** Методы генной и клеточной терапии при дегенеративной болезни диска (данные на основании источников [40, 43, 44, 47, 48, 50, 54, 61–63])  
**Table 2.** Methods of gene and cell therapy for degenerative disc disease (summary data based on sources [40, 43, 44, 47, 48, 50, 54, 61–63])

Генная терапия Gene therapy		
Прямая генная терапия <i>In vivo</i> gene therapy	Прямое введение интересующего гена в резидентные клетки <i>in situ</i> Direct introduction of the gene of interest into resident cells <i>in situ</i>	Низкоэффективно из-за спонтанности трансдукции ДНК в клетки Low effective due to spontaneous DNA transduction into cells
Непрямая генная терапия <i>Ex vivo</i> gene therapy	Выделение клеток-мишеней, введение интересующего гена <i>in vitro</i> и реимплантация трансформированных клеток обратно в дисковое пространство Isolation of target cells, introduction of the gene of interest <i>in vitro</i> , and reimplantation of the transformed cells back into disk space	Интеграция чистой ДНК в ядро клеток-хозяев осуществляется с помощью вирусного «вектора» Integration of pure DNA into the nucleus of host cells is carried out using the viral “vector”
Клеточная терапия Cell therapy		
Имплантация аутологических клеток, выделенных из межпозвонкового диска Implantation of autologous cells isolated from the intervertebral disc	Непосредственная имплантация извлеченных и культивированных <i>in vitro</i> клеток обратно в ткань пульпозного ядра межпозвонкового диска Direct implanting <i>in vitro</i> extracted and cultured cells back into the tissue of the nucleus pulpous of the intervertebral disc	
	Генетическая модификация клеток с помощью вирусной инженерии до имплантации (непрямая генная терапия) Genetic modification of cells using viral engineering prior to implantation (indirect gene therapy)	
	Тканевая инженерия – имплантация клеток вместе с каркасом (поддерживающим биоматериалом), в который они были помещены <i>in vitro</i> Tissue engineering – implanting cells together with supporting biomaterial where they were placed <i>in vitro</i>	
Имплантация стволовых клеток Stem cells implantation	Выделены из костного мозга, жировой ткани, мышечной ткани, гемопоэтических, обонятельных мембран, синовиальных Isolated from bone marrow, adipose tissue, muscle tissue, hematopoietic, olfactory membranes, synovial	
Комбинации непрямой генной инженерии и тканевой инженерии Combinations of indirect gene engineering and tissue engineering	Суспендирование клеток в растворе-матриксе и их дифференцировка с использованием генной терапии Cell suspension in a matrix solution and their differentiation using gene therapy	



клеток-мишеней, вероятно вследствие его эписомальной локализации, поэтому стойкий эффект пока не достигнут.

Вирусные векторы позволяют достичь стабильной интеграции ДНК в геном клетки-хозяина, принимающей на себя репликацию ДНК и механизм экспрессии белка. Такими генами на сегодняшний день являются анаболические факторы, ТФР- $\beta$ 1, латентный мембранный протеин, он же онкопротеин, усиливающий экспрессию ТФР- $\beta$ 1, Sox9 (белок, фактор транскрипции Sox9, участвующий в процессе дифференцировки хондроцитов) и антикатаболический фактор тканевого ингибитора металлопротеиназы 1.

Специально сконструированный вирус должен эффективно инфицировать неделящиеся, покоящиеся хондроциты ПЯ, которые, кроме того, находятся там в очень малом количестве (на долю клеток приходится всего 1–2 % объема ткани МПД), и распределены они на расстоянии друг от друга, препятствующем эффективному заражению клеток [6]. С другой стороны, аваскулярное пространство инкапсулированного в ФК диска, наоборот, позволяет достичь высоких концентраций вируса и создает низкий риск иммунной реакции против вирусных белков [12].

