

УДК 611.721.1:616.34-007.43-031:611.959:616.8-08:576.32/36



Устименко А. М.

ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України», Київ, Україна

e-mail: alina_ustymenko@ukr.net

ПЕРСПЕКТИВИ ЗАСТОСУВАННЯ КЛІТИННИХ ТЕХНОЛОГІЙ В ЛІКУВАННІ ГРИЖ МІЖХРЕБЦЕВОГО ДИСКА

РЕЗЮМЕ

Одним із захворювань опорно-рухового апарату у людей, яке спричиняє значний біль, неврологічний дефіцит і функціональні розлади, є грижа міжхребцевого диска. Неефективність консервативних терапевтичних заходів, повторні звернення за медичною допомогою після хірургічного втручання спонукали до пошуку нових ефективних методів лікування, які були б спрямовані не тільки на послаблення дегенеративних процесів і болю, пов'язаного з ними, а й на відновлення функції диска та збереження його висоти. Розвиток регенеративної медицини і тканинної інженерії сприяв розробці нових дієвих методів клітинної терапії, а результати їх застосування в експериментальних дослідженнях на тваринах дають надію на можливість ефективного застосування таких підходів і у людей.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: міжхребцевий диск; драглисте ядро, фіброзне кільце; мезенхімальні стовбурові клітини; клітинна терапія

На вирішення проблем, пов'язаних з болем в спині, у розвинених країнах світу витрачається щорічно понад 100 млрд доларів [1-3]. Ці витрати пов'язані не тільки з витратами на медичне обслуговування, а також є провідною причиною виплат допомоги по непрацездатності в системі соціального забезпечення.

Як правило, біль у спині пов'язують з дегенеративними процесами, що відбуваються в опорно-руховому апараті. За даними магнітно-резонансної томографії (МРТ), приблизно у 40% пацієнтів біль у спині пов'язаний з дегенерацією міжхребцевого диска (МХД). Ці процеси супроводжуються високим рівнем продукції клітинами МХД прозапальних цитокінів. Зокрема, фактор некрозу пухлин- α (ФНП- α), інтерлейкін-1 α/β , інтерлейкін-17 спричинюють деградацію матриксу, продукцію хемокінів і зміну фенотипу клітин. Це, в свою чергу, призводить до дисбалансу катаболічних і анаболічних процесів та до порушення мікроструктури МХД з виникненням тріщин та випинань (протрузій) в ньому, які з часом посилюються і можуть призвести до розриву фіброзного кільця (ФК) з подальшим виникненням гриж у ньому. Так, показано, що виникнення гриж супроводжується інфільтрацією тканин диска CD68⁺ макрофагами, нейтрофілами і Т-лімфоцитами (CD4⁺, CD8⁺), появою в структурах МХД нервових волокон – похідних спинномозкових гангліїв [4, 5]. У цих умовах клітинами диска і імунними клітинами продукуються нейрогенні фактори, такі як фактор росту нервів (nerve growth factor – NGF) і нейротрофічний фактор мозку (brain-derived neurotrophic factor – BDNF), що спричиняють виникнення болю через вплив на катіонні канали в спино-мозкових гангліях [6-8].

Оскільки фізіотерапевтичні заходи та знеболювання дають короткострокове послаблення симптомів болю, хворим рекомендують хірургічні методи лікування болю у спині. Однак навіть хірургічне втручання не гарантує повного одужання у зв'язку з тим, що після

видалення секвестру грижі зникає гостра неврологічна симптоматика, але в МХД починаються незворотні інволюційні процеси, які призводять до значного зменшення його висоти, що, у свою чергу, знов спричиняє розвиток корінцевого синдрому та виникнення з досить високою частотою рецидивів гриж після їх видалення (приблизно 15%) [9-12]. Слід зазначити, що видалення тканини драглистого ядра (ДЯ) під час дискотомії, незалежно від віку пацієнта, призводить до прискорення процесу дегенерації МХД [13, 14]. Крім того, після оперативних втручань можливе обмеження рухливості та біомеханічних властивостей хребта [15].

Експериментальні дослідження в галузі біології стовбурових клітин та тканинної інженерії на тваринах свідчать про обнадійливі перспективи застосування клітинних технологій, завдяки яким буде можливим відновити гомеостаз дегенеративно зміненого диску у людини [16]. Вибір належного джерела клітин є необхідною умовою для успішної трансплантації, виживання та розвитку тканини відповідної якості, особливо на фоні зміненого мікрооточення дегенерованого диска. З метою регенерації та попередження втрати висоти диска при грижах МХД досліджується регенераторний потенціал аутологічних клітин драглистого ядра та фіброзного кільця. Особлива увага приділяється дослідженням по застосуванню мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (МСК) [17, 18]. Розробка новітніх підходів відновлення МХД має базуватись на розумінні особливостей його анатомічної будови та гістологічної структури.

СТРУКТУРА МІЖХРЕБЦЕВОГО ДИСКА

Хребет людини складається з 24 рухливих хребців: 7 шийних, 12 грудних, 5 поперекових. За винятком першого і другого шийних хребців, всі тіла хребців з'єднані по типу симфізу спеціальною

структурою – міжхребцевим диском, який забезпечує утримання хребців разом, розподіл та пом'якшення осьових навантажень під вагою власного тіла і під час фізичних навантажень. МХД представляє собою фіброзно-хрящову структуру, в якій виділяють три зони: драглисте ядро, фіброзне кільце та дві гіалінові пластини (ГП).

ДРАГЛИСТЕ ЯДРО

Завдяки ДЯ рівномірно розподіляється гідравлічний тиск в усіх напрямках всередині кожного диска під силою компресійного навантаження, що припадає на хребет. Драглисте ядро представляє собою високогідратовану (70-90% залежно від віку), в'язкопружну структуру, сформовану, в основному, мережею колагенових волокон II типу (55-65% сухої ваги) і в меншій кількості колагенами типів III, VI, IX, XI та протеогліканами, містить еластин та ламініні [19].

