ISSN 0869-6047 (Print)
ISSN 2414-3545 (Online)

# ВЕСТНИК РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ МЕДИЦИНСКИХ НАУК

ANNALS OF THE RUSSIAN ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES

5

Online версия журнала
http://vestnikramn.spr-journal.ru

2016; 71 (5)

ISSN 0869-6047 (Print)
ISSN 2414-3545 (Online)

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК**

# ВЕСТНИК РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ МЕДИЦИНСКИХ НАУК

*Научно-теоретический журнал. Выходит один раз в два месяца. Основан в 1946 г.*

Входит в Перечень ведущих научных журналов и изданий ВАК.
Индексируется в базах данных: Elsevier BV Scopus, Pub Med, Embase, EBSCO, Russian Science Citation Index.
Учредитель — Российская академия медицинских наук

Главный редактор И.И. ДЕДОВ

**РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:**
Э.К. АЙЛАМАЗЯН, А.И. АРЧАКОВ, Л.И. АФТАНАС, А.А. БАРАНОВ, В.В. БЕРЕГОВЫХ (зам. гл. редактора), Л.А. БОКЕРИЯ, Н.Н. ВОЛОДИН, Н.Ф. ГЕРАСИМЕНКО, Е.К. ГИНТЕР, П.В. ГЛЫБОЧКО, Е.З. ГОЛУХОВА, В.В. ЗВЕРЕВ, Р.С. КАРПОВ, С.И. КОЛЕСНИКОВ, В.В. КУХАРЧУК. Г.А. МЕЛЬНИЧЕНКО, Н.А. МУХИН, Е.Л. НАСОНОВ, Г.Г. ОНИЩЕНКО, В.И. ПЕТРОВ, В.И. ПОКРОВСКИЙ, В.П. ПУЗЫРЁВ, В.Г. САВЧЕНКО, В.И. СЕРГИЕНКО, Г.А. СОФРОНОВ, В.И. СТАРОДУБОВ, Г.Т. СУХИХ, В.А. ТУТЕЛЬЯН (зам. гл. редактора), И.Б. УШАКОВ, Р.М. ХАИТОВ, Е.И. ЧАЗОВ, В.П. ЧЕХОНИН, В.И. ЧИССОВ, Е.В. ШЛЯХТО

**НАУЧНЫЙ РЕДАКТОР:** А.А. КУБАНОВ

2016/том 71/№5

Журнал «Вестник Российской академии медицинских наук» зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций 16.09.1992 г. Регистрационный номер 01574.

Редакция не несет ответственности за содержание рекламных материалов.
Воспроизведение или использование другим способом любой части издания без согласия редакции является незаконным и влечет за собой ответственность, установленную действующим законодательством РФ

Тираж 1000 экз. Подписные индексы: в агентстве Роспечать — 71488, в агентстве «Пресса России» — 38814

Издательство «ПедиатрЪ»: 119991, Москва, Ломоносовский пр-т, 2/62, тел./факс: +7 (499) 132-30-43, http://vestnikramn.spr-journal.ru
e-mail: vestnikramn@nczd.ru
ООО «ХОМОПРИНТ»: 117623, Москва, ул. Типографская, д. 10

ISSN 0869-6047 (Print)
ISSN 2414-3545 (Online)

THE RUSSIAN ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES

# ANNALS OF THE RUSSIAN ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES

*Published bimonthly. Founded in 1946.*

The Journal is in the List of the leading scientific journals and publications of the Supreme Examination Board (VAK).
The journal is indexed in Elsevier BV Scopus, Pub Med, Embase, EBSCO, Russian Science Citation Index.
Founder — The Russian Academy of Medical Sciences

Editor-in-chief I.I. Dedov

**EDITORIAL BOARD:**
E.K. AILAMAZYAN, A.I. ARCHAKOV, L.I. AFTANAS, A.A. BARANOV, V.V. BEREGOVYKH (deputy editors-in-chief), L.A. BOKERIYA, N.N. VOLODIN, N.F. GERASIMENKO, E.K. GINTHER, P.V. GLYBOCHKO, L.Z. GOLUKHOVA, V.V. ZVEREV, R.S. KARPOV, S.I. KOLESNIKOV, V.V. KUKHARCHUK, G.A. MELNICHENKO, N.A. MUKHIN, E.L. NASONOV, I.I. ONISHCHENKO, V.I. PETROV, V.I. POKROVSKII, V.P. PUZYREV, V.G. SAVCHENKO, V.I. SERGIENKO, G.A. SOFRONOV, V.I. STARODUBOV, G.T. SUKHIKH, V.A. TUTELYAN (deputy editors-in-chief), I.B. USHAKOV, R.M. KHAITOV, E.I. CHAZOV, V.P. CHEKHONIN, V.I. CHISSOV, E.V. SHLYAKHTO

**SCIENCE EDITOR:** A.A. KUBANOV

2016/ 71 (5)

Mass media registration certificate dated September, 16, 1992. Series № 01574 Federal service for surveillance over non-violation of the legislation in the sphere of mass communications and protection of cultural heritage.

Editorial office takes no responsibility for the contents of advertising material.
No part of this issue may be reproduced without permission from the publisher. While reprinting publications one must make reference to the journal « Annals of The Russian Academy of Medical Sciences »

Edition 1000 copies. Subscription indices are in the catalogue «Rospechat» 71488

Publisher «PEDIATR»: 2/62, Lomonosov avenue, Moscow, 119991, tel./fax: +7 (499) 132-30-43, http://vestnikramn.spr-journal.ru
e-mail: vestnikramn@nczd.ru
Printed in the printing office «KHOMOPRINT», 10, Tipografskaya st., Moscow, 117623

## СОДЕРЖАНИЕ


### АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ АНЕСТЕЗИОЛОГИИ И РЕАНИМАТОЛОГИИ

***М.Б. Ярустовский, М.В. Абрамян, Е.В. Комардина***
Методы молекулярной трансфузиологии в педиатрической интенсивной терапии критических состояний после кардиохирургических операций

### АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

***Н.А. Зенинская, А.В. Колесников, А.К. Рябко, И.Г. Шемякин, И.А. Дятлов, А.В. Козырь***
Аптамеры для терапии бактериальных инфекций: проблемы и перспективы

### АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ КЛЕТОЧНОЙ ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

***В.А. Бывальцев, И.А. Степанов, Л.А. Бардонова, Е.Г. Белых***
Использование стволовых клеток в терапии дегенерации межпозвонкового диска

### АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ МИКРОБИОЛОГИИ

***А.П. Пикина, А.Н. Шкопоров, Е.В. Кулагина, Е.В. Хохлова, А.В. Чаплин, Н.Н. Володин, Л.И. Кафарская, Н.Г. Короткий, Б.А. Ефимов***
Сравнительное генетическое типирование изолятов *Staphylococcus aureus*, выделенных с поверхности кожи, из носовой полости и кишечника у детей, страдающих атопическим дерматитом

### АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ НЕВРОЛОГИИ И НЕЙРОХИРУРГИИ

***В.А. Бывальцев, А.А. Калинин, А.К. Оконешникова, Т.Т. Керимбаев, Е.Г. Белых***
Фасеточная фиксация в комбинации с межтеловым спондилодезом: сравнительный анализ и клинический опыт нового способа хирургического лечения пациентов с дегенеративными заболеваниями поясничного отдела позвоночника


## CONTENTS


### ANAESTHESIOLOGY AND CRITICAL CARE MEDICINE: CURRENT ISSUES

341 ***M.B. Yaroustovsky, M.V. Abramyan, E.V. Komardina***
Methods of Molecular Transfusion in Intensive Care of Critical States in Pediatric Postoperative Cardiac Surgery Patients

### INFECTIOUS DISEASES: CURRENT ISSUES

350 ***N.A. Zeninskaya, A.V. Kolesnikov, A.K. Ryabko, I.G. Shemyakin, I.A. Dyatlov, A.V. Kozyr***
Aptamers in the Treatment of Bacterial Infections: Problems and Prospects

### CELL TRANSPLANTOLOGY AND TISSUE ENGINEERING: CURRENT ISSUES

359 ***V.A. Byvaltsev, I.A. Stepanov, L.A. Bardonova, E.G. Belykh***
The Use of Stem Cells in the Treatment of Intervertebral Disc Degeneration

### MICROBIOLOGY: CURRENT ISSUES

367 ***A.P. Pikina, A.N. Shkoporov, E.V. Kulagina, E.V. Khokhlova, A.V. Chaplin, N.N. Volodin, L.I. Kafarskaya, N.G. Korotkiy, B.A. Efimov***
Comparative Genotyping of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Skin Lesions, Nasal Cavities, and Feces of Children with Atopic Dermatitis

### NEUROLOGY AND NEUROSURGERY: CURRENT ISSUES

375 ***V.A. Byvaltsev, A.A. Kalinin, A.K. Okoneshnikova, T.T. Kerimbayev, E.G. Belykh***
Facet Fixation Combined with Lumbar Interbody Fusion: Comparative Analysis of Clinical Experience and A New Method of Surgical Treatment of Patients with Lumbar Degenerative Diseases

## АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ПСИХОЛОГИИ И ПСИХИАТРИИ

***В.А. Шаркова, И.А. Ковалёв, А.Ю. Шиванова***
Мониторинг аутоантител к нейроспецифическим белкам при различных состояниях опийной наркомании

## PSYCHOLOGY AND PSYCHIATRY: CURRENT ISSUES

385 ***V.A. Sharkova, I.A. Kovalev, A.Yu. Shivanova***
Autoantibodies to Neuropeptides in the Different States of Opium Addiction

## АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ОНКОЛОГИИ

***А.В. Караулов, Н.Н. Гурина, Д.В. Новиков, С.Г. Фомина, В.В. Новиков***
Роль экспрессии белка MUC1 в прогрессии опухоли

## ONCOLOGY: CURRENT ISSUES

392 ***A.V. Karaulov, N.N. Gurina, D.V. Novikov, S.G. Fomina, V.V. Novikov***
Role of MUC1 Expression in Tumor Progression

## СОСТОЯНИЕ МЕДИЦИНСКОЙ НАУКИ

***Н.В. Александрова, М.А. Школьникова, В.В. Длин, М.Т. Югай***
Стимулирование научных исследований в биомедицине. Роль эффективного контракта

## STATE OF MEDICAL SCIENCES

397 ***N.V. Aleksandrova, M.A. Shkolnikova, V.V. Dlin, M.T. Yugay***
Stimulation of Research in Biomedicine. Role of Effective Contract

## ЮБИЛЕИ

***Николай Васильевич Медуницын***
***Юрий Петрович Пивоваров***

## ANNIVERSARIES, CONGRATULATIONS

406 ***Nikolay Vasilevich Medunitsyn***
407 ***Yuriy Petrovich Pivovarov***

DOI: 10.15690/vramn709

**М.Б. Ярустовский, М.В. Абрамян, Е.В. Комардина**

Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева , Москва, Российская Федерация

# Методы молекулярной трансфузиологии в педиатрической интенсивной терапии критических состояний после кардиохирургических операций

*В последние годы в клинической практике педиатрических отделений интенсивной терапии все шире стали применяться методы молекулярной трансфузиологии, в первую очередь у детей, находящихся в критическом состоянии. Учитывая анатомо-физиологические особенности детского организма, выраженную тяжесть и быстрое прогрессирование полиорганных нарушений, проблема показаний, выбора методов и своевременного начала экстракорпоральной гемокоррекции является ключевой и определяющей результаты лечения. Сегодня наряду со всем спектром методик заместительной почечной терапии у детей успешно начали применяться процедуры альбуминового диализа и высокообъемного плазмафереза при острой дисфункции печени, экстракорпоральной мембранной оксигенации — при бивентрикулярной сердечной и/или дыхательной недостаточности; внедряются методики селективной сорбции эндотоксина при тяжелом грамотрицательном сепсисе.*

***Ключевые слова**: экстракорпоральная гемокоррекция, острое почечное повреждение, острая печеночная недостаточность, экстракорпоральная мембранная оксигенация, сепсис.*

***(Для цитирования:** Ярустовский М.Б., Абрамян М.В., Комардина Е.В. Методы молекулярной трансфузиологии в педиатрической интенсивной терапии критических состояний после кардиохирургических операций. *Вестник РАМН*. 2016;71(5):341–349. doi: 10.15690/vramn709)*



## Актуальность

В последние годы в клинической практике педиатрических отделений интенсивной терапии все шире стали применяться методы молекулярной трансфузиологии, в первую очередь у детей, находящихся в критическом состоянии. Раннее считалось, что использование методов гемокоррекции в отделении интенсивной терапии сопряжено только с лечением острого почечного повреждения (ОПП). Известно, что у детей ОПП остается одним из серьезных осложнений, особенно в кардиохирургической практике, продлевая время пребывания пациента в реанимационном отделении до 3–4 нед и повышая летальность до 50–90% [1]. Однако лишь у 15% детей в отделении интенсивной терапии наблюдается изолированное нарушение функции почек, чаще их острая дисфункция встречается как составляющая синдрома полиорганной недостаточности [2]. Правильный выбор эффективных методов протекции и замещения нарушенных функций органов, нацеленный на коррекцию водно-электролитного и метаболического дисбаланса, уменьшение проявлений эндо- и экзотоксикозов, а также других нарушений гомеостаза позволяет повысить выживаемость детей в критически тяжелом состоянии.

Специфическую когорту пациентов составляют дети, перенесшие открытые операции на сердце с использованием искусственного кровообращения. Примерно десятая часть этих пациентов в связи с развитием полиорганной недостаточности и инфекционно-септических осложнений в послеоперационном периоде нуждается в применении различных методик интра- и экстракорпоральной гемокоррекции в комплексе проводимой интенсивной терапии. При тяжелой сердечной и дыхательной недостаточности предпочтение отдается методикам вспо-

**M.B. Yaroustovsky, M.V. Abramyan, E.V. Komardina**

Bakoulev Scientific Center for Cardiovascular Surgery, Moscow, Russian Federation

# Methods of Molecular Transfusion in Intensive Care of Critical States in Pediatric Postoperative Cardiac Surgery Patients

*Molecular techniques in transfusion medicine have become popular in the clinical practice of pediatric intensive care units when the patient needs blood purification, more recently, in children in critical condition. Considering the anatomical and physiological characteristics of the child's body, pronounced severity, and rapid progression of multiple organ disorders, the key problems defining the treatment results are instrument reading, choice and timely initiation of extracorporeal therapy. Today, along with the methods of renal replacement therapy in children albumin dialysis therapy and high-volume plasmapheresis are successfully applied in the treatment of acute liver dysfunction; extracorporeal membrane oxygenation — in the treatment of biventricular cardiac and/or respiratory failure. Selective endotoxin sorption methods (LPS-adsorption) are implemented in the treatment of severe gram-negative sepsis.*

***Key words**: blood purification, acute renal failure; critical illness children; epidemiology, acute liver failure, sepsis.*

***(For citation:** Yaroustovsky MB, Abramyan MV, Komardina EV. Methods of Molecular Transfusion in Intensive Care of Critical States in Pediatric Postoperative Cardiac Surgery Patients. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2016;71(5):341–349. doi: 10.15690/vramn709)*

могательного кровообращения и экстракорпоральной мембранной оксигенации (ЭКМО); при доминировании явлений ОПП подключаются методики заместительной почечной терапии; тяжелая печеночная недостаточность нередко требует применения методики альбуминового диализа и плазмообмена; при инфекционно-септических осложнениях к интенсивной терапии подключают селективные технологии элиминации эндотоксина.

Проблемы наличия соответствующего оборудования и подготовленного медицинского персонала, ограничивающие широкое применение методик экстракорпоральной гемокоррекции в педиатрической интенсивной терапии, остались в прошлом. В настоящее время определенную техническую сложность сохраняет лишь вопрос создания у ребенка адекватного сосудистого доступа, обеспечивающего возможность проведения экстракорпоральной терапии в полном масштабе соответственно протоколу и поставленным клиническим задачам.

## Методики гемокоррекции при остром почечном повреждении у детей с полиорганной недостаточностью



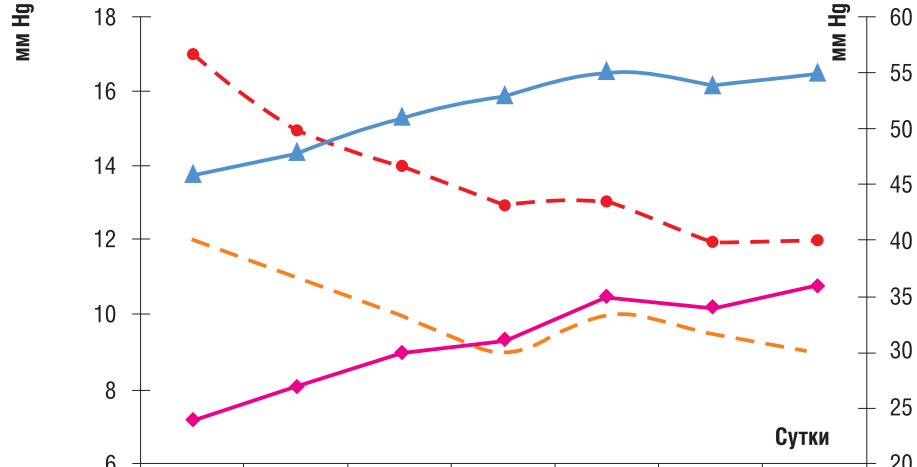
Развитие полиорганной недостаточности у детей, как правило, сопровождается ОПП. Патогенетически обоснованными при этом становятся экстра- (гемодиализ, гемофильтрация) и интракорпоральные (перитонеальный диализ) методы гемокоррекции. Каждая методика имеет свои преимущества и ограничения, исходя из которых формируется алгоритм протокола терапии [3, 4].

### *Перитонеальный диализ*

Острый перитонеальный диализ в качестве методики заместительной почечной терапии получил наибольшее распространение в интенсивной терапии у детей, особенно среди новорожденных и пациентов с низкой массой тела. Отсутствие необходимости в сосудистом доступе и в системной антикоагуляции обеспечили методу несомненные преимущества. Этот метод практически не оказывает отрицательного воздействия на систему кровообращения и исключает возникновение синдрома дисэквилибрации. Кроме того, метод перитонеального диализа достаточно прост, эффективен и безопасен, не требует использования сложной дорогостоящей аппаратуры [5–7]. Показаниями к проведению перитонеального диализа являются нарушения водно-электролитного баланса (гиперволемия и отечный синдром на фоне олиго-/анурии, гиперкалиемия) и повышенное содержание в крови продуктов белкового обмена (азотемия). Перитонеальный диализ препятствует прогрессированию недостаточности кровообращения, что клинически проявляется улучшением гемодинамических параметров: постепенным повышением среднего артериального давления, возрастанием фракции выброса левого желудочка на фоне снижения инотропной поддержки, нормализацией давлений наполнения желудочков, снижением пред- и постнагрузки (центрального венозного давления и давления в левом предсердии) (рис. 1). Благоприятное воздействие медленной и постоянной фильтрации обеспечивает возможность достижения оптимального объема циркулирующей крови; с другой стороны, это способствует уменьшению отечного синдрома и тканевой гипергидратации, улучшению газообменной функции легких с повышением индекса оксигенации $PO_2/FiO_2$. Благодаря индивидуальному подбору программы/дозы перитонеального диализа и парентерального питания возможно прогнозирование течения ОПП со стабилизацией и дальнейшим поддержанием азотемии на благоприятном уровне [8].

### *Гемофильтрация и гемодиализ*

Однако, как и у взрослых пациентов, в педиатрической практике чаще всего дисфункция почек является одной из составляющих синдрома полиорганной недостаточности, что требует значительного расширения показаний к применению методов экстракорпоральной гемокоррекции у этой категории больных. Практически рутинными стали процедуры гемофильтрации и гемодиализа с целью замещения функций почек у детей с ОПП. Учитывая, что все реже в клинической практике встре-




| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ЦВД | 12 | 11 | 10 | 9 | 10 | 9,5 | 9 |
| Длп | 17 | 15 | 14 | 13 | 13 | 12 | 12 |
| АДср | 46 | 48 | 51 | 53 | 55 | 54 | 55 |
| ФВ,% | 24 | 27 | 30 | 31 | 35 | 34 | 36 |

**Рис. 1.** Изменение гемодинамических параметров при проведении перитонеального диализа

*Примечание.* ЦВД — центральное венозное давление, Длп — давление в левом предсердии, АДср — среднее артериальное давление, ФВ — фракция выброса левого желудочка.

чается изолированное повреждение почек, гемофильтрация/гемодиализ могут рассматриваться в качестве метода активной детоксикации в комплексе лечения более широкого спектра внепочечных осложнений в составе синдрома полиорганной недостаточности.

Необходимость в более «агрессивном» лечении диктуется недостаточной дозой перитонеального диализа при коррекции грубых метаболических и водно-электролитных нарушений с развитием тяжелого отечного синдрома и гипергидратации тканей у детей, а также сохранением выраженного отрицательного азотистого баланса и стойкой высокой азотемии. При проведении гемофильтрации/гемодиализа благодаря управляемой ультрафильтрации практически всегда удается достичь необходимого жидкостного баланса и нужного уровня волемии. Для детей очень важна управляемость внутрисосудистым объемом крови, при фильтрации которого обеспечивается возможность притока жидкости из интерстициального пространства, поддерживая давление наполнения желудочков, пред- и постнагрузки. Нормализация уровней центрального венозного давления и давления в левом предсердии сопровождается параллельным повышением среднего артериального давления и фракции выброса левого желудочка, позволяющим в некоторых случаях рассмотреть вопрос об уменьшении кардиотонической поддержки. В отличие от перитонеального диализа сравнительно раньше удается стабилизировать рост и затем существенно снизить уровень азотемии; быстрее корригируются гиперкалиемия, грубые метаболические нарушения; обеспечивается бóльший клиренс экзо- и эндотоксинов. При проведении экстракорпоральной терапии следует особо тщательно выбирать режим антикоагуляции, особенно у кардиохирургических пациентов, в связи с опасностью развития нарушений со стороны свертывающей системы крови (возможны явления как гипо-, так и гиперкоагуляции с соответствующими дальнейшими осложнениями).

Известно, что в условиях анурии и тканевой гипергидратации практически невозможно выполнить инфузионно-трансфузионную терапию, даже в минимально необходимом объеме, прежде всего ввиду угрозы возникновения гиперволемии. Таким образом, дети, в частности младенцы первого года жизни, и когорта кардиохирургических больных представляют особую категорию пациентов. Тем не менее использование экстра- и интракорпоральных методов заместительной почечной терапии позволяет решать эту задачу.

## Постоянная гемофильтрация у детей с тяжелой дыхательной и бивентрикулярной сердечной недостаточностью

В связи со значительным расширением возможностей кардиохирургической помощи и утяжелением контингента детей, нуждающихся в коррекции сложных врожденных заболеваний сердца и магистральных сосудов, все чаще в ближайшем послеоперационном периоде применяется метод ЭКМО. Нередко у больных с тяжелой кардиопатологией диагностируется функциональная недостаточность почек, в первую очередь — неспособность поддерживать гомеостаз. Это приводит к нарушению водного баланса, в частности к задержке жидкости и патологическому распределению воды в организме, электролитным расстройствам (гиперкалиемия, гипокальциемия, гипо- и гипернатриемия), накоплению азотистых шлаков, активизации катаболических процессов, метаболическим нарушениям. Тяжелая сердечная и/или дыхательная недостаточность, сопровождаемые гипоксией и кардиогенным шоком, обусловливающими развитие ОПП, являются этиопатогенетическими звеньями отечного синдрома [9]. С другой стороны, при проведении ЭКМО у детей обращает на себя внимание большая площадь контакта крови с неэндотелизированной чужеродной поверхностью экстракорпорального контура. Уже с первых минут запускается цепь различных патологических реакций в организме (активируются ферментативные процессы, свертывающая система, система комплемента, нейтрофильный и тромбоцитарный ответ, запускается воспалительный каскад с появлением в русле большого количества циркулирующих вазоактивных медиаторов), что сопровождается нарушением гомеостаза и стимуляцией неспецифических реакций. Взаимодействия всего комплекса воспалительных субстанций и медиаторов способствуют запуску синдрома системной воспалительной реакции, характеризуемого повышением капиллярной проницаемости с накоплением жидкости в интерстициальном пространстве и дальнейшим развитием дисфункций жизненно важных органов [10]. При этом в патогенезе отечного синдрома у этой тяжелой категории пациентов определенная роль отводится экстравазации не только водного компонента крови, но более крупных молекул (например, альбумина). Таким образом, создаются предпосылки снижения артериального давления на фоне гиповолемии (потери объема внутрисосудистой жидкости) и уменьшения онкотического давления плазмы.



С одной стороны, при ОПП клиническая ситуация требует восполнения объема циркулирующей крови у ребенка и выполнения адекватной инфузионно-трансфузионной программы, с другой — синдром низкого сердечного выброса и гипергидратация обусловливают ухудшение тканевой перфузии и оксигенации, приводя в итоге к развитию и прогрессированию полиорганной недостаточности. Этот комплекс причин лежит в основе развития нарушений водно-электролитного баланса и тяжелых метаболических расстройств [11].

Развитие тяжелого ацидоза не связано с обычной скоростью продукции водородных ионов (1 мЭкв/кг в сут), а, скорее всего, обусловлено выраженным катаболизмом и переходом на анаэробный путь метаболизма вследствие возникшей тканевой гипоксии. Нивелирование метаболического ацидоза инфузией растворов бикарбоната натрия сопряжено с риском развития гиперволемии и/или гипернатриемии, в связи с чем эта тактика не всегда применима и ограничена в клиническом успехе [12]. И именно параллельное проведение постоянной гемофильтрации с ЭКМО является оправданным и широкомасштабным методом коррекции сложного комплекса нарушений гомеостаза, особенно у пациентов детского возраста. Важно отметить, что в настоящее время при проведении заместительной почечной терапии в замещающих (субститутных) растворах в качестве буфера применяется бикарбонат (ранее широко использовались лактатсодержащие растворы). Это определяет успех проведения экстракорпоральной терапии, обеспечивая возможность коррекции метаболических нарушений за счет элиминации органических кислот и поступления щелочного компонента с замещающими растворами.

Гемофильтрация позволяет предотвратить развитие и прогрессирование синдрома полиорганной недостаточности, в том числе ОПП, снизить выраженность синдрома системного воспалительного ответа, обеспечивая эли-

минацию среднемолекулярных субстанций, в том числе медиаторов воспаления. Помимо этого, применение высоких объемов замещающих жидкостей (более 30–35 мл/кг в час) может иметь большое значение для усиления лимфатического транспорта между межклеточным пространством и тканями, с одной стороны, и кровью — с другой, что обеспечивает снижение интенсивности провоспалительного каскада [13].

При проведении постоянной заместительной почечной терапии в контуре ЭКМО с первых же суток появляется возможность контролировать грубые водно-электролитные и метаболические нарушения, уровень азотемии. Протокол проведения гемофильтрации, в частности целевой скорости ультрафильтрации, выбирается на основании точной оценки волемии, о которой позволяют судить показатели центрального венозного давления, давления в левом предсердии и в легочной артерии, конечные диастолические объемы желудочков. Следует указать, что объем инфузионной и трансфузионной терапии, в том числе нутритивной поддержки, также оказывает влияние на выбор протокола проведения гемофильтрации. Так, уже через 1 сут после включения заместительной почечной терапии в контур ЭКМО нами были отмечены достоверное ($p<0,05$) снижение уровней центрального венозного давления и давления в левом предсердии до 15 (14–17) и 16,5 (14–18,75) мм рт.ст. соответственно (рис. 2). При достижении значений центрального венозного давления 8–12 мм рт.ст. и давления в левом предсердии 10–14 мм рт.ст. процедуру заместительной почечной терапии переводили в режим изоволемической ультрафильтрации. Важно отметить, что выполнение гемофильтрации в режиме пассивной (неавтоматизированной) ультрафильтрации всегда сопряжено с неточным расчетом жидкостного баланса и опасно, особенно для детей с массой тела до 10 кг [12].

Постоянная гемофильтрация при ОПП как метод замещения функции почек аналогична поддержке дыхания с помощью искусственной вентиляции легких и ЭКМО при сердечной и дыхательной недостаточности. Применение методов экстракорпоральной гемокоррекции должно рассматриваться в качестве вспомогательного лечения, позволяющего пережить ребенку период до момента восстановления и функционирования собственных почек. Процедура гемофильтрации является наиболее универсальной, поскольку не только замещает функции почек, но и корректирует нарушенный гомеостаз, приближая его к физиологичному, и не оказывает отрицательного влияния на функции других органов и систем пациента [14].

## Методики экстракорпоральной гемокоррекции при острой печеночной недостаточности у детей в критическом состоянии

Острая печеночная недостаточность у детей является редким, но тяжелым и угрожающим жизни состоянием. Этиология изменяется в зависимости от возраста. У 40% младенцев острая печеночная недостаточность обусловлена врожденными нарушениями обмена веществ, в 60% — вирусным гепатитом и желтухой новорожденных. В более старшем возрасте в половине случаев этиологическим фактором печеночной недостаточности являются вирусный и токсический гепатит, в то время как в остальных случаях причина остается неизвестной [15]. До 1/3 детей выздоравливают благодаря применению заместительной и поддерживающей терапии, остальным пациентам требуется трансплантация печени [16]. В связи с расширением возможностей трансплантологии и хирургии в различных областях медицины (например, в кардио-, нейрохирургии) все больше стали применяться методы экстракорпоральной поддержки и замещения функций печени для преодоления критического интервала: одни — до восстановления функции органа, другие — в качестве «моста» к трансплантации печени.

В настоящее время известны основные методы поддерживающей гемокоррекции — молекулярная адсорбирующая рециркулирующая система (Molecular adsorbent recirculation system, MARS), фракционированная сепарация и адсорбция плазмы (Fractionated plasma separation and adsorption, Prometheus), высокообъемный плазмообмен (возможно в сочетании с гемодиализом или гемофильтрацией), однопроходной альбуминовый диализ (Single-pass albumin dialysis, SPAD). До сих пор не выполнено ни одного контролируемого исследования среди



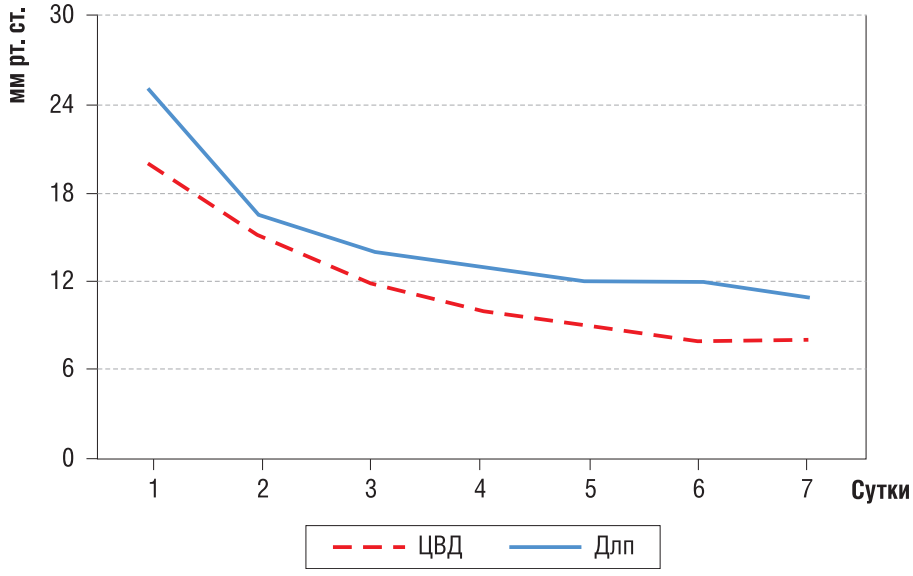



**Рис. 2.** Динамика давления в левом предсердии (Длп) и центрального венозного давления (ЦВД) при проведении постоянной гемофильтрации в контуре экстракорпоральной мембранной оксигенации

детей по применению какого-либо из вышеуказанных методов [17, 18]. У взрослых пациентов благоприятное влияние этих процедур на клинико-лабораторные показатели объясняется удалением вазоактивных веществ и токсинов, что приводит к улучшению перфузии органов и тканей, показателей гемодинамики, снижению портальной гипертензии, улучшению функции почек, снижению внутричерепного давления и печеночной энцефалопатии и т.д. Накопленный опыт применения у взрослых позволяет рекомендовать применение методик экстракорпоральной поддержки печени в педиатрической практике [18, 19].

Методика, предполагающая использование 20% раствора альбумина в качестве диализирующего, иначе называется альбуминовым диализом. Процесс осуществляется на высокобиосовместимой мембране с дальнейшей «очисткой» диализирующего раствора адсорбцией при прохождении через картридж с активированным углем и колонку с анионообменной смолой, а также диффузионным методом при перфузии через диализатор. Другими словами, в комплексе MARS-контура объединены разные экстракорпоральные технологии. Сочетание альбуминового контура с традиционным бикарбонатным диализом обеспечивает селективное удаление субстанций, связанных с альбумином, и одновременный контроль уровня водорастворимых молекул [20, 21].

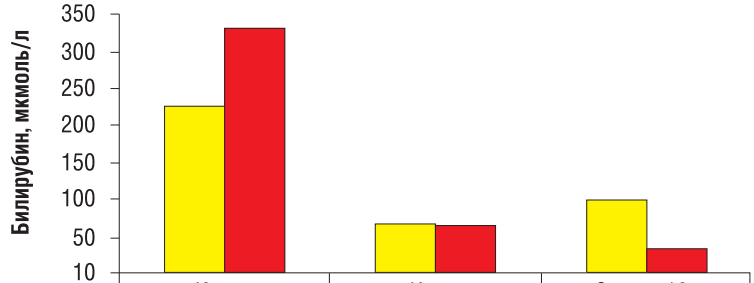
В НЦССХ им. А.Н. Бакулева МЗ РФ впервые в отечественной клинической практике метод MARS-терапии успешно был применен у детей после радикальной коррекции врожденных пороков сердца. В рамках синдрома полиорганной недостаточности наряду с сердечной (фракция выброса левого желудочка < 40%, потребность в инотропной поддержке), дыхательной и почечной недостаточностью у пациентов развивалась и тяжелая печеночная дисфункция. Консервативная терапия печеночной недостаточности была безуспешной: наблюдались прогрессивный рост уровня билирубина (до 500 мкмоль/л), цитолитический синдром с повышением уровней аланин- и аспартатаминотрансфераз (более 200 ЕД/л). Положительная динамика при проведении MARS-терапии у детей была более очевидна, чем у взрослых: так, проявления желтухи снижались уже к окончанию процедуры (через 16–18 ч), что свидетельствует об эффективной элиминации билирубина и желчных кислот. Данный факт, возможно, объясняется благоприятным соотношением площади поверхности тела ребенка и сорбционной емкости колонок с активированным углем и ионообменной смолой. Так, снижение общего билирубина у ребенка массой тела менее 6 кг (возраст 4 мес) составило ~ 75% к окончанию процедуры, и эти изменения сохранялись почти на том же уровне спустя 12 ч. Причем наблюдаемое к окончанию процедуры снижение неконъюгированной фракции (на 80%) продолжалось, а спустя 12 ч достигло почти 90% от исходного уровня. Динамика конъюгированной фракции билирубина оказалась несколько менее значимой: на 70% непосредственно к завершению процедуры и на 55% через 12 ч (рис. 3). У второго ребенка (2,5 года, масса тела 12 кг) динамика снижения уровня общего билирубина к концу процедуры составила 30%, через 12 ч после ее завершения — 27%. Конъюгированная фракция уменьшилась на 28 и 20% соответственно, а значения неконъюгированной фракции, как и ожидалось, продолжали уменьшаться на следующие сутки после прекращения MARS-терапии [22].

Один из важных аспектов включения альбуминового диализа, как и других методов экстракорпоральной гемокоррекции, в комплекс интенсивной терапии пациентов кардиохирургического профиля, особенно у детей, — изучение их влияния на гемодинамику и респираторные показатели с учетом того, что декомпенсация этих систем представляет собой пусковой фактор развития синдрома полиорганной недостаточности. Наш опыт свидетельствует не только об отсутствии отрицательного воздействия MARS-терапии на систему кровообращения, но и о благоприятном положительном влиянии на показатели гемодинамики, сопровождаемых к тому же уменьшением инотропной поддержки.



Важно отметить, что при проведении экстракорпоральных процедур у детей особое значение имеет профилактика гипотермии, которая часто приводит к возникновению выраженного периферического спазма, возрастанию постнагрузки, что приводит к угнетению производительности сердца. При выполнении MARS-процедур у детей мы настоятельно рекомендуем использовать теплообменник, устанавливать высокую температуру на подаче бикарбонатного диализата (38–39°С) в аппарате «искусственная почка», а также использовать другие средства физического обогрева и исключения потерь тепла.

Ни один из методов не способен в достаточной мере обеспечить полное замещение детоксикационной функции печени, поскольку требуется одновременное удаление альбуминсвязанных субстанций с большим объемом распределения в организме и водорастворимых низкомолекулярных веществ без потерь полезных соединений (факторов роста гепатоцитов, необходимых для восстановления функций собственного органа) [22]. Методика MARS-терапии может рассматриваться в качестве успешного метода поддержки и замещения при печеночной недостаточности как изолированно, так и в составе синдрома полиорганной недостаточности [23].




| | Исход | Конец | Спустя 12 ч |
|---|---|---|---|
| Конъюгированный | 225 | 67 | 101 |
| Неконъюгированный | 331 | 65 | 34 |

**Рис. 3.** Динамика фракций билирубина при проведении MARS-терапии (пациент, возраст 4 мес)

## Современная концепция применения методов молекулярной гемокоррекции у детей с сепсисом

По общемировым оценкам, сепсис не теряет лидирующих позиций в причинах смертности: летальность среди младенцев и детей достигает ~1,6 млн в год. Наибольшую распространенность детский сепсис приобрел в развивающихся странах. В США уровень тяжелого детского сепсиса неуклонно повышается: 0,56/1000 в 1995 г., 0,63/1000 в 2000 г. и 0,89/1000 в 2005 г., увеличиваясь в основном за счет неонатального инфицирования. Сепсис встречается у 9,7/1000 новорожденных, 2,25/1000 детей первого года жизни и 0,23–0,52/1000 детей в возрасте от 1 до 19 лет. В США ежегодно фиксируются до 42 тыс. случаев тяжелого сепсиса, а госпитальная смертность оценивается в 10,3% [24, 25].

Средняя стоимость лечения ребенка с тяжелым сепсисом в США составляет более 40 тыс. долл./мес [25]. Czaja и соавт. ретроспективно изучили более 7000 случаев тяжелого сепсиса у детей. Обращала на себя внимание большая частота госпитализаций, сравнительно худшие отдаленные результаты [24].

Очевидно, что сепсис остается важной проблемой общественного здравоохранения как в слаборазвитых, так и в странах с высоким уровнем оказания медицинской помощи, поэтому следует приложить все возможные усилия для проведения новых исследований и внедрения в практику достигнутых результатов.



Сепсис у детей вызывают те же возбудители, что и у взрослых, но с иной локализацией и сопутствующими заболеваниями. В НЦССХ им. А.Н. Бакулева МЗ РФ, как и во всем мире, за последние 10 лет отмечается тенденция к снижению частоты выделения грамположительных микроорганизмов и возрастание частоты обнаружения грамотрицательных бактерий при микробиологических исследованиях [26].

В структуру мембраны грамотрицательных бактерий входит молекула липополисахарида (ЛПС), выступающая в роли одной из основных триггерных молекул запуска и поддержания сложного каскада патологических реакций при сепсисе [27]. Липополисахарид поступает в циркуляцию как из очагов инфекции, так и из естественных резервуаров при определенных условиях (например, из желудочно-кишечного тракта, в частности после искусственного кровообращения у детей). В русле липополисахарид (эндотоксин), выступающий в роли этиологического фактора септического процесса, взаимодействуя с иммунной системой, активирует синтез и выброс целого каскада медиаторов, обусловливающих патогенез сепсиса и его клиническое течение [28, 29].

В связи с отсутствием на сегодняшний день доказательной базы по клиническому применению специфической лекарственной терапии сепсиса с использованием антиэндотоксиновых и антицитокиновых антител [30] создана почва для поиска новых методов и технологий лечения сепсиса. В частности, внедрение в комплексную интенсивную терапию экстракорпоральных технологий в качестве адъювантной терапии сепсиса является перспективным подходом для элиминации пусковых и эффекторных молекул, ответственных за каскад патофизиологических реакций. Таким образом, современные методы молекулярной гемокоррекции, в частности метод селективной адсорбции эндотоксина, нацелены в первую очередь на удаление пускового этиотропного субстрата — эндотоксина.

В НЦССХ за период 2007–2015 гг. накоплен опыт лечения тяжелого сепсиса у взрослых пациентов методом селективной ЛПС-адсорбции с применением картриджей Toraymyxin-PMX-20R (Toray, Япония), о чем свидетельствует ряд научных сообщений и статьей в зарубежной и отечественной печати [31, 32]. В данном сорбционном картридже на волокнистой основе иммобилизирован антибиотик полимиксин В, обладающий высокой связывающей способностью к одному из фрагментов молекулы липополисахарида — липиду А, за счет чего и происходит элиминация эндотоксина из кровотока. Также стоит отметить способность данной методики снижать количество активированных лейкоцитов и медиаторов воспаления посредством афереза и неспецифической сорбции.

Опыт использования экстракорпоральных методик в лечении сепсиса у детей достаточно скудный и, более того, ограничивается технологиями в рамках заместительной почечной терапии [33]. Нет никаких сообщений о применении сорбционных технологий, в частности селективно-направленных, в терапии сепсиса у детей после открытых операций на сердце. Применение меньшего по объему и сорбционной емкости картриджа с иммобилизированным полимиксином В (Toraymyxin-PMX-0,5R) в экстракорпоральной терапии у детей является абсолютно новой технологией, которая позволит существенно снизить летальность от инфекционно-септических осложнений у детей. Опыт применения процедур селективной сорбции эндотоксина имеется только в Японии, где в группу исследуемых пациентов вошли и дети с абдоминальной патологией. Учеными была установлена безопасность и высокая эффективность применения картриджей Toraymyxin-PMX-0,5R [34, 35].

Принцип применения селективной сорбции у детей является абсолютно инновационным как для российского, так и для мирового здравоохранения. При изучении отечественных литературных источников по базе электронной Национальной медицинской библиотеки США (US National Library of Medicine National Institutes of Health, NeLH) нами были найдены единичные публикации о применении вышеуказанных экстракорпоральных методик у детей с септическими осложнениями, и ни одной — об использовании у детей после кардиохирургических вмешательств.

На сегодняшний день в НЦССХ имеется начальный опыт клинического применения селективной ЛПС-адсорбции в терапии сепсиса у детей после коррекции сложных врожденных пороков сердца в условиях искусственного кровообращения. Селективная адсорбция эндотоксина проводилась с применением картриджей с иммобилизированным на волокнах полимиксином В Toraymyxin-PMX-0,5R. По 2 процедуры ЛПС-адсорбции (продолжительность 180 мин) получили четверо детей в возрасте 9–14 мес с массой тела 6,5–12,5 кг. Послеоперационный период у всех пациентов осложнился сепсисом. Источником инфекции у троих из них была пневмония, ассоциированная с искусственной вентиляцией легких, у одного — эмпиема плевры, грамотрицательная этиология которых была определена при микробиологическом исследовании бронхоальвеолярного лаважа и крови. Решение о включении процедур селективной ЛПС-адсорбции в комплексную терапию было принято на основании клинических и лабораторных данных по решению консилиума врачей.

Клиническое состояние пациентов характеризовалось наличием признаков синдрома системного воспалительного ответа с труднокорригируемыми фармакологическими и физическими методами гипертермией (38,7–39°C), лейкоцитозом/лейкопенией 4,5–21×$10^9$/л,

субкомпенсированным синдромом диссеминированного внутрисосудистого свертывания с повышением уровня D-димера до 530–680 нг/мл. При лабораторных исследованиях определялись высокие концентрации маркеров системной инфекции и эндотоксемии: прокальцитонин 3,65–130 пг/мл, пресепсин 415–1300 пг/мл, уровень активности эндотоксина (Endotoxin activity assay, EAA) 0,59–1,0. В структуре органной недостаточности превалировал сердечно-легочный компонент, что требовало многокомпонентной кардиотонической и вазопрессорной терапии, инфузии левосимендана, искусственной вентиляции легких с поддержанием высокого положительного давления на выдохе.

На фоне экстракорпоральной терапии отмечалось умеренное увеличение индекса оксигенации, уменьшение интенсивности инфекционного процесса, что характеризовалось нормализацией температуры тела и количества лейкоцитов в периферической крови, снижением уровня эндотоксемии (динамика EAA), значимым уменьшением концентрации прокальцитонина и пресепсина (табл.).

Трое детей на 9–21-е сутки после экстракорпоральной терапии сепсиса были переведены из отделений интенсивной терапии в хирургические и в дальнейшем успешно выписаны из стационара. Один пациент умер спустя 1 сутки после 2-го сеанса ЛПС-сорбции, что было связано с острой парапротезной фистулой, потребовавшей экстренной хирургической коррекции, после чего наблюдались полиорганная недостаточность и развитие отека головного мозга.

При правильном соблюдении протокола и должной технике выполнения процедуры селективной сорбции частота потенциальных рисков сведена к 0%. В ходе применения данного метода побочных явлений, сопровождающихся риском для больного, нами не выявлено, что подтверждается и результатами экспериментальных и клинических исследований [34, 35]. Полученные нами результаты инновационной терапии методом селективной адсорбции эндотоксина у детей средней возрастной группы свидетельствуют о ее клинической эффективности и безопасности, что позволит в дальнейшем рассмотреть вопрос о возможности применения этого метода у младенцев и детей первого года жизни (<10 кг).

## Заключение

Целенаправленное внедрение за последние 15 лет в клиническую практику педиатрической интенсивной терапии критических состояний современных методик молекулярной трансфузиологии свидетельствует об их безусловной эффективности. Эти методы позволяют за короткий промежуток времени осуществить коррекцию эндотоксикозов, обусловленных развитием острого почечного и печеночного повреждений и инфекционно-септическими осложнениями; существенно изменить показатели гемодинамики и респираторной функции. Применение методик интра- и экстракорпоральной гемокоррекции позволяет улучшить результаты комплексной интенсивной терапии полиорганной недостаточности и сепсиса, уменьшить длительность пребывания в отделении интенсивной терапии, снизить летальность у критически тяжелых детей с врожденными пороками сердца после радикальных кардиохирургических операций.

## Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

## Источники финансирования

Исследование проводилось в рамках выполнения целевой комплексной темы Центра сердечно-сосудистой хирургии «Патогенетическое обоснование применения современных методов молекулярной трансфузиологии у больных с заболеваниями сердца и сосудов», которая входит в государственное задание и финансируется из государственного бюджета Российской Федерации.

## Участие авторов

М.Б. Ярустовский — разработка концепции, дизайна и методологии исследования; М.В. Абрамян — анализ результатов и подготовка рукописи к публикации; Е.В. Комардина — сбор клинических и лабораторных данных, анализ результатов исследования.



**Таблица.** Динамика клинико-лабораторных показателей при проведении селективной ЛПС-адсорбции у детей

| Показатель | Пациент № 1 | | Пациент № 2 | | Пациент № 3 | | Пациент № 4 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | До | После | До | После | До | После | До | После |
| АДср | 88 | 80 | 66 | 81 | 62 | 63 | 63 | 74 |
| ЧСС | 119 | 110 | 126 | 139 | 169 | 146 | 127 | 111 |
| $PO_2/FiO_2$ | 1,4 | 1,1 | 3,0 | 4,0 | 1,0 | 1,5 | | |
| Температура | 38,7 | 39 | 39 | 36,8 | 39 | 37,4 | 36 | 36,4 |
| PCT | 18 | - | 130 | 32 | 0,6 | 0,5 | 3,65 | 0,69 |
| EAA | 0,59 | - | 0,97 | 0,8 | 1,0 | 0,2 | 0,94 | 0,8 |
| Ответ нейтрофилов | 93 | - | 78 | 85 | 75 | 95 | 83 | 83 |
| Пресепсин | 415 | - | 1300 | 85 | 892 | 725 | | 342 |
| Лейкоциты | 21 | - | 4,5 | 7,6 | 5,0 | 9 | 15,4 | 40 |
| Исход | Умер (повтор. операция в связи с фистулой протеза) | | Выписан | | Выписан | | Выписан | |

*Примечание*. АДср. — среднее артериальное давление, ЧСС — частота сердечных сокращений, PCT — прокальцитонин, EAA — уровень активности эндотоксина.