Были продемонстрированы эффективные модели с применением ретровирусных и аденовирусных конструкций [44, 45]. Необходимым условием для широкого применения этого метода является независимость эффективности трансдукции вектора в клетки-мишени от степени дегенерации диска и иммунологической безопасности вируса по отношению ко всему организму пациента [46]. Для повышения безопасности процесса трансдукции вируса в клетки был сконструирован аденоассоциированный вирусный вектор для лечения ДБД [47]. Пилотное исследование, проведенное с целью интеграции экзогенного гена *ТФР- $\beta$ 1* в диск кроликов с помощью аденовирусного вектора, показало увеличение *ТФР- $\beta$ 1* и продукцию протеогликана в инъецированном диске [48]. Экспрессия анаболических цитокинов мРНК BMP-2, -7 и мРНК агрекана в ткани МПД кроликов также повышалась после введения альтернативного аденовируса, несущего минерализующий протеин 1 (повышалась экспрессия протеогликанов посредством повышения экспрессии костных морфогенетических белков латентного мембранного протеина 1, BMP-2 и -7 в клетках ПЯ) [49]. Альтернативным терапевтическим подходом является перенос гена *Sox9* с помощью аденовирусного вектора в ткань поврежденного диска человека для повышения продукции коллагена 2-го типа [50]. В настоящее время ведутся работы по синергичному повышению амплификации структурных белков матрикса путем введения вирусных переносчиков сразу нескольких анаболических факторов [51]. Также были осуществлены успешные попытки генно-вирусной инженерии для подавления катаболических процессов в матриксе МПД.

Замедление его деградации достигалось использованием аденовирусного вектора-гена, кодирующего тканевые ингибиторы металлопротеиназы 1, полученного *ex vivo*, в результате чего повышалось содержание протеогликана в клеточных культурах дисков [52].

### Клеточная терапия

#### *Имплантация аутологичных клеток, выделенных из межпозвонкового диска*

Различают 3 вида обработки аутологичных клеток (полностью иммунологически совместимых с клетками МПД) перед их имплантацией в ткань МПД:

- непосредственная имплантация извлеченных и культивированных *in vitro* клеток обратно в ткань ПЯ МПД;
- генетическая модификация клеток с помощью вирусной инженерии до имплантации (непрямая генная терапия);
- тканевая инженерия – имплантация клеток вместе с каркасом (поддерживающим биоматериалом), в который они были помещены *in vitro* (см. выше).

Введение суспензии пролиферированных *ex vivo* клеток диска сопряжено с риском инвазивной нуклеотомии, – трудность представляют изъятие достаточного количества клеток ПЯ для успешного культивирования *in vitro*, а также утечка биоматериала после трансплантации через поврежденное ФК [53]. Поэтому применение комбинации не прямой генной инженерии и тканевой инженерии (суспендирования клеток в растворе фибриноген-тромбина) является более надежным способом из всех представленных. Перенос пролиферированных и модифицированных хондроцитов с помощью матрицы обеспечивает максимальное выживание инъецированных клеток [54]. Но и после успешной имплантации остается проблема нутритивной поддержки матрицы внутри матрикса деградированного диска, который сам представляет из себя агрессивную среду с низкими значениями pH, высоким содержанием лактата, гипоксемией и гипогликемией.

Таким образом, не решен вопрос выживаемости пересаженных хондроцитов в разрушенном диске. Усовершенствованный подход – культивирование клеток диска в трехмерной системе перед имплантацией с использованием каркаса на основе неиммуногенного производного коллагена ателоколлагена – повышает шансы на выживание в агрессивной среде. Так, клетки ФК, культивированные в течение 3 нед, проявили способность экспрессировать мРНК коллагена 2-го типа, депонировать коллаген и синтезировать протеогликан [55, 56]. В дальнейшем в структуре МПД, а именно в области наружного края ФК, были выявлены не только зрелые клетки, но и популяции СК, которые способны к активации при дегенерации МПД, так называемые прогениторные клетки [57]. Стволоподобные клетки также выделены в дегенерированном диске человека [58]. И те и другие клеточные популяции

способны к дифференцировке в любую ткань мезодермального происхождения, т. е. обладают полипотентными свойствами. Также непосредственно в ткани ФК недегенерированного МПД была обнаружена прогениторная популяция клеток, сходная по своему иммунофенотипу с мезенхимальными СК [59].

Перед имплантацией прогениторные клетки должны быть дифференцированы в хондроцитоподобные клетки. Это достигалось с помощью ростовых факторов семейства BMP, о которых упоминалось ранее, и специфичного фактора дифференцировки из семейства Sox9 [59, 60]. При имплантации системы мезенхимальных клеток, находящихся в коллагеновом геле, в МПД, у кроликов отмечено сохранение структуры ПЯ и ФК, стабильный синтез протеогликанов, увеличение высоты МПД [61]. Похожие результаты получены на животных после инъекции суспензии прогениторных клеток в МПД, заключенных в гидрогель. Имплантация клеток приводила к улучшению гистологической архитектоники матрикса хряща МПД, его биомеханических свойств [61].

