

# ЭМБРИОГЕНЕЗ И РЕГЕНЕРАЦИЯ МЕЖПОЗВОНКОВОГО ДИСКА (ОБЗОР)

DOI: 10.17691/stm2017.9.3.19

УДК 616.721.1:591.471.32:57.086.83

Поступила 30.09.2015 г.

И.А. Степанов, аспирант курса нейрохирургии<sup>1</sup>;Л.А. Бардонова, аспирант курса нейрохирургии<sup>1</sup>;Е.Г. Бельих, врач-нейрохирург<sup>2</sup>; ассистент курса нейрохирургии<sup>1</sup>;В.А. Бывальцев, д.м.н., профессор, зав. курсом нейрохирургии<sup>1</sup>; руководитель Центра нейрохирургии<sup>3</sup>;  
руководитель научно-клинического отдела нейрохирургии<sup>4</sup>; профессор кафедры травматологии,  
ортопедии и нейрохирургии<sup>5</sup><sup>1</sup>Иркутский государственный медицинский университет, Иркутск, 664003,

ул. Красного Восстания, 1;

<sup>2</sup>Дорожная клиническая больница на ст. Иркутск-Пассажирский, Иркутск, 664082, ул. Боткина, 10;<sup>3</sup>Иркутский научно-исследовательский противочумный институт, Иркутск, 664007, ул. Трилиссера, 78;<sup>4</sup>Иркутский научный центр хирургии и травматологии, Иркутск, 664003, ул. Борцов Революции, 1;<sup>5</sup>Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования, Иркутск, 664079,  
микрорайон Юбилейный, 100

Показано, что дегенеративные процессы межпозвонкового диска представляют собой целый ряд молекулярных, клеточных, структурных и функциональных изменений, основным клиническим проявлением которых является болевой синдром. На этом основании традиционная терапия дегенерации межпозвонкового диска направлена на устранение боли и не учитывает истинных причин развития дегенеративных процессов, не исследует возможности дальнейшего восстановления структуры и биомеханической функции диска. Новый подход к изучению молекулярных и клеточных механизмов дегенерации межпозвонкового диска, рассмотрение патогенеза дегенеративных процессов диска с позиций его развития в онтогенезе позволяют открыть новые звенья патогенеза и предложить новые перспективные методы терапевтического воздействия.

Рассмотрены разработанные модели дегенерации межпозвонковых дисков, которые позволяют комплексно изучать морфогенез и связанные с ним внутриклеточные сигнальные пути, а также ранние постнатальные изменения в диске. Представлены современные стратегии биологической терапии дегенеративных процессов, которые направлены на активацию регенераторных потенциалов в диске и его самообновление. Одним из перспективных методов биологической терапии данного заболевания названо использование аутологичных культивированных *in vitro* клеток межпозвонковых дисков с последующей их имплантацией, что потенциально может восполнить дефицит клеток, а следовательно, и матрикса диска.

**Ключевые слова:** дегенерация межпозвонкового диска; студенистое ядро; фиброзное кольцо; внеклеточный матрикс; агреган; модели дегенерации диска; эмбриогенез; внутриклеточные сигнальные пути.

**Как цитировать:** Stepanov I.A., Bardonova L.A., Belykh Y.G., Byvaltsev V.A. Embryogenesis and regeneration of the intervertebral disk (review). *Sovremennye tehnologii v medicine* 2017; 9(3): 151–161, <https://doi.org/10.17691/stm2017.9.3.19>

## English

## Embryogenesis and Regeneration of the Intervertebral Disk (Review)

I.A. Stepanov, PhD Student, Neurosurgery Course<sup>1</sup>;L.A. Bardonova, PhD Student, Neurosurgery Course<sup>1</sup>;Y.G. Belykh, Neurosurgeon<sup>2</sup>; Tutor, Neurosurgery Course<sup>1</sup>;V.A. Byvaltsev, MD, DSc, Professor, Head of the Neurosurgery Course<sup>1</sup>; Chief of the Neurosurgery Center<sup>3</sup>;  
Head of the Scientific and Clinical Unit of Neurosurgery<sup>4</sup>; Professor, Department of Traumatology,  
Orthopedics and Neurosurgery<sup>5</sup><sup>1</sup>Irkutsk State Medical University, 1 Krasnogo Vosstaniya St., Irkutsk, 664003, Russian Federation;<sup>2</sup>Railway Clinical Hospital at the Irkutsk-Passagirsky station, 10 Botkin St., Irkutsk, 664082, Russian Federation;

**Для контактов:** Бывальцев Вадим Анатольевич; e-mail: [byval75vadim@yandex.ru](mailto:byval75vadim@yandex.ru)

<sup>3</sup>Irkutsk Research Antiplague Institute, 78 Trilisser St., Irkutsk, 664007, Russian Federation;

<sup>4</sup>Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology, 1 Bortsov Revolutsii St., Irkutsk, 664003, Russian Federation;

<sup>5</sup>Irkutsk State Medical Academy for Postgraduate Education, 100 Yubileyny Microdistrict, Irkutsk, 664079, Russian Federation

Degenerative processes of the intervertebral disc are shown to represent a diversity of molecular, cellular, structural, and functional alterations, the main clinical manifestation of which is pain syndrome. On this basis, therapy of intervertebral disc degeneration is directed to pain elimination and does not take into consideration real causes of degenerative process development, does not study the feasibility of regenerating the structure and biomechanical function of the disc. A new approach to the study of molecular and cellular mechanisms of intervertebral disc degeneration, examination of the disc degenerative process pathogenesis from the standpoint of its ontogenetic development allows discovery of new links of pathogenesis and suggestion of new promising ways of therapeutic intervention. The developed models of intervertebral disc degeneration, which make it possible to explore comprehensively morphogenesis and associated intracellular signal pathways, as well as early postnatal alterations in the discs, are considered here. Current strategies of biological therapy of degenerative processes, which are directed to the activation of regenerative potentials in the disc and in its self-renewal, are presented. One of the perspective methods of biological therapy of this disease is application of autologous intervertebral disc cells cultured *in vitro* with their subsequent transplantation, which can potentially compensate for cell deficiency and, consequently, disc matrix as well.

**Key words:** intervertebral disc degeneration; nucleus pulpous; annulus fibrosus; extracellular matrix; aggrecan; models of disc degeneration; embryogenesis; intracellular signal pathways.

Дегенеративные процессы межпозвонкового диска (МПД) в настоящее время продолжают оставаться актуальной проблемой современной медицины. Наиболее частым клиническим проявлением дегенеративных процессов МПД является боль в спине, которая зачастую сопряжена с ранней утратой трудоспособности [1, 2]. Болевой синдром в спине встречается у более 85% людей старше 35 лет [3, 4]. МПД представляет собой частично подвижный сустав, соединяющий тела позвонков и обеспечивающий равномерное распределение нагрузки и мобильность всего позвоночного столба. Причины развития дегенеративных процессов МПД до конца не изучены, но можно с уверенностью сказать, что они тесно связаны с процессами старения организма человека [5]. Дегенерация МПД — это сложный каскад реакций, который развивается в первую очередь в клетках МПД и, прогрессируя в течение десятилетий, проявляет себя в виде структурных и функциональных нарушений [6, 7].

