

Оглядові статті

УДК 575.191:615:616.721.1(019.941)

Генетические аспекты и возможности генной терапии дегенеративных заболеваний межпозвонковых дисков

Педаченко Е.Г., Горбатюк К.И.

ГУ «Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова АМН Украины», г. Киев

В начале 90-х годов прошлого столетия интенсивное развитие молекулярной биологии и тканевой инженерии позволило изучить влияние факторов роста на клетки межпозвонкового диска (МД). В последние несколько лет появилось большое число экспериментальных исследований, посвященных использованию факторов роста, самостоятельно или в сочетании с генной терапией для биологической регенерации МД. Изучение возможностей генной терапии становится все более интересным и перспективным, поскольку потенциально появилась возможность не только остановить прогрессирование дегенерации МД, но и регенерировать его. Показаны основные принципы и предпосылки к изучению данного метода, описаны основные экспериментальные и клинические исследования, проведенные к настоящему времени. Позитивные результаты проведенных исследований дают основание прогнозировать перспективы в хирургии дегенеративно-дистрофических заболеваний позвоночника с применением миниинвазивных технологий, что будет способствовать повышению ее эффективности.

Ключевые слова: дегенерация межпозвонкового диска, миниинвазивная хирургия, биотехнологии, факторы роста, генная терапия.

Практически все возможные хирургические методы лечения дегенеративных заболеваний позвоночника на данный момент уже исследованы, и если бы какое-то революционное открытие вложило в руки хирурга контроль над остеогенезом, ничего более значительного в хирургии позвоночника нельзя и представить

J. Charnley

Дегенеративные заболевания позвоночника (ДЗП) и обусловленные ими клинические симптомы являются ведущей причиной инвалидизации пациентов трудоспособного возраста. В течение жизни от 75 до 80% населения планеты испытывает боль в нижней части спины, 33% консультаций врача общей практики (семейного врача) связаны с болью в нижней части спины.

Остеохондроз позвоночника выявляют в основном у пациентов трудоспособного возраста, у мужчин приблизительно в 1,7 раза чаще, чем у женщин. ДЗП могут возникать и в детском возрасте, что впервые отмечено Р. Венеке в 1897 г. [6]. По данным генетических исследований, дегенеративные изменения в поясничном отделе позвоночника прослеживаются в трех поколениях — у 94,2% пациентов, в 5,8% — их обнаруживают через поколение. Частота выявления ДЗП у родителей составила 46,4%, у sibсов — 23,3% при средней частоте 0,5–3,5%. Если оба родителя страдали ДЗП, частота его возникновения у потомства составила 26%, при их отсутствии у родителей — всего 4%. В исследованиях, проведенных у монозиготных близнецов с разными факторами риска [4] установлено, что изначальное наличие генетического риска возникновения ДЗП увеличивает частоту заболевания до 6 раз по сравнению с таковой в общей популяции. У 45 монозиготных близнецов, которые в течение жизни испытывали частое вибрационное

воздействие (водители-профессионалы), не выявлена четкая ассоциация между частотой ДЗП и воздействием внешних факторов [5].

Таким образом, возникновение ДЗП в существенной степени связано с фактором генетического воздействия [33]. Все специалисты, занимающиеся ДЗП, едины во мнении, что первые признаки дегенеративного процесса начинаются в студенистом ядре МД, а изменение его структуры запускает каскад патологических механизмов, определяющих его клинические проявления [6, 9, 11, 24, 30, 39].

Дегенеративный процесс в МД ассоциируется с биохимическими и морфологическими изменениями, которые нарушают биомеханические свойства пораженного сегмента позвоночника. В норме МД состоит из экстрацеллюлярного матрикса, который делится на студенистое ядро (содержит хондроциты) и фиброзное кольцо (фибробласты). Экстрацеллюлярный матрикс обеспечивает биомеханические свойства МД, в то время как клетки в пределах этой фиброзно-хрящевой структуры синтезируют и поддерживают матрикс [3]. Матрикс МД — это совершенный корпус из макромолекул, которые притягивают и удерживают воду, основными компонентами которого являются коллагены и протеогликаны. Коллагены обеспечивают форму и эластичность, протеогликаны — упругость ткани и ее резистентность к сдавлению. Коллагеновые протеины составляют 70% состава

наружного кольца фиброзной капсулы, всего 20% их содержится в студенистом ядре. С другой стороны, максимальную концентрацию протеогликанов (50%) выявляют в студенистом ядре [39]. Течение дегенеративного процесса характеризуется заменой матрикса студенистого ядра фиброзной тканью.