Серед протеогліканів (агрекан, біглікан, декорин, версикан), які забезпечують в'язкопружність ДЯ, слід виділити агрекан – велику молекулу ($3 \cdot 10^2 - 7 \cdot 10^3$ кДа), невід'ємною складовою якої є глікозаміногліканові ланцюжки хондроїтин сульфату та кератансульфату. Агрекан, нековалентно зв'язуючись з молекулою гіалуронану через зв'язуючий білок, утворює великі негативно заряджені агрегати, які адсорбують і утримують воду в ДЯ [20]. Слід зазначити, що кількість протеогліканів та їх здатність утримувати воду всередині ДЯ зменшується з віком [21]. Це призводить до зниження гідростатичного тиску з подальшою втратою висоти диска та збільшення стискаючої напруги на ФК. Внаслідок цього можуть виникати як випинання на ФК з утворенням так званих вузлів Шморля, так і його розриви з утворенням гриж [22].

Особливої уваги заслуговує клітинний склад ДЯ. Тканина ДЯ містить гетерогенну популяцію клітин, склад і морфологія яких змінюється з віком [23]. У дорослої людини щільність клітин дуже низька і складає $2 \cdot 10^3 - 5 \cdot 10^3$ клітин/см³ [24]. Унікальний за складом екстрацелюлярний матрикс продукується в основному хондроцитоподібними клітинами та підтримується популяцією клітин ДЯ, яка за фенотипічними маркерами має хордальне походження (експресія цитокератинів 8, 18, 19, galectin-3) [25-29]. Вважають, що хордальні клітини є своєрідними клітинами-органайзерами, які стимулюють міграцію резидентних стовбурових клітин з ніш МХД до ДЯ, а також беруть участь у підтримці його гомеостазу. Розчинні фактори, що секретуються цими клітинами, захищають клітини ДЯ від дегградації матриці та апоптозу шляхом пригнічення активності каспаз та металопроеїназ [28].

У людини при народженні клітини ДЯ великі (25-85 мкм), вакуолізовані, за морфологією схожі з ембріональними хордальними клітинами [28]. Упродовж перших років життя їх кількість зменшується і відбувається заміщення маленькими хондроцитоподібними клітинами нехордального походження. [31, 32], у зв'язку з чим здатність до відновлення цієї структури значно зменшується. ДЯ є аваскулярною структурою і за відсутності кисню клітини виживають за рахунок енергії, отриманої шляхом анаеробного гліколізу. Фізіологічне навантаження на хребет стимулює механорецептори клітин ДЯ, завдяки чому стимулюється синтез цитокінів суперродини TGF- β . Ці ростові фактори регулюють анаболічні процеси в хрящовій тканині МХД, що сприяє активізації біосинтезу колагену II типу та агрекана в ДЯ [33].

ФІБРОЗНЕ КІЛЬЦЕ

ФК має мезенхімальне походження [30], його будова представлена волокнистою хрящовою тканиною, в якій пучки колагенових волокон розташовані пошарово і кільцеподібно, мають різну орієнтацію до осі хребта і суміжних пластинок, що надає їй еластичності при компресії. Завдяки особливостям структури ФК забезпечується стійкість до зусиль розтягу з боку ДЯ, вигину і скручуванню хребта [33]. ФК містить колагени, переважно I типу (50-70% сухої ваги), протеоглікани (10-20% сухої ваги), воду (60-70%), неколагенові білки (еластин). Умовно в цій структурі можна виділити зовнішню, проміжну та внутрішню зони. Клітинний склад та типи колагенів, що

синтезуються в зазначених зонах, різняться. В зовнішній зоні ФК розташовані фібробластоподібні клітини, що синтезують колаген I типу, а також невелика кількість капілярів. Хондроцитами внутрішньої зони ФК синтезується колаген II типу, а також колагени III, IV, IX, X типів, завдяки яким формується складна міжклітинна речовина ФК. Хондроцити проміжної і внутрішньої зони розташовані в лакунах, оточені перичелюлярним матриксом, синтезують не тільки колаген, а й протеоглікани (агрекан, декорин, біглікан, версикан). Деякі колагенові волокна ФК на периферії проникають в тіла хребців по типу «шарпеевських волокон» [33]. Завдяки особливостям архітектоніки колагенових волокон ФК забезпечується відносно постійний об'єм ДЯ. Слід зазначити, що внутрішня частина фіброзного кільця більш стійка до високого гідростатичного тиску з боку драглистого ядра, ніж до зусиль розтягу зовнішньої частини ФК. За цих причин процес синтезу екстрацелюлярного матриксу та його оновлення в різних зонах відбувається по-різному: від внутрішньої зони до зовнішньої синтез колагену I типу посилений, а колагену II типу – навпаки, зменшений. Декорин та біглікан розташовані, в основному, в зовнішній частині ФК, а колаген X типу – у внутрішній зоні. Не дивлячись на дуже малий вміст еластину (приблизно 2% сухої ваги), він відіграє важливу роль в амортизаційних властивостях ФК. Завдяки еластичним волокнам, які визначаються в усіх компонентах диска, розподіляються динамічні навантаження на міжхребцевий диск.

У дорослих щільність клітин у ФК складає приблизно $9 \cdot 10^6$ клітин/см³, що майже у 2 рази більше у порівнянні з ДЯ [34]. Дослідження клітин, отриманих з ФК людини, показало їх здатність до диференціювання в хондрогенному і адипогенному напрямках [35, 36], що дає надію на їх використання при таких патологічних станах, як грижа МХД.