Современные методы лечения дегенеративных процессов МПД направлены лишь на устранение болевого синдрома и, как правило, включают в себя противовоспалительные лекарственные средства и физиотерапию. В тех случаях, когда показано оперативное лечение, «золотым стандартом» является спондилодез с применением различных фиксирующих систем [8]. Однако только устранение болевого синдрома без восстановления механики или структуры МПД может привести к рецидивированию болевого синдрома и, как следствие, — к прогрессированию дегенерации МПД [9, 10]. В последнее время популярным методом хирургии дегенеративных процессов МПД становится артропластика (замена искусственным диском), которая направлена на восстановление подвижности позвоночника. Однако такого рода им-

плантаты имеют целый ряд недостатков, что ограничивает их широкое применение: они не способны полностью повторить механическую функцию нативного МПД, подвержены быстрому износу и поломкам [10]. А потому наиболее перспективным методом лечения дегенеративных процессов МПД является биологическая терапия, основанная на изучении молекулярных механизмов дегенерации МПД.

Известно, что дегенеративные процессы МПД не характерны для людей подросткового возраста, тем не менее микроструктурные изменения в МПД обнаруживаются уже в первые годы жизни ребенка [11, 12]. С точки зрения эмбриологии, МПД — это уникальная структура, происходящая из клеток хорды и ножек сомитов. Именно эти клеточные популяции образуют в последующем ткань МПД с его неповторимыми микроструктурными, механическими и функциональными особенностями. Именно с позиций эмбриологии мы и будем рассматривать молекулярные и клеточные механизмы дегенеративных процессов МПД и перспективные методы биологической терапии дегенерирующего МПД.

### Строение и метаболизм межпозвонкового диска

МПД — это высокоспециализированное образование, состоящее из трех основных структурных компонентов: фиброзного кольца, студенистого ядра и концевых пластинок [13]. Фиброзное кольцо ограничивает студенистое ядро — желатиноподобную сердцевину, состоящую из беспорядочно расположенных коллагеновых и радиально расположенных эластиновых волокон, погруженных в высокогидратированный агрекансодержащий гель. Фиброзное кольцо состо-

ит примерно из 25 концентрических колец, или ламелл, образованных параллельно расположенными коллагеновыми фибриллами, которые в свою очередь окружены эластиновыми волокнами [14, 15]. Высокогидратированный агрекан в студенистом ядре поддерживает осмотическое давление, обеспечивая формирование свойств МПД.

Студенистое ядро и фиброзное кольцо различаются по клеточному составу. Клетки фиброзного кольца во внешней части фибробластоподобной структуры расположены параллельно коллагеновым волокнам. Во внутренней части они более овальные, хондроцитоподобные. Клетки студенистого ядра имеют хондроцитоподобную структуру и располагаются единично — около 5000 в 1 мм<sup>3</sup>, погружены в матрикс и иногда заключены в капсулу. Некоторые клетки МПД как в студенистом ядре, так и в фиброзном кольце имеют удлиненную форму и могут достигать 30 мкм. Предполагают, что они выполняют сенсорную, коммуникативную роль в МПД [16, 17]. Две концевые пластинки, состоящие из гиалинового хряща, замыкают диск аксиально и прилегают к соседним позвонкам. Толщина пластинок не превышает 1 мм [18, 19].

МПД здорового взрослого человека практически лишен кровеносных сосудов и нервных волокон. Некоторое количество нервных волокон обнаруживают только во внешних ламеллах фиброзного кольца, часть из них представляет собой окончания проприорецепторов [20]. Уже в первые десятилетия жизни диск утрачивает большую часть кровоснабжения, что обуславливает дефицит питательных веществ [21, 22]. Вторичным по отношению к утрате значительной части кровоснабжения является кальцификация концевой пластинки, вследствие чего снижается диффузия пластинчатых веществ [23]. Без необходимых нутриентов клетки гибнут, снижается синтез энергетических субстратов, белков межклеточного вещества [24]. У взрослого количество клеток МПД в 2 раза меньше, чем у ребенка [25, 26].

Дегенеративные изменения студенистого ядра характеризуются прогрессирующим уменьшением высоты МПД. Граница между студенистым ядром и фиброзным кольцом становится более четкой. В ткани МПД усиливается коричневая пигментация, ткань становится более хрупкой. Дегенеративные изменения в фиброзном кольце проявляются дезорганизацией регулярного чередования ламелл коллагена и эластина, замещением гелеподобной структуры фибро-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 [27, 28].

Деструкция матрикса МПД осуществляется преимущественно специфическими ферментами. К ним относят агреканазы, различные виды матричных ме-

таллопротеиназ (ММР) и другие деградирующие энзимы. Например, ММР-3, или стромелизин, приводит к разрушению коллагена III, IX и X типов, протеогликанов, фибронектина; ММР-2, или желатиназа, вызывает деградацию коллагена IV типа. Ряд других деградирующих ферментов объединяют в семейство ADAMTS [29, 30].

### Патогенез дегенерации межпозвонковых дисков

С возрастом происходят выраженные изменения внеклеточного матрикса МПД [31, 32]. Снижение синтеза агрекана в пульпозном ядре приводит к его дегидратации и последующему нарушению механической функции [33, 34]. Дегидратированное пульпозное ядро не в состоянии равномерно распределять механическое давление на все структуры МПД. По данной причине фиброзное кольцо испытывает повышенную нагрузку, что не может не отразиться на его структуре в виде локальных повреждений [35–38]. Повреждения фиброзного кольца приводят к формированию протрузий и грыж МПД, что является причиной острого корешкового болевого синдрома. Кроме того, при повреждении фиброзного кольца значительно уменьшается высота МПД, что также влечет за собой изменение биомеханических параметров позвоночника и развитие боли в спине [39].

Несомненно, в инициации и прогрессировании дегенеративных процессов МПД участвуют несколько взаимосвязанных факторов: неравномерное распределение механической нагрузки на структуры МПД, снижение диффузии питательных веществ через замыкательную пластину, а также генетические факторы [40]. Возрастные изменения внеклеточного вещества МПД связаны с изменением метаболизма и апоптозом клеточных популяций [41]. Клеточное микроокружение становится агрессивным по отношению к структурам МПД и характеризуется повышением синтеза провоспалительных цитокинов, медиаторов и катаболических ферментов [42]. Причина активации воспаления в МПД отчасти связана со снижением диффузии нутриентов через замыкательные пластины, которые подвержены выраженному истончению и обызвествлению [42]. Механическая нагрузка также играет немаловажную роль в прогрессировании дегенерации МПД. Так, A.J. Walsh [43] показал, что при неадекватном механическом воздействии на ткань МПД число клеток и межклеточного вещества значительно снижается. С другой стороны, незначительная механическая нагрузка на МПД стимулирует диффузию питательных веществ через замыкательную пластину и синтез белков внеклеточного матрикса.

Роль генетических факторов в развитии дегенеративных процессов МПД не вызывает сомнений [44]. Исследования близнецов доказывают наличие генетической предрасположенности к развитию дегенерации МПД [45].

## Модели дегенерации межпозвоночных дисков

Создание моделей дегенерации МПД для изучения звеньев патогенеза и разработки методов терапии явилось весьма сложной проблемой. Это связано как с временными характеристиками (для понимания истинной картины дегенерирующего МПД нужно несколько лет), так и со способами инициации дегенерации МПД в эксперименте [46]. Однако малая доступность ткани МПД на начальных этапах дегенерации и практически полное отсутствие неизмененных МПД для сравнения *in vitro* означают, что такие модели дегенерации МПД, несмотря на их недостатки, необходимы для изучения клеточных сигнальных путей дегенерирующего МПД. МПД многих животных обладают схожими анатомическими и биологическими свойствами с человеческими, что делает их пригодными для создания моделей дегенерации [47]. Среди методов инициации дегенеративных процессов МПД в моделях различают травму фиброзного кольца, пульпозного ядра, механическую перегрузку, а также ферментативную обработку гликозаминогликана пульпозного ядра [48–51]. Также разработаны модели со спонтанной дегенерацией МПД [52, 53].