Морфология МД изменяется с возрастом, дегенеративные изменения определенно выявляют, начиная с 11 лет [9]. Эти изменения включают дегидратацию, утрату целостности студенистого ядра, трещины фиброзного кольца и замыкательных пластинок. На молекулярном уровне дегенеративные изменения сопровождаются уменьшением диффузии питательных веществ и микроэлементов, снижением жизнеспособности клеток, аккумуляцией участков апоптоза, снижением активности ферментов, накоплением деградированных макромолекул матрикса, уменьшением синтеза протеогликанов, изменением распределения коллагена.

Важным пусковым механизмом дегенеративного процесса является уменьшение диффузии питательных веществ в МД, которое, в свою очередь, обусловлено изменением замыкательных пластинок, снижением рН, апоптозом клеток [30]. Наиболее значимые изменения — это прогрессирующая утрата протеогликанов, воды и коллагена II в матриксе студенистого ядра. Кроме того, ДЗП сопровождаются утратой дифференцированных хондроцитарных фенотипов в пользу фиброзных фенотипов, полной утратой протеогликанов с высокой молекулярной массой, изменениями в малых богатых лейцином протеогликанах, образованием поперечных связей коллагена. В дегенеративно-измененном МД также идентифицировано большое количество медиаторов воспаления: оксид азота (NO), интерлейкин-6 (ИЛ-6), простагландин E2 (ПГЕ2), фактор роста опухолей альфа (ФНО-альфа), фибронектин, матриксные металлопротеиназы. Роль каждого из указанных медиаторов воспаления уточняется, тем не менее, NO, ИЛ-6, ПГЕ2 являются прямыми ингибиторами синтеза протеогликанов. Медиатор воспаления ИЛ-1 играет роль в формировании протрузии (грыжи) МД и, возможно, в возникновении болевого синдрома. Существует гипотеза, что за счет ИЛ-1 нервные корешки становятся более чувствительными к давлению, возможно, вследствие обусловленной ими экспрессии ПГЕ2, фосфолипазы A2, NO, ФНО-альфа, ИЛ-6 и металлопротеиназ [19].

ФНО-альфа в дозе 1–5 нг/мл обуславливает множественный клеточный ответ, включающий уменьшение экспрессии генов синтеза коллагена II типа, увеличение экспрессии металлопротеиназ, деградацию протеогликанов, а также утрату 70% протеогликанов в студенистом ядре в течение 48 ч [32]. Баланс между синтезом, распадом и аккумуляцией матриксных макромолекул определяет качество и целостность матрикса и, таким образом, механические свойства самого МД.

Генетическими факторами риска возникновения ДЗП являются полиморфизм гена рецептора витамина D (FokI и TagI), который обуславливает появление остеопороза, остеоартрита и др. По данным обследования 205 добровольцев и пациентов в возрасте от

20 до 29 лет установлено, что Tt генотип TagI полиморфизма чаще ассоциируется с многоуровневым поражением МД, более выраженной дегенерацией и степенью протрузии МД, чем TT генотип [12]. Интересно, что наличие фактора риска t-аллели различно в зависимости от национальной принадлежности: у азиатов — 8%, африканцев — 31%, кавказцев (европейцев) — 43% [35].

Мутация альфа-2 связи в гене коллагена IX (Trp2 аллель) также отнесена к генетическим факторам риска возникновения ДЗП. Установлена прямая зависимость наличия Trp2 аллели и структурных изменений МД с коэффициентом 2,4 — для протрузии и 4,0 — грыжи МД. Также отмечена ассоциация частоты выявления Trp2 аллели в популяции в зависимости от этнической принадлежности: от 4% — у финнов до 20% — у жителей южной части Китая. Механизм влияния Trp2 аллели как фактора риска возникновения ДЗП не изучен, но определенно коллаген IX и фактор риска Trp2 ассоциируются с дегенеративным поясничным спинальным стенозом [18].

