

УДК 616.721.1:577.73

Васильева И.Г., Хижняк М.В., Шуба И.Н., Гафийчук Ю.Г.

Дегенерация межпозвонковых дисков и методы ее биологической коррекцииИнститут нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины, г. Киев,
Военно-медицинский клинический центр Южного региона МО Украины, г. Одесса

Ограничение физических возможностей человека является важной медицинской и социальной проблемой современности. Дегенеративные процессы опорно-двигательного аппарата дифференцируются в зависимости от сроков их появления на возрастные и патологические. Несмотря на то, что в настоящее время отмечены значительные успехи в изучении молекулярных процессов при дегенеративных изменениях в межпозвонковых дисках, молекулярные механизмы и этиология их недостаточно изучены. Очевидно, этот сложный феномен является следствием воздействия многих эндогенных и экзогенных факторов, которые условно разделяют на три группы: механическая нагрузка, генетическая предрасположенность и нутриенты. Полагают, что нормальная возрастная и патологическая дегенерация имеют сходные морфологические признаки и определяются одинаковыми молекулярными процессами.

Структура и морфологические признаки дегенеративных процессов в межпозвонковых дисках

Межпозвонковый диск состоит из трех специализированных структур — фиброзного кольца, студенистого ядра и концевых пластинок. Две концевые пластинки, состоящие из гиалинового хряща, замыкают диск аксиально и прилежат к соседним позвонкам. Толщина пластинок не превышает 1 мм. Фиброзное кольцо состоит из 25 концентрических колец или ламелей, образованных параллельно расположенными коллагеновыми фибриллами, окруженными эластиновыми волокнами [1, 2]. Фиброзное кольцо ограничивает студенистое ядро — желатиноподобную сердцевину, состоящую из беспорядочно расположенных коллагеновых и радиально расположенных эластиновых волокон, погруженных в высокогидратированный агрегансодержащий гель [3, 4]. Высокогидратированный агреганс в студенистом ядре поддерживает осмотическое давление, поэтому выполняет основную роль в формировании свойств межпозвонкового диска [5]. Студенистое ядро и фиброзное кольцо различаются по клеточному составу. Клетки фиброзного кольца во внешней части фибробластоподобной структуры, расположены параллельно коллагеновым волокнам. Во внутренней части фиброзного кольца клетки более овальные, хондроцитоподобные. Клетки студенистого ядра имеют хондроцитоподобную структуру — единичные клетки (5000 в 1 мм³), иногда заключенные в капсулу, погружены в матрикс [6]. Некоторые клетки межпозвонкового диска как в студенистом ядре, так и в фиброзном кольце имеют удлиненную форму, их длина до 30 мкм. Предполагают, что они выполняют сенсорную, коммуникативную роль в межпозвонковом диске. Межпозвонковый диск здорового взрослого человека практически лишен кровеносных сосудов и нервных волокон [7]. Некоторое количество нервных волокон обнаруживают только во внешних ламелях фиброзного кольца, часть из них представляет собой окончания проприорецепторов.

С возрастом вследствие дегенеративных процессов изменяется морфология диска. Уже в первые

десятилетия жизни диск утрачивает большую часть кровоснабжения, что обуславливает дефицит глюкозы, аминокислот и воды. Вторичным по отношению к утрате значительной части кровоснабжения является кальцификация концевой пластинки, вследствие чего снижается фильтрация пластических веществ. Без необходимых нутриентов клетки гибнут, снижается синтез протеогликанов [8]. У взрослого количество клеток в 2 раза меньше, чем у ребенка [9]. Дегенеративные изменения студенистого ядра характеризуются прогрессирующим уменьшением толщины межпозвонкового диска. Граница между студенистым ядром и фиброзным кольцом становится более четкой [10]. В ткани межпозвонкового диска усиливается коричневая пигментация [11], ткань становится более хрупкой [12]. Дегенеративные изменения в фиброзном кольце проявляются дезорганизацией регулярного чередования ламелей коллагена и эластина, замещением гелеподобной структуры фиброзно-хрящевой тканью.

У большинства людей течение процесса старения (дегенерации) медленное, постепенное, однако в определенных ситуациях оно может значительно ускориться, что обуславливает возникновение хронического болевого синдрома. Такую ускоренную форму дегенеративного процесса межпозвонкового диска называют дегенеративной болезнью диска (ДБД). По мере прогрессирования ДБД патологические изменения становятся более выраженными, их морфологическими признаками являются образование трещин фиброзного кольца с последующим вращением сосудов и формированием протрузии диска [13].

Молекулярные признаки дегенеративных процессов в межпозвонковом диске**Изменение состава внеклеточного матрикса.**

Толщина диска уменьшается вследствие снижения синтеза протеогликана в студенистом ядре, уменьшения гидратации. В прогрессивном уменьшении толщины диска также имеет значение неферментное гликозилирование коллагена, происходящее при нормальном функционировании белка и контакте с глюкозой либо другим редуцирующим моносахаридом. Химическая конденсация является реакцией соединения амина (NH₂-группы) и альдегида (CHO-группы). Альдегид присоединяется, как правило, к свободной NH₂-группе концевой аминокислоты или к одной из доступных ε-аминогрупп остатка лизина (у большинства белков). Гликозилированные производные окисляются с образованием более стабильной молекулы N-карбоксиметиллизина (КМЛ) [11]. Этот процесс, как и утрата молекул агрегана, способствует уменьшению толщины диска и образованию трещин. Процесс протекает тем более активно, чем меньше кровоснабжение и концентрация кислорода [11, 12]

Реакция провоспалительных цитокинов в дегенерирующем диске. При исследовании ткани диска установлено, что его клетки синтезируют большое количество сигнальных молекул, участвующих в провоспалительных и сопряженных с ними

метаболических реакциях. Среди них провоспалительные сигнальные молекулы интерлейкинов, в том числе ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, фактор некроза опухоли- α (ФНО- α), гранулоцитарный/макрофагальный колонистимулирующий фактор (GM-CSF), ИЛ-8, RANTES (регулируется активацией, синтезируется и секретируется Т-лимфоцитами) и ИЛ-10 [14, 15]. Кроме воспалительных сигнальных молекул, в ткани диска синтезируются воспалительные медиаторы: лейкотриен В₄, тромбоксан В₂, простагландин Е₂ и, соответственно, ферменты, участвующие в этих сигнальных реакциях (фосфолипаза А₂ и СОХ-2) [16, 17]. Экспрессия рецепторов цитокинов на клетках диска свидетельствует, что эти клетки не только иницируют проведение сигнала, но и имеют механизмы адекватного реагирования на провоспалительные медиаторы [14]. Некоторые исследователи приводят веские доказательства того, что хондроцитоподобные клетки студенистого ядра являются источником провоспалительных медиаторов в дегенерирующем диске. Установлена связь между уровнем провоспалительных цитокинов, ИЛ-6 и ИЛ-8 и выраженностью болевого синдрома [18], что указывает на вероятное участие провоспалительных цитокинов не только в дегенеративных процессах в диске, но и в формировании болевого синдрома.