### Развитие межпозвоночных дисков: эмбриогенез и постнатальный период

Осевая струна из клеток, толщиной поначалу лишь в одну клетку, именуемая хордой, присутствует у эмбрионов всех хордовых животных и дает им соответствующее название. У ланцетника и туникат хорда остается единственным осевым скелетом на все время жизни организма. У позвоночных хорда исчезает на ранней стадии эмбрионального развития и замещается хрящевым или костным позвоночником [54]. Всего через несколько недель после зачатия эмбрион (длиной 12 мм от головного конца до крестца) имеет позвоночный столб с отчетливыми позвонками и МПД. Они пронизаны хордой, которая все еще сохраняется по всей длине позвоночника [55]. В дальнейшем хорда вытесняется из примордиальных тел позвонков растущими хрящевыми клетками и сохраняется лишь в виде каплевидных включений в центре МПД, обозначая местонахождение того, что позднее станет пульпозным ядром. Наружная зона впоследствии превращается в фиброзное кольцо [56, 57]. Даже на ранней стадии развития оно уже содержит продольно идущие волокна, распространяющиеся в хрящевой слой примордиального тела позвонка. Это предшественники шарпеевых волокон в переходной зоне между диском и позвонком. В наружной зоне содержится много волокон и мало клеток. Она плавно переходит в рыхлую внутреннюю зону вокруг хорды с меньшим количеством структур [57]. Из паракордальной внутренней зоны и несколько эксцентрично расположенного остатка хорды развивается пульпозное ядро. В то время как центр позвонка постепенно оссифицирует-

ся, на стыке тела позвонка и диска образуется хрящевая пластинка. Из хрящевой кромки этой пластины в дальнейшем развивается костная кромка тела позвонка [57].

Все структуры диска, призванные участвовать в биомеханической функции позвоночника, уже присутствуют при рождении. На протяжении эмбрионального развития и в младенчестве растущий МПД все еще обладает собственной системой кровоснабжения. Эти кровеносные сосуды развиваются из сосудистой сети, располагающейся сразу снаружи от позвоночника, особенно в межпозвоночных отверстиях, и напрямую вступают в фиброзное кольцо, радиально пронизывая его слои (ламеллы) и образуя интерламеллярные капиллярные сплетения. МПД питают сосуды двух типов: периферические и центральные осевые. Они никогда не проходят ни во внутренние слои, ни в пульпозное ядро [58, 59]. Таким образом, с самого начала своего развития центральная часть МПД получает питание исключительно посредством диффузии. Формирование тел позвонков и МПД окончательно завершается лишь в юношеском возрасте. Тела позвонков вырастают из зон пролиферации в хрящевых концевых пластинах. В участке концевой пластины, обращенном к костному мозгу, находится типичная зона роста и распада хряща, которая сохраняется примерно до 20-летнего возраста [59].

Внутри хрящевого кольца на краю концевой пластины появляются участки оссификации, к 12 годам они объединяются для образования костного кольца, которое затем сливается с телом позвонка. Ламеллы фиброзного кольца прикреплены к этому костному краевому кольцу шарпеевыми волокнами. Фиброзное кольцо и пульпозное ядро увеличиваются в размерах посредством интерстициального аппозиционного роста. В наружных слоях диска образуются плотные ламеллярные пучки, которые проходят между телами двух позвонков в виде переплетенных спиралей [60]. Чем дальше от периферии МПД находятся ламеллы фиброзного кольца, тем они слабее и тем менее плотно сгруппированы. Даже в полностью созревшем МПД его центр — пульпозное ядро — состоит в основном из бесструктурного матрикса [60]. Доказано, что клетки соединительной ткани, находящиеся в фиброзном кольце и вырабатывающие волокна и матрикс, снабжаются кровью лишь приблизительно до второго года [61]. Затем питающие сосуды претерпевают регресс, и примерно к 4 годам фиброзное кольцо оказывается бессосудистым. Смысл этого регресса сосудов не известен. Казалось бы, наоборот, МПД человека, столь богатый клетками и волокнами, нуждается в обильном кровоснабжении ввиду постоянно происходящих в нем синтеза и распада макромолекул. Начало регресса кровоснабжения МПД приблизительно совпадает с началом прямохождения и происходит в возрасте около одного года. Можно предположить связь между аваскулярностью МПД и механической нагрузкой, которая постоянно оказывается на него в процессе стояния и ходьбы.

Артерии и вены позвонков залегают в пустотах, оставленных жесткой костной трабекулярной системой, а потому не подвергаются осевой механической нагрузке. Физически рыхлая гомогенная ткань нижней части МПД, напротив, напоминает жидкость [62]. Таким образом, в зависимости от положения тела давление внутри МПД может быть достаточно высоким, чтобы вызвать длительную компрессию внутридисковых сосудов, ведущую к нарушению метаболизма ткани МПД. Недостаточное поступление питательных веществ в МПД пагубно сказывается на количестве и качестве внутридисковой соединительной ткани. В последующие годы фиброзное кольцо и пульпозное ядро увеличиваются в объеме за счет аппозиционного роста интерстиция, но их увеличение отстает от роста тела позвонков. Таким образом, соотношение высоты МПД и высоты позвонка постепенно увеличивается от 1:1 при рождении до 3:1–5:1 к завершению фазы аксиального роста.

В качественном отношении МПД подростков тоже обнаруживают инволюционные изменения, что свидетельствует о преждевременном старении, в основном эти изменения связаны со стремительным снижением уровня содержания воды. Изменения консистенции и цвета ткани МПД в первые годы жизни легко увидеть невооруженным глазом на свежих аутопсийных препаратах. У новорожденных и детей раннего возраста поверхность МПД на срезе выглядит стекловидной, желатинозной, полужидкой. Например, даже у двухлетнего ребенка полужидкую центральную часть МПД можно убрать ватным тампоном, тогда как у взрослого это уже невозможно [63]. Даже по завершении аксиального роста МПД претерпевает дальнейшие регрессивные изменения, отражающиеся на его внешнем виде. В зрелом возрасте ткань центральной части МПД перестает быть гомогенной, желатинозной и выглядит сухой и волокнистой. Если двигательный сегмент иммобилизован спондилезными шпорами, соединительная ткань МПД может подвергнуться перестройке, так что кровеносные сосуды вновь начинают вращаться в МПД [63].

### Клеточные сигнальные пути в эмбриогенезе межпозвонковых дисков

Развитие МПД в онтогенезе всецело зависит от скоординированной деятельности молекулярных сигналов, исходящих от клеток хорды и пластинки нервной трубки [64]. Белок Shh (sonic hedgehog) представляет собой сигнальную молекулу, которая выполняет важнейшую функцию регулирования морфогенеза тканей, предоставляя информацию о местоположении и степени дифференцировки клеток [65, 66]. Ножки сомитов развиваются при минимальном воздействии Shh- и Wnt-сигнальных путей, в то время как ткань склеротома — только при активирующем влиянии Shh-пути [67]. Особенностью работы Shh-внутриклеточного каскада является синергизм с Noggin-каскадом, который

служит прямым антагонистом BMP-пути в индукции роста склеротома [67]. Молекулы Noggin вначале активно экспрессируются клетками хорды, блокируя BMP-сигнализацию из развивающихся тел позвонков до того момента, как сформируется фиброзное кольцо [68].