COL1A1 ген кодирует альфа-1 цепь молекулы коллагена I — наиболее распространенного в организме человека типа коллагена [16]. Коллаген I присутствует в фиброзном кольце МД, обеспечивая его стабильность на растяжение.

Тактика как консервативного? так и хирургического лечения ДЗП предусматривает уменьшение выраженности клинических симптомов заболевания, не оказывая влияния на патогенетические факторы дегенеративного процесса. Возможность замедлить прогрессирование или достичь частичного регресса каскада дегенеративных изменений с помощью биологических манипуляций является перспективной темой для исследования. Возможности лечения ДЗП на молекулярном уровне расширились с установлением терапевтического эффекта генов и успешным использованием в клинике факторов роста для эффективного спондилодеза.

Генная терапия, впервые предложенная T. Friedmann, R. Roblin [15], включает перенос (трансфер) генетического материала (ДНК или РНК) в клетку-цель для продукции необходимого терапевтического средства [1]. Трансфер генетического материала может быть полезным при лечении врожденных генетически обусловленных заболеваний, детерминированных ошибкой в одном гене. Изучаются возможности генной терапии злокачественных, сердечно-сосудистых заболеваний, а также ДЗП. В качестве транспорта для генов используют векторы («переносчики»), которые разделяют на вирусные и невирусные. Вирусы достаточно хорошо выполняют роль переносчика генетического материала благодаря их способности проникать непосредственно в клетку, завладеть репликацией ДНК, транскрипцией и трансляцией, другими словами, вирусный вектор представляет «тройского коня» для внутриклеточной доставки гена (*рис. 1*).

Вирусные векторы разделяют [10] на:

– ретровирусные — при внедрении в клетку-цель ретровирусная РНК включается в геном реципиента. Преимуществом использования ретровируса

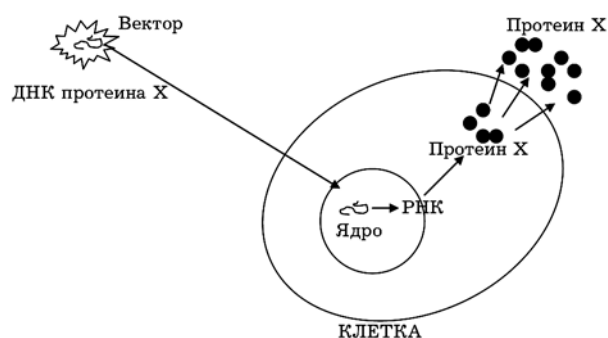


Рис. 1. Принцип генной терапии.

является то, что он эффективно переносит нужный ген в хромосомы реципиента;

– аденовирусные — в отличие от ретровируса, несут ДНК, не проникают в клетку. Аденовирус является эффективным вектором, может нести в клетку-реципиенту генетического материала в 4 раза больше, чем ретровирус. Одна из основных проблем при использовании аденовируса — это короткое время трансгенной экспрессии, наличие ДНК в эписомальном, а не в интегрированном в ДНК реципиента состоянии, что ограничивает экспрессию продолжительностью жизни клетки-реципиента, поскольку ДНК в эписомальной форме не передается дочерним клеткам. Кроме того, аденовирус продуцирует аденовирусные протеины, что обуславливает как клеточный, так и генерализованный иммунный ответ, поэтому его можно использовать только однократно;

– адено-ассоциированный вирус — парвовирус, интегрирует свою ДНК в гостевую хромосому, а именно в специфическое место, локализованное в хромосоме 19. Как и аденовирус, адено-ассоциированный вирус способен проникать в неделящиеся клетки. Недостатком использования вектора этого типа является неспособность переносить достаточное количество генетического материала, а также его достаточно сложное производство.