Активация металлопротеиназ матрикса. Дезорганизация матрикса диска — один из основных признаков его дегенерации. Соответственно составляющим матрикса коллагенам, протеогликанам и фибронектину клетки диска продуцируют ферменты, которые специфически разрушают эти компоненты. Наиболее изучены металлопротеиназы (МП) — протеазы, разрушающие различные типы коллагена [19]. В дегенерирующем диске активируется экспрессия всех классов протеиназ -1, -2, -3, -9. С использованием клеток диска, выделенных у различных животных, а также человека, показано, что клетки синтезируют МП *in vitro* спонтанно [20], под действием гидростатического давления [21] или при стимулировании ИЛ-1 [22]. Кроме регулирования экспрессии, активность МП регулируется также на посттрансляционном этапе, в частности, они связываются с тканевым ингибитором МП (ТИМП), что регулирует количество свободной протеиназы [23]. Результаты исследований подтверждают, что экспрессия МП сопровождается повышением уровня ТИМП [24]. При дегенерации дисков повышается экспрессия ТИМП-1 и ТИМП-2, а экспрессия ТИМП-3 практически не изменяется [25]. В некоторых исследованиях при дегенеративных процессах обнаружен дисбаланс ТИМП-1 и МП-3 [26]. Кроме коллагена, при дегенерации деградирует также агрекан — основной протеогликан. В настоящее время протеиназы, разрушающие агрекан, недостаточно изучены, известно, что в этом процессе участвует агреканиназа-1 [27]. Кроме МП, другая важная группа протеиназ — катепсины также способны расщеплять коллаген и протеогликаны. Показано, что активность катепсинов D, L, K и G в дегенерирующем диске повышается. Это связано с сепарированием концевой пластики и дезорганизацией фиброзного кольца [28]. Определенную роль в регуляции активности катепсинов играют воспалительные цитокины и факторы роста [29]. Хотя субстраты МП и катепсинов в значительной мере пересекаются, отмечено, что МП активны при нейтральной pH, в то время как катепсины максимально активны в кислой среде

[30]. Свойство катепсинов активироваться в кислой среде может иметь значение в поздних стадиях дегенерации, когда накопление лактата в ткани диска обуславливает «закисление» среды.

Активация экспрессии нейротрофинов в дегенерирующем диске. В норме межпозвоноковый диск лишен иннервации. Нервные волокна обнаруживаются только в самых верхних слоях фиброзного кольца и концевой пластинке над студенистым ядром [31]. При дегенерации межпозвонокового диска происходит вращение сосудов и нервов в фиброзное кольцо и студенистое ядро. Показана экспрессия на растущих нервных волокнах Trk A и B — рецепторов фактора роста нервов (ФРН) и BDNF, что свидетельствует о чувствительности этих нервных окончаний к ФРН [32]. Нейротрофины ФРН и BDNF — факторы выживания и активации анаболических процессов в нервных клетках — экскретируются не только нервными клетками, но и интактными клетками различных тканей, в том числе хрящевой. В дегенерирующем межпозвоноковом диске ФРН синтезируется хондроцитоподобными клетками фиброзного кольца и клетками студенистого ядра [33]. Установлена корреляция между степенью выраженности дегенеративных процессов и экспрессией ФРН и BDNF [34]. Предполагают, что в дегенерирующем диске активация синтеза нейротрофинов связана с воспалительной реакцией. Так, Y. Abe и соавторы [35] доказали активацию экспрессии гена и секреции протеина ФРН после обработки клеток студенистого ядра ИЛ-1 β и ФНО- α . Эти результаты, а также данные об увеличении синтеза провоспалительных цитокинов в дегенерирующем межпозвоноковом диске дают основание предполагать связь между этими процессами и формированием болевого синдрома. Поскольку новые нервные фибриллы обнаруживают только в дисках при болевом синдроме, можно утверждать, что их образование является характерным признаком дегенерирующего диска. Имеющиеся данные относительно присутствия факторов роста в дегенерирующем диске при болевом синдроме подтверждают, что эффективное воздействие может быть достигнуто, если для блокирования болевого синдрома ингибировать действие ФРН.

Этиология дегенерации межпозвонокового диска

Нутриентное воздействие. Недостаточное нутриентное обеспечение клеток диска является одним из важнейших факторов, способствующих возникновению дегенеративных изменений. H.A. Hogner и J.P.G. Urban [36], исследуя выживание клеток диска в различных условиях, доказали, что, если не поступает адекватное количество глюкозы и кислорода или не поддерживается оптимальный уровень pH, клетки диска гибнут и прекращают вырабатывать молекулы протеогликана, диск теряет воду (дегидратируется). Недостаточное поступление нутриентов начинается с идиопатической потери сосудов в концевой пластинке, являющихся единственным источником поступления питательных веществ в студенистое ядро, а также кальцификации концевой пластинки [37]. Затруднено не только движение нутриентов, замедляется также отток продуктов метаболизма, в частности, лактата, концентрация которого становится критической [38]. Концентрация кислорода снижается к центру диска, а содержание молочной кислоты увеличивается, что обуславливает «закисление» среды в центре диска

[39]. В настоящее время установлено, что в местах локального уменьшения обеспечения кислородом формируется хронический воспалительный процесс [40]. В совокупности эти условия способствуют уменьшению количества клеток в диске, контролирующих матрикс. Дегенеративные процессы становятся необратимыми

Механические воздействия. В течение длительного времени причинами дегенерации межпозвоноковых дисков считали чрезмерные нагрузки, курение и тучность. В настоящее время в экспериментальных и эпидемиологических исследованиях установлено, что сами по себе эти факторы не часто приводят к дегенерации диска [41]. Прямая корреляция между появлением дегенеративных процессов, интенсивностью и частотой нагрузки на межпозвоночный диск не установлена. Напротив, с увеличением рациональной физической нагрузки увеличивается синтез протеогликанов [42].