#### **Генная терапия на основе стволовых клеток**

На сегодняшний день методы клеточной терапии, основанные на применении СК, активно применяются в репарации различных тканей, в том числе и хрящевых дефектов при остеоартрите, травмах опорно-двигательного аппарата, в спортивной медицине. Известны следующие виды СК у взрослого человека, которые активно используются: мезенхимальные, полученные из костного мозга; выделенные из жировой ткани; полученные из мышечной ткани; гемопоэтические; обонятельных мембран; синовиальные. Уникальная особенность СК, как известно, заключается в том, что она может дифференцироваться *in vitro* в хондроцитоподобный фенотип. После достижения стадии зрелости *in vitro* клетки инъецируют в межклеточное вещество МПД. Так, первое исследование по имплантации мезенхимальных СК в дегенерированные МПД пациентов было осуществлено в 2011 г. Через 3 мес после введения значительно уменьшалась интенсивность болевого синдрома и сокращались сроки нетрудоспособности больных с хронической болью в спине. По данным магнитно-резонансной томографии, происходило «обратное развитие ДБД»: усиливалась гидратация дисков и увеличивалась их высота [62]. Сам способ дифференцировки при некоторых подходах имел не меньший эффект, чем при использовании факторов роста или модификации клеток. А сокультивирование в одной питательной среде *in vitro* мезенхимальных СК из жировой ткани и клеток ПЯ и ФК МПД стимулировало морфологическое созревание СК с приобретением функций хондроцитов. Кроме того, выяснилось, что у жировых СК увеличена экспрессия генов коллагена 2-го типа и агреккана [63]. Терапия

СК — современное и перспективное направление среди малоинвазивных методов лечения ДБД — потенциально может восполнить дефицит клеток, а следовательно, и матрикс. Для понимания причин успешной или неуспешной имплантации необходимо в дальнейшем изучать жизнеспособность и активность имплантированного материала под влиянием различных факторов, а также способы нутритивного гомеостаза внутри дискового пространства после имплантации биоматериала [6].

#### **Генно-инженерная биологическая терапия при дегенеративной болезни диска**

Очевидно, что цитокины играют ведущую роль в формировании ДБД и ассоциированного с ней болевого синдрома. Так как в последних исследованиях не были выявлены уровни воспалительных биомаркеров в сыворотке крови в группах пациентов с люмбоишиалгией и нейрогенной болью в ногах (с компрессией нервного корешка или без компрессии), интерес к локальной антицитокиновой терапии пациентов с болью в нижней части спины обоснован и имеет четкие точки приложения. В дегенерированных дисках и материале грыжи диска содержатся повышенные уровни ИЛ-1, 4, 6, 12, 17, ФНО- $\alpha$ , интерферона  $\gamma$  [64]. Такой цитокиновый каскад возможен только при проникновении иммунокомпетентных клеток-макрофагов CD68, CD4<sup>+</sup> Th и других в ткань МПД [65]. Более того, экспериментальные исследования с внутрисквовой инъекцией цитокинов ФНО- $\alpha$  подтверждают корреляцию уровня экспрессии цитокинов в ткани ПЯ диска с интенсивностью боли в спине, потерей высоты диска и высоким уровнем ИЛ-1 [66].

В соответствии с имеющимися на сегодня целями терапии для подавления асептического воспаления в диске применяются препараты:

- с анти-ФНО-активностью: этанерцепт, адалимумаб, инфликсимаб;
- антитела к рецептору ИЛ-6: тоцилизумаб;
- ингибитор рецептора эпидермального фактора роста: gefитиниб.

Во всех исследованиях было продемонстрировано снижение болевой чувствительности у пациентов с острой, подострой и хронической радикулопатией, развившейся вследствие грыжи МПД и даже стеноза спинного мозга.

Стоит отметить, что пилотные исследования с применением анти-ФНО-препаратов проводились среди пациентов с грыжами МПД и неврологической симптоматикой: люмбалгией, люмбоишиалгией, прогрессирующим корешковым синдромом и неврологическим дефицитом, в том числе вследствие поясничного стеноза. Так, эпидуральное введение этанерцепта в область корешка спинального нерва приводило к значительному уменьшению боли в нижней части спины, снижению иррадиации в нижние конечности и чувства

онемения ног [67–69]. Применение адалимумаба продемонстрировало также положительное неврологическое воздействие и сокращение количества необходимых операций на протяжении трехлетнего наблюдения рабочей группы под руководством S. Genevay [70]. Введение инфликсимаба в МПД в рандомизированном контролируемом исследовании показало наибольшую эффективность в группе пациентов с радикулопатией и грыжами диска на уровне L<sub>III</sub>–L<sub>IV</sub> или L<sub>IV</sub>–L<sub>V</sub> в сочетании с реактивными изменениями в телах позвонков типа Modic [71]. Отчетливый анальгетический эффект был выявлен при инъекциях блокатора рецептора ИЛ-6 во внутрискладовое пространство. Было показано, что экспрессия ИЛ-6 локализуется во внутренних слоях ФК и ЗП и связана с гиперэкспрессией «болевого» пептида – кальцитонина, особенно в нейронах ганглиев задних корешков спинальных нервов [72].