Невирусные векторы для облегчения входа генетического материала в клетку-цель используют физико-химические субстраты. Они более стабильны в химическом отношении, чем вирусные, кроме того, могут переносить генетический материал любого объема, не вызывают иммунного ответа, их можно вводить неоднократно. Недостатки их применения: низкая эффективность трансфекции, а также короткая продолжительность экспрессии по сравнению даже с таковой эписомальной ДНК. Выделяют следующие невирусные векторы [10]:

– плазмиды — свободные ДНК-структуры, несут гены, необходимые для выработки бактериями резистентности к антибиотикам. Не все клетки-цели воспринимают вектор этого типа, поэтому их сочетают с оболочкой для упрощения контакта донорской ДНК с клеткой-целью, что способствовало появлению «ген-активированного матрикса» (ГАМ). ГАМ успешно используют для лечения переломов у кролей и собак;

– катионические липосомы — внедряют ДНК в гостевую клетку благодаря «прилипанию» к ее мембране. Могут переносить большой объем генетического материала, но их эффективность по сравнению с таковой вирусных векторов значительно ниже;

– ДНК-лиганды — комплексы ДНК и белка, которые воспринимают рецепторы клеточной мембраны. Как только белковая часть связывается с мембраной, ДНК попадает внутрь клетки благодаря фагоцитозу;

– принцип генной пушки. Метод появился в начале 90-х годов прошлого столетия, основан на проникновении в клетку-цель мельчайших крупиц металла, поверхность которого покрыта генетическим материалом (ДНК). Крупицы металла разгоняют с помощью электричества или давления, что позволяет им проникать внутрь клетки-реципиента. Недостатки — непродолжительная экспрессия гена, возможность цитотоксического воздействия металла на цитозоль.

Существуют два принципа генной терапии: *in vivo* и *ex vivo*. Принцип *in vivo* предусматривает непосредственное введение терапевтического гена в организм. В основном в методе *in vivo* используют аденовирус. Альтернативный принцип *ex vivo* более сложен, чем *in vivo*. Он включает биопсию клеток реципиента, размножение клеток *in vitro*, трансфер гена в клеточную культуру, начало выработки клетками терапевтического агента, после чего производят имплантацию данной клеточной культуры. Метод сложен, но более безопасен, поскольку нет непосредственного контакта организма с вирусом или свободной цепью ДНК. Кроме того, экспрессия гена *in vitro* более контролируема, позволяет максимально эффективно интегрировать терапевтический ген в хромосомы растущих клеток реципиента. Основным недостатком метода *ex vivo* является длительность выращивания клеточной культуры и более дорогой процесс лечения.

Использование генной терапии в лечении ДЗП является перспективным направлением [13, 14, 27]. Так, Р. Wehling и соавторы [37], используя ретровирус, впервые показали успешный трансфер двух разных генов — бактериальной галактозидазы (*lacZ*) и антагониста рецептора ИЛ-1 (ИЛ-1Ra) — в культивированные хондроциты крупного рогатого скота. При переносе ИЛ-1Ra ДНК отмечена значительная продукция ИЛ-1Ra в сроки наблюдения до 48 ч.

К. Nishida и соавторы [26] успешно осуществили первый трансфер *in vivo* генетического материала в МД кроля. Отмечены трансдукция и трансгенная экспрессия *lacZ* маркер-гена в клетки студенистого ядра с использованием аденовирусного вектора. Через 3 мес после трансдукции наблюдали поддерживающую экспрессию без снижения концентрации синтезируемого протеина. Только через 1 год после трансдукции авторы отметили отсутствие экспрессии трансгенного протеина. Получив предварительные положительные результаты, они осуществили *in vivo* трансдукцию МД фактором роста TGF- β 1 с помощью аденовирусного вектора [25]. В течение 30

сут наблюдали увеличение активного TGF- β 1 синтеза в инъектированных МД приблизительно в 5 раз по сравнению с таковым в контроле. При сравнении с контрольной группой интактных дисков также отмечено увеличение синтеза протеогликанов почти вдвое. Как и в предыдущем исследовании, авторы не отметили клеточного или системного иммунного ответа даже через 1 год после вмешательства, что подтверждает существующий концептуальный подход к МД как к «иммуно-привилегированному».