**ЛИТЕРАТУРА**


1. Харькин А.В. *Комплексная интенсивная терапия у новорожденных после кардиохирургических вмешательств*: Дис. ... докт. мед. наук. — М.; 2008. — 261 с. [Har'kin AV. *Kompleksnaya intensivnaya terapiya u novorozhdennykh posle kardiokhirurgicheskikh vmeshatel'stv*. [dissertation] Moscow; 2009. 261 p. (In Russ).] Доступно по: http://www.dissercat.com/content/kompleksnaya-intensivnaya-terapiya-u-novorozhdennykh-posle-kardiokhirurgicheskikh-vmeshatels. Ссылка активна на 12.07.2016.
2. Gulla KM, Sachdev A, Gupta D, et al. Continuous renal replacement therapy in children with severe sepsis and multiorgan dysfunction - a pilot study on timing of initiation. *Indian J Crit Care Med*. 2015;19(10):613–617. doi: 10.4103/0972-5229.167044.
3. Bridges BC, Askenazi DJ, Smith J, Goldstein SL. Pediatric renal replacement therapy in the intensive care unit. *Blood Purif*. 2012;34(2):138–148. doi: 10.1159/000342129.
4. Goldstein SL. Advances in pediatric renal replacement therapy for acute kidney injury. *Semin Dial*. 2011;24(2):187–191. doi: 10.1111/j.1525-139X.2011.00834.x.
5. Банкетов Я.В. *Клинические аспекты применения перитонеального диализа у детей с острой почечной недостаточностью после коррекции врожденных пороков сердца*: Дис. ... канд. мед. наук. — М.; 2002. — 145 с. [Banketov YaV. *Klinicheskie aspekty primeneniya peritoneal'nogo dializa u detei s ostroi pochechnoi nedostatochnost'yu posle korrektsii vrozhdennykh porokov serdtsa*. [dissertation] Moscow; 2002. 145 p. (In Russ).] Доступно по: http://www.dissercat.com/content/klinicheskie-aspekty-primeneniya-peritonealnogo-dializa-u-detei-s-ostroi-pochechnoi-nedostat. Ссылка активна на 12.07.2016.
6. Зверев Д.В., Музуров А.Л., Долецкий А.С. Перитонеальный диализ при острой почечной недостаточности у детей // *Анестезиология и реаниматология*. — 2002. — №1 — С. 32–35. [Zverev DV, Muzurov AL, Doletskii AS. Peritoneal'nyi dializ pri ostroi pochechnoi nedostatochnosti u detei. *Anesteziol Reanimatol*. 2002;(1):32–35. (In Russ).]
7. Панкратенко Т.Е., Музуров А.Л., Зверев Д.В. и др. Заместительная почечная терапия у детей раннего возраста с острой и хронической почечной недостаточностью // *Нефрология и диализ*. — 2012. — Т.14. — №1 — С. 48–56. [Pankratenko TE, Muzurov AL, Zverev DV, et al. Renal replacement therapy in babies with acute and chronic renal failure. *Nephrology and dialysis*. 2012;14(1):48–56. (In Russ).]
8. Ponce D, Balbi AL, Amerling R. Advances in peritoneal dialysis in acute kidney injury. *Blood Purif*. 2012;34(2):107–116. doi: 10.1159/000341648.
9. Bunchman TE. *ECLS and the kidney*. In: Van Meurs K, Lally KP, Peek G, Zwischenberger JB, editors. *ECMO extracorporeal cardiopulmonary support in critical care*. 3rd ed. Ann Arbor, Michigan: Extracorporeal Life Support Organization; 2005. p. 485–492.
10. *Абрамян М.В. Модифицированная ультрафильтрация в ближайшем постперфузионном периоде у новорожденных и грудных детей*: Дис. ... канд. мед. наук. — М.; 2000. — 138 с. [Abramyan MV. *Modifitsirovannaya ul'trafil'tratsiya v blizhaishem postperfuzionnom periode u novorozhdennykh i grudnykh detei*. [dissertation] Moscow; 2000. 138 p. (In Russ).]
11. Fleming GM, Askenazi DJ, Bridges BC, et al. A multicenter international survey of renal supportive therapy during ECMO: the Kidney Intervention During Extracorporeal Membrane Oxygenation (KIDMO) group. *ASAIO J*. 2012;58(4):407–414. doi: 10.1097/MAT.0b013e3182579218.
12. Ярустовский М.Б., Абрамян М.В., Шаталов К.В. и др. Постоянная гемофильтрация у пациентов детского возраста с бивентрикулярной недостаточностью, находящихся на экстракорпоральной мембранной оксигенации, после кардиохирургических операций // *Грудная и сердечно-сосудистая хирургия*. — 2013. — №1. — С. 3–9. [Yarustovsky MB, Abramyan MV, Shatalov KV, et al. The continuous hemofiltration applied to children patients with biventricular failure and who have been placed under extracorporeal membrane oxygenation after cardiac surgery. *Grud Serdechnososudistaia Khir*. 2013;(1):3–9. (In Russ).]
13. Peng Z, Singbartl K, Simon P, et al. Blood purification in sepsis: a new paradigm. *Contrib Nephrol*. 2010;165:322–328. doi: 10.1159/000313773.
14. Бокерия Л.А., Ярустовский М.Б. *Руководство по экстракорпоральному очищению крови в интенсивной терапии*. — М.: НЦ ССХ им. А.Н. Бакулева РАМН; 2009. — 468 с. [Bokeriya LA, Yaroustovsky MB. *Rukovodstvo po ekstrakorporal'nomu ochishcheniyu krovi v intensivnoi terapii*. Moscow: NTs SSKh im. A.N. Bakuleva RAMN; 2009. 468 p. (In Russ).]
15. Cochran JB, Losek JD. Acute liver failure in children. *Pediatr Emerg Care*. 2007;23(2):129–135. doi: 10.1097/PEC.0b013e3180308f4b.
16. Lee WS, McKiernan P, Kelly DA. Etiology, outcome and prognostic indicators of childhood fulminant hepatic failure in the United Kingdom. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2005;40(5):575–581. doi: 10.1097/01.mpg.0000158524.30294.e2.
17. Rosenthal P. Is the molecular adsorbent recirculating system the answer for children with acute liver failure? *Liver Transpl*. 2015;21(3):277–278. doi: 10.1002/lt.24045.
18. Schaefer B, Schmitt CP. The role of molecular adsorbent recirculating system dialysis for extracorporeal liver support in children. *Pediatr Nephrol*. 2013;28(9):1763–1769. doi: 10.1007/s00467-012-2348-9
19. Ярустовский М.Б., Абрамян М.В., Комардина Е.В. и др. Экстракорпоральные методы гемокоррекции при острой печеночной недостаточности у пациентов после кардиохирургических вмешательств // *Анестезиология и реаниматология*. — 2014. — Т.59. — №5 — С. 4–10. [Yaroustovsky MB, Abramyan MV, Komardina EV, et al. Artificial liver support devices in patients with acute liver failure after cardiac surgery. *Anesteziol Reanimatol*. 2014;59(5):4–10. (In Russ).]
20. Mitzner SR, Stange J, Klammt S, et al. Albumin dialysis using the molecular adsorbent recirculating system. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2001;10(6):777–783. doi: 10.1097/00041552-200111000-00008.
21. Vaid A, Chweich H, Balk EM, Jaber BL. Molecular adsorbent recirculating system as artificial support therapy for liver failure: a meta-analysis. *ASAIO J*. 2012;58(1):51–59. doi: 10.1097/MAT.0b013e31823fd077.
22. Гептнер Р.А. Альбуминовый диализ в интенсивной терапии больных с синдромом полиорганной недостаточности после операций на сердце и сосудах: Дис... канд. мед. наук. — М.; 2009 — 169 с. [Geptner RA. Al'buminovyi dializ v intensivnoi terapii bol'nykh s sindromom poliorgannoi nedostatochnosti posle operatsii na serdtse i sosudakh. [dissertation] Moscow; 2009. 169 p. (In Russ).]
23. Novelli G, Rossi M, Morabito V, et al. Pediatric acute liver failure with molecular adsorbent recirculating system treatment. *Transplant Proc*. 2008;40(6):1921–1924. doi: 10.1016/j.transproceed.2008.05.075.
24. Czaja AS, Zimmerman JJ, Nathens AB. Readmission and late mortality after pediatric severe sepsis. *Pediatrics*. 2009;123(3):849–857. doi: 10.1542/peds.2008-0856
25. Hanna W, Wong HR. Pediatric sepsis: challenges and adjunctive therapies. *Crit Care Clin*. 2013;29(2):203–222. doi: 10.1016/j.ccc.2012.11.003.
26. Попов Д.А., Вострикова Т.Ю. Микробиологический мониторинг в кардиохирургическом стационаре — опыт за 10 лет // *Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН*. — 2012. — Т.13. — №5. — С. 68–76. [Popov DA, Vostrikova TYu. Mikrobiologicheskii

monitoring v kardiokhirurgicheskom statsionare — opyt za 10 let. *Byulleten' NTsSSKh im. A.N. Bakuleva RAMN*. 2012;13(5):68–76. (In Russ).]
27. Marshall JC. Endotoxin in the pathogenesis of sepsis. *Contrib Nephrol*. 2010;167:1–13. doi: 10.1159/000315914.
28. Berthet J, Damien P, Hamzeh-Cognasse H, et al. Human platelets can discriminate between various bacterial LPS isoforms via TLR4 signaling and differential cytokine secretion. *Clin Immun*. 2012;145(3):189–200. doi: 10.1016/j.clim.2012.09.004.
29. Bosmann M, Ward PA. The inflammatory response in sepsis. *Trends Immunol*. 2013;34(3):129–136. doi: 10.1016/j.it.2012.09.004.
30. Cross AS. Anti-endotoxin vaccines: back to the future. *Virulence*. 2014;5(1):219–225. doi: 10.4161/viru.25965.
31. Yaroustovsky M, Abramyan M, Krotenko N, et al. Endotoxin adsorption using polymyxin B immobilized fiber cartridges in severe sepsis patients following cardiac surgery. *Int J Artif Organs*. 2014;37(4):299–307. doi: 10.5301/ijao.5000322.
32. Ярустовский М.Б., Абрамян М.В., Кротенко Н.П. и др. Опыт применения селективной адсорбции эндотоксина у пациентов с тяжелым сепсисом после открытых операций на сердце // *Анестезиология и реаниматология*. — 2014. — №3. — С. 39–46. [Yarustovsky MB, Abramyan MB, Krotenko NP, et al. Experience of use of endotoxin selective adsorption in patients with heavy sepsis after open-heart surgery. *Anesteziol Reanimatol*. 2014;(3):39–46. (In Russ).]
33. Liu JP, Wang XW, Qie LP. Disease indicators for sepsis and analysis of sepsis treatment in children using the continuous blood purification technique. *Genet Mol Res*. 2015;14(2):5685–5693. doi: 10.4238/2015.May.25.21.
34. Hirakawa E, Ibara S, Tokuhisa T, et al. Septic neonate rescued by polymyxin B hemoperfusion. *Pediatr Int*. 2013;55(3):e70–72. doi: 10.1111/ped.12029.
35. Morishita Y, Kita Y, Ohtake K, et al. Successful treatment of sepsis with polymyxin b-immobilized fiber hemoperfusion in a child after living donor liver transplantation. *Dig Dis Sci*. 2005;50(4):757. doi: 10.1007/s10620-005-2569-x.
36. Ярустовский М.Б., Абрамян М.В., Комардина Е.В., Назарова Е.И. Гемокоррекция в педиатрической интенсивной терапии / Сб. материалов X Юбилейной международной конференции «Актуальные аспекты экстракорпорального очищения крови в интенсивной терапии». — М.; 2016. — С. 38. [Yarustovsky MB, Abramyan MV, Komardina EV, Nazarova EI. Gemokorrektsiya v pediatricheskoi intensivnoi terapii. (Conferene proceedings) X Yubileinaya mezhdunarodnaya konferentsiya «Aktual'nye aspekty ekstrakorporal'nogo ochishcheniya krovi v intensivnoi terapii». Moscow; 2016. p. 38. (In Russ).]



## КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

***Ярустовский Михаил Борисович***, доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделением гравитационной хирургии крови и эндоскопии ФГБУ НЦССХ
**Адрес**: 121552, Москва, Рублевское шоссе, д. 135, **тел**.: +7 (495) 414-75-68, **e-mail**: mbyar@yandex.ru .
**ORCID**: http://orcid.org/0000-0002-1849-4745

***Абрамян Марина Владимировна***, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник отделения гравитационной хирургии крови и эндоскопии ФГБУ НЦССХ
**Адрес**: 121552, Москва, Рублевское шоссе, д. 135, **тел**.: +7 (495) 414-75-03, **e-mail**: mar-abr@rambler.ru.
**ORCID**: http://orcid.org/0000-0001-6200-7855

***Комардина Екатерина Викторовна***, младший научный сотрудник отделения гравитационной хирургии крови и эндоскопии ФГБУ НЦССХ
**Адрес**: 121552, Москва, Рублевское шоссе, д. 135, **тел**.: +7 (495) 414-75-03, **e-mail**: nesluchainost@mail.ru.
**ORCID**: http://orcid.org/0000-0002-4997-5218

DOI: 10.15690/vramn591

**Н.А. Зенинская[1], А.В. Колесников[1, 2], А.К. Рябко[1], И.Г. Шемякин[1], И.А. Дятлов[1], А.В. Козырь[1]**

[1] Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Российская Федерация
[2] Институт инженерной иммунологии, Любучаны, Российская Федерация

# Аптамеры для терапии бактериальных инфекций: проблемы и перспективы

*Аптамеры — короткие одноцепочечные фрагменты нуклеиновых кислот, которые в процессе направленной химической «эволюции в пробирке» на основе технологии SELEX отбирают на специфичность к избранной молекулярной мишени. Возможность получать при помощи SELEX олигонуклеотиды, связывающие широчайший спектр высоко- и низкомолекулярных лигандов, а также простота автоматизированного синтеза привели к созданию широкого спектра приложений аптамеров — от биосенсоров до противоопухолевых препаратов. С точки зрения медицинской химии, аптамеры являются новым классом молекул, на основе которых могут быть разработаны лекарственные препараты. Поэтому, а также ввиду стабильности, относительной простоты синтеза и создания все более эффективных стратегий селекции мишеньспецифических молекул аптамеры привлекают внимание разработчиков лекарственных средств, в том числе и антибактериальных. Интерес к антибактериальным аптамерам усиливается и в связи с проблемами, возникшими при разработке принципиально новых антибактериальных средств на основе классических химических соединений — как малых органических молекул, так и синтетических модификаций известных антибиотиков. В настоящем обзоре рассматриваются работы, направленные на создание противоинфекционных аптамеров, и обсуждаются как потенциал, так и существующие на данном этапе ограничения, свойственные этому классу терапевтических молекул.*

***Ключевые слова**: аптамеры, SELEX-терапия бактериальных инфекций.*

***(Для цитирования**:* Зенинская Н.А., Колесников А.В., Рябко А.К., Шемякин И.Г., Дятлов И.А., Козырь А.В. Аптамеры для терапии бактериальных инфекций: проблемы и перспективы. *Вестник РАМН.* 2016;71(5):350–358. doi: 10.15690/vramn591)



## Введение

Термин «аптамер» происходит от латинского «*aptus*», что значит «соответствие», и греческого «meros» — «область» [1, 2]. В основе парадигмы аптамеров как возможных лигандов, связывающих биомолекулы, лежат представления о взаимодействии нуклеиновых кислот с белками [3], низкомолекулярными лигандами (рибосвитчи, или рибопереключатели) [4], а также о каталитической активности рибо- и дезоксирибонуклеиновых кислот (РНК и ДНК) [5, 6].

Впервые работы, посвященные технологии селекции мишеньспецифических аптамеров, впоследствии получившей название SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, систематическая эволюция лигандов экспоненциальным обогащением), были опубликованы в 1990 г. [7, 8.] Первый лекарственный препарат на основе аптамера Макуген (Macugen) был разрешен к применению в 2004 г. [9]. К настоящему моменту более десяти аптамерных терапевтических молекул находятся на различных стадиях клинических испытаний [10]. Аптамеры получают путем селекции *in vitro* комбинатор-

**N.A. Zeninskaya[1], A.V. Kolesnikov[1, 2], A.K. Ryabko[1], I.G. Shemyakin[1], I.A. Dyatlov[1], A.V. Kozyr[1]**

[1] State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation
[2] Immunological Engineering Institution, Lyubuchany, Russian Federation

# Aptamers in the Treatment of Bacterial Infections: Problems and Prospects

*Aptamers are short single-stranded oligonucleotides which are selected via targeted chemical evolution in vitro to bind a molecular target of interest. The aptamer selection technology is designated as SELEX (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment). SELEX enables isolation of oligonucleotide aptamers binding a wide range of targets of interest with little respect for their nature and molecular weight. A number of applications of aptamer selection were developed ranging from biosensor technologies to antitumor drug discovery. First aptamer-based pharmaceutical (Macugen) was approved by FDA for clinical use in 2004, and since then more than ten aptamer-based drugs undergo various phases of clinical trials. From the medicinal chemist's point of view, aptamers represent a new class of molecules suitable for the development of new therapeutics. Due to the stability, relative synthesis simplicity, and development of advanced strategies of target specific molecular selection, aptamers attract increased attention of drug discovery community. Difficulties of the development of next-generation antibiotics basing on the conventional basis of combinatorial chemistry and high-throughput screening have also amplified the interest to aptamer-based therapeutic candidates. The present article reviews the investigations focused on the development of antibacterial aptamers and discusses the potential and current limitations of the use of this type of therapeutic molecules.*

***Key words:** aptamers, nucleotide, SELEX aptamer technique bacterial infections.*

***(For citation**:* Zeninskaya NA, Kolesnikov AV, Ryabko AK, Shemyakin IG, Dyatlov IA, Kozyr AV. Aptamers in the Treatment of Bacterial Infections: Problems and Prospects. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2016;71(5):350–358. doi: 10.15690/vramn591)

ных библиотек ДНК- или РНК-олигонуклеотидов длиной 50–70 мономерных звеньев. Прямой химический синтез позволяет получать библиотеки олигонуклеотидов, состоящие из $10^{17}$ и даже более уникальных молекул. Такой уровень сложности библиотеки на многие порядки превышает разнообразие фаг-дисплейных (Phage display) или экспрессионных библиотек, получаемых генно-инженерными методами (не более $10^{12}$–$10^{13}$ индивидуальных членов). Селекция аптамеров, как правило, осуществляется в несколько раундов, в течение которых проводится обогащение библиотеки мишеньспецифическими последовательностями. Развитие технологий скрининга библиотек аптамеров привело к значительному повышению эффективности как селекции за счет методов, обеспечивающих сокращение числа раундов [11], так и дискриминации неспецифически связывающихся аптамерных молекул [12]. Доступность технологий высокопроизводительного секвенирования значительно облегчает поиск и анализ консенсусных районов аптамеров, обусловливающих связывание с мишенью [13]. За время, прошедшее с момента создания SELEX, технология претерпела глубокие изменения и получила целый ряд модификаций. Детальное обсуждение современного состояния SELEX выходит за рамки данной статьи и представлено, в частности, в процитированных выше и многих других обзорных публикациях.

Аптамеры иногда называют «химическими антителами», поскольку так же, как и антитела, аптамеры можно получить к мишеням, обладающим различной структурой и химическим составом. Однако между антителами и аптамерами имеется и ряд существенных отличий. Поскольку аптамеры являются полностью синтетическими молекулами, их производство намного дешевле, чем производство антител. Аптамеры значительно меньше антител по размеру (8–25 против ~155 кДа у антител класса G [14, 15]), что в ряде случаев облегчает проникновение в ткани [16–18]. В отличие от антител, которые производятся биосинтетически, препараты синтетических аптамеров обладают высокой воспроизводимостью характеристик в различных лотах. Синтез аптамеров может сопровождаться введением различных химических модификаций практически без ограничения по положению и химической структуре. В частности, такие модификации повышают устойчивость аптамеров к нуклеазам [19], улучшают фармакокинетические показатели [20], увеличивают аффинность и химическое разнообразие библиотек аптамеров [21]. Аптамеры термостабильны (способны выдерживать нагревание до 80–90°C без потери своих свойств) и могут длительное время храниться при комнатной температуре [22].

Одним из важнейших направлений в разработке аптамеров является создание терапевтических молекул. В связи с распространением лекарственно-устойчивых патогенных бактерий и сложностями, с которыми столкнулись разработчики новых антибиотиков на основе библиотек малых органических молекул [23], ведется постоянный поиск альтернативных платформ, на основе которых могли бы быть созданы эффективные антибактериальные препараты. Существующие прототипы антибактериальных средств на основе аптамеров целесообразно разделить на препараты, самостоятельно инактивирующие бактериальные клетки, и молекулы, блокирующие действие секретируемых патогенами токсинов и других факторов вирулентности.

Основные направления, в которых ведутся разработки антибактериальных аптамеров, включают:

1) воздействие на метаболизм патогена;

2) стимуляцию иммунного ответа на клетки конкретного вида бактерий;

3) блокировку инвазивной активности микроорганизмов по отношению к клеткам хозяина;

4) ингибирование действия токсинов и других факторов вирулентности [24].

## Аптамеры, ингибирующие бактериальные ферменты

В 2011 г. были получены ДНК-аптамеры, связывающие полифосфаткиназу-2 *Mycobacterium tuberculosis*. Отбор осуществлялся методом SELEX при помощи магнитных гранул для выделения и очистки биологических макромолекул (Magnetic-bead) на протяжении 20 циклов. В итоге было отобрано 11 индивидуальных последовательностей, которые были разделены на 2 группы на основании гомологичных мотивов в первичной последовательности нуклеотидов и наличия сходных элементов вторичной структуры. С помощью программы квадруплексного формирования G-богатых последовательностей (Quadruplex forming G-Rich Sequences, QGRS mapper) удалось выяснить, что такого рода аптамеры образуют структуры в виде G-квадруплексов, которые, вероятно, являются полезными при взаимодействии со сложным октамерным комплексом полифосфаткиназы-2. Методом изотермической калориметрии был отобран аптамер, связывающий полинуклеотид с константой диссоциации (Kd) 870±220 нМ. Анализ взаимодействия этого аптамера с полифосфаткиназой-2 из *Laribacter hongkongensis* и *Vibrio cholerae* продемонстрировал наличие определенной (хотя и пониженной по сравнению с *M. tuberculosis*) аффинности и к ферментам этих микроорганизмов. Было показано, что концентрация полумаксимального ингибирования ($IC_{50}$) мишени для данного аптамера составляет 39,3±10 нМ, в то время как остальные отобранные индивидуальные последовательности подавляющего действия почти не проявляют. К тому же он оказывает не столь сильный ингибирующий эффект на полифосфаткиназу-2 *L. hongkongensis* и *V. cholerae*. Полифосфаткиназа-2 является критическим фактором и вирулентности, и стрессовой резистентности бактерий. Эффект при ингибировании полифосфаткиназы-2 может быть плейотропным и заключаться в нарушении подвижности бактерий, формировании дефектов биопленок, понижении устойчивости к физическим стрессам и ингибиторам роста [25]. Таким образом, ингибиторы полифосфаткиназы-2 могут замедлять развитие и распространение инфекции в организме.



Недавно были описаны аптамеры, специфичные к другому ферменту *M. tuberculosis* — синтетазе гликолевой кислоты (Alpha-Hydroxy Acids, AHAs) [26]. Последняя является валидированной мишенью для создания противотуберкулезных препаратов [27]. Две полученные молекулы вначале демонстрировали эффективное подавление активности AHAs ($IC_{50}$ 20–30 нМ), несколько отличаясь механизмом ингибирования фермента, а после оптимизации длины — подавление роста *M. tuberculosis* в культуре (минимальная ингибирующая концентрация 5,36 и 6,24 мкг/мл) при практическом отсутствии токсичности в отношении клеток млекопитающих. Вместе с тем авторы отмечают, что механизм проникновения полученных аптамеров в клетки *M. tuberculosis* остается неизученным [26].

Ингибирование β-лактамаз является одним из важнейших способов повышения эффективности антибиотиков — ингибиторов синтеза клеточной стенки. В частности, были получены ДНК-аптамеры, способные

ингибировать действие металло-β-лактамазы патогенной палочки *Bacillus cereus*. В качестве мишени для отбора аптамеров методом SELEX была использована металло-β-лактамаза подкласса BcII. В итоге нескольких циклов селекции удалось выделить только 1 аптамер длиной 30 оснований. После программной идентификации его вторичной структуры была синтезирована укороченная версия аптамера длиной 10 оснований. При этом $IC_{50}$ для исходного и модифицированного аптамеров составила 1,2 нМ, что является весьма высоким показателем. Для анализа специфичности связывания использовались карбоксипептидаза А свиньи и серин-β-лактамаза. Оба фермента не ингибировались аптамером, что показывает его высокую специфичность к целевому энзиму. Тесты на *B. cereus* аптамера с β-лактамным антибиотиком (цефалексин) показали супрессию роста культуры в течение 20 ч при 30°С [28].

Аптамеры могут быть получены не только с использованием отдельных молекул-мишеней, но и на основе связывания с более сложными структурами, включающими живые клетки, в том числе бактериальные (cell-SELEX). Следует отметить, что технологически cell-SELEX является весьма эффективной процедурой, поскольку в роли твердой фазы выступает сама мишень, снижая, таким образом, вероятность селекции неспецифически связывающихся аптамерных молекул [29, 30].



В 2012 г. были получены высокоспецифичные ДНК-аптамеры к *Salmonella enteritidis* и *Salmonella typhimurium* методом селекции библиотек аптамеров с использованием в качестве мишеней живых интактных клеток (cell-SELEX). Константы диссоциации отобранных аптамерных пулов составляли 7 и 25 нМ. Аптамеры показывали высокую специфичность, а именно: они не связывались с термоинактивированными культурами *Salmonella* и неповрежденными культурами *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Citrobacter freundii*. В итоге, в соответствии с показателями наиболее высокой аффинности были выбраны 10 аптамеров для *S. enteritidis* и 9 — для *S. typhimurium*. Антибактериальные эффекты воздействия аптамеров были определены путем сравнения и подсчета количества колоний на чашках Петри в культуре, обработанной аптамерами, и в контроле, что отобразилось в виде существенного ингибирования роста. Механизм подавления роста бактерий не был до конца изучен, однако выяснилось, что бактериостатическое действие вызвано влиянием аптамеров на клеточную стенку бактерий. В экспериментах по окрашиванию Родамином-123 обработанных аптамерами сальмонелл выяснилось, что присутствие аптамеров вызывало сильную деполяризацию клеточной стенки после 30-минутной инкубации. Эффект наблюдался на протяжении 18 ч и сопровождался реверсией [31]. Эффекты взаимодействия аптамеров с поверхностью бактериальных клеток практически не изучены и, возможно, что модуляция физико-химических процессов в бактериальных оболочках является новым перспективным направлением применения аптамеров как для научных целей, так и для создания новых антибактериальных средств.

## Аптамеры, стимулирующие иммунный ответ к бактериям

Внешняя стенка многих бактерий в процессе эволюции приобрела функцию защиты от воздействия иммунной системы атакуемого организма. Модификация клеточной стенки может изменять ее свойства и облегчать распознавание патогена защитными системами организма-хозяина. В 2007 г. впервые были получены ДНК-аптамеры, специфичные к интактным клеткам вирулентного штамма *M. tuberculosis* [32]. После 10 раундов отбора эффективность связывания 20 из отобранных последовательностей была проанализирована методом изотермической калориметрии, а специфичность к *M. tuberculosis* — методом проточной цитометрии. На основании полученных данных был идентифицирован оптимальный вариант аптамера и установлено, что, блокируя некоторые мембранные белки на поверхности бактерии, аптамер может активировать продукцию CD4+ Т клетками организма-хозяина интерферона γ — важнейшего компонента иммунного ответа против возбудителя туберкулеза. При испытаниях аптамера на мышиной модели инфекции было показано, что средняя продолжительность жизни животных при введении им патогена в среднем увеличивалась на 3 дня по сравнению с контрольной группой. Кроме того, было отмечено уменьшение отека легких у животных, которым в процессе инфекции вводили аптамер [33].

В качестве продолжения предыдущего исследования были получены ДНК-аптамеры к маннозокапсулированному липоарабиноманнану *M. tuberculosis* (ManLAM). За 12 раундов селекции было отобрано 13 различных молекул аптамеров. Иммуноферментным методом, аналогичным ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), но использующим одноцепочечные олигонуклеотиды вместо антител (Enzyme-linked oligonucleotide assay, ELONA), был идентифицирован аптамер с наибольшей константой диссоциации (436,3±37,84 нМ) и проанализирована кроссреактивность отобранных к *M. tuberculosis* аптамеров к различным бактериям. Исследуемый аптамер оказался не только высокоспецифичным к избранной мишени, но и показал значительный ингибирующий эффект в отношении ManLAM-индуцированной иммуносупрессии CD11c+ дендритных клеток, а также активацию CD4+ Th1 лимфоцитов. Экспериментальная терапия полученным аптамером зараженных *M. tuberculosis* мышей оказалась весьма эффективной: в тканях легких и селезенки спустя 30 дней после введения аптамера присутствовало незначительное количество клеток патогена, причем существенных патологических изменений обнаружено не было. Аналогичный 16-недельный эксперимент с макаками-резусами показал меньшую эффективность терапии: были диагностированы хроническое воспаление легких и интерстициальная пневмония, однако формирования гранулем не было обнаружено. В итоге, только 2 из 3 макак, составляющих экспериментальную группу, были излечены [34]. Тем не менее результаты показывают, что данный аптамер обладает значительным потенциалом и может рассматриваться как основа для новых противотуберкулезных вакцин.

Интересная модель непрямой стимуляции иммунного ответа на основе модифицированного аптамера была разработана для повышения эффективности элиминации стрептококков за счет предсуществующего иммунного ответа. В организме человека в высоком титре присутствуют антитела к галактозо-α-1,3-галактозил-β-1,4-N-ацетилглюкозамину (α-Gal) [35]. Этот олигосахарид был конъюгирован с аптамером, отобранным на связывание с М-белком на поверхности стрептококков. Таким образом, конъюгат с аптамером являлся молекулярной «приманкой» для повышения эффективности опсонизации патогена и его последующей элиминации различными компонентами иммунной системы. В экспериментах *in vitro* были продемонстрированы эффективный фагоцитоз

опсонизированных бактерий и бактерицидная активность нейтрофилов [36]. Учитывая интерес к технологиям повышения эффективности презентации антигенов [37], описанная стратегия может получить распространение при создании профилактических и терапевтических антибактериальных вакцин.

Перспективным направлением является использование аптамеров для создания искусственных опсонинов — молекул или молекулярных комплексов, способных усиливать продуктивный фагоцитоз клеток-патогенов антигенпрезентирующими клетками или провоцировать фиксацию комплемента с последующим лизисом бактериальных частиц. Впервые успешная опсонизация с использованием конъюгатов аптамер-константной части молекулы иммуноглобулина (Fc) была проведена в модельных экспериментах с магнитными частицами, покрытыми поли-γ-D-глутаминовой кислотой — основным компонентом клеточной стенки *Bacillus anthracis*, предотвращающим продуктивный фагоцитоз патогена. Было показано, что опсонизированные Fc-аптамерным конъюгатом частицы поглощаются значительно более эффективно по сравнению с неопсонизированными.

В дальнейшем удалось получить ДНК-аптамер к липополисахариду *E. coli* O111:B4. Для анализа связывания аптамеров также использовался метод, аналогичный ELISA, с применением стрептавидин-пероксидазных конъюгатов, который показал, что отобранные аптамеры имеют высокое сродство к мишени. Полученные липополисахаридсвязывающие аптамеры были затем конъюгированы с белковым комплексом C1qrs, который включал 3 связанных белка системы комплемента — C1q, C1r и C1s соответственно. Конъюгат комплемент-аптамер связывался с клетками *E. coli* и реализовывал антителонезависимую активацию комплемента, которая и обусловливала лизис клеток-мишеней [38].

## Аптамеры, блокирующие инвазивную активность патогенов

Хотя некоторые бактерии, такие как *B. anthracis*, используют относительно пассивные механизмы проникновения в макрофаги [39] (сопровождающиеся тем не менее последующей блокировкой иммунного ответа под действием комплекса токсинов [40]), целый ряд патогенов использует активные стратегии проникновения внутрь клеток хозяина, которые осуществляются при участии специализированных белковых комплексов — адгезинов, инвазинов, а также систем, индуцируемых на последующих стадиях инвазии и угнетающих защитные системы клеток — объекты инвазии [41, 42]. Системы инвазии бактериальных патогенов были выбраны в качестве мишеней для аптамеров несколькими группами исследователей.

В 2005 г. были получены РНК-аптамеры, связывающиеся с IVB-пилями *S. typhimurium*. В качестве мишени для селекции использовали предшественник белка PilS (pre-PilS). Константа связывания с пилями для наиболее эффективного из полученных аптамеров составляла 8,56 нМ. Способность аптамера ингибировать инвазию сальмонелл в макрофагоподобные клетки линии THP-1 (клетки миелолейкоза человека) была проанализирована с использованием амплификации в реальном времени ДНК сальмонелл, выделенной из культуры THP-1 после инкубации в присутствии аптамера и удаления внеклеточных бактерий. Была показана дозозависимость ингибирования инвазии от концентрации конкурентного аптамера, при этом удавалось достичь практически полной блокировки заражения. Полученный продукт имеет не только значительный потенциал в борьбе против сальмонеллезной инвазии, но и может быть использован как аналитический инструмент в исследовании взаимодействия бактериальных пили типа IVB с клетками хозяина [43].

Интересным примером аптамеров, связывающихся с функциональными поверхностными структурами сальмонелл, являются молекулы, ингибирующие образование биопленок. Биопленки значительно повышают устойчивость бактерий к неблагоприятным условиям среды, в том числе и антибиотикорезистентность [44]. Прикрепление сальмонелл и других бактерий к поверхностям, обусловливающее формирование биопленки, требует синтеза флагелл (жгутиков), поэтому блокировка их взимодействия с внешними субстратами может предотвращать формирование биопленок. В описываемом исследовании был получен аптамер к флагеллину *S. choleraesuis* с константой связывания 41±2 нМ, при этом изначально селекция на предмет ингибирования формирования биопленок велась с использованием целых клеток (cell-SELEX), а впоследствии мишень была идентифицирована методами масс-спектрометрии. Полученный «аптамер 3» ингибировал формирование биопленки и усиливал действие антибиотиков [45].



Селекция аптамеров с использованием в качестве мишеней целых бактерий является одним из наиболее распространенных методов создания средств блокировки инвазии патогенов в клетки хозяина. В 2012 г. этим методом было получено семейство ДНК-аптамеров к клеткам *M. tuberculosis* с целью исследования блокировки клеточной инвазии возбудителя туберкулеза [33]. Отобранный из популяции 30 молекул на основании данных проточной цитометрии аптамер обладал аффинностью к *M. tuberculosis* в наномолярном диапазоне, предотвращал проникновение патогена в макрофаги и был способен стимулировать в присутствии возбудителя синтез цитокинов (интерферона γ, интерлейкинов 15 и 17), усиливая таким образом иммунный ответ к патогену [46].

Одним из важных преимуществ аптамеров по сравнению с антителами является возможность их отбора к широкому спектру низкомолекулярных мишеней. Спектр подобных мишеней для антител весьма ограничен: помимо необходимой иммуногенности малой молекулы-мишени для индукции значимого иммунного ответа данную мишень необходимо гаптенизировать (щадящее разрушение), иначе говоря, — представить иммунной системе в виде ковалентного конъюгата с большой (как правило, белковой) молекулой. Более того, даже в случае гаптенизации не гарантировано распознавание малой органической молекулы иммунокомпетентными клетками, ведущее к индукции антительного ответа. Таким образом, спектр низкомолекулярных мишеней, к которым можно получить антитела, весьма ограничен. Напротив, нет никаких ограничений на создание аптамеров, связывающих всевозможные малые молекулы, вплоть до аденозинтрифосфата [47, 48].

N-ацилгомосеринлактон (N-acylhomoserine lactone, HSL) является ключевым компонентом регуляции чувствительности бактерий к их концентрации в окружающей среде (Quorum sensing). Нарушение этой чувствительности приводит к некорректным реакциям патогенов на неблагоприятные условия среды (например, к нарушениям в синтезе биопленок), и может использоваться

для сенсибилизации бактерий к антибиотикам, а также в других терапевтических стратегиях [49]. Поскольку HSL секретируется в окружающую среду, он является удобной мишенью для аптамеров. В 2013 г. были получены ДНК-аптамеры к структурному аналогу HSL — аминолактамному суррогату (ALS), пригодному для ориентированной иммобилизации на магнитных микросферах. Полученные аптамеры проявляли высокую аффинность к ALS (10–20 нМ), а в отношении природных лактонов (гомосерин- и бутирилзамещенных) — разбились на три группы. Одна из групп аптамеров, аффинных к ALS, не продемонстрировала существенного сродства к природным лактонам, вторая связывала только бутирилзамещенный лактон, а третья — только HSL. Не удалось идентифицировать аптамер, способный эффективно связывать обе модификации лактона, поэтому были отобраны молекулы, связывающие бутирильный и гомосериновый варианты лактона с максимальной аффинностью. Очевидного влияния на рост культуры *P. aeruginosa in vitro* данные аптамеры не оказывали, однако существенно снижали синтез пиоцианина, LasA- и LasB-протеаз, а также подавляли формирование биопленок [50].

## Аптамеры, ингибирующие действие бактериальных токсинов



Впервые аптамеры, ингибирующие действие нейротоксина *Clostridium botulinum*, были выделены в 2007 г. Авторы предположили возможность селекции аптамеров ко всем трем функциональным доменам ботулинического нейротоксина типа А (BoNT/A) для получения как профилактических, так и терапевтических препаратов [51].

Впоследствии были получены аптамеры, связывающие полноразмерный токсоид BoNT/A (токсин, инактивированный альдегидом) и короткий фрагмент тяжелой цепи BoNT/A (HC-пептид), содержащий 19 аминокислот (аминокислоты 1177–1195). Аптамеры к HC-пептиду BoNT/A должны были тормозить связывание токсина с поверхностью клеток-мишеней. Константы диссоциации отобранных аптамеров измеряли методом флюоресцентной анизотропии. У аптамеров, специфичных к токсоиду, константа равновесия варьировала в пределах от 3 до 51 нМ, а у молекул, связывающих HC-пептид, — от 1 до 4 мкМ. Дальнейшие исследования показали, что Hc-пептидные ДНК-аптамеры полностью ингибировали связывание нейтрализующего моноклонального антитела с полноразмерным токсином. Был сделан вывод о возможности разработки на основе HC-пептидного аптамера препарата, способного воспрепятствовать связыванию BoNT/A с рецептором-мишенью на поверхности синаптических везикул [52].

Аптамеры, специфичные к легкой цепи (LC) BoNT/A и ингибирующие протеолитическую активность, были получены методом автоматизированного SELEX. Константа диссоциации для трех наиболее эффективно связывавшихся с мишенью РНК аптамеров составляла 87 нМ. При дальнейшем исследовании было показано, что два из полученных аптамеров являются неконкурентными, а один — конкурентным ингибитором LC BoNT/A. Для обеспечения устойчивости к нуклеазам аптамеры были стабилизированы 2'F-пирамидоном [53]. Полученные РНК-аптамеры представляют собой перспективные прототипы для разработки как терапевтических, так и диагностических препаратов против ботулизма. Интересно, что неконкурентные ингибиторы металлопротеаз могут являться наиболее ценными с точки зрения возможного терапевтического применения, поскольку они с меньшей вероятностью могут ингибировать активность различных металлоферментов организма-хозяина [54].

Исследований, посвященных детекции бактериальных токсинов на основе аптамеров, пока значительно больше, чем работ по селекции потенциальных терапевтических молекул [55, 56]. Ряд методик, разработанных для целей диагностики, оказывается весьма перспективным для последующего отбора терапевтических молекул. Например, для диагностики ботулотоксинов различных серотипов с применением аптамеров была разработана методика на основе флюоресцентного резонансного переноса энергии (Fluorescence resonance energy transfer, FRET). Анализ специфичности связывания аптамеров с ботулотоксинами различных серотипов проводили, используя возможность синтеза аптамеров с заранее встроенными красителями и гасителями флюоресценции. Изменение конформации аптамера при связывании может сопровождаться изменением расстояния между флюорофором и гасителем, что ведет к изменению интенсивности флюоресценции [57]. Удобство данной методики заключается в том, что она позволяет изучать связывание аптамера с мишенью в растворе, исключая искажающие результаты измерений твердофазными методами и значительно упрощая процедуру анализа. Создание таких методик возможно благодаря значительной гибкости «химического пространства» синтеза олигонуклеотидов.

Одними из первых аптамеров к стафилококковым энтеротоксинам были ДНК-шпигельмеры (от нем. Spiegel — зеркало, греч. Meros — часть, доля; энтантиомеры исходных аптамеров) против энтеротоксина B *S. aureus* (*Staphylococcus enterotoxins* B, SEB), отобранные зеркальным методом SELEX (Mirror-image) [58]. Характеристики связывания с SEB были проанализированы с использованием поверхностного плазмонного резонанса (Plasmon resonance). Константа равновесия шпигельмера с оптимальными характеристиками составляет ~420 нМ. При этом он проявляет высокую специфичность при связывании с SEB даже при избытке концентрации других белков (обнаружено на примере казеина). Идентифицированный шпигельмер может быть положен как в основу диагностических систем, так и для разработки терапевтических препаратов [59].

В 2014 г. методом классической SELEX были получены ДНК-аптамеры против стафилококкового α-токсина. В результате 10 раундов селекции удалось выделить 49 уникальных последовательностей. Все они были проверены на возможность нейтрализации цитотоксичности α-токсина: для эксперимента была взята доза токсина, вызывающая 50% клеточную смерть в течение 6 ч ($LD_{50}$). Четыре из 49 аптамеров повышали жизнеспособность клеток до ~85–90%, что характеризует их как продукт со значительным терапевтическим потенциалом при заболеваниях, вызванных *S. aureus* [60].

Работы по получению аптамеров к токсину SEB ведутся весьма активно. В частности, в одной из последних работ были проведены не только эксперименты *in vitro* с использованием моноцитарных клеточных линий, но и проанализировано действите ПЭГ-модифицированного аптамера *in vivo* на классической мышиной модели токсического шока, индуцированного SEB. В этих экспериментах было достигнуто значительное снижение смертности эксперментальных животных при введении полиэтиленликированного аптамера [61].

### Аптамеры и рибосвитчи

По сути, многие из рибосвитчей (Riboswitch) являются природными РНК-аптамерами, связывающимися с низкомолекулярными лигандами и осуществляющими сигнальную трансдукцию [62, 63]. Существование большого числа как видов рибосвитчей, так и связывающих их лигандов является своеобразным аргументом в пользу развития аптамерных платформ, существующих *in vivo*. Рибосвитчи являются нетранслируемыми последовательностями матричной РНК, с которыми низкомолекулярный метаболит или иная малая молекула способны связываться без посредничества белков, вызывая изменения во вторичной структуре РНК [64]. Изменения структуры РНК затем транслируются в изменение экспрессии генов. Рибосвитч обычно располагается на 5'-конце цепи матричной РНК и представляет собой структуру из двух доменов — аптамерного и регуляторного. Аптамерный домен отвечает за связывание с сигнальной молекулой, регуляторный — за модуляцию экспрессии гена. Механизмы влияния на экспрессию разнообразны: воздействие может осуществляться и на транскрипционном, и на посттранскрипционном уровне. Регуляторные домены рибосвитчей весьма вариабельны и отличаются даже у близкородственных видов, в то время как аптамерный домен зачастую весьма консервативен [65]. Учитывая аптамерподобную структуру рибосвитчей, логично было бы ожидать работ по созданию искусственных рибосвитчей и модификации уже существующих на основе технологий SELEX [66]. Однако на данный момент эти работы лишь опосредованно связаны с созданием антибактериальных агентов на основе селекции рибосвитчей, например через создание систем для тестирования антибиотиков [67] или в интересах синтетико-биологического подхода к созданию регулируемых моделей для инфекционных заболеваний [68].

### Проблемы селекции и применения аптамеров для создания антибактериальных и антитоксинных препаратов

Несмотря на интенсивные исследования в области антибактериальных аптамеров, подтверждаемые примерами из настоящего обзора, следует отметить, что в данной области имеются задачи, решить которые еще предстоит. В значительной степени эти проблемы вызваны теми же особенностями строения бактерий, которые привели в свое время к неудачам в создании новых антибиотиков методами медицинской химии и высокопроизводительного скрининга библиотек малых молекул [69]. Клеточная стенка бактерий непроницаема для немодифицированных молекул ДНК или РНК. В силу этого выбор мишеней для большинства антибактериальных аптамеров в значительной степени ограничивался секретируемыми молекулами (в первую очередь, токсинами и другими факторами вирулентности) или мишенями, находящимися на внешней мембране микроорганизмов.

Разработка принципиально новых подходов к созданию антибиотиков позволяет говорить о начале преодолении кризиса в этом направлении исследований [35, 70]. Таким же образом новые технологии, разрабатываемые в области селекции и дизайна аптамеров, помогут созданию высокоэффективных антибактериальных препаратов на основе этих молекул.

Например, использование аптамеров в качестве промежуточного звена для опсонизации бактерий предсуществующими в организме антителами [71] может рассматриваться в качестве одного из способов достижения терапевтического эффекта без необходимости преодоления барьера в форме клеточной стенки микроорганизма. В рамках той же парадигмы аптамеры были использованы в качестве средства направленной доставки наноконтейнеров, содержащих антибиотик [72]. Доставка с использованием наноконтейнеров, высвобождающих действующее вещество только при условии связывания аптамеров с мишенью, повышает специфичность действия антибиотика в отношении целевого патогена и уменьшает значение минимальной ингибирующей концентрации, снижая вероятность формирования антибиотикорезистентности как у целевого патогена, так и за счет уменьшения неспецифического эволюционного давления на непатогенную микрофлору. Физические методы, использующие аптамеры в качестве мишеньнаправленного носителя, в частности фотоинактивация [73], могут быть развиты на основе имеющихся подходов к фотодинамической терапии [74] и использованы в борьбы с патогенами, обладающими неспецифической резистентностью, например за счет формирования биопленок [75].

Можно предположить, что принципиальная способность аптамеров как фрагментов ДНК или РНК воспроизводиться в аппарате репликации или транскрипции клетки [76] приведет к разработке аптамеров, включенных в состав плазмидного или фагового генома и способных к высокоэффективному размножению внутри бактерии после ее инфекции фаговой частицей [77] или иным вектором, несущим репликационно- и транскрипционно-компетентный аптамер [78].



В качестве альтернативного пути доставки молекул в бактериальные клетки можно рассматривать биспецифические аптамеры, способные не только распознавать внутриклеточные мишени, но и связываться с транспортерами, переносящими биомолекулы во внутриклеточное пространство бактерий по аналогии с механизмом проникновения в клетки бактериоцинов [79]. Одной из приоритетных мишеней для аптамеров, действующих по вышеописанному сценарию, могут быть рибосвитчи [80]. С другой стороны, поскольку искусственные рибосвитчи, основанные на аптамерах, активно используются в экспериментах по модуляции метаболизма и сложных регуляторных процессов в бактериях [81], можно предполагать, что сфера использования «эндогенных» аптамеров в интересах борьбы с бактериальными инфекциями может быть расширена и в область создания вакцинных штаммов, для которых требуется исключительно тонкая настройка степени вирулентности [82].

Одной из проблем использования аптамеров в качестве терапевтических молекул долгое время являлась их относительно низкая аффинность к мишеням. Для аптамеров, блокирующих действие токсинов, константа связывания с мишенью имеет принципиальное значение. Поскольку у токсина, как правило, аффинность к клеточным рецепторам весьма высока, а связывание сопровождается значительными конформационными перестройками [83], относительно низкоаффинные аптамеры в таких условиях будут вытесняться из комплекса с мишенью и окажутся неспособными выполнять блокирующую функцию.

Принципиальная возможность создания высокоаффинных аптамеров (с константами связывания в субнаномолярном диапазоне) была продемонстрирована на примере аптамера к тромбину и ряда других [84]. Однако число высокоаффинных аптамеров, полученных классическим путем селекции на основе немодифицированных

ДНК и РНК, относительно невелико. Не исключено, что получение немодифицированных высокоаффинных аптамеров к некоторым типам мишеней столкнется с трудноразрешимыми физико-химическими проблемами [85].

Создание модификаций нуклеозидов, содержащих гидрофобные ароматические группы, а также мутантной ДНК-полимеразы, способной эффективно включать в цепочку ДНК модифицированные нуклеотиды [20], позволило не только повысить аффинность отобранных аптамеров к мишеням, но и значительно расширить круг мишеней, к которым возможно получение одноцепочечных олигонуклеотидов [86]. Новые молекулы получили название SOMAmers (Slow Off-rate Modified Aptamers), что подчеркивает один из важных механизмов селекции — отбор молекул, медленно (в течение десятков минут и часов) диссоциирующих из комплекса с мишенью. Успех в получении высокоаффинных лигандов на основе сомамеров к клинически значимым белковым молекулам, например к интерлейкину 6 [87], обусловливает дальнейшее развитие этой технологии, в частности создание новых ферментов, способных полимеризовать различные модификации нуклеотидов.

## Заключение

Разработка технологий получения высокоаффинных аптамеров далека от завершения, и необходимы усилия как в области модификации структуры самих аптамеров, так и модернизации подходов к их селекции из библиотек [11, 88]. Решение указанных проблем значительно продвинет разработку антибактериальных препаратов на основе аптамеров.



## Источник финансирования

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-15-00630).

## Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

## Участие авторов

Н.А. Зенинская — сбор материалов, подготовка текста, редактирование; А.В. Колесников — анализ полученных данных, разработка концепции обзорной статьи, подготовка текста; А.К. Рябко — сбор материалов, подготовка текста; И.Г. Шемякин — разработка концепции обзорной статьи; И.А. Дятлов — анализ полученных данных, дизайн исследования; А.В. Козырь — координация подготовки материалов, анализ информационных источников, дизайн исследования.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Klussmann S, editor. *The aptamer handbook: functional oligonucleotides and their applications*. Weinheim: Wiley-VCH; 2006. doi: 10.1002/3527608192.
2. Tan W, Fang X, editors. *Aptamers selected by cell-SELEX for theranostics*. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2015. 352 p. doi: 10.1007/978-3-662-46226-3.
3. Ptashne M, Hopkins N. The operators controlled by the lambda phage repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1968;60(4):1282–1287. doi: 10.1073/pnas.60.4.1282.
4. Westhof E. Isostericity and tautomerism of base pairs in nucleic acids. *FEBS Lett*. 2014;588(15):2464–2469. doi: 10.1016/j.febslet.2014.06.031.
5. Cech TR. Ribozymes, the first 20 years. *Biochem Soc Trans*. 2002;30(6):1162–1166. doi: 10.1042/bst0301162.
6. Silverman SK. Catalytic DNA: scope, applications, and biochemistry of deoxyribozyme. *Trends Biochem Sci*. 2016;41(7):595–609. doi: 10.1016/j.tibs.2016.04.010.
7. Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*. 1990;346(6287):818–822. doi: 10.1038/346818a0.
8. Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*. 1990;249(4968):505–510. doi: 10.1126/science.2200121.
9. FDA orders new phase III trial for anticancer drug; SuperGen withdraws orathecin NDA; FDA okays keratinocyte growth factor for prevention of mucositis during chemotherapy; AstraZeneca withdraws application for European approval of Iressa; FDA approves anti-angiogenesis agent for “wet” age-related macular degeneration; Access pharmaceuticals gets clearance for clinical trials of AP5346; FDA establishes nanotechnology site; Microarray chip for genetic analysis receives FDA clearance. *Biotechnol Law Rep*. 2005;24(2):177–179. doi: 10.1089/blr.2005.24.177.
10. Weinberg MS. Therapeutic Aptamers March On. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2014;3(9):e194. doi:10.1038/mtna.2014.46
11. Blind M, Blank M. Aptamer selection technology and recent advances. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2015;4(1):e223. doi: 10.1038/mtna.2014.74.
12. Ozer A, Pagano JM, Lis JT. New technologies provide quantum changes in the scale, speed, and success of SELEX methods and aptamer characterization. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2014;3(8):e183. doi: 10.1038/mtna.2014.34.
13. Schutze T, Wilhelm B, Greiner N, et al. Probing the SELEX process with next-generation sequencing. *PLoS One*. 2011;6(12):e29604. doi: 10.1371/journal.pone.0029604.
14. Hicke BJ, Stephens AW. Escort aptamers: a delivery service for diagnosis and therapy. *J Clin Invest*. 2000;106(8):923–928. doi: 10.1172/JCI11324.
15. Sun H, Zu Y. Aptamers and their applications in nanomedicine. *Small*. 2015;11(20):2352–2364. doi: 10.1002/smll.201403073.
16. Keefe AD, Pai S, Ellington A. Aptamers as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9(7):537–550. doi: 10.1038/nrd3141.
17. Nimjee SM, Rusconi CP, Sullenger BA. Aptamers: an emerging class of therapeutics. *Annu Rev Med*. 2005;56(1):555–583. doi: 10.1146/annurev.med.56.062904.144915.
18. Thiel KW, Giangrande PH. Therapeutic applications of DNA and RNA aptamers. *Oligonucleotides*. 2009;19(3):209–222. doi: 10.1089/oli.2009.0199.
19. Maier KE, Levy M. From selection hits to clinical leads: progress in aptamer discovery. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2016;5:16014. doi: 10.1038/mtm.2016.14.
20. Bruno JG. A review of therapeutic aptamer conjugates with emphasis on new approaches. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2013;6(3):340–357. doi: 10.3390/ph6030340.
21. Rohloff JC, Gelinas AD, Jarvis TC, et al. Nucleic acid ligands with protein-like side chains: modified aptamers and their use as diagnostic and therapeutic agents. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2014;3(10):e201. doi: 10.1038/mtna.2014.49.
22. Thiel K. Oligo oligarchy-the surprisingly small world of aptamers. *Nat Biotechnol*. 2004;22(6):649–651. doi: 10.1038/nbt0604-649.
23. Lewis K. Platforms for antibiotic discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12(5):371–387. doi: 10.1038/nrd3975.
24. Ozalp VC, Bilecen K, Kavruk M, Oktem HA. Antimicrobial aptamers for detection and inhibition of microbial pathogen growth. *Future Microbiol*. 2013;8(3):387–401. doi: 10.2217/fmb.12.149.

25. Shum KT, Lui EL, Wong SC, et al. Aptamer-mediated inhibition of Mycobacterium tuberculosis polyphosphate kinase 2. *Biochemistry*. 2011;50(15):3261–3271. doi: 10.1021/bi2001455.
26. Baig IA, Moon JY, Lee SC, et al. Development of ssDNA aptamers as potent inhibitors of Mycobacterium tuberculosis acetohydroxyacid synthase. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1854(10 Pt A):1338–1350. doi: 10.1016/j.bbapap.2015.05.003.
27. Gokhale K, Tilak B. Mechanisms of bacterial acetohydroxyacid synthase (AHAS) and specific inhibitors of Mycobacterium tuberculosis AHAS as potential drug candidates against tuberculosis. *Curr Drug Targets*. 2015;16(7):689–699. doi: 10.2174/1389450116666150416115547.
28. Schlesinger SR, Lahousse MJ, Foster TO, Kim SK. Metallo-β-lactamases and aptamer-based inhibition. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2011;4(2):419–428. doi: 10.3390/ph4020419.
29. Teng J, Yuan F, Ye Y, et al. Aptamer-based technologies in foodborne pathogen detection. *Front Microbiol*. 2016;7:1426. doi: 10.3389/fmicb.2016.01426.
30. Hamula CL, Peng H, Wang Z, et al. The effects of SELEX conditions on the resultant aptamer pools in the selection of aptamers binding to bacterial cells. *J Mol Evol*. 2015;81(5–6):194–209. doi: 10.1007/s00239-015-9711-y.
31. Kolovskaya OS, Savitskaya AG, Zamay TN, et al. Development of bacteriostatic DNA aptamers for salmonella. *J Med Chem*. 2013;56(4):1564–1572. doi: 10.1021/jm301856j.
32. Ohuchi S. Cell-SELEX Technology. *Biores Open Access*. 2012;1(6):265–272. doi: 10.1089/biores.2012.0253.
33. Chen F, Zhou J, Luo F, et al. Aptamer from whole-bacterium SELEX as new therapeutic reagent against virulent Mycobacterium tuberculosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;357(3):743–748. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.04.007.
34. Pan Q, Wang Q, Sun X, et al. Aptamer against mannose-capped lipoarabinomannan inhibits virulent Mycobacterium tuberculosis infection in mice and rhesus monkeys. *Mol Ther*. 2014;22(5):940–951. doi: 10.1038/mt.2014.31.
35. Galili U. Anti-Gal: an abundant human natural antibody of multiple pathogeneses and clinical benefits. *Immunology*. 2013;140(1):1–11. doi: 10.1111/imm.12110.
36. Kristian SA, Hwang JH, Hall B, et al. Retargeting pre-existing human antibodies to a bacterial pathogen with an alpha-Gal conjugated aptamer. *J Mol Med (Berl)*. 2015;93(6):619–631. doi: 10.1007/s00109-015-1280-4.
37. Abdel-Motal UM, Guay HM, Wigglesworth K, et al. Immunogenicity of influenza virus vaccine is increased by anti-gal-mediated targeting to antigen-presenting cells. *J Virol*. 2007;81(17):9131–9141. doi: 10.1128/JVI.00647-07.
38. Bruno JG, Carrillo MP, Phillips T. In vitro antibacterial effects of antilipopolysaccharide DNA aptamer-C1qrs complexes. *Folia Microbiol (Praha)*. 2008;53(4):295–302. doi: 10.1007/s12223-008-0046-6.
39. Dixon TC, Fadl AA, Koehler TM, et al. Early Bacillus anthracis-macrophage interactions: intracellular survival survival and escape. *Cell Microbiol*. 2000;2(6):453–463. doi: 10.1046/j.1462-5822.2000.00067.x.
40. Ali SR, Timmer AM, Bilgrami S, et al. Anthrax toxin induces macrophage death by p38 MAPK inhibition but leads to inflammasome activation via ATP leakage. *Immunity*. 2011;35(1):34–44. doi: 10.1016/j.immuni.2011.04.015.
41. Ribet D, Cossart P. How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. *Microbes Infect*. 2015;17(3):173–183. doi: 10.1016/j.micinf.2015.01.004.
42. Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Hook M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of Staphylococcus aureus. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12(1):49–62. doi: 10.1038/nrmicro3161.
43. Pan Q, Zhang XL, Wu HY, et al. Aptamers that preferentially bind type IVB pili and inhibit human monocytic-cell invasion by *Salmonella enterica* serovar typhi. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(10):4052–4060. doi: 10.1128/aac.49.10.4052-4060.2005.
44. Balcazar JL, Subirats J, Borrego CM. The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance. *Front Microbiol*. 2015;6:1216. doi: 10.3389/fmicb.2015.01216.
45. Ning Y, Cheng L, Ling M, et al. Efficient suppression of biofilm formation by a nucleic acid aptamer. *Pathog Dis*. 2015;73(6):ftv034. doi: 10.1093/femspd/ftv034.
46. Chen F, Zhang X, Zhou J, et al. Aptamer inhibits Mycobacterium tuberculosis (H37Rv) invasion of macrophage. *Mol Biol Rep*. 2012;39(3):2157–2162. doi: 10.1007/s11033-011-0963-3.
47. Feng C, Dai S, Wang L. Optical aptasensors for quantitative detection of small biomolecules: a review. *Biosens Bioelectron*. 2014;59:64–74. doi: 10.1016/j.bios.2014.03.014.
48. Hurwitz M, Eliot RS. Arrhythmias in acute myocardial infarction. *Dis Chest*. 1964;45(6):616–626. doi: 10.1378/chest.45.6.616.
49. Bhardwaj AK, Vinothkumar K, Rajpara N. Bacterial quorum sensing inhibitors: attractive alternatives for control of infectious pathogens showing multiple drug resistance. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*. 2013;8(1):68–83. doi: 10.2174/1574891x11308010012.
50. Zhao ZG, Yu YM, Xu BY, et al. Screening and anti-virulent study of N-acyl homoserine lactones DNA aptamers against *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. *Biotechnol Bioprocess Eng*. 2013;18(2):406–412. doi: 10.1007/s12257-012-0556-6.
51. Cai S, Singh BR. Strategies to design inhibitors of Clostridium botulinum neurotoxins. *Infect Disord Drug Targets*. 2007;7(1):47–57. doi: 10.2174/187152607780090667.
52. Tok JB, Fischer NO. Single microbead SELEX for efficient ssDNA aptamer generation against botulinum neurotoxin. *Chem Commun (Camb)*. 2008;(16):1883–1885. doi: 10.1039/b717936g.
53. Chang TW, Blank M, Janardhanan P, et al. In vitro selection of RNA aptamers that inhibit the activity of type A botulinum neurotoxin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;396(4):854–860. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.05.006.
54. Jacobsen JA, Jourden JLM, Mille MT, Cohen SM. To bind zinc or not to bind zinc: an examination of innovative approaches to improved metalloproteinase inhibition. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1803(1):72–94. doi: 10.1016/j.bbamcr.2009.08.006.
55. Kolesnikov AV, Kozyr' AV, Shemyakin IG. The prospects for using aptamers in diagnosing bacterial infections. *Mol. Gen. Mikrobiol. Virol*. 2012;27(2):49–55. doi: 10.3103/s0891416812020048
56. Hong KL, Sooter LJ. Single-stranded DNA aptamers against pathogens and toxins: identification and biosensing applications. *Biomed Res Int*. 2015;2015:419318. doi: 10.1155/2015/419318.
57. Bruno JG, Richarte AM, Carrillo MP, Edge A. An aptamer beacon responsive to botulinum toxins. *Biosens Bioelectron*. 2012;31(1):240–243. doi: 10.1016/j.bios.2011.10.024.
58. Klussmann S, Nolte A, Bald R, et al. Mirror-image RNA that binds D-adenosine. *Nat Biotechnol*. 1996;14(9):1112–1115. doi: 10.1038/nbt0996-1112.
59. Purschke WG, Radtke F, Kleinjung F, Klussmann S. A DNA Spiegelmer to staphylococcal enterotoxin B. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(12):3027–3032. doi: 10.1093/nar/gkg413.
60. Vivekananda J, Salgado C, Millenbaugh NJ. DNA aptamers as a novel approach to neutralize Staphylococcus aureus alpha-toxin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;444(3):433–438. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.01.076.
61. Wang K, Gan L, Jiang L, et al. Neutralization of staphylococcal enterotoxin B by an aptamer antagonist. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(4):2072–2077. doi: 10.1128/AAC.04414-14.
62. Berens C, Groher F, Suess B. RNA aptamers as genetic control devices: the potential of riboswitches as synthetic elements for regulating gene expression. *Biotechnol J*. 2015;10(2):246–257. doi: 10.1002/biot.201300498.
63. Winkler W, Nahvi A, Breaker RR. Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature*. 2002;419(6910):952–956. doi: 10.1038/nature01145.
64. Cressina E, Chen L, Moulin M, et al. Identification of novel ligands for thiamine pyrophosphate (TPP) riboswitches. *Biochem Soc Trans*. 2011;39(2):652–657. doi: 10.1042/BST0390652.
65. Mandal M, Breaker RR. Gene regulation by riboswitches. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5(6):451–463. doi: 10.1038/nrm1403.
66. Wittmann A, Suess B. Engineered riboswitches: Expanding researchers' toolbox with synthetic RNA regulators. *FEBS Lett*. 2012;586(15):2076–2083. doi: 10.1016/j.febslet.2012.02.038.

67. Topp S, Gallivan JP. Emerging applications of riboswitches in chemical biology. *ACS Chem Biol*. 2010;5(1):139–148. doi: 10.1021/cb900278x.
68. Trausch JJ, Batey RT. Design of modular "plug-and-play" expression platforms derived from natural riboswitches for engineering novel genetically encodable RNA regulatory devices. *Methods Enzymol*. 2015;550:41–71. doi: 10.1016/bs.mie.2014.10.031.
69. Hughes D, Karlen A. Discovery and preclinical development of new antibiotics. *Ups J Med Sci*. 2014;119(2):162–169. doi: 10.3109/03009734.2014.896437.
70. Ling LL, Schneider T, Peoples AJ, et al. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*. 2015;517(7535):455–459. doi: 10.1038/nature14098.
71. Andries K, Verhasselt P, Guillemont J, et al. A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of Mycobacterium tuberculosis. *Science*. 2005;307(5707):223–227. doi: 10.1126/science.1106753.
72. Kavruk M, Celikbicak O, Ozalp VC, et al. Antibiotic loaded nanocapsules functionalized with aptamer gates for targeted destruction of pathogens. *Chem Commun (Camb)*. 2015;51(40):8492–8495. doi: 10.1039/c5cc01869b.
73. Song MY, Jurng J, Park YK, Kim BC. An aptamer cocktail-functionalized photocatalyst with enhanced antibacterial efficiency towards target bacteria. *J Hazard Mater*. 2016;318:247–254. doi: 10.1016/j.jhazmat.2016.07.016.
74. Ornellas PO, Antunes LD, Fontes KB, et al. Effect of the antimicrobial photodynamic therapy on microorganism reduction in deep caries lesions: a systematic review and meta-analysis. *J Biomed Opt*. 2016;21(9):90901. doi: 10.1117/1.jbo.21.9.090901.
75. Zoccolillo ML, Rogers SC, Mang TS. Antimicrobial photodynamic therapy of S. mutans biofilms attached to relevant dental materials. *Lasers Surg Med*. Forthcoming 2016. doi: 10.1002/lsm.22534.
76. Meitert J, Aram R, Wiesemann K, et al. Monitoring the expression level of coding and non-coding RNAs using a TetR inducing aptamer tag. *Bioorg Med Chem*. 2013;21(20):6233–6238. doi: 10.1016/j.bmc.2013.07.035.
77. Chaloin L, Lehmann MJ, Sczakiel G, Restle T. Endogenous expression of a high-affinity pseudoknot RNA aptamer suppresses replication of HIV-1. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(18):4001–4008. doi: 10.1093/nar/gkf522.
78. Yosef I, Manor M, Kiro R, Qimron U. Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(23):7267–7272. doi: 10.1073/pnas.1500107112.
79. Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(2):95–105. doi: 10.1038/nrmicro2937.
80. Lee CH, Han SR, Lee SW. Therapeutic applications of aptamer-based riboswitches. *Nucleic Acid Ther*. 2016;26(1):44–51. doi: 10.1089/nat.2015.0570.
81. Vazquez-Anderson J, Contreras LM. Regulatory RNAs: charming gene management styles for synthetic biology applications. *RNA Biol*. 2013;10(12):1778–1797. doi: 10.4161/rna.27102.
82. Wang S, Kong Q, Curtiss R. New technologies in developing recombinant attenuated Salmonella vaccine vectors. *Microb Pathog*. 2013;58:17–28. doi: 10.1016/j.micpath.2012.10.006.
83. Mechaly A, Levy H, Epstein E, et al. A novel mechanism for antibody-based anthrax toxin neutralization: inhibition of prepore-to-pore conversion. *J Biol Chem*. 2012;287(39):32665–32673. doi: 10.1074/jbc.M112.400473.
84. Tian L, Heyduk T. Bivalent ligands with long nanometer-scale flexible linkers. *Biochemistry*. 2009;48(2):264–275. doi: 10.1021/bi801630b.
85. Hasegawa H, Savory N, Abe K, Ikebukuro K. Methods for improving aptamer binding affinity. *Molecules*. 2016;21(4):421. doi: 10.3390/molecules21040421.
86. Diafa S, Hollenstein M. Generation of aptamers with an expanded chemical repertoire. *Molecules*. 2015;20(9):16643–16671. doi: 10.3390/molecules200916643.
87. Gupta S, Hirota M, Waugh SM, et al. Chemically modified DNA aptamers bind interleukin-6 with high affinity and inhibit signaling by blocking its interaction with interleukin-6 receptor. *J Biol Chem*. 2014;289(12):8706–8719. doi: 10.1074/jbc.M113.532580.
88. Lollo B, Steele F, Gold L. Beyond antibodies: new affinity reagents to unlock the proteome. *Proteomics*. 2014;14(6):638–644. doi: 10.1002/pmic.201300187.



## КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

***Зенинская Наталья Алексеевна***, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «ГНЦ ПМБ» 312084
**Адрес**: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, пос. Оболенск, **тел.**: +7 (496) 731-20-84,
**e-mail**: nataliazeninskaya@mail.ru. **ORCID**: http://orcid.org/0000-0002-5388-292X. **SPIN-код:** 8215-3219

***Колесников Александр Владимирович***, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «ГНЦ ПМБ», заведующий лабораторией иммунопротеомики микроорганизмов ОАО «Института инженерной иммунологии»
**Адрес**: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, пос. Оболенск, **тел.**: +7 (496) 731-20-84,
**e-mail**: pfu2000@mail.ru. **ORCID**: http://orcid.org/0000-0001-8108-0265. **SPIN-код:** 5324-5998

***Рябко Алёна Константиновна***, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «ГНЦ ПМБ»
**Адрес**: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, пос. Оболенск, **тел.**: +7 (496) 731-20-84,
**e-mail**: ryabko_alena@mail.ru. **ORCID**: http://orcid.org/0000-0001-7478-909X. **SPIN-код:** 3992-7400

***Шемякин Игорь Георгиевич***, доктор биологических наук, профессор, заместитель директора ФБУН «ГНЦ ПМБ» по научной работе, заведующий лабораторией молекулярной биологии
**Адрес**: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, пос. Оболенск, **тел.**: +7 (496) 736-00-60,
**e-mail**: shemyakin@obolensk.org. **ORCID**: http://orcid.org/0000-0001-9667-1674. **SPIN-код:** 3180-1459

***Дятлов Иван Алексеевич***, член-корреспондент РАМН, доктор медицинских наук, профессор, директор ФБУН «ГНЦ ПМБ»
**Адрес**: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, пос. Оболенск, **тел.**: +7 (496) 736-00-03,
**e-mail**: dyatlov@obolensk.org. **ORCID**: http://orcid.org/0000-0003-1078-4585. **SPIN-код:** 6567-8380

***Козырь Арина Владимировна***, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «ГНЦ ПМБ»
**Адрес**: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, пос. Оболенск, **тел.**: +7 (496) 731-20-84,
**e-mail**: avkozyr@gmail.com. **ORCID**: http://orcid.org/0000-0001-6295-5943. **SPIN-код:** 7791-8537

DOI: 10.15690/vramn729

**В.А. Бывальцев[1, 2, 3, 4], И.А. Степанов[1], Л.А. Бардонова[1], Е.Г. Белых[1, 3]**

[1] Иркутский государственный медицинский университет, Иркутск, Российская Федерация
[2] Дорожная клиническая больница на ст. Иркутск-Пассажирский, Иркутск, Российская Федерация
[3] Иркутский научный центр хирургии и травматологии, Иркутск, Российская Федерация
[4] Иркутская государственная академия последипломного образования, Иркутск, Российская Федерация

# Использование стволовых клеток в терапии дегенерации межпозвонкового диска

*Статья представляет собой обзор современных литературных данных, посвященных применению стволовых клеток в терапии дегенеративных процессов межпозвонковых дисков. Чаще всего причиной развития болевого синдрома в спине является дегенеративное поражение межпозвонковых дисков. Дегенерация дисков в настоящее время представляет собой одну из основных причин утраты трудоспособности населения. Нередко многие методы лечения не позволяют получить ожидаемых результатов, так как в большинстве своем они имеют симптоматическую направленность и не влияют на патогенез процесса. Авторами изложены современные данные о молекулярно-клеточных механизмах дегенерации межпозвонковых дисков. Представлен анализ экспериментальных исследований, проводимых в мире, демонстрирующих возможности клеточной терапии дегенеративных процессов дисков на примере использования мезенхимальных, жировых, синовиальных и костномозговых стволовых клеток. Обозначены актуальные, остающиеся нерешенными вопросы, что обусловливает необходимость проведения дальнейших экспериментальных и клинических исследований при лечении данной патологии.*

***Ключевые слова**: стволовые клетки, дегенерация межпозвонкового диска, тканевая инженерия, клеточная терапия.*

*(**Для цитирования**:* Бывальцев В.А., Степанов И.А., Бардонова Л.А., Белых Е.Г. Использование стволовых клеток в терапии дегенерации межпозвонкового диска. *Вестник РАМН.* 2016;71(5):359–366. doi: 10.15690/vramn729)



## Актуальность

Боль в спине является наиболее распространенным симптомом при поражении позвоночного столба [1]. Так, согласно последним исследованиям, хроническая боль в спине встречается у 2–40% взрослого населения развитых стран. Хотя бы раз в жизни болевой синдром в области позвоночника испытывали 54–80% людей, а синдром люмбалгии (боль в пояснице) — более половины населения земного шара [2–5]. Чаще всего причиной развития боли в спине является дегенеративное поражение межпозвонковых дисков [6, 7]. Дегенеративно-дистрофические процессы в межпозвонковых дисках в настоящее время представляют собой одну из основных причин утраты трудоспособности населения развитых стран мира [8–10].

Межпозвонковый диск (МПД) — это сложная структура, которая включает в себя три вида специализированных тканей: фиброзное кольцо, пульпозное ядро и замыкательную пластинку, покрывающую прилежащие тела позвонков. Межпозвонковый диск выполняет важнейшие биомеханические функции: обеспечивает амортизацию, участвует в сгибании-разгибании, боковых изгибах и вращении позвоночника. Пульпозное ядро, окруженное волокнами фиброзного кольца, обеспечивает сопротивление компрессионному напряжению, в то время как кольцо, главным образом, устойчиво к продольной и вращающей нагрузкам [11].

Дегенерация МПД — это хронический процесс, характеризующийся прогрессирующим снижением уровня содержания протеогликанов и воды в пульпозном ядре с последующей утратой способности межпозвонкового

**V.A. Byvaltsev[1, 2, 3, 4], I.A. Stepanov[1], L.A. Bardonova[1], E.G. Belykh[1, 3]**

[1] Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russian Federation
[2] Railway Clinical Hospital on the station Irkutsk-Passazhirskiy of Russian Railways Ltd., Irkutsk, Russian Federation
[3] Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology, Irkutsk, Russian Federation
[4] Irkutsk State Academy of Postgraduate Education, Irkutsk, Russian Federation

# The Use of Stem Cells in the Treatment of Intervertebral Disc Degeneration

*The paper presents a review of current data on the use of stem cells in the treatment of intervertebral disc degeneration. Acute spinal pain is often a consequence of the pathology affecting the intervertebral disc. Many applied therapeutic techniques do not provide effective results as expected because most of them address symptoms, but do not treat the underlying disease. We have outlined current findings on the molecular mechanisms of intervertebral disc degeneration, analyzed international experimental studies demonstrating the feasibility of a stem cell therapy for intervertebral disc degeneration. The conducted studies reported on the clinical application of mesenchymal stem cells or stem cells derived from adipose, synovium, and bone marrow tissue. The most pressing and undetermined issues that require further experimental and clinical studies are indicated and defined in the article.*

***Key words**: stem cells, intervertebral disc degeneration, tissue engineering, cell therapy.*

*(**For citation**:* Byvaltsev VA, Stepanov IA, Bardonova LA, Belykh EG. The Use of Stem Cells in the Treatment of Intervertebral Disc Degeneration. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2016;71(5):359–366. doi: 10.15690/vramn729)

диска противостоять компрессионной нагрузке [12]. Нередко первым симптомом дегенерации МПД является болевой синдром в спине. Дегенерация межпозвонкового диска может приводить к развитию таких серьезных заболеваний, как грыжа диска, спондилолистез, нестабильность позвоночных сегментов, стеноз позвоночного канала, которые проявляются в виде радикуло- и/или миелопатии. На сегодняшний день в лечении дегенерации МПД используется широкий спектр как консервативных, так и хирургических методов лечения [13]. К сожалению, многие методы лечения данного заболевания не позволяют получить ожидаемых результатов. Во многом это объясняется тем, что технология лечения имеет симптоматическую направленность и не влияет на патогенез дегенеративного процесса. Разработка новых эффективных методов терапии ранних стадий дегенеративного поражения диска — основная цель многих исследований в области вертебрологии и спинальной нейрохирургии. Современные достижения тканевой инженерии позволяют замедлить процесс дегенерации МПД и активировать регенераторные механизмы путем введения в него полипотентных стволовых клеток.

**Цель настоящего обзора** — анализ современных литературных данных о возможностях клеточной терапии дегенеративных процессов межпозвонкового диска при помощи различных типов стволовых клеток взрослого человеческого организма.



## Патофизиология дегенеративных процессов межпозвонковых дисков

Несмотря на возрастающий интерес к методам биологической терапии дегенеративных процессов межпозвонкового диска, по-прежнему остаются малоизученными их механизмы действия. Дегенерация диска связана с возрастными изменениями человеческого организма, берущими свое начало уже со второго десятилетия жизни [14], генетической предрасположенностью, влиянием факторов окружающей среды [15] и нарушением его питания [16].

Одним из основных микроструктурных изменений пульпозного ядра при дегенерации диска — прогрессирующее снижение уровня протеогликанов, в первую очередь аггрекана [17]. Морфологические изменения межпозвонкового диска обусловлены метаболическим дисбалансом между анаболическими и катаболическими процессами. Процессы синтеза веществ в диске регулируются многочисленными биологически активными веществами, такими как инсулиноподобный фактор роста-1 (insulin-like growth factor, IGF1) [18], трансформирующий фактор роста β (transforming growth factor beta, TGFβ), костные морфогенетические белки (bone morphogenetic proteins, BMPs) [19]. Распад веществ в диске осуществляется благодаря катаболическим ферментам — матриксным металлопротеиназам (matrix metalloproteinases, MMPs) и адамализинам с тромбоспондиновым модулем (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs, ADAMTS) [20].

Изменения структуры межклеточного матрикса связаны с активностью клеток межпозвонкового диска. Так, снижение пула клеток диска приводит к прогрессированию дегенеративных процессов в межклеточном матриксе [21]. Уменьшение содержания протеогликанов пульпозного ядра приводит к дегидратации гелеобразного ядерного матрикса. В таком состоянии ядро неспособно нести на себе статическую нагрузку [22]. В свою очередь, неспособность пульпозного ядра адекватно поглощать компрессионную нагрузку и передавать ее на фиброзное кольцо приводит к износу пластинчатой архитектоники кольца и формированию микротрещин [23]. Помимо микроструктурных изменений фиброзного кольца, как правило, при дегенерации МПД наблюдаются субхондральный склероз, оссификация замыкательной пластинки и формирование остеофитов тел позвонков [24, 25].

## Роль биологической терапии при дегенерации межпозвонкового диска

Основным терапевтическим подходом в лечении или предотвращении дегенерации межпозвонкового диска является восстановление способности диска синтезировать полноценный внеклеточный матрикс, богатый протеогликанами. Это позволит пульпозному ядру сохранить в себе достаточное количество воды для выполнения полноценной биомеханической функции. Как уже было отмечено ранее, некоторые гены и клеточные факторы роста влияют на анаболические и катаболические процессы, которые регулируют постоянство внутренней среды внеклеточного матрикса диска. В таком случае для лечения дегенерации межпозвонкового диска могут быть использованы рекомбинантные факторы роста и/или технологии генной терапии [26, 27]. Так, внутридисковое введение факторов роста (BMP7, BMP2 и IGF1) показало значимое увеличение уровня содержания протеогликанов в пределах ткани диска [28–30].

Возможность синтеза рекомбинантных факторов роста с последующим их введением под кожу представляет собой перспективное направление биологической терапии. Однако короткий период полураспада экзогенных факторов клеточного роста ограничивает их применение в лечении дегенерации диска, а все больше исследований концентрируется на методах генной терапии.

Известно, что генная терапия локально изменяет характер экспрессии определенных генов, результатом чего является биосинтез специфических белковых молекул. Согласно данным мировой литературы, многочисленные анаболические агенты (TGFβ, BMP2, BMP7 и IGF1), антикатаболические агенты (TIMP1) и регуляторы генов (SOX9 и LMP1) обладают способностью изменять метаболическую активность клеток межпозвонкового диска в сторону увеличения синтеза протеогликанов [31–34]. С другой стороны, указанные агенты способны активировать воспалительную реакцию в ткани диска и нервных корешках [35]. В настоящее время для клинического применения разрабатываются надежные и безопасные методы трансфекции и трансдукции генов [36].

Учитывая то, что дегенерация межпозвонкового диска связана с прогрессирующим снижением количества клеток, группой американских ученых была предложена клеточная терапия, направленная на восстановление клеточной популяции диска. Клеточная терапия предполагает использование различных дифференцированных клеток межпозвонкового диска, например клеток пульпозного ядра [37, 38], фиброзного кольца [39], хондроцитов замыкательной пластинки [40], а также их клеток-предшественников [41]. Трансплантация аутологичных хондроцитов представляет собой современный метод лечения дегенерации межпозвонкового диска, в основе которого — введение в поврежденный диск клеток пульпозного ядра. В исследовании Sakai и соавт. [42] отмечено, что при

использовании аутологичных хондроцитов имеют место увеличение высоты диска и регресс болевого синдрома. На сегодняшний день клеточная терапия — это перспективный метод лечения дегенерации диска, а количество исследований в данной области увеличивается с каждым годом.

### Стволовые клетки как источник регенерации межпозвонкового диска

Стволовые клетки (СК) — это недифференцированные клетки с высокой степенью пролиферативной активности. Стволовые клетки способны к дифференцировке не только в тканеспецифичном направлении, но и в клетки других тканей [43–47]. В настоящий момент известно несколько типов человеческих СК — как эмбриональных, так и взрослого организма. Несмотря на то, что эмбриональные СК считаются полипотентными, юридические и этические ограничения не позволяют их использовать в клинической практике [48]. В свою очередь СК взрослого человека представляют собой пул клеток-предшественников, расположенных в различных органах и тканях организма. Стволовые клетки взрослого человека, бесспорно, составляют потенциал клеточной терапии дегенерации межпозвонкового диска. К настоящему моменту выделены следующие типы СК взрослого организма: костномозговые [49], жировой ткани [50], периоста [51, 52], синовиальной ткани [53], скелетных мышц [54], кожи [55], сосудов [56, 57], кроветворной [58] и костной тканей [59, 60]. Функция СК заключается в поддержании анатомических и функциональных особенностей органов и тканей организма. Применение СК взрослого человеческого организма в регенераторной медицине не вызывает каких-либо этических проблем, так как они могут быть выделены непосредственно из тканей пациента.

В клеточной терапии дегенерации межпозвонкового диска описано применение нескольких видов стволовых клеток взрослого организма: мезенхимальные, полученные из костного мозга; выделенные из жировой ткани; выделенные из мышечной ткани; гемопоэтические; стволовые клетки обонятельных мембран; синовиальные (рис. 1). Недавние исследования в области гистогенеза доказали, что источником мезенхимальных, жировых и мышечных СК служит периваскулярная ткань [61–66]. В настоящее время описано несколько методов клеточной терапии дегенерации межпозвонкового диска, основанных на применении различных типов введения СК внутрь дегенерированного диска (рис. 2). Яркий пример такой терапии — введение в диск взвеси СК в гидрогеле [67].

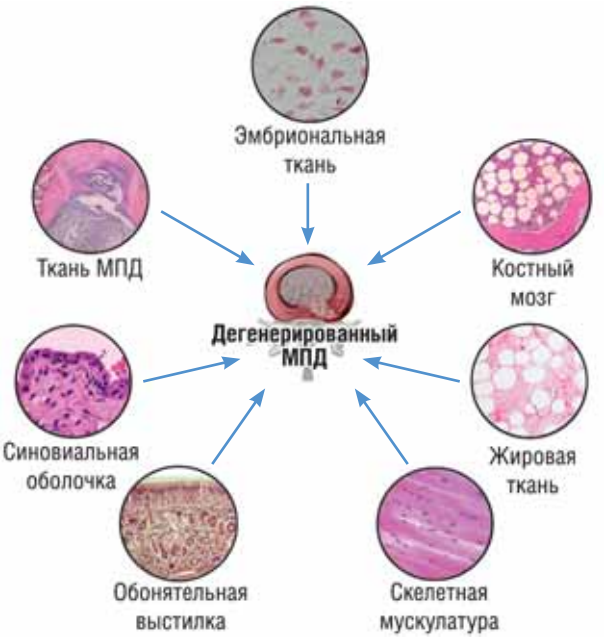



**Рис. 1.** Различные виды стволовых клеток, применяемых в клеточной терапии дегенеративного поражения межпозвонковых дисков [6]

*Примечание.* МПД — межпозвонковый диск.



Стоит отметить, что и в самом межпозвонковом диске обнаружены специфические популяции клеток-предшественников [68]. Так, в работе Blanco с соавт. [69] показано, что клетки-предшественники очень схожи по маркерам кластера дифференцировки (cluster of differentiation, CD) с мезенхимальными СК, которые были получены из костного мозга. А потому еще одним альтернативным методом клеточной терапии может стать использование клеток-предшественников, взятых из самого диска.

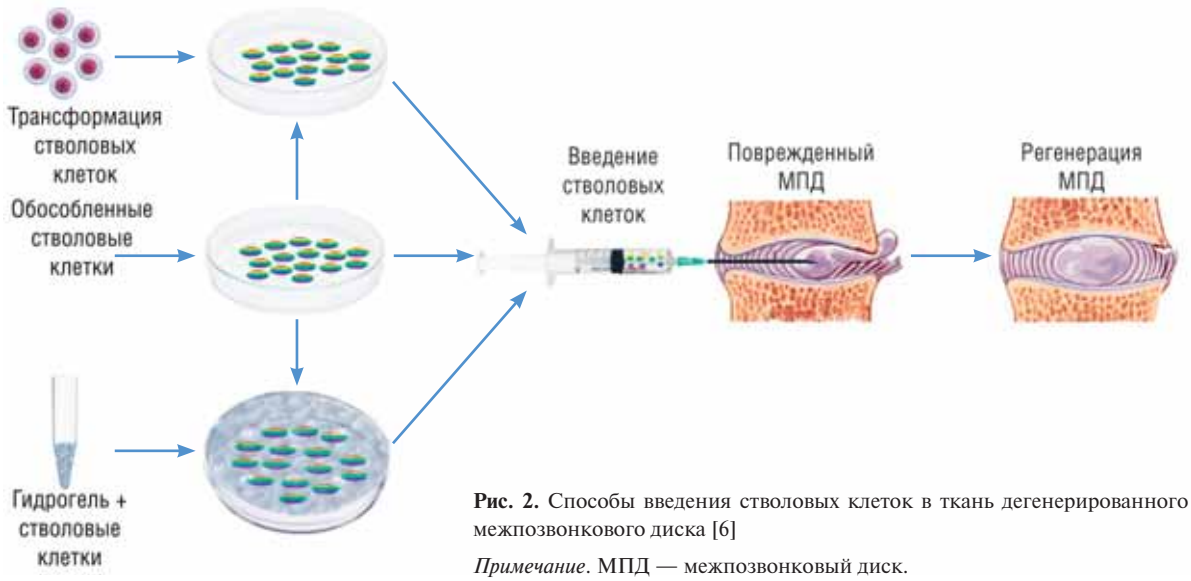



**Рис. 2.** Способы введения стволовых клеток в ткань дегенерированного межпозвонкового диска [6]

*Примечание.* МПД — межпозвонковый диск.

### Значение мезенхимальных стволовых клеток в клеточной терапии дегенерации межпозвонкового диска

Мезенхимальные СК способны к самообновлению и мультилинейной дифференцировке. Открытие и подробное описание мезенхимальных СК связано с именем отечественного гистолога А.Я. Фриденштейна. Ученый первым показал, что мезенхимальные СК, расположенные в строме костного мозга, способны к дифференцировке в клетки костной ткани. Это открытие дало мощный толчок к развитию клеточной терапии не только в нашей стране, но и за рубежом [70]. Дифференцировочный потенциал мезенхимальных СК и их паракринные свойства позволяют рассматривать материал в качестве перспективного субстрата для клеточной терапии различных заболеваний, в том числе и дегенеративного поражения межпозвонкового диска [71].

Терапевтические эффекты мезенхимальных СК широко изучены *in vitro*. Предполагается, что терапевтический потенциал мезенхимальных СК во многом зависит от их взаимодействия с клетками пульпозного ядра: введенные мезенхимальные СК в присутствии клеток ядра начинают активно синтезировать протеогликаны. Так, Sobajima с соавт. [62] культивировали в трехмерных сфероидах мезенхимальные СК совместно с клетками пульпозного ядра в различных процентных соотношениях (75:25, 50:50, 25:75 соответственно) в течение 2 нед. По результатам данного исследования, соотношение 75 на 25% дало статистически значимое увеличение содержания протеогликанов. С другой стороны, Le Visage и соавт. [71], проведя аналогичное исследование совместного культивирования мезенхимальных СК костного мозга с клетками пульпозного ядра в процентном соотношении 50 на 50, не получили статистически достоверных результатов увеличения содержания протеогликанов в ядре.



Как известно, СК подвергаются дифференцировке под действием генетических (путем активации генов *KLF4*, *COL1A1*, *COL2A1*, *Acan* и др.), гормональных факторов (инсулин, соматотропный гормон, кальцитонин, паратгормон) и цитокинов (простагландины $A_1$, $E_2$). Однако СК способствуют восстановлению и регенерации тканей не только путем дифференцировки в клетки данной ткани, но также и путем создания собственного микроокружения, которое представляет собой множество молекул, обеспечивающих взаимодействие клеток, их цитоархитектонику в ткани и формообразование. В свою очередь, микроокружение способствует локальной регенерации эндогенных клеток [72]. Richardson с соавт. [73] совместно культивировали в монослое человеческие мезенхимальные СК и здоровые клетки пульпозного ядра: в одном случае клетки контактировали друг с другом, а в другом подобного взаимодействия не происходило. Спустя одну неделю культивирования были получены следующие результаты: мезенхимальные СК претерпели фенотипические изменения, схожие с клетками ядра в обеих группах. Полученные результаты указывают на то, что имеет место как прямое взаимодействие между клеточными популяциями, так и паракринная регуляция. С другой стороны, количество клеток в дегенерированном пульпозном ядре снижено, что уменьшает вероятность прямого контакта веденных мезенхимальных СК с клетками ядра и повышает вероятность паракринного взаимодействия [74, 75].

Мезенхимальные СК секретируют множество цитокинов и факторов роста, которые способны стимулировать митоз и внутритканевой репаративный потенциал клеток-хозяев [76]. Strassburg и соавт. [77] исследовали различия во взаимодействии между человеческими мезенхимальными СК и клетками пульпозного ядра от нормального и дегенерированного межпозвонкового диска во время сокультивирования *in vitro* с прямым межклеточным контактом. Они пришли к заключению, что клетки пульпозного ядра как здорового, так и дегенерированного диска способны стимулировать дифференцировку мезенхимальных СК до фенотипически похожих клеток ядра, в то время как сами мезенхимальные СК были способны стимулировать экспрессию генов внеклеточного матрикса только в клетках дегенерирующего пульпозного ядра.

В 2011 г. Orozco и соавт. [78] провели пилотное исследование по имплантации мезенхимальных СК в дегенерированные межпозвонковые диски пациентов. Аутологичные костномозговые мезенхимальные СК вводили в пульпозное ядро 10 пациентам с верифицированным диагнозом дегенеративного поражения поясничных дисков. В течение следующего года у пациентов оценивали выраженность боли в спине, длительность нетрудоспособности, качество жизни, а также высоту диска и степень его гидратации. По окончании данного исследования было отмечено, что уже через 3 месяца от момента введения мезенхимальных СК пациенты отмечали значимое уменьшение выраженности болевого синдрома и сокращение сроков нетрудоспособности. Более того, по данным магнитно-резонансных томографических (МРТ) исследований отмечалось увеличение степени гидратации дисков и увеличение их высоты.

В похожем исследовании Yoshikawa и соавт. [79] проводили забор аутологичных мезенхимальных СК из подвздошной кости у двух пациентов с диагностированным стенозом позвоночного канала. Полученные клетки культивировали в аутогенной сыворотке и затем пересаживали на коллагеновой губке перкутанно в стенозированный позвоночный канал. Через 2 года после выполнения оперативного вмешательства пациенты сообщили об улучшении состояния, а по данным Т2-взвешенных изображений МРТ отмечалось увеличение степени гидратации межпозвонковых дисков.

### Применение жировых стволовых клеток

Известно, что жировая ткань представляет собой новый источник мультипотентных СК. Одно из главных преимуществ использования жировой ткани заключается в том, что она может быть получена у взрослого человека в достаточном количестве для проведения исследований в области клеточной терапии, в том числе и клеточной терапии дегенерации межпозвонкового диска. Терапевтическая эффективность жировых СК была исследована при сокультивировании с другими типами СК взрослого организма [80].

В исследовании Lu с соавт. [80] оценивались изменения экспрессии генов в СК, полученных из подкожной жировой клетчатки кролика при их сокультивировании с клетками фиброзного кольца и пульпозного ядра *in vitro*. Авторы доказали, что у жировых СК отмечается увеличение экспрессии генов коллагена II типа и аггрекана при их сокультивировании с клетками пульпозного ядра, но не с клетками фиброзного кольца. Позже эти данные были подтверждены Xeng с соавт. [81], которые доказали, что при сокультивировании клеток ядра и жировых СК у последних отмечается повышение экспрессии генов аггрекана, коллагена II типа и снижение экспрессии гена остепонтина и коллагена I типа.

Эффективность применения жировых СК была исследована и на моделях дегенерации межпозвонкового диска у животных. Так, Jeong с соавт. [82] вводили жировые СК в дегенерирующий диск крыс. Модель дегенеративного процесса диска создавали путем его механического повреждения иглой для инъекций. Спустя 2 нед внутрь диска вводили СК. Анализ эффективности применения жировых СК оценивали через 6 нед путем измерения высоты диска, оценки интенсивности сигнала по данным МРТ и гистологического исследования при окраске гематоксилином-эозином. В итоге авторами получены следующие результаты: при введении в межпозвонковый диск жировых СК отмечаются достоверное увеличение его высоты и интенсивности сигнала на МРТ, а также увеличение количества клеток при гистологическом анализе. В дополнение ко всему при иммуногистохимическом исследовании межпозвонковых дисков определялось наличие коллагена II типа и аггрекана.

В других работах [83, 84] исследована эффективность применения жировых СК на моделях дегенерирующих межпозвонковых дисков собак. Модель дегенерирующего диска создавали путем частичного удаления пульпозного ядра. Спустя 6 нед после удаления части ядра диски были извлечены из трупов собак и разделены на три группы. Первая группа дисков была погружена в пробирку с жировыми СК и гиалуроновой кислотой, вторая группа — с гиалуроновой кислотой без клеток и третья группа дисков — в пробирку с физиологическим раствором. При сравнении различий в состоянии трех групп дисков были использованы данные МРТ, рентгенографии, гистологического и иммуногистохимического анализов. Статистически значимых различий по данным МРТ и спондилограмм выявлено не было. Однако при гистологическом и иммуногистохимическом анализах отмечалось достоверное увеличение количества клеток в пульпозном ядре, а также содержания коллагена II типа и аггрекана в группе с применением жировых СК совместно с гиалуроновой кислотой. При этом внеклеточный матрикс пульпозного ядра и фиброзного кольца морфологически полностью соответствовал картине нормального межпозвонкового диска.

Учитывая данные факты, можно с уверенностью рассматривать жировые СК в качестве источника для регенерации межпозвонковых дисков. Но их использование в клеточной терапии дегенерации дисков у людей станет возможным лишь тогда, когда будет выполнен необходимый спектр клинических испытаний.

## Использование синовиальных стволовых клеток

В последние несколько лет значительно возрос интерес к использованию синовиальных СК в регенерации межпозвонковых дисков. Это обусловлено двумя причинами. Во-первых, синовиальные СК обладают высокой пролиферативной активностью, превосходящей СК костного мозга в несколько раз [85]. Во-вторых, синовиальные СК синтезируют полноценный внеклеточный матрикс хрящевой ткани, что было доказано при их трансплантации в сустав кроликов и последующим иммуногистохимическим анализом [86].

Выполнен ряд исследований по применению синовиальных СК в качестве клеточной терапии дегенерации дисков. Одним из таких исследований является работа Miyamoto с соавт. [87], которые оценивали эффективность внутридискового введения синовиальных СК на моделях дегенерирующих межпозвонковых дисков кроликов. После трансплантации аллогенных синовиальных СК авторами проведен анализ дисков с помощью МРТ, рентгенографии, а также гистологии и иммуногистохимии. Более того, был проведен опыт *in vitro* для оценки взаимодействия синовиальных СК и клеток пульпозного ядра путем их сокультивирования. Результаты проведенного исследования показали, что синовиальные СК, введенные в диск, способны стимулировать оставшиеся клетки ядра, синтезировать коллаген II типа и тормозить выработку провоспалительных цитокинов и ферментов, деградирующих межклеточный матрикс. Эффективность применения синовиальных СК была подтверждена также достоверным увеличением высоты дисков в группе с их применением по сравнению с контрольной группой.

Несомненно, синовиальные СК обладают высокой пролиферативной активностью и регенераторным потенциалом, который подтверждается работами на моделях дегенерации суставов и межпозвонковых дисков.

## Роль стволовых клеток костного мозга в регенерации межпозвонковых дисков

Костный мозг взрослого человека содержит два вида СК — негемопоэтические (не экспрессируют маркер CD34) и гемопоэтические (экспрессирующие CD34). В исследовании Wei с соавт. [88] применялась ксеногенная трансплантация человеческих костномозговых СК (как гемопоэтических, так и не гемопоэтических) в модель дегенерирующего межпозвонкового диска крыс. После выделения и флуоресцентной маркировки человеческие СК (CD34+ и CD34-) были введены в копчиковые диски крысы. Авторами проведены гистологический, иммуногистохимический анализы, а также оценка жизнеспособности СК в разные периоды времени (на 1, 10, 21 и 42-й дни опыта). Исследование показало, что клетки CD34- обнаруживались в пульпозном ядре вплоть до 42-го дня опыта, в то время как CD34+ — лишь до 21-го дня и позднее погибали. Более того, CD34- способны экспрессировать белковые компоненты матрикса ядра, в частности коллаген II типа. Таким образом, данное исследование наглядно показало, что гемопоэтические СК не пригодны для клеточной терапии дегенерации межпозвонковых дисков, так как они не способны ни к дифференцировке в хондроцитоподобные клетки, ни синтезировать необходимые компоненты внеклеточного матрикса диска.

Неэффективность использования гемопоэтических СК в качестве клеточной терапии при дегенерации дисков также была доказана в работе Haufe и Mork [89]. В данном исследовании аутологичные гемопоэтические СК, полученные из костного мозга гребня подвздошной кости, были введены в дегенерирующие диски пациентов, страдающих болевым синдромом в спине. Спустя 2 недели от момента проведения клеточной терапии клиническая эффективность была оценена с помощью анкеты качества жизни Освестри (Oswestry Disability Index) и выраженности болевого синдрома по визуальной аналоговой шкале. Авторы исследования пришли к следующему заключению: трансплантация гемопоэтических СК не приводит к клиническому улучшению состояния пациентов.

## Заключение

Благодаря достижениям последних лет в области биологии и биологической химии межпозвонковых дис-

ков понимание дегенеративных процессов вышло на качественно новый уровень развития. Несмотря на то, что патогенез дегенерации диска по-прежнему остается малоизученным, ученым все же стали известны основные факторы, инициирующие процесс дегенерации межпозвоночного диска. Подтверждение факта уменьшения количества клеток диска как ключевого механизма его дегенеративного процесса позволило приступить к разработке перспективных методов терапии, направленных на поддержание его клеточной популяции. Учитывая уникальную способность СК взрослого организма дифференцироваться в различные типы клеток и секретировать целый ряд трофических цитокинов, их применение в лечении дегенерации межпозвонковых дисков представляется многообещающим. Исследования последних лет подтвердили, что использование СК, а именно мезенхимальных СК в терапии дегенерации дисков, — это безопасный и весьма эффективный метод. В настоящее время проводятся исследования *in vitro* на животных моделях по применению других видов СК в терапии дегенеративных процессов дисков. Таким образом, терапия СК представляет собой современный и эффективный метод лечения дегенерации межпозвонковых дисков, и, возможно, уже в ближайшем будущем эти технологии могут быть транслированы в широкую клиническую практику.


## Источники финансирования

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (№ 15-15-30037).


## Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

## ЛИТЕРАТУРА




1. Belykh E, Giers M, Bardonova L, et al. The role of bone morphogenetic proteins 2, 7, and 14 in approaches for intervertebral disk restoration. *World Neurosurg*. 2015;84(4):871–873. doi: 10.1016/j.wneu.2015.08.011.
2. Katz JN. Lumbar disc disorders and low-back pain: socioeconomic factors and consequences. *J Bone Joint Surg Am*. 2006;88 Suppl 2:21–24. doi: 10.2106/JBJS.E.01273.
3. Freemont AJ. The cellular pathobiology of the degenerate intervertebral disc and discogenic back pain. *Rheumatology (Oxford)*. 2009;48(1):5–10. doi: 10.1093/rheumatology/ken396.
4. Andersson GB. Epidemiological features of chronic low-back pain. *Lancet*. 1999;354(9178):581–585. doi: 10.1016/S0140-6736(99)01312-4.
5. Бывальцев В.А., Степанов И.А., Калинин А.А., Шашков К.В. Диффузионно-взвешенная магнитно-резонансная томография в диагностике дегенерации межпозвонкового диска // *Медицинская техника*. — 2016. — №4. — С. 29–32. [Byvaltsev VA, Stepanov IA, Kalinin AA, Shashkov et al. Diffuzionno-vzveshennaya magnitno-rezonansnaya tomografiya v diagnostike degeneratsii mezhpozvonkovogo diska. *Med Tekh*. 2016;(4):29–32. (In Russ).]
6. Vadala G, Russo F, Ambrosio L, Loppini M, Denaro V. Stem cells sources for intervertebral disc regeneration. World J Stem Cells. 2016;8(5):185–201. doi: 10.4252/wjsc.v8.i5.185.
7. Pezowicz CA, Robertson PA, Broom ND. The structural basis of interlamellar cohesion in the intervertebral disc wall. *J Anat*. 2006;208(3):317–330. doi: 10.1111/j.1469-7580.2006.00536.x.
8. Urban JP, McMullin JF. Swelling pressure of the inervertebral disc: influence of proteoglycan and collagen contents. *Biorheology*. 1985;22(2):145–157.
9. Trout JJ, Buckwalter JA, Moore KC, Landas SK. Ultrastructure of the human intervertebral disc. I. Changes in notochordal cells with age. *Tissue Cell*. 1982;14(2):359–369. doi: 10.1016/0040-8166(82)90033-7.
10. Humzah MD, Soames RW. Human intervertebral disc: structure and function. *Anat Rec*. 1988;220(4):337–356. doi: 10.1002/ar.1092200402.
11. Best BA, Guilak F, Setton LA, et al. Compressive mechanical properties of the human anulus fibrosus and their relationship to biochemical composition. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1994;19(2):212–221. doi: 10.1097/00007632-199401001-00017.
12. Boni M, Denaro V. *Anatomo-clinical correlations in cervical spondylosis*. In: Kehr P, Weidner A, editors. *Cervical Spine I*. Vienna: Springer-Verlag Wien; 1987. p. 3–20. doi: 10.1007/978-3-7091-8882-8_1.
13. Di Martino A, Vaccaro AR, Lee JY, et al. Nucleus pulposus replacement: basic science and indications for clinical use. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2005;30(16 Suppl):S16–22. doi: 10.1097/01.brs.0000174530.88585.32.
14. Haefeli M, Kalberer F, Saegesser D, et al. The course of macroscopic degeneration in the human lumbar intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2006;31(14):1522–1531. doi: 10.1097/01.brs.0000222032.52336.8e.
15. Battie MC, Videman T. Lumbar disc degeneration: epidemiology and genetics. *J Bone Joint Surg Am*. 2006;88 Suppl 2:3–9. doi: 10.2106/JBJS.E.01313.
16. Horner HA, Urban JP. 2001 Volvo Award Winner in Basic Science Studies: Effect of nutrient supply on the viability of cells from the nucleus pulposus of the intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2001;26(23):2543–2549. doi: 10.1097/00007632-200112010-00006.
17. Buckwalter JA. Aging and degeneration of the human intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1995;20(11):1307–1314. doi: 10.1097/00007632-199506000-00022.
18. Gruber HE, Norton HJ, Hanley EN, Jr. Anti-apoptotic effects of IGF-1 and PDGF on human intervertebral disc cells in vitro. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2000;25(17):2153–2157. doi: 10.1097/00007632-200009010-00002.
19. Kim DJ, Moon SH, Kim H, et al. Bone morphogenetic protein-2 facilitates expression of chondrogenic, not osteogenic, phenotype of human intervertebral disc cells. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2003;28(24):2679–2684. doi: 10.1097/01.BRS.0000101445.46487.16.
20. Antoniou J, Steffen T, Nelson F, et al. The human lumbar intervertebral disc: evidence for changes in the biosynthesis and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, ageing, and degeneration. *J Clin Invest*. 1996;98(4):996–1003. doi: 10.1172/JCI118884.
21. Gruber HE, Hanley EN, Jr. Analysis of aging and degeneration of the human intervertebral disc. Comparison of surgical specimens with normal controls. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1998;23(7):751–757. doi: 10.1097/00007632-199804010-00001.
22. Butler D, Trafimow JH, Andersson GB, et al. Discs degenerate before facets. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1990;15(2):111–113. doi: 10.1097/00007632-199002000-00012.
23. Acaroglu ER, Latridis JC, Setton LA, et al. Degeneration and aging affect the tensile behavior of human lumbar anulus fibrosus. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1995;20(24):2690–2701. doi: 10.1097/00007632-199512150-00010.
24. Vernon-Roberts B. *The biology of the intervertebral disc*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1988.
25. Urban JP, Smith S, Fairbank JC. Nutrition of the intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2004;29(23):2700–2709. doi: 10.1097/01.brs.0000146499.97948.52.
26. Masuda K, Oegema TR, Jr., An HS. Growth factors and treatment of intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2004;29(23):2757–2769. doi: 10.1097/01.brs.0000146048.14946.af.

27. Vadala G, Sowa GA, Kang JD. Gene therapy for disc degeneration. *Expert Opin Biol Ther.* 2007;7(2):185–196. doi: 10.1517/14712598.7.2.185.
28. Thompson JP, Oegema TR, Jr., Bradford DS. Stimulation of mature canine intervertebral disc by growth factors. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1991;16(3):253–260. doi: 10.1097/00007632-199103000-00001.
29. Li J, Yoon ST, Hutton WC. Effect of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) on matrix production, other BMPs, and BMP receptors in rat intervertebral disc cells. *J Spinal Disord Tech*. 2004;17(5):423–428. doi: 10.1097/01.bsd.0000112084.85112.5d.
30. An HS, Takegami K, Kamada H, et al. Intradiscal administration of osteogenic protein-1 increases intervertebral disc height and proteoglycan content in the nucleus pulposus in normal adolescent rabbits. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2005;30(1):25–31. doi: 10.1097/01.brs.0000148002.68656.4d.
31. Nishida K, Kang JD, Gilbertson LG, 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):2419–2425. doi: 10.1097/00007632-199912010-00002.
32. Paul R, Haydon RC, Cheng H, et al. Potential use of Sox9 gene therapy for intervertebral degenerative disc disease. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2003;28:755–763. doi: 10.1097/01.BRS.0000058946.64222.92.
33. Wallach CJ, 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 (Phila Pa 1976)*. 2003;28(20):2331–2337. doi: 10.1097/01.BRS.0000085303.67942.94.
34. Yoon ST, Park JS, Kim KS, 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):2603–2611. doi: 10.1097/01.brs.0000146103.94600.85.
35. Wallach CJ, Kim JS, Sobajima S, et al. Safety assessment of intradiscal gene transfer: a pilot study. *Spine J*. 2006;6(2):107–112. doi: 10.1016/j.spinee.2005.05.002.
36. Vadalà G, Sowa GA, Smith L, et al. Regulation of transgene expression using an inducible system for improved safety of intervertebral disc gene therapy. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2007;32(13):1381–1387. doi: 10.1097/BRS.0b013e3180601215.
37. 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):2609–2620. doi: 10.1097/01.BRS.0000097891.63063.78.
38. Nishimura K, Mochida J. Percutaneous reinsertion of the nucleus pulposus. An experimental study. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1998;23(14):1531–1538. doi: 10.1097/00007632-199807150-00006.
39. 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 (Phila Pa 1976)*. 2003;28(6):548–553. doi: 10.1097/01.BRS.0000049909.09102.60.
40. Gorensek M, Jaksimovic C, Kregar-Velikonja N, et al. Nucleus pulposus repair with cultured autologous elastic cartilage derived chondrocytes. *Cell Mol Biol Lett.* 2004;9(2):363–373.
41. Li X, Lee JP, Balian G, Anderson DG. Modulation of chondrocytic properties of fat-derived mesenchymal cells in co-cultures with nucleus pulposus. *Connect Tissue Res.* 2005;46(2):75–82. doi: 10.1080/03008200590954104.
42. Sakai D, Mochida J, Yamamoto Y, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells embedded in Atelocollagen gel to the intervertebral disc: a potential therapeutic model for disc degeneration. *Biomaterials.* 2003;24(20):3531–3541. doi: 10.1016/s0142-9612(03)00222-9.
43. Vadalà G, Sobajima S, Lee JY, et al. In vitro interaction between muscle-derived stem cells and nucleus pulposus cells. *Spine J*. 2008;8(5):804–809. doi: 10.1016/j.spinee.2007.07.394.
44. Meisel HJ, Ganey T, Hutton WC, et al. Clinical experience in cell-based therapeutics: intervention and outcome. *Eur Spine J*. 2006;15 Suppl 3:S397–405. doi: 10.1007/s00586-006-0169-x.
45. Meisel HJ, Siodla V, Ganey T, et al. Clinical experience in cell-based therapeutics: disc chondrocyte transplantation A treatment for degenerated or damaged intervertebral disc. *Biomol Eng.* 2007;24(1):5–21. doi: 10.1016/j.bioeng.2006.07.002.
46. Maldonado BA, Oegema TR, Jr. Initial characterization of the metabolism of intervertebral disc cells encapsulated in microspheres. *J Orthop Res.* 1992;10(5):677–690. doi: 10.1002/jor.1100100510.
47. Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell.* 2001;105(7):829–841. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00409-3.
48. Wobus AM. Potential of embryonic stem cells. *Mol Aspects Med.* 2001;22(3):149–164. doi: 10.1016/s0098-2997(01)00006-1.
49. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284(5411):143–147. doi: 10.1126/science.284.5411.143.
50. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7(2):211–228. doi: 10.1089/107632701300062859.
51. Nakahara H, Goldberg VM, Caplan AI. Culture-expanded human periosteal-derived cells exhibit osteochondral potential in vivo. *J Orthop Res.* 1991;9(4):465–476. doi: 10.1002/jor.1100090402.
52. De Bari C, Dell'Accio F, Luyten FP. Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age. *Arthritis Rheum.* 2001;44(1):85-95. doi: 10.1002/1529-0131(200101)44:1<85::AID-ANR12>3.0.CO;2-6.
53. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 2001;44(8):1928-1942. doi: 10.1002/1529-0131(200108)44:8<1928::AID-ART331>3.0.CO;2-P.
54. Lee JY, Qu-Petersen Z, Cao B, et al. Clonal isolation of muscle-derived cells capable of enhancing muscle regeneration and bone healing. *J Cell Biol.* 2000;150(5):1085–1100. doi: 10.1083/jcb.150.5.1085.
55. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol.* 2001;3(9):778–784. doi: 10.1038/ncb0901-778.
56. Brighton CT, Lorich DG, Kupcha R, et al. The pericyte as a possible osteoblast progenitor cell. *Clin Orthop Relat Res.* 1992;(275):287–299. doi: 10.1097/00003086-199202000-00043.
57. Reilly TM, Seldes R, Luchetti W, Brighton CT. Similarities in the phenotypic expression of pericytes and bone cells. *Clin Orthop Relat Res.* 1998:(346);95–103. doi: 10.1097/00003086-199801000-00014.
58. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res.* 2000;2(6):477–488. doi: 10.1186/ar130.
59. Noth U, Osyczka AM, Tuli R, et al. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J Orthop Res.* 2002;20(5):1060–1069. doi: 10.1016/S0736-0266(02)00018-9.
60. Osyczka AM, Noth U, Danielson KG, Tuan RS. Different osteochondral potential of clonal cell lines derived from adult human trabecular bone. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;961(1):73–77. doi: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb03054.x.
61. Risbud MV, Albert TJ, Guttapalli A, et al. Differentiation of mesenchymal stem cells towards a nucleus pulposus-like phenotype in vitro: implications for cell-based transplantation therapy. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2004;29(23):2627–2632. doi: 10.1097/01.brs.0000146462.92171.7f.
62. Sobajima S, Vadala G, Shimer A, et al. Feasibility of a stem cell therapy for intervertebral disc degeneration. *Spine J*. 2008;8(6):888–896. doi: 10.1016/j.spinee.2007.09.011.
63. Kuroda R, Usas A, Kubo S, et al. Cartilage repair using bone morphogenetic protein 4 and muscle-derived stem cells. *Arthritis Rheum*. 2006;54(2):433–442. doi: 10.1002/art.21632.
64. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell.* 2007;131(2):324–336. doi: 10.1016/j.cell.2007.08.025.
65. Crisan M, Yap S, Casteilla L, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell.* 2008;3(3):301–313. doi: 10.1016/j.stem.2008.07.003.
66. Caplan AI. All MSCs are pericytes? *Cell Stem Cell*. 2008;3(3):229–230. doi: 10.1016/j.stem.2008.08.008.

67. Hubert MG, Vadala G, Sowa G, et al. Gene therapy for the treatment of degenerative disk disease. *J Am Acad Orthop Surg*. 2008;16(6):312–319. doi: 10.5435/00124635-200806000-00003.
68. Risbud MV, Guttapalli A, Tsai TT, et al. Evidence for skeletal progenitor cells in the degenerate human intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2007;32(23):2537–2544. doi: 10.1097/BRS.0b013e318158dea6.
69. Blanco JF, Graciani IF, Sanchez-Guijo FM, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stromal cells from human degenerated nucleus pulposus: comparison with bone marrow mesenchymal stromal cells from the same subjects. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2010;35(26):2259–2265. doi: 10.1097/BRS.0b013e3181cb8828.
70. Steck E, Fischer J, Lorenz H, et al. Mesenchymal stem cell differentiation in an experimental cartilage defect: restriction of hypertrophy to bone-close neocartilage. *Stem Cells Dev*. 2009;18(7):969–978. doi: 10.1089/scd.2008.0213.
71. Le Visage C, Kim SW, Tateno K, et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with disc cells: changes in extracellular matrix biosynthesis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2006;31(18):2036–2042. doi: 10.1097/01.brs.0000231442.05245.87.
72. Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, et al. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(4):2199–2204. doi: 10.1073/pnas.042678299.
73. Richardson SM, Walker RV, Parker S, et al. Intervertebral disc cell-mediated mesenchymal stem cell differentiation. *Stem Cells*. 2006;24(3):707–716. doi: 10.1634/stemcells.2005-0205.
74. Maroudas A, Stockwell RA, Nachemson A, Urban J. Factors involved in the nutrition of the human lumbar intervertebral disc: cellularity and diffusion of glucose in vitro. *J Anat*. 1975;120(Pt 1):113–130.
75. Vadala G, Studer RK, Sowa G, et al. Coculture of bone marrow mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells modulate gene expression profile without cell fusion. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2008;33(8):870–876. doi: 10.1097/BRS.0b013e31816b4619.
76. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*. 2006;98(5):1076–1084. doi: 10.1002/jcb.20886.
77. Strassburg S, Richardson SM, Freemont AJ, Hoyland JA. Coculture induces mesenchymal stem cell differentiation and modulation of the degenerate human nucleus pulposus cell phenotype. *Regen Med*. 2010;5(5):701–711. doi: 10.2217/rme.10.59.
78. Orozco L, Soler R, Morera C, et al. Intervertebral disc repair by autologous mesenchymal bone marrow cells: a pilot study. *Transplantation*. 2011;92(7):822–828. doi: 10.1097/TP.0b013e3182298a15.
79. Yoshikawa T, Ueda Y, Miyazaki K, et al. Disc regeneration therapy using marrow mesenchymal cell transplantation: a report of two case studies. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2010;35(11):475–480. doi: 10.1097/BRS.0b013e3181cd2cf4.
80. Lu ZF, Doulabi BZ, Wuisman PI, et al. Influence of collagen type II and nucleus pulposus cells on aggregation and differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *J Cell Mol Med*. 2008;12(6B):2812–2822. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00278.x.
81. Xeng TX, Doulabi BZ, Wuisman PI, Bank RA, Helder MN. Influence of collagen type II and nucleus pulposus cells on aggregation and differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *J Cell Mol Med*. 2008;12:2812–2822. doi: 10.1111/ j.1582-4934.2008.00278.x.
82. Jeong JH, Lee JH, Jin ES, et al. Regeneration of intervertebral discs in a rat disc degeneration model by implanted adipose-tissue-derived stromal cells. *Acta Neurochir (Wien)*. 2010;152(10):1771–1777. doi: 10.1007/s00701-010-0698-2.
83. Ganey T, Hutton WC, Moseley T, et al. Intervertebral disc repair using adipose tissue-derived stem and regenerative cells: experiments in a canine model. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2009;34(21):2297–2304. doi: 10.1097/ BRS.0b013e3181a54157.
84. Sun Z, Luo B, Liu ZH, et al. Adipose-derived stromal cells protect intervertebral disc cells in compression: implications for stem cell regenerative disc therapy. *Int J Biol Sci*. 2015;11(2):133–143. doi: 10.7150/ijbs.10598.
85. Nimura A, Muneta T, Koga H, et al. Increased proliferation of human synovial mesenchymal stem cells with autologous human serum: comparisons with bone marrow mesenchymal stem cells and with fetal bovine serum. *Arthritis Rheum*. 2008;58(2):501–510. doi: 10.1002/art.23219.
86. Koga H, Muneta T, Nagase T, et al. Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for in vivo chondrogenesis: suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit. *Cell Tissue Res*. 2008;333(2):207–215. doi: 10.1007/s00441-008-0633-5.
87. Miyamoto T, Muneta T, Tabuchi T, et al. Intradiscal transplantation of synovial mesenchymal stem cells prevents intervertebral disc degeneration through suppression of matrix metalloproteinase-related genes in nucleus pulposus cells in rabbits. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(6):R206. doi: 10.1186/ar3182.
88. Wei A, Tao H, Chung SA, et al. The fate of transplanted xenogeneic bone marrow-derived stem cells in rat intervertebral discs. *J Orthop Res*. 2009;27(3):374–379. doi: 10.1002/jor.20567.
89. Haufe SM, Mork AR. Intradiscal injection of hematopoietic stem cells in an attempt to rejuvenate the intervertebral discs. *Stem Cells Dev*. 2006;15(1):136–137. doi: 10.1089/scd.2006.15.136.



## КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

***Бывальцев Вадим Анатольевич***, доктор медицинских наук, главный нейрохирург Департамента здравоохранения ОАО «РЖД», заведующий курсом нейрохирургии Иркутского государственного медицинского университета, заведующий научно-клиническим отделом нейрохирургии и ортопедии Иркутского научного центра хирургии и травматологии, профессор кафедры травматологии, ортопедии и нейрохирургии Иркутской государственной медицинской академии последипломного образования
**SPIN-код:** 5996-6477, **ORCID:** http://orcid.org/0000-0003-4349-7101
**Адрес**: 664082, Иркутск, ул. Боткина, д. 10, **тел.**: +7 (3952) 63-85-28, **e-mail**: byval75vadim@yandex.ru

***Степанов Иван Андреевич***, аспирант курса нейрохирургии Иркутского государственного медицинского университета
**SPIN-код:** 5485-5316, **ORCID:** http://orcid.org/0000-0001-9039-9147
**Адрес**: 664003, Иркутск, ул. Красного Восстания, д. 14, **тел.**: +7 (951) 632-66-35, **e-mail**: edmoilers@mail.ru

***Бардонова Людмила Андреевна***, аспирантка курса нейрохирургии Иркутского государственного медицинского университета
**ORCID:** http://orcid.org/0000-0001-8468-0471
**Адрес**: 664003, Иркутск, ул. Красного Восстания, д. 14, **тел.**: +7 (908) 656-36-10, **e-mail**: lyudmila15@ibox.ru

***Белых Евгений Георгиевич***, ассистент курса нейрохирургии Иркутского государственного медицинского университета, аспирант Иркутского научного центра хирургии и травматологии
**SPIN-код:** 4191-8687, **ORCID:** http://orcid.org/0000-0003-2060-5739
**Адрес**: 664082, Иркутск, ул. Боткина, д. 10, **тел.**: +7 (3952) 63-85-28, **e-mail**: e.belykh@yandex.ru

DOI: 10.15690/vramn695

**А.П. Пикина[1], А.Н. Шкопоров[1], Е.В. Кулагина[2], Е.В. Хохлова[1], А.В. Чаплин[1], Н.Н. Володин[3], Л.И. Кафарская[1], Н.Г. Короткий[1], Б.А. Ефимов[1]**

[1] Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Российская Федерация

[2] Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Москва, Российская Федерация

[3] Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачёва, Москва, Российская Федерация

# Сравнительное генетическое типирование изолятов *Staphylococcus aureus*, выделенных с поверхности кожи, из носовой полости и кишечника у детей, страдающих атопическим дерматитом

***Обоснование**. Кожные покровы больных, страдающих атопическим дерматитом, с большой частотой колонизированы бактериями, принадлежащими виду Staphylococcus aureus. Топическая антибактериальная и противовоспалительная терапия часто оказываются недостаточно эффективными, что проявляется реколонизацией кожных покровов золотистым стафилококком и обострением аллергического процесса. **Цель исследования**: определить частоту колонизации S. aureus кожных покровов, слизистых оболочек носовой полости и кишечника у детей, страдающих атопическим дерматитом, провести сравнительный анализ выделенных из различных биотопов штаммов S. aureus, используя методы генетического типирования, и на основании полученных результатов оценить вероятность миграции стафилококков между биотопами. **Методы**. Выделение S. aureus проведено у 38 детей с атопическим дерматитом. Осуществляли видовую идентификацию стафилококков при помощи биохимических (API Staph) и масс-спектрометрических (MALDI-TOF MS) методов. Генетическое типирование выделенных штаммов S. aureus проводилось методами анализа длин участков между генами 16S рРНК и 23S рРНК в многокопийных рРНК-оперонах и высокоразрешающего анализа плавления региона X гена spa. **Результаты**. При помощи MALDI-TOF масс-спектрометрии были успешно идентифицированы 99% выделенных штаммов S. aureus: у 31,6% детей — из всех изучаемых биотопов, у 42% — с поверхности кожи и из носовой полости, у 2,6% — с кожи и из кишечника, у 10,5% — только с кожи, у 2,6% — из носовой полости и кишечника, у 2,6% — только из носовой полости. У 8% детей S. aureus не был обнаружен ни в одном из биотопов. Генотипирование позволило выявить 17 отличающихся генотипов S. aureus. Генотипы S. aureus, выделенные из носовой полости и кишечника, были в 88 и 61% случаев соответственно идентичны генотипу S. aureus, обнаруженному на кожных покровах. **Заключение**. Высокая частота совпадений генотипов свидетельствует о возможности миграции S. aureus между биотопами в организме человека и об отсутствии выраженной специализации штаммов S. aureus к колонизации какого-либо одного из них.*

***Ключевые слова**: атопический дерматит, Staphylococcus aureus, генетическое типирование.*

***(Для цитирования:** Пикина А.П., Шкопоров А.Н., Кулагина Е.В., Хохлова Е.В., Чаплин А.В., Володин Н.Н., Кафарская Л.И., Короткий Н.Г., Ефимов Б.А. Сравнительное генетическое типирование изолятов *Staphylococcus aureus*, выделенных с поверхности кожи, из носовой полости и кишечника у детей, страдающих атопическим дерматитом. *Вестник РАМН*. 2016;71(5):367–374. doi: 10.15690/vramn695)*



## Обоснование

Атопический дерматит — хроническое рецидивирующее заболевание кожи, характеризующееся нарушением целостности эпидермального барьера, снижением гидратации рогового слоя, воспалением; сопровождающееся выраженным психоэмоциональным воздействием на пациента и членов его семьи. По данным разных источников, частота встречаемости атопического дерматита у детей составляет 15–30% [1]. В течение последних десятилетий отмечается прогрессивный рост распространенности атопического дерматита в развитых странах, в том числе в России [1, 2].

В основе патогенеза атопического дерматита лежит конвергенция генетической предрасположенности к заболеванию с воздействием на организм разнообразных внешних факторов, в совокупности приводящих к глубокому и стойкому нарушению важнейших функций кожного покрова, включая проницаемость кожи и антимикробного барьера [3].

Негативные изменения антимикробного барьера при атопическом дерматите часто сопровождаются колонизацией поврежденной и неповрежденной кожи золотистым стафилококком (*Staphylococcus aureus*), что отражается в существенном различии качественных и количественных показателей, характеризующих обсеменение кожи больных бактериями этого вида по сравнению с кожей практически здоровых лиц [4].

В то время как в норме кожа редко (2–25%) колонизирована *S. aureus* (за исключением здоровых хронических носителей *S. aureus* в эндемичных районах), частота колонизации кожи больных с атопическим дерматитом, по разным данным, варьирует от 76 до 100% [5].

Ранее в серии непрерывных исследований по изучению микробной обсемененности кожных покровов у 26 детей в возрасте от 4 до 16 лет с диагнозом атопического дерматита мы обнаружили колонизацию (в средней концентрации 4,0±1,4 lg КОЕ/см$^2$) пораженных участков кожи *S. aureus* в 88,5% случаев. С меньшей частотой выявлялись другие виды стафилококков: *S. epidermidis*,

*S. hominis*, *S capitis*, *S. cohnii*, *S. simulans*, *S. haemolyticus*. На участках неповрежденной кожи, хотя и в меньшей степени, но также определялся патогенный штамм *S. aureus* (23,1% случаев) в концентрации до3,2±0,8 lg КОЕ/см$^2$ кожного покрова [4].

При изучении параметров обсемененности микрофлоры кожи 14 клинически здоровых детей *S. aureus* не выявлены, а видовой состав стафилококков у них включал только *S. epidermidis* и *S. hominis* в низкой концентрации [6].

Штаммы *S. aureus*, изолированные с кожи больных атопическим дерматитом, как правило, хронически колонизируют покровы тела, и могут быть повторно изолированы даже спустя месяцы после лечения [7].

К непосредственным причинам, вызывающим стойкую колонизацию кожи больных *S. aureus*, относят, прежде всего, нарушение целостности рогового слоя кожи, изменение pH в щелочную сторону, экссудацию фибриногена из плазмы, повышение синтеза фибронектина под действием интерлейкина 4 и снижение синтеза антимикробных пептидов кератиноцитами [8].

Колонизируя кожу, *S. aureus* могут вырабатывать эксфолиатины, альфа-гемолизин, а также другие токсины и ферменты, которые вызывают повреждение кератиноцитов. Некоторые штаммы *S. aureus* синтезируют суперантигены, что вызывает поликлональную активацию Т лимфоцитов, обусловливающую гиперпродукцию провоспалительных цитокинов и усиление воспалительной реакции. Таким образом, суперантигены, ассоциированные с *S. aureus*, выступают также и в роли аллергенов [5, 8].



Антибактериальная терапия приводит к снижению тяжести течения атопического дерматита, хотя ее эффективность ниже ожидаемой вследствие высокой скорости реколонизации пораженных участков кожи. Поскольку у больных атопическим дерматитом колонизация *S. aureus* с высокой частотой обнаруживается на слизистой оболочке носовой полости, высказано предположение, что именно она является резервуаром патогенных микроорганизмов [9].

Одним из подтверждений того, что можно говорить о переносе бактерий в организме с кожи в носовую полость, могло бы служить обнаружение генетической идентичности штаммов *S. aureus*, выделенных из разных областей тела у одного больного. Этот же факт мог бы указывать на преимущественную независимую колонизацию конкретного пациента определенными генотипами бактерий внутри вида *S. aureus*.

Генетическое типирование штаммов *S. aureus*, выделенных с пораженных участков кожи, а также носовой полости и кишечника больных детей, проводили с использованием двух молекулярно-генетических методов. Первый заключался в сравнительном высокочувствительном анализе кривых температур плавления (High Resolution Melting Analysis, HRM), продуктов амплификации фрагмента хромосомной ДНК *S. aureus*, кодирующего аминокислотную последовательность гипервариабельного региона X белка A (*spa*), полученных при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) [10]. Другой метод подразумевал сравнительный анализ длин продуктов амплификации, также полученных при помощи ПЦР, спейсерных участков, располагающихся между генами *16S* рРНК и *23S* рРНК, многокопийных рРНК-оперонов хромосомной ДНК *S. aureus*. Показатель уровня внутривидовой вариабельности длин спейсерных участков и

**A.P. Pikina[1], A.N. Shkoporov[1], E.V. Kulagina[2], E.V. Khokhlova[1], A.V. Chaplin[1], N.N. Volodin[3], L.I. Kafarskaya[1], N.G. Korotkiy[1], B.A. Efimov[1]**

[1] Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation
[2] Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
[3] D. Rogachev Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russian Federation

# Comparative Genotyping of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Skin Lesions, Nasal Cavities, and Feces of Children with Atopic Dermatitis

***Background**: The lesion of skin of the majority atopic dermatitis patients is chronically colonized by bacteria belonging to the species Staphylococcus aureus. Topical antibacterial and anti-inflammatory therapy treatment are often ineffective due to fast recolonization by S. aureus and exacerbation of allergic process. **Aims**: Our aim was to determine a frequency of S. aureus colonization in skin lesions, mucous membranes of the nasal cavity and intestine of children with atopic dermatitis, to compare the genotypes of Staphylococcus aureus strains isolated from different biotopes of atopic dermatitis patients, and to clarify whether the intestinal and nasal cavities microbiota may act as a source of S. aureus recolonization of skin lesions. **Materials and methods**: Bacteriological examination of fecal samples, skin, and nasal swabs was conducted in 38 atopic dermatitis patients. The pure bacterial cultures of S. aureus were identified using API Staph (Biomerieux, France) and Vitek 2 MS (Biomerieux, France). Isolates of S. aureus were subjected to genotyping by analysis of rRNA internal 16S-23S rRNA spacer regions and high resolution melting analysis (HMR) of polymorphic spa X-regions. **Results:** 99% S. aureus strains were successfully identified using MALDI-TOF mass-spectrometry. S. aureus cultures were isolated from all biotopes in 31,6% of children, from skin and nasal cavities — in 42% of cases, from skin and feces — in 2,6% of cases, only from skin — in 10,5%, from nasal cavities and feces — in 2,6%, and only from nasal cavities — in 2,6% of cases. In 8% of children, S. aureus was not detected in any of the biotopes. Genotyping of the isolates enabled the detection of 17 different genotypes. A match between the genotypes of skin and nasal strains, and skin and fecal strains was observed in 88% and 61% of the cases respectively. **Conclusions**: The observed a high-frequency matching genotypes suggests the possibility of migration of S. aureus strains inside biotopes in humans and the absence of specialization to colonization of any of the niches.*

***Key words**: atopic dermatitis, Staphylococcus aureus, genotyping.*

***(For citation:** Pikina AP, Shkoporov AN, Kulagina EV, Khokhlova EV, Chaplin AV, Volodin NN, Kafarskaya LI, Korotkiy NG, Efimov BA. Comparative Genotyping of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Skin Lesions, Nasal Cavities, and Feces of Children with Atopic Dermatitis. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2016;71(5):367–374. doi: 10.15690/vramn695)*

числа рРНК-оперонов ранее с успехом был использован для типирования и сравнения клинических изолятов *S. aureus* [11, 12].

**Цель исследования**: определение частоты колонизации *S. aureus* кожных покровов, слизистых оболочек носовой полости и кишечника детей, страдающих атопическим дерматитом, проведение с помощью методов генетического типирования сравнительного анализа выделенных из различных биотопов штаммов *S. aureus* и оценка вероятности миграции стафилококков между биотопами.

## Методы

### *Дизайн исследования*

Проведено одномоментное обсервационное моноцентровое исследование.

### *Критерии соответствия*

В исследование включали детей младше 18 лет, страдающих атопическим дерматитом.

### *Условия проведения*

Исследование проведено на базе кафедры микробиологии и вирусологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова (Москва).

### *Продолжительность исследования*

Биоматериал брали однократно; наблюдений за состоянием обследуемых или исследования в динамике в рамках данной работы не проводили. Включение пациентов в исследование и набор материала проходили в течение 2008–2012 гг.

### *Исходы исследования*

Выделяли *S. aureus* с кожи, из носовой полости и кишечника у детей с атопическим дерматитом. Проводили генетическое типирование выделенных штаммов. Определяли частоту совпадения генотипов штаммов *S. aureus* из различных ниш организма.

### *Методы регистрации исходов*

Материалом для бактериологического исследования служили смывы с 1 см$^2$ пораженных участков кожи, смывы из носовой полости и фекалии обследуемых. Тампоны со смывами участков кожи помещали в транспортные пробирки, содержащие 2 мл стерильного физиологического раствора. Тампоны со смывами из носовой полости помещали в пробирки с транспортной питательной средой. Фекалии собирали стерильным шпателем и помещали в транспортный контейнер. Для определения количества *S. aureus* в образцах кожных смывов и фекалий в бактериологической лаборатории из этого материала готовили серийные разведения в стерильном физиологическом растворе. Посев материала на селективную питательную среду проводили из разведений исследуемого материала в $10^1$ и $10^3$ раз. Определение обсемененности носовой полости проводили только качественно — путем высева исследуемого материала с тампонов непосредственно на питательную среду.

Для выделения стафилококков использовали селективную питательную среду Staphylococcus Medium 110 (Difco, США). После посева чашки Петри инкубировали в течение 48 ч при температуре 37°С, на этой среде микроорганизмы вида *S. aureus* образуют колонии с желтой пигментацией. Морфологию бактерий изучали микроскопией мазков, окрашенных по Граму. Определение родовой и видовой принадлежности выделенных микроорганизмов проводили на основании изучения каталазной активности и теста на плазмокоагуляцию. Для биохимической идентификации использовали тест-систему API-20 Staph (BioMerieux, Франция).

Кроме этого, для видовой идентификации микроорганизмов использовали метод MALDI-TOF MS (Matrix assisted laser desorption/Ionization time-of-flight Mass Spectrometry), основанный на времяпролетной масс-спектрометрии с лазерной десорбцией-ионизацией при содействии матрицы [13, 14]. Масс-спектрометрия была проведена с использованием прибора Vitek 2 MS (BioMerieux, Франция). Анализ спектров осуществляли с использованием программного обеспечения Saramis (BioMerieux, Франция).

Все штаммы бактерий, принадлежащие к виду *S. aureus*, были получены в чистой культуре сначала на плотной питательной среде, а затем в жидкой питательной среде BHI (BBL) для последующего приготовления лиофилизированных стоков. Лиофилизацию чистых культур бактерий проводили в растворе сахарозы (10%) и желатина (1%) в лиофильной сушке SB1 (Chemlab, Англия). Все последующие манипуляции с чистыми культурами стафилококков осуществляли после их выделения из лиофилизированных стоков.



Геномную ДНК из чистых культур стафилококков получали путем двухминутного кипячения суспензии бактериальных клеток в ТЕ-буфере и последующего центрифугирования лизата клеток. Супернатант использовали в качестве образцов ДНК в ПЦР.

Амплификацию фрагмента ДНК, кодирующего аминокислотную последовательность гипервариабельного региона X белка A *S. aureus*, проводили в приборе Bio-Rad C 100 с оптическим модулем CFX-96 с использованием готовых ПЦР-смесей (Синтол, Россия), содержащих флуоресцентный краситель EvaGreen (QIAGEN, Германия). Реакционные смеси объемом 25 мкл содержали 0,2 мкл образцов ДНК и специфичные для исследуемой области праймеры 1095F (5'-AGACGATCCTTCGGTGAGC-3') и 1517R (5'-GCTTTTGCAATGTCATTACTG-3') в финальной концентрации 0,2 мкМ каждого. Программа ПЦР в реальном времени состояла из начальной денатурации при 94°С в течение 15 с и 30 циклов амплификации, включавших отжиг праймеров при 60°С в течение 20 с и элонгацию при 72°С в течение 20 с. Затем проводили один цикл программы HRM для построения графиков кривых плавления продуктов амплификации, заключавшейся в линейном повышении температуры реакционной смеси от 75 до 95°С с одновременной регистрацией данных, характеризующих флуоресценцию на каждом шаге повышения температуры на 0,1°С. Время каждого этапа измерения составляло 5 с [10].

Для анализа кривых плавления использовали собственное программное обеспечение прибора BioRad C 100 (версия Precision Melt analysis), которое позволяет пользователю несколькими способами визуализировать данные в HRM и на этом основании распределить анализируемые последовательности на HRM-кластеры с вычислением уровня достоверности их принадлежности к соответствующему кластеру.

Идентичность ПЦР-продуктов, полученных при амплификации специфического участка ДНК из штаммов стафилококков, выделенных из смывов носовой полости и испражнений (опытные образцы), ПЦР-продуктам, полученным при амплификации ДНК из штаммов, выделенных из смывов кожи (контрольный образец) соот-

ветствующих пациентов, определялась по результатам анализа кривых плавления.

Для визуализации данных HRM-анализа были использованы сгенерированные программой кривые:

- кривая зависимости отрицательной производной функции флуоресценции (F) от температуры (T) (*df/ dt*), которая главным образом отображает температуру плавления ($T_m$) продукта амплификации;
- нормализованная исходная кривая, показывающая зависимость уменьшения флуоресценции от повышения температуры;
- разностные кривые, которые отображают определяемую пользователем кривую в качестве базисной линии (т.е. как ось X) и изображают другие нормализованные кривые по отношению к этой базисной линии.

Критерием признания кривых плавления продуктов амплификации опытных и контрольных образцов как «одинаковые» или «отличающиеся» служило определение их принадлежности к тому или иному HRM-кластеру. В соответствии с этим кривые плавления, характеризующие опытные штаммы, считались одинаковыми с выбранным контрольным штаммом, если они относились к одному и тому же кластеру. Кроме того, для признания HRM кривой опытного образца такой же, как кривая контрольного образца, следовала двухступенчатая процедура. Во-первых, проводился сравнительный анализ нормализованной HRM кривой для опытного образца с нормализованными профилями контрольного образца. Во-вторых, HRM профиль контрольного образца выбирался в качестве контроля для разностного графика, и сравнение разностных кривых использовалось для определения, был ли опытный штамм одинаковым с контрольным или же отличался от него.



Для анализа количества и размера спейсерных участков между генами *16S* рРНК и *23S* рРНК производилась ПЦР с праймерами IX (5'-GGTGAAGTCGTAACAAG-3') и II (5'-TGCCAAGGCATCCACC-3') [11, 12]. Состав ПЦР-смеси: SE-буфер AS (СибЭнзим, Россия), доведенный до 1х; 2,5 мМ $MgCl_2$; 0,4 мМ смеси нуклеотидов; 0,5 мкМ каждого праймера; 1 ед. Taq ДНК полимеразы (СибЭнзим, Россия), 0,2 мкл выделенной ДНК. Программа ПЦР состояла из начальной денатурации при 94°С в течение 2 мин, 30 циклов (денатурация — 1 мин при 94°С, отжиг праймеров — 1 мин при 55°С, элонгация — 40 с при 72°С) и завершающей элонгации в течение 4 мин при 72°С. Для визуализации продуктов амплификации применялся электрофорез в 2% агарозном геле.

В данном исследовании штаммы признавались одинаковыми в том случае, если характеристики температур плавления продуктов амплификации специфического участка гена белка А не отличались между собой по HRM-профилю, и электрофоретические картины, характеризующие их межгенные спейсерные участки, были неотличимы.

### *Этическая экспертиза*

В соответствии с заключением Этического комитета РНИМУ им. Н.И. Пирогова данное исследование не подлежит этической экспертизе согласно СОП ЭК РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

### *Статистический анализ*

Принципы расчета размера выборки: размер выборки предварительно не рассчитывали.

Методы статистического анализа данных: частота совпадения генотипов штаммов *S. aureus* оценивалась с помощью пермутационного теста [15].

## Результаты

### *Объекты (участники) исследования*

Изучение параметров колонизации кожных покровов, слизистой оболочки носовой полости и толстой кишки бактериями вида *S. aureus* проведено у 38 детей обоего пола, страдающих атопическим дерматитом. Возраст обследуемых составлял от 1,5 до 17 лет (средний возраст 6 лет). У наблюдаемых детей в анамнезе количество обострений основного заболевания составляло 2–3 раза в год. Обострения заболевания в большинстве случаев были связаны с нарушениями в питании. Суммарная продолжительность обострений атопического дерматита в год в среднем составляла 2–3 нед. У всех пациентов имелись родственники первой степени родства с атопическими заболеваниями.

### *Основные результаты исследования*

Проведенные исследования показали, что участки пораженной кожи у детей, страдающих атопическим дерматитом, были колонизированы *S. aureus* в 33 (86,8%) случаях из 38. С применением MALDI-TOF масс-спектрометрии были успешно идентифицированы 99% выделенных штаммов *S. aureus*: у 12 (31,6%) детей — из всех изученных ниш, у 16 (42,1%) — с поверхности кожи и из носовой полости, у 1 (2,6%) — с кожи и из кишечника, у 4 (10,5%) — только с кожи, у 1 (2,6%) — из носовой полости и кишечника, у 1 (2,6%) — только из носовой полости. У 3 (7,8%) детей *S. aureus* не были обнаружены ни в одной из ниш.

Средняя концентрация *S. aureus* на коже составила 4,6±1,4 КОЕ/см$^2$. В 3 случаях из образцов смывов с кожи было выделено 2 отличающихся по совокупности фенотипических свойств штамма *S. aureus* (по биохимическим свойствам и чувствительности к антибиотикам). Средняя концентрация *S. aureus* в кишечнике составила 4,6±0,87 КОЕ/г исследуемого материала.

Всего было выделено 159 штаммов *S. aureus.*

Для сравнительного генотипирования был отобран 51 штамм, выделенный с поверхности кожи, из носовой полости и испражнений 18 обследованных детей (табл.).

**Таблица.** Источники выделения, температура плавления (*Tm*), HRM и 16S-23S рРНК спейсер генотип штаммов *S. aureus,* выделенных от детей, страдающих атопическим дерматитом

| № п/п | № штамма | Источник выделения *S. aureus* | Tm (HRM) | HRM Генотип | Генотип по спейсеру 16S-23S рРНК | Генотип по совокупности HRM + спейсер 16S-23S рРНК |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | *1* | Смыв с кожи | 85.6 | 4 | 1 | 1 |
| | *2* | Носовая полость | 85.6 | 4 | 1 | 1 |
| | *3* | Кишечное содержимое | 85.6 | 4 | 1 | 1 |
| 2 | *4* | Смыв с кожи | 85.4 | 8 | 2 | 2 |
| | *5* | Носовая полость | 85.4 | 8 | 2 | 2 |
| | *6* | Кишечное содержимое | 85.4 | 8 | 2 | 2 |

**Таблица.** Источники выделения, температура плавления (*Tm*), HRM и 16S-23S рРНК спейсер генотип штаммов *S. aureus,* выделенных от детей, страдающих атопическим дерматитом *(Окончание)*

| № п/п | № штамма | Источник выделения *S. aureus* | Tm (HRM) | HRM Генотип | Генотип по спейсеру 16S-23S рРНК | Генотип по совокупности HRM + спейсер 16S-23S рРНК |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 3 | *8* | Смыв с кожи | 82.9 | 7 | 4 | 3 |
| | *9* | Носовая полость | 82.9 | 7 | 4 | 3 |
| | *10* | Кишечное содержимое | 84.4 | 1 | 5 | 4 |
| 4 | *17* | Смыв с кожи | 84.4 | 1 | 9 | 5 |
| | *18* | Смыв с кожи | 84.8 | 6 | 8 | 6 |
| | *19* | Носовая полость | 84.4 | 1 | 9 | 5 |
| | *20* | Кишечное содержимое | 84.4 | 1 | 9 | 5 |
| 5 | *21* | Смыв с кожи | 83.9 | 2 | 6 | 7 |
| | *24* | Носовая полость | 83.9 | 2 | 6 | 7 |
| 6 | *25* | Смыв с кожи | 83.8 | 2 | 6 | 7 |
| | *26* | Носовая полость | 83.8 | 2 | 6 | 7 |
| 7 | *30* | Смыв с кожи | 84.1 | 10 | 13 | 8 |
| | *31* | Носовая полость | 85.0 | 11 | 2 | 9 |
| | *32* | Кишечное содержимое | 84.3 | 5 | 3 | 10 |
| 8 | *34* | Смыв с кожи | 84.1 | 10 | 13 | 8 |
| | *35* | Носовая полость | 84.1 | 10 | 13 | 8 |
| | *36* | Кишечное содержимое | 84.1 | 10 | 13 | 8 |
| 9 | *11* | Смыв с кожи | 84.4 | 1 | 5 | 4 |
| | *12* | Смыв с кожи | 83.7 | 2 | 7 | 11 |
| | *13* | Носовая полость | 83.8 | 2 | 7 | 11 |
| | *14* | Кишечное содержимое | 85.6 | 4 | 15 | 17 |
| 10 | *38* | Смыв с кожи | 85.6 | 4 | 1 | 1 |
| | *39* | Носовая полость | 85.6 | 4 | 1 | 1 |
| | *41* | Кишечное содержимое | 85.6 | 4 | 1 | 1 |
| 11 | *43* | Смыв с кожи | 84.4 | 1 | 12 | 12 |
| | 45 | Носовая полость | 84.8 | 6 | 10 | 13 |
| | *46* | Кишечное содержимое | 84.8 | 6 | 10 | 13 |
| 12 | *47* | Смыв с кожи | 84.1 | 10 | 13 | 8 |
| | *48* | Носовая полость | 84.1 | 10 | 13 | 8 |
| 13 | *49* | Смыв с кожи | 85.1 | 3 | 11 | 14 |
| | *50* | Носовая полость | 85.1 | 3 | 11 | 14 |
| 14 | *51* | Смыв с кожи | 85.1 | 3 | 11 | 14 |
| | *52* | Носовая полость | 85.1 | 3 | 11 | 14 |
| | *53* | Кишечное содержимое | 85.1 | 3 | 11 | 14 |
| 15 | *54* | Смыв с кожи | 84.5 | 1 | 9 | 5 |
| | *55* | Кишечник | 84.5 | 1 | 9 | 5 |
| 16 | *56* | Смыв с кожи | 84.4 | 5 | 3 | 10 |
| | *57* | Носовая полость | 84.4 | 5 | 3 | 10 |
| 17 | *60* | Смыв с кожи | 85.6 | 4 | 1 | 1 |
| | *61* | Носовая полость | 85.6 | 4 | 1 | 1 |
| | *62* | Кишечное содержимое | 83.9 | 2 | 14 | 15 |
| 18 | *63* | Смыв с кожи | 85.4 | 8 | 1 | 16 |
| | *64* | Смыв с кожи | 85.7 | 4 | 1 | 1 |
| | *65* | Носовая полость | 85.7 | 4 | 1 | 1 |
| | *66* | Кишечное содержимое | 85.7 | 4 | 1 | 1 |

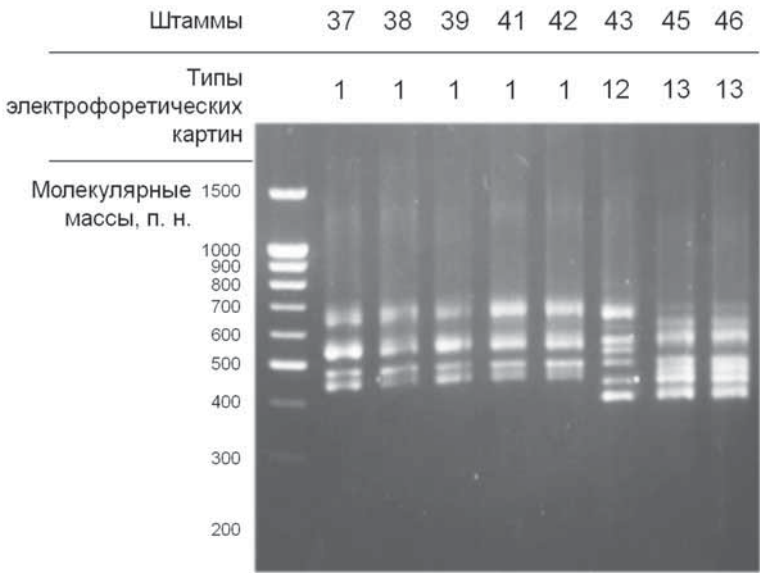



**Рис.** Агарозный электрофорез наборов участков между генами *16S* рРНК и *23S* рРНК в многокопийных рРНК оперонах. На первой дорожке представлен ДНК-маркер 100 bp + 1.5 Kb (СибЭнзим), на дорожках 2–10 — ПЦР-продукты, полученные из ДНК различных штаммов *S. aureus*.



У данной группы детей *S. aureus* был выделен из 2 или 3 биотопов. В смывах из носовой полости этих детей *S. aureus* был обнаружен в 17 (94,4%) случаях из 18 обследованных детей, а в фекалиях — в 13 случаях (72,2%).

Температуры плавления продуктов амплификации участка ДНК, кодирующего гипервариабельный регион X белка A *S. aureus*, полученные при помощи HRM-анализа, находились в диапазоне от 83,4 до 85,7°C. В соответствии с вышеуказанными критериями, по 51 нуклеотидной последовательности *spa* было сгенерировано 11 различных типов HRM.

При анализе характеристик спейсерных участков между генами *16S* рРНК и *23S* рРНК было выявлено 15 вариантов электрофоретических картин (рис.). Суммарно при использовании двух методов генотипирования было выделено 17 отличающихся генотипов *S. aureus*, причем кожные покровы детей были колонизированы 13 различными генотипами, носовая полость — 11, кишечник — 10. С наибольшей частотой среди обследованных пациентов были распространены штаммы *S. aureus*, отнесенные нами к генотипам 1 и 8: бактерии этих генотипов были обнаружены в различных анатомических областях у 4 и 3 детей соответственно. Генотипы 4, 5, 7, 10 и 14 *S. aureus* встречались каждый у двух разных пациентов. Только штаммы 10 генотипов (2, 3, 6, 9, 11, 12, 13, 15, 16 и 17) *S. aureus* колонизировали по одному ребенку.

В 15 (88,2%) случаях из 17 генотипы *S. aureus*, колонизирующие носовую полость и кожные покровы детей, совпадали. В 8 (61,5%) случаях из 13 генотип *S. aureus*, колонизировавший кишечник, был идентичен генотипу стафилококков, колонизирующих кожные покровы. Подобная высокая частота совпадений свидетельствует о возможности миграции *S. aureus* между биотопами в организме человека и отсутствии выраженной специализации штаммов к колонизации какому-либо одному из них. Для установления статистической значимости полученной частоты совпадений был применен пермутационный тест [16]: генотипы штаммов подвергались 10 000 случайных перемешиваний, после чего считалась частота совпадений генотипов штаммов между биотопами организма. В результате, случайная частота совпадения генотипов в сравнении «кожа-носоглотка» составила 9,6±6,8%, в сравнении «кожа-кишечник» — 10,0±8,0%. Таким образом, в обоих случаях наблюдаемая частота совпадений (88,2 и 61,5% соответственно) значимо отличались от частоты, которая бы наблюдалась при случайных совпадениях ($p<0,0001$, пермутационный тест).

## Обсуждение

### *Резюме основного результата исследования*

По результатам исследования показана высокая частота колонизации *S. aureus* поврежденных участков кожных покровов, слизистой оболочки носовой полости и кишечника детей, страдающих атопическим дерматитом. Генетическое типирование выделенных штаммов *S. aureus* позволило выявить 17 отличающихся генотипов, обладающих высоким уровнем специфичности колонизации индивидуального организма. В большинстве случаев генотипы *S. aureus*, колонизирующие носовую полость и кишечник детей, страдающих атопическим дерматитом, были идентичны генотипу микроорганизмов, обнаруженных на их кожных покровах.