ГІАЛІНОВІ ПЛАСТИНКИ

Дві ГП, товщина яких не перевищує 1 мм, замикають диск аксіально та прилягають до сусідніх тіл хребців, забезпечуючи дифузійну поживних речовин і кисню до внутрішніх аваскулярних структур міжхребцевого диска [37]. ГП є найуразливішою структурою, оскільки на неї постійно впливає сила стиснення, у зв'язку з чим виникають і накопичуються мікрошкодження (тріщини). Під силою навантаження драглисте ядро проникає в губчасте тіло хребця та утворює грижі Шморля [38]. Кальцифікація ГП теж сприяє дегенерації диска, оскільки зменшується дифузія як поживних речовин, так і побічних продуктів життєдіяльності клітин. Вважають, що в зоні ГП знаходяться і ніші прогеніторних клітин, які мігрують в диск [39, 40]. Слід зазначити, що всі елементи МХД – драглисте ядро, фіброзне кільце та гіалінові пластини – структурно пов'язані один з одним і зміни в одному з них призводять до розвитку негативних змін в усій структурі. Пояснити причинно-наслідкові зв'язки цих подій, а також впровадити нові методи лікування, зокрема із застосуванням стовбурових клітин, можна завдяки моделюванню патологічних станів опорно-рухового апарату на тваринах.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ МОДЕЛІ ПАТОЛОГІЇ МІЖХРЕБЦЕВОГО ДИСКА У ТВАРИН

Зазвичай оцінку нових методів лікування опорно-рухового апарату із застосуванням клітинних технологій досліджують як на малих (миші, щурі), так і великих (кролі, собаки, свині, кози) тваринах зі змодельованими дегенеративними процесами шляхом травматичного або хімічного впливів на структури МХД [41-46]. Дослідження регенеративного потенціалу МСК, отриманих з жирової тканини, кісткового мозку, синовіальної тканини колінного суглоба, показали їх спроможність після трансплантації набувати функцій ДЯ або сприяти стимулюванню власних клітин МХД до напрацювання екстрацелюлярного матриксу [47]. Вказані ефекти були підтверджені радіографічним аналізом висоти диска, детекцією колагену II типу і протеогліканів гістологічним аналізом, аналізом експресії генів. Зокрема, на кролях було показано, що введені в МХД хондроцити еластичного

хряща вуха кролика виживають і сприяють продукції екстрацелюлярного матриксу і синтезу колагену II типу в ДЯ; трансплантовані хондроцити суглобового хряща в МХД свині теж вказують на позитивний ефект [48].

Зазначимо, що ідеальної моделі, яка могла б повністю відповідати патологічному стану в МХД людини, поки що не існує з кількох причин. По-перше, на відміну від людей, в експеримент беруться тварини зі здоровим МХД, який має нормальний клітинний склад і мікросередовище. По-друге, є відмінності в розмірах клітин, в складі клітинних популяцій ДЯ (наприклад, у дорослих гризунів ДЯ містить хордальні клітини, які, як правило, відсутні в МХД дорослої людини) та біомеханічні особливості у тварин і людини (наприклад, пряма хода у людини) [49-51].

Твариною, у якій розвиток спонтанної дегенерації МХД з боєм і неврологічним дефіцитом максимально подібний до таких процесів у людей, є собака [52-55]. Саме на них були отримані результати ефективного застосування аутологічних клітин МХД, культивованих *in vitro*. Показано, що імплантовані в МХД собаки клітини були життєздатними (за включенням BRDU-мітки), сприяли синтезу компонентів екстрацелюлярного матриксу, подібного складу МХД в нормі. Аналіз гістологічних препаратів підтвердив їх проліферативну активність [56].

Тим не менш, незважаючи на складність екстраполяції результатів, отриманих на тваринах, застосування МСК відкриває перспективи для лікування гриж МХД та дегенеративних захворювань хребта у людей [56].

У людей існує велика кількість потенційних джерел стовбурових клітин для можливого застосування у клітинній терапії: кістковий мозок, стромальні клітини жирової тканини – *adipose-derived stem cells* (ADSCs) та інші тканини (наприклад, синовіальна тканина колінного суглоба тощо). Велика увага приділяється дослідженню ефективності застосування клітин, отриманих з МХД (культивування клітин ДЯ та співкультивування клітин ДЯ і ФК) [57, 58].

Результати багатьох досліджень показують здатність МСК людини диференціюватися в клітини ДЯ і продукувати матрикс, що містить протеоглікани і колаген II типу. Більш того, співкультивування МСК людини і ДЯ не тільки посилює диференціацію клітин ДЯ, а й відновлює їх нормальне функціонування та посилює проліферацію. Зокрема, в культурах клітин ДЯ, ФК та ГП людини була ідентифікована популяція CD105⁺CD73⁺CD90⁺CD45⁻CD34⁻CD14⁻CD11b⁻CD79⁻CD19⁻HLA-DR⁻ клітин, схожих з МСК кісткового мозку, які відповідали мінімальним критеріям такого типу клітин, визначеним Міжнародним товариством клітинної терапії (ISCT) [59].

Для посилення регенераторних властивостей трансплантованих клітин в зоні ушкодження диска успішно застосовують скафолди різного походження в якості тривимірної матриці для клітин. Вони можуть підтримувати механічні навантаження і запобігати розселенню імплантованих МСК в інші тканини, а також сприяти їх проліферації і диференціюванню. Частіше використовують гідрогелі на основі колагену і гіалуронової кислоти, оскільки вони є гідрофільними полімерами, які повільно розсмоктуються, даючи можливість трансплантованим МСК диференціюватися і виробляти власну матрицю [60]. Для виживаності трансплантованих МСК скафолди повинні бути неімунногенними, біосумісними, спроможними до біодеградації і витримувати механічні навантаження в МХД. Навіть сам скафолд за рахунок своєї хімічної структури може сприяти диференціації клітин. Зокрема, показано, що ADSCs, внесені в хітозан-альгінатний гель, здатні диференціюватися в драглистоподібні клітини в умовах гіпоксії [61].