Как уже говорилось ранее, различные факторы роста вносят свой вклад в ДБД. Так, ЭФР, известный как маркер и терапевтическая мишень при немелкоклеточном раке легких, положительно коррелирует со степенью дегенерации МПД, будучи повышенным в клетках ПЯ. Инъекции ингибитора рецептора ЭФР эффективно блокировали продукцию хемокинов (в частности, CXCL8), участвующих в привлечении иммунокомпетентных клеток и запуске каскада иммунологических реакций [73]. Кроме того, в исследова-

нии на мышцах при блокировании рецептора ЭФР повышался синтез матрикса ПЯ и снижалась экспрессия ММП-13. У пациентов с немелкоклеточным раком легких, получавших ингибитор рецептора ЭФР гефитиниб в течение 5 лет, наблюдалось более медленное прогрессирование дегенерации диска по сравнению с контрольной группой [74]. Это создает предпосылки для дальнейших исследований в сфере применения генно-инженерной биологической терапии и низкомолекулярных лекарственных средств в лечении ДБД.

### Заключение

Последние достижения в области молекулярной и клеточной биологии открыли новые горизонты в понимании патогенеза дегенеративного поражения МПД. Основная терапевтическая цель в лечении или предотвращении дегенерации МПД – восстановление способности диска синтезировать полноценный внеклеточный матрикс, богатый протеогликанами. Некоторые гены и клеточные факторы роста влияют на анаболические и катаболические процессы, которые регулируют постоянство внутренней среды внеклеточного матрикса. Нами представлен перечень потенциальных стратегий биологической терапии ДБД, которые могут быть применены в лечении болевого синдрома в спине, ассоциированного с дегенеративным поражением позвоночника.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Правдюк Н.Г., Шостак Н.А. Дегенеративное поражение позвоночника, ассоциированное с болью в спине: морфогенетические аспекты. *Клиницист* 2017;11(3–4):17–22. DOI: 10.17650/1818-8338-2017-11-3-4-17-22. [Pravdyuk N.G., Shostak N.A. Degenerative spine injury associated with back pain: morphogenetic aspects. *Klinitsist = The Clinician* 2017;11(3–4):17–22. (In Russ.)].
2. Nijs J., Clark J., Malfliet A. et al. In the spine or in the brain? Recent advances in pain neuroscience applied in the intervention for low back pain. *Clin Exp Rheumatol* 2017;35 Suppl. 107(5):108–15.
3. Raastad J., Reiman M., Coeytaux R. et al. The association between lumbar spine radiographic features and low back pain: a systematic review and meta-analysis. *Semin Arthritis Rheum* 2015;44(5):571–85. DOI: 10.1016/j.semarthrit.2014.10.006.
4. Anitua E., Padilla S. Biologic therapies to enhance intervertebral disc repair. *Regen Med* 2018;13(1):55–72. DOI: 10.2217/rme-2017-0111.
5. Fujii K., Yamazaki M., Kang J.D. et al. Discogenic back pain: literature review of definition, diagnosis, and treatment. *JBMR Plus* 2019;3(5):10180. DOI: 10.1002/jbm4.10180.
6. Бывальцев В.А., Степанов И.А., Бардонова Л.А., Белых Е.Г. Дегенерация межпозвонкового диска и возможности тканевой инженерии: обзор литературы. *Хирургия позвоночника* 2017;14(1):60–7. DOI: 10.14531/ss2017.1.60-67. [Byvaltsev V.A., Stepanov I.A., Bardonova L.A., Belykh E.G. Intervertebral disc degeneration and possibilities of tissue engineering. *Hirurgia Pozvonochnika = Spine Surgery* 2017;14(1):60–7. (In Russ.)].
7. Paul C.P.L., Emanuel K.S., Kingma I. et al. changes in intervertebral disk mechanical behavior during early degeneration. *J Biomech Eng* 2018;140(9). DOI: 10.1115/1.4039890.
8. Kushchayev S.V., Glushko T., Jarraya M. et al. ABCs of the degenerative spine. *Insights Imaging* 2018;9(2):253–74. DOI: 10.1007/s13244-017-0584-z.
9. Fields A.J., Ballatori A., Liebenberg E.C., Lotz J.C. Contribution of the endplates to disc degeneration. *Curr Mol Biol Rep* 2018;4(4):151–60. DOI: 10.1007/s40610-018-0105-y.
10. Urban J.G., Holm S., Maroudas A. Diffusion of small solutes into the intervertebral disc: an *in vivo* study. *Biorheology* 1978;15(3–4):203–21. DOI: 10.3233/bir-1978-153-409.
11. Benneker L.M., Heini P.F., Alini M. et al. 2004 Young Investigator Award Winner: vertebral endplate marrow contact channel occlusions and intervertebral disc degeneration. *Spine* 2005;30(2):167–73. DOI: 10.1097/01.brs.0000150833.93248.09.
12. Paesold G., Nerlich A.G., Boos N. Biological treatment strategies for disc degeneration: potentials and shortcomings. *Eur Spine J* 2007;16(4):447–68. DOI: 10.1007/s00586-006-0220-y.
13. Srivastava A., Isa I.L., Rooney P., Pandit A. Bioengineered three-dimensional diseased intervertebral disc model revealed inflammatory crosstalk. *Biomaterials* 2017;123:127–41. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.01.045.
14. Gruber H.E., Fisher E.C.Jr., Desai B. et al. Human intervertebral disc cells from the annulus: three-dimensional culture in agarose or alginate and responsiveness to TGF-beta1. *Exp Cell Res* 1997;235(1):13–21. DOI: 10.1006/excr.1997.3647.
15. Stamenkovic I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol* 2000;10(6):415–33. DOI: 10.1006/scbi.2000.0379.