### *Обсуждение основного результата исследования*

Атопический дерматит является наиболее распространенным хроническим воспалительным дерматозом. Заболевание характеризуется ранним началом, обычно в детском возрасте, кожным зудом, хронизацией с рецидивами и ремиссиями, наличием других сопутствующих атопических заболеваний (астма, сенная лихорадка), семейным анамнезом атопии и типичными изменениями вовлеченной в патологический процесс кожи. Кожа пациентов с атопическим дерматитом часто колонизирована *S. aureus*, причем как само наличие, так и количественный уровень колонизирующих кожу *S. aureus* коррелирует с усилением тяжести течения заболевания [6].

Временная эрадикация *S. aureus* путем применения антибиотикотерапии или антисептиков, даже когда кожа не имеет клинических признаков инфицирования, часто приводит к клиническому улучшению течения атопического дерматита. Однако эффективность антибактериальной терапии оказывается ниже ожидаемой из-за высокой скорости реколонизации пораженных участков кожи штаммами *S. aureus* [7, 17]. Проведенные ранее исследо-

вания показали, что возможными причинами реколонизации кожных покровов у больных атопическим дерматитом могут быть устойчивость бактерий к применяемым антибактериальным препаратам, интраназальное и/или подногтевое носительство стафилококков и микробная контаминация лекарственных препаратов, используемых для местной терапии [7, 16]. В другом исследовании с применением молекулярных методов генетического типирования штаммов *S. aureus* в качестве одного из потенциальных источников реколонизации кожных покровов у детей с атопическим дерматитом идентифицировали носительство *S. aureus* в носовой полости у родителей больных детей [17]. Так, в исследовании было показано, что по крайней мере один из родителей больного ребенка в 65% семей являлся носителем *S. aureus* в носовой полости. При этом 84% штаммов *S. aureus*, выделенных от детей и их родителей, обладали схожим генотипом. Исследований, посвященных сравнительному генетическому типированию штаммов стафилококков, выделенных из испражнений детей, страдающих атопическим дерматитом, ранее не проводилось. В то же время известно, что течение атопического дерматита часто сопровождается выраженным зудом. При расчесывании кожи бактерии вместе с эпителиальными клетками попадают на руки пациента и в подногтевое пространство, что в свою очередь может вести к контаминации ротовой и носовой полости либо прямо, либо опосредованно через предметы окружающей среды, например игрушки, к которой прикасается ребенок обсемененными руками и затем берет ее в рот. Контаминация ротовой полости может приводить к проникновению бактерий в носовую полость или в кишечник больного ребенка. Также существует вероятность того, что дети, страдающие атопическим дерматитом, контактным или воздушно-капельным механизмом могут загрязнять колонизирующими их штаммами стафилококков тесно контактирующих с ними людей, а те в свою очередь за счет тех же механизмов способны возвращать эти бактерии обратно детям. Кроме того, колонизирующие кишечник штаммы *S. aureus* с каловыми массами могут загрязнять перианальную область кожи и далее контактным механизмом распространятся на другие участки кожной поверхности. Однако эти предположения должны быть подвергнуты тщательному научному исследованию.

В нашем исследовании мы провели оценку частоты одновременного обнаружения *S. aureus* у детей с атопическим дерматитом на коже, в носовой полости и в испражнениях. Кроме того, было проведено генетическое типирование выделенных штаммов *S. aureus* с целью подтверждения роли слизистых оболочек носовой полости и кишечника как вероятных источников реколонизации кожных покровов *S. aureus*.

Результаты бактериологического исследования подтвердили высокую частоту колонизации *S. aureus* поврежденных участков кожных покровов детей, страдающих атопическим дерматитом. Так, кожа 86,8% обследованных детей была колонизирована *S. aureus*. Кроме того, при бактериологическом исследовании смывов из носовой полости и образцов испражнений детей бактерии вида *S. aureus* были обнаружены в 79 и 37% случаев соответственно.

Генетическое типирование *S. aureus* позволило выявить 17 отличающихся генотипов *S. aureus*, причем кожные покровы 18 детей были колонизированы 13 различными генотипами этих бактерий, носовая полость — 11, кишечник — 10. Интересно, что только два из идентифицированных генотипов (генотипы 1 и 8) *S. aureus* были обнаружены более чем у двух обследованных детей. В частности, *S. aureus* этих генотипов были обнаружены на коже, слизистой оболочке носа и в кишечном содержимом, каждый — у трех разных детей. Еще у одного ребенка стафилококки генотипа 1 были выделены только с поверхности кожи и из носовой полости. Генотипы 4, 5, 7, 10 и 14 были обнаружены каждый у 2 детей. Штаммы *S. aureus* оставшихся 10 генотипов (2, 3, 6, 9, 11, 12, 13, 15, 16 и 17) колонизировали только по одному ребенку. Эти данные свидетельствуют о высоком уровне специфичности колонизации *S. aureus* детей, страдающих атопическим дерматитом, что выражается в индивидуальной склонности организма больного ребенка к контаминации определенными, характерными только для него генотипами *S. aureus*.

Кроме того, было установлено, что в 88% случаев генотип *S. aureus*, колонизирующий носовую полость, и в 61% случаев генотип *S. aureus*, колонизирующий кишечник детей, страдающих атопическим дерматитом, был идентичен генотипу *S. aureus*, обнаруженных на их кожных покровах. С учетом возможности сенсибилизации организма аллергенами *S. aureus* их длительная персистенция в указанных биотопах может влиять на течение как непосредственно кожного процесса, так и провоцировать возникновение воспалительных процессов в кишечном тракте, а также аллергического ринита, возникающего впоследствии как этап атопического марша.



***Ограничения исследования***

Основным ограничением исследования является анализ параметров колонизации различных биотопов у детей, страдающих атопическим дерматитом, только стафилококками, относящимися к виду *S. aureus*.

Из 159 выделенных штаммов *S. aureus* для сравнительного генотипирования использовали 51 штамм стафилококков, выделенных с поверхности кожи, из носовой полости и испражнений у 18 из 38 детей. У данной группы детей *S. aureus* выделялся из 2 или 3 биотопов.

## Заключение

Высокая частота совпадений генотипов штаммов *S. aureus*, выделенных из носовой полости, кишечника и с поверхности кожных покровов, свидетельствует о возможности миграции *S. aureus* между различными биотопами организма и отсутствии выраженной специализации штаммов *S. aureus* к колонизации какого-либо одного из них. Исходя из этого, поиск оптимальных методов предупреждения перекрестной микробной контаминации у детей, страдающих атопическим дерматитом, должен вестись с учетом их эффективности в отношении *S. aureus* во всех биотопах.

## Источник финансирования

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова.

## Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие финансовой поддержки исследования/конфликта интересов, о которых необходимо сообщить.

## ЛИТЕРАТУРА


1. Семенов В.Ю., Руголь Л.В., Матвеев Э.Н. Повозрастные показатели нуждаемости детского населения в специализированной стационарной медицинской помощи на примере Московской области // *Социальные аспекты здоровья населения*. — 2010. — Т.16. — №4 — С. 10. [Semenov VYu, Rugol LV, Matveev EN. Age-related indicators of children population's needs in the specialized stationary medical care by an example of the Moscow region. *Sotsial'nye aspekty zdorov'ya naseleniya*. 2010;16(4):10. (In Russ).]
2. Bieber T. Atopic dermatitis. *Ann Dermatol.* 2010;22(2):125–137. doi: 10.5021/ad.2010.22.2.125.
3. Leung DY. New insights into atopic dermatitis: role of skin barrier and immune dysregulation. *Allergol Int*. 2013;62(2):151–161. doi: 10.2332/allergolint.13-RAI-0564.
4. Ефимов Б.А., Короткий Н.Г., Постникова Е.А. и др. Изучение качественного состава стафилококков кожи у больных атопическим дерматитом // *Стерилизация и госпитальные инфекции*. — 2007. — Т.3. — №5 — С. 17–20. [Efimov BA, Korotkii NG, Postnikova EA, et al. Izuchenie kachestvennogo sostava stafilokokkov kozhi u bol'nykh atopicheskim dermatitom. *Sterilizatsiya i gospital'nye infektsii*. 2007;3(5):17–20. (In Russ).]
5. Mempel M. *Staphylococcus aureus and atopic eczema*. In: Ring JPB, Przybilla B, Ruzicka T, editors. *Handbook of atopic eczema*. Berlin: Springer Science & Business; 2006. p. 406–409.
6. Park HY, Kim CR, Huh IS, et al. Staphylococcus aureus colonization in acute and chronic skin lesions of patients with atopic dermatitis. *Ann Dermatol*. 2013;25(4):410–416. doi: 10.5021/ad.2013.25.4.410.
7. Gilani SJ, Gonzalez M, Hussain I, et al. Staphylococcus aureus recolonization in atopic dermatitis: beyond the skin. *Clin Exp Dermatol.* 2005;30(1):10–13. doi: 10.1111/j.1365-2230.2004.01679.x.
8. Elias PM, Schmuth M. Abnormal skin barrier in the etiopathogenesis of atopic dermatitis. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2009;9(4):265–272. doi: 10.1007/s11882-009-0037-y.
9. Arisawa T, Arisawa S, Yokoi T, et al. Endoscopic and histological features of the large intestine in patients with atopic dermatitis. *J Clin Biochem Nutr*. 2007;40(1):24–30. doi: 10.3164/jcbn.40.24.
10. Stephens AJ, Inman-Bamber J, Giffard PM, Huygens F. High-resolution melting analysis of the spa repeat region of Staphylococcus aureus. *Clin Chem*. 2008;54(2):432–436. doi: 10.1373/clinchem.2007.093658.
11. Gürtler V, Barrie HD, Mayall BC. Use of denaturing gradient gel electrophoresis to detect mutation in VS2 of the 16S-23S rDNA spacer amplified from Staphylococcus aureus isolates. *Electrophoresis*. 2001;22(10):1920–1924. doi: 10.1002/1522-2683(200106)22:10<1920::aid-elps1920>3.0.co;2-0.
12. Saruta K, Matsunaga T, Kono M, et al. Rapid identification and typing of Staphylococcus aureus by nested PCR amplified ribosomal DNA spacer region. *FEMS Microbiol Lett*. 1997;146(2):271–278. doi: 10.1016/s0378-1097(96)00487-9.
13. Nomura F. Proteome-based bacterial identification using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS): A revolutionary shift in clinical diagnostic microbiology. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1854(6):528–537. doi: 10.1016/j.bbapap.2014.10.022.
14. Zhu W, Sieradzki K, Albrecht V, et al. Evaluation of the Biotyper MALDI-TOF MS system for identification of Staphylococcus species. *J Microbiol Methods*. 2015;117:14–17. doi: 10.1016/j.mimet.2015.07.014.
15. Good P. Permutation tests: a practical guide to resampling methods for testing hypotheses. Springer series in statistics. New York: Springer Science & Business Media; 2013. 228 p.
16. Kim BS, Park JY, Song CH, et al. Clarifying the transmission route of Staphylococcus aureus colonizing the skin in early childhood atopic dermatitis. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2012;109(6):448–453. doi: 10.1016/j.anai.2012.09.015.
17. Bonness S, Szekat C, Novak N, Bierbaum G. Pulsed-field gel electrophoresis of Staphylococcus aureus isolates from atopic patients revealing presence of similar strains in isolates from children and their parents. *J Clin Microbiol*. 2008;46(2):456–461. doi: 10.1128/JCM.01734-07.




## КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ


***Пикина Алла Павловна***, старший преподаватель кафедры микробиологии и вирусологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова
**Адрес**: 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1, **тел.**: +7 (495) 434-16-77, **e-mail**: apikina@mail.ru
**SPIN-код**: 3542-4060, **ORCID**: http://orcid.org/0000-0001-7232-3288

***Шкопоров Андрей Николаевич***, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии и биобезопасности РНИМУ им. Н.И. Пирогова
**Адрес**: 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1, **тел.**: +7 (495) 434-16-77, **e-mail**: a.shkoporov@gmail.com

***Кулагина Елена Валерьевна***, научный сотрудник Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
**Адрес**: 119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32, **тел.**: +7 (499) 135 98 46, **e-mail**: elenka176@yandex.ru
**SPIN-код**: 3437-5000, **ORCID**: http://orcid.org/0000-0002-5381-1785

***Хохлова Екатерина Викторовна***, научный сотрудник лаборатории микробиологии и биобезопасности РНИМУ им. Н.И. Пирогова
**Адрес**: 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1, **тел.**: +7 (495) 434-16-77, **e-mail**: a.shkoporov@gmail.com

***Чаплин Андрей Викторович***, ассистент кафедры микробиологии и вирусологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова
**Адрес**: 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1, **тел.**: +7 (495) 434-16-77, **e-mail**: okolomedik@gmail.com
**SPIN-код**: 6434-2207, **ORCID**: http://orcid.org/0000-0003-1377-7153

***Володин Николай Николаевич***, доктор медицинских наук, академик РАМН, профессор ФНКЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачёва
**Адрес**: 117997, Москва, ул. Саморы Машела, д. 1, **тел.**: +7 (495) 287-65-70, **e-mail**: info@fnkc.ru

***Кафарская Людмила Ивановна***, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой микробиологии и вирусологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова
**Адрес**: 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1, **тел.**: +7 (495) 434-16-77, **e-mail**: likmed@mail.ru

***Короткий Николай Гаврилович***, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой дерматовенерологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова
**Адрес**: 117997, Москва, Ленинский проспект, д. 117, **тел.**: +7 (495) 936-90-16, **e-mail**: korotkiy_ng@rsmu.ru

***Ефимов Борис Алексеевич***, доктор медицинских наук, профессор кафедры микробиологии и вирусологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова
**Адрес**: 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1, **тел.**: +7 (495) 434-16-77, **e-mail**: efimov_ba@mail.ru

DOI: 10.15690/vramn738

**В.А. Бывальцев[1, 2, 3, 4], А.А. Калинин[1, 2, 3], А.К. Оконешникова[1], Т.Т. Керимбаев[1], Е.Г. Белых[1, 3]**

[1] Иркутский государственный медицинский университет, Иркутск, Российская Федерация
[2] Дорожная клиническая больница на станции Иркутск-Пассажирский ОАО «РЖД», Иркутск, Российская Федерация
[3] Иркутский научный центр хирургии и травматологии, Иркутск, Российская Федерация
[4] Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования, Иркутск, Российская Федерация

# Фасеточная фиксация в комбинации с межтеловым спондилодезом: сравнительный анализ и клинический опыт нового способа хирургического лечения пациентов с дегенеративными заболеваниями поясничного отдела позвоночника

***Обоснование**. В лечении пациентов с дегенеративными заболеваниями поясничного отдела позвоночника широкое распространение получила методика транспедикулярной фиксации, когда после открытой декомпрессии канала винты фиксирующей конструкции вводятся в тело позвонка сзади через ножки позвонка. Нами впервые применен принципиально новый способ задней фиксации с использованием фасеточного плат-кейджа Facet Wedge, когда хирургическая коррекция производится посредством замыкания фасеточных суставов минимально инвазивным чрескожным способом. Данные о клинической эффективности фасеточной фиксации в научной литературе отсутствуют. **Цель исследования**: провести сравнительный анализ клинической эффективности фасеточной фиксации в комбинации с межтеловым спондилодезом при лечении пациентов с дегенеративными заболеваниями поясничного отдела позвоночника. **Методы**. В исследование включено 145 пациентов, которые разделены на 2 группы. Основную группу проспективного наблюдения составили пациенты (n=100), которым выполнен новый метод поясничной фиксации, заключающийся в односторонней или двусторонней имплантации титанового кейджа Facet Wedge в суставную щель фасеточного сустава в комбинации с передним, боковым и трансфораминальным межтеловым спондилодезом. Группу клинического сравнения (n=45) составили ретроспективно набранные пациенты, которым после открытой декомпрессии и межтелового спондилодеза выполнена задняя поясничная фиксация путем транспедикулярной установки титановых винтов. Динамическое наблюдение и комплексную клиническую оценку результатов лечения проводили в течение 18 мес после операции. **Результаты**. Технология установки фасеточного кейджа достаточно проста, является универсальной для стабилизации заднего опорного комплекса после межтелового спондилодеза из переднего, бокового и заднего доступов, не требует интраоперационного применения дорогостоящего высокотехнологичного оборудования. При сравнительном анализе в основной группе выявлены значимо лучшие результаты по продолжительности операции [основная группа, ОГ, 125 (90; 140) мин, группа клинического сравнения, ГКС, 205 (160; 220) мин; p=0,01], объему кровопотери [ОГ 80 (70; 120) мл, ГКС 350 (300; 550) мл; p=0,008], времени активизации [ОГ 2 (1; 2) дн., ГКС 4 (3; 5) дн.; p=0,02], срокам госпитализации [ОГ 9 (10; 11) дн., ГКС 13 (12; 15) дн.; p=0,03], уровню болевого синдрома по визуальной аналоговой шкале [ОГ 3 (2; 4) мм, ГКС 15 (12; 18) мм; p=0,001], качеству жизни (по индексу Освестри) [ОГ 8 (6; 8) баллов, ГКС 23 (20; 28) баллов; p=0,003] и трудовой реабилитации [ОГ 3 (2; 6) мес, ГКС 9 (6; 12) мес; p=0,0001]. Количество послеоперационных осложнений в группе I составило 13%, в группе II — 31,1% (p=0,0012). Новая методика задней фиксации сопряжена со значительно меньшей операционной травмой паравертебральных мягких тканей, что позволяет проводить раннюю активизацию пациентов, ведет к сокращению сроков пребывания в стационаре и лучшему функциональному восстановлению пациентов. **Заключение**. При лечении пациентов с дегенеративными заболеваниями поясничного отдела позвоночника использование фасеточной фиксации в комбинации с межтеловым спондилодезом позволяет достичь лучших клинических исходов, снизить число послеоперационных осложнений в ближайшем и отдаленном периодах наблюдения в сравнении с традиционной методикой транспедикулярной стабилизации. Сочетание малой травматичности и надежности методики фасеточной фиксации для задней стабилизации оперированного сегмента создает благоприятные условия для восстановления функционального состояния пациентов, полноценной социальной и физической реабилитации.*

***Ключевые слова**: поясничный отдел позвоночника, дегенеративные заболевания, декомпрессия, межтеловой спондилодез, фасеточная стабилизация, транспедикулярная фиксация.*

*(**Для цитирования**:* Бывальцев В.А., Калинин А.А., Оконешникова А.К., Керимбаев Т.Т., Белых Е.Г. Фасеточная фиксация в комбинации с межтеловым спондилодезом: сравнительный анализ и клинический опыт нового способа хирургического лечения пациентов с дегенеративными заболеваниями поясничного отдела позвоночника. *Вестник РАМН.* 2016;71(5):375–384. doi: 10.15690/vramn738)



## Обоснование

Значительная часть дегенеративных заболеваний пояснично-крестцового отдела позвоночника при неэффективности стандартной консервативной терапии требует осуществления декомпрессивно-стабилизирующих хирургических вмешательств [1–3]. Вне зависимости от вида доступа к позвоночному столбу «золотым стандартом» дорзальной стабилизации позвоночных сегментов после декомпрессии нервных структур является методика классической открытой транспедикулярной фиксации [4–6]. Тем не менее это сопряжено со

значимым повреждением мышечно-связочного аппарата, что сопровождается длительным болевым синдромом, снижением качества жизни и увеличением сроков нетрудоспособности, связанных с оперативным вмешательством [7–9]. Для нивелирования отрицательных побочных эффектов за счет уменьшения травматизации окружающих мягких тканей в хирургии дегенеративных поражений пояснично-крестцового отдела позвоночника в последние годы распространение получил способ перкутанной транспедикулярной стабилизации [10, 11]. Несмотря на чрескожное минимально инвазивное проведение погружной конструкции, сохраняются риски повреждения невральных структур при введении винтов [12, 13].

В период с 2005 по 2016 г. в центре нейрохирургии НУЗ «ДКБ на ст. Иркутск-Пассажирский ОАО «РЖД» выполнено свыше 2000 декомпрессивно-стабилизирующих вмешательств при дегенеративных заболеваниях пояснично-крестцового отдела позвоночника из переднего, бокового и заднего доступов с задней транспедикулярной стабилизацией. Проведенный ранее анализ послеоперационных результатов показал, что подавляющее большинство неудовлетворительных клинических исходов связано со значительной операционной травмой мягких тканей и локальной мышечной атрофией при выполнении этапов хирургических вмешательств, а также мальпозицией транспедикулярных винтов с компрессией спинномозговых корешков и неврологической симптоматикой [1]. В связи с этим актуальным является исследование возможности контролируемой и безопасной стабилизации заднего опорного комплекса при минимальной агрессивности вмешательства.

Одним из технологических решений является трансфасеточная фиксация заднего опорного комплекса [14, 15]. С октября 2014 г. мы внедрили новый метод стабилизации поясничного отдела позвоночника с использованием фасеточного плат-кейджа в комбинации с передним, боковым и трансфораминальным межтеловым спондилодезом. Методика фасеточной фиксации с использованием кейджа Facet Wedge (Synthes, Швейцария) осуществлена в России впервые. Кроме того, в профессиональных литературных источниках нами не найдено исследований клинической эффективности фасеточного кейджа при лечении пациентов с дегенеративными поражениями пояснично-крестцового отдела позвоночника, что обусловливает новизну данной работы.



**V.A. Byvaltsev[1, 2, 3, 4], A.A. Kalinin[1, 2, 3], A.K. Okoneshnikova[1], T.T. Kerimbayev[1], E.G. Belykh[1, 3]**

[1] Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russian Federation
[2] Railway Clinical Hospital on the station Irkutsk-Passazhirskiy of Russian Railways Ltd, Irkutsk, Russian Federation
[3] Scientific Center of Surgery and Traumatology, Irkutsk, Russian Federation
[4] Irkutsk State Medical Academy of Continuing Education, Irkutsk, Russian Federation

# Facet Fixation Combined with Lumbar Interbody Fusion: Comparative Analysis of Clinical Experience and A New Method of Surgical Treatment of Patients with Lumbar Degenerative Diseases

***Background**: For the treatment of patients with degenerative diseases of the lumbar spine the technique of pedicle fixation is widespread, when after open decompression channel structure locking screws are introduced into the vertebral body through the back vertebra legs. We first used a fundamentally new way of fixing the rear using the facet-boards Cage «Facet Wedge», when posterior fixation is done by closing the facet joints with minimally invasive, percutaneous method. We have not found data on the clinical efficacy of facet fixation in scientific literature. **Aims**: To compare the clinical efficacy of facet fixation combined with interbody fusion in the treatment of patients with degenerative lumbar spine disease. **Materials and methods**: The study included 145 patients who were divided into 2 groups. The study group with long-term observation included patients (n=100) who underwent a new method for lumbar fixation; the method comprises unilateral or bilateral implantation of titanium Cage «facet Wedge» in the joint space facet joint in combination with the anterior, lateral, and transforaminal interbody fusion. Clinical comparison group (n=45) included retrospectively recruited patients who were performed titanium pedicle screw installation after open decompression and interbody fusion posterior lumbar fixation. Dynamic observation and comprehensive evaluation of the treatment clinical results was carried out for 18 months after surgery. **Results**: Cage facet installation technology is quite simple, universal for the stabilization of the rear of the complex after interbody fusion from the front, side, and rear access; and does not require the intraoperative application of expensive high-tech equipment. Comparative analysis of the main group showed significantly better results in terms of the duration of the operation [CG 125 (90; 140) min, the CCG 205 (160; 220) min; p=0.01], the volume of blood loss [CG 80 (70; 120) ml, CCG 350 (300; 550) ml; p=0.008], activation time [CG 2 (1; 2) days, 4 CCG (3; 5) days; p=0.02], length of hospitalization [CG 9 (10; 11) days, the CCG 13 (12; 15) days; p=0.03], the level of pain on a visual analog scale [CG 3 (2; 4) mm, CCG 15 (12; 18) mm; p=0.001], quality of life (by index Oswestry) [CG 8 (6; 8) points, the CCG 23 (20; 28) points, p=0.003], and labor rehabilitation [CG 3 (2; 6) months, CCG 9 (6; 12) months; p=0.0001]. The number of postoperative complications in group 1 was 13%, in the 2nd — 31,1% (p=0,0012). The new method involves fixing the back with considerably less surgical trauma of paravertebral soft tissue that results in early activation of patients, reduction of stay in hospital period, and better functional recovery of patients. **Conclusions**: The application of facet fixation combined with interbody fusion in the treatment of patients with degenerative diseases of the lumbar spine allows achieving the best clinical outcomes and fewer postoperative complications during the short and long-term follow-up if compared with the traditional method of transpedicular stabilization. The combination of low-impact and reliability facet fixation techniques for posterior stabilization of the operated segment creates favorable conditions for the restoration of a functional condition of patients, full social and physical rehabilitation.*

***Key words**: lumbar spine degenerative disease, decompression, interbody fusion, facet stabilization, transpedicular fixation.*

***(For citation**: Byvaltsev VA, Kalinin AA, Okoneshnikova AK, Kerimbayev TT, Belykh EG. Facet Fixation Combined with Lumbar Interbody Fusion: Comparative Analysis of Clinical Experience and A New Method of Surgical Treatment of Patients with Lumbar Degenerative Diseases. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2016;71(5):375–384. doi: 10.15690/vramn738)*

**Цель исследования**: провести сравнительный анализ клинической эффективности фасеточной фиксации в комбинации с межтеловым спондилодезом при лечении пациентов с дегенеративными заболеваниями поясничного отдела позвоночника.

## Методы

### *Дизайн исследования*

Выполнено одноцентровое проспективное исследование. Произведен ретроспективный анализ полученных данных.

### *Критерии соответствия*

*Критерии включения*: необходимость в стабилизации заднего опорного комплекса с целью формирования спондилодеза при дегенеративных заболеваниях поясничного отдела позвоночника, резистентных к консервативной терапии.

*Критерии исключения*: ревизионные декомпрессивно-стабилизирующие вмешательства, рентгенологические признаки спондилолистеза выраженные изменения или разрушение структур фасеточного сустава IV степени по классификации A. Fujiwara [16].

### *Условия проведения*

Исследование проведено в центре нейрохирургии НУЗ «ДКБ на ст. Иркутск-Пассажирский ОАО «РЖД». Хирургический доступ, выполнение прямой и непрямой декомпрессии нервных структур осуществляли по общепринятым в нейрохирургии стандартам с использованием операционного микроскопа OPMI Pentero (Carl Zeiss, Германия), специализированного силового инструментария (высокоскоростная дрель Anspach Effort, США) и ретракторных систем для минимально инвазивной хирургии, индивидуальных для каждого анатомического коридора: SynFrame (Synthes, Швейцария) для переднего (Anterior lumbar interbody fusion, ALIF) с установкой кейджа Synster ALIF (Корея), Oracle (Synthes, Швейцария) для бокового (Direct lumbar interbody fusion, DLIF) с имплантацией кейджа Oracle (Synthes, Швейцария), Insight (Synthes, Швейцария) для трансфораминального (Transforaminal lumbar interbody fusion, TLIF) поясничного межтелового спондилодеза кейджем T-pal (Synthes, Швейцария) и унилатеральной транспедикулярной стабилизацией винтовой системой Viper II (Synthes, Швейцария). Для открытой задней декомпрессии использовали билатеральные ранорасширители Егорова (Россия) и Caspar (Германия), межтеловой спондилодез осуществляли кейджем Pezo-T (Ulrich, Германия) и установкой четырехвинтовой системы «Конмет» (Россия). Для проведения транспедикулярной стабилизации использованы стандартные хирургические приемы и подходы.

### *Анализ в подгруппах*

Группу I (основная группа, ОГ; n=100) составили пациенты, прооперированные с использованием нового метода задней поясничной фиксации, заключающегося в одно- или двусторонней имплантации титанового кейджа Facet Wedge в суставную щель фасеточного сустава в комбинации с передним, боковым или задним трансфораминальным межтеловым спондилодезом.

Группу II (группа клинического сравнения, ГКС; n=45) составили пациенты, отобранные ретроспективно случайным способом. Пациенты соответствовали всем критериям включения и исключения и были прооперированы ранее по тем же показаниям, но с использованием методики открытой транспедикулярной фиксации системой «Конмет» (Россия) в комбинации с задним межтеловым спондилодезом.

### *Продолжительность исследования*

В группе I оценивали значения клинических параметров до операции, при выписке и при контрольных обследованиях, рекомендованных через 3, 6, 12, 18 мес после вмешательства. Медиана наблюдения в группе I составила 20 (18; 22) мес, в группе II — 42 (36; 52) мес.

### *Описание медицинского вмешательства*

Пациенты группы I в зависимости от способа хирургической коррекции были разделены на 3 подгруппы:

- IA (ALIF) — 28 пациентов, прооперированных методом переднего ретроперитонеального межтелового спондилодеза кейджем Synster ALIF (Корея) с двусторонней фасеточной фиксацией Facet Wedge;
- IБ (DLIF) — 31 пациент, прооперированный методом бокового ретроперитонеального межтелового спондилодеза кейджем Oracle с билатеральной фасеточной фиксацией Facet Wedge;
- IB (TLIF) — 41 пациент, в хирургической коррекции которых использована методика трансфораминального межтелового спондилодеза кейджем T-pal (Synthes, Швейцария) с унилатеральной транспедикулярной стабилизацией винтовой системой Viper II (Synthes, Швейцария) и фасеточной фиксацией Facet Wedge с контрлатеральной стороны.

В первой и второй подгруппах после этапа декомпрессии осуществляли переворот пациента на живот с последующим выполнением этапа задней поясничной фиксации.

В группе ретроспективного анализа выполняли реконструкцию позвоночного канала из срединного доступа в виде ламинэктомии с одно- или двусторонней частичной или полной фасетэктомией, с последующим задним межтеловым спондилодезом кейджем Pezo-T (Ulrich, Германия) и четырехвинтовой транспедикулярной стабилизацией системой «Конмет» (Россия).

Во всех случаях хирургические манипуляции осуществлялись на одном позвоночно-двигательном сегменте, одной хирургической бригадой. Вмешательства проводились под внутривенным обезболиванием с искусственной вентиляцией легких. Этапы операции осуществлялись под флюороскопическим контролем С-дуги (Philips, Голландия) и видеорегистрацией.

### *Исходы исследования*

#### Основной исход исследования

Эффективная стабилизация оперированного сегмента при помощи фасеточной фиксации имплантатом Facet Wedge при низкой травматичности вмешательства.

#### Дополнительные исходы исследования

Исследовали технические особенности оперативного вмешательства: продолжительность операции, объем кровопотери, сроки госпитализации и время активизации.

### *Методы регистрации исходов*

Оценку клинической эффективности проводили на основании изучения выраженности болевого синдрома по визуально-аналоговой шкале боли; уровня качества жизни, связанного с проблемой в спине, по индексу Освестри (Oswestry Disability Index, ODI), удовлетворенно-

сти результатом оперативного лечения по шкале Macnab и хирургических осложнений [17].

### *Этическая экспертиза*

Исследование одобрено Этическим комитетом ИГМУ; каждый из включенных в исследование пациентов дал письменное информированное согласие.

### *Статистический анализ*

**Принципы расчета размера выборки**

Для обнаружения минимального клинически значимого различия в уровне качества жизни по классификации Освестри в 10 баллов и при стандартном отклонении равном 15, 80% мощности исследования и статистической значимости ($p$) 5% достаточно 37 наблюдений в группе.

**Методы статистического анализа данных**

Статистическая обработка результатов исследования проведена с использованием программ Microsoft Excel и Statistica 8,0. Для оценки значимости различий выборочных совокупностей использованы критерии непараметрической статистики, в качестве нижней границы достоверности принят уровень $p<0,05$. Данные представлены медианой и интерквартильным размахом в виде Me (25; 75). Статистическая значимость различий установлена для повторных измерений (спустя 3, 6, 12 и 18 мес после операции), с учетом поправки Бонферрони, при $p<2,5\%$. Использованы критерии непараметрической статистики: Манна–Уитни (M-U) для межгруппового сравнения, критерий Вилкоксона (W) для зависимых выборок, хи-квадрат Пирсона ($\chi^2$) для биноминальных признаков.



## Результаты

### *Объекты (участники) исследования*

Общие сведения о пациентах исследуемых групп представлены в табл. 1: отмечены преимущественно лица мужского пола, двух периодов зрелого возраста (35–60 лет), повышенного питания (индекс массы тела >25 кг/м$^2$). При проведении сравнительного анализа между группами исследуемых пациентов по полу ($p=0,64$), возрасту ($p=0,42$) и конституциональным особенностям ($p=0,28$) статистически значимых различий не выявлено (см. табл. 1).

При осуществлении межгруппового сравнения уровня болевого синдрома по визуальной аналоговой шкале ($p=0,36$) и качества жизни по индексу Освестри ($p=0,62$) установлено, что дооперационные показатели статистически значимо не отличались.

### *Основные результаты исследования*

После операции у пациентов обеих групп отмечено существенное уменьшение интенсивности болевого синдрома. В группе I: с 70 (65,5; 80) до 24 мм (23,5; 36) при выписке и до 4 мм (2; 6) через 18 мес после операции ($p<0,001$) для подгруппы IA; с 79 (75; 85) до 15 (14; 16) и 3,5 мм (2; 6) ($p<0,001$) для подгруппы IБ; с 82 (78; 85) до 15 (14; 16) и 3 мм (2; 4) соответственно ($p<0,001$) для подгруппы IB; в группе II: с 84 (74;92) до 21 мм (16; 28) при выписке и до 15 мм (12; 18) в отдаленном послеоперационном периоде ($p<0,001$) (рис. 1).

На момент выписки из стационара и в течение всего периода наблюдения (Me 18 мес) в группе I отмечен статистически значимо меньший уровень болевого синдрома ($p<0,05$; см. рис. 1).

Оценка уровня качества жизни пациентов по индексу ODI позволила выявить позитивную динамику функционального состояния после операции по сравнению с дооперационным уровнем. В группе I: с 66 (63; 68) до 24 баллов (22; 30) при выписке и 8 баллов (6; 8) в отдаленном послеоперационном периоде ($p<0,001$) для подгруппы IA; с 68 (62; 74) до 20 (20; 22) и 8 баллов (6; 8) ($p<0,001$) для подгруппы IБ; с 74 (66; 78) до 22 (20; 24) и 8 баллов (6; 8) соответственно ($p<0,001$) для подгруппы IB; в группе II: с 75 (60; 85) до 30 баллов (24; 36) при выписке и 23 баллов (20; 28) через 18 мес после операции ($p<0,001$) (рис. 2).

При сравнительной оценке качества жизни пациентов по индексу Освестри на момент выписки из стационара и в катамнезе (в среднем 18 мес) в группе I отмечены статистически значимо лучшие показатели уровня качества жизни пациентов ($p<0,05$; см. рис. 2).

При субъективной оценке пациентами результата хирургического лечения по шкале Macnab через 18 мес после операции в группе I получены преимущественно отличные и хорошие послеоперационные исходы, неудовлетворительных — не наблюдалось; в группе II выявлены в основном хорошие и удовлетворительные исходы, в 4 случаях (9%) диагностирован неудовлетворительный результат (рис. 3).

Анализ трудовой реабилитации в группе I показал, что 64 (64%) пациента вернулись к прежней работе спустя 2 мес после операции, 20 (20%) прооперированных были переведены на легкий труд через 2 мес после операции и спустя 6 мес полностью восстановили прежнюю трудоспособность; 15 (15%) респондентов, являясь пенсионерами, вернулись к обычному ритму жизни в сроки от 4 до 6 мес после операции.

**Таблица 1.** Распределение исследуемых пациентов по группам в зависимости от способа хирургической коррекции

| Признак | | Группа I, n=100 | | | Группа II, n=45 | $p$* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | IA (ALIF) n=28 | IБ (DLIF) n=31 | IB (TLIF) n=41 | | |
| Возраст, лет, Me | | 38 (30; 46) | 39 (32; 49) | 43 (38; 52) | 38 (32; 44) | 0,42 |
| Пол | Мужской пол, n (%) | 21 (75) | 22 (71) | 31 (75) | 33 (73) | 0,64 |
| | Женский пол, n (%) | 7 (25) | 9 (29) | 10 (25) | 12 (27) | |
| Индекс массы тела, кг/м$^2$, Me | | 26,4 (23,1; 29,4) | 26,8 (23,5; 29,7) | 27,1 (22,5; 30,1) | 25,8 (22,9; 29,1) | 0,28 |

*Примечание*. * — доверительная вероятность анализировалась между средними значениями всех подгрупп основной группы и данными группы клинического сравнения.

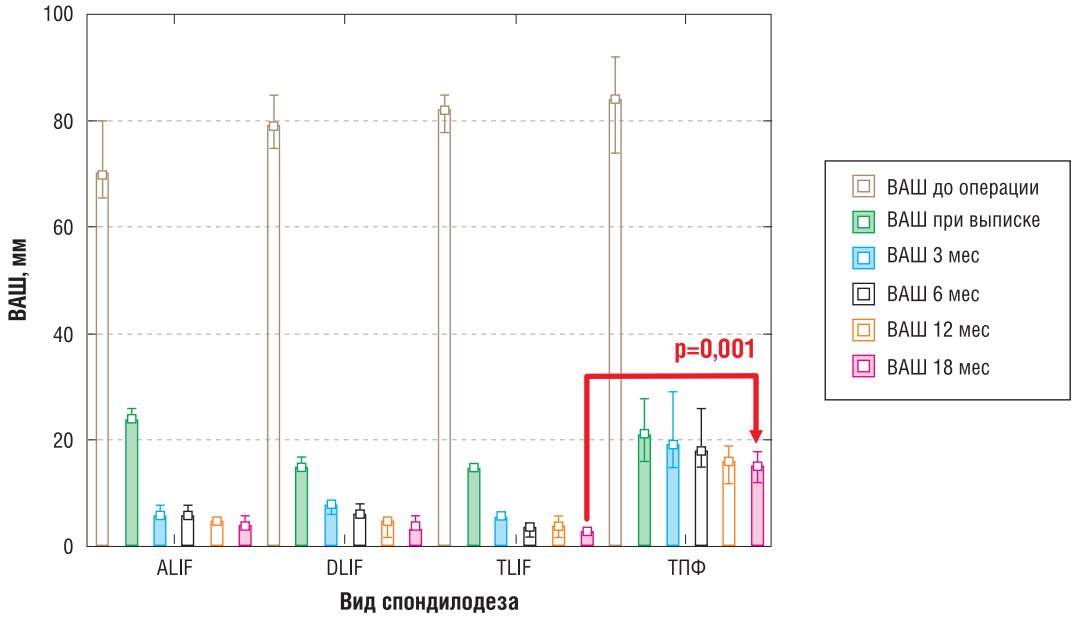



**Рис. 1.** Динамика уровня болевого синдрома по визуально-аналоговой шкале (ВАШ) среди пациентов исследуемых групп

*Примечание.* ALIF – передний поясничный межтеловой спондилодез, DLIF – боковой поясничный межтеловой спондилодез, TLIF – трансфораминальный поясничный межтеловой спондилодез, ТПФ – транспедикулярная фиксация.



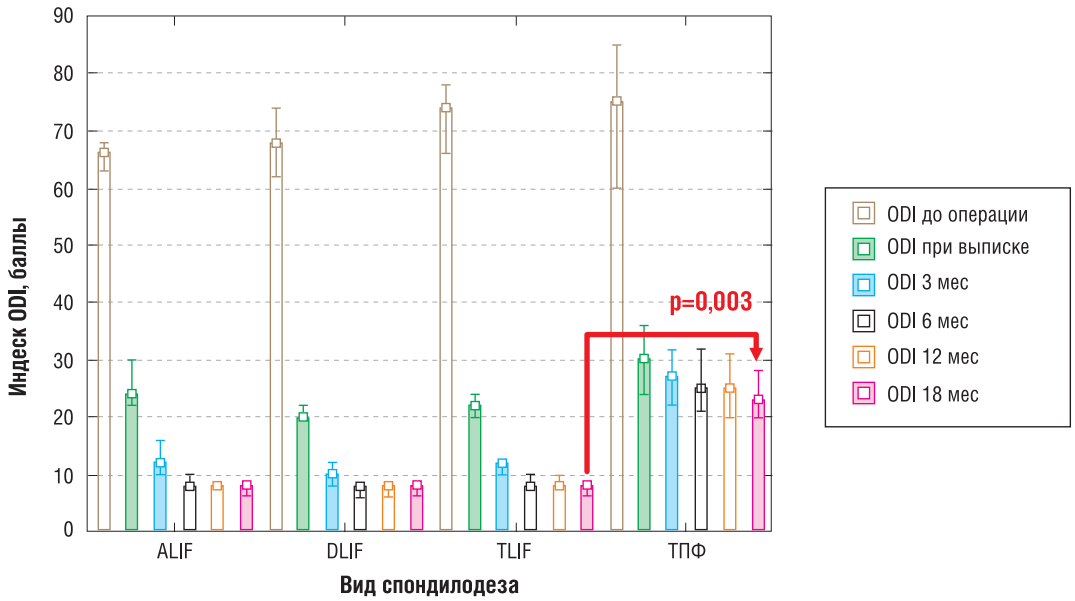



**Рис. 2.** Динамика функционального состояния пациентов по индексу ODI среди пациентов исследуемых групп

*Примечание.* ALIF – передний поясничный межтеловой спондилодез, DLIF – боковой поясничный межтеловой спондилодез, TLIF – трансфораминальный поясничный межтеловой спондилодез, ТПФ – транспедикулярная фиксация.

В группе II установлено, что к прежней работе спустя 3 мес после операции вернулось 8 (18%) человек, перешли на легкий труд через 3 мес и восстановили свою работоспособность в сроки от 6 до 12 мес 26 (58%) пациентов; 7 (15%) респондентов, являясь пенсионерами, вернулись к обычному ритму жизни в сроки от 6 до 12 мес после операции. Четверо (9%) пациентов трудоспособного возраста, учитывая сохраняющийся болевой синдром, связанный с рубцово-спаечным интраканальным патологическим процессом, не смогли восстановить трудоспособность и получили группу инвалидности.

### *Дополнительные результаты исследования*

Сводные данные о продолжительности операции, объеме кровопотери, времени активизации и сроках госпитализации представлены в табл. 2. При сравнительном анализе установлено, что исследуемые параметры были статистически значимо меньше в группе I, чем в группе II. Так, фасеточная фиксация в комбинации со спондилодезом может быть осуществлена в среднем на 40% быстрее [125 (90; 140) мин в группе I и 205 (160; 220) мин в группе II ($p$=0,01)] и менее травматичным доступом, чем транспедикулярная фиксация, что обеспечивает возможность безопасной ранней активизации пациентов и сокращение сроков пребывания в стационаре (см. табл. 2).

### *Нежелательные явления*

В ходе исследования в обеих группах не обнаружено неблагоприятных последствий, связанных с непосредственной установкой стабилизирующих конструкций.

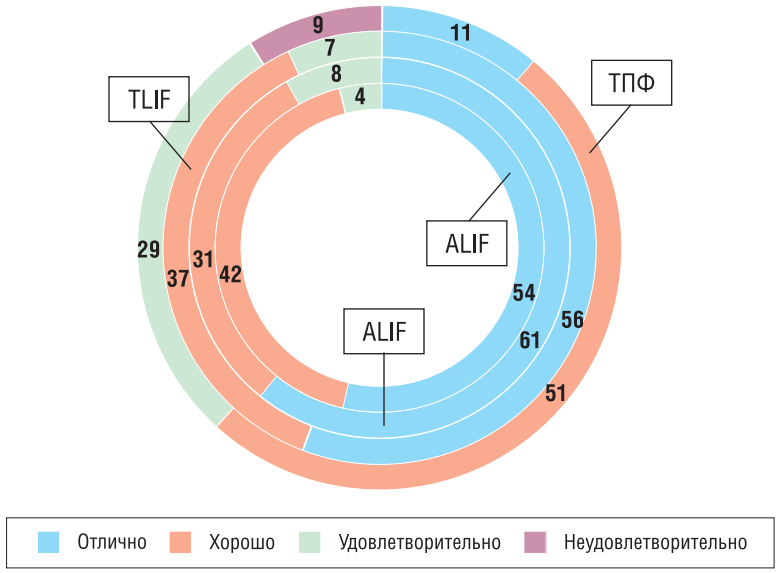



**Рис. 3.** Субъективная удовлетворенность проведенной операцией по шкале Macnab (в %) через 18 мес после операции среди пациентов исследуемых групп

*Примечание.* ALIF – передний поясничный межтеловой спондилодез, DLIF – боковой поясничный межтеловой спондилодез, TLIF – трансфораминальный поясничный межтеловой спондилодез, ТПФ – транспедикулярная фиксация.



**Таблица 2.** Характеристика пациентов по операционным критериям

| Исследуемые параметры | Группа I, n=100 | | | Группа II, n=45 | *p* |
|---|---|---|---|---|---|
| | IA (ALIF) n=28 | IБ (DLIF) n=31 | IB (TLIF) n=41 | | |
| Длительность операции, мин | 145 (90; 160) | 135 (95; 140) | 150 (90; 175) | 205 (160; 220) | 0,01 |
| Объем кровопотери, мл | 75 (65; 135) | 80 (70; 140) | 90 (65; 150) | 350 (300; 550) | 0,008 |
| Время активизации, сут | 2 (2; 3) | 2 (1; 2) | 2 (1; 3) | 4 (3; 5) | 0,02 |
| Сроки госпитализации, сут | 10 (10; 12) | 10 (9; 11) | 10 (10; 11) | 13 (12; 15) | 0,03 |

При сравнительном анализе количества послеоперационных осложнений их статистически значимо большее число выявлено в группе II ($p$=0,0012).

В группе I верифицировано 13 (13%) осложнений: 2 (2%) интраоперационных (краевое ранение подвздошной вены при переднем доступе и дуротомия при трансфораминальном подходе, в обоих случаях микрохирургическая техника позволила восстановить анатомическую герметичность поврежденных анатомических структур); 5 (5%) — в раннем послеоперационном периоде (диагностировано формирование межмышечной гематомы, из них в 2 случаях выявлены признаки локальной инфекции на фоне субкомпенсированного сахарного диабета; дренирование и использование местных антисептиков способствовали ликвидации инфекционного процесса, что не повлияло на стандартные сроки заживления послеоперационной раны); 6 (6%) — при оценке отдаленных результатов (из них в 3 случаях верифицировано значимое прогрессирование дегенеративного процесса в смежном с операцией сегменте при отсутствии клинических данных за компрессию невральных структур, при этом проведенное консервативное лечение позволило улучшить состояние пациентов). В 2 случаях возник рецидив болевого синдрома при отсутствии рентгенологических признаков сужения межпозвонковых отверстий и позвоночного канала, а также признаков сегментарной нестабильности. Возникшие клинические ситуации расценены как явления послеоперационного рубцово-спаечного эпидурита. При этом повторные курсы консервативной терапии позволили снизить уровень болевого синдрома до минимальных значений. В 1 случае после хирургической коррекции методом бокового ретроперитонеального межтелового спондилодеза кейджем Oracle с билатеральной фасеточной фиксацией Facet Wedge через 5 мес после операции пациент упал с высоты трех метров, что привело к несостоятельности фасеточной фиксации с обеих сторон. Были выполнены удаление фасеточных винтов и билатеральная четырехвинтовая открытая транспедикулярная фиксация с положительным клиническим эффектом.

В группе II отмечено 14 (31%) осложнений: в 3 (7%) интраоперационных случаях наблюдалось ятрогенное повреждение твердой мозговой оболочки дурального мешка (выполнено микрохирургическое ушивание дефекта твердой мозговой оболочки с дополнительной аппликацией фибриновым клеем); 4 (9%) — в раннем послеоперационном периоде (в 3 случаях определена инфекция мягких тканей в связи с появлением признаков инфицирования гематомы: ликвидации инфекцион-

ного процесса способствовали дренирование послеоперационной раны и местная антибактериальная терапия; в 1 случае в связи с неправильным восстановлением биомеханики произошла перегрузка дугоотросчатых суставов на смежном с операцией уровне с формированием билатерального фасет-синдрома: после исключения другого генеза болевого синдрома выполнена радиочастотная денервация фасеточных суставов с полным регрессом симптоматики); 7 (16%) — в отдаленном периоде (у 2 пациентов рецидив болевого синдрома был обусловлен формированием грыжи диска в смежных сегментах на фоне прогрессирования дегенеративного процесса, в связи с чем было выполнено ревизионное оперативное вмешательство). Еще у 5 пациентов в отдаленном послеоперационном периоде (4–8 мес) рецидив корешковой симптоматики был обусловлен формированием послеоперационного перидурального фиброза при отсутствии рентгенологических признаков сужения межпозвонковых отверстий и позвоночного канала, а также признаков сегментарной нестабильности по результатам мультиспиральной компьютерной томографии с миелографией. И в этих случаях курсы консервативной терапии позволили значительно снизить уровень болевого синдрома.

## Обсуждение

***Резюме основного результата исследования***

Методика фасеточной фиксации имплантатом Facet Wedge в комбинации с передним, боковым и задним трансфораминальным межтеловым спондилодезом при лечении пациентов с дегенеративными заболеваниями поясничного отдела позвоночника позволяет значимо улучшить функциональное состояние пациентов, что подтверждается минимальным количеством баллов по индексу ODI и низким уровнем болевого синдрома по визуально-аналоговой шкале боли в раннем и отдаленном операционных периодах.

При сравнительном анализе в основной группе выявлены значимо лучшие результаты по продолжительности операции [ОГ 125 (90; 140) мин, ГКС 205 (160; 220) мин; $p$=0,01], объему кровопотери [ОГ 80 (70; 120) мл, ГКС 350 (300; 550) мл; $p$=0,008], времени активизации [ОГ 2 (1; 2) дн., ГКС 4 (3; 5) дн.; $p$=0,02], срокам госпитализации [ОГ 9 (10; 11) дн., ГКС 13 (12; 15) дн.; $p$=0,03], уровню болевого синдрома по визуальной аналоговой шкале [ОГ 3 (2; 4) мм, ГКС 15 (12; 18) мм; $p$=0,001], качеству жизни (по индексу Освестри) [ОГ 8 (6; 8) баллов, ГКС 23 (20; 28) балла; $p$=0,003] и трудовой реабилитации [ОГ 3 (2; 6) мес, ГКС 9 (6; 12) мес; $p$=0,0001]. Количество послеоперационных осложнений в группе I составило 13%, в группе II — 31% ($p$=0,0012).