Гены семейства *Pax* кодируют транскрипционные факторы, регулирующие процессы пролиферации, дифференцировки, апоптоза и миграции полипотентных клеток в эмбриогенезе. Именно экспрессия этих генов играет первоочередную роль в разграничении клеточных популяций, из которых в последующем произойдут МПД и тела позвонков [69–71]. Доказано, что в развитии МПД участвуют именно гены *Pax1* и *Pax9*. При делеции данных генов МПД и тела позвонков не развиваются, а на их месте формируется неправильной формы хрящевой стержень [72]. Экспрессия гена *Pax1* в ткани склеротома опосредуется действием Shh- и Noggin-сигнальных путей из клеток хорды [73, 74]. До окончательного формирования МПД и тел позвонков почти вся клеточная популяция склеротома экспрессирует ген *Pax1*. После формирования МПД экспрессия *Pax1* происходит только в ткани закладки МПД (предшественника фиброзного кольца), окружающей хорду. Существуют доказательства того, что ген *Pax1* способен опосредованно через ткань склеротома действовать на развитие хорды: в *Pax1*-мутантных клетках хорда значительно увеличена в размерах за счет выраженной клеточной пролиферации [74]. Таким образом, ген *Pax1* влияет на развитие хорды путем активации клеточной пролиферации до превращения последней в пульпозное ядро.

Не менее важным семейством генов, участвующих в развитии структур позвоночного столба, являются гены *Sox* [75, 76]. Особое значение в развитии ткани МПД играют гены *Sox5*, *Sox6* и *Sox9*. *Sox5* и *Sox6* экспрессируются как в клетках склеротома, так и в хорде [77]. В эксперименте у мышей, лишенных генов *Sox5* и *Sox6*, нарушалось формирование хордальной оболочки. Это связано с тем, что данные гены ответственны за синтез компонентов межклеточного вещества (агрекан и коллаген II типа) [77]. Отсутствие хордальной оболочки приводит к апоптозу клеток хорды и нарушению дальнейшего развития всех компонентов МПД. Ген *Sox9* изначально экспрессируется в хорде и склеротоме, участвуя в синтезе преимущественно коллагена II типа [78]. В клетках мышей с делецией гена *Sox9* вначале формируется полноценная хорда, но при дальнейшем ее развитии она деградирует ввиду отсутствия матрикса хордальной оболочки. Недоразвитие хорды и, как следствие, опосредованной клеточной сигнализации пагубно влияет на дальнейшее формирование склеротома [79].

Сигнальный путь TGF- $\beta$  также активно участвует в развитии МПД и тел позвонков. TGF- $\beta$ -каскад регулирует клеточную пролиферацию, дифференцировку и синтез компонентов межклеточного вещества МПД [80]. Существует несколько тканеспецифических раз-

новидностей TGF- $\beta$ . TGF- $\beta_3$  активно синтезируется в перихордальной оболочке и способствует развитию фиброзного кольца и тел позвонков. Блокирование рецепторов TGF- $\beta_2$ , ответственных за синтез коллагена II типа, приводит к неполному формированию пульпозного ядра, наружной части фиброзного кольца, а также частичной минерализации МПД. Это подтверждает тот факт, что рецепторы TGF- $\beta_2$  участвуют в разграничении ткани МПД и тел позвонков, формируя полноценный позвоночный столб [80].

### Современные методы биологической терапии дегенеративных процессов межпозвоночных дисков

Для активации регенеративного потенциала МПД используют различные подходы: введение терапевтических агентов, белков-активаторов, различных типов клеток или клеточных популяций, влияющих на биосинтез и деградацию различных компонентов внеклеточного матрикса, а также методы генной инженерии.

**Введение биологически активных веществ в дегенерирующий межпозвоночный диск.** Разовые или повторяющиеся прямые инъекции TGF- $\beta$  в ткань дегенерирующего МПД человека *in vitro* способствовали увеличению синтеза протеогликана и снижению резорбции ткани вследствие уменьшения секреции MMP-2; наблюдали также периодический пролиферативный эффект [81]. Аналогично цитокин IGF-1 способствует увеличению синтеза протеогликана и замедлению резорбции МПД посредством снижения уровня активной MMP-2 [82]. IGF-1 также вызывает повышение жизнеспособности клеток посредством антиапоптотического действия [83]. Интересно, что уровень IGF-1 с возрастом снижается. В настоящее время опубликованы результаты исследования, в котором у кроликов моделировали дегенерацию МПД поясничного отдела позвоночника. Прямые инъекции остеогенного протеина-1 (OP-1) — фактора роста, принадлежащего к семейству TGF- $\beta$ , — способствовали значительному увеличению синтеза протеогликанов и восстановлению высоты МПД. Полученный результат был стабильным в течение 8 нед после инъекций [83]. После прямых инъекций OP-1 крысам, у которых моделировали дегенерацию МПД, наблюдали ингибирование больопределяемого поведения [84].

**Методы генно-инженерной терапии для регенерации межпозвоночного диска.** Доставка биологически активных веществ в дегенерирующий МПД возможна при использовании генетически модифицированных клеток МПД, экспрессирующих необходимый генный продукт. Благодаря достижениям молекулярной генетики возможно введение необходимого генетического элемента практически в любую клетку. Изолированные клетки из МПД быка или крысы трансформировали с помощью ретровирусного вектора, содержащего генкодирующий антагонист рецептора IL-1 (IL-1RA) [85, 86]. Эти генные конструкции использова-

ли для инъекций *in vivo* в экспериментах на кроликах, у которых моделировали дегенерацию МПД, а также для трансфекции клеток МПД человека *in vitro* [86]. Эти эксперименты показали, что вектор на основе ретровируса способен эффективно трансфецировать клетки различных видов млекопитающих. В последующем для преодоления опасности возникновения иммунной реакции при использовании ретровирусного вектора был разработан аденовирус-ассоциированный вектор (AAV) [87]. Авторы [50] продемонстрировали, что AAV эффективно трансфецирует клетки МПД человека и кролика *in vivo*, генерируя гуморальный, но не клеточный иммунный ответ, а также приводит к активной трансгенной экспрессии.

Несмотря на достаточное число исследований, доказывающих гибкость метода прямой доставки генов с использованием векторов на основе вирусов в клетки МПД, вопрос о том, какой ген необходимо доставлять, остается открытым. Среди кандидатов — анаболические факторы TGF- $\beta_1$ , LMP-1, Sox9, а также антикатаболический фактор MMP-1. Первые исследования по экзогенной доставке гена *in vivo* провели К. Nishida и соавт. [88] с использованием аденовирусного вектора, несущего ген TGF- $\beta_1$ , у кроликов. Авторы констатировали значительное увеличение экспрессии TGF- $\beta_1$ , а также протеогликана в МПД. При введении в ткань диска кроликов 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 [89]. Sox9 не оказывает влияния на синтез протеогликана, но в то же время при переносе его в клетки дегенерирующего МПД человека увеличивает синтез коллагена II типа. Трансфекция Sox9 в составе аденовирусного вектора в дегенерирующий диск кролика обеспечивает сохранение структуры, свойственной непораженному диску, в то время как в контрольной группе животных наблюдали типичные дегенеративные изменения в МПД [89, 90].

Таким образом, увеличение синтеза не только протеогликана, но и коллагена II типа способно предотвратить дегенеративные изменения МПД. Можно также предположить, что сочетанное использование различных факторов будет еще более эффективным и физиологичным. Известно, что применение одновременно TGF- $\beta_1$ , IGF-1 и BMP-2 оказывает синергичное действие на синтез полезных межклеточных белков. Альтернативой анаболическим факторам может быть применение антикатаболических факторов, что позволит замедлить процесс деградации без необходимости увеличивать синтез в клетках МПД. Доставка с помощью аденовирусного вектора в дегенерирующий диск человека MMP-1 способствовала увеличению содержания протеогликана в культуре [90].

**Использование стволовых клеток в терапии дегенерации межпозвоночных дисков.** Достижения в области использования мезенхимальных стволовых клеток (МСК) позволяют рассматривать их в качестве

источника клеток для генной терапии с последующей имплантацией. МСК — не коммитированные полипотентные стволовые клетки, которые обнаруживают в различных тканях. Они отличаются высокой пластичностью и способностью к мультилинейной дифференцировке. Они доступны, ими легко манипулировать. Известно о введении в МСК уже нескольких векторных систем, показавших высокую активность экспрессии [91, 92].

