

ОГЛЯДИ І РЕЦЕНЗІЇ

УДК 576.371+615.361:616.721.1

К ВОПРОСУ О ПРИМЕНЕНИИ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ДЕГЕНЕРАТИВНО-ДИСТРОФИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЯХ МЕЖПОЗВОНКОВЫХ ДИСКОВ

М. С. Юхта, В. И. Грищенко

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

TO THE PROBLEM OF USE OF CELL THERAPY IN DEGENERATIVE AND DYSTROPHIC LESIONS OF INTERVERTEBRAL DISKS

M. S. Iukhta, V. I. Grischenko

Up-to-date data about the structure of intervertebral disks and factors causing development of degenerative and dystrophic changes in them are represented. The mechanisms of intervertebral disk lesions are considered on molecular and cellular level. Basing on the pathogenesis of degenerative and dystrophic changes of the intervertebral disks the prospective use of different treatment methods of this pathology is discussed. The special attention is given to the cellular therapy. The results of own experimental studies of use of multipotent mesenchymal stromal cells with therapeutic purpose in this pathology are mentioned briefly.

Key words: intervertebral disk, degenerative and dystrophic lesion, cell therapy, autologous chondroblasts, multipotent mesenchymal stromal cells.

ДО ПИТАННЯ ПРО ЗАСТОСУВАННЯ КЛІТИННОЇ ТЕРАПІЇ ПРИ ДЕГЕНЕРАТИВНО-ДИСТРОФІЧНИХ ПОШКОДЖЕННЯХ МІЖХРЕБЦЕВИХ ДИСКІВ

М. С. Юхта, В. І. Грищенко

Представлені сучасні дані про структуру міжхребцевих дисків і чинники, які обумовлюють розвиток дегенеративно-дистрофічних змін у них. На молекулярному і клітинному рівнях розглянуті механізми пошкодження міжхребцевих дисків. Грунтуючись на патогенезі дегенеративно-дистрофічних змін у міжхребцевих дисках, обговорюється перспективність застосування різних методів лікування цієї патології. Особлива увага приділяється клітинній терапії. Стисло висловлені результати власних експериментальних досліджень застосування мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин з терапевтичною метою при цій патології.

Ключові слова: міжхребцевий диск, дегенеративно-дистрофічне пошкодження, клітинна терапія, аутологічні хондробласти, мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини.

Дегенеративно-дистрофические заболевания позвоночника, сопряженные с поражением связочно-суставного аппарата, остаются не только весьма актуальной медицинской, но и социально-экономической проблемой практически любой страны мира.

Остеохондроз считают одним из самых распространенных заболеваний позвоночника в мире, которое является причиной социальной дисадаптации, временной, а иногда и стойкой утраты трудоспособности. Так, в 2001 г. остеохондроз позвоночника составил 2,91% от причин инвалидности при заболеваниях и травмах опорно-двигательного аппарата, а показатель инвалид-

ности – 1,5 на 100 тыс. населения [4]. К тому же остеохондроз занимает одно из первых мест в структуре заболеваемости с временной утратой трудоспособности [2]. Это заболевание приобретает все большую социальную значимость и в связи с постоянным ростом количества больных среди лиц трудоспособного возраста (30–50 лет) [3].

Особенности строения межпозвонковых дисков

Боли в спине многие ученые называют “расплатой человека за прямохождение”, поскольку важнейшим звеном в происхождении этой группы заболеваний

является постоянное вертикальное давление массы тела на структуры позвоночника, в том числе и на межпозвоночные диски (МПД). Последние представляют собой сложные анатомические образования, состоящие из пульпозного ядра (*nucleus pulposus*, ПЯ), фиброзного кольца (*annulus fibrosus*, ФК) и двух гиалиновых пластинок, которые плотно прилегают к замыкательным пластинкам тел смежных позвонков [5].

Каждый МПД развивается из двух эмбриональных источников – эмбриональной мезенхимы и нотохорда. В процессе эмбриогенеза клетки мезенхимы окружают нотохорд и формируют грубоволокнистую хрящевую ткань ФК и гиалиновый хрящ, покрывающий замыкательные пластинки тел позвонков. Хорда при этом фрагментируется, и ее остатки сохраняются лишь внутри ФК, формируя ПЯ.

Структура и биохимический состав диска полностью определяют его механические свойства. В норме ПЯ представляет собой гелеобразную структуру и преимущественно состоит из агреканов и коллагена II типа, хотя в небольших количествах в нем содержатся и коллагены VI, IX и XI типов, а также версикан и низкомолекулярные протеогликаны (бигликан, декорин, фибромодулин, люмикан) [31]. Роль коллагеновых волокон сводится к формированию своеобразного каркаса для остальных компонентов межклеточного вещества, в том числе и для протеогликанов, которые заряжены негативно, благодаря большому количеству входящих в их состав цепей глюкозаминогликанов, богатых сульфатными и уроновыми группами [46]. Высокий отрицательный потенциал протеогликанов обуславливает высокое осмотическое давление внутри ПЯ, что крайне необходимо для противодействия компрессионным воздействиям.