Генетические факторы дегенерации межпозвоночного диска. В исследованиях с участием близнецов отмечено, что, наряду с физической нагрузкой, важное значение в возникновении дегенеративных процессов в межпозвоночных дисках имеет наследственная предрасположенность [43], которая проявляется в 52–74% наблюдений и увеличивается с возрастом [41, 44]. Генетическая предрасположенность проявляется полиморфизмом генов, кодирующих белки внеклеточного матрикса. Полиморфизм, затрагивающий коллаген, в основном обнаружен в генах, кодирующих коллаген I, II и IX типа [45–49]. Полиморфизм, затрагивающий ген, кодирующий агрекан, способствует повышению риска возникновения дегенерации дисков на многих уровнях в более раннем возрасте [50, 51]. Мутации в коллагене IX типа в последнее время связывают с мутациями в неколлагеновом белке матрикса (промежуточный белок слоев хряща — СІLP). Предполагают, что СІLP участвует в регуляции сигнального пути фактора роста опухоли-*b* (ФРО-*b*) и что именно эта регуляция имеет ведущее значение в этиологии и патогенезе дегенерации диска [52]. Однако не только полиморфизм в генах, кодирующих протеины матрикса, связан с дегенерацией дисков. Недавно обнаружена связь дегенеративных изменений с мутацией в провоспалительном цитокине ИЛ-1 [53, 54] и ИЛ-6 [55]. Обнаружен также полиморфизм в генах, кодирующих МП-3, установлена корреляция с повышенным риском возникновения дегенеративных изменений у пациентов пожилого возраста [56]. Полиморфизм также обнаружен в гене, кодирующем рецептор витамина D [57]. Результаты научных исследований свидетельствуют о важном значении в формировании дегенеративных изменений в межпозвоночных дисках генетических нарушений. Генетические нарушения обуславливают нарушение баланса матриксных белков, их синтеза, а также регуляции воспалительного процесса, что при наличии неадекватных внешних факторов способствует прогрессированию дегенеративных изменений в межпозвоночном диске. При существовании генетической предрасположенности ткань ослаблена, и травма может возникнуть даже когда прилагается нормальное воздействие [58].

Применение биологических материалов для лечения дегенерации межпозвоночного диска

Дегенерация межпозвоночного диска является частой причиной формирования болевого синдрома.

В настоящее время терапия направлена не только на устранение болевого синдрома, но и восстановление функций межпозвоночного диска. Современные технологии часто предусматривают использование биологических материалов. Для активации регенерации межпозвоночного диска используют инъекции белков активаторов, биоматериалов, различных типов клеток или комплексов клеток, различных типов внеклеточного матрикса, генетически модифицированные клетки, *in vitro* сконструированную ткань. Использование той или иной лечебной тактики в значительной степени зависит от выраженности дегенерации с учетом безопасности процедуры.

Прямые инъекции биоактивных препаратов в дегенерирующий диск. Разовые или повторяющиеся прямые инъекции ФРО-*b* в ткань дегенерирующего диска человека *in vitro* способствовали увеличению синтеза протеогликана и снижению резорбции ткани вследствие уменьшения секреции МП-2, наблюдали также транзистентный пролиферативный эффект [59]. Аналогично, ФРО-*b*, IGF-1 также способствуют увеличению синтеза протеогликана и замедлению резорбции диска посредством снижения уровня активной МП-2 [60, 61]. IGF-1 также способствует повышению жизнеспособности клеток посредством антиапоптотического действия [62]. Интересно, что уровень IGF-1 с возрастом снижается [63, 64].

В настоящее время опубликованы результаты исследования, проведенного на кролях, у которых моделировали дегенерацию диска поясничного отдела позвоночника. Прямые инъекции остеогенного протеина-1 (OP-1) — фактора роста, принадлежащего к семейству ФРО-*b*, способствовало значительному увеличению синтеза протеогликанов и восстановлению высоты диска. Полученный результат был стабильным в течение 8 нед после инъекций [5, 65]. После прямых инъекций OP-1 крысам, у которых моделировали дегенерацию диска, наблюдали ингибирование боль-определяемого поведения [50, 66].

В пилотных клинических исследованиях использовали прямые внутрисквозные инъекции смеси матриксных компонентов, так называемый «раствор диска» [67]. После лечения в среднем в течение 13 мес у пациентов отмечали уменьшение выраженности дисфункций и болевого синдрома. Авторы считают, что хороший результат может быть обусловлен сочетанным эффектом нескольких процессов — увеличением количества матриксных белков вследствие активации синтеза протеогликана и активацией репаративных процессов, обусловленной воздействием комплекса факторов. Недостатком метода прямых инъекций является невозможность длительного введения препаратов.

Генная терапия. Длительная доставка биоактивных молекул в дегенерирующий диск возможна при использовании генетически модифицированных клеток диска, экспрессирующих необходимый генный продукт. Благодаря достижениям молекулярной генетики возможно введение необходимого генетического элемента практически в любую клетку. В 1997 г. появилось первое сообщение о вирусосредствованном переносе терапевтических генов в клетки межпозвоночного диска [68]. Изолированные клетки из межпозвоночного диска быка или крысы трансформировали с помощью ретровирусного вектора, содержащего ген-кодирующий антагонист рецептора ИЛ-1 (IL-1RA) [69]. Эти генные конструкции использовали

для инъекций *in vivo* в экспериментах на кролях, у которых моделировали дегенерацию диска [70, 71] а также трансфекции клеток диска человека *in vitro* [72]. В экспериментах показано, что вектор на основе ретровируса способен эффективно трансфектировать клетки различных видов млекопитающих. В последующем для преодоления опасности возникновения иммунной реакции при использовании ретровирусного вектора разработан аденовирус-ассоциированный вектор (AAV) [73, 74]. Авторы продемонстрировали, что AAV эффективно трансфектирует клетки диска человека и кроля *in vivo*. Хотя AAV генерирует гуморальный иммунный ответ, существенный клеточный иммунный ответ не обнаружен, наблюдали активную трансгенную экспрессию [75].