КЛІТИННА ТЕРАПІЯ ГРИЖ МІЖХРЕБЦЕВИХ ДИСКІВ В КЛІНІЦІ

Для успішного застосування в клінічній практиці клітинний матеріал має бути безпечним, з можливістю отримання його з доступних джерел в максимальній достатній кількості для регенерації структур МХД. Найбільш безпечними для трансплантації клітинами вважаються аутологічні клітини. Але завдяки імуноселекції стало можливим засто-

совувати клітинний матеріал алогенного походження. Необхідно максимально враховувати відповідність фенотипу імплантованих клітин до функціонуючих клітин в диску, а також способі і кількості їх введення. Відомо, що кількість введених клітин є критичною для їх виживання. Так, Serigano K. (2010) показав, що оптимальна кількість аутологічних МСК, виділених з гребеня клубової кістки для введення в МХД собаки складала 10^6 на диск, а 10^7 клітин – індукувала апоптоз [62].

Щоб мінімізувати ризик виникнення імуногенних реакцій та відновити відповідну біологічну матрицю для відновлення нормального метаболізму і біомеханіки диска, бажане використання аутологічних клітин МХД, отриманих після видалення секвестру грижі.

Такий підхід було реалізовано дослідницькою групою Н. J. Meisel. У 2008 р. було ініційоване перше рандомізоване дослідження на людях по оцінці ефективності застосування аутологічних хондроцитів, виділених з секвестру грижі (Euro Disc Randomized Trial) [56]. Клітинний препарат, отриманий в умовах GMP, містив близько $5 \cdot 10^6$ живих клітин. Ін'єкцію проводили тонкою голкою для мінімальної травматизації ФК, оскільки відомо, що розмір ушкодження ФК корелює з посиленням дегенерації МХД [63-66]. Після дворічного спостереження пацієнтів результати були обнадійливими і відображали ефекти, отримані раніше на собаках: зник біль, висота диска не втратилась у порівнянні з пацієнтами, яким було видалено грижу без подальшого введення клітинного матеріалу [56]. Слід зазначити, що клітини ДЯ, отримані від пацієнтів з грижами диска, часто були з ознаками апоптозу, старіння та продукували менше колагену II типу; також спостерігалась підвищена експресія катаболічних факторів і зниження синтезу компонентів матриксу [67, 68]. Показано, що клітини ДЯ людини, отримані після видалення секвестра грижі, мали ознаки старіння в культурі *in vitro* і кількість їх збільшувалась з 19,8% до 23,9% на 4-у і 5-у пасажах відповідно. Цей факт підтверджувався присутністю β -галактозаміну (SA β Gal) – маркеру клітинного старіння. Але навіть в такому матеріалі спостерігається експресія маркерів мультипотентності Oct3/4, Notch1 і таких маркерів МСК, як CD105, CD90, Stro-1, що свідчить про присутність примітивної клітинної популяції в дегенерованому диску, яка бере участь у його відновленні [69].

З 2012 р. триває нове клінічне випробування (NCT01640457) клітинного препарату під назвою NOVOCART[®] Disc Plus (Tetec, Німеччина), отриманого з клітин видаленого секвестру грижі МХД людини [70]. Отримані згодом результати дозволять визначити безпеку та ефективність клітинної терапії в регенерації МХД.

Іншим джерелом стовбурових клітин є кістковий мозок. Цікаві результати по застосуванню попередньо культивованих аутологічних МСК кісткового мозку були отримані в клінічних дослідженнях на пацієнтах з дегенеративними захворюваннями диска зі стійкими симптомами болю в спині. У дослідженні Orozco L. (2011) попередньо культивовані аутологічні клітини кісткового мозку вводили за допомогою ін'єкції безпосередньо в ДЯ [71], а в дослідженні Yoshikawa T. (2010) – на колагеновому носії [72]. У першому випадку у 10 пацієнтів з інтактним ФК і стійким боєм в спині через три місяці після введення клітин повністю зникав біль, а збільшення у висоті диска спостерігали через 12 місяців. Такий знеболюючий ефект можна пояснити поліпшенням міжклітинних взаємодій в структурах МХД, яке проявляється швидше, ніж можна виявити регенерацію тканини. Можна припустити, що в цьому випадку введені МСК проявляють імунomodуючі властивості. Дані другого нечисленного дослідження вказують на поліпшення стану у 2 пацієнтів з «вакуум-феноменом» (наявність пухирців газу різного розміру в товщі диска), що підтверджено рентгенограмою і комп'ютерною томографією. В обох пацієнтів відбувалось пом'якшення симптомів болю та спостерігалась висока інтенсивність сигналу в міжхребцевих дисках саме в зонах з трансплантованими МСК в колагеновому носії-губці, що свідчило про високий вміст вологи і було причиною збереження висоти диска [72].

Однак є і виключення серед позитивних результатів клітинної терапії, які доводять важливість правильного вибору джерела клітин і їх кількості. Дослідження, проведене Haufe S. M. в 2006 р. із

застосуванням аутологічних гемопоетичних стовбурових клітин, отриманих з тазової кістки, не показали покращення у стані 10 пацієнтів зі стійким дискогенним болем. Це пов'язують з двома причинами: малою кількістю отриманих клітин *in vitro* або неправильно вибраним джерелом клітин, хоча попередні дослідження з ними на тваринах показали позитивні результати [73].