16. Kanemoto M., Hukuda S., Komiya Y. et al. Immunohistochemical study of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 human intervertebral discs. *Spine* 1996;21(1):1–8. DOI: 10.1097/00007632-199601010-00001.
17. Zhao R., Liu W., Xia T., Yang L. Disordered mechanical stress and tissue engineering therapies in intervertebral disc degeneration. *Polymers (Basel)* 2019;11(7):1151. DOI: 10.3390/polym11071151.
18. Seliktar D. Designing cell-compatible hydrogels for biomedical applications. *Science* 2012;336(6085):1124–8. DOI: 10.1126/science.1214804.
19. Feng G., Zhang Z., Dang M. et al. Injectable nanofibrous spongy microspheres for NR4A1 plasmid DNA transfection to reverse fibrotic degeneration and support disc regeneration. *Biomaterials* 2017;131:86–97. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.03.029.
20. Nakashima S., Matsuyama Y., Takahashi K. et al. Regeneration of intervertebral disc by the intradiscal application of cross-linked hyaluronate hydrogel and cross-linked chondroitin sulfate hydrogel in a rabbit model of intervertebral disc injury. *Biomed Mater Eng* 2009;19(6):421–9. DOI: 10.3233/BME-2009-0608.
21. Nerurkar N.L., Sen S., Baker B.M. et al. Dynamic culture enhances stem cell infiltration and modulates extracellular matrix production on aligned electrospon nanofibrous scaffolds. *Acta Biomater* 2011;7(2):485–91. DOI: 10.1016/j.actbio.2010.08.011.
22. Vadalà G., Mozetic P., Rainer A. et al. Bioactive electrospon scaffold for annulus fibrosus repair and regeneration. *Eur Spine J* 2012;21(Suppl. 1):20–6. DOI: 10.1007/s00586-012-2235-x.
23. Zhu C., Li J., Liu C. et al. Modulation of the gene expression of annulus fibrosus-derived stem cells using poly(ether carbonate urethane)urea scaffolds of tunable elasticity. *Acta Biomater* 2016;29:228–38. DOI: 10.1016/j.actbio.2015.09.039.
24. Scholz B., Kinzelmann C., Benz K. et al. Suppression of adverse angiogenesis in an albumin-based hydrogel for articular cartilage and intervertebral disc regeneration. *Eur Cell Mater* 2010;20:24–37. DOI: 10.22203/ecm.v020a03.
25. Silva-Correia J., Miranda-Gonçalves V., Salgado A.J. et al. Angiogenic potential of gellan-gum-based hydrogels for application in nucleus pulposus regeneration: *in vivo* study. *Tissue Eng Part A* 2012;18(11–12):1203–12. DOI: 10.1089/ten.TEA.2011.0632.
26. Perugini V., Guildford A.L., Silva-Correia J. et al. Anti-angiogenic potential of VEGF blocker dendron loaded on to gellan gum hydrogels for tissue engineering applications. *J Tissue Eng Regen Med* 2018;12(2):669–78. DOI: 10.1002/term.2340.
27. Schmocker A., Khoushabi A., Frauchiger D.A. et al. A photopolymerized composite hydrogel and surgical implanting tool for a nucleus pulposus replacement. *Biomaterials* 2016;88:110–9. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.02.015.
28. Yuan D., Chen Z., Xiang X. et al. The establishment and biological assessment of a whole tissue-engineered intervertebral disc with PBST fibers and a chitosan hydrogel *in vitro* and *in vivo*. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2019;107(7):2305–16. DOI: 10.1002/jbm.b.34323.
29. An H.S., Thonar E.J., Masuda K. Biological repair of intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976)* 2003;28(Suppl. 15):86–92. DOI: 10.1097/01.BRS.0000076904.99434.40.
30. Klein R.G., Eek B.C., O'Neill C.W. et al. Biochemical injection treatment for discogenic low back pain: a pilot study. *Spine J* 2003;3(3):220–6. DOI: 10.1016/s1529-9430(02)00669-1.
31. Маланин Д.А., Трегубов А.С., Демешенко М.В., Черезов Л.Л. PRP-терапия при остеоартрите крупных суставов. Методические рекомендации. Волгоград: ВолГМУ, 2018. С. 46. [Malanin D.A., Tregubov A.S., Demeshchenko M.V., Cherezov L.L. PRP therapy in osteoarthritis of large joints. Guidelines. Volgograd: Volgograd State Medical University 2018. P. 46. (In Russ.)].
32. Pirvu T., Schroeder J., Peroglio M. et al. Platelet-rich plasma causes proliferation of fibrous ring cells and matrix formation. *Eur J Spine* 2014;23(4):745–53. DOI: 10.1007/s00586-014-3198-x.