Использование фасеточной фиксации имплантатом Facet Wedge при низкой операционной травме позволяет добиться эффективной стабилизации оперированного сегмента, что способствует безопасному проведению ранней активизации пациентов, уменьшению рисков интра- и послеоперационных осложнений, ранней полноценной социальной и физической реабилитации пациентов в сравнении с традиционной методикой открытой транспедикулярной стабилизации.

***Обсуждение основного результата исследования***

Полная физическая и социальная реабилитация пациентов после операций на позвоночном столбе и структурах позвоночного канала вошла в мировые специальные центры как обязательный критерий эффективности лечения. Результаты выполненной работы направлены на обеспечение условий к созданию стандартов лечения пациентов с проблемами позвоночника на основе проведенных исследований.

Этапы прямой и непрямой декомпрессии нервных структур и эффективная стабилизация оперированного сегмента являются необходимыми условиями при лечении пациентов с дегенеративными заболеваниями поясничного отдела позвоночника [18–20]. Значительная интраоперационная травма, а также относительно высокий риск развития ранних и отдаленных нежелательных последствий в виде рестеноза позвоночного канала, несостоятельности формирования костного блока являются частыми осложнениями открытой транспедикулярной стабилизации [1, 5, 21]. Исходы контрольной группы нашего исследования подтверждают литературные данные. Результаты применения фасеточной фиксации приводят к значимо меньшей интраоперационной травме и меньшему числу осложнений при схожем качестве замыкания оперируемых сегментов.

Использование методики чрескожной транспедикулярной стабилизации способствовало улучшению результатов оперативных вмешательств за счет меньшего повреждения паравертебральной мускулатуры [22]. Но при этом даже перкутанное проведение винта через ножку позвонка создает высокие риски интраканальных повреждений при его мальпозиции, а длительное сдавление окружающих мягких тканей тубулярным ретрактором способствует развитию мышечной атрофии и раневой инфекции [23–25]. Кроме того, закрытое проведение транспедикулярных винтов требует знаний специфической трехмерной анатомии для исключения интраканальных повреждений [26]. Для уменьшения таких осложнений используются интраоперационные навигационные системы, робототехника и нейрофизиологический мониторинг [27–29]. Тем не менее даже применение вышеперечисленных способов не позволяет во всех случаях избежать рисков повреждения содержимого позвоночного канала [30]. Кроме того, современное оборудование требует значительных экономических затрат — на приобретение, содержание, обучение медицинского персонала работе с ним [31]. В отличие от транспедикулярной фиксации фасеточная фиксация кейджем не несет значительных рисков повреждения интраканальных структур, так как осуществляется вне проекции от позвоночного канала структуры. Данная методика не требует обязательного наличия навигации и нейрофизиологического мониторинга.

Среди различных способов выполнения фасеточной фиксации [14, 15] используемая нами методика является, пожалуй, наиболее безопасной и сопряженной с меньшими рисками интраканальных повреждений, при этом жесткость фиксации является сопоставимой с транспедикулярной стабилизацией [23, 32].

В нашем исследовании использовалась комбинированная дорзальная стабилизация в виде одно- или двусторонней фасеточной фиксации в комбинации с передним, боковым и трансфораминальным межтеловым спондилодезом. Изучалась клиническая эффективность симультантной прямой и непрямой декомпрессии различными доступами с установкой имплантата Facet Wedge как универсальной системы стабилизации. Особенности данной конструкции позволяют выполнять фиксацию исключительно фасеточных суставов без необходимости внедрения имплантата в переднюю опорную колонну, что снижает возможные риски ин-

траканальных повреждений невральных структур при установке других погружных систем, в том числе транспедикулярных винтов. Это обстоятельство также делает возможным создание условий для менее ригидной стабилизации заднего опорного комплекса, что наряду с малой травматичностью методики фиксации позволяет предупредить развитие дегенерации в смежных позвоночно-двигательных сегментах и снизить ятрогенное повреждение мышечно-связочного аппарата.

В базе данных Pubmed и русскоязычной литературе авторами не обнаружено исследований, посвященных оценке клинических результатов применения фасеточной фиксации Facet Wedge. При этом изучение биомеханической эффективности вышеупомянутого имплантата на кадаверах свидетельствует о сопоставимости в стабильности сегментов по сравнению с транспедикулярной стабилизацией и биомеханических преимуществах перед трансламинарной фасеточной фиксацией [33–35].

В настоящем исследовании мы не получили принципиальных различий с данными, представленными в литературе, в клинических исходах и наличии осложнений после фасеточной фиксации по Magerl [15] и межтелового спондилодеза из переднего [24, 36, 37], бокового [38, 39] и трансфораминального [40–42] доступов.

Нами получены различия в ранних послеоперационных исходах по уровню болевого синдрома, что обусловлено меньшей инвазивностью вмешательства и операционной травмой паравертебральных мягких тканей. Полученные результаты исследования меньшего уровня болевого синдрома и лучшего качества жизни пациентов группы I, оперированных с использованием новой минимально инвазивной методики фасеточной фиксации, может быть связано с сохранением функционального состояния заднего мышечно-связочного комплекса и меньшей выраженностью интраканальных рубцово-спаечных изменений.



***Ограничения исследования***

Ограничением данного исследованиями является лимитированная продолжительность наблюдения (18 мес), что не позволяет во всех случаях оценить формирование спондилодеза в оперированном позвоночно-двигательном сегменте и степень дегенерации смежных с оперированным сегментов у всех пациентов.

Исследование проведено в одном хирургическом центре одной хирургической бригадой, не являлось рандомизированным мультицентровым.

## Заключение

Технология установки фасеточного кейджа достаточно проста, является универсальной для стабилизации заднего опорного комплекса после межтелового спондилодеза из переднего, бокового и заднего доступа, а также не требует интраоперационного применения дорогостоящего высокотехнологичного оборудования.

Использование фасеточной фиксации в комбинации с межтеловым спондилодезом позволяет достичь лучших клинических исходов, снизить число послеоперационных осложнений в раннем и отдаленном периодах наблюдения (18 мес) в сравнении с традиционной методикой транспедикулярной стабилизации.

Сочетание малой травматичности методики фасеточной фиксации и менее «агрессивной» задней стабилизации оперированного сегмента создает благоприятные условия для более раннего восстановления функционального состояния пациентов, полноценной социальной и физической реабилитации по сравнению с традиционной методикой транспедикулярной стабилизации.

## Источник финансирования

Оригинальное исследование проведено в рамках научной программы, поддержанной грантом Российского научного фонда (проект № 15-15-30037).

## Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бывальцев В.А., Калинин А.А., Белых Е.Г. и др. Оптимизация результатов лечения пациентов с сегментарной нестабильностью поясничного отдела позвоночника при использовании малоинвазивной методики спондилодеза // *Вопросы нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко*. — 2015. — Т.79. — №3 — С. 45–54. [Byvaltsev VA, Kalinin AA, Belykh EG, et al. Optimization of segmental lumbar spine instability treatment using minimally invasive spinal fusion technique. *Zh Vopr Neirokhir Im N N Burdenko*. 2015;79(3):45–54. (In Russ).]
2. Коновалов Н.А., Шевелев И.Н., Корниенко В.Н., Назаренко А.Г. Клинико-диагностическая оценка выраженности дегенеративного поражения пояснично-крестцового отдела позвоночника // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. — 2009. — №1 — С. 16–21. [Konovalov NA, Shevelev IN, Kornienko VN, Nazarenko AG. Kliniko-diagnosticheskaya otsenka vyrazhennosti degenerativnogo porazheniya poyasnichno-kresttsovogo otdela pozvonochnika. *Annaly klinicheskoi i eksperimental'noi nevrologii*. 2009;(1):16–21. (In Russ).]
3. Masferrer R, Gomez CH, Karahalios DG, Sonntag VK. Efficacy of pedicle screw fixation in the treatment of spinal instability and failed back surgery: a 5-year review. *J Neurosurg*. 1998;89(3):371–377. doi: 10.3171/jns.1998.89.3.0371.
4. Park Y, Ha JW. Comparison of one-level posterior lumbar interbody fusion performed with a minimally invasive approach or a traditional open approach. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2007;32(5):537–543. doi: 10.1097/01.brs.0000256473.49791.f4.
5. Крутько А.В. Сравнительный анализ результатов заднего межтелового спондилодеза (PLIF) и трансфораминального межтелового спондилодеза (TLIF) в сочетании с транспедикулярной фиксацией // *Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова*. — 2012. — №1. — С. 12–21. [Krutko AV. Comparative analysms of posterior interbody fusion and transforaminal interbody fusion in combination with transpedicular fixation. *Vestnik travmatologii i ortopedii imeni N.N. Priorova*. 2012;(1):12–21. (In Russ).]
6. Logroscino CA, Proietti L, Pola E, et al. A minimally invasive posterior lumbar interbody fusion for degenerative lumbar spine instabilities. *Eur Spine J*. 2011;20 Suppl 1:S41–45. doi: 10.1007/s00586-011-1762-1.
7. Thalgott JS, Chin AK, Ameriks JA, et al. Minimally invasive 360 degrees instrumented lumbar fusion. *Eur Spine J*. 2000;9 Suppl 1:S51–56. doi: 10.1007/pl00010022.

8. Blumenthal S, Gill K. Complications of the Wiltse pedicle screw fixation system. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1993;18(13):1867–1871. doi: 10.1097/00007632-199310000-00024.
9. France JC, Yaszemski MJ, Lauerman WC, et al. A randomized prospective study of posterolateral lumbar fusion. Outcomes with and without pedicle screw instrumentation. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1999;24(6):553–560. doi: 10.1097/00007632-199903150-00010.
10. Jose-Antonio SS, Baabor-Aqueveque M, Silva-Morales F. Philosophy and concepts of modern spine surgery. *Acta Neurochir Suppl*. 2011;108:23–31. doi: 10.1007/978-3-211-99370-5_5.
11. Son S, Lee SG, Park CW, Kim WK. Minimally invasive multilevel percutaneous pedicle screw fixation for lumbar spinal diseases. *Korean J Spine*. 2012;9(4):352–357. doi: 10.14245/kjs.2012.9.4.352.
12. Regev GJ, Lee YP, Taylor WR, et al. Nerve injury to the posterior rami medial branch during the insertion of pedicle screws: comparison of mini-open versus percutaneous pedicle screw insertion techniques. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2009;34(11):1239–1242. doi: 10.1097/BRS.0b013e31819e2c5c.
13. Ringel F, Stoffel M, Stuer C, Meyer B. Minimally invasive transmuscular pedicle screw fixation of the thoracic and lumbar spine. *Neurosurgery*. 2006;59(4Suppl2):ONS361–366. doi: 10.1227/01.NEU.0000223505.07815.74.
14. Boucher HH. A method of spinal fusion. *J Bone Joint Surg Br*. 1959;41–B(2):248–259.
15. Magerl FP. Stabilization of the lower thoracic and lumbar spine with external skeletal fixation. *Clin Orthop Relat Res*. 1984;(189):125–141. doi: 10.1097/00003086-198410000-00014.
16. Fujiwara A, Lim TH, An HS, et al. The effect of disc degeneration and facet joint osteoarthritis on the segmental flexibility of the lumbar spine. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2000;25(23):3036–3044. doi: 10.1097/00007632-200012010-00011.
17. Бывальцев В.А., Сороковиков В.А., Белых Е.Г., Арсентьева Н.И. Использование шкал и анкет в вертебрологии // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. — 2011. — Т.111. — № 9–2 — С. 51–56. [Byval'tsev VA, Sorokovikov VA, Belykh EG, Arsent'eva NI. The use of scales and questionnaires in vertebrology. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*. 2011;111(9–2):51–56. (In Russ).]
18. Belykh E, Giers MB, Preul MC, et al. Prospective comparison of microsurgical, tubular-based endoscopic, and endoscopically assisted diskectomies: clinical effectiveness and complications in railway workers. *World Neurosurg*. 2016;90:273–280. doi: 10.1016/j.wneu.2016.02.047.
19. Schwender JD, Holly LT, Rouben DP, Foley K.T. Minimally invasive transforaminal lumbar interbody fusion (TLIF): technical feasibility and initial results. *J Spinal Disord Tech*. 2005;18:S1–6. doi: 10.1097/01.bsd.0000132291.50455.d0.
20. Jacobs RR, Montesano PX, Jackson RP. Enhancement of lumbar spine fusion by use of translaminar facet joint screws. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1989;14(1):12–15. doi: 10.1097/00007632-198901000-00003.
21. Калинин А.А., Бывальцев В.А. Взаимосвязь спондилометрических параметров с клиническим исходом хирургического лечения дегенеративного спондилолистеза при многоуровневых поражениях поясничных межпозвонковых дисков // *Хирургия позвоночника*. — 2015. — Т.12. — №4 — С. 56–62. [Kalinin AA, Byvaltsev VA. Relationship between vertebral metric parameters and outcome of surgical treatment of degenerative spondylolisthesis with multilevel lumbar intervertebral disc lesions. *Spine surgery*. 2015;12(4):56–62. (In Russ).]
22. Weber BR, Grob D, Dvorak J, Muntener M. Posterior surgical approach to the lumbar spine and its effect on the multifidus muscle. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1997;22(15):1765–1772. doi: 10.1097/00007632-199708010-00017.
23. Reich SM, Kuflik P, Neuwirth M. Translaminar facet screw fixation in lumbar spine fusion. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1993;18(4):444–449. doi: 10.1097/00007632-199318040-00007.
24. Moore KR, Pinto MR, Butler LM. Degenerative disc disease treated with combined anterior and posterior arthrodesis and posterior instrumentation. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2002;27(15):1680–1686. doi: 10.1097/00007632-200208010-00018.
25. Parker SL, Adogwa O, Witham TF, et al. Postoperative infection after minimally invasive versus open transforaminal lumbar interbody fusion (TLIF): literature review and post analysis. *Minim Invasive Neurosurg*. 2011;54(1):33–37. doi: 10.1055/s-0030-1269904.
26. Mohi Eldin MM, Hassan AS. Percutaneous transpedicular fixation: technical tips and pitfalls of sextant and pathfinder systems. *Asian Spine J*. 2016;10(1):111–122. doi: 10.4184/asj.2016.10.1.111.
27. Lieberman JA, Lyon R, Feiner J, et al. The efficacy of motor evoked potentials in fixed sagittal imbalance deformity correction surgery. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2008;33(13):E414–424. doi: 10.1097/BRS.0b013e318175c292.
28. Tian W, Han X, Liu B, et al. A robot-assisted surgical system using a force-image control method for pedicle screw insertion. *PLoS One*. 2014;9(1):e86346. doi: 10.1371/journal.pone.0086346.
29. Van de Kelft E, Costa F, Van der Planken D, Schils F. A prospective multicenter registry on the accuracy of pedicle screw placement in the thoracic, lumbar, and sacral levels with the use of the O-arm imaging system and StealthStation Navigation. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2012;37(25):E1580–1587. doi: 10.1097/BRS.0b013e318271b1fa.
30. Jutte PC, Castelein RM. Complications of pedicle screws in lumbar and lumbosacral fusions in 105 consecutive primary operations. *Eur Spine J*. 2002;11(6):594–598. doi: 10.1007/s00586-002-0469-8.
31. Al-Khouja L, Shweikeh F, Pashman R, et al. Economics of image guidance and navigation in spine surgery. *Surg Neurol Int*. 2015;6(Suppl 10):S323–326. doi: 10.4103/2152-7806.159381.
32. Tuli SK, Eichler ME, Woodard EJ. Comparison of perioperative morbidity in translaminar facet versus pedicle screw fixation. *Orthopedics*. 2005;28(8):773–778.
33. Shao RX, Luo P, Lin Y, et al. [Treatment of low lumbar degenerative disease with unilateral pedicle screw combined with contralateral percutaneous transfacet screws fixation. (In Chinese).] *Zhongguo Gu Shang*. 2015;28(4):318–322.
34. Hartensuer R, Riesenbeck O, Schulze M, et al. Biomechanical evaluation of the Facet Wedge: a refined technique for facet fixation. *Eur Spine J*. 2014;23(11):2321–2329. doi: 10.1007/s00586-014-3533-2.
35. Beaubien BP, Mehbod AA, Kallemeier PM, et al. Posterior augmentation of an anterior lumbar interbody fusion: minimally invasive fixation versus pedicle screws in vitro. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2004;29(19):E406–412. doi: 10.1097/01.brs.0000141187.53366.9b.
36. Jang JS, Lee SH, Lim SR. Guide device for percutaneous placement of translaminar facet screws after anterior lumbar interbody fusion. Technical note. *J Neurosurg Spine*. 2003;98(1):100–103. doi: 10.3171/spi.2003.98.1.0100.
37. Shim CS, Lee SH, Jung B, et al. Fluoroscopically assisted percutaneous translaminar facet screw fixation following anterior lumbar interbody fusion: technical report. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2005;30(7):838–843. doi: 10.1097/01.brs.0000157473.17313.6f.
38. Rhee JW, Petteys RJ, Anaizi AN, et al. Prospective evaluation of 1-year outcomes in single-level percutaneous lumbar transfacet screw fixation in the lateral decubitus position following lateral transpsoas interbody fusion. *Eur Spine J*. 2015;24(11):2546–2554. doi: 10.1007/s00586-015-3934-x.
39. Voyadzis JM, Anaizi AN. Minimally invasive lumbar transfacet screw fixation in the lateral decubitus position after extreme lateral interbody fusion: a technique and feasibility study. *J Spinal Disord Tech*. 2013;26(2):98–106. doi: 10.1097/BSD.0b013e318241f6c3.
40. Xu J, Mao K, Wang Y, et al. [A feasibility research of minimally invasive transforaminal lumbar interbody fusion using unilateral incision and hybrid internal fixation for dural-level lumbar degenerative disease . (In Chinese).] *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2013;27(8):955–959.

41. Jiang X, Feng Z, Liu F, et al. Transforaminal lumbar interbody fusion using unilateral pedicle screw fixation plus contralateral translaminar facet screw fixation in lumbar degenerative diseases. *Indian J Orthop*. 2014;48(4):374–379. doi: 10.4103/0019-5413.136240.

42. Mao KY, Wang Y, Xiao SH, et al. [A feasibility research of minimally invasive transforaminal lumbar interbody fusion (MIS-TLIF) using hybrid internal fixation for recurrent lumbar disc herniation. (In Chinese).] *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*. 2013;51(8):723–727.

## КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

***Бывальцев Вадим Анатольевич***, доктор медицинских наук, заведующий курсом нейрохирургии Иркутского государственного медицинского университета, главный нейрохирург ОАО «РЖД», руководитель центра нейрохирургии НУЗ «Дорожная клиническая больница на ст. Иркутск-Пассажирский» ОАО «РЖД», заведующий научно-клиническим отделом нейрохирургии и ортопедии Иркутского научного центра хирургии и травматологии, профессор кафедры травматологии, ортопедии и нейрохирургии Иркутской государственной медицинской академии последипломного образования
**Адрес**: 664082, Иркутск, ул. Боткина, д. 10, **тел**.: +7 (3952) 63-85-28, **e-mail**: byval75vadim@yandex.ru,
**SPIN-код**: 5996-6477, **ORCID**: http://orcid.org/0000-0003-4349-7101

***Калинин Андрей Андреевич***, кандидат медицинских наук, доцент курса нейрохирургии Иркутского государственного медицинского университета, врач нейрохирургического отделения НУЗ «Дорожная клиническая больница на ст. Иркутск-Пассажирский» ОАО «РЖД», научный сотрудник Иркутского научного центра хирургии и травматологии
**Адрес**: 664082, Иркутск, ул. Боткина, д. 10, **тел**.: +7 (3952) 63-85-28, **e-mail**: andrei_doc_v@mail.ru, **SPIN-код**: 9707-8291, **ORCID**: http://orcid.org/0000-0003-2707-0511

***Оконешникова Алёна Константиновна***, аспирант курса нейрохирургии Иркутского государственного медицинского университета
**Адрес**: 664003, Иркутск, ул. Красного Восстания, д. 14, **тел**.: +7 (951) 632-66-35, **e-mail**: alena-okoneshnikova@mail.ru, **ORCID**: http://orcid.org/0000-0003-1556-3095

***Керимбаев Талгат Тынышбаевич***, доктор медицинских наук, исследователь курса нейрохирургии Иркутского государственного медицинского университета
**Адрес**: 664003, Иркутск, ул. Красного Восстания, д. 14, **тел**.: +7 (951) 632-66-35, **e-mail**: kerimbaev_t@mail.ru, **ORCID**: http://orcid.org/0000-0002-0862-1747

***Белых Евгений Георгиевич***, ассистент курса нейрохирургии Иркутского государственного медицинского университета, научный сотрудник Иркутского научного центра хирургии и травматологии
**Адрес**: 664082, Иркутск, ул. Боткина, д. 10, **тел**.: +7 (3952) 63-85-28, **e-mail**: e.belykh@yandex.ru, **SPIN-код**: 4191-8687, **ORCID**: http://orcid.org/0000-0003-2060-5739

DOI: 10.15690/vramn669

**В.А. Шаркова[1], И.А. Ковалёв[1, 2], А.Ю. Шиванова[1]**

[1] Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток, Российская Федерация
[2] Краевой наркологический диспансер, Владивосток, Российская Федерация

# Мониторинг аутоантител к нейроспецифическим белкам при различных состояниях опийной наркомании

*Нервно-психические заболевания могут сопровождаться изменением иммунологических показателей, в том числе нарушениями идиотип-антиидиотипических балансов. Однако реакции с направленностью к нейроантигенам на основе определения идиотипических и антиидиотипических антител при различных состояниях наркозависимости не изучались.* ***Цель исследования****: проанализировать изменения идиотипических (аАТ1) и антиидиотипических (аАТ2) аутоантител к нейробелкам S100, ОБМ, ГФКП, ФРН при различных состояниях опийной наркомании — интоксикации, абстиненции и ремиссии. Определить прогностические критерии их влияния.* ***Пациенты и методы****. Обследовано 70 пациентов с диагнозом опийной наркомании, все — мужчины в возрасте 22–38 лет. В состоянии интоксикации — 24, в абстиненции — 24, в периоде ремиссии 21–28 дней — 22 человека. Контрольную группу составили здоровые лица (n=18). Обследование включало определение уровня идиотипических и антиидиотипических антител к нейробелкам (S100, ОБМ, ГФКП, ФРН) в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа.* ***Результаты****. В состоянии интоксикации сравнительный анализ уровня аутоантител к нейробелкам относительно группы контроля выявил статистически значимые различия только аАТ2 к ОБМ. В абстиненции выявлено повышение уровня аАТ1 к ГФКП, ОБМ (p⩽0,05); уровень аАТ2 к ГФКП и ФРН возрастает (p⩽0,05), к S100 и ОБМ — снижается (p⩽0,05). В ремиссии уровень аутоантител приближается к показателям интоксикации; информативно повышение аАТ2 к ФРН и аАТ2 к S100, ОБМ (p⩽0,05). Сравнительный анализ между разными состояниями опийной наркомании показал, что между стадиями интоксикации и ремиссии существует критериальная идентичность. Статистическая достоверность выявлена между стадиями интоксикации и абстиненции аАТ1 к ОБМ и аАТ2 к ФРН (увеличение в абстиненции) и между стадиями абстиненции и ремиссии — аАТ1 к ГФКП, ОБМ, аАТ2 к ГФКП (снижение в ремиссии), S100, ОБМ (увеличение в ремиссии).* ***Заключение****. Концентрация идиотипических и антиидиотипических антител к нейробелкам S100, ОБМ, ГФКП, ФРН может быть использована в качестве критерия различных состояний опийной зависимости при диагностике опийной наркомании.*

***Ключевые слова****: аутоантитела к нейробелкам S100, ОБМ, ГФКП, ФРН; опийная наркомания, иммунный ответ.*
(***Для цитирования****:* Шаркова В.А., Ковалёв И.А., Шиванова А.Ю. Мониторинг аутоантител к нейроспецифическим белкам при различных состояниях опийной наркомании. *Вестник РАМН.* 2016;71(5):385–391. doi: 10.15690/vramn669)



**V.A. Sharkova[1], I.A. Kovalev [1, 2], A.Yu. Shivanova[1]**

[1] Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation
[2] Regional narcological clinic, Vladivostok, Russian Federation

# Autoantibodies to Neuropeptides in the Different States of Opium Addiction

***Background****: During the last years the addiction rate remains stable high. While the neurochemical drug effect remains unclear.* ***Aims****: To analyze the changes of the idiotypic (aAT1) and anti-idiotypic (aAT2) autoantibodies to the neuroproteins S100, MBP, GFAP, NGF on the different stages of opium addiction and to indicate prognosis criteria of their effect.* ***Materials and methods****: 70 patients (only men, aged 22–38) with diagnosis opium addiction underwent examination. According to the results of testing, we detected the intoxication in 24 patients, withdrawal — in 24, and 22 patients were at remission stage of 21–28 days. The control group included only healthy people (n=18). The survey was focused on the rate detection of the idiotypic and anti-idiotypic IgG class antibodies in relation to the rate of neural proteins (S100, MBP, GFAP, NGF) in the serum with the IEA.* ***Results:*** *in patients with opium intoxication, we revealed statistical assurance in the rate of autoantibodies amount and their counterweights to the neural proteins rate between control and experimental groups. Only the rate of the aAT2 protein significantly decreased relatively to the MBP. In patients with abstinence, the rate of aAT1 to the MBP, GFAP (p⩽0,05) increased. The rate of aAT2 in relation to the GFAP and MBP also increased (p⩽0,05), at the same time it decreased in relation to the S100 and NGF (p⩽0,05). The autoantibodies amount at the remission stage corresponded to the amount at the intoxication stage. The comparative analysis of the patient groups with the different stages of opium addiction detected the identity criteria both in the intoxication and remission. We revealed statistical assurance in the rates of aAT1 to MBP and aAT2 to NGF in patients with intoxication and abstinence, and in the rates of aAT1 to GFAP, MBP, and aAT2 to GFAP (decreased in the remission) and to S100, MBP (increased in the remission) in patients with abstinence and at remission.* ***Conclusion:*** *Levels of idiotypic and anti-idiotypic antibodies to the neural proteins S100, MBP, GFAP, NGF (especially aAT2 to MPB) could be used as diagnostic factor and for accessing different states of opium addiction.*

***Key words:*** *autoantibodies to neuropeptides S100, MBP, GFAP, NGF; opium addiction, immune response.*
(***For citation****:* Sharkova VA, Kovalev IA, Shivanova AY. Autoantibodies to Neuropeptides in the Different States of Opium Addiction. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2016;71(5):385–391. doi: 10.15690/vramn669)

## Обоснование

Потребление наркотиков в немедицинских целях в течение последних лет остается стабильно высоким: появляются новые виды наркотических веществ, упрощаются способы их употребления, увеличивается число наркозависимых лиц, ситуация с употреблением наркотиков среди российской молодежи ухудшается. Первичная заболеваемость наркоманией в Российской Федерации по состоянию на 2015 г. зафиксирована на уровне предыдущего года (14,1 на 100 тыс. населения), однако в Приморском крае выросла на 15%, составив 43,5 на 100 тыс. населения. Показатель пораженности наркоманией в Приморском крае составляет 317 на 100 тыс. населения, что также в 1,5 раза выше среднероссийского показателя (213 на 100 тыс.). При этом уже длительное время регистрируется высокий уровень наркозаболеваемости, превышающий среднероссийский показатель [1].

Оценка длительности употребления наркотических веществ проводится на основании анамнестических данных пациента и данных лабораторных анализов наличия психоактивных веществ в организме. Прием разных наркотических веществ имеет различную клиническую картину. Опийная наркомания имеет несколько состояний при употреблении опийного наркотика: интоксикация при введении наркотика, синдром отмены при отсутствии наркотика более 1–2 сут и состояние ремиссии, возникающее спустя 10–15 дней после последнего употребления опийного наркотика. Наличие или отсутствие опийного наркотика в организме меняет не только клиническое проявление заболевания, изменения происходят и на уровне иммунологических показателей, идут нарушения иммунорегуляторных функций центральной нервной системы [2–6].



Иммунологические механизмы принимают участие в патогенезе развития и формировании опийной наркомании. Однако маркеров или индикаторов, указывающих на определенное состояние наркомании, не выявлено. Нервная система представляет собой единую нервно-трофическую сеть, в которой соседние нейроны обмениваются не только импульсами, но и трофическими сигналами, а также своим пластическим материалом, что влияет и на уровень аутоантител к нейробелкам. Изучение нейробелков S100 (семейство растворимых $Ca^{2+}$-связывающих белков нервной ткани, участвующих в процессах деления и дифференцировки клеток), ГФКП (глиальный фибриллярный кислый протеин), ОБМ (основной белок миелина), ФРН (фактор роста нервов) показывает в различной степени выраженный эффект на такие функции нейронов, как деполяризация мембраны, снижение генерации потенциала действия, снижение максимальной проводимости, способность к увеличению инактивации каналов. Анализ физиологической роли данных белков показал, что антитела к этим антигенам обратимо влияют на пассивные и активные характеристики электрических параметров нейрональных мембран [7–9].

Употребление опийного наркотика вносит деструкцию и во все органы и системы, включая мозговую ткань. Исследования уровня аутоантител к мозговым нейробелкам говорят о нарушениях в нейроглии, в связи с чем исследования динамики аутоантител при черепно-мозговой травме и эпилепсии позволяют рассматривать уровень аутоантител как дополнительный критерий оценки степени тяжести повреждения мозга [10–13]. При хронической интоксикации происходит износ организма, что ведет к нарушениям белкового обмена и влияет на уровень нейроантител. Магнитно-резонансная томография показывает у больных опиоидной наркоманией диффузные изменения в затылочной области, префронтальных корковых отделах, структурах гиппокампа, базальных ядрах. При этом органического поражения головного мозга не выявляется. Влияние опийного наркотика на мозговую ткань может привести к нарушениям трофики нервно-мозговой ткани вплоть до развития амнестического синдрома [14, 15].

Антитела к указанным белкам и их функциональные противовесы, специфические антиидиотипические антитела, являются нормальными компонентами сыворотки крови и синтезируются у всех здоровых лиц в строго определенных количествах, мало подверженных индивидуальным колебаниям. Повышение или снижение содержания аАТ1 и аАТ2 может сопровождать или предшествовать клинической манифестации разных форм патологии центральной или периферической нервной системы. Регуляторная роль антител к биологически активным соединениям демонстрирует участие антител в церебральных механизмах мотиваций, эмоций, а также при формировании долговременной памяти [16–18].

Исследования идиотипических антител (аАТ1) к белкам нервной ткани S100, ГФКП, ОБМ и ФРН и их функциональных противовесов антиидиотипических антител (аАТ2) в сыворотке крови человека проводятся для оценки аутоиммунных реакций организма с направленностью к антигенам нервной ткани.

S100 участвует в регуляции созревания центральных нейронов в ходе раннего онтогенеза, является трофическим фактором для серотонинергических нейронов в сформированной нервной системе; функции S100 связаны с регуляцией проницаемости ионных каналов, а также с интегративной деятельностью мозга (механизмами обучения, памяти, эмоционально мотивационных реакций). ГФКП — основной компонент промежуточных филаментов астроцитов, синтез быстро и значительно изменяется при повреждающих воздействиях на нервную ткань (ишемия, геморрагия, механические повреждения). ОБМ участвует в организации, сборке и поддержании структурной целостности миелина в центральной и периферической нервной системе. ФРН — нейротрофин, участвующий в регуляции развития холинергических нейронов, в установлении контактов между нейронами центральной и периферической нервной системы.

Нейропептидные комплексы составляют основу эмоционально-мотивационного поведения человека, участвуют в регуляции таких процессов, как голод, жажда, боль, сон, память, внимание, работоспособность, регенерации нервной ткани [19, 20].

Таким образом, изучение уровня аутоантител к нейробелкам позволит лучше узнать о степени повреждения нервной ткани при употреблении опийного наркотика, установить взаимосвязь уровня аутоантител с различными состояниями опийной наркомании.

**Целью** нашего исследования явилась оценка динамики продукции идиотипических и антиидиотипических аутоантител к нейробелкам S100, ГФКП, ОБМ, ФРН при формировании различных состояний наркозависимости.

## Методы

### *Дизайн исследования*

Проведено квазирандомизированное контролируемое исследование.

Для проведения исследования была сформирована репрезентативная выборка из числа пациентов с различными состояниями опийной наркомании, обратившихся для лечения.

***Критерии соответствия***

*Критерии включения в исследование*

1. Больные опийной наркоманией (шифр по МКБ-10 F11), находящиеся в разных состояниях опийной зависимости: с синдромом зависимости от опиоидов, систематическим употреблением, второй стадией. Активная зависимость (F11.25.2). Синдром отмены опиоидов (F11.30). В настоящее время воздержание (F11.20.2).
2. Контрольная группа (здоровые лица).
3. Возраст от 22 до 38 лет.

*Критерии исключения*

1. Синдром отмены опиоидов с делирием (F11.40).
2. Синдром зависимости от опиоидов с сопутствующими диагнозами (туберкулез, повреждения мозга (инсульт, черепно-мозговая травма), инфаркт миокарда, острая пневмония, острая инфекционная патология с выраженными кишечными или дыхательными нарушениями).
3. Лица, получающие антиретровирусную, антибактериальную терапию.
4. Пациенты с вирусом иммунодефицита человека.
5. Пациенты, получающие R-облучение.
6. Пациенты с установленными ревматологическими заболеваниями.
7. Пациенты женского пола.

***Условия проведения***

Исследование выполнено на базах ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России (Владивосток), ГБУЗ «Краевой наркологический диспансер» (Владивосток). В исследование включались наркозависимые лица, обратившиеся для клинического обследования и лечения с апреля 2013 по декабрь 2014 г.

***Продолжительность исследования***

Исследование проводилось в период с ноября 2011 по декабрь 2015 г.

***Описание медицинского вмешательства***

Всем больным проводилось стандартное клинико-лабораторное обследование с тестированием на психоактивные вещества. Клинический диагноз устанавливался согласно критериям МКБ-10. Для определения уровней идиотипических и антиидиотипических аутоантител к нейробелкам S100, ГФКП, ОБМ, ФРН использовалась сыворотка крови наркозависимых больных. Пациенты распределялись по группам: в группу интоксикации отбирались лица, употребившие опийный наркотик в течение последних 12 ч (исследовано 192 пробы), в группе абстиненции находились лица с клиническими признаками абстиненции, употребившие опийный наркотик около 2 сут назад (исследовано 192 пробы), в группе ремиссии — лица после купирования абстинеции, употребившие опийный наркотик более 14 дней назад (176 проб). Контрольную группу составили здоровые лица (144 пробы). Распределение по группам происходило параллельно.

***Исходы исследования***

Исходом исследования явилось определение уровня аутоантител в сыворотке крови больных при различных состояниях опийной наркомании в качестве дополнительного критерия определения стадии наркозависимости.

***Методы регистрации исходов***

Для достижения цели исследования было использовано определение идиотипических и антиидиотипических антител в сыворотке крови. Уровни аутоантител к белкам S100, ГФКП, ОБМ, ФРН определялись методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью набора реагентов для полуколичественного определения идиотипических и антиидиотипических антител к нейроантигенам в сыворотке крови «ИФА-НЕЙРО-АТ» ООО «Биофарм-тест» (Россия). В сыворотке крови определяли концентрацию нейротропных аАТ класса G к антигенным компонентам S100, ГФКП, ОБМ, ФРН. Расчеты количества идиотипических и антиидиотипических антител к нейроантигенам проводили путем построения калибровочной кривой с помощью компьютерной программы. Результаты иммунологического исследования сравнивали с данными контрольной группы клинически здоровых лиц.

***Этическая экспертиза***

В соответствии с Хельсинской декларацией (2000), в результате этической экспертизы Этическим комитетом при ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России получено положительное решение на проведение данного исследования: «Исследование отвечает основным этическим требованиям, выполнено с письменного информированного согласия пациента, в полном объеме соблюдаются права пациентов на самоопределение и конфиденциальность персональных данных пациентов. Результаты исследования могут быть представлены в печати с соблюдением конфиденциальности» (Выписка из протокола Этического комитета № 3, дело № 11 от 01.04.2013).



***Статистический анализ***

**Принципы расчета размера выборки**

Размер выборки предварительно не рассчитывался.

**Методы статистического анализа данных**

Статистический анализ результатов исследования проводили с помощью программ STATISTICA v. 6.0 (StatSoft Inc., США). Статистическая обработка полученных материалов произведена с применением прикладных компьютерных программ BioStat (AnalystSoft Inc., США). Распределение количественных показателей проверяли на нормальность с использованием критерия Шапиро–Уилка. Для каждой из непрерывных величин определяли среднее (M) и стандартное отклонение (σ) либо медиану (Me) и квартили распределения (LQ–UQ). При сравнении групп использовали непарный *t*-критерий Стьюдента. Для сравнения средних значений показателей в нескольких независимых группах применяли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Для анализа таблиц сопряженности признаков применяли двусторонний точный критерий Фишера. Взаимосвязь переменных изучали при помощи корреляционного анализа. Проверку гипотезу о нормальности распределения выполняли с использованием критерия Колмогорова–Смирнова, различия считали статистически значимыми при $p \leqslant 0{,}05$.

## Результаты

***Объекты (участники) исследования***

Проведено изучение идиотипических и антиидиотипических антител в сыворотке крови у 70 пациентов (мужчин) с диагнозом опийной наркомании без осложнений в возрасте 22–38 лет. Были сформированы три исследуемые группы. Первую группу составили 24 (34,3%) пациента в состоянии интоксикации опиоидами, средний возраст

29,5±3,79 года, интерквартильный размах 27–32,5. Во вторую группу вошли 24 (34,3%) пациента в состоянии абстинентного синдрома вследствие употребления опиоидов, средний возраст 29,4±3,68 года, интерквартильный размах 27–32. Третья группа представлена 22 (31,4%) пациентами в состоянии постабстинентной ремиссии 21–28 дней воздержания употребления опиоидов, возраст 29,68±3,25 года, интерквартильный размах 28–32. Для сравнительной характеристики использована контрольная группа, сформированная из здоровых лиц, проходивших обследование по медицинской комиссии допуска к управлению автотранспортом и не имевших наркологического заболевания, численностью 17 человек, мужчины, средний возраст 29,5±3,5 года, интерквартильный размах 28–32. Контрольная и исследуемые группы были сопоставимы по возрасту (F=3,075; $p$=0,091). Обследование включало определение уровня идиотипических и антиидиотипических антител класса IgG к белкам нервной ткани (S100, ОБМ, ГФКП, ФРН) в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа. Отбор производился среди лиц, употребляющих опийный наркотик в течение 5 лет (систематическое употребление). Все пациенты, у которых произведен забор крови, ежедневно употребляли 1 г опийного наркотика, не имели ремиссий за последние 5 лет, не получали медикаментозного лечения.



### *Основные результаты исследования*

Уровни аАТ1 и аАТ2 к белкам нервной ткани S100, ГФКП, ОБМ, ФРН в сыворотке крови наркозависимых лиц разных клинических групп оказались неравнозначными (табл.). Так, аАТ2 к ОБМ у лиц в состоянии интоксикации было в 1,2 раза ниже контроля (168,5±23,1 против 197±17,2 усл. ед.; $p$⩽0,05). Сравнительный анализ уровня остальных аутоантител к белкам нервной ткани в сыворотке крови лиц в состоянии интоксикации не выявил статистически значимых различий по исследуемым показателям.

В состоянии абстиненции относительно группы контроля было выявлено повышенное содержание аАТ1 к белкам ГФКП (148,9±16,1 против 136,2±13,1 усл. ед.; $p$⩽0,05) и ОБМ (221,9±39,9 против 138,5±13,4 усл. ед.; $p$⩽0,05), аАТ2 к белкам ГФКП (176,5±21,6 против 153,3±7,9 усл. ед.; $p$⩽0,05) и ФРН (171,5±39,6 против 127,4±20,3 усл. ед.; $p$⩽0,05). Содержание аАТ2 к остальным белкам нервной ткани оказались снижены. Так, уровень аАТ2 к белку S100 составил 166,3±28,4 против 217,2±22,1 усл. ед. ($p$⩽0,05), к белку ОБМ — 154,9±24,4 против 197±17,2 усл. ед. ($p$⩽0,05). При этом различия аАТ1 к S100 и ФРН с контрольными величинами не были статистически значимы.

Показатели уровня аутоантител к мозговым нейробелкам в состоянии ремиссии незначительно отличались от показателей контрольной группы. Поэтому разница аАТ1 всех белков нервной ткани с контрольными величинами не была статистически значима. Уровень же антиидиотипических антител к белкам S100, ОБМ и ФРН отличался от контроля. Так, уровень аАТ2 к белкам S100 и ОБМ оказался ниже контроля и составил 186,2±5,2 против 217,2±22,1 усл. ед. ($p$⩽0,05) и 182,1±9 против 197±17,2 усл. ед. ($p$>0,05) соответственно. Уровень аАТ2 к ФРН увеличен по отношению к контролю (149,1±11,7 против 127,4±20,3 усл. ед.; $p$⩽0,05).

Возможно, чрезмерно длительное сохранение повышенной реактивности аАТ1 к нейробелкам ГФКП, ОБМ и аАТ2 к ФРН, а также снижение аАТ2 к S100, ГФКП, ОБМ в период наиболее выраженного клинического проявления физических и психических изменений в организме говорит о выраженных неврологических дефектах.

Сравнительный анализ уровней аутоантител и их противовесов к белкам нервной ткани в сыворотке крови наркозависимых лиц на разных стадиях заболевания выявил динамику их изменения. При переходе от интоксикации в состояние абстиненции выявлено повышение уровня аАТ1 к белкам ГФКП, ОБМ, ФРН и аАТ2 к белкам ГФКП, ФРН. Из них статистически достоверное повышение показали аАТ1 к ОБМ (142,3±27,6 против 221,9±39,9 усл. ед.) и аАТ2 к ФРН (130,6±34 против 171,5±39,6 усл. ед.). Уровень аАТ1 к S100, аАТ2 к S100 и к ОБМ при переходе от интоксикации в абстиненцию оказался снижен незначительно ($p$>0,05).

При переходе состояния абстиненции в ремиссию обнаружено снижение уровня аАТ1 к белкам ГФКП (148,9±16,1 против 133,2±6 усл. ед.), ОБМ (221,9±39,9 против 131,6±10,6 усл. ед.), ФРН (157,5±25,9 против 150,4±7 усл. ед.) и аАТ2 к ГФКП (176,5±21,6 против

**Таблица.** Показатели уровня идиотипических и антиидиотипических аутоантител при различных состояниях опийной наркомании

| Показатель, усл. ед. | Состояние опийной наркомании | | | Контрольная группа (здоровые лица) n=18 | $p$ |
|---|---|---|---|---|---|
| | Интоксикация n=24 | Абстиненция n=24 | Ремиссия n=22 | | |
| № п/п | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| *Уровень аАТ1 к белку* | | | | | |
| S100 | 203,5±16,5 | 188,1±33,5 | 206±14,3 | 203,8±29,9 | $_{1, 2, 3}$>0,05 |
| ГФКП | 133,4±25,2 | 148,9±16,1* | 133,2±6 | 136,2±13,1 | $_{3}$⩽0,05 |
| ОБМ | 142,3±27,6 | 221,9±39,9* | 131,6±10,6 | 138,5±13,4 | $_{1}$⩽0,05<br>$_{3}$⩽0,05 |
| ФРН | 146,7±19,4 | 157,5±25,9 | 150,4±7 | 145,3±10,8 | $_{1, 2, 3}$>0,05 |
| *Уровень аАТ2 к белку* | | | | | |
| S100 | 185,1±39,6 | 166,3±28,4* | 186,2±5,2* | 217,2±22,1 | $_{3}$⩽0,05 |
| ГФКП | 159,5±30,9 | 176,5±21,6* | 153,8±6,8 | 153,3±7,9 | $_{3}$⩽0,05 |
| ОБМ | 168,5±23,1* | 154,9±24,4* | 182,1±9* | 197±17,2 | $_{3}$⩽0,05 |
| ФРН | 130,6±34 | 171,5±39,6* | 149,1±11,7* | 127,4±20,3 | $_{1}$⩽0,05 |

*Примечание*. Статистическая достоверность различий показателей с группой контроля: * — $p$⩽0,05, $_{1}$ — между подгруппами 1 и 2, $_{2}$ — между подгруппами 1 и 3, $_{3}$ — между подгруппами 2 и 3.

153,8±6,8 усл. ед.), ФРН (171,5±39,6 против 149,1±11,7 усл. ед.). У идиотипических аутоантител к S100 (188,1±33,5 против 206±14,3 усл. ед.), АТ2 к S100 (166,3±28,4 против 186,2±5,2 усл. ед.) и ОБМ (154,9±24,4 против 182,1±9 усл. ед.) выявлено повышение уровня их содержания. При изменении состояния опийной наркомании от абстиненции к ремиссии статистическую достоверность показали аАТ1 к ГФКП, ОБМ и аАТ2 к S100, ГФКП, ОБМ.

Проведение сравнительного анализа уровня аутоантител в интоксикации и ремиссии показало, что содержание аАТ1 и аАТ2 в состоянии интоксикации практически совпадает с уровнем в ремиссии ($p$>0,05), в состоянии абстиненции нейроантител образуется больше, чем при интоксикации и ремиссии. Уровень антиидиотипических антител ко всем нейробелкам можно использовать как маркер состояния абстиненции. Количественные сдвиги в продукции антиидиотипических антител к белку ОБМ можно использовать в качестве интегрального (результирующего) показателя различных состояний наркозависимости.

Выявленные тенденции подтверждают, что наркотические вещества меняют активность иммунной системы, указывают на вовлечение аутоиммунных реакций в патогенез формирования наркозависимости и влияют на выработку идио- и антиидиотипических аутоантител к нейробелкам S100, ГФКП, ОБМ, ФРН, изменяя их уровень поступления в периферическую кровь. Изменение динамики синтеза нейроаутоантител может являться патогенетическим звеном нарушений нервной системы при опийной наркомании.

## Обсуждение

### *Резюме основного результата исследования*

Иммунологические механизмы играют важную роль в клинико-иммунологической характеристике опийной наркомании при разных ее состояниях (интоксикации, абстиненции и ремиссии). Выявлены определенные уровни содержания аутоантител в сыворотке крови при различных состояниях наркомании. В ходе исследования установлена сопряженность показателей иммунной реактивности с различными состояниями опийной наркомании, имеющими различные клинические проявления и их различную степень выраженности. Обнаружено, что различное содержание идио- и антиидиотипических аутоантител к нейробелкам S100, ГФКП, ОБМ, ФРН характеризует разнообразный уровень иммунной реактивности в течение периода заболевания. Обнаружено, что определение уровня аутоантител к нейробелкам может служить дополнительными диагностическими критериями состояния интоксикации (аАТ2 к ОБМ), состояния абстинентного синдрома при опийной наркомании (аАТ1 к ГФКП, ОБМ; аАТ2 ко всем белкам) и состояния ремиссии (аАТ2 к S100, ОБМ, ФРН).

### *Обсуждение основного результата исследования*

Приоритетное направление практического здравоохранения — профилактическое — требует более раннего выявления признаков употребления психоактивных веществ и проведения превентивных мероприятий, предотвращающих дальнейшее развитие опийной наркомании, а также обнаружения признаков рецидива заболевания при возникновении ремиссии у пациента. До настоящего времени исследования в области прогнозирования течения наркомании ограничиваются только исследованием на наличие психоактивных веществ в организме. Настоящая работа предполагает внедрение дополнительных диагностических критериев для подтверждения различных состояний опийной наркомании на основе различной иммунной реактивности при разных состояниях наркозависимости.

Полученные данные свидетельствуют о роли изменения уровня аутоантител к нейробелкам при употреблении опиоидов. Изменение уровня аутоантител свидетельствует о поражении центральной нервной системы, что позволяет предположить, что клиническая картина опийной наркомании имеет свою систему изменений на иммунологическом уровне, в частности изменение уровня идиотипических и антиидиотипических нейроантител.

Согласно проведенным в данной области исследованиям, рост либо снижение количества аутоантител к нейробелкам S100, ГФКП, ОБМ, ФРН свидетельствуют не только о повреждении нейронов головного мозга, но и об изменениях в нервно-мозговой ткани в результате регулярного употребления наркотических веществ. Данные повреждения влекут за собой формирование психических расстройств, снижение психической активности и общего качества жизни [12–14].

Формирование опийной наркомании — сложный патогенетический процесс, отражающий реакции организма на введение наркотических веществ, и эти реакции меняются и зависят от длительности употребления наркотика, дозы вводимого вещества и различных состояний проявления опийной наркомании. Дисфункция регуляторного звена иммунной системы усугубляет течение заболевания, вызывая его прогрессирование. Уровень аутоантител к мозговым нейробелкам отражает активность иммунных реакций на повреждение организма и указывает на его способность к адаптации при хроническом введении опийного наркотика. Дальнейшее исследование динамики продукции аутоантител к нейробелкам позволит использовать данные показатели в качестве дополнительных диагностических критериев повреждения головного мозга, клинических состояний опийной наркомании с целью диагностики, экспертизы, прогноза, исхода опийной наркомании.



Методики определения аутоантител доступны для практического применения в клиническом здравоохранении. Наиболее высокую прогностическую информативность показал уровень аАТ2 к белку ОБМ и ФРН, что заставляет уделить более пристальное внимание данным нейробелкам, а также применять их для исследований как в качестве отдельных характеристик, так и в комплексе с другими нейробелками. Обнаружено, что именно аутоиммунные процессы 2-го уровня более стабильно отражают повреждения мозговой ткани, тем самым являясь более стабильными показателями изменений при опийной наркомании в сочетании с ее клиническими симптомами. Прогностическая информативность полученных показателей не является постоянной величиной, а изменяется в динамике различных состояний опийной наркомании.