Однако трансформация — не единственная проблема, которую необходимо решить. МСК не дифференцированы, перед имплантацией их необходимо дифференцировать в хондроцитоподобные клетки. Для этого использовали ростовые факторы семейства BMP [93]. Также изучается более специфичный фактор дифференцировки из семейства Sox. Установлено, что семейство факторов транскрипции *Brgshuру* способствует необходимой адгезии клеток [94–97]. Тем не менее в последнее время установлено, что для индукции дископодобного фенотипа достаточно культивирования МСК с клетками МПД [98, 99].

Культивирование в условиях трехмерной системы также способствует формированию хондроцитоподобного фенотипа. При имплантации в дегенерирующий МПД кроликов системы МСК, заключенных в коллагеновый гель, отмечено сохранение структуры студенистого ядра и фиброзного кольца, предотвращение уменьшения синтеза протеогликанов, увеличение высоты МПД [100]. Имплантированные клетки выживают и экспрессируют генетические маркеры студенистого ядра и фиброзного кольца. Аналогичные результаты получены при инъекции суспензии МСК в МПД кроликов и суспензии МСК, заключенной в гель, в МПД копчикового отдела крысы [101–103].

Использование МСК дало новый импульс развитию методов аутотрансплантации при дегенеративных процессах в МПД. В то же время предстоит ответить еще на многие вопросы, например, являются ли хондроциты, произошедшие из МСК, идентичными или похожими на клетки студенистого ядра. Хотя результаты последних исследований показывают соответствие клеток, не известно, как долго они будут сохранять фенотип в условиях микроокружения в дегенерирующем МПД и не будут ли новые клетки также подвергаться дегенерации или малигнизации. Неизученным остается вопрос о биомеханических свойствах вновь синтезированного матрикса.

## Заключение

Несмотря на значительные успехи в изучении молекулярных и клеточных механизмов дегенеративных процессов межпозвоночных дисков, этиология данного заболевания остается изученной не до конца. Методы терапии, применяемые в клинической практике в настоящее время, не способны восстановить структуру и биомеханическую функцию межпозвоночных дисков. Важно помнить, что развитие межпозвоночных дисков

в эмбриогенезе — это сложный процесс слияния нескольких клеточных популяций посредством целого ряда молекулярных взаимодействий. Образованные в онтогенезе структуры межпозвоночных дисков должны функционировать в строгом синергизме, особенно при воздействии неблагоприятных эндогенных и экзогенных факторов. По всей вероятности, изменения межпозвоночных дисков в постнатальном периоде (регрессия ангиогенеза, снижение числа клеточной популяции и внеклеточного матрикса) представляют собой следующий этап «развития» межпозвоночного диска, результатом которого является постепенное разрушение его структур. Рассматривая дегенеративные процессы межпозвоночного диска в контексте эмбриогенеза, можно предложить новые методы биологической терапии данного заболевания. Перспективным представляется использование аутологических культивированных *in vitro* клеток межпозвоночных дисков с последующей их имплантацией, что потенциально может восполнить дефицит клеток, а следовательно, и матрикса диска. Но для реализации такого подхода следует в первую очередь изучить жизнеспособность и активность имплантированного материала под влиянием различных факторов на протяжении длительного периода времени. Таким образом, комплексный подход к изучению молекулярных и клеточных механизмов патогенеза дегенерации межпозвоночных дисков позволит открыть новые методы биологической терапии, направленной на восстановление микроструктуры и биомеханической функции межпозвоночных дисков.

**Финансирование исследования.** Исследование не финансировалось какими-либо источниками.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов, о которых необходимо сообщить.

## Литература/References

1. Благодатский М.Д., Балашов Б.Б. О морфологических изменениях в тканях позвоночного канала при корешковом синдроме поясничного остеохондроза. Журнал невропатологии и психиатрии 1987; 4: 512–516. Blagodatskiy M.D., Balashov B.B. On morphological alterations in the vertebral canal in radicular syndrome of lumbar osteochondrosis. *Zhurnal nevropatologii i psikhiiatrii* 1987; 4: 512–516.
2. Благодатский М.Д., Солодун Ю.В. Об аутоиммунном компоненте воспалительных реакций при корешковых синдромах поясничного остеохондроза. Журнал невропатологии и психиатрии 1988; 4: 46–51. Blagodatskiy M.D., Solodun Yu.V. On an autoimmune component of inflammatory reactions in radicular syndromes of lumbar osteochondrosis. *Zhurnal nevropatologii i psikhiiatrii* 1988; 4: 46–51.
3. Бывальцев В.А., Панасенков С.Ю., Цыганов П.Ю., Бельх Е.Г., Сороковиков В.А. Наноструктурный анализ поясничных межпозвоночных дисков на разных стадиях дегенеративного процесса. Вопросы нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко 2013; 77(3): 36–41. Byval'tsev V.A., Panasenkov S.Iu., Tsyganov P.Iu., Belykh E.G.,