33. Nagae M., Ikeda T., Mikami Y. et al. Intervertebral disc regeneration using platelet-rich plasma and biodegradable gelatin hydrogel microspheres. *Tissue Eng* 2007;13(1):147–58. DOI: 10.1089/ten.2006.0042.
34. Nurden A.T., Nurden P., Sanchez M. et al. Platelets and wound healing. *Front Biosci* 2008;13:3532–48.
35. Akeda K., Yamada J., Linn E.T. et al. Platelet-rich plasma in the management of chronic low back pain: a critical review. *J Pain Res* 2019;12:753–67. DOI: 10.2147 / JPR.S153085.
36. Tuakli-Wosornu Y.A., Terry A., Boachie-Adjei K. et al. lumbar intradiscal platelet-rich plasma (PRP) injections: a prospective, double-blind, randomized controlled study. *PMR* 2016;8(1):1–10. DOI: 10.1016/j.pmrj.2015.08.010.
37. Imai Y., Miyamoto K., An H.S. et al. Recombinant human osteogenic protein-1 upregulates proteoglycan metabolism of human annulus fibrosus and nucleus pulposus cells. *Spine (Phila Pa 1976)* 2007;32(12):1303–9. DOI: 10.1097/BRS.0b013e3180593238.
38. Hodgkinson T., Shen B., Diwan A. et al. Therapeutic potential of growth differentiation factors in the treatment of degenerative disc diseases. *JOR Spine* 2019;2(1):1045. DOI: 10.1002/jsp2.1045.
39. Clarke L.E., McConnell J.C., Sherratt M.J. et al. Growth differentiation factor 6 and transforming growth factor-beta differentially mediate mesenchymal stem cell differentiation, composition, and micromechanical properties of nucleus pulposus constructs. *Arthritis Res Ther* 2014;16(2):R67. DOI: 10.1186/ar4505.
40. Wolff J.A., Malone R.W., Williams P. et al. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* 1990;247(4949 Pt. 1):1465–8. DOI: 10.1126/science.1690918.
41. Li S., Wu S.P., Whitmore M. et al. Effect of immune response on gene transfer to the lung via systemic administration of cationic lipidic vectors. *Am J Physiol* 1999;276(5):796–804. DOI: 10.1152/ajplung.1999.276.5.L79.
42. Mahato R.I., Kawabata K., Takakura Y., Hashida M. *In vivo* disposition characteristics of plasmid DNA complexed with cationic liposomes. *J Drug Target* 1995;3(2):149–57. DOI: 10.3109/10611869509059214.
43. Yang N.S., Burkholder J., Roberts B. et al. *In vivo* and *in vitro* gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87(24):9568–72. DOI: 10.1073/pnas.87.24.9568.
44. Wehling P., Schulitz K.P., Robbins P.D. et al. Transfer of genes to chondrocytic cells of the lumbar spine. Proposal for a treatment strategy of spinal disorders by local gene therapy. *Spine (Phila Pa 1976)* 1997;22(10):1092–7. DOI: 10.1097/00007632-199705150-00008.
45. Kroeber M.W., Unglaub F., Wang H. et al. New *in vivo* animal model to create intervertebral disc degeneration and to investigate the effects of therapeutic strategies to stimulate disc regeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2002;27(23):2684–90. DOI: 10.1097/00007632-200212010-00007.
46. Ritter T., Lehmann M., Volk H.D. Improvements in gene therapy: averting the immune response to adenoviral vectors. *BioDrugs* 2002;16(1):3–10. DOI: 10.2165/00063030-200216010-00001.
47. Lattermann C., Oxner W.M., Xiao X. et al. The adeno associated viral vector as a strategy for intradiscal gene transfer in immune competent and pre-exposed rabbits. *Spine (Phila Pa 1976)* 2005;30(5):497–504. DOI: 10.1097/01.brs.0000154764.62072.44.
48. Nishida K., Kang J.D., Gilbertson L.G. et al. Modulation of the biologic activity of the rabbit intervertebral disc by gene therapy: an *in vivo* study of adenovirus-mediated transfer of the human transforming growth factor beta 1 encoding gene. *Spine (Phila Pa 1976)* 1999;24(23):2419–25. DOI: 10.1097/00007632-199912010-00002.
49. Yoon S.T., Park J.S., Kim K.S. et al. ISSLS prize winner: LMP-1 upregulates intervertebral disc cell production of proteoglycans and BMPs *in vitro* and *in vivo*. *Spine (Phila Pa 1976)* 2004;29(23):2603–11. DOI: 10.1097/01.brs.0000146103.94600.85.