Завдяки можливостям імуноселекції, стало можливим випробувати на людях аlogenні клітинні препарати різного походження: з кісткового мозку (NCT01860417) [74], з дорослих попередників мезенхімальних клітин (NCT01290367) [75], з ювенільних хондроцитів (NCT01771471) [76].

Враховуючи доступність, можливість отримання максимально достатньої кількості клітин, а також доведено в експерименті на тваринах здатність відновлювати функцію клітин ДЯ, великі перспективи для застосування в клініці представляють стромальні клітини жирової тканини – ADSCs [77, 78].

Дані експериментальних досліджень на собаках свідчать, що їх імплантація в МХД після видалення грижового секвестру сприяє

його регенерації, про що свідчать незмінна морфологія і збережена висота, підтверджена МРТ-дослідженням [79].

Іншими дослідниками показано, що співкультивування ADSCs з клітинами ДЯ супресує апоптоз клітин ДЯ людини через пригнічення активації каспази-9 і каспази-3. Крім того, ADSCs захищають клітини ДЯ від руйнуючих дій стискаючого навантаження завдяки значній експресії білків генів екстрацелюлярного матриксу (SOX9, COL2A1 і ACAN), генів (TIMP-1 і TIMP-2) тканинних інгібіторів металопротеїназ (TIMPs) та цитокератину 8 (CK8). Також ADSCs сприяли пригніченню прозапальних факторів IL-1 β , IL-6, TGF- β 1 і TNF- α [78].

Завдяки позитивним результатам, отриманим на експериментальних тваринах, в січні 2015 р. почалося клінічне випробування (фаза I) аутологічних стромальних клітин жирової тканини в комбінації з похідними гіалуронової кислоти «Autologous Adipose Derived Stem Cell Therapy for Intervertebral Disc Degeneration» (NCT02338271) на 10 пацієнтах з хронічним болем в спині та дегенерацією поперекових МХД [80].

ВИСНОВКИ

*Узагальнюючи вищевикладене, можна констатувати ефективність та перспективність застосування клітинної терапії при дегенеративно-дистрофічних захворюваннях опорно-рухового апарату, зокрема при грижі міжхребцевого диска. Застосування клітинних препаратів попереджує втрату висоти диска у порівнянні з контрольними групами пацієнтів, яким було тільки видалено секвестр грижі, без подальшої трансплантації. Як експериментальні дослідження на тваринах, так і клінічні дослідження показують покращення біомеханічних властивостей хребта, а також втрату або послаблення больових відчуттів. Важливо відзначити, що безпека біологічного матеріалу, з урахуванням необхідності маніпуляцій *in vitro*, залишається основним питанням. Проведення великомасштабних рандомізованих випробувань з часом дозволить визначити реальну безпеку та ефективність клітинної терапії в регенерації МХД.*

ЛІТЕРАТУРА

1. Katz J. N. Lumbar disc disorders and low-back pain: socioeconomic factors and consequences [Text] / J. N. Katz // J Bone Joint Surg Am. – 2006. – Vol. 88, № 2. – P. 21–24.
2. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 [Text] / T. Vos, A. D. Flaxman, M. Naghavi, et al. // The Lancet. – 2010. – Vol. 380, № 9859. – P. 2163–2196.
3. Dagenais S. Synthesis of recommendations for the assessment and management of low back pain from recent clinical practice guidelines [Text] / S. Dagenais, A. Tricco, S. Haldeman // Spine Journal. – 2010. – Vol. 10, № 6. – P. 514–529.
4. Proinflammatory cytokine expression profile in degenerated and herniated human intervertebral disc tissues [Text] / M. F. Shamji, L. A. Setton, V. Jarvis, et al. // Arthritis Rheum. – 2010. – Vol. 62. – P. 1974–1982.
5. Risbud V. Makarand. Role of Cytokines in Intervertebral Disc Degeneration: Pain and Disc-content [Text] // M. V. Risbud, I. M. Shapiro // Nat Rev Rheumatol. – 2014. – Vol. 10, № 1. – P. 44–56.
6. Inflammation in intervertebral disc degeneration and regeneration [Text] / M. Molinos, C. R. Almeida, J. Caldeira, et al. // J. R. Soc. – 2015. – Interface 12: 20141191.
7. Increased nerve and blood vessel ingrowth associated with proteoglycan depletion in an ovine annular lesion model of experimental disc degeneration [Text] / J. Melrose, S. Roberts, S. Smith, et al. // Spine. – 2002. – Vol. 27. – P. 1278–1285.
8. Nerve growth factor expression and innervation of the painful intervertebral disc [Text] / A. J. Freemont, A. Watkins, C. Le Maitre, et al. // J Pathol. – 2002. – Vol. 197. – P. 286–292.
9. Long-term outcomes of surgical and nonsurgical management of sciatica secondary to a lumbar disc herniation: 10 year results from the maine lumbar spine study [Text] / S. J. Atlas, R. B. Keller, Y. A. Wu, et al. // Spine. – 2005. – Vol. 30, № 8. – P. 927–935.
10. Choy D. S. Familial incidence of intervertebral disc herniation: an hypothesis suggesting that laminectomy and discectomy may be counterproductive [Text] / D. S. Choy // J Clin Laser Med Surg. – 2000. – Vol. 18, № 1. – P. 29–32.
11. Reoperations after first lumbar disc herniation surgery; a special interest on residives during a 5-year follow-up [Text] / A. Hakkinen, I. Kiviranta, M. H. Neva, et al. // BMC Musculoskelet Disord. – 2007. – Vol. 8, № 2. – DOI:10.1186/1471-2474-8-2.
12. Swartz K. R. Recurrent lumbar disc herniation [Text] / K. R. Swartz, G. R. Trost // Neurosurg Focus. – 2003. – Vol. 15, № 3. – P. E10.
13. Xia X. P. Prevalence of adjacent segment degeneration after spine surgery: a systematic review and meta-analysis [Text] / X. P. Xia, H. L. Chen, H. B. Cheng // Spine. – 2013. – Vol. 38. – P. 597–608.
14. The importance of preserving disc structure in surgical approaches to lumbar disc herniation [Text] / J. Mochida, K. Nishimura, T. Nomura, et al. // Spine. – 1996. – Vol. 21. – P. 1556–1563.
15. Schlegel J. D. Lumbar motion segment pathology adjacent to thoracolumbar, lumbar, and lumbosacral fusions [Text] / J. D. Schlegel, J. A. Smith, R. L. Schlessener // Spine. – 1996. – Vol. 21. – P. 970–981.
16. Mesenchymal stem cells: potential application in intervertebral disc regeneration [Text] / A. Wei, B. Shen, L. Williams, et al. // Translational Pediatrics. – 2014. – Vol. 3, № 2. – P. 71–90.