На основе успешных результатов генного трансфера с клетками МД у кроля аналогичные эксперименты начали проводить с использованием клеток студенистого ядра человека. Впервые успешный перенос lacZ маркер-гена с использованием аденовирусного вектора был осуществлен в 2000 г. [21]. Авторы наблюдали одинаковый уровень экспрессии как в пораженных, так и в дегенеративно-измененных МД, что свидетельствовало об отсутствии прямой зависимости уровня экспрессии от степени выраженности дегенерации МД. В последующем, используя тот же аденовирусный вектор, авторы сравнили результаты синтеза протеина при использовании одного фактора роста и генного коктейля, включавшего BMP-2, TGF- β 1, IGF-1 [22]. При изменении комбинированной терапии синтез протеина существенно увеличился — соответственно на 295, 398 и 471% при применении одного, двух и трех генов факторов роста.

T. Matsumoto и соавторы [20] опубликовали результаты трансдукции гена для синтеза факторов роста OP-1 в клетки МД крупного рогатого скота методом генной пушки. После трансфекции OP-1 геном клетки синтезировали протеогликаны в большей степени, чем контрольные клетки — 124% клетки фиброзного кольца и 144% — студенистого ядра.

S. Moon и соавторы [23] представили данные исследования трансдукции Ad-TGF- β 1 в клетки МД, синтез протеогликанов и коллагена увеличился на 300% по сравнению с таковым в контроле. Увеличение продукции матрикса было больше, чем при использовании примененного *ex vivo* TGF- β 1. Увеличение анаболизма было не следствием введения аденовирусного вектора, а результатом работы доставленного гена. Интересно, что доза вируса, необходимая для увеличения синтеза протеогликана, была существенно меньше, чем доза, необходимая для 100% трансдукции клеток, возможно, благодаря появлению возможности в трансдуцированных клетках влиять на биологическую активность соседних, интактных клеток. Этот эффект назван паракринным, он свидетельствует, что для достижения достаточного синтеза нужного протеина можно использовать небольшое число трансдуцированных клеток.

Sox9 ген — один из наиболее значимых факторов синтеза коллагена II, его также считают одним из перспективных факторов стимуляции регенерации при ДЗП. R. Paul и соавторы [28] сообщили об успешном переносе Sox9 ДНК аденовирусным вектором в клетки дегенеративно-измененного МД человека с последующим увеличением количества РНК Pro α 1(II) и, соот-

ветственно, увеличением синтеза коллагена II. Авторы также вводили аденовирус, несущий Sox9 ген, в поврежденный МД и отметили сохранение фенотипа хондроцитов и структуры студенистого ядра через 5 недель после инъекции по сравнению с таковым в контроле.

LIM mineralization protein-1 (LMP-1) впервые описан S. Boden и соавторами [7] как необходимый регулятор дифференциации остеобластов. С помощью аденовирусного вектора LMP-1 трансдуцировали в клетки дегенеративно-пораженного МД крысы, отмечено существенное (до 260%) увеличение синтеза протеогликанов. Этот же протеин использовали в генной терапии в целях осуществления спондиллодеза в эксперименте *in vivo* [8].

Одним из направлений генной терапии является ингибирование катаболических процессов, возникающих в МД. При аденовирусном трансфере эндогенного ингибитора матриксных металлопротеиназ (TIMP-1) отмечено увеличение концентрации протеогликанов в клетках студенистого ядра при ДЗП [36].

В многочисленных исследованиях установлены различные факторы роста костной ткани и их способность к эффективному спондиллодезу. Применение генной терапии с длительной продукцией факторов роста в конкретном месте открывает следующий шаг к совершенствованию биотехнологии спондиллодеза [31, 38].

T.D. Alden и соавторы [2] использовали *in vivo* у крыс методику с применением Adv-BMP-2 для достижения спондиллодеза. В исследование включены 12 крыс, которым параспинально в область пояснично-крестцового соединения вводили Adv-BMP-2. Через 12 нед у всех животных в месте инъекции препарата по данным гистологического исследования отмечено формирование костной ткани. Аналогичный результат достигнут G.A. Helm и соавторами [17], которые использовали такую же методику — аденовирусный вектор, но с геном BMP-9 фактора, который вводили в параспинальную мышечную ткань 8 крысам. Отмечено формирование костной ткани в месте инъекции.