50. Paul R., Haydon R.C., Cheng H. et al. Potential use of Sox9 gene therapy for intervertebral degenerative disc disease. *Spine* 2003;28(8):755–63. DOI: 10.1097/00007632-200304150-00006.
51. Moon S.H., Nishida K., Gilbertson L. et al. Biologic response of human intervertebral disc cell to gene therapy cocktail. *Spine (Phila Pa 1976)* 2008;33(17):1850–5. DOI: 10.1097/BRS.0b013e31817e1cd7.
52. Wallach C.J., Sobajima S., Watanabe Y. et al. Gene transfer of the catabolic inhibitor TIMP-1 increases measured proteoglycans in cells from degenerated human intervertebral discs. *Spine* 2003;28(10):2331–7. DOI: 10.1097/01.BRS.0000085303.67942.94.
53. Ganey T., Libera J., Moos V. et al. Disc chondrocyte transplantation in a canine model: a treatment for degenerated or damaged intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976)* 2003;28(23):2609–20. DOI: 10.1097/01.BRS.0000085303.67942.94.
54. Bertram H., Kroeber M., Wang H. et al. Matrix-assisted cell transfer for intervertebral disc cell therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;331(4):1185–92. DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.04.034.
55. Sato M., Asazuma T., Ishihara M. et al. An experimental study of the regeneration of the intervertebral disc with an allograft of cultured annulus fibrosus cells using a tissue-engineering method. *Spine* 2003;28(6):548–53. DOI: 10.1097/01.BRS.0000049909.09102.60.
56. Sato M., Kikuchi M., Ishihara M. et al. Tissue engineering of the intervertebral disc with cultured annulus fibrosus cells using atelocollagen honeycomb-shaped scaffold with a membrane seal (ACHMS scaffold). *Med Biol Eng Comput* 2003;41(3):365–71. DOI: 10.1097/01.BRS.0000049909.09102.60.
57. Richardson S.M., Walker R.V., Parker S. et al. Intervertebral disc cell-mediated mesenchymal stem cell differentiation. *Stem Cells* 2006;24(3):707–16. DOI: 10.1634/stemcells.2005-0205.
58. Moore R.J. The vertebral endplate: disc degeneration, disc regeneration. *Eur Spine* 2006;15(Suppl 3):333–7. DOI: 10.1007/s00586-006-0170-4.
59. Zhang Y.G., Guo X., Xu P. et al. Bone mesenchymal stem cells transplanted into rabbit intervertebral discs can increase proteoglycans. *Clin Orthop Relat Res* 2005;(430):219–26. DOI: 10.1097/01.blo.0000146534.31120.cf.
60. Tam V., Rogers I., Chan D. et al. A comparison of intravenous and intradiscal delivery of multipotential stem cells on the healing of injured intervertebral disk. *J Orthop Res* 2014;32(6):819–25. DOI: 10.1002/jor.22605.
61. Leckie S.K., Sowa G.A., Bechara B.P. et al. Injection of human umbilical tissue-derived cells into the nucleus pulposus alters the course of intervertebral disc degeneration *in vivo*. *Spine J* 2013;13(3):263–72. DOI: 10.1016/j.spinee.2012.12.004.
62. Orozco L., Soler R., Morera C. et al. Intervertebral disc repair by autologous mesenchymal bone marrow cells: a pilot study. *Transplantation* 2011;92(7):822–8. DOI: 10.1097/TP.0b013e3182298a15.
63. Lu Z.F., Doulabi Z.B., Wuisman P.I. et al. Differentiation of adipose stem cells by nucleus pulposus cells: configuration effect. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;359(4):991–6. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.06.002.