Несмотря на достаточное число исследований, доказывающих гибкость метода прямой доставки генов с использованием векторов на основе вирусов в клетки диска, вопрос о том, какой ген необходимо доставлять, остается открытым. Среди таких генов — анаболический фактор ФРО-b1, LMP-1, Sox9, а также антикатаболический фактор TIMP-1.

Первые исследования по экзогенной доставке гена *in vivo* провели Т. Nishida и соавторы [70] с использованием аденовирусного вектора, несущего ген ФРО-b1, у кролей. Авторы констатировали значительное увеличение экспрессии ФРО-b1, а также протеогликана в диске. При введении в ткань диска кролей LMP-1 *in vivo* наблюдали повышение экспрессии анаболических цитокинов BMP-2, BMP-7 и агрекана, что подтверждает целесообразность применения этого фактора в качестве терапевтического средства [76]. Sox-9 не оказывает влияния на синтез протеогликана. При переносе этого гена в клетки дегенерирующего диска человека увеличивается синтез коллагена II типа. Трансфекция Sox-9 в составе аденовирусного вектора в дегенерирующий диск кроля обеспечивает сохранение структуры, свойственной непораженному диску, в то время как в контрольной группе животных наблюдали типичные дегенеративные изменения в диске [77]. Таким образом, увеличение синтеза не только протеогликана, но и коллагена II способно предотвратить дегенеративные изменения диска. Можно также предположить, что сочетанное использование различных факторов будет еще более эффективным и физиологичным. В последних исследованиях показано, что применение одновременно ФРО-b1, IGF-1 и BMP-2 оказывает синергичное действие на синтез белка [78]. Альтернативой анаболическим факторам может быть применение антикатаболических факторов, что позволит замедлить процесс дегенерации без необходимости увеличивать синтез в клетках диска. С помощью аденовирусного вектора в дегенерирующий диск человека был доставлен TIMP-1. Такая манипуляция способствовала увеличению содержания протеогликана в культуре [79].

Несмотря на положительные результаты применения инъекционных методов в отношении дегенерирующего диска человека, где формируется токсичное микроокружение, уменьшение поступления нутриентов глюкозы и кислорода, а также «защисление» среды, остается открытым вопрос, как долго в этих условиях возможна экспрессия генинженерной конструкции. Неизвестно также, смогут ли клетки в условиях недостаточного поступления нутриентов адекватно реагировать на поступающий трофический фактор.

Использование аутологичных клеток. В качестве альтернативы генетически модифицированным клеткам диска дегенерирующий диск можно заселить культивированными *in vitro* клетками. Для предупреждения иммунных реакций клетки должны быть аутологичными. Клетки, совместимые с клетками диска, наращивают *in vitro* и затем имплантируют в поврежденный диск. Поскольку эти клетки культивируют *in vitro*, их можно подвергнуть генетической модификации или заселить этими клетками трехмерный матрикс. Сочетанное применение этих технологий потенциально может повысить эффективность лечения за счет увеличения выживания клеток и повышения их биосинтетической активности. Ввиду того, что модификация культивированных клеток технически отработана, в центре внимания в настоящее время стоит вопрос о культивировании клеток диска и формировании адекватных имплантатов. Очевидно, получить достаточное количество клеток, пригодных для культивирования, из межпозвонкового диска — задача достаточно сложная. Отбор клеток из студенистого ядра — очевидных клеток-мишеней, адекватных для решения поставленных задач, связан с повреждением фиброзного кольца. С одной стороны, при этой процедуре нарушается его целостность, кроме того, в дегенерирующем диске плотность клеток в студенистом ядре низкая, что создает проблему получения их в достаточном количестве. В связи с этим существует ограниченное число подходов, которые позволяют извлечь достаточное количество клеток без повреждения диска или ускорения его дегенерации. Использование материала студенистого ядра, отобранного во время микродискэктомии, может быть одним из подходов к получению клеток для культивирования *in vitro*. Однако возможность введения клеток или имплантатов после хирургического вмешательства на диске является дискуссионной [80]. Наиболее простым подходом, обеспечивающим репарацию дегенерирующего диска с использованием аутологичных клеток, является инъекция клеток, выращенных *ex vivo* [81]. Этот подход в настоящее время прошел только одно клиническое испытание [82]. Исследования показывают, что все пациенты отмечали значительное улучшение. Другой подход к использованию аутологичных клеток для трансплантации в дегенерирующий диск — это культивирование клеток в трехмерной культивационной системе. В настоящее время предложено достаточное число искусственных трехмерных матрикс для культивирования клеток диска [5]. Н.Е. Gruber и соавторы [59] применяли аутологичные клетки, выращенные в обычной монослойной культуре, которые затем заселяли в трехмерный матрикс в соответствии с полостью, образованной в межпозвонковом диске. Через 33 нед строение клеток было аналогично таковому обычных клеток межпозвонкового диска. Не выявлено также нарушения морфологии окружающих клеток. По результатам исследования был сделан вывод, что имплантация аутологичных клеток может быть успешной, хотя существуют технические вопросы, например, предупреждение вытекания имплантата, минимизация повреждения фиброзного кольца при прохождении иглы, степень заселения матрикса клетками и т.д. Усовершенствованный подход апробирован М. Sato и соавторами [15, 76, 83] с использованием неиммуногенного коллагена. Клетки фиброзного кольца кролей засевали в коллагеновый матрикс и

культивировали в течение 3 нед. Клетки, растущие в матриксе, синтезировали больше коллагена II типа и протеогликана, чем клетки, растущие в монослое. Через 3 нед матрикс имплантировали в полость, образовавшуюся после лазерной дискэктомии. Имплантация способствовала существенному уменьшению сморщивания диска в сроки наблюдения до 12 нед после операции. По данным гистологического исследования, клетки жизнеспособны, пролиферируют и продуцируют гиалиноподобный матрикс.