D. Riew и соавторы [29] исследовали возможность осуществления эффективного миниинвазивного спондиллодеза с помощью генной терапии в грудном отделе позвоночника у млекопитающих. Авторы изолировали мезенхимальные стволовые клетки 3 свиней, вырастили клеточную культуру, которую трансдуцировали с помощью аденовирусного вектора, несущего ген BMP-2 (Adv-BMP-2), или β -галактозидазы (Adv- β gal). С использованием торакоскопической методики удален 1 см³ ткани МД на четырех уровнях, после чего каждому животному пункционно вводили в 2 диска клеточную культуру, трансдуцированную Adv-BMP-2, в третий диск — Adv- β gal, четвертый уровень служил контролем. В результате, в дисках, в которые введен Adv-BMP-2, отмечено значительное увеличение синтеза BMP-2, повышение активности щелочной фосфатазы, а также увеличение концентрации коллагена I типа по сравнению с этими показателями при введении Adv- β gal и в контроле. Кроме того, уровень минерализации матрикса, остеопонтин

к 18-м суткам в дисках, в которые введен Adv-BMP-2, был существенно выше, чем в дисках, в которые введен Adv- β gal, и в контроле. По данным компьютерной томографии отмечено формирование внутри диска костного мостика от выше- к нижележащей замыкательной пластинке после введения Adv-BMP-2. В дисках, в которые введен Adv- β gal и в контрольных формирование костной структуры не обнаружено. Таким образом, установлено успешное использование генной терапии для проведения эффективного миниинвазивного спондилодеза. В ранее проведенных исследованиях показана неэффективность использования внутридискового введения BMP-2 в свободном виде для достижения спондилодеза.

S. Boden и соавторы [8] в эксперименте у 12 крыс исследовали возможность экспрессии LMP-1 гена (ДНК-невирусный вектор) в дополнение к стабилизации на уровне грудного и поясничного отделов позвоночника использовали обычные имплантаты и имплантаты с экспрессией LMP-1 гена. В месте применения имплантата с экспрессией LMP-1 гена наблюдали эффективный спондилодез с формированием новой костной ткани. При использовании обычного имплантата формирование костной ткани не обнаружено. Применение свободной ДНК LMP-1 гена по методике *in vivo* оказалось успешным и на модели у кролей.

Позвоночник является той зоной в организме человека, в которой выполнение артродеза предпочтительнее, чем артропластики. Несмотря на многочисленные разработки новых инструментов, новых видов оперативных вмешательств, обеспечение достаточного спондилодеза проблематично почти в 40% наблюдений [34]. Внедрение современных биотехнологий позволяет использовать менее инвазивные и более эффективные методы, чем общепринятые оперативные вмешательства. Генная терапия может быть перспективным методом в спинальной хирургии нынешнего столетия.