64. Hider S.L., Konstantinou K., Hay E.M. et al. Inflammatory biomarkers do not distinguish between patients with sciatica and referred leg pain within a primary care population: results from a nested study within the ATLAS cohort. *BMC Musculoskelet Disord* 2019;20(1):202. DOI: 10.1186/s12891-019-2604-2.
65. Risbud M.V., Shapiro I.M. Role of cytokines in intervertebral disc degeneration: pain and disc content. *Nat Rev Rheumatol* 2014;10(1):44–56. DOI: 10.1038/nrrheum.2013.160.
66. Evashwick-Rogler T.W., Lai A., Watanabe H. et al. Inhibiting tumor necrosis factor- $\alpha$  at time of induced intervertebral disc injury limits long-term pain and degeneration in a rat model. *JOR Spine* 2018;1(2):1014. DOI: 10.1002/jsp2.1014.
67. Ohtori S., Miyagi M., Eguchi Y. et al. Epidural administration of spinal nerves with the tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibitor, etanercept, compared with dexamethasone for treatment of sciatica in patients with lumbar spinal stenosis: a prospective randomized study. *Spine (Phila Pa 1976)* 2012;37(6):439–44. DOI: 10.1097/BRS.0b013e318238af83.
68. Okoro T., Tafazal S.I., Longworth S., Sell P.J. Tumor necrosis  $\alpha$ -blocking agent (etanercept): a triple blind randomized controlled trial of its use in treatment of sciatica. *Clinical Spine Surgery* 2010;23(1):74–7. DOI: 10.1097/BSD.0b013e31819afdc4.
69. Cohen S.P., White R.L., Kurihara C. et al. Epidural steroids, etanercept, or saline in subacute sciatica: a multicenter, randomized trial. *Ann Intern Med* 2012;156(8):551–9. DOI: 10.7326/0003-4819-156-8-201204170-00002.
70. Genevay S., Finckh A., Zufferey P. et al. Adalimumab in acute sciatica reduces the long-term need for surgery: a 3-year follow-up of a randomised double-blind placebo-controlled trial. *Ann Rheum Dis* 2012;71(4):560–2. DOI: 10.1136/annrheumdis-2011-200373.
71. Korhonen T., Karppinen J., Paimela L. et al. The treatment of disc-herniation-induced sciatica with infliximab: one-year follow-up results of FIRST II, a randomized controlled trial. *Spine (Phila Pa 1976)* 2006;31(24):2759–66. DOI: 10.1097/01.brs.0000245873.23876.1e.
72. Sainoh T., Orita S., Miyagi M. et al. Interleukin-6 and interleukin-6 receptor expression, localization, and involvement in pain-sensing neuron activation in a mouse intervertebral disc injury model. *J Orthop Res* 2015;33(10):1508–14. DOI: 10.1002/jor.22925.
73. Huang B.R., Chen T.S., Bau D.T. et al. EGFR is a pivotal regulator of thrombin-mediated inflammation in primary human nucleus pulposus culture. *Sci Rep* 2017;7(1):8578. DOI: 10.1038/s41598-017-09122-3.
74. Pan Z., Sun H., Xie B. et al. Therapeutic effects of gefitinib-encapsulated thermosensitive injectable hydrogel in intervertebral disc degeneration. *Biomaterials* 2018;160:56–68. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.01.016.

**ORCID авторов/ORCID of authors**A.B. Новикова/A.V. Novikova: <https://orcid.org/0000-0002-8104-9791>Н.Г. Правдюк/N.G. Pravdyuk: <https://orcid.org/0000-0002-9710-699X>Н.А. Шостак/N.A. Shostak: <https://orcid.org/0000-0003-4669-1006>**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.**Финансирование.** Работа выполнена без спонсорской поддержки.**Financing.** The work was performed without external funding.**Статья поступила:** 29.02.2020. **Принята к публикации:** 21.03.2020.**Article submitted:** 29.02.2020. **Accepted for publication:** 21.03.2020.