17. Potential regenerative treatment strategies for intervertebral disc degeneration in dogs [Text] / F. C. Bach, N. Willems, L. C. Penning, et al. // BMC Vet Res. – 2014. – Vol. 10, № 1. – P. 3.
18. Gilbert H. T. Stem cell regeneration of degenerated intervertebral discs: current status (update) [Text] / H. T. Gilbert, J. A. Hoyland, S. M. Richardson // Curr Pain Headache Rep. – 2013. – Vol. 17. – P. 377.
19. Gilchrist C. L. Nucleus pulposus cell-matrix interactions with laminins [Text] / C. L. Gilchrist, A.T. Francisco, G. E. Plopper // Eur Cell Mater. – 2011. – Vol. 21. – P. 523–532.
20. Hardingham T. E. The specific interaction of hyaluronic acid with cartilage proteoglycans [Text] / T. E. Hardingham, H. Muir // Biochim Biophys Acta. – 1972. – Vol. 279. – P. 401–405.
21. «The human lumbar intervertebral disc: Evidence for changes in the biosynthesis and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, ageing, and degeneration» [Text] / J. Antoniou, T. Steffen, F. Nelson, et al. // Journal of Clinical Investigation. – 1996. – Vol. 98, № 4. – P. 996–1003.
22. Adams M. A. Gradual disc prolapse [Text] / M. A. Adams, W. C. Hutton // Spine. – 1985. – Vol. 10, № 6. – P. 524–31.
23. Bach F. C. The species-specific regenerative effects of notochordal cell-conditioned medium on chondrocyte-like cells derived from degenerated human intervertebral discs [Text] / F. C. Bach, S. A. H.de Vries, A. Krouwels // European Cells and Materials. – 2015. – Vol. 30. – P. 132–147.
24. Age-related variation in cell density of human lumbar intervertebral disc [Text] / T. Liebscher, M. Haefeli, K. Wuertz, et al. // Spine. – 2011. – Vol. 36. – P. 153–159.
25. Hunter C. J. The notochordal cell in the nucleus pulposus: a review in the context of tissue engineering [Text] / C. J. Hunter, J. R. Matyas, N. A. Duncan // Tissue Eng. – 2003. – Vol. 9. – P. 667–677.
26. Choi K. S. Identification of nucleus pulposus precursor cells and notochordal remnants in the mouse: implications for disk degeneration and chordoma formation [Text] / K. S. Choi, M. J. Cohn, B. D. Harfe // Dev Dyn. – 2008. – Vol. 237. – P. 3953–3958.
27. Sivakamasundari V. Stemming the Degeneration: IVD Stem Cells and Stem Cell Regenerative Therapy for Degenerative Disc Disease. [Text] / V. Sivakamasundari, T. Lufkin // Advances in Stem Cells. – 2013. – Vol. 2013. – Article ID 724547.
28. Risbud M. V. Notochordal Cells in the Adult Intervertebral Disc: New Perspective on an Old Question Crit Rev [Text] / M. V. Risbud, I. M. Shapiro // Eukaryot Gene Expr. – 2011. – Vol. 21, № 1. – P. 29–41.
29. Diversity of intervertebral disc cells: phenotype and function [Text] / G. Pattappa, Z. Li, M. Peroglio, et al. // J. Anat. – 2012. – Vol. 221. – P. 480–496.
30. Walmsley R. The development and growth of the intervertebral disc [Text] / R. Walmsley // Edinburgh Med J. – 1953. – Vol. 60, № 8. – P. 341–364.
31. Histology and pathology of the human intervertebral disc [Text] / S. Roberts, H. Evans, J. Trivedi, et al. // J Bone Joint Surg. – 2006. – Vol. 88, № 2. – P. 10–14.
32. Hunter C. J. Cytomorphology of notochordal and chondrocytic cells from the nucleus pulposus: a species comparison [Text] / C. J. Hunter, J. R. Matyas, N. A. Duncan // J Anat. – 2004. – Vol. 205. – P. 357–362.
33. Дедух Н. В. Межпозвоночные диски: структурная организация в норме и при патологии [Текст] / Н. В. Дедух // Проблемы остеологии. – 2008. – Т. 11, № 3–4. – С. 11–17.
34. Repair, regenerative and supportive therapies of the annulus fibrosus: achievements and challenges [Text] / J. L. Bron, M. N. Helder, H.-J. Meisel et al. // Eur Spine J. – 2009. – Vol. 18. – P. 301–313.
35. Age- and degeneration-related variations in cell density and glycosaminoglycan content in the human cervical intervertebral disc and its endplates [Text] / K. A. Tomaszewski, J. A. Walocha, E. Mizia, et al. // Pol J Pathol. – 2015. – Vol. 66, № 3. – P. 296–300.