Терапия, основанная на использовании стволовых клеток. Последние достижения в инжиниринге тканей, а именно в исследовании свойств мезенхимальных стволовых клеток (МСК), позволяют рассматривать их в качестве источника клеток для генной терапии и имплантации. МСК — не коммитированные плюрипотентные стволовые клетки, которые обнаруживают в различных тканях. Эти клетки имеют высокую пластичность и высокую способность к мультилинейной дифференцировке. Они доступны и ими легко манипулировать. В МСК уже введено несколько векторных систем, в которых они показали высокую активность экспрессии [2, 24, 84]. Однако трансформация — не единственная проблема, которую необходимо решить. МСК недифференцированы, перед имплантацией их необходимо дифференцировать в хондроцитоподобные клетки. Для дифференцировки МСК в хондроциты использовали ростовые факторы семейства BMP [85, 86]. В настоящее время изучается более специфичный фактор дифференцировки из семейства Sox. Члены семейства факторов транскрипции *Brschuury* способствуют адгезии клеток [87]. В последнее время обнаружено, что для индукции дископодобного фенотипа достаточно культивирование МСК с клетками диска [88]. Культивирование в условиях трехмерной системы также способствует формированию хондроцитоподобного фенотипа [89]. При имплантации МСК, заключенных в коллагеновый гель, в дегенерирующий диск кролей отмечено сохранение структуры студенистого ядра и фиброзного кольца, предотвращение уменьшения синтеза протеогликанов, увеличение высоты диска [90].

Импантированные клетки выживают и экспрессируют генетические маркеры студенистого ядра и фиброзного кольца. Аналогичные результаты были получены при инъекции суспензии МСК в диск кроля и суспензии МСК, заключенной в гель, в межпозвоночный диск копчикового отдела крысы [91].

Использование МСК дало новый импульс развитию методов аутопересадки при дегенеративных процессах в диске. Их применение позволяет преодолеть основное ограничение — доступность клеточного матрикса в необходимом количестве. Предстоит ответить еще на многие вопросы, например, являются ли хондроциты, происшедшие из МСК, идентичными или похожими на клетки студенистого ядра. Хотя результаты последних исследований доказывают соответствие клеток, однако, неизвестно, как долго они будут сохранять фенотип в условиях микроокружения в дегенерирующем диске, не будут ли новые клетки также подвергаться дегенерации. Не изучен также вопрос о биомеханических свойствах вновь синтезированного матрикса. Привлекательны МСК в качестве источника клеток еще и потому, что они не экспрессируют рецепторы КГС первого типа: у реципиентов, которым вводили МСК от доноров-сибсов, не обнаруживал иммунный ответ,

что свидетельствует о возможности использования аллогенных МСК.

Заключение. Межпозвоночный диск является высокоспециализированной структурой. Из-за отсутствия кровеносных сосудов поступление нутриентов обеспечивается посредством диффузии, что делает его зависимым от структуры матрикса. Повреждение матрикса обуславливает изменение диффузии, в последующем — уменьшение количества клеток, обеспечивающих достаточное количество матриксных белков. Клиническое использование методов блокирования сигналов проведения болевых импульсов в дегенерирующем диске, а также провоспалительных сигналов будет способствовать восстановлению дегенеративно-измененного межпозвоночного диска и улучшению качества жизни пациента. Перспективным представляется использование аутологичных культивированных *in vitro* клеток межпозвоночного диска с последующей их имплантацией, что потенциально может восполнить дефицит клеток, а следовательно, и матрикс. Однако, данный метод, вероятно, не применим при условии генетических аномалий матриксных белков. Возможно, более эффективными в таких ситуациях будут генномодифицированные аутологичные или аллогенные стволовые МСК. Очевидно также, что метод лечения следует подбирать в зависимости от степени выраженности дегенерации межпозвоночного диска на основе четко отработанных критериев.

Список литературы

1. Marchand F., Ahmed A.M. Investigation of the laminate structure of lumbar disc anulus fibrosus // *Spine*. — 1990. — V.15. — P.402-410.
2. Yu J., Fairbank J.C., Roberts S., Urban J.P. The elastic fiber network of the anulus fibrosus of the normal and scoliotic human intervertebral disc // *Spine*. — 2005. — V.30, N16. — P.1815-1820.
3. Inoue H. Three-dimensional architecture of lumbar intervertebral discs // *Spine*. — 1981. — V.6. — P.139-146.
4. Yu J., Tirlapur U., Fairbank J. et al. Microfibrils, elastin fibres and collagen fibres in the human intervertebral disc and bovine tail disc // *J. Anat.* — 2007. — V.210, N4. — P.460-471.
5. An H.S., Masuda K., Inoue N. Intervertebral disc degeneration: biological and biomechanical factors // *J. Orthop. Sci.* — 2006. — V.11, N5. — P.541-552.
6. Roberts S., Menage J., Duance V. et al. 1991 Volvo Award in Basic Sciences. Collagen types around the cells of the intervertebral disc and cartilage end plate: an immunolocalization study // *Spine*. — 1991. — V.16. — P.1030-1038.
7. Crock H.V., Goldwasser M., Yoshizawa H. Vascular anatomy related to the intervertebral disc // *The biology of the intervertebral disc / Ed. P. Gosh.* — Boca Raton: CRC Press, 1988. — P.109-133.
8. Lyons G., Eisenstein S.M., Sweet M.B. Biochemical changes in intervertebral disc degeneration // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1981. — V.673. — P.443-453.
9. Trout J.J., Buckwalter J.A., Moore K.C. Ultrastructure of the human intervertebral disc: II. Cells of the nucleus pulposus // *Anat. Rec.* — 1982. — V.204. — P.307-314.
10. Antoniou J., Mwale F., Demers C.N. et al. Quantitative magnetic resonance imaging of enzymatically induced degradation of the nucleus pulposus of intervertebral discs // *Spine*. — 2006. — V.31, N14. — P.1547-1554.
11. Nerlich A.G., Bachmeier B.E., Schleicher E. et al. Immunomorphological analysis of RAGE receptor expression and NF- κ B activation in tissue samples from normal and degenerated intervertebral discs of various ages // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* — 2007. — V.1096. — P.239-248.
12. Banks R.A., Bayliss M.T., Lafeber F.P. et al. Ageing and zonal