## Заключение

В настоящем исследовании при проведении мониторинга нейроантител при различных состояниях наркозависимости выявлена их прогностическая значимость. Показана зависимость содержания идиотипических и антиидиотипических антител к нейробелкам S100, ГФКП,

ОБМ, ФРН в сыворотке крови не только при использовании опиатов, но и в состоянии наркозависимости. Определены маркеры, которые могут быть использованы в качестве дополнительного критерия разницы между стадиями наркозависимости. Наиболее выраженные изменения уровня аутоантител к мозговым нейробелкам выявлены при абстинентном синдроме опийной наркомании. Полученные данные позволяют рассматривать антиидиотипические антитела к нейробелкам ОБМ и ФРН как биомаркеры диагностики состояния опийной наркозависимости.

**Источник финансирования**

Исследование выполнено за счет средств федерального бюджета в рамках государственного задания и при использовании личных средств авторов данной статьи.

**Конфликт интересов**

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Киржанова В.В., Григорова Н.И., Сидорюк О.В. / *Сб.: Основные показатели деятельности наркологической службы в РФ 2009–2014.* — М.: НИИ наркологии; 2015. — 141 с. [Kirzhanova VV, Grigorova NI, Sidoryuk OV. *Sbornik. Osnovnye pokazateli deyatel'nosti narkologicheskoi sluzhby v RF 2009–2014.* Moscow: NII narkologii; 2015. 141 p. (In Russ).]
2. Погосов А.В., Хадж С.Ш. Депрессивные расстройства в клинике опийного абстинентного синдрома // *Наркология*. — 2015. — Т.14. — №5. — С. 50–56. [Pogosov AV, Khadzh SSh. Depressivnye rasstroistva v klinike opiinogo abstinentnogo sindroma. *Narkologiya*. 2015;14(5):50–56.(In Russ).]
3. Батухтина Е.И., Невидимова Т.И., Давыдова Т.В. и др. Особенности нейроиммунорегуляции у лиц с опиоидной зависимостью // *Сибирский вестник психиатрии и наркологии*. — 2012. — №6. — С. 9–11. [Batukhtina EI, Nevidimova TI, Davydova TV, et al. Features of neuroimmunoregulation in patients with drug dependence. *Siberian gerald [sic] of psychiatry and addiction psychiatry*. 2012;(6):9–11. (In Russ).]
4. Шаркова В.А. Роль цитокинов в иммунопатогенезе наркозависимости // *Аллергология и иммунология*. — 2007. — Т.8. — №2 — С. 225–230. [Sharkova VA. The role of cytokines in immunopathogenesis of drug addiction. *Allergologiya i immunologiya*. 2007;8(2):225–230. (In Russ).]
5. Ковалев И.А., Шиванова А.Ю., Ермолицкая С.А., Шаркова В.А. Цитокиновый спектр при различных состояниях наркомании // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. — 2014. — №2. — С. 133–134. [Kovalev IA, Shivanova AYu, Ermolitskaya SA, Sharkova VA. Tsitokinovyi spektr pri razlichnykh sostoyaniyakh narkomanii. *Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovanii*. 2014;(2):133–134. (In Russ).]
6. Шаркова В.А. Особенности иммунного статуса, гено-фенотипической характеристики наркомании: автореф. дис... докт. мед. наук. — Владивосток; 2007. — 50 с. [Sharkova VA. *Osobennosti immunnogo statusa, geno-fenotipicheskoi kharakteristiki narkomanii*. [dissertation abstract] Vladivostok; 2007. 50 p. (In Russ).] Доступно по: http://www.tgmu.ru/library. Ссылка активна на 20.04.2016.
7. Гамалея Н.Б. Иммунотерапия при наркологических заболеваниях (II часть) // *Вопросы наркологии*. — 2012. — №1 — С.84–112. [Gamaleya NB. Immunoterapiya pri narkologicheskikh zabolevaniyakh (II chast'). *Voprosy narkologii*. 2012;(1):84–112. (In Russ).]
8. Кибитов А.О., Бродянский В.М., Анохина И.П. Поиск молекулярно-генетических маркеров высокого риска наркологических заболеваний // *Вопросы наркологии*. — 2015. — №5 — С. 85–98. [Kibitov AO, Brodyansky VM, Anokhina IP. Search for high-risk molecular and genetic markers of addictions. *Voprosy narkologii*. 2015;(5):85–98. (In Russ).]
9. Абдурасулова И.Н., Клименко В.М. Роль иммунных и глиальных клеток в процессах нейродегенерации // *Медицинский академический журнал*. — 2011. — Т.11. — №1 — С. 12–29. [Abdurasulova IN, Klimenko VM. The role of immune and glial cells in neurodegenerative processes. *Med Akad Z*. 2011;11(1):12–29. (In Russ).]
10. Симонова А.В., Карабиненко А.А., Ганин Д.И., и др. Клинико-диагностическое значение комплексной оценки аутоиммунитета у пациентов с алкогольной и наркотической зависимостью // *Наркология*. — 2011. — Т.10. — №7 — С. 61–67. [Simonova AV, Karabinenko AA, Ganin DI, et al. Clinical and diagnostic value of integrated assessment of autoimmunity in patients with alcohol and drug dependence. *Narkologiya*. 2011;10(7):61–67. (In Russ).]
11. Шаркова В.А., Забелина Н.Р., Шиванова А.Ю. и др. *Аутоантитела в патогенезе наркозависимости*. / Материалы VII Дальневосточного регионального конгресса с международным участием «Человек и лекарство». — Владивосток: Медицина ДВ; 2010. — С. 113–114. [Sharkova VA, Zabelina NR, Shivanova AY, et al. *Autoantitela v patogeneze narkozavisimosti*. (Conference proceedigs) VII Dal'nevostochnyi regional'nyi kongress s mezhdunarodnym uchastiem "Chelovek i lekarstvo". Vladivostok: Meditsina DV; 2010. p. 113–114. (In Russ).]
12. Нганкам Л., Казанцева Н.В., Герасимова М.М. Иммунологические маркеры тяжести и прогноза черепно-мозговой травмы // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. — 2011. — Т.111. — №7 — С. 61–65. [Ngankam L, Kazantseva NV, Gerasimova MM. Immunological markers of severity and outcome of traumatic brain injury. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*. 2011;111(7):61–65. (In Russ).]
13. Одинак М.М., Цыган Н.В., Иванов А.М. и др. Белок S100β — биомаркер повреждения головного мозга // *Вестник Российской военно-медицинской академии*. — 2011. — №1 — С. 210–214. [Odinak MM, Tsygan NV, Ivanov AM, et al. Protein S100β — biomarker of brain injury. *Vestnik Rossiiskoi voenno-meditsinskoi akademii*. 2011;(1):210–214. (In Russ).]
14. Расулова Х.А., Азизова Р.Б. Естественные нейротропные аутоантитела в сыворотке крови больных, страдающих эпилепсией // *Вестник РАМН*. — 2014. — Т.69. — №5–6 — С. 111–116. [Rasulova KhA, Arizova RB. Natural neurotropic autoantibodies in blood serum of epilepsy patients. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2014;69(5–6):111–116. (In Russ).] doi:10.15690/vramn.v69i5-6.1054.
15. Литвинцев Б.С., Ефимцев А.Ю., Тарумов Д.А. и др. Нейрофункциональные изменения у пациентов с опиоидной зависимостью: данные функциональной магнитно-резонансной томографии // *Medline.ru*. — 2015. — Т.16. — №2 — С. 542–559. [Litvintsev BS, Efimtsev AYu, Tarumov DA, et al. Neurofunctional alterations in patients with opioid addiction: functional MRI data. *Medline.ru*. 2015;16(2):542–559. (In Russ).]
16. Сахаров А.В., Хафизов Р.К., Краузе Л.А., Говорин Н.В. Клинический случай развития амнестического синдрома при зависимости от опиатов // *Вопросы наркологии*. — 2015. — №3 — С.80–86. [Sakharov AV, Khafizov RK, Krauze LA, Govo-

rin NV. Clinical case of amnestic syndrome development with underlying opiate dependence. *Voprosy narkologii*. 2015;(3):80–86. (In Russ).]

17. Пальцев М.А., Полетаев А.Б., Сучков С.В. Аутоиммунитет и аутоиммунный синдром: границы нормы и патологии // *Вестник РАМН*. — 2010. — №8 — С. 3–6. [Pal'tsev MA, Poletaev AB, Suchkov SV. Autoimmunity and autoimmune syndrome: norm and pathology. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2010;(8):3–6. (In Russ).]
18. Полетаев А.Б. *Физиологическая иммунология (естественные аутоантитела и проблемы наномедицины)*. — М.: Миклош; 2010. — 220 с. [Poletaev AB. *Fiziologicheskaya immunologiya (estestvennye autoantitela i problemy nanomeditsiny)*. Moscow: Miklosh; 2010. 220 p. (In Russ).]
19. Умрюхин А.Е. Антитела в механизмах вегетативных и поведенческих функций организма // *Фундаментальные исследования*. — 2013. — №3–2 — С. 425–430. [Umryukhin AE. Antibodies in mechanisms of autonomic functions and behavior. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2013;(3–2):425–430. (In Russ).]
20. Сепиашвили Р.И., Малашхия Ю.А. Мозг — один из центральных органов иммунной системы // *Аллергология и иммунология*. — 2015. — Т.16. — №1 — С. 8–13. [Sepiashvili RI, Malashkhiya YuA. Mozg — odin iz tsentral'nykh organov immunnoi sistemy. *Allergologiya i immunologiya*. 2015;16(1):8–13. (In Russ).]

## КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

***Шаркова Валентина Александровна***, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой микробиологии и вирусологии, ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России РФ
**Адрес**: 690000, Владивосток, пр. Острякова, д. 2, **тел.**: +7 (924) 123-74-25, **e-mail**: valexsh@mail.ru,
**SPIN-код:** 2258-1360, **ORCID:** http://orcid.org/0000-0002-8489-5475

***Ковалёв Игорь Анатольевич***, заочный аспирант ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России РФ, заведующий амбулаторно-поликлиническим отделением ГБУЗ «Краевой наркологический диспансер»
**Адрес**: 690003, Владивосток, ул. Станюковича, д. 53, **тел.**: +7 (423) 276-04-63, **e-mail**: reindgerow@yandex.ru,
**SPIN-код:** 7334-2334, **ORCID**: http://orcid.org/0000-0002-5787-5233

***Шиванова Анна Юрьевна***, врач-иммунолог, специалист научного отдела ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России РФ
**Адрес**: 690000, Владивосток, пр. Острякова, д. 2, **тел.**: +7 (924) 230-32-36, **e-mail**: ykima@bk.ru,
**ORCID**: http://orcid.org/0000-0003-4559-5979

DOI: 10.15690/vramn736

**А.В. Караулов[1,2], Н.Н. Гурина[2], Д.В. Новиков[2], С.Г. Фомина[2], В.В. Новиков[2]**

[1] Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Российская Федерация

[2] Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Российская Федерация

# Роль экспрессии белка MUC1 в прогрессии опухоли

*MUC1 является полифункциональным белком с высоким структурным разнообразием, позволяющим ему оказывать влияние на разные клеточные события. Этот сильно гликозилированный трансмембранный протеин принимает участие в формировании муциноподобного геля на поверхности эпителиальных клеток, обеспечивая таким образом защиту последних от повреждений. MUC1 через регуляцию работы ряда транскрипционных факторов модулирует обмен веществ и устойчивость к воспалению, вызванному бактериальной инфекцией. В настоящем обзоре представлены данные о связи структурных и функциональных изменений MUC1 с характеристиками раковых клеток. В раковых клетках происходят изменения уровня экспрессии гена MUC1, образование множества структурных форм MUC1, отклонения от нормального гликозилирования белка и изменение его локализации. Изменение свойств MUC1 в раковой клетке приводит к метаболическому перепрограммированию, ассоциированному с пролиферативной активностью, устойчивостью к гипоксии и стимуляцией ангиогенеза, что в конечном итоге влияет на выживаемость раковых клеток. Более того, раковые клетки могут использовать взаимодействие MUC1 с молекулами адгезии для инвазии и метастазирования. Другими словами, MUC1 играет ключевую роль как в гомеостазе эпителиальных клеток, так и в прогрессии опухоли. Понимание роли экспрессии MUC1 в жизнедеятельности опухолевых клеток имеет значение для разработки новых мониторинговых и терапевтических подходов для лечения больных с MUC1-позитивными злокачественными новообразованиями.*



***Ключевые слова:*** *MUC1, MUC1-N, MUC1-C, альтернативные формы MUC1, прогрессия опухоли.*

***(Для цитирования:*** Караулов А.В., Гурина Н.Н., Новиков Д.В., Фомина С.Г., Новиков В.В. Роль экспрессии MUC1 в прогрессии опухоли. *Вестник РАМН.* 2016;71(5):392–396. doi: 10.15690/vramn736)

## Введение

Муцины представляют разнообразное семейство гликопротеинов с высокой молекулярной массой, которые экспрессируются на апикальной поверхности эпителиальных клеток. Аминокислотная последовательность муцинов характеризуется наличием переменного числа тандемных повторов, богатых пролином, серином и треонином. Число повторов определяет неоднородность длины полипептидной цепи, а экстенсивное О-гликозилирование приводит к тому, что на углеводы приходится до 80% общей массы муцина [1]. Полисахариды принимают участие в формировании муцинозного геля на поверхности эпителия, который защищает клетки от высыхания, изменения pH, воздействия загрязняющих веществ и проникновения микроорганизмов [2].

В настоящее время у человека обнаружено более 20 муцинов. Базируясь на структурных особенностях и физиологических функциях, муцины подразделяют на секреторные и ассоциированные с мембранами [3]. Секреторные муцины — основные структурные компоненты муцинозного геля. Характерной особенностью секреторных муцинов является способность образовывать гранулы за счет полимеризации молекул. Полимеризация происходит с образованием дисульфидных связей между цистеинбогатыми доменами, расположенными на

**A.V. Karaulov[1, 2], N.N. Gurina[2], D.V. Novikov[2], S.G. Fomina[2], V.V. Novikov[2]**

[1] I.M. Sechenov Moscow State Medical University Ministry of Health of Russia, Moscow, Russian Federation

[2] N.I. Lobachevskiy National Research Nizhny Novgorod State University, Nizhniy Novgorod, Russian Federation

# Role of MUC1 Expression in Tumor Progression

*Mucin 1 (MUC1) is a multistructural and multifunctional protein that is involved in regulating diverse cellular activities. This strongly glycosylated transmembrane protein forms a mucous gel on the surface of epithelial cells that protects the cells from injury. MUC1 acts as a signaling molecule and transcription factor modulating metabolism and resistance to bacterial-induced inflammation. This article presents a review of the relationship between structural and functional changes of the MUC1 and the characteristics of cancer cells. The alteration in MUC1 expression level, a number of structural forms, protein glycosylation and localization occurs in cancer cells. These alterations lead to metabolic reprogramming associated with proliferation, resistance to hypoxia and angiogenesis which affects the survival of cancer cells. Furthermore, cancer cells can take advantage of MUC1 interaction with adhesion molecules for invasion and metastasis. Thus, MUC1 plays a key role both in the homeostasis of epithelial cells and in cancer progression. Understanding the role of MUC1 expression in tumor cells survival is important for the development of new monitoring and therapeutic approaches for the treatment MUC1 positive maligancies.*

***Key words:*** *MUC1, MUC1-N, MUC1-C, alternative forms of MUC1, cancer progression.*

***(For citation:*** Karaulov AV, Gurina NN, Novikov DV, Fomina SG, Novikov VV. Role of MUC1 Expression in Tumor Progression. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2016;71(5):392–396. doi: 10.15690/vramn736)

N- или С-концах гликопротеинов [4]. Гидратирование гранул увеличивает объем молекул более чем в 1000 раз, что обеспечивает формирование слизи [5]. Мембранные муцины формируют гликокаликс слизистой поверхности, участвуют во взаимодействиях клеток между собой или с матриксом, а также принимают участие в передаче сигналов внутрь клетки [6]. Мембранные муцины могут протеолитически отщепляться от поверхности клетки и интегрироваться в верхний слой слизи, влияя на его вязкость [7].

Муцин 1 (Mucin, MUC1, так же известный как episialin, PEM, H23Ag, EMA, CA15-3 или MCA) — трансмембранный гликопротеин первого типа, принимающий участие в формировании слоя полисахаридов непосредственно на поверхности эпителиальных клеток. Экспрессия MUC1 регистрируется на эпителиальных клетках пищевода, желудка, двенадцатиперстной кишки, матки, простаты, легких, поджелудочной и молочной желез. В раковых клетках регистрируются изменение экспрессии гена *MUC1*, отклонения от нормального гликозилирования белка и изменение внутриклеточной локализации [8]. Изменение свойств MUC1 приводит к метаболическому перепрограммированию клеток и приобретению ими подвижности [9].

В настоящем обзоре особое внимание уделено связи структурных и функциональных изменений MUC1 со свойствами раковых клеток. Понимание роли экспрессии MUC1 в жизнедеятельности опухолевых клеток имеет значение для разработки новых мониторинговых и терапевтических подходов в лечении больных со злокачественными новообразованиями.

## Строение и функции MUC1

Ген *MUC1* расположен на первой хромосоме (1q21) и состоит из 7 экзонов и 6 интронов, кодирует полипептидную цепь, которая расщепляется на N-концевую (MUC1-N) и С-концевую (MUC1-C) субъединицы. При фолдинге молекулы происходит аутопротеолитическое расщепление связи между глицином и серином в последовательности G↓SVVV. На мембране клетки MUC1-N и MUC1-C субъединицы образуют гетеродимер за счет стабильных водородных связей. Субъединица MUC1-N содержит большое количество тандемных повторов, состоящих из 20–21 аминокислот. Количество тандемных повторов варьирует у разных людей от 20 до 120, наиболее распространенным является набор из 40–80 повторов [10].

При созревании функциональной молекулы MUC1 гликозилируется. Паттерн гликозилирования MUC1 зависит от набора гликозилтрансфераз в различных тканях [11]. N-гликозилирование происходит по остаткам аспарагина, находящимся вблизи сайтов аутопротеолиза. Четыре из них расположены на MUC1-N и один — на MUC1-C субъединицах. N-гликозилирование необходимо для укладки белка, его секреции и локализации на апикальной поверхности эпителиальных клеток [12]. О-гликозилирование происходит по остаткам серина и треонина, которыми богаты тандемные повторы MUC1-N субъединицы, и приводит к увеличению массы белка на 50–100% в зависимости от количества повторов. В нормальных клетках углеводные звенья предотвращают клатринзависимый эндоцитоз молекулы с поверхности клетки и маскируют белок от протеолитического расщепления внешними ферментами [9].

MUC1-C субъединица состоит из ассоциированного с MUC1-N внеклеточного сегмента (58 а.м.), трансмембранного домена (28 а.м.) и цитоплазматической части (72 а.м.). В зависимости от N-гликозилирования внеклеточного домена молекулярная масса MUC1-C может варьировать от 17 до 25 кДа. Трансмембранный домен и семь остатков тирозина цитоплазматической части MUC1-C высоко консервативны у разных видов, что свидетельствует об их важной функциональной роли. Цитоплазматическая часть MUC1-C служит адаптером, который взаимодействует с факторами роста, киназами и другими белками, принимающими участие в передаче сигналов, регулирующих обмен веществ, пролиферацию, адгезию и апоптоз клеток [13, 14].

MUC1 как часть физиологического барьера защищает эпителиальные клетки от повреждений, вызванных свободными радикалами, низким pH, токсинами и другими факторами стресса, возникающими на границе раздела с внешней средой [8]. Механизмы опосредованных MUC1-защитных реакций изучены недостаточно. Однако показано, что эпителиальные клетки дыхательных путей контролируют вызванное бактериальной инфекцией воспаление за счет гиперпродукции MUC1 в ответ на продукцию фактора некроза опухолей (Tumor necrosis factor, TNF) и интерлейкина (Interleukin, IL) 8. Увеличение экспрессии MUC1, в свою очередь, приводит к подавлению передачи сигналов Toll-like рецепторами и снижению экспрессии IL8 [15]. Также известно, что гетеродимер MUC1 диссоциирует в ответ на продукцию провоспалительных цитокинов (интерферона-гамма или TNF), которые вызывают активацию шеддаз (протеолитических ферментов, срезающих белки с поверхности клеток). К ним относятся TNF-конвертирующие ферменты (TACE, ADAM17) и матричные металлопротеиназы. Эти ферменты вызывают высвобождение во внеклеточное пространство субъединицы MUC1-N, а также катализируют расщепление внеклеточного домена MUC1-C, генерируя тем самым небольшие пептидные фрагменты MUC1* и MUC1-CTF15, которые выступают как регуляторы транскрипции [9]. MUC1 взаимодействует с различными факторами транскрипции и непосредственно с промоторными элементами генов. Его присутствие в транскрипционных комплексах меняет набор и специфичность транскрипционных факторов. MUC1 взаимодействует с p53 и HIF-1 — двумя ключевыми факторами, регулирующими экспрессию генов метаболизма. Кроме того, MUC1 регулирует экспрессию генов, участвующих в процессах поглощения клеткой питательных веществ. Протеолитическое расщепление MUC1 приводит к изменениям в гликолизе, пентозофосфатном пути, цикле трикарбоновых кислот, биосинтезе жирных кислот [3].

## Структурные варианты MUC1

В настоящее время описано образование 78 изоформ в результате сплайсинга мРНК MUC1. Выпадение при сплайсинге фрагментов матричной РНК приводит к образованию различных структурных вариантов молекулы MUC1. Изоформа мРНК MUC1/TM кодирует классический белок MUC1 (в некоторых публикациях обозначается как MUC1/REP). Известны изоформы мРНК, кодирующие секреторную форму MUC1/sec, лишенную трансмембранного домена, а также полноразмерные сплайсинг-варианты с добавлением аминокислот в регион тандемных повторов (MUC1/A, MUC1/B и др.) или выпадением аминокислот из региона тандемных повторов (MUC1/X, MUC1/Y, MUC1/Z и др.) [16]. Показано, что некоторые изоформы вовлечены в патогенез воспали-

тельных заболеваний. Например, изоформа MUC1/A часто регистрируется при синдроме сухости глаз. Развитие данной болезни коррелирует с хроническим воспалением. Экспериментально продемонстрирована способность MUC1/A и MUC1/B модулировать индукцию IL1β и IL8 [17]. Изоформа с выпадением аминокислот из региона тандемных повторов (MUC1/Y) увеличивает онкогенный потенциал клеток рака простаты и ассоциирована с индукцией транскрипции провоспалительных цитокинов. Секретируемая изоформа MUC/sec также способна вызывать избыточную экспрессию цитокинов [18].

В дополнение к этому структурный полиморфизм MUC1 в значительной степени определяется и характером гликозилирования белка, который варьирует в зависимости от функциональной специализации клеток, степени их дифференцировки, а также может изменяться под действием физиологических и патофизиологических сигналов [8].

В раковых клетках происходят транскрипционные и пост-транскрипционные изменения набора структурных вариантов MUC1, приводящие к метаболическому перепрограммированию раковых клеток и приобретению ими подвижности. Вариабельность альтернативных форм мРНК MUC1 описана при воспалительных заболеваниях, доброкачественных изменениях эпителия и злокачественных новообразованиях [9]. Однако функциональное значение структурных вариантов MUC1 остается не до конца понятым.



### Строение и функции MUC1 в раковой клетке

При опухолевой трансформации клеток эпителиального происхождения наблюдается как избыточная экспрессия MUC1, так и «молчание» гена. При экспрессии в раковых клетках MUC1 характеризуется гипогликозилированием, выраженным в изменении химической структуры и степени полимеризации гликанов (рис.). Гипогликозилирование открывает белок для протеолитического расщепления внеклеточными ферментами, что приводит к образованию растворимых форм. В норме растворимые формы MUC1 детектируются методом иммуноферментного анализа в грудном молоке, периферической крови, моче человека. Растворимый MUC1, наряду с раково-эмбриональным антигеном, является одним из основных онкомаркеров при диагностике рака молочной железы (РМЖ). На поверхности MUC1 представлены углеводные антигены (Carbohydrate *antigen,* CA) 15.3 и 27.29 [19]. Процесс злокачественного роста сопровождается у больных РМЖ повышением уровня CA в сыворотке крови, который коррелирует с размерами опухоли. Однако чувствительность первичной диагностики по уровню CA в сыворотке больных РМЖ составляет 15–35%. Низкое содержание онкомаркера в сыворотке больного не гарантирует отсутствия злокачественного процесса, а повышение может быть связано с воспалительными процессами [20]. В то же время пациенты с прогрессирующим заболеванием при рецидиве и метастазировании имеют устойчиво высокий уровень CA, в связи с чем методы его определения рекомендованы для мониторинговых исследований и прогнозирования течения РМЖ. Следует отметить, что повышение уровня CA в сыворотке крови регистрируется при многих онкологических заболеваниях [21].

В раковых клетках наблюдается изменение локализации MUC1. С потерей полярности, характерной для эпителиальных клеток, MUC1 распределяется по всей клеточной поверхности. Изменение полярности также вызывает перераспределение на клеточной поверхности факторов роста [фактор роста ткани (CTGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF-A и B)], которые в норме сосредоточены на базолатеральной поверхности эпителиальных клеток [22]. Взаимодействие MUC1 с факторами роста привлекает киназы (ZAP-70, PKC-G, GSK-3b и c-Src), которые фосфорилируют аминокислоты цитоплазматической части MUC1 и запускают множественные сигнальные пути. Для MUC1-C субъединицы описана активация сигналов через MAPK, P13K/Akt, Wnt, STAT3 и NF-KB пути. Таким образом, MUC1 влияет на транскрипцию регуляторных генов, ассоциированных с опухолевой инвазивностью, метастазированием, ангиогенезом, пролиферацией, устойчивостью к апоптозу, лекарственной устойчивостью и воспалением [9].

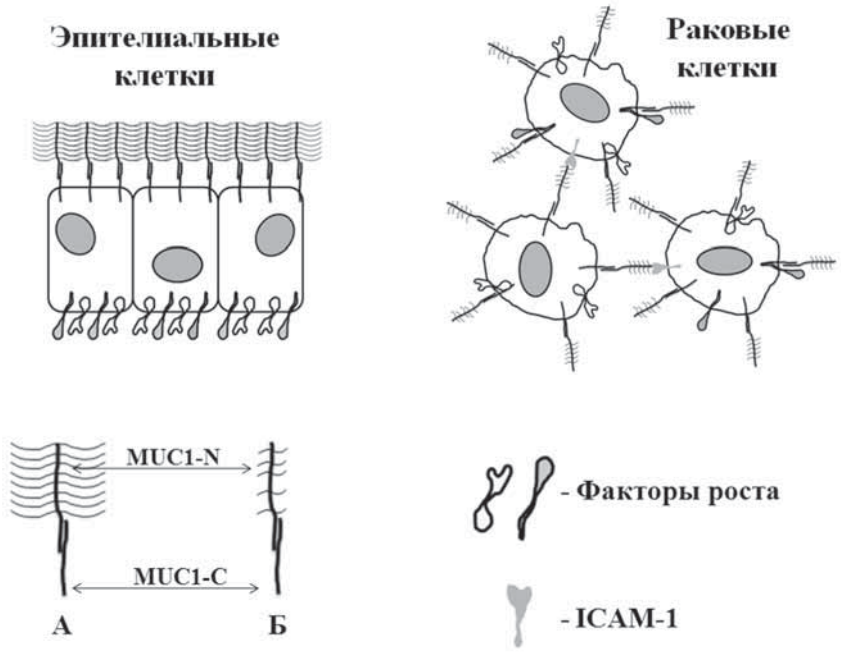



**Рис.** Схематичное изображение строения и распределения MUC1 на поверхности эпителиальных и раковых клеток: А — гликозилированный MUC1, Б — гипогликозированный MUC1

Внеклеточная субъединица MUC1-N опосредует подвижность раковых клеток. MUC1-N включает адгезивные повторы, определяющие взаимодействие с молекулой ICAM-1, которая играет ключевую роль в миграции лимфоцитов [23]. ICAM-1 экспрессируется на поверхности различных клеток (например на эндотелиальных клетках сосудов, вилочковой железы, фибробластах и лейкоцитах периферической крови), присутствует в крови в растворимой форме в виде мономеров, гомо- и гетеродимеров [24, 25]. На примере клеток РМЖ показано, что во взаимодействии MUC1 и ICAM-1 немаловажную роль играет кальций. Кальциевые сигналы участвуют в реорганизации цитоскелета, что способствует подвижности раковых клеток [26]. Другая аминокислотная последовательность субъединицы MUC1-N (RYVPPSSTDR) участвует во взаимодействии с белком Src в местах контакта с эндотелиальными клетками, что приводит к передаче сигналов, регулирующих клеточную пролиферацию, адгезию и миграцию [27]. Таким образом, субъединица MUC1-N может управлять межклеточными взаимодействиями, способствуя метастазированию.

## Роль MUC1 в ответе на гипоксию

Значение экспрессии MUC1 в прогрессии онкологических заболеваний подтверждают исследования, демонстрирующие роль MUC1 в регуляции метаболизма раковых клеток. Различные структурные варианты MUC1 оказывают влияние на уровень питательных веществ и процесс их обмена в клетках опухоли. Отличительной чертой неопластической клетки является повышенный метаболизм глюкозы, способствующий выживанию и пролиферации клеток в условиях гипоксии [28]. Гипоксией индуцированный фактор HIF-1a регулирует продукцию гликолитических ферментов, необходимых для пролиферирующих раковых клеток. MUC1 действует в качестве регулятора экспрессии, стабильности и активности HIF-1a. MUC1 физически взаимодействует с HIF-1a в качестве стабилизирующего белка. Такое взаимодействие напрямую регулирует поглощение глюкозы и обмен других веществ [22, 29].

Показано, что при гипоксии структурные варианты субъединицы MUC1-C накапливаются в ядре в ассоциации с β-катенином, что приводит к подавлению экспрессии Е-кадгерина. Как следствие, происходит перестройка цитоскелета, способствующая уменьшению контактов между раковыми клетками, тем самым увеличивая инвазивный потенциал раковой клетки [28].

В микроокружении опухолевых клеток происходит снижение количества питательных веществ и кислорода. Чтобы выжить в гипоксической среде, раковые клетки адаптируются путем экспрессии проангиогенных факторов и стимуляции ангиогенеза. При гипоксии MUC1 индуцирует экспрессию проангиогенных факторов (CTGF, PDGF-B и фактор роста эндотелия сосудов VEGF-A), что способствует формированию в опухоли структур, сходных с капиллярами, и прорастанию новых кровеносных сосудов [30, 31]. Такие наблюдения объясняют клинические выводы, которые подчеркивают связь избыточной экспрессии MUC1 с развитием метастазов и плохим прогнозом при раке поджелудочной железы, желчном пузыре, толстой кишки, молочной железы [32].

## Заключение

MUC1 является полифункциональным белком, обладает высоким структурным разнообразием, позволяющим ему оказывать влияние на разные клеточные события. Структурные формы MUC1 присутствуют на поверхности клеток, в цитоплазме и ядре. В норме MUC1 через регуляцию работы ряда транскрипционных факторов модулирует обмен веществ и устойчивость к внешним воздействиям. При злокачественной трансформации MUC1 играет важную роль в модуляции транскрипции регуляторных генов, ассоциированных с инвазивностью, метастазированием, ангиогенезом, пролиферацией и устойчивостью к гипоксии, что в конечном итоге влияет на выживаемость раковых клеток. Другими словами, MUC1 является многоликим онкобелком, играющим ключевую роль в опухолевой прогрессии. Понимание роли экспрессии MUC1 в жизнедеятельности опухолевых клеток имеет значение для разработки новых мониторинговых и терапевтических подходов для лечения больных со злокачественными новообразованиями.



## Источник финансирования

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (грант №16-14-10179).

## Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

## Участие авторов

А.В. Караулов — общий анализ проблематики, выработка общей концепции обзора; Н.Н. Гурина — анализ данных литературы и написание раздела «Строение и функции MUC1», рисунок; Д.В. Новиков — анализ литературного материала и написание раздела «Структурные варианты MUC1», рисунок; С.Г. Фомина — анализ литературы и написание раздела «Строение и функции MUC1 в раковой клетке»; В.В. Новиков — анализ данных литературы и написание раздела «Роль MUC1 в ответе на гипоксию».

## ЛИТЕРАТУРА

1. Bergstrom KS, Xia LJ. Mucin-type O-glycans and their roles in intestinal homeostasis. *Glycobiology*. 2013;23(9):1026–1037. doi: 10.1093/glycob/cwt045.
2. Tailford LE, Crost EH, Kavanaugh D, Juge N. Mucin glycan foraging in the human gut microbiome. *Front Genet*. 2015;6:81. doi: 10.3389/fgene.2015.00081.
3. Corfield AP. Mucins: a biologically relevant glycan barrier in mucosal protection. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1850(1):236–252. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.05.003.
4. Ambort D, van der Post S, Johansson ME, et al. Function of the CysD domain of the gel-forming MUC2 mucin. *Biochem J*. 2011;436(1):61–70. doi: 10.1042/BJ20102066.
5. Verdugo P. Supramolecular dynamics of mucus. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(11):a009597. doi: 10.1101/cshperspect.a009597.
6. Jonckheere N, Skrypek N, Van Seuningen I. Mucins and pancreatic cancer. *Cancers (Basel)*. 2010;2(4):1794–1812. doi: 10.3390/cancers2041794.
7. Pelaseyed T, Bergstrom JH, Gustafsson JK, et al. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense

line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol Rev*. 2014;260(1):8–20. doi: 10.1111/imr.12182.
8. Joshi S, Kumar S, Choudhury A, et al. Altered Mucins (MUC) trafficking in benign and malignant conditions. *Oncotarget*. 2014;5(17):7272–7284. doi: 10.18632/oncotarget.2370.
9. Nath S, Mukherjee P. MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends Mol Med*. 2014;20(6):332–342. doi: 10.1016/j.molmed.2014.02.007.
10. Levitin F, Stern O, Weiss M, et al. The MUC1 SEA module is a self-cleaving domain. *J Biol Chem*. 2005;280(39):33374–33386. doi: 10.1074/jbc.M506047200.
11. Hattrup CL, Gendler SJ. Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Annu Rev Physiol*. 2008;70:431–457. doi: 10.1146/annurev.physiol.70.113006.100659.
12. Parry S, Hanisch FG, Leir SH, et al. N-Glycosylation of the MUC1 mucin in epithelial cells and secretions. *Glycobiology*. 2006;16(7):623–634. doi: 10.1093/glycob/cwj110.
13. Raina D, Kosugi M, Ahmad R, et al. Dependence on the MUC1-C oncoprotein in non-small cell lung cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2011;10(5):806–816. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-10-1050.
14. Yin L, Kufe D. MUC1-C oncoprotein blocks terminal differentiation of chronic myelogenous leukemia cells by a ROS-mediated mechanism. *Genes Cancer*. 2011;2(1):56–64. doi: 10.1177/1947601911405044.
15. Kyo Y, Kato K, Park YS, et al. Antiinflammatory role of MUC1 mucin during infection with nontypeable Haemophilus influenzae. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012;46(2):149–156. doi: 10.1165/rcmb.2011-0142OC.
16. Zhang L, Vlad A, Milcarek C, Finn OJ. Human mucin MUC1 RNA undergoes different types of alternative splicing resulting in multiple isoforms. *Cancer Immunol Immunother*. 2013;62(3):423–435. doi: 10.1007/s00262-012-1325-2.
17. Imbert-Fernandez Y, Radde BN, Teng Y, et al. MUC1/A and MUC1/B splice variants differentially regulate inflammatory cytokine expression. *Exp Eye Res*. 2011;93(5):649–657. doi: 10.1016/j.exer.2011.08.004.
18. Ilkovitch D, Carrio R, Lopez DM. Mechanisms of antitumor and immune-enhancing activities of MUC1/sec, a secreted form of mucin-1. *Immunol Res*. 2013;57(1–3):70–80. doi: 10.1007/s12026-013-8451-6.
19. Kirwan A, Utratna M, O'Dwyer ME, et al. Glycosylation-based serum biomarkers for cancer diagnostics and prognostics. *Biomed Res Int*. 2015;2015:490531. doi: 10.1155/2015/490531.
20. Wang T, Zheng XJ, Ji YL, et al. Tumour markers in rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. *Clin Exp Rheumatol*. 2016;34(4):587–591.
21. Treon SP, Maimonis P, Bua D, et al. Elevated soluble MUC1 levels and decreased anti-MUC1 antibody levels in patients with multiple myeloma. *Blood*. 2000;96(9):3147–3153.
22. Sahraei M, Roy LD, Curry JM, et al. MUC1 regulates PDGFA expression during pancreatic cancer progression. *Oncogene*. 2012;31(47):4935–4945. doi: 10.1038/onc.2011.651.
23. Kufe DW. MUC1-C oncoprotein as a target in breast cancer: activation of signaling pathways and therapeutic approaches. *Oncogene*. 2013;32(9):1073–1081. doi: 10.1038/onc.2012.158.
24. Новиков В.В., Бабаев А.А., Кравченко Г.А. и др. Растворимые ассоциаты молекул адгезии CD54 и CD18 в сыворотке крови человека // *Иммунология*. — 2008. — Т.29. —№4. — С. 220—223. [Novikov VV, Babayev AA, Kravchenko GA, et al. Soluble associates of adhesion molecules CD54 and CD18 in the human serum. *Immunologija (Moskva)*. 2008;29(4):220–223. (In Russ).]
25. Новиков В.В., Шумилова С.В., Новиков Д.В. и др. Генетическая нестабильность в локусе RS5498 E469K (A/G) гена ICAM-1 у больных раком толстой кишки и молочной железы // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. — 2015. — Т.160. — №12. — С. 783–786. [Novikov VV, Shumilova SV, Novikov DV, et al. Geneticheskaya nestabil'nost' v lokuse RS5498 E469K (A/G) gena ICAM-1 u bol'nykh rakom tolstoi kishki i molochnoi zhelez. *Biull Eksp Biol Med*. 2015;160(12):783–786. (In Russ).]
26. Haddon L, Hugh J. MUC1-mediated motility in breast cancer: a review highlighting the role of the MUC1/ICAM-1/Src signaling triad. *Clin Exp Metastasis*. 2015;32(4):393–403. doi: 10.1007/s10585-015-9711-8.
27. Bitler BG, Menzl I, Huerta CL, et al. Intracellular MUC1 peptides inhibit cancer progression. *Clin Cancer Res*. 2009;15(1):100–109. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1745.
28. Chen JQ, Russo J. Dysregulation of glucose transport, glycolysis, TCA cycle and glutaminolysis by oncogenes and tumor suppressors in cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1826(2):370–384. doi: 10.1016/j.bbcan.2012.06.004.
29. Riganti C, Gazzano E, Polimeni M, et al. The pentose phosphate pathway: an antioxidant defense and a crossroad in tumor cell fate. *Free Radic Biol Med*. 2012;53(3):421–436. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.006.
30. Klinge CM, Radde BN, Imbert-Fernandez Y, et al. Targeting the intracellular MUC1 C-terminal domain inhibits proliferation and estrogen receptor transcriptional activity in lung adenocarcinoma cells. *Mol Cancer Ther*. 2011;10(11):2062–2071. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0381.
31. Kitamoto S, Yokoyama S, Higashi M, et al. MUC1 enhances hypoxia-driven angiogenesis through the regulation of multiple proangiogenic factors. *Oncogene*. 2013;32(39):4614–4621. doi: 10.1038/onc.2012.478.
32. Cardaci S, Ciriolo MR. TCA cycle defects and cancer: when metabolism tunes redox state. *Int J Cell Biol*. 2012;2012:161837. doi: 10.1155/2012/161837.



## КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

***Караулов Александр Викторович***, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заведующий кафедрой клинической иммунологии и аллергологии ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России
**Адрес**: 119991, Москва**,** ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, **тел.:** +7 (495) 6351373, **e-mail**: drkaraulov@mail.ru, **SPIN-код**: 4122-5565, **ORCID**: http://orcid.org/0000-0002-1930-5424

***Гурина Наталья Николаевна***, аспирант кафедры молекулярной биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»
**Адрес**: 603950, Н. Новгород, ГСП-20, пр. Гагарина, д. 23, **тел/факс**: +7 (831) 419-90-64, **e-mail**: natalydz91@gmail.com, **SPIN-код**: 4902-2708, **ORCID**: http://orcid.org/0000-0001-8025-7292

***Новиков Дмитрий Викторович***, кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник Центра молекулярной биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»
**Адрес**: 603950, Н. Новгород, ГСП-20, пр. Гагарина, д. 23, **тел/факс**: +7 (831) 419-90-64, **e-mail**: novikov.dv75@mail.ru, **SPIN-код**: 6801-1613, **ORCID**: http://orcid.org/0000-0001-7049-6935

***Фомина Светлана Григорьевна***, кандидат биологических наук, научный сотрудник Центра молекулярной биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»
**Адрес**: 603950, Н. Новгород, ГСП-20, пр. Гагарина, д. 23, **тел/факс**: +7 (831) 419-90-64, **e-mail**: svetafor22@mail.ru, **SPIN-код**: 4242-9550, **ORCID**: http://orcid.org/0000-0002-6610-1774

***Новиков Виктор Владимирович***, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой молекулярной биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»
**Адрес**: 603950, Н. Новгород, ГСП-20, пр. Гагарина, д. 23, **тел/факс**: +7 (831) 419-90-64, **e-mail**: mbre@mail.ru, **SPIN-код**: 5492-7871, **ORCID**: http://orcid.org/0000-0002-2449-7213

DOI: 10.15690/vramn705

**Н.В. Александрова[1, 2], М.А. Школьникова[3], В.В. Длин[3], М.Т. Югай[2]**

[1] Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова, Москва, Российская Федерация
[2] Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Москва, Российская Федерация
[3] Научно-исследовательский клинический институт педиатрии имени академика Ю.Е. Вельтищева ГБОУ ВПО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова», Москва, Российская Федерация

# Стимулирование научных исследований в биомедицине. Роль эффективного контракта

***Обоснование***. *Анализ публикационной активности в области биомедицины свидетельствует о незначительном вкладе России в мировой научный продукт. Во многом это связано с недостаточным стимулированием научных сотрудников. Статья описывает российскую систему стимулирования научных исследований, сравнивает ее с зарубежными моделями, формулирует основные недостатки системы поддержки и стимулирования научных исследований в России и вводит понятие «эффективного контракта».* ***Цель*** *— разработка системы мотивации персонала и стимулирования труда работников научно-исследовательских организаций в сфере здравоохранения.* ***Методы***. *Описывается разработка и внедрение эффективного контракта в научно-исследовательском клиническом институте педиатрии имени академика Ю.Е. Вельтищева, где в течение многих лет оплата труда научных сотрудников осуществлялась с учетом занимаемых должностей и не зависела от результатов их научной деятельности.* ***Результаты***. *Эффективный контракт внес существенные изменения в систему учета результатов научной деятельности, установив новые показатели и критерии эффективности. Была разработана балльная оценка результативности научной деятельности, учитывающая публикационную активность, презентационную активность, внедрение результатов научно-исследовательских работ, подготовку научных кадров, диссертационную деятельность и деятельность, приносящую доход. Внедрение эффективного контракта уже на втором году привело к росту числа зарубежных статей, публикаций в журналах с импакт-фактором более 2, общему увеличению числа работ в рецензируемых журналах с импакт-фактором более 0,3, росту количества изданий на одного научного сотрудника, повышению индекса Хирша как отдельных сотрудников, так и всего института, росту грантовой активности и активизации презентационной активности на профессиональных конгрессах. При этом рост публикационной и презентационной активности был достигнут на фоне уменьшения числа научных сотрудников на 23%. Экономически это выразилось в перераспределении ресурсов в пользу более эффективных исследователей.* ***Заключение***. *Внедрение эффективного контракта и повышение требований к качеству научных работ не вызвало сопротивления персонала, хотя и потребовало времени для совместной выработки критериев научным сообществом, а также разработки и внедрения компьютерной системы непрерывного объективного учета научной продукции.*

***Ключевые слова****: биомедицинские исследования, компенсация, методы оплаты, эффективный контракт.*
*(****Для цитирования****:* Школьникова М.А., Александрова Н.В., Длин В.В., Югай М.Т. Стимулирование научных исследований в биомедицине. Роль эффективного контракта. *Вестник РАМН.* 2016;71(5):397–405. doi: 10.15690/vramn705)



**N.V. Aleksandrova[1, 2], M.A. Shkolnikova[3], V.V. Dlin[3], M.T. Yugay[2]**

[1] Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation
[2] Higher School of Economics, Moscow, Russian Federation
[3] Veltishev Research and Clinical Institute for Pediatrics at the Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

# Stimulation of Research in Biomedicine. Role of Effective Contract

***Background****: Analysis of publication activity in the field of biomedicine shows insignificant input of Russia in the world scientific product. This is largely due to the lack of incentives for researchers. Article describes stimulation of researchers in Russia, compares it with foreign models, formulates main shortcomings of support and stimulation of research in Russia and introduces the concept of effective contract.* ***Aims****: Development of personnel motivation and stimulation of employees of scientific and research organizations in the field of health.* ***Materials and methods****: As a successful experience the article describes the implementation of effective contract in Veltishev Research and Clinical Institute for Pediatrics where for years remuneration of researchers depended upon their positions without consideration of research results. Effective contract brought significant changes in the traditional system setting new performance and efficiency criteria. New evaluation system took into account publication activity, presentation activity, implementation of research results, raising scientific personnel, thesis work and income-generating activities.* ***Results****: Introduction of effective contract already in the second year led to a rise in the number of foreign publications, publications in journals with impact factor of more than 2, the general increase in the number of articles in peer-reviewed journals with impact factor more than 0.3, the growth of the number of articles by 1 researcher, Hirsch index improving both by individual employees and the entire Institute, increase of grant activity and presentation activity at top-rated professional congresses. The growth of publication and presentation activities has been achieved at the reduction of research staff by 23%. From financial viewpoint effective contract resulted in the redistribution of resources in favour of more efficient researchers.* ***Conclusions****: The introduction of effective contract and increase of requirements for scientific output did not cause resistance of staff, although demanded certain time for joint development of criteria by scientific community, as well as the development and implementation of soft for continuous assessment of research activity.*

***Key words****: biomedical research, compensation, payment method, effective contract.*
*(****For citation****:* Aleksandrova NV, Shkolnikova MA, Dlin VV, Yugay MT. Stimulation of Research in Biomedicine. Role of Effective Contract. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2016;71(5):397–405. doi: 10.15690/vramn705)

## Обоснование

Эффективное развитие любой национальной экономики существенно зависит от состояния, направленности и обеспеченности развития научной и инновационной деятельности. Недостаточные темпы развития отечественной науки во многом обусловлены отсутствием рынка актуальных научно-методических инноваций. Неизбежным следствием этого стало заметное снижение значимости отечественных научных исследований в международном научном сообществе.

Одним из показательных способов оценки состояния научных исследований любого научно-исследовательского учреждения является анализ публикационной активности его сотрудников [1]. В 2011 г. доля российских публикаций по клинической медицине в базе данных Web of Science составляла всего 0,56% от общемирового объема медицинских журнальных статей. В 2014 г. этот показатель немного увеличился — до 0,59%, а Россия по количеству национальных публикаций, проиндексированных в Web of Science, заняла только 31-ю позицию, уступая не только странам — научным лидерам, но даже таким государствам с относительно небольшим населением, как Греция, Дания (рис. 1).

В 2011 г. наибольший вклад в международный сегмент российского публикационного потока в области медицины вносили кардиологи, психологи и неврологи. К 2014 г. заметно возросла доля статей в Web of Science с участием российских авторов, ведущих исследования в области иммунологии, ревматологии, урологии, гинекологии, медицинской информатике. При этом увеличилось наше присутствие в международном публикационном сегменте практически по всем медицинским направлениям. Однако в целом все показатели остались на достаточно низком уровне и не превышают 2% [2].

Сравнение публикационной активности авторов из разных стран (на основании баз данных Scopus и Web of Science) показывает, что количество публикаций российских исследователей в области биомедицины в 20–65 раз меньше, чем американских, и в 4–11 раз меньше, чем китайских. Среднее число цитирований в расчете на одну российскую работу уступает по этому показателю работам американских авторов в 5–6 раз, но близко к числу цитирований для публикаций работ китайских исследователей.

Расходы на здравоохранение ежегодно растут практически во всех странах мира, при этом во многих из них — темпами, опережающими рост валового внутреннего продукта. Важнейшим фактором, определяющим структуру расходов на здравоохранение в развитых странах, является устойчивый спрос на новое, более высокое качество жизни с учетом фактора «старения населения». Этот фактор характеризуется ростом числа людей с хроническими неинфекционными заболеваниями (сердечно-сосудистыми, онкологическими, диабетом, остеопорозом и др.). Расходы на лечение для пациентов в возрасте старше 65 лет в 3–8 раз выше, чем для пациентов в возрасте до 45 лет. При этом особое значение приобретает развитие биомедицинских технологий и медицинской науки, поскольку оно является основой лечения и профилактики хронических неинфекционных заболеваний, начиная с детского возраста.

Таким образом, со всей неизбежностью следует ожидать, что рост расходов на здравоохранение продолжится, сопровождаясь и увеличением спроса на новое, более высокое качество жизни. В условиях ограниченности бюджетных ресурсов, выделяемых на развитие медицины (при необходимости удовлетворения спроса населения на более высокое качество жизни), основным способом сдерживания расходов при одновременном удовлетворении спроса на качество жизни является развитие и внедрение новых эффективных биомедицинских технологий, направленных на предупреждение, раннюю диагностику, эффективное лечение и реабилитацию.