Список литературы

- Adam S., Chadderdon R., Gilberts L. et al. Gene therapy approaches for intervertebral disc degeneration // *Spine*. — 2004. — V.29. — P.2770-2778.
- Alden T.D., Pittman D.D., Beres E.J. et al. Percutaneous spinal fusion using bone morphogenetic protein-2 gene therapy // *J. Neurosurg.* — 1999. — V.90. — P.109-114.
- An H., Thonar E., Masuda K. Biological repair of intervertebral disc // *Spine*. — 2003. — V.28. — P.86-92.
- Battie M.C., Videman T. Lumbar disc degeneration: epidemiology and genetics // *J. Bone Jt. Surg.* — 2006. — V.88. — P.3-9.
- Battie M.C., Videman T., Gibbons L.E. Determinants of lumbar disc degeneration. A study relating lifetime exposures and magnetic resonance imaging findings in identical twins: 995 Volvo Award in clinical sciences // *Spine*. — 1995. — V.20. — P.2601-2612.
- Beneke R. Zur lehre von der spondylitis deformans // *Versammlung deutscher Naturforscher und arzte*. — 1897. — H.4. — S.69.
- Boden S.D., Liu Y., Hair G. et al. LMP-1, a LIM-domain protein, mediates BMP-6 effects on bone formation // *Endocrinology*. — 1998. — V.139. — P.5125-5134.
- Boden S.D., Titus L., Hair G. et al. Lumbar spine fusion by local gene therapy with a cDNA encoding a novel osteoinductive protein (LMP-1) // *Spine*. — 1998. — V.23. — P.2486-2492.
- Boos N., Weissbachs S., Rohrbach H. Classification of age-related changes in lumbar intervertebral discs: 2002 Volvo award // *Spine*. — 2002. — V.27. — P.2631-2644.
- Cha Ch., Boden S. Gene therapy applications for spine fusion // *Spine*. — 2003. — V.28. — P.74-84.
- Chan D., Song Y., Sham P. et al. Genetics of disc degeneration // *Eur. Spine J.* — 2006. — V.15, suppl.3. — P.317-325.
- Cheung K.M., Chan D., Karppinen J. Association of the TaqI allele in vitamin D receptor with degenerative disc disease and disc bulge in Chinese // *Spine*. — 2006. — V.31. — P.1141-1148.
- Corey J., Gilbertson L., Kang J. Gene therapy applications for intervertebral disc degeneration // *Spine*. — 2003. — V.28. — P.93-98.
- Evans Ch. Potential biologic therapies for the intervertebral disc // *J. Bone Jt. Surg.* — 2006. — V.88. — P.95-98.
- Friedmann T., Roblin R. Gene therapy for human genetic disease? // *Science*. — 1972. — V.175. — P.949-955.
- Grant S.F., Reid D.M., Blake G. Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Spl binding site in the collagen type I alpha 1 gene // *Nat. Genet.* — 1996. — V.14. — P.203-205.
- Helm G.A., Aiden T.D., Beres E.J. et al. Use of bone morphogenetic protein-9 gene therapy to induce spinal arthrodesis in the rodent // *J. Neurosurg.* — 2000. — V.92. — P.191-196.
- Jim J.J., Noponen-Hietala N., Cheung K.M. The TRP2 allele of COL9A2 is an age dependent risk factor for the development and severity of intervertebral disc degeneration // *Spine*. — 2005. — V.30. — P.2735-2742.
- Kang J.D., Georgescu H.I., Intyre-Larkin L. Herniated lumbar intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinases, nitric oxide, interleukine-6, and prostaglandin E2 // *Spine*. — 1996. — V.21. — P.271-277.
- Matsumoto T., Masuda K., Chen S. et al. Transfer of osteogenic protein-1 gene by gene gun system promotes matrix synthesis in bovine intervertebral disc and articular cartilage cells // *Orthop. Res. Soc.* — 2001. — V.30. — P.849-876.
- Moon S.H., Gilbertson L.G., Nishida K. et al. Human intervertebral disc cells are genetically modifiable by adenovirus-mediated gene transfer // *Spine*. — 2000. — V.25. — P.2573-2579.
- Moon S.H., Nishida K., Gilbertson L.G. et al. Biologic response of human intervertebral disc cell to gene therapy cocktail // *Orthop. Res. Soc.* — 2001. — V.30. — P.883-886.
- Moon S.H., Nishida K., Gilbertson L.G. et al. Responsiveness of human intervertebral disc cells to adenovirus mediated transfer of TGF- β 1 cDNA in 2D and 3D culture systems: Comparison to exogenous TGF- β 1 // *Abstr. Intern. Society for the Study of the Lumbar Spine*. — Adelaide (Australia), 2002. — P.145-146.
- Neidlinger-Wilke C., Wurtz K., Urban J. et al. Regulation of gene expression in intervertebral disc cells by low and high hydrostatic pressure // *Eur. Spine J.* — 2006. — V.15, suppl.3. — P.372-378.
- 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*. — 1999. — V.24. — P.2419-2425.