- variation in post-translational modification of collagen in normal human articular cartilage // *Biochem. J.* — 1998. — V.30. — P.345–351.
13. Johnson W.E., Evans H., Menage J. et al. Immunohistochemical detection of Schwann cells in innervated and vascularized human intervertebral discs // *Spine.* — 2001. — V.26. — P.2550–2557.
 14. Specchia N., Pagnotta A., Toesca A., Greco F. Cytokines and growth factors in the protruded intervertebral disc of the lumbar spine // *Eur. Spine. J.* — 2002. — V.11. — P.145–151.
 15. Weiler C., Nerlich A.G., Bachmeier B.E., Boos N. Expression and distribution of tumor necrosis factor alpha in human lumbar intervertebral discs: a study in surgical specimen and autopsy controls // *Spine.* — 2005. — V.30. — P.44–53.
 16. Saal J.S., Franson R.C., Dobrow R. et al. High levels of inflammatory phospholipase A2 activity in lumbar disc herniations // *Spine.* — 1990. — V.15. — P.674–678.
 17. Takahashi H., Suguro T., Okazima Y. et al. Inflammatory cytokines in the herniated disc of the lumbar spine // *Spine.* — 1996. — V.21. — P.218–224.
 18. Burke J.G., Watson R.W., McCormack D. et al. Intervertebral discs which cause low back pain secrete high levels of proinflammatory mediators // *J. Bone Joint Surg. Br.* — 2002. — V.84. — P.196–201.
 19. Goupille P., Jayson M.I., Valat J.P. et al. Matrix metalloproteinases: the clue to intervertebral disc degeneration? // *Spine.* — 1998. — V.23. — P.1612–1626.
 20. Kang J.D., Georgescu H.I., McIntyre-Larkin L. et al. Herniated lumbar intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinases, nitric oxide, interleukin-6, and prostaglandin E2 // *Spine.* — 1996. — V.21. — P.271–277.
 21. Handa T., Ishihara H., Ohshima H. et al. Effects of hydrostatic pressure on matrix synthesis and matrix metalloproteinase production in the human lumbar intervertebral disc // *Spine.* — 1997. — V.22. — P.1085–1091.
 22. Jimbo K., Park J.S., Yokosuka K. et al. Positive feedback loop of interleukin-1beta upregulating production of inflammatory mediators in human intervertebral disc cells in vitro // *J. Neurosurg. Spine.* — 2005. — V.2. — P.589–595.
 23. Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases // *J. Pathol.* — 2003. — V.200, N4. — P.448–464.
 24. Liu P., Kalajzic I., Stover M.L. et al. Human bone marrow stromal cells are efficiently transduced by vesicular stomatitis virus-pseudotyped retrovectors without affecting subsequent osteoblastic differentiation // *Bone.* — 2001. — V.29. — P.331–335.
 25. Nishida T. Kinetics of tissue and serum matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in intervertebral disc degeneration and disc herniation // *Kurume Med. J.* — 1999. — V.46. — P.39–50.
 26. Kanemoto M., Hukuda S., Komiya Y. et al. Immunohistochemical study of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human intervertebral discs // *Spine.* — 1996. — V.21. — P.1–8.
 27. Le Maitre C.L., Pockert A., Buttle D.J. et al. Matrix synthesis and degradation in human intervertebral disc degeneration // *Biochem. Soc. Trans.* — 2007. — V.35, N4. — P.652–655.
 28. Ariga K., Yonenobu K., Nakase T. et al. Localization of cathepsins D, K, and L in degenerated human intervertebral discs // *Spine.* — 2001. — V.26. — P.2666–2672.
 29. Gerber A., Wille A., Welte T. et al. Interleukin-6 and transforming growth factor-beta 1 control expression of cathepsins B and L in human lung epithelial cells // *J. Interferon Cytokine Res.* — 2001. — V.21. — P.11–19.
 30. Nagase H., Fushimi K. Elucidating the function of non catalytic domains of collagenases and aggrecanases // *Connect. Tissue Res.* — 2008. — V.49, N3. — P.169–174.
 31. Fagan A., Moore R., Vernon Roberts B. et al. ISSLS prize winner: the innervation of the intervertebral disc: a quantitative analysis // *Spine.* — 2003. — V.28. — P.2570–2576.
 32. Aoki Y., Ohtori S., Takahashi K. et al. Innervation of the lumbar intervertebral disc by nerve growth factor-dependent neurons related to inflammatory pain // *Spine.* — 2004. — V.29. — P.1077–1081.
 33. Gigante A., Bevilacqua C., Pagnotta A. et al. Expression of NGF, TrkA and p75 in human cartilage // *Eur. J. Histochem.* — 2003. — V.47. — P.339–344.
 34. Freemont A.J. The cellular pathobiology of the degenerate intervertebral disc and discogenic back pain // *Rheumatology.* — 2009. — V.48, N1. — P.5–10.
 35. Abe Y., Akeda K., An H.S. et al. Proinflammatory cytokines stimulate the expression of nerve growth factor by human intervertebral disc cells // *Spine.* — 2007. — V.32. — P.635–642.
 36. Horner H.A., Urban J.P.G. Effects of nutrient supply on the viability of cells from the nucleus pulposus of the intervertebral disc: 2001 Volvo Award in Basic Science // *Spine.* — 2001. — V.26, N23. — P.2543–2549.
 37. Boos N., Weissbach S., Rohrbach H. et al. Classification of age-related changes in lumbar intervertebral discs 2002 Volvo Award in Basic Science // *Spine.* — 2002. — V.27, N23. — P.2631–2644.
 38. Holm S., Baranto A., Kaigle Holm A. et al. Reactive changes in the adolescent porcine spine with disc degeneration due to endplate injury // *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.* — 2007. — V.20, N1. — P.12–17.
 39. Bartels E.M., Fairbank J.C., Winlove C.P. et al. Oxygen and lactate concentrations measured in vivo in the intervertebral discs of patients with scoliosis and back pain // *Spine.* — 1998. — V.23. — P.1–7.
 40. Cormac T. Taylor Interdependent roles for hypoxia inducible factor and nuclear factor-kB in hypoxic inflammation // *J. Physiol.* — 2008. — V.586, N17. — P.4055–4059.
 41. Battié M.C., Videman T., Kaprio J. et al. The Twin Spine Study: contributions to a changing view of disc degeneration // *Spine J.* — 2009. — V.9, N1. — P.47–59.
 42. Videman T., Levälähti E., Battié M.C. The effects of anthropometrics, lifting strength, and physical activities in disc degeneration // *Spine.* — 2007. — V.32, N13. — P.1406–1413.
 43. Heikkilä J.K., Koskenvuo M., Heliovaara M. et al. Genetic and environmental factors in sciatica. Evidence from a nationwide panel of 9365 adult twin pairs // *Ann. Med.* — 1989. — V.21. — P.393–398.
 44. MacGregor A.J., Andrew T., Sambrook P.N., Spector T.D. Structural, psychological, and genetic influences on low back and neck pain: a study of adult female twins // *Arthritis Rheum.* — 2004. — V.51. — P.160–167.
 45. Jim J.J., Noponen-Hietala N., Cheung K.M. et al. The TRP2 allele of COL9A2 is an age-dependent risk factor for the development and severity of intervertebral disc degeneration // *Spine.* — 2005. — V.30. — P.2735–2742.
 46. Karppinen J., Paakko E., Paassilta P. et al. Radiologic phenotypes in lumbar MR imaging for a gene defect in the COL9A3 gene of type IX collagen // *Radiology.* — 2003. — V.227. — P.143–148.
 47. Noponen-Hietala N., Kyllonen E., Mannikko M. et al. Sequence variations in the collagen IX and XI genes are associated with degenerative lumbar spinal stenosis // *Ann. Rheum.* — 2003. — V.62. — P.1208–1214.
 48. Pluijm S.M., van Essen H.W., Bravenboer N. et al. Collagen type I alpha1 Sp1 polymorphism, osteoporosis, and intervertebral disc degeneration in older men and women // *Ann. Rheum. Dis.* — 2004. — V.63. — P.71–77.
 49. Solovieva S., Lohiniva J., Leino-Arjas P. et al. COL9A3 gene polymorphism and obesity in intervertebral disc degeneration of the lumbar spine: evidence of gene-environment interaction // *Spine.* — 2002. — V.27. — P.2691–2696.
 50. An H.S., Takegami K., Kamada H., Nguyen C.M. et al. Intradiscal administration of osteogenic protein-1 increases intervertebral disc height and proteoglycan content in the nucleus pulposus in normal adolescent rabbits // *Spine.* — 2005. — V.30. — P.25–31.
 51. Doege K.J., Coulter S.N., Meek L.M. et al. A human-specific polymorphism in the coding region of the aggrecan gene. Variable number of tandem repeats produce a range of core protein sizes in the general population // *J. Biol. Chem.*