В России бюджетное финансирование исследований и разработок распределяется в форме так называемого базового (финансирование по смете, предоставляемое для выполнения исследований и разработок в рамках го-



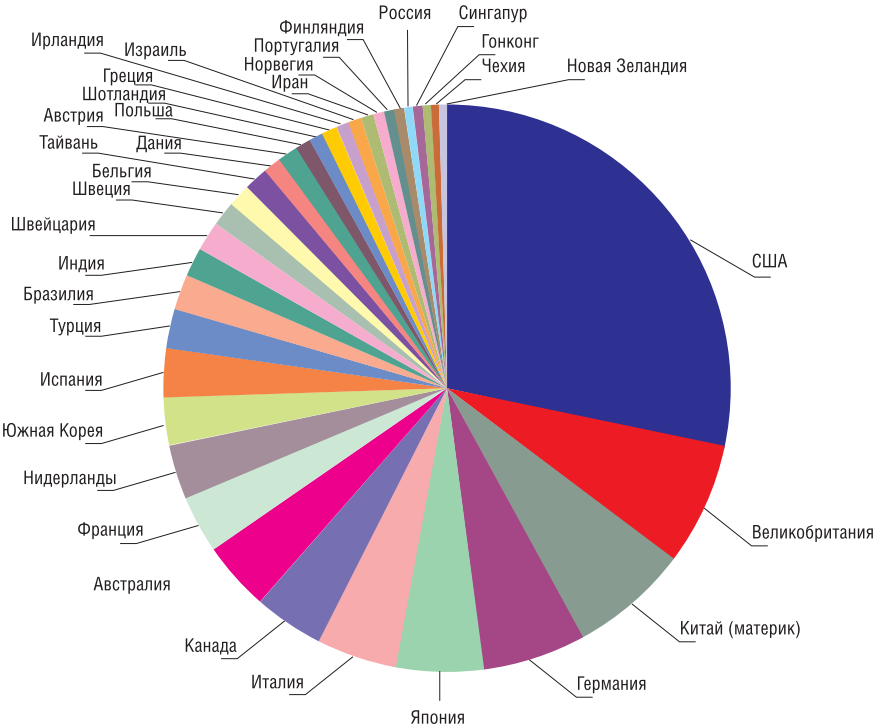



**Рис. 1.** Топ-35 стран мира с самым большим количеством публикаций по клинической медицине в 2014 г. в Web of Science (данные InCites, актуальные на 08.05.2015)

сударственного задания), программного финансирования и финансирования на основе грантов.

В целом, существующая в России система базового финансирования государственных заданий обеспечивает очень умеренную, если не сказать слабую, «базовую» поддержку исследований, позволяющую лишь сохранить, но не развить инфраструктуру. Она создает условия для некоторой стабильности, однако не способствует развитию биомедицинских исследований. При этом базовое финансирование имеет ряд ограничений:

- не учитывает проектный конкурсный подход, способствующий финансированию исследований с учетом их актуальности, реализуемости и перспективности;
- не обеспечивает исследования необходимыми расходными материалами и оборудованием, так как финансовые средства выделяются преимущественно на заработную плату;
- не является адресным (финансовые средства выделяются в целом на организацию, а не на отдельное включенное в государственный заказ исследование).

Создание условий для достижения научных результатов в принципиально новой рыночной среде требует также совершенствования системы социального, экономического и правового взаимодействия между государством, работодателями и научными работниками [3].

Экономическая сущность контрактного оформления труда заключается в мотивации работников к достижению определенных результатов, исходя из личных интересов и внутренних мотивов. Применение экономических рычагов стимулирования труда в сфере научной деятельности основывается на таких материальных стимулах, как должностные оклады, надбавки и доплаты, премии, авторские гонорары и вознаграждения. Способы материального стимулирования труда научных работников должны учитывать затраты труда. Необходимо продолжать поиск новых практических подходов к мотивации научных работников с постепенным отходом от оплаты за деятельность и максимально возможному приближению к оплате за результат [4].

Ожидаемыми результатами реализации «эффективного контракта» в науке являются:

- повышение публикационной и изобретательской активности российских исследователей на международном уровне;
- создание развитой системы инструментов финансирования науки на конкурсной основе;
- создание функционирующей сети исследовательских лабораторий, работающих под руководством ведущих ученых;
- повышение заработной платы научных работников к 2018 г. до уровня 200% от средней заработной платы в соответствующем регионе.

В последние годы ведущие российские научные институты разрабатывают и внедряют собственные системы эффективных контрактов, однако у участников этого процесса остается множество вопросов: как правильно измерить эффективность научных исследований, зачем нужен новый тип трудовых отношений, и, наконец, как такая система отразится на положении научных работников и научных институтов [5].

### *Зарубежный опыт контрактных отношений в сфере науки*

Ключевым механизмом поддержки сектора биомедицинской науки в развитых странах мира является целевое финансирование на основе грантов. В США главным распорядителем федеральных средств на биомедицинские исследования (96% более чем из 29 млрд долларов в 2013 г.) является агентство «Национальные институты здравоохранения» (National Institutes of Health, NIH). Особенностью поддержки исследований в Германии является ее многоканальность: государственная поддержка осуществляется за счет «базового» финансирования университетов и научных институтов, а также через системы грантов крупных научных обществ [6]. Значительная поддержка предоставляется различными европейскими программами, в том числе рамочными программами Евросоюза. Например, в настоящее время разворачивается финансирование в рамках программы «Горизонт-2020». Поддержка со стороны негосударственных фондов осуществляется фармацевтическими и биомедицинскими компаниями, которые в последние годы все больше ориентируются на кооперацию с университетами и научными центрами, и меньше — на развитие собственных инноваций (Research and Development, R&D), а также с благотворительными организациями, которые предоставляют именные стипендии и гранты на исследования и разработки.

Приведенные примеры иллюстрируют разные модели стимулирования научных исследований, различающиеся главным образом по степени централизации и наличию или отсутствию специализации в области биомедицины. Для всех упомянутых моделей характерен проектный подход к финансированию, предполагающий большое количество целевых моделей, таких как программы поддержки инициативных и тематических исследований, кооперации, поддержки молодых исследователей и карьерного роста, международного сотрудничества, инфраструктуры, рискованных и прочих пилотных проектов.



В Германии, Японии и США условия и продолжительность контракта для научных сотрудников строги, полностью ясны и содержат рутинные процедуры обновления кадров научных сотрудников [5]. При этом существует устойчивая практика заключения контрактов на академические позиции с сотрудниками, имеющими высокую ученую степень. Наличие степени доктора, раньше представлявшее обязательное требование к кандидатам на все академические позиции только в Австралии, Канаде, Европе и США, сейчас становится требованием к кандидатам на должности в исследовательских университетах практически повсеместно [7]. Как правило, научные институты самостоятельно определяют, когда открывать вакансии, как о них информировать, и как они будут заполняться. И только в немногих странах, например во Франции, все кандидаты сначала проходят отбор на национальном уровне (т.е. кандидатура рассматривается Национальной комиссией), а затем лица, прошедшие отбор, рассматриваются как кандидаты на академическую позицию в конкретном научном или учебном учреждении.

В некоторых развитых странах (Австралия, Канада, Япония, Франция, Германия и др.) заработная плата без каких-либо надбавок и льгот позволяет научным сотрудникам на полной ставке поддерживать уровень жизни, соответствующий среднему классу. Израильские преподаватели могут повысить свою зарплату более чем на 13% благодаря научным достижениям [8]. Ведущие китайские университеты устанавливают значительные надбавки за статьи, опубликованные в известных рецензируемых журналах. Все эти программы, несомненно, поощряют высокие академические результаты.

В ряде стран (Австралия, Великобритания) факторами, стимулирующими качество исследований, являются не только гранты, но также и прямое финансирование научных учреждений. Распределение субсидий прово-

дится на конкурсной основе и напрямую зависит от оценки качества результатов, выполняемых научно-исследовательских проектов в учреждении, т.е. механизм схож с грантовым финансированием. Так, например, в Великобритании финансирование учреждений науки зависит от качества научных исследований учреждения. Совет по финансированию высшего образования Англии (Higher Education Funding Council for England, HEFCE) предоставляет единовременную субсидию с целью поддержки инфраструктуры и разработок учреждений системы высшего образования в соответствии с их стратегией и приоритетами развития. Каждое учреждение проходит процедуру оценки и получает свой профиль качества: таким образом распределяется более 60% всех средств на научно-исследовательскую деятельность [9]. Остальные средства распределяются между учреждениями на основании конкурсного отбора. В конечном итоге практически все механизмы финансирования научных организаций соотносятся с качеством работы организации, а оценка научных исследований выступает как инструмент стимулирования этого качества.

Конкурсный механизм в большей степени помогает независимо оценить результаты научной деятельности учреждения, которое должно быть лучшим в «своей» области, выполнять научно-исследовательские работы на высоком уровне и обладать соответствующей репутацией как в профессиональной среде, так и среди потенциальных заказчиков. Анализ методик оценки вузов и научных институтов в мировых и национальных рейтингах, таких как Academic Ranking of World Universities, Times Higher Education World University Rankings, QS World University Rankings и Минобрнауки, позволил выделить три группы показателей, которые в большей степени влияют на позиции вузов и научных институтов. Первая группа показателей оценивается по научным результатам и учитывает количество статей, опубликованных в журналах, размещенных в международных базах данных, а также индекс цитирований и т.д. Во вторую группу, которая представляет собой результаты образовательной деятельности, включены такие показатели, как отношение защищенных диссертаций к численности преподавательского состава, количество иностранных магистрантов, аспирантов, докторантов и т.д. К третьей группе относятся показатели, оценивающие академическую репутацию научного института.



Таким образом, для оценки научной деятельности научных сотрудников необходимо выделить показатели, совпадающие со стратегической целью учреждения. Разработка таких показателей позволяет выстроить рейтинг наиболее эффективных сотрудников.

**Цель исследования**: разработка системы мотивации персонала и стимулирования труда работников научно-исследовательских организаций в сфере здравоохранения.

## Методы

В качестве одного из примеров стимулирования научной деятельности предлагается опыт внедрения эффективного контракта в Научно-исследовательском клиническом институте педиатрии имени академика Ю.Е. Вельтищева РНИМУ им. Н.И. Пирогова (далее Институт). Основные виды деятельности Института — оказание специализированной, в том числе высокотехнологичной, помощи детям с хроническими заболеваниями с использованием экспертного потенциала научных школ, а также разработка новых эффективных принципов и методов диагностики и лечения этих заболеваний. Научные отделы Института возглавляются известными в России и за ее пределами учеными в области педиатрии, которые в тесном контакте с врачами координируют лечебную работу и руководят прикладными научными исследованиями в профильных направлениях. Такое содружество науки и практического здравоохранения повышает эффективность оказания специализированной помощи сложным категориям больных, что отражается в высокой ежегодной востребованности данной клинической базы более чем в 80 регионах Российской Федерации.

На протяжении почти 90-летней истории существования Института оплата труда научных сотрудников осуществлялась на основе занимаемых должностей и не зависела от результатов их научной деятельности, что не способствовало стимулированию научной активности. В то же время в советский период длительное время заработная плата научных сотрудников была достаточной для поддержания уровня жизни среднего класса и даже выше, что само по себе, наряду с высокой престижностью научной работы, оказывало стимулирующий эффект на научных работников. В последние два десятилетия ситуация изменилась: требования к качеству научного продукта возросли, а уровень жизни ученых снизился. Все это потребовало разработки системы мотивации к повышению качества исследований и росту научной активности, в том числе и грантовой. Более важное значение приобрели в этих условиях научная репутация и ее объективные критерии — индекс Хирша, цитирование в Web of Science и Scopus и др. Эти цели были поставлены при внедрении эффективного контракта для экономического стимулирования научных сотрудников на достижение наилучших научных результатов, причем в наиболее значимых направлениях — публикационной, презентационной активности, внедрении и подготовке научных кадров.

На первом этапе при разработке эффективного контракта были внесены существенные изменения в традиционную систему учета результатов научной деятельности. Ученым советом Института были приняты новые показатели и критерии оценки эффективности, согласно которым при анализе эффективности публикационной и внедренческой деятельности научного сотрудника учитываются следующие достижения: монографии, клинические рекомендации, методические рекомендации, руководства для врачей; учебники и учебные пособия; главы (разделы) в монографиях, руководства для врачей, учебники, научные статьи в рецензируемых российских и зарубежных журналах; тезисы зарубежных конференций, опубликованные в международных рецензируемых научных изданиях; дипломы на открытия и авторские свидетельства на изобретения, патенты на изобретения, свидетельства на полезную модель, патенты на промышленный образец и т.д.; заявки, поданные на грантовое финансирование. Была разработана балльная оценка результативности научной деятельности, основанная на следующих принципах:

- баллы начисляются по результатам анализа публикационной активности работника за предыдущий год;
- баллы начисляются независимо от занимаемой должности и доли занятости при условии, что результаты научной деятельности оцениваются однократно и не дублируются в других учреждениях, где сотрудник может работать по совместительству;
- обязательна верификация публикаций: представление оригинала или ксерокса публикации, характеристика журнала с обязательным указанием импакт-фактора.

В табл. приведены данные о количестве баллов, начисляемых в соответствии с критериями оценки научных сотрудников.

Общее количество набранных баллов определяет эффективность научного сотрудника.

- менее 10 баллов — неудовлетворительная (очень низкий рейтинг);
- 10–20 баллов — удовлетворительная (низкий рейтинг);
- 20–40 баллов — хорошая (средний рейтинг);
- более 40 баллов — отличная (высокий рейтинг).

**Таблица.** Критерии оценки эффективности работы научного сотрудника (в баллах)

| № | Критерии оценки | Количество баллов |
|---|---|---|
| **1-й критерий — ПУБЛИКАЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ** | | |
| 1 | Статья в российском журнале, индексируемом в РИНЦ, Web of Science, Scopus с ИФ менее 0,3 | 0,5* |
| 2 | Статья в российском журнале, индексируемом в РИНЦ, Web of Science, Scopus с ИФ более 0,3 | 1,0* |
| 3 | Статья в зарубежном рецензируемом журнале, индексируемом в Web of Science, Scopus с ИФ менее 2,0 | 4,0* |
| 4 | Статья в зарубежном рецензируемом журнале, индексируемом в Web of Science, Scopus с ИФ более 2,0 | 6,0* |
| 5 | Тезисы в зарубежном рецензируемом журнале, индексируемом в Web of Science, Scopus | 1,0* |
| 6 | Глава в монографии, учебнике, руководстве и других научных изданиях на русском языке | 1,0* |
| 7 | Монография, учебник, руководство и другое научное издание на русском языке (авторских листов более 7) (титульный автор) | 8,0* |
| 8 | Глава в зарубежной монографии, учебнике, руководстве и других научных изданиях | 6,0* |
| 9 | Зарубежная монография, учебник, руководство и др. научное издание (авторских листов более 7) (титульный автор) | 15,0* |
| 10 | Брошюра, клинические рекомендации, методические рекомендации, учебное пособие | 1,5* |
| **2-й критерий — ПРЕЗЕНТАЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ<br>Участие в работе конгрессов, конференций, семинаров, круглых столов и т.д.** | | |
| 1 | Доклад, лекция на международных научных мероприятиях: всемирные и европейские конгрессы и конференции; мероприятия, организуемые международными профессиональными ассоциациями | 2,0* |
| 2 | Стендовые доклады на международных научных мероприятиях: всемирные и европейские конгрессы и конференции; мероприятия, организуемые международными профессиональными ассоциациями | 1,0* |
| 3 | Доклад на научных мероприятиях всероссийского масштаба, Содружества Независимых Государств и стран ближнего зарубежья | 1,0* |
| 4 | Стендовые доклады на всероссийских научных мероприятиях, конгрессах стран Содружества Независимых Государств и стран ближнего зарубежья | 0,5* |
| **3-й критерий — ВНЕДРЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ НИР** | | |
| 1 | Автор (соавтор) изобретения (патента), свидетельства на полезную модель; патенты на промышленный образец | 8,0* |
| **4-й критерий — ПОДГОТОВКА НАУЧНЫХ КАДРОВ, ДИССЕРТАЦИОННАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ** | | |
| 1 | Подготовка рецензий:<br>на кандидатскую диссертацию<br>докторскую диссертацию | <br>1,0*<br>1,5* |
| 3 | Подготовка заключения ведущей организации на диссертационное исследование | 1,0* |
| 4 | Выступление оппонентом по кандидатской или докторской диссертации | 1,0* |
| 5 | Научное руководство кандидатской диссертации (защищена и получено удостоверение) | 8,0* |
| 6 | Научное консультирование докторской диссертации (защищена и получено удостоверение) | 10,0* |
| **5-й критерий — ПРИНОСЯЩАЯ ДОХОД ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ** | | |
| 1 | НИР (приносящая доход), клинические исследования фармпрепаратов и изделий медицинского назначения | 5,0** |
| 2 | Подача заявки на российский грант | 2,0 |
| 3 | Получение российского гранта | 5,0 |
| 4 | Подача заявки на зарубежный грант | 5,0 |
| 5 | Получение зарубежного гранта | 10,0** |

*Примечание*. * — баллы начисляются ежегодно по итогам года, ** — баллы начисляются однократно при переходящем проекте на следующий год. ИФ — импакт-фактор, НИР — научно-исследовательская работа, РИНЦ — российский индекс научного цитирования.

## Результаты

Внедрение эффективного контракта в течение более 1,5 лет (с марта 2014 г.) привело к значимому повышению эффективности научной деятельности Института в соответствии с международными критериями, а также к повышению рейтинга большинства научных сотрудников.

В первую очередь это отразилось на качестве научных публикаций вследствие изменения приоритетов по эффективному контракту: снизилось число публикаций тезисов и журнальных статей в российских нерецензируемых журналах и сборниках наряду с увеличением зарубежных статей и тезисов, а также ростом числа научных публикаций в рецензируемых отечественных журналах со 141 в 2013 г. до 163 в 2015 (рис. 2). При этом следует отметить, что работа была выполнена значительно меньшим числом научных сотрудников, так как с 2013 г. их численный состав сократился на 19 (23%) человек — со 101 в 2013 г. до 82 в 2015.

В 2015 г. также существенно увеличилось количество публикаций в журналах с импакт-фактором 2 и выше по сравнению с 2013 и 2014 гг. (рис. 3).

В 2015 г. произошло снижение числа публикаций в нерецензируемых изданиях за счет перераспределения в пользу публикаций в журналах с импакт-фактором выше 0,3 (рис. 4).

Важным показателем является интенсивность работы научного сотрудника. На рис. 5 видно, что в 2015 г. по сравнению с 2013 и 2014 гг. увеличилось количество статей из расчета на одного научного сотрудника.



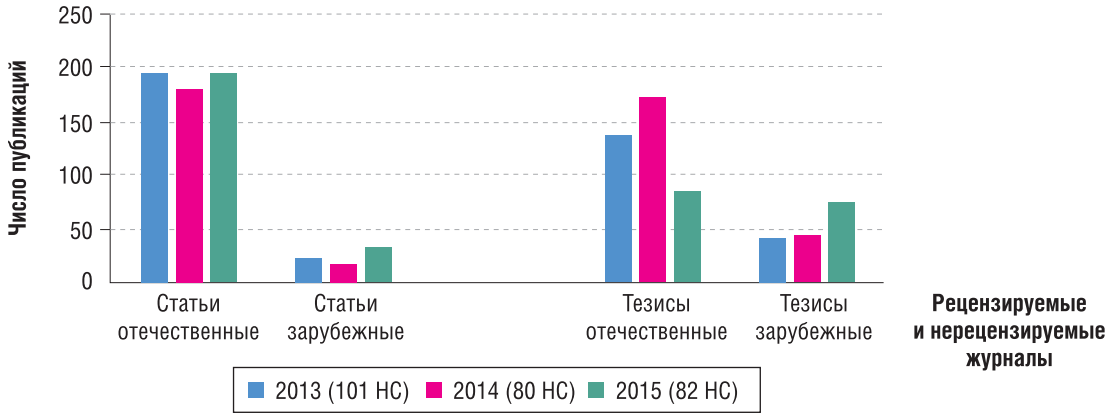



**Рис. 2.** Сравнительные данные публикационной активности научных сотрудников (НС) Института в 2013, 2014 и 2015 гг.

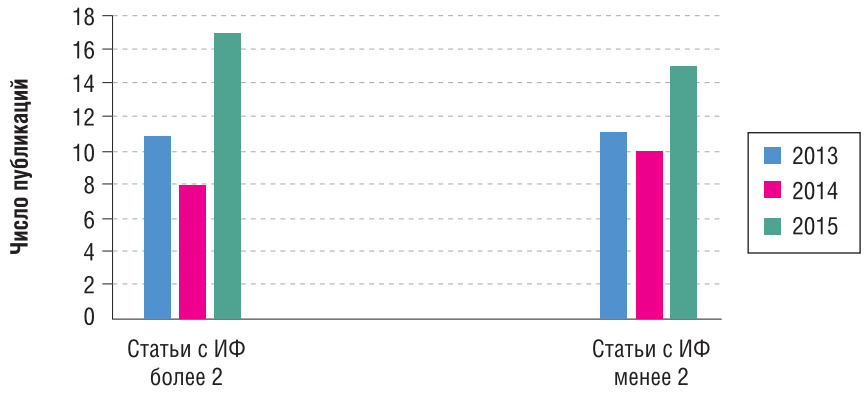



**Рис. 3.** Сравнительные результаты публикационной активности научных сотрудников Института в зарубежных изданиях

*Примечание*. ИФ — импакт-фактор.

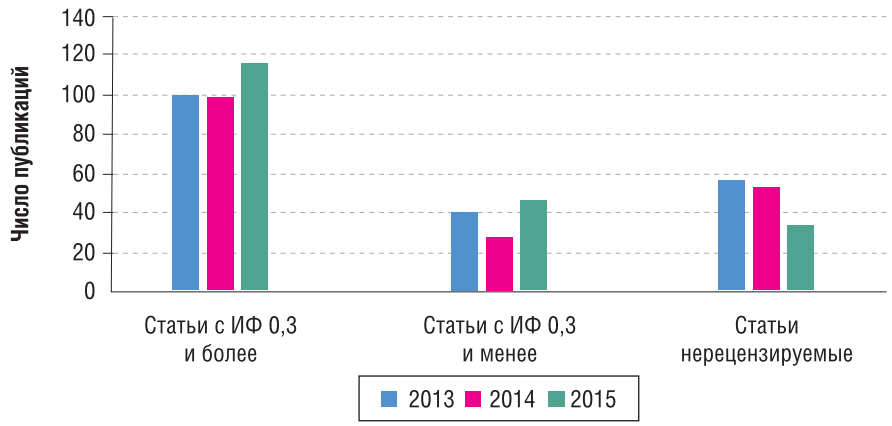



**Рис. 4.** Сравнительные данные публикационной активности научных сотрудников Института в отечественных изданиях

*Примечание*. ИФ — импакт-фактор.

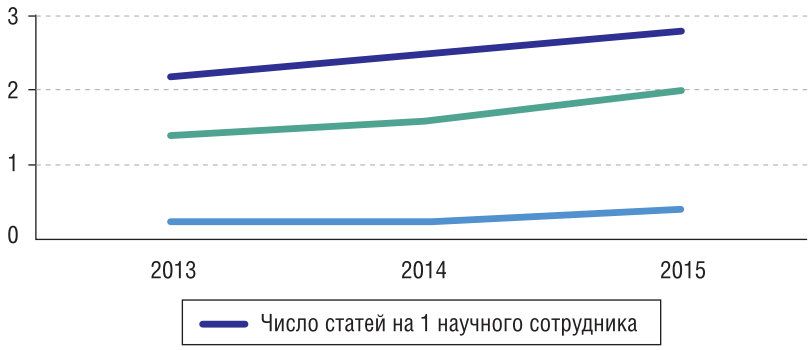



**Рис. 5.** Динамика публикационной активности на одного научного сотрудника Института

Параллельно с увеличением публикационной активности научных сотрудников у них увеличился индекс Хирша, что, хотя и не является непосредственным результатом роста публикаций в краткосрочной перспективе, косвенно влияет на цитируемость авторов в связи с ростом их публикаций в высокорейтинговых изданиях. Так, у руководителей научных отделов средний индекс Хирша в 2013 г. был 7,6, в 2014 — 9,5, а в 2015 — уже 11,3. Это также отразилось на индексе Хирша Института в целом. Если в 2013 г. индекс Хирша Института был 19, то в 2014 — 36, а в 2015 — уже 44, то есть за 2 года индекс Хирша Института вырос на 25 единиц. При этом до введения эффективного контракта рост индекса Хирша Института составлял в среднем 1–2 единицы в год.

За 2014–2015 гг. сотрудники Института публиковались в таких изданиях, как Lancet (ИФ 24,725), Circulation (ИФ 14,43), European Journal of Epidemiology (ИФ 5,147), European Journal of Human Genetics (ИФ 4,225), Human Mutation (ИФ 5,02), Orphanet Journal of Rare Diseases (ИФ 3,96), Nephrol Dial Transplant (ИФ 3,396), Molecular Cytogenetics (ИФ 2,66), Statistics and Medicine (ИФ 2,037).

После внедрения эффективного контракта отмечен рост грантовой активности. Если до 2014 г. в российские фонды (РНФ, РФФИ) ежегодно подавалось не более 1–2 заявок, то в 2014 г. были поданы 9 заявок, а в 2015 г. — 15, из них 4 были приняты, и получено грантовое финансирование, что привело к развитию новых научных направлений в работе Института, повышению финансовой заинтересованности научных сотрудников, дальнейшему повышению активности по написанию новых грантов, увеличению количества действующих грантов в 2 раза (рис. 6).



Активизировалась и презентационная активность на профессиональных конгрессах. Так, количество отечественных докладов и лекций на всероссийских мероприятиях увеличилось по сравнению с 2013 г. в 1,3 раза, при этом пропорционально снизилось количество презентаций на региональных и муниципальных мероприятиях, что говорит об изменении приоритетов у научных сотрудников (рис. 7).

Таким образом, внедрение эффективного контракта среди научных работников а Института уже на втором

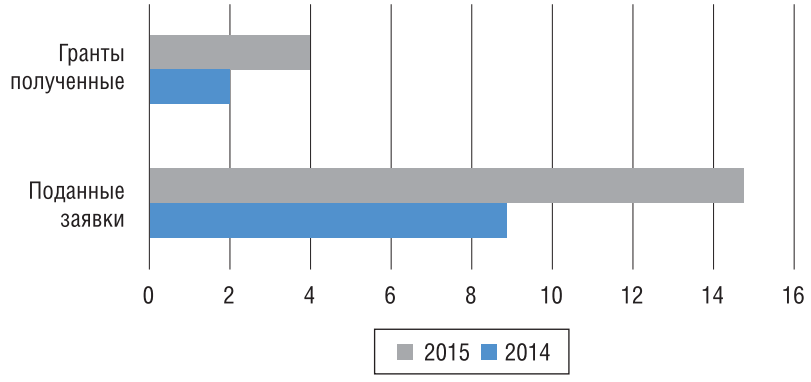



**Рис. 6.** Сравнительные данные грантовой активности научных сотрудников Института

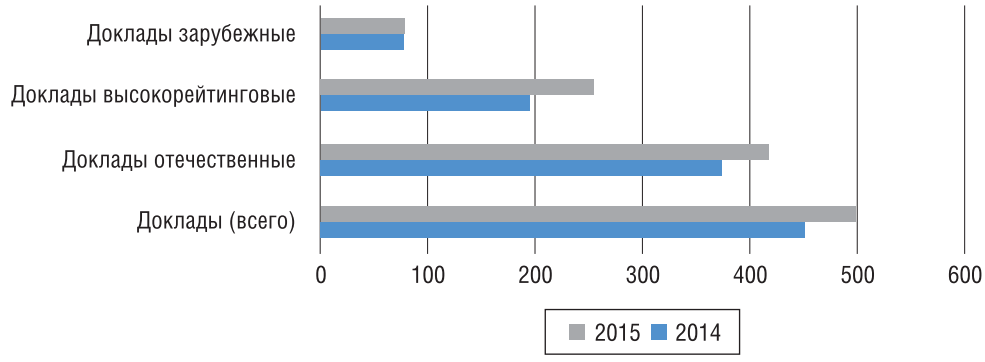



**Рис. 7.** Сравнительные данные презентационной активности научных сотрудников Института на отечественных, включая всероссийские, и зарубежных мероприятиях

году привело к росту зарубежных публикаций, и прежде всего в журналах с импакт-фактором более 2, общему росту числа статей в рецензируемых журналах с импакт-фактором более 0,3, повышению активности научных сотрудников в участии во всероссийских и зарубежных конференциях и конгрессах. Все это сопровождалось ростом рейтинга научных сотрудников и Института в целом.

Следует отметить, что такой рост публикационной и презентационной активности был достигнут на фоне сокращения числа научных сотрудников на 23%, произошедшего в основном за счет самостоятельного увольнения лиц с крайне незначительной научной активностью. Экономически это выразилось в перераспределении ресурсов в пользу более эффективных исследователей. На фоне роста презентационной активности на общероссийских и международных научных форумах сократилось число выступлений профессоров Института на локальных конференциях с небольшим числом участников, не требующих обязательного включения в доклады инновационных составляющих. Эти выступления стали с успехом заменяться дистанционной формой обучения, которая позволила экономить рабочее время. Внедрение данной формы эффективного контракта с повышением требований к качеству научной продукции было воспринято научной общественностью положительно, и научные сотрудники Института активно принимали участие в разработке как самих критериев эффективного контракта, так и компьютерной системы непрерывного объективного учета научной продукции.



## Обсуждение

Анализ мирового опыта стимулирования научных исследований и опыта внедрения эффективного контракта демонстрирует, что для стимулирования научных исследований необходимы:

- четко прописанные (как вариант в трудовом контракте) минимумы обязательной работы. При несоблюдении минимума, как вариант, контракт может заключаться только на год и не возобновляться при повторном невыполнении минимума (соответственно, количество статей, повышение квалификации и прочее учитывается только при выполнении дополнительных, сверхобязательных объемов работ);
- построение эффективного контракта преимущественно на системе заслуг, а не штрафов, с применением объективных релевантных критериев;
- построение эффективного контракта с научными сотрудниками на основе небольшого числа понятных критериев, объединенных в группы (например, публикационная активность, презентационная активность, грантовая активность), в рамках которых должны быть четко прописаны все варианты критериев с указанием веса в баллах или иных единицах;
- показатели личных достижений научных сотрудников должны быть формализованы в таблицах по итогам года и лично каждым сотрудником на внутреннем (локальном) сайте (через рабочий кабинет) в течение года;
- при балльной оценке рассчитывается «стоимость» одного балла исходя из финансирования раздела «Наука» и определяется сумма баллов сотрудника для расчета стимулирующей выплаты на текущий год по итоговым оценкам эффективного контракта за предшествующий период. Фонд стимулирующих выплат по эффективным контрактам, как правило, не делится по научным подразделениям, так как это может привести к системе несправедливого материального поощрения, поскольку «эффективно работающие» научные сотрудники могут распределяться по подразделениям неравномерно.

К выработке критериев балльной оценки эффективности научной работы рекомендуется привлекать научное сообщество Института, что позволит добиться консенсуса и облегчит внедрение эффективного контракта в учреждении. Впоследствии эти баллы переводятся в денежный эквивалент для расчета стимулирующих выплат научным сотрудникам.

Информационная система является наиболее эффективной моделью для сбора, анализа и обработки данных. Она позволяет проводить учет результатов научно-исследовательской деятельности сотрудников в структурных подразделениях научных институтов в оперативном порядке. В течение года научные сотрудники через личный кабинет вносят в информационную систему результаты своей деятельности, прикрепляют подтверждающие документы. Достоверность представленной информации о результатах научно-образовательной деятельности контролируется руководителями структурных подразделений. Благодаря системе эффективного контракта может быть проведен разносторонний анализ эффективности различных направлений научной деятельности. Система учета и анализа рейтинговых показателей научных сотрудников позволяет отслеживать как количество, так и качество публикаций.

На основе полученных данных может быть проведен анализ как деятельности научных институтов в целом, так и любого структурного подразделения, а также индивидуального вклада научного сотрудника в общий рейтинг.

Благодаря мониторингу, который включает в себя сбор данных, их анализ, определение минимума и максимума, а также составление перечня наиболее эффективных научных сотрудников, можно выделить ряд показателей с низкими критическими значениями и разработать меры по их преодолению.

Таким образом, в эффективном контракте научного сотрудника, равно как и в эффективных контрактах других работников системы образования и здравоохранения, желательно точно и конкретно обозначить трудовые функции работников, показатели и критерии оценки эффективности их деятельности, что должно соотноситься с размерами вознаграждения в виде стимулирующих выплат, а также с размерами поощрения за достижение коллективных результатов труда.

## Заключение

Приведенный пример эффективного контракта в науке показал свою результативность и уже за короткий период времени привел к повышению рейтинга ученых и Института в целом и при этом нашел активную поддержку у научных сотрудников. Все это позволяет считать предложенный инструмент оценки результатов научной деятельности адекватным, а апробированные научным сообществом научно-исследовательского медицинского института критерии — эффективными.

## Источник финансирования

Поисково-аналитическая работа и подготовка статьи проведена за счет личных средств авторов.

## Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

## ЛИТЕРАТУРА


1. Waltman L, van Raan AFJ, Smart S. Exploring the relationship between the engineering and physical sciences and the health and life sciences by advanced bibliometric methods. *PLoS ONE*. 2014;9(10):e111530. doi: 10.1371/journal.pone.0111530.
2. Куракова Н.Г., Цветкова Л.А., Черченко О.В. и др. Оценка вклада отдельных областей клинической медицины в интегральный публикационный поток РФ, проиндексированный в Web of Science и Scopus // *Менеджер здравоохранения*. — 2015. — №7 — С. 41–53. [Kurakova NG, Tsvetkova LA, Cherchenko OV, et al. Evaluation of contributions of specific areas of clinical medicine to Russian integral publication flow, indexed in Web of Science and Scopus. *Menedzher zdravookhraneniya*. 2015;(7):41–53. (In Russ).]
3. Боровская М.А., Масыч М.А., Бечвая М.Р. Анализ системы оплаты труда преподавателей вузов // *Высшее образование в России*. — 2013. — №2 — С. 3–8. [Borovskaya MA, Masych MA, Bechvaya MR. Analysis of compensation systems of higher education institutions employees. *Vysshee obrazovanie v Rossii*. 2013;(2):3–8. (In Russ).]
4. *Индикаторы науки: 2013. Статистический сборник*. — М.: ВШЭ; 2013. [*Indikatory nauki: 2013. Statisticheskii sbornik*. Moscow: VShE; 2013. (In Russ).] Доступно по https://www.hse.ru/primarydata/in Ссылка активна на 12.11.2016.
5. *Как платят профессорам. Глобальное сравнение систем вознаграждения и контрактов* / Под ред. Ф. Альтбаха, Л. Райсберг, М. Юдкевич и др. — М.: ВШЭ; 2012. — 35 с. [*Kak platyat professoram. Global'noe sravnenie sistem voznagrazhdeniya i kontraktov*. Ed by Al'tbakh F., Raĭsberg L., Yudkevich M., et al. Moscow: VShE; 2012. 35 p. (In Russ).]
6. Калятин В.О., Наумов ВБ, Никифорова Т.С. Опыт Европы, США и Индии в сфере государственной поддержки инноваций // *Российский юридический журнал*. — 2011. — №1. — С. 171–183. [Kalyatin VO, Naumov VB, Nikiforova TS. Experience of Europe, the USA and India in the field of innovations' state support. *Rossiiskii yuridicheskii zhurnal*. 2011;(1):171–183. (In Russ).]
7. Rumbley L, Pacheco I, Altbach PG. *International comparison of academic salaries: An exploratory study*. Chestnut Hill. MA: Boston College Center for International Higher Education; 2008.
8. Altbach PhG, Reisberg L, Rumbley LE. *Trends in global higher education: tracking an academic revolution*. Rotterdam: Sence; 2010. P. 272.
9. Яник А.А., Попова С.М. Оценочные методы в управлении государственным сектором науки: опыт Соединенного Королевства // *Государственное управление. Электронный вестник*. — 2014. — №45. — С. 110–147. [Yanik AA, Popova SM. Evaluation methods in management of public sector of science: the UK experience. *Gosudarstvennoe upravlenie. Elektronnyi vestnik*. 2014;(45):110–147. (In Russ).]




## КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ


***Александрова Наталья Владимировна***, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, магистр Национального исследовательского университета «Высшая школа экономики»
**Адрес**: 117997, Москва, ул. академика Опарина, д. 4, **тел**.: + 7 (495) 438-25-38, **e-mail**: alexnat1@yandex.ru,
**SPIN-код:** 2578-0943, **ORCID**: http://orcid.org/0000-0001-7353-9515

***Школьникова Мария Александровна***, доктор медицинских наук, профессор, директор Научно-исследовательского клинического института педиатрии имени академика Ю.Е. Вельтищева ФГБОУ ВПО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова»
**Адрес**: 125400, Москва, ул. Талдомская, д. 2, **тел**.: +7 (495) 484-0292, **e-mail**: m_shkolnikova@pedklin.ru,
**SPIN-код**: 9051-7107, **ORCID**: http://orcid.org/0000-0001-7115-0186

***Длин Владимир Викторович***, доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по научной работе Научно-исследовательского клинического института педиатрии имени академика Ю.Е. Вельтищева ФГБОУ ВПО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова»
**Адрес**: 125400, Москва, ул. Талдомская, д. 2, **тел**.: +7 (499) 488-30-00, **e-mail**: vdlin@pedklin.ru, **SPIN-код**: 4087-1250,
**ORCID**: http://orcid.org/0000-0002-3050-7748

***Югай Михаил Торичеллиевич***, кандидат медицинских наук, старший преподаватель Национального исследовательского университета «Высшая школа экономики»
**Адрес**: 101000, Москва, ул. Мясницкая, д. 20, **тел.:** +7 (495) 621-63-97, **e-mail**: myugay@hse.ru,
**SPIN-код:** 1246-4761, **ORCID**: http://orcid.org/0000-0001-9965-380X

# Николай Васильевич Медуницын

19 октября исполнилось 85 лет со дня рождения и 61 год научной, научно-организационной, педагогической и общественной деятельности доктора медицинских наук, профессора, заслуженного деятеля науки Российской Федерации, академика РАН Николая Васильевича Медуницына.

Научной деятельностью Николай Васильевич начал заниматься на 3-м курсе кафедры патофизиологии 2-го Московского медицинского института. За первую же научную работу молодой ученый был награжден дипломом и двумя почетными грамотами от Министерства здравоохранения и Министерства высшего образования СССР. В 1960 г. он защитил кандидатскую диссертацию «О фиксирующей и антителообразовательной функции лимфатических узлов», а в 1971 г. — докторскую диссертацию «Замедленная гиперчувствительность к растворимым белкам».



Работая в научно-исследовательской аллергологической лаборатории АМН СССР, руководителем которой был академик Андрей Дмитриевич Адо, Н.В. Медуницын участвовал в становлении аллергологической службы в стране. Им исследована перекрестная антигенная активность пыльцы разных трав и деревьев, предложены классификации основных признаков повышенной чувствительности замедленного и немедленного типов, соотношений клеточных и гуморальных факторов антиинфекционного иммунитета при разных видах инфекций.

В 1969 г. Николай Васильевич был назначен на должность заместителя директора по научной работе НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, а в 1979 г. — переведен на ту же должность в Институт иммунологии. В течение 21 года (с 1988) он возглавлял Государственный НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича. В настоящее время работает руководителем научного направления в Научном центре экспертизы средств медицинского применения Минздрава России.

Николай Васильевич занимался проблемами иммунологической безопасности вакцин и вакцинации, изучением аллергенных и протективных свойств анатоксинов. Им получены доказательства, что продукты генов гистосовместимости участвуют в образовании клеток-эффекторов гиперчувствительности замедленного типа i*n vitro*; установлено, что эти продукты являются универсальными акцепторами для антигенов и носителями антигенной информации. В вирусных вакцинах и препаратах естественного интерферона были обнаружены сопутствующие цитокины; исследованы адъювантные свойства цитокинов, изучено их действие на развитие поствакцинального иммунитета против бешенства, вирусных гепатитов и клещевого энцефалита.

Н.В. Медуницын является одним из ведущих ученых в области иммунологии и аллергологии; много внимания уделяет вакцинологии, считая, что она должна стать самостоятельной ветвью науки. Николай Васильевич внес крупный вклад в теорию и практику вакцинологии, в разработку критериев эффективности, безопасности и побочного действия иммунобиологических препаратов. С 2000 г. он занимается активной пропагандой индивидуализации (персонализации) вакцинации с целью защиты лиц с низким уровнем иммунитета против инфекций и предотвращения случаев гипериммунизации. Он автор многочисленных методических и нормативных документов по производству, контролю и применению биологических средств медицинского применения; автор 452 научных работ, среди которых 15 монографий, 7 авторских свидетельств на изобретения и патентов, монографии «Вакцинология», претерпевшей несколько переизданий, соавтор книги на английском языке «Mediators of immune response» (издательство Harwood Academic Publishers, Швейцария, 1987). Кроме того, он соавтор патента на технологию изготовления иммунобиологического препарата КИП-ферона, который содержит нормальные сывороточные антитела и иммуностимулятор интерферон. Благодаря двойному действию препарат широко используется в медицинской практике.

В течение длительного времени Николай Васильевич был членом Бюро Отделения профилактической медицины РАМН, членом Комитета Всемирной организации здравоохранения по биологической стандартизации, Ученым секретарем Экспертного совета ВАК Российской Федерации; возглавлял Национальный регулирующий орган по биологическим препаратам, был главным редактором журналов «Иммунология» и «Биопрепараты». В настоящее время является членом редколлегий ряда научных журналов и членом Совета по защите диссертаций при ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии».

Под руководством Николая Васильевича подготовлен 21 кандидат медицинских наук, в том числе 5 докторов, диссертации которых были посвящены изучению механизмов развития иммунитета и аллергии, роли цитокинов и других медиаторов иммунного ответа при инфекционных заболеваниях.

Николай Васильевич имеет ряд правительственных наград: орден Почета (2007), медали «За заслуги перед отечественным здравоохранением» (2001) и «В память 850-летия Москвы» (1997); он лауреат премий имени В.Д. Тимакова РАМН (1999) и имени Е.И. Смирнова Академии медико-технических наук (1996).

*Редколлегия журнала «Вестник Российской академии медицинских наук», Бюро Отделения медицинских наук Российской академии наук, друзья, коллеги и ученики сердечно поздравляют Николая Васильевича со славным юбилеем, желают ему отличного здоровья, счастья, неиссякаемой бодрости и творческой активности, новых идей, успехов в трудовой деятельности!*

# Юрий Петрович Пивоваров

20 октября отметил свой 80-летний юбилей академик РАН Юрий Петрович Пивоваров — высококвалифицированный специалист, блестящий педагог, выдающийся ученый с мировым именем, посвятивший более 50 лет изучению закономерностей и механизмов влияния окружающей, производственной среды и условий жизнедеятельности на состояние здоровья и качество жизни населения России и разработке основ государственной политики в целях профилактики, сохранения и укрепления здоровья населения.

Юрий Петрович родился в Луганске (Украина). Окончил в 1955 г. русскую мужскую школу в Сухуми (Республика Абхазия) и в том же году поступил на лечебный факультет 2-го Московского медицинского института (ныне Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова). Окончив в 1965 г. аспирантуру при кафедре гигиены, связал с нею дальнейшую творческую судьбу: более 40 лет был ее руководителем, занимал должности декана лечебного факультета, проректора по научной работе, в настоящее время является почетным профессором кафедры. Здесь же защитил кандидатскую (1966) и докторскую (1971) диссертации.

На протяжении многих лет Юрий Петрович возглавляет школу санитарных микробиологов, гигиенистов и экологов, работающих по таким научным направлениям, как микробное загрязнение продуктов питания и влияние этой микрофлоры на биологическую и пищевую ценность продуктов питания. Учеными разработаны методы диагностики и профилактики пищевых токсикоинфекций, вызываемых *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* и *Vibrio parahaemolyticus*; предложены нормативы для оценки качества пищевых продуктов по микробиологическим показателям. Изучение проблемы использования бактериальных пестицидов для борьбы с вредителями сельского и лесного хозяйства переросло в изучение промышленной биотехнологии в целом, что привело к созданию лаборатории экологических и медицинских аспектов биотехнологии, во главе которой встал Юрий Петрович. Его научными исследованиями было установлено, что многие штаммы-продуценты могут оказывать неблагоприятное влияние на окружающую среду, а именно: влиять на самоочищение почвы и воды, их биоценоз, сроки выживания в них патогенных микроорганизмов, а также оказывать неблагоприятное воздействие на здоровье работников предприятий и населения. Были разработаны методика комплексной оценки штаммов-продуцентов и критерии их возможного допуска в промышленное производство, а также допустимые регламенты применения бактериальных пестицидов в народном хозяйстве. В 2013 г. академику Ю.П. Пивоварову в составе творческого коллектива была присуждена премия имени Ф.Ф. Эрисмана за лучшую научную работу по гигиене «Влияние биотехнологических штаммов микроорганизмов на объекты окружающей среды и здоровье населения».

В последние годы все бóльшее внимание в исследованиях Ю.П. Пивоварова уделяется изучению изменений в состоянии здоровья населения под влиянием экологических факторов и факторов производственной среды, а также условий роста и развития детей и подростков. Научные данные, полученные Юрием Петровичем, представляют интерес как для фундаментальной науки, так и для практического здравоохранения, в том числе учреждений Роспотребнадзора.

Ю.П. Пивоваров является членом Президиума Всероссийского общества гигиенистов и санитарных врачей, председателем секции «Гигиенические аспекты биотехнологии и микробного загрязнения окружающей среды», председателем Проблемной комиссии «Научные основы гигиены окружающей среды», членом редакционных коллегий трех медицинских журналов, председателем диссертационного совета (Д208.072.06) на базе ГБОУ ВПО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, председателем Совета старейшин этого университета.

Ю.П. Пивоваров — автор более 350 публикаций, в том числе 22 учебников и учебных пособий (среди которых есть издания на английском и арабском языках), статей в научных журналах, включенных в международные базы данных научного цитирования.

Юрий Петрович уделяет большое внимание подготовке научных кадров: под его руководством и научном консультировании выполнены и защищены 24 докторские и 34 кандидатские диссертации. Подготовленные Ю.П. Пивоваровым специалисты преподают в РНИМУ им. Н.И. Пирогова, на профильных кафедрах многих вузов Российской Федерации, а также за рубежом — в Греции, Сирии, Вьетнаме, Ливане, Бангладеш, Йемене.

*Редколлегия журнала «Вестник Российской академии медицинских наук», Президиум и Бюро Отделения медицинских наук Российской академии наук, друзья, коллеги и ученики сердечно поздравляют Юрия Петровича с юбилеем и желают ему крепкого здоровья, счастья, долгих лет активной жизни и новых творческих успехов на благо медицинской науки, здравоохранения и образования.*

К 90-летию Союза педиатров России

# XVIII СЪЕЗД ПЕДИАТРОВ РОССИИ
# «Актуальные проблемы педиатрии»

## Москва, 17-19 февраля 2017 года

### ОРГАНИЗАТОРЫ

- Министерство здравоохранения Российской Федерации
- Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения
- Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
- Союз педиатров России
- Российская академия наук
- Европейская педиатрическая ассоциация EPA/UNEPSA
- Научный центр здоровья детей Минздрава России
- Департамент здравоохранения города Москвы
- Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России
- Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России
- Российская академия педиатрии
- НИИ неотложной детской хирургии и травматологии Департамента здравоохранения города Москвы
- ООО «Новые информационные технологии»

### ОРГАНИЗАЦИОННЫЙ КОМИТЕТ

**Председатель:**

**Скворцова Вероника Игоревна**
Министр здравоохранения Российской Федерации

**Сопредседатели:**

**Яковлева Татьяна Владимировна**
заместитель Министра здравоохранения Российской Федерации

**Байбарина Елена Николаевна**
директор Департамента медицинской помощи детям и службы родовспоможения Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Баранов Александр Александрович**
председатель Исполкома Союза педиатров России, директор Научного центра здоровья детей Минздрава России

### ВРЕМЯ И МЕСТО ПРОВЕДЕНИЯ СЪЕЗДА

**Научная часть Съезда:**
**17 – 19 февраля 2017 года, 9:00 - 18:00**
**Москва, Краснопресненская набережная, 12**
**Центр международной торговли, 4-й подъезд**

**Церемония открытия Съезда:**
**17 февраля 2017 года* в 18:00**
**Москва, Краснопресненская набережная, 12**
**Центр международной торговли, 4-й подъезд**

**** Уважаемые коллеги! Обратите внимание: 17 февраля 2017 г. – это пятница!***

### ОТКРЫТ ПРИЕМ ТЕЗИСОВ

**Оплата тезисов**

Тезисы, присланные до **20.12.2016 г.**, публикуются **бесплатно**. Для публикации тезисов, присланных после **20.12.2016 г.**, необходимо перевести сумму в размере **500 рублей** на расчетный счет Общественной организации «Союз педиатров России» или оплатить членский взнос, в который входит сбор за публикацию одного тезиса. Копия платежного поручения об оплате сбора за публикацию тезисов должна быть выслана по адресу Общественной организации «Союз педиатров России» с указанием на бланке платежного поручения фамилии первого автора и названия мероприятия. Оплаченные тезисы должны поступить в Оргкомитет не позднее **30.12.2016 г.** О регистрации тезисов в системе Вы получите автоматическое уведомление.

**Требования к оформлению тезисов**

Тексты тезисов принимаются **только в электронном виде следующими способами:**

1) через сайт Союза педиатров России: **www.pediatr-russia.ru**, раздел «Новости» – «XVIII Съезд педиатров России». Прямая ссылка на страницу: **http://www.pediatr-russia.ru/spr_sezd2017.html**
2) через сайт Научного центра здоровья детей Минздрава России: **www.nczd.ru**, раздел «Новости» – «XVIII Съезд педиатров России». Прямая ссылка на страницу: **http://www.nczd.ru/tezis.phtml**

Для передачи тезисов в Оргкомитет надо зайти на **любой** из указанных сайтов в соответствующий раздел или последовать по прямой ссылке, набрав ее в адресной строке Вашего браузера. После этого на открывшейся странице отправки тезисов выбрать нужное количество авторов и подтвердить кнопкой «Ок». Далее следует заполнить все необходимые разделы, строго следуя указаниям системы администрирования сайта. Особое внимание просим обратить на правильное заполнение полей с Вашей контактной информацией.

Не принимаются к рассмотрению работы, присланные по факсу, на дискете, а также отправленные позже установленного срока. Оргкомитет вправе отказать в публикации материалов, не соответствующих тематике Съезда, не получивших положительную рецензию научного комитета Съезда или имеющих рекламную направленность. **В таких случаях оплата за публикацию не возвращается.**

Подтверждение публикации тезисов высылается контактному лицу до **30.01.2017 г.**

Лучшие, по мнению научных консультантов, тезисы будут отмечены логотипом Союза педиатров России, а их авторы получат возможность представить свои работы на постерной сессии Съезда.

**Работы, присланные до 20.12.2016 г., публикуются бесплатно (но не более 3-х работ одного автора).**

E-mail: **tezis@nczd.ru**