36. Evidence for skeletal progenitor cells in the degenerate human intervertebral disc [Text] / M.V. Risbud, A. Guttapalli, T. T. Tsai, et al. // Spine. – 2007. – Vol. 32, № 23. – P. 2537–2544.
37. Biochemical and structural properties of the cartilage end-plate and its relation to the intervertebral disc [Text] / S. Roberts, J. Menage, J. P. Urban // Spine. – 1989. – Vol. 14. – P. 166–174.
38. Adams M. A. What is Intervertebral Disc Degeneration, and What Causes It? [Text] / M. A. Adams, P. J. Roughley // Spine. – 2006. – Vol. 31, № 18. – P. 2151–2161.
39. The presence of local mesenchymal progenitor cells in human degenerated intervertebral discs and possibilities to influence these *in vitro*: a descriptive study in humans [Text] / H. Brisby, N. Papadimitriou, C. Brantsing, et al. // Stem Cells Dev. – 2013. – Vol. 22. – P. 804–14.
40. Notochordal cells stimulate migration of cartilage end plate chondrocytes of the intervertebral disc in *in vitro* cell migration assays [Text] / K. W. Kim, K. Y. Ha, J. S. Lee, et al. // Spine J. – 2009. – Vol. 9. – P. 323–9.
41. Translation of an Engineered Nanofibrous Disc-like Angle Ply Structure for Intervertebral Disc Replacement in a Small Animal Model [Text] / J. T. Martin, A. H. Milby, J. A. Chiaro, et al. // Acta Biomater. – 2014. – Vol. 10, № 6. – P. 2473–2481.
42. Crevensten G. Intervertebral disc cell therapy for regeneration: mesenchymal stem cell implantation in rat intervertebral discs [Text] / G. Crevensten, A. J. Walsh, D. Ananthakrishnan, et al. // Ann. Biomed. Eng. – 2004. – Vol. 32. – P. 430–434.
43. Wang Y. H. Effect of the mixture of bone marrow mesenchymal stromal cells and annulus fibrosus cells in repairing the degenerative discs of rabbits [Text] / Y. H. Wang, B. Yang, W. L. Li, // Genet Mol Res. – 2015. – Vol. 14, № 1. – P. 2365–73.
44. B. A. Winkelstein. Intervertebral Disc Herniation: Pathophysiology and Emerging Therapies [Text] / B. A. Winkelstein, K. D. Allen, L.A. Setton // The Intervertebral Disc. – 2014. – DOI 10.1007/978-3-7091-1535-0_19.
45. Transplantation of human mesenchymal stem cells into intervertebral discs in a xenogeneic porcine model [Text] / H. B. Henriksson, T. Svanvik, M. Jonsson, et al. // Spine. – 2009. – Vol. 34. – P. 141–148.
46. Transplantation of goat bone marrow stromal cells to the degenerating intervertebral disc in a goat disc injury model [Text] / Y. Zhang, S. Drapeau, S. A. Howard, et al. // Spine. – 2011. – Vol. 36. – P. 372–377.
47. Nucleus pulposus degeneration alters properties of resident progenitor cells [Text] / O. Mizrahi, D. Sheyn, W. Tawackoli, et al. // The Spine Journal. – 2013. – Vol. 13, № 7. – P. 803–814.
48. Gorenssek M. Nucleus pulposus repair with cultured autologous elastic cartilage derived chondrocytes [Text] / M. Gorenssek, C. Jaksimovic, N. Kregar-Velikonja // Cell. Mol. Biol. Lett. – 2004. – Vol. 9. – P. 363–373.
49. New *in vivo* animal model to create intervertebral disc degeneration and to investigate the effects of therapeutic strategies to stimulate disc regeneration [Text] / M. W. Kroeber, F. Unglaub, H. Wang, et al. // Spine. – 2002. – Vol. 27. – P. 2684–2690.
50. Brinckerhoff C. E. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince [Text] / C. E. Brinckerhoff, L. M. Martrisian // Nat Rev Mol Cell Biol. – 2002. – Vol. 3. – P. 207–214.
51. Spondylosis in sand rats: a model of intervertebral disc degeneration and hyperostosis [Text] / R. W. Moskowitz, I. Ziv, C. W. Denko, et al. // J Orthop Res. – 1990. – Vol. 8. – P. 401–411.
52. Bergknut N. Intervertebral Disc Degeneration in Dogs [Text] / N. Bergknut // Doctoral Thesis Swedish University of Agricultural Sciences Utrecht University Uppsala & Utrecht. – 2011. – P. 111.