Клеточная популяция ПЯ представлена двумя видами клеток: крупными нотохордальными клетками и мелкими хондроцитоподобными клетками. Согласно современным представлениям ткань ПЯ формируется либо полностью за счет эмбрионального зачатка хорды, либо с его участием, при этом в процессе постнатального развития по неопределенным причинам происходит замещение нотохордальных клеток хондроцитоподобными. В то время как происхождение нотохордальных клеток практически не оставляет сомнений, механизм возникновения хондроцитоподобных клеток в ПЯ по-прежнему является предметом научных дискуссий. До сих пор не ясно, представляют ли они собой терминальную стадию дифференцировки нотохордальных клеток или они мигрируют сюда из ФК и/или замыкательных пластинок. Тем не менее, эти клетки ответственны за регуляцию молекулярного состава межклеточного вещества ПЯ, контролируя таким образом гомеостаз между процессами синтеза компонентов матрикса и его деградацией.

ФК в основном состоит из коллагена I типа, хотя оно содержит в относительно небольших количествах также и коллагеновые волокна других типов. Состав волокон зависит от места их расположения в ФК. Так, коллагеновые волокна наружных слоев ФК богаты коллагеном I типа, а также содержат в небольших количе-

ствах коллагены III, V и VI типов. Содержание коллагена I типа в волокнах прогрессивно снижается с их приближением к ПЯ таким образом, что внутренние слои ФК по своему составу занимают переходное положение между ФК и ПЯ [31]. Пучки коллагеновых волокон формируют 20–25 колец, называемых пластинами, направленных параллельно и под углом 60° к вертикальной оси, которые окружают ПЯ и противодействуют повышению осмотического давления в нем при нагрузках [33].

Как ФК, так и ПЯ, помимо коллагеновых волокон, содержат и эластические, причем ориентация последних в ПЯ имеет преимущественно радиальное направление, а в ФК они сгруппированы и ориентированы либо вдоль пучков коллагеновых волокон в пластинах, либо беспорядочно в пространствах между ними. Основная функция этих волокон – восстанавливать форму диска после выполненного движения [48].

Интересно, что и клеточный состав ФК тоже неоднороден: в наружных слоях определяются фибробластоподобные клетки, в то время как во внутренних отделах – хондроцитоподобные, обладающие промежуточной морфологией между хондроцитоподобными клетками ПЯ и фибробластоподобными клетками наружных слоев ФК [17].

Перечисленные анатомические особенности, а также данные сравнительной анатомии позволили рассматривать МПД как полусустав [1]. При этом ПЯ, содержащее жидкость типа синовиальной, сравнивают с полостью сустава; замыкательные пластинки позвонков, покрытые гиалиновым хрящом, уподобляют суставным концам, а ФК рассматривают как капсулу сустава и связочный аппарат.

Еще одной особенностью межпозвоночных дисков является то, что они есть самой большой аваскулярной структурой в организме человека [13]. До подросткового возраста их васкуляризация осуществляется сосудами, проникающими из губчатого вещества смежных позвонков. Но уже с 12–13 лет начинается облитерация сосудов дисков, которая заканчивается к 23–27 годам, т.е. ко времени окончания роста позвоночника. У взрослого МПД бессосудистые, и питание их осуществляется путем диффузии через гиалиновые пластинки [5].

Патогенез дегенеративно-дистрофических повреждений МПД

В связи с вертикальной ходьбой у человека нижнепоясничные и нижнешейные отделы позвоночника поддаются значительной перегрузке, и уже с 30–40 лет жизни начинается изнашивание отмеченных позвоночных сегментов. Причем дегенерация МПД является мультифакторным процессом, среди основных причин которого нужно упомянуть чрезмерные механические воздействия, генетическую предрасположенность, нарушение адекватного питания клеточных элементов [39]. Воздействие всех этих факторов приводит к дисбалансу между синтезом и деградацией компонентов межклеточного вещества в пользу последнего, вовлекая в дегенеративный процесс все структурные компоненты

диска. При этом прежде всего происходит обезвоживание ПЯ, снижение его тургора из-за снижения содержания протеогликанов, что в свою очередь усиливает нагрузку, приходящуюся на ФК, постепенно вызывая его растяжение, разволокнение, образование в нем трещин и со временем приводя к протрузии ткани МПД за пределы краев тел, прилегающих к нему позвонков.