- Sorokovikov V.A. Nanostructural analysis of the lumbar intervertebral disc on the various stages of degenerative process. *Voprosy neyrokhirurgii im. N.N. Burdenko* 2013; 77(3): 36–41.
4. An H.S., Masuda K., Inoue N. Intervertebral disc degeneration: biological and biomechanical factors. *J Orthop Sci* 2006; 11(5): 541–552, <https://doi.org/10.1007/s00776-006-1055-4>.
  5. Adams M.A., Roughley P.J. What is intervertebral disc degeneration, and what causes it? *Spine* 2006; 31(18): 2151–2161, <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000231761.73859.2c>.
  6. Freemont A.J. The cellular pathobiology of the degenerate intervertebral disc and discogenic back pain. *Rheumatology* 2009; 48(1): 5–10, <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ken396>.
  7. Urban J.P.G., Roberts S., Ralphs J.R. The nucleus of the intervertebral disc from development to degeneration. *American Zoologist* 2000; 40(1): 53–61, <https://doi.org/10.1093/icb/40.1.53>.
  8. Mirza S.K., Deyo R.A. Systematic review of randomized trials comparing lumbar fusion surgery to nonoperative care for treatment of chronic back pain. *Spine* 2007; 32(7): 816–823, <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000259225.37454.38>.
  9. Ghiselli G., Wang J.C., Bhatia N.N., Hsu W.K., Dawson E.G. Adjacent segment degeneration in the lumbar spine. *J Bone Joint Surg Am* 2004; 86(7): 1497–1503, <https://doi.org/10.2106/00004623-200407000-00020>.
  10. Hanley E.N. Jr., Herkowitz H.N., Kirkpatrick J.S., Wang J.C., Chen M.N., Kang J.D. Debating the value of spine surgery. *J Bone Joint Surg Am* 2010; 92(5): 1293–1304.
  11. Miller J.A., Schmatz C., Schultz A.B. Lumbar disc degeneration: correlation with age, sex and spine level in 600 autopsy specimens. *Spine* 1988; 13(2): 173–178, <https://doi.org/10.1097/00007632-198802000-00008>.
  12. Boos N., Weissbach S., Rohrbach H., Weiler C., Spratt K.F., Nerlich A.G. Classification of age-related changes in lumbar intervertebral discs: 2002 Volvo Award in basic science. *Spine* 2010; 27(23): 2631–2644, <https://doi.org/10.1097/00007632-200212010-00002>.
  13. Urban J.P., Smith S., Fairbank J.C. Nutrition of the intervertebral disc. *Spine* 2004; 29(23): 2700–2709, <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000146499.97948.52>.
  14. Humzah M.D., Soames R.W. Human intervertebral disc: structure and function. *Anat Rec* 1988; 220(4): 337–356, <https://doi.org/10.1002/ar.1092200402>.
  15. Cassidy J.J., Hiltner A., Baer E. Hierarchical structure of the intervertebral disc. *Connect Tissue Res* 1989; 23(1): 75–88, <https://doi.org/10.1557/proc-174-145>.
  16. Marchand F., Ahmed A.M. Investigation of the laminate structure of lumbar disc anulus fibrosus. *Spine* 1990; 15(5): 402–410, <https://doi.org/10.1097/00007632-199005000-00011>.
  17. Rajasekaran S., Babu J.N., Arun R., Armstrong B.R., Shetty A.P., Murugan S. ISSLS prize winner: a study of diffusion in human lumbar discs: a serial magnetic resonance imaging study documenting the influence of the endplate on diffusion in normal and degenerate discs. *Spine* 2004; 29(23): 2654–2667, <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000148014.15210.64>.
  18. Johannessen W., Cloyd J.M., O'Connell G.D., Vresilovic E.J., Elliott D.M. Trans-endplate nucleotomy increases deformation and creep response in axial loading. *Ann Biomed Eng* 2006; 34(4): 687–696, <https://doi.org/10.1007/s10439-005-9070-8>.
  19. O'Connell G.D., Guerin H.L., Elliott D.M. Theoretical and experimental evaluation of human annulus fibrosus degeneration. *J Biomech Eng* 2009; 131(11): 111007, <https://doi.org/10.1115/1.3212104>.
  20. Heuer F., Schmidt H., Wilke H.J. Stepwise reduction of functional spinal structures increase disc bulge and surface strains. *J Biomech* 2008; 41(9): 1953–1960, <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2008.03.023>.
  21. Burnstock G. The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. *Neuropharmacology* 1997; 36(9): 1127–1139, [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(97\)00125-1](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(97)00125-1).
  22. Gonzales S.D. *The effects of ATP and adenosine on the extracellular matrix biosynthesis via purinergic pathways*. Dissertation. University of Miami; 2014.
  23. Wang C., Gonzales S., Levene H., Gu W., Huang C.Y. Energy metabolism of intervertebral disc under mechanical loading. *J Orthop Res* 2013; 31(11): 1733–1738, <https://doi.org/10.1002/jor.22436>.
  24. Roughley P.J. Biology of intervertebral disc aging and degeneration: involvement of the extracellular matrix. *Spine* 2004; 29(23): 2691–2699, <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000146101.53784.b1>.
  25. Vresilovic E.J., Johannessen W., Elliott D.M. Disc mechanics with trans-endplate partial nucleotomy are not fully restored following cyclic compressive loading and unloaded recovery. *J Biomech Eng* 2006; 128(6): 823–829, <https://doi.org/10.1115/1.2354210>.
  26. Guerin H.L., Elliott D.M. Quantifying the contributions of structure to annulus fibrosus mechanical function using a nonlinear, anisotropic, hyperelastic model. *J Orthop Res* 2007; 25(4): 508–516, <https://doi.org/10.1002/jor.20324>.
  27. Schmidt H., Kettler A., Heuer F., Simon U., Claes L., Wilke H.J. Intradiscal pressure, shear strain, and fiber strain in the intervertebral disc under combined loading. *Spine* 2007; 32(7): 748–755, <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000259059.90430.c2>.
  28. Nerlich A.G., Schaaf R., Wälchli B., Boos N. Temporo-spatial distribution of blood vessels in human lumbar intervertebral discs. *Eur Spine J* 2007; 16(4): 547–555, <https://doi.org/10.1007/s00586-006-0213-x>.
  29. Maroudas A., Stockwell R.A., 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.
  30. Bruehlmann S.B., Rattner J.B., Matyas J.R., Duncan N.A. Regional variations in the cellular matrix of the annulus fibrosus of the intervertebral disc. *J Anat* 2002; 201(2): 159–171, <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2002.00080.x>.
  31. Antoniou J., Steffen T., Nelson F., Winterbottom N., Hollander A.P., Poole R.A., Aebi M., Alini M. 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, <https://doi.org/10.1172/jci118884>.
  32. Roughley P.J., Melching L.I., Heathfield T.F., Pearce R.H., Mort J.S. The structure and degradation of aggrecan in human intervertebral disc. *Eur Spine J* 2006; 15(Suppl 3): 326–332, <https://doi.org/10.1007/s00586-006-0127-7>.
  33. Boxberger J.I., Auerbach J.D., Sen S., Elliott D.M. An in vivo model of reduced nucleus pulposus glycosaminoglycan content in the rat lumbar intervertebral disc. *Spine* 2008; 33(2): 146–154, <https://doi.org/10.1097/brs.0b013e31816054f8>.
  34. Nerurkar N.L., Mauck R.L., Elliott D.M. ISSLS prize

winner: integrating theoretical and experimental methods for functional tissue engineering of the annulus fibrosus. *Spine* 2008; 33(25): 2691–2701, <https://doi.org/10.1097/brs.0b013e31818e61f7>.

35. Adams M.A., McNally D.S., Dolan P. 'Stress' distributions inside intervertebral discs. The effects of age and degeneration. *J Bone Joint Surg Br* 1996; 78(6): 965–972.

36. Acaroglu E.R., Iatridis J.C., Setton L.A., Foster R.J., Mow V.C., Weidenbaum M. Degeneration and aging affect the tensile behavior of human lumbar annulus fibrosus. *Spine* 1995; 20(24): 2690–2701, <https://doi.org/10.1097/00007632-199512150-00010>.

37. O'Connell G.D., Vresilovic E.J., Elliott D.M. Comparison of animals used in disc research to human lumbar disc geometry. *Spine* 2007; 32(3): 328–333, <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000253961.40910.c1>.

38. Vernon-Roberts B. Disc pathology and disease states. In: *The biology of the intervertebral disc*. Ghosh P. (editor). CRC Press; 1988; p. 73–119.

39. Videman T., Battié M.C., Gibbons L.E., Maravilla K., Manninen H., Kaprio J. Associations between back pain history and lumbar MRI findings. *Spine* 2003; 28(6): 582–588, <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000049905.44466.73>.

40. Stokes I.A., Iatridis J.C. Mechanical conditions that accelerate intervertebral disc degeneration: overload versus immobilization. *Spine* 2004; 29(23): 2724–2732, <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000146049.52152.da>.

41. Zhao C.Q., Wang L.M., Jiang L.S., Dai L.Y. The cell biology of intervertebral disc aging and degeneration. *Ageing Res Rev* 2007; 6(3): 247–261, <https://doi.org/10.1016/j.arr.2007.08.001>.

42. Le Maitre C.L., Pockert A., Buttle D.J., Freemont A.J., Hoyland J.A. Matrix synthesis and degradation in human intervertebral disc degeneration. *Biochem Soc Trans* 2007; 35(Pt 4): 652–655, <https://doi.org/10.1042/bst0350652>.

43. Walsh A.J., Lotz J.C. Biological response of the intervertebral disc to dynamic loading. *J Biomech* 2004; 37(3): 329–337, [https://doi.org/10.1016/s0021-9290\(03\)00290-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9290(03)00290-2).

44. Battie M.C., Videman T. Lumbar disc degeneration: epidemiology and genetics. *J Bone Joint Surg Am* 2006; 88(Suppl 2): 3–9, <https://doi.org/10.2106/00004623-200604002-00002>.

45. Sambrook P.N., MacGregor A.J., Spector T.D. Genetic influences on cervical and lumbar disc degeneration: a magnetic resonance imaging study in twins. *Arthritis Rheum* 1999; 42(2): 366–372, [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(199902\)42:2<366::aid-anr20>3.0.co;2-6](https://doi.org/10.1002/1529-0131(199902)42:2<366::aid-anr20>3.0.co;2-6).