26. Nishida K., Kang J.D., Suh J.K. et al. Adenovirus-mediated gene transfer to nucleus pulposus cells. Implications for the treatment of intervertebral disc degeneration // *Spine*. — 1999. — V.23. — P.2437–2442.
27. Nishida K., Gilbertson L.G., Robbins P. D. et al. Potential applications of gene therapy to the treatment of intervertebral disc disorders // *Clin. Orthop. Relat. Res.* — 2000. — N.379. — P.234–241.
28. Paul R., Haydon R., Ishikawa A. Potential use of Sox9 gene therapy for intervertebral degenerative disc disease // *Spine*. — 2003. — V.28. — P.755–763.
29. Riew D., Lou J., Wright N. et al. Thoracoscopic intradiscal spine fusion using a minimally invasive gene-therapy technique // *J. Bone Jt. Surg.* — 2003. — V.85. — P.866–871.
30. Roughley P.J. Parameters that influence change in nucleus pulposus composition // *Spine*. — 2004. — V.29. — P.2691–2699.
31. Sandhu H., Boden S., Kang J. et al. BMP's and gene therapy for spinal fusion (summary statement) // *Spine*. — 2003. — V.28. — P.85.
32. Seguin C.A., Pilliar R.M., Roughley P.J. et al. Tumor necrosis factor (alpha) modulates matrix production and catabolism in nucleus pulposus tissue // *Spine*. — 2005. — V.30. — P.1940–1948.
33. Solovieva S., Lohiniva J., Leino-Arjas P. COL9A3 gene polymorphism and obesity in intervertebral disc degeneration of the lumbar spine: evidence of gene-environment interaction // *Spine*. — 2002. — V.27. — P.2691–2696.
34. Steinmann J.C., Herkowitz H.N. Pseudarthrosis of the spine // *Clin. Orthop.* — 1992. — V.284. — P.80–90.
35. Uitterlinden A.G., Fang Y., van Meurs J.B. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms // *Gene*. — 2004. — V.338. — P.143–156.
36. Wallach C.J., Sobajima S., Watanabe Y. Gene transfer of the catabolic inhibitor TIMP-1 increases measured proteoglycans in human intervertebral disc cells // *Abstr. Intern. Society for the Study of the Lumbar Spine*. — Cleveland, Ohio, 2002. — P.67.
37. 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*. — 1997. — V.22. — P.1092–1097.
38. Yoo J.U., Mandell I., Angele P. et al. Chondrogenitor cells and gene therapy // *Clin. Orthop. Relat. Res.* — 2000. — N.379. — P.164–170.
39. Yoon T.S., Patel N. Molecular therapy of the intervertebral disc // *Eur. Spine J.* — 2006. — V.15, suppl.3. — P.379–388.

Генетичні аспекти та можливості генної терапії дегенеративних захворювань міжхребцевих дисків

Педаченко Є.Г., Горбатюк К.І.

На початку 90-х років минулого сторіччя інтенсивний розвиток молекулярної біології та тканинної інженерії дав можливість вивчити вплив факторів росту на клітини міжхребцевого диска (МД). В останні кілька років з'явилися численні експериментальні дослідження, присвячені використанню факторів росту, як самостійно, так і в поєднанні з генною терапією для біологічної регенерації МД. Вивчення можливостей генної терапії стає все більш цікавим та перспективним, оскільки потенційно з'явилася можливість не тільки припинити прогресування дегенерації МД, а й регенерувати його. Показані основні принципи та передумови до вивчення даного методу, описані основні експериментальні та клінічні дослідження, проведені до теперішнього часу. Позитивні результати проведених досліджень дають підстави прогнозувати перспективи в хірургії дегенеративно-дистрофічних захворювань хребта з застосуванням мініінвазивних технологій, що сприятиме підвищенню її ефективності.

Gene therapy genetic aspects and possibilities for degenerative diseases of intervertebral disks treatment

Pedachenko E.G., Horbatiuk K.I.

At the beginning of 90th past century, due to intensive development of molecular biology and tissue engineering, knowledge accumulation about growth factors influence on the intervertebral disc cells, became possible. For the last few years, there were made a lot of experimental works dedicated to the growth factors, and their combination with gene therapy for intervertebral disc biological regeneration. The study of gene therapy possibilities becomes more interesting and perspective, as potentially becomes possible not only to stop the progress of intervertebral disc degeneration, but also to its regeneration. We showed basic principles and pre-conditions for this method study, and also described the main experimental and clinical research studies. Positive results of the investigations enabled to forecast the changes in spine degenerative diseases surgery in the future, making it less invasive and more effective.