- 1997. — V.272. — P.13974-13979.
52. Seki S., Kawaguchi Y., Chiba K. et al. A functional SNP in CILP, encoding cartilage intermediate layer protein, is associated with susceptibility to lumbar disc disease // *Nat. Genet.* — 2005. — V.37. — P.607-612.
 53. Solovieva S., Kouhia S., Leino-Arjas P. et al. Interleukin 1 polymorphisms and intervertebral disc degeneration // *Epidemiology.* — 2004. — V.15. — P.626-633.
 54. Solovieva S., Leino-Arjas P., Saarela J. et al. Possible association of interleukin-1 gene locus polymorphisms with low back pain // *Pain.* — 2004. — V.109. — P.8-19.
 55. Noponen-Hietala N., Virtanen I., Karttunen R. et al. Genetic variations in IL6 associate with intervertebral disc disease characterized by sciatica // *Pain.* — 2005. — V.114. — P.186-194.
 56. Takahashi M., Haro H., Wakabayashi Y. et al. The association of degeneration of the intervertebral disc with 5a/6a polymorphism in the promoter of the human matrix metalloproteinase-3 gene // *J. Bone Joint Surg. Br.* — 2001. — V.83. — P.491-495.
 57. Kawaguchi Y., Kanamori M., Ishihara H. et al. The association of lumbar disc disease with vitamin-D receptor gene polymorphism // *J. Bone Joint Surg. Am.* — 2002. — V.84-A. — P.2022-2028.
 58. Adams M.A., Dolan P. Spine biomechanics // *J. Biomech.* — 2005. — V.38. — P.1972-1983.
 59. Gruber H.E., Hoelscher G.L., Leslie K. et al. Three-dimensional culture of human disc cells within agarose or a collagen sponge: assessment of proteoglycan production // *Biomaterials.* — 2006. — V.27, N3. — P.371-376.
 60. Pattison S.T., Melrose J., Ghosh P. et al. Regulation of gelatinase-A (MMP-2) production by ovine intervertebral disc nucleus pulposus cells grown in alginate bead culture by transforming growth factor-beta(1) and insulin like growth factor-I // *Cell Biol. Int.* — 2001. — V.25. — P.679-689.
 61. Thompson J.P., Oegema T.R., Bradford D.S. Stimulation of mature canine intervertebral disc by growth factors // *Spine.* — 1991. — V.16. — P.253-260.
 62. Gruber H.E., Norton H.J., Hanley E.N. Anti-apoptotic effects of IGF-1 and PDGF on human intervertebral disc cells in vitro // *Spine.* — 2000. — V.25. — P.2153-2157.
 63. Okuda S., Myoui A., Ariga K. et al. Mechanisms of age-related decline in insulin-like growth factor-I dependent proteoglycan synthesis in rat intervertebral disc cells // *Spine.* — 2001. — V.26. — P.2421-2426.
 64. Osada R., Ohshima H., Ishihara H. et al. Autocrine/paracrine mechanism of insulin-like growth factor-1 secretion, and the effect of insulin-like growth factor-1 on proteoglycan synthesis in bovine intervertebral discs // *J. Orthop. Res.* — 1996. — V.14. — P.690-699.
 65. Takegami K., An H.S., Kumano F. et al. Osteogenic protein-1 is most effective in stimulating nucleus pulposus and annulus fibrosus cells to repair their matrix after chondroitinase ABC-induced in vitro chemonucleolysis // *Spine J.* — 2005. — V.5, N3. — P.231-238.
 66. Kawakami M., Matsumoto T., Hashizume H. et al. Osteogenic protein-1 (osteogenic protein-1/bone morphogenetic protein-7) inhibits degeneration and pain-related behavior induced by chronically compressed nucleus pulposus in the rat // *Spine.* — 2005. — V.30. — P.1933-1939.
 67. Klein R.G., Eek B.C., O'Neill C.W. et al. Biochemical injection treatment for discogenic low back pain: a pilot study // *Spine.* — 2003. — V.3. — P.220-226.
 68. Wehling P., Schulitz K.P., Robbins P.D. et al. Transfer of genes to chondrocytic cells of the lumbar spine. Proposal for a treatment strategy of spinal disorders by local gene therapy // *Spine.* — 1997. — V.22. — P.1092-1097.
 69. Reinecke J.A., Wehling P., Robbins P. et al. In vitro transfer of genes in spinal tissue // *Z. Orthop. Ihre Grenzgeb.* — 1997. — Bd.135. — S.412-416.
 70. Nishida K., Kang J.D., Gilbertson L.G. et al. Modulation of the biologic activity of the rabbit intervertebral disc by gene therapy: an in vivo study of adenovirus-mediated transfer of the human transforming growth factor beta 1 encoding gene // *Spine.* — 1999. — V.24. — P.2419-2425.