53. Hansen H. J. A pathologic-anatomical interpretation of disc degeneration in dogs [Text] / H. J. Hansen // Acta Orthop Scand. – 1951. – Vol. 20. – P. 280-293.
54. Webb A. Potential sources of neck and back pain in clinical conditions of dogs and cats: a review [Text] / A. Webb // Vet J. – 2003. – Vol. 165, №3. – P.193 – 213.
55. Tissue-engineered allograft intervertebral disc transplantation for the treatment of degenerative disc disease: experimental study in a beagle model [Text] / H. Xin, C. Zhang, D. Wang, et al. // Tissue Eng Part A. – 2013. – Vol. 19, № 1-2. – P. 143-51.
56. Cell transplantation in lumbar spine disc degeneration disease [Text] / C. Hohaus, T. M. Ganey, Y. Minkus, et al. // Eur Spine J. – 2008. – Vol. 17, № 4. – P.492–503.
57. Co-culture of human nucleus pulposus cells with multipotent mesenchymal stromal cells from human bone marrow reveals formation of tunnelling nanotubes [text] / T. P. Lehmann, K. Filipiak, W. Juzwa, et al. // Mol Med Rep. – 2014. – Vol. 9, № 2. – P. 574-82.
58. Co-culture induces mesenchymal stem cell differentiation and modulation of the degenerate human nucleus pulposus cell phenotype [Text] / S. Strassburg, S. M. Richardson, A. J. Freemont, et al. // Regen Med. – 2010. – Vol. 5, № 5. – P. 701-11.
59. Mesenchymal Stem Cells in Regenerative Medicine: Focus on Articular Cartilage and Intervertebral Disc Regeneration [Text] / S. M. Richardson, G. Kalamegam, P. N. Pushparaj, et al. // A. Methods. – 2015. – Vol. - S1046-2023, № 15. – P. 30091-8.
60. Role of biomechanics in intervertebral disc degeneration and regenerative therapies: what needs repairing in the disc and what are promising biomaterials for its repair? [Text] / J. C. Iatridis, S. B. Nicoll, A. J. Michalek, et al. // Spine J. – 2013. – Vol. 13. – P. 243-62.
61. Differentiation of adiposederived stem cells toward nucleus pulposus-like cells induced by hypoxia and a three-dimensional chitosanalginate gel scaffold *in vitro* [Text] / Z. Zhang, F. Li, H. Tian, et al. // Chin Med J. – 2014. – Vol. 127. – P. 314-21.
62. Serigano K. Effect of cell number on mesenchymal stem cell transplantation in a canine disc degeneration model [Text] / K. Serigano, D. Sakai // J Orthop Res. – 2010. – Vol. 28, № 10. – P. 1267-75.
63. Does provocative discography cause clinically important injury to the lumbar intervertebral disc? a ten-year matched cohort stud [Text] / E. Carragee, J. M. Cuellar, E. L. Hurwitz, et al. // Spine J. – 2011. – Vol. 11, № 10. – P. S23–S24.
64. Adams M. A. The stages of disc degeneration as revealed by discograms [Text] / M. A. Adams, P. Dolan, W. C. Hutton // J Bone Joint Surg Br. – 1986. – Vol. 68, № 1. – P. 36–41.
65. Deleterious effects of discography radiocontrast solution on human annulus cell *in vitro*: changes in cell viability, proliferation, and apoptosis in exposed cells [Text] / H. E. Gruber, A. L. Rhyne, K. J. Hansen, et al. // Spine J. – 2012. – Vol. 12, № 4. – P. 329–335.
66. Needle puncture injury causes acute and long-term mechanical deficiency in a mouse model of intervertebral disc degeneration [Text] / J. T. Martin, D. J. Gorth, E. E. Beattie, et al. // J Orthop Res. – 2013. – Vol. 31, № 8. – P. 1276-82.
67. Le Maitre C. L. Catabolic cytokine expression in degenerate and herniated human intervertebral discs: IL-1beta and TNFalpha expression profile [Text] / C. L. Le Maitre, J. A. Hoyland, A. J. Freemont // Arthritis Res Ther. – 2007. – Vol. 9. – P. 77.
68. Park J.-B. Expression of Fas ligand and apoptosis of disc cells in herniated lumbar disc tissue [Text] / J. – B. Park, H. Chang, K. W. Kim // Spine. – 2001. – Vol. 26. – P. 618–621.
69. The presence of local mesenchymal progenitor cells in human degenerated intervertebral discs and possibilities to influence these *in vitro*: a descriptive study in humans [Text] / H. Brisby, N. Papadimitriou, C. Brantsing, et al. // Stem Cells Dev. – 2013. – Vol. 22, № 5. – P. 804-14.
70. NOVOCART US National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov [online], <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01640457> (2014).
71. Intervertebral disc repair by autologous mesenchymal bone marrow cells: a pilot study [Text] / L. Orozco, R. Soler, C. Morera, et al. // Transplantation. – 2011. – Vol. 92, № 7. – P. 822-8.
72. Disc regeneration therapy using marrow mesenchymal cell transplantation: a report of two case studies [Text] / T. Yoshikawa, Y. Ueda, K. Miyazaki, et al. // Spine. – 2010. – Vol. 35. – P. E475–E480.
73. Hufe S. M. W. Intradiscal injection of hematopoietic stem cells in an attempt to rejuvenate the intervertebral disc [Text] / S. M.W. Hufe, A. R. Mark // Stem cell dev. – 2006. – Vol. 15. – P. 136-137.
74. US National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov [online], <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01860417> (2014).
75. US National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov [online], <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01290367> (2014).
76. US National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov [online], <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01771471> (2014).
77. Differentiation of rat adipose tissue-derived mesenchymal stem cells towards a nucleus pulposus-like phenotype *in vitro* [Text] / L. W. Xie, H. Fang, A. M. Chen, et al. // Chin J Traumatol. – 2009. – Vol.12, № 2. – P. 98-103.
78. Adipose-Derived Stromal Cells Protect Intervertebral Disc Cells in Compression: Implications for Stem Cell Regenerative Disc Therapy [Text] / Z. Sun, B. Luo, Z.-H. Liu, et al. // Int J Biol Sci. – 2015. – Vol. 11, № 2. – P. 133–143.
79. Intervertebral Disc Repair Using Adipose Tissue-Derived Stem and Regenerative Cells Experiments in a Canine Model [Text] / Timothy Ganey, William C. Hutton, Timothy Moseley, et al. // Spine. – 2009. – Vol. 34, № 21. – P. 2297–2304.
80. US National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov [online], <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02338271> (2015).



СТАТТЯ НА САЙТІ
TRANSPLANTOLOGY.ORG

Автор підтверджує відсутність можливих конфліктів інтересів.

Надійшла до редакції 05.10.2015 р.

Прийнята до друку 09.11.2015 р.