46. Alini M., Eisenstein S.M., Ito K., Little C., Kettler A.A., Masuda K., Melrose J., Ralphs J., Stokes I., Wilke H.J. Are animal models useful for studying human disc disorders/degeneration? *Eur Spine J* 2008; 17(1): 2–19, <https://doi.org/10.1007/s00586-007-0414-y>.

47. Beckstein J.C., Sen S., Schaer T.P., Vresilovic E.J., Elliott D.M. Comparison of animal discs used in disc research to human lumbar disc: axial compression mechanics and glycosaminoglycan content. *Spine* 2008; 33(6): 166–177, <https://doi.org/10.1097/brs.0b013e318166e001>.

48. Elliott D.M., Yerramalli C.S., Beckstein J.C., Boxberger J.I., Johannessen W., Vresilovic E.J. The effect of relative needle diameter in puncture and sham injection animal models of degeneration. *Spine* 2008; 33(6): 588–596, <https://doi.org/10.1097/brs.0b013e318166e0a2>.

49. Iatridis J.C., Mente P.L., Stokes I.A., Aronsson D.D.,

Alini M. Compression-induced changes in intervertebral disc properties in a rat tail model. *Spine* 1999; 24(10): 996–1002, <https://doi.org/10.1097/00007632-199905150-00013>.

50. Kroeber M.W., Unglaub F., Wang H., Schmid C., Thomsen M., Nerlich A., Richter W. New in vivo animal model to create intervertebral disc degeneration and to investigate the effects of therapeutic strategies to stimulate disc regeneration. *Spine* 2002; 27(23): 2684–2690, <https://doi.org/10.1097/00007632-200212010-00007>.

51. Hoogendoorn R.J., Wuisman P.I., Smit T.H., Everts V.E., Helder M.N. Experimental intervertebral disc degeneration induced by chondroitinase ABC in the goat. *Spine* 2007; 32(17): 1816–1825, <https://doi.org/10.1097/brs.0b013e31811ebac5>.

52. Gruber H.E., Norton H.J., Ingram J.A., Hanley E.N. Jr. The SOX9 transcription factor in the human disc: decreased immunolocalization with age and disc degeneration. *Spine* 2005; 30(6): 625–630, <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000155420.01444.c6>.

53. Hansen H.J. A pathologic-anatomical interpretation of disc degeneration in dogs. *Acta Orthop Scand* 1951; 20(4): 280–294, <https://doi.org/10.3109/17453675108991175>.

54. Fleming A., Keynes R.J., Tannahill D. The role of the notochord in vertebral column formation. *J Anat* 2001; 199(Pt 1–2): 177–180, <https://doi.org/10.1017/s0021878201008044>.

55. Stemple D.L. Structure and function of the notochord: an essential organ for chordate development. *Development* 2005; 132(11): 2503–2512, <https://doi.org/10.1242/dev.01812>.

56. Choi K.S., Cohn M.J., Harfe B.D. Identification of nucleus pulposus precursor cells and notochordal remnants in the mouse: implications for disk degeneration and chordoma formation. *Dev Dyn* 2008; 237(12): 3953–3958, <https://doi.org/10.1002/dvdy.21805>.

57. Peacock A. Observations on the postnatal development of the intervertebral disc in man. *J Anat* 1952; 86: 162–179.

58. Walmsley R. The development and growth of the intervertebral disc. *Edinb Med J* 1953; 60(8): 341–364.

59. Hunter C.J., Matyas J.R., Duncan N.A. Cytomorphology of notochordal and chondrocytic cells from the nucleus pulposus: a species comparison. *J Anat* 2004; 205(5): 357–362.

60. Aszódi A., Chan D., Hunziker E., Bateman J.F., Fässler R. Collagen II is essential for the removal of the notochord and the formation of intervertebral discs. *J Cell Biol* 1998; 143(5): 1399–1412, <https://doi.org/10.1083/jcb.143.5.1399>.

61. Rufai A., Benjamin M., Ralphs J.R. The development of fibrocartilage in the rat intervertebral disc. *Anat Embryol (Berl)* 1995; 192(1): 53–62, <https://doi.org/10.1007/bf00186991>.

62. Hayes A.J., Benjamin M., Ralphs J.R. Role of actin stress fibres in the development of the intervertebral disc: cytoskeletal control of extracellular matrix assembly. *Dev Dyn* 1999; 215(3): 179–189, [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0177\(199907\)215:3<179::aid-aja1>3.0.co;2-q](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0177(199907)215:3<179::aid-aja1>3.0.co;2-q).

63. Pazzaglia U.E., Salisbury J.R., Byers P.D. Development and involution of the notochord in the human spine. *J R Soc Med* 1989; 82(7): 413–415.

64. Placzek M. The role of the notochord and floor plate in inductive interactions. *Curr Opin Genet Dev* 1995; 5(4): 499–506, [https://doi.org/10.1016/0959-437x\(95\)90055-l](https://doi.org/10.1016/0959-437x(95)90055-l).

65. Ehlen H.W., Buelens L.A., Vortkamp A. Hedgehog signaling in skeletal development. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2006; 78(3): 267–279, <https://doi.org/10.1002/bdrc.20076>.