 71. Kroeber M.W., Unglaub F., Wang H. et al. New in vivo animal model to create intervertebral disc degeneration and to investigate the effects of therapeutic strategies to stimulate disc regeneration // *Spine.* — 2002. — V.27. — P.2684-2690.
 72. Moon S.H., Nishida K., Gilbertson L.G. et al. Biologic response of human intervertebral disc cells to gene therapy cocktail // *Spine.* — 2008. — V.33, N17. — P.1850-1855.
 73. Ritter T., Lehmann M., Volk H.D. Improvements in gene therapy: averting the immune response to adenoviral vectors // *Biodrugs.* — 2002. — V.16. — P.3-10.
 74. Somia N., Verma I.M. Gene therapy: trials and tribulations // *Nat. Rev. Genet.* — 2000. — V.1. — P.91-99.
 75. Lattermann C., Oxner W.M., Xiao X. et al. The adeno associated viral vector as a strategy for intradiscal gene transfer in immune competent and pre-exposed rabbits // *Spine.* — 2005. — V.30. — P.497-504.
 76. Yoon S.T., Park J.S., Kim K.S. et al. ISSLS prize winner: LMP-1 upregulates intervertebral disc cell production of proteoglycans and BMPs in vitro and in vivo // *Spine.* — 2004. — V.29. — P.2603-2611.
 77. Paul R., Haydon R.C., Cheng H. et al. Potential use of Sox-9 gene therapy for intervertebral degenerative disc disease // *Spine.* — 2003. — V.28. — P.755-763.
 78. Moon S.H., Nishida K., Gilbertson L. et al. Biologic response of human intervertebral disc cell to gene therapy cocktail // *Orthop. Res. Soc.* — 2001. — V.30. — P.883-886.
 79. Wallach C.J., Sobajima S., Watanabe Y. et al. Gene transfer of the catabolic inhibitor TIMP-1 increases measured proteoglycans in cells from degenerated human intervertebral discs // *Spine.* — 2003. — V.28. — P.2331-2337.
 80. Maroon J.C. Current concepts in minimally invasive discectomy // *Neurosurgery.* — 2002. — V.51. — P.137-145.
 81. Ganey T., Hutton W.C., Moseley T. et al. Intervertebral disc repair using adipose tissue-derived stem and regenerative cells: experiments in a canine model // *Spine.* — 2009. — V.34, N21. — P.2297-2304.
 82. Ganey T.M., Meisel H.J. A potential role for cell-based therapeutics in the treatment of intervertebral disc herniation // *Eur. Spine J.* — 2002. — V.11, N2. — P.S206-S214.
 83. Sato M., Asazuma T., Ishihara M. et al. An experimental study of the regeneration of the intervertebral disc with an allograft of cultured annulus fibrosus cells using a tissue-engineering method // *Spine.* — 2003. — V.28. — P.548-553.
 84. Kuhlcke K., Fehse B., Schilz A. et al. Highly efficient retroviral gene transfer based on centrifugation-mediated vector preloading of tissue culture vessels // *Mol. Ther.* — 2002. — V.5. — P.473-478.
 85. Kramer J., Hegert C., Guan K. et al. Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation in vitro: activation by BMP-2 and BMP-4 // *Mech. Dev.* — 2000. — V.92. — P.193-205.
 86. Mason J.M., Breitbart A.S., Barcia M. et al. Cartilage and bone regeneration using gene-enhanced tissue engineering // *Clin. Orthop. Relat. Res.* — 2000. — V.379, N1. — P.S171-S178.
 87. Akiyama H. Control of chondrogenesis by the transcription factor Sox9 // *Modern Rheumatol.* — 2008. — V.18, N3. — P.213-219.
 88. Richardson S.M., Walker R.V., Parker S. et al. Intervertebral disc cell mediated mesenchymal stem cell differentiation // *Stem Cells.* — 2005. — V.24. — P.707-716.
 89. Risbud M.V., Anderson D.G., Shapiro I.M. et al. Cell-based therapy for disc repair // *Spine J.* — 2005. — V.5, N6. — P.297S-303S.
 90. Sakai D., Mochida J., Iwashina T. et al. Regenerative effects of transplanting mesenchymal stem cells embedded in atelocollagen to the degenerated intervertebral disc // *Biomaterials.* — 2006. — V.27. — P.335-345.
 91. Zhang Y.G., Guo X., Xu P. et al. Bone mesenchymal stem cells transplanted into rabbit intervertebral discs can increase proteoglycans // *Clin. Orthop. Relat. Res.* — 2005. — V.430. — P.219-226.