66. McMahon A.P., Ingham P.W., Tabin C.J. Developmental

- roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Curr Top Dev Biol* 2003; 53: 1–114, [https://doi.org/10.1016/s0070-2153\(03\)53002-2](https://doi.org/10.1016/s0070-2153(03)53002-2).
67. Choi K.S., Harfe B.D. Hedgehog signaling is required for formation of the notochord sheath and patterning of nuclei pulposi within the intervertebral discs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(23): 9484–9489, <https://doi.org/10.1073/pnas.1007566108>.
68. DiPaola C.P., Farmer J.C., Manova K., Niswander L.A. Molecular signaling in intervertebral disk development. *J Orthop Res* 2005; 23(5): 1112–1119, <https://doi.org/10.1016/j.orthres.2005.03.008>.
69. Frost V., Grocott T., Eccles M.R., Chantry A. Self-regulated Pax gene expression and modulation by the TGFbeta superfamily. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2008; 43(6): 371–391, <https://doi.org/10.1080/10409230802486208>.
70. Wallin J., Wilting J., Koseki H., Fritsch R., Christ B., Balling R. The role of Pax-1 in axial skeleton development. *Development* 1994; 120(5): 1109–1112.
71. Smith C.A., Tuan R.S. Human PAX gene expression and development of the vertebral column. *Clin Orthop Relat Res* 1994; 302: 241–250.
72. Peters H., Wilm B., Sakai N., Imai K., Maas R., Balling R. Pax1 and Pax9 synergistically regulate vertebral column development. *Development* 1999; 126(23): 5399–5408.
73. Fan C.M., Tessier-Lavigne M. Patterning of mammalian somites by surface ectoderm and notochord: evidence for sclerotome induction by a hedgehog homolog. *Cell* 1994; 79(7): 1175–1186, [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90009-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90009-4).
74. Furumoto T.A., Miura N., Akasaka T., Mizutani-Koseki Y., Sudo H., Fukuda K., Maekawa M., Yuasa S., Fu Y., Moriya H., Taniguchi M., Imai K., Dahl E., Balling R., Pavlova M., Gossler A., Koseki H. Notochord-dependent expression of MFH1 and PAX1 cooperates to maintain the proliferation of sclerotome cells during the vertebral column development. *Dev Biol* 1999; 210(1): 15–29, <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9261>.
75. Schepers G.E., Teasdale R.D., Koopman P. Twenty pairs of sox: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human sox transcription factor gene families. *Dev Cell* 2002; 3(2): 167–170, [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(02\)00223-x](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(02)00223-x).
76. Wegner M. All purpose Sox: the many roles of Sox proteins in gene expression. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42(3): 381–390, <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.07.006>.
77. Smits P., Lefebvre V. Sox5 and Sox6 are required for notochord extracellular matrix sheath formation, notochord cell survival and development of the nucleus pulposus of intervertebral discs. *Development* 2003; 130(6): 1135–1148, <https://doi.org/10.1242/dev.00331>.
78. Bi W., Deng J.M., Zhang Z., Behringer R.R., de Crombrughe B. Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet* 1999; 22(1): 85–89, <https://doi.org/10.1038/8792>.
79. Barrionuevo F., Taketo M.M., Scherer G., Kispert A. Sox9 is required for notochord maintenance in mice. *Dev Biol* 2006; 295(1): 128–140, <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.03.014>.
80. Millan F.A., Denhez F., Kondaiah P., Akhurst R.J. Embryonic gene expression patterns of TGF beta 1, beta 2 and beta 3 suggest different developmental functions in vivo. *Development* 1991; 111(1): 131–143.
81. Pattison S.T., Melrose J., Ghosh P., Taylor T.K. Regulation of gelatinase-A (MMP-2) production by ovine intervertebral disc nucleus pulposus cells grown in alginate bead culture by transforming growth factor-β1 and insulin like growth factor-I. *Cell Biol Int* 2001; 25(7): 679–689, <https://doi.org/10.1006/cbir.2000.0718>.
82. 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; 25(17): 2153–2157, <https://doi.org/10.1097/00007632-20000910-00002>.
83. Okuda S., Myoui A., Ariga K., Nakase T., Yonenobu K., Yoshikawa H. Mechanisms of age-related decline in insulin-like growth factor-I dependent proteoglycan synthesis in rat intervertebral disc cells. *Spine* 2001; 26(22): 2421–2426, <https://doi.org/10.1097/00007632-200111150-00005>.
84. Takegami K., An H.S., Kumano F., Chiba K., Thonar E.J., Singh K., Masuda K. 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; 5(3): 231–238, <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2004.11.001>.
85. Wehling P., Schulitz K.P., Robbins P.D., Evans C.H., Reinecke J.A. Transfer of genes to chondrocytic cells of the lumbar spine. Proposal for a treatment strategy of spinal disorders by local gene therapy. *Spine* 1997; 22(10): 1092–1097, <https://doi.org/10.1097/00007632-199705150-00008>.
86. Reinecke J.A., Wehling P., Robbins P., Evans C.H., Sager M., Schulze-Allen G., Koch H. In vitro transfer of genes in spinal tissue. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 1997; 135(5): 412–416.
87. Lattermann C., Oxner W.M., Xiao X., Li J., Gilbertson L.G., Robbins P.D., Kang J.D. The adenoassociated viral vector as a strategy for intradiscal gene transfer in immune competent and pre-exposed rabbits. *Spine* 2005; 30(5): 497–504, <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000154764.62072.44>.
88. Nishida K., Kang J.D., Gilbertson L.G., Moon S.H., Suh J.K., Vogt M.T., Robbins P.D., Evans C.H. 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; 24(23): 2419–2425.
89. Somia N., Verma I.M. Gene therapy: trials and tribulations. *Nat Rev Genet* 2000; 1: 91–99.
90. Moon S.H., Nishida K., Gilbertson L.G., Lee H.M., Kim H., Hall R.A., Robbins P.D., Kang J.D. Biologic response of human intervertebral disc cells to gene therapy cocktail. *Spine* 2008; 33(17): 1850–1855, <https://doi.org/10.1097/brs.0b013e31817e1cd7>.
91. Mason J.M., Breitbart A.S., Barcia M., Porti D., Pergolizzi R.G., Grande D.A. Cartilage and bone regeneration using gene-enhanced tissue engineering. *Clin Orthop Relat Res* 2000; 379(Suppl): S171–S178.
92. Sakai D., Mochida J., Iwashina T., Hiyama A., Omi H., Imai M., Nakai T., Ando K., Hotta T. Regenerative effects of transplanting mesenchymal stem cells embedded in atelocollagen to the degenerated intervertebral disc. *Biomaterials* 2006; 27(3): 335–345, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.06.038>.
93. Kuhlcke K., Fehse B., Schilz A., Loges S., Lindemann C., Ayuk F., Lehmann F., Stute N., Fauser A.A., Zander A.R., Eckert H.G. Highly efficient retroviral gene transfer based on centrifugation-mediated vector preloading of tissue culture vessels. *Mol Ther* 2002; 5(4): 473–478, <https://doi.org/10.1006/mthe.2002.0566>.

94. Akiyama H. Control of chondrogenesis by the transcription factor Sox9. *Mod Rheumatol* 2008; 18(3): 213–219, <https://doi.org/10.1007/s10165-008-0048-x>.
95. Kramer J., Hegert C., Guan K., Wobus A.M., Müller P.K., Rohwedel J. Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation in vitro: activation by BMP-2 and BMP-4. *Mech Dev* 2000; 92(2): 193–205, [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(99\)00339-1](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(99)00339-1).
96. Richardson S.M., Walker R.V., Parker S., Rhodes N.P., Hunt J.A., Freemont A.J., Hoyland J.A. Intervertebral disc cell mediated mesenchymal stem cell differentiation. *Stem Cells* 2006; 24(3): 707–716, <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0205>.
97. Anderson D.G., Risbud M.V., Shapiro I.M., Vaccaro A.R., Albert T.J. Cell-based therapy for disc repair. *Spine J* 2005; 5(6 Suppl): S297–S303, 2005, <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2005.02.019>.
98. Zhang Y.G., Guo X., Xu P., Kang L.L., Li J. Bone mesenchymal stem cells transplanted into rabbit intervertebral discs can increase proteoglycans. *Clin Orthop Relat Res* 2005; 430: 219–226, <https://doi.org/10.1097/01.blo.0000146534.31120.cf>.
99. Li J., Ezzelarab M.B., Cooper D.K. Do mesenchymal stem cells function across species barriers? Relevance for xenotransplantation. *Xenotransplantation* 2012; 19(5): 273–285, <https://doi.org/10.1111/xen.12000>.
100. Jorgensen C. Mesenchymal stem cells immunosuppressive properties: is it specific to bone marrow derived cells? *Stem Cell Res Ther* 2010; 1(2): 15–16, <https://doi.org/10.1186/scrt15>.
101. Djouad F., Plence P., Bony C., Tropel P., Apparailly F., Sany J., Noël D., Jorgensen C. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 2003; 102(10): 3837–3844, <https://doi.org/10.1182/blood-2003-04-1193>.
102. Lee J.P., Jeyakumar M., Gonzalez R., Takahashi H., Lee P.J., Baek R.C., Clark D., Rose H., Fu G., Clarke J., McKercher S., Meerloo J., Muller F.J., Park K.I., Butters T.D., Dwek R.A., Schwartz P., Tong G., Wenger D., Lipton S.A., Seyfried T.N., Platt F.M., Snyder E.Y. Stem cells act through multiple mechanisms to benefit mice with neurodegenerative metabolic disease. *Nat Med* 2007; 13(4): 439–447, <https://doi.org/10.1038/nm1548>.
103. Crevensten G., Walsh A.J., Ananthkrishnan D., Page P., Wahba G.M., Lotz J.C., Berven S. Intervertebral disc cell therapy for regeneration: mesenchymal stem cell implantation in rat intervertebral discs. *Ann Biomed Eng* 2004; 32(3): 430–434, <https://doi.org/10.1023/b:abme.0000017545.84833.7c>.