Если рассмотреть процесс дегенерации МПД на молекулярном уровне, то он в первую очередь включает в себя прогрессивное снижение содержания протеогликанов, воды и коллагена II типа в матриксе ПЯ [8]. На ранних стадиях дегенерации происходит усиление синтеза коллагена в ПЯ, в основном II типа, что можно объяснить активацией защитных механизмов в ответ на повреждение [47]. Но при прогрессировании патологии синтез коллагена приобретает искаженный характер: все большие количества коллагена II типа выявляются в наружных слоях ФК, а коллагена I типа во внутренних слоях и в ПЯ. О ненормальной синтетической активности говорит и тот факт, что при дегенерации МПД происходит накопление коллагена X типа в межклеточном веществе ПЯ, где в норме он вообще не определяется [25]. Синтез протеогликанов также претерпевает специфические изменения. При этом происходит снижение синтеза агрекана [13] и увеличение синтеза версикана, бигликана, декорина [10, 42] и фибронектина [18]. Параллельно происходит нарушение процентного соотношения между хондроитин сульфатами и кератин сульфатами в структуре глюкозаминогликанов, что в итоге приводит к снижению степени гидратации последних [42].

Вышеописанные изменения синтетической активности являются результатом дисбаланса между факторами, ответственными за регуляцию синтеза матричных компонентов, и факторами, регулируемыми их распад. В норме хондроцитоподобные клетки ПЯ синтезируют как первые, так и вторые. В частности они продуцируют:

1) ростовые факторы:

- морфогенетический протеин кости (*bone morphogenetic protein*);
- трансформирующий и инсулиноподобный факторы роста;

2) цитокины:

- интерлейкин-1;
- интерлейкин-6;
- фактор некроза опухоли [39].

Ростовые факторы стимулируют синтез белков межклеточного вещества, а цитокины наоборот ингибируют его, стимулируя продукцию таких литических ферментов как металлопротеиназы [26] и *disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin motifs* (ADAMTS) [31]. Увеличение активности этих протеаз приводит к чрезмерному разрушению коллагена II типа и агрекана [32].

В работе J. A. Hoyland et al. [19] именно интерлейкин-1 рассматривается в качестве ключевого цитокина, вовлеченного в патогенез дегенерации МПД. Объясняется это тем, что в здоровом диске активность интер-

лейкина-1 находится под контролем его ингибитора-антагониста. Однако при дегенеративном процессе происходит непропорциональное увеличение продукции интерлейкина-1 по отношению к его антагонисту. И таким образом нарушается гомеостаз в сторону разрушения матричных компонентов ПЯ [19].

Активность металлопротеиназ также регулируется специфическими ингибиторами. В настоящее время известно 4 типа тканевых ингибиторов металлопротеиназ (ТИМР), каждый из которых проявляет относительную специфичность к определенному виду протеиназ. Исследования С. L. Le Maître et al. [31] показали, что, несмотря на повышение экспрессии металлопротеиназ при дегенеративных процессах в МПД, в них происходит пропорциональное усиление синтеза и их основных ингибиторов ТИМР-1 и ТИМР-2. Исключение составляет металлопротеиназы, которые относительно резистентны к влиянию ТИМР-1 и ТИМР-2. Это дало основание некоторым исследователям утверждать, что именно этот тип металлопротеиназ играет ключевую роль в дегенерации основного вещества МПД [32].

Разрушение основного вещества и дегидратация МПД, в свою очередь, отрицательно сказываются на процессах снабжения клеточных элементов питательными веществами, так как скорость диффузии последних находится в полной зависимости от свойств межклеточного вещества. Таким образом, формируется замкнутый патологический круг: чрезмерное разрушение внеклеточного матрикса нарушает тканевой обмен веществ, а страдающие от недостатка питательных веществ клетки не способны полноценно восполнить структуру межклеточного вещества. В итоге количество активных хондроцитоподобных клеток, которые синтезируют ростовые факторы, необходимые для стимуляции продукции межклеточного матрикса, снижается, в результате чего дисбаланс между синтезом и деградацией матричных компонентов ПЯ еще больше усиливается.

Сложности лечения дегенеративно-дистрофических заболеваний МПД

В настоящее время боли в нижнем отделе позвоночника лечат при помощи медикаментозных средств, методов физиотерапии и хирургии. Но традиционно используемые методы направлены лишь на купирование отдельных симптомов заболевания, тогда как с их помощью практически невозможно прервать патологическую цепочку, приводящую к последовательному поражению большей части МПД, а, следовательно, и успех лечения не может быть полноценным. В результате после окончания консервативной терапии лишь 35–70% больных чувствуют себя здоровыми. Рецидивы неврологических проявлений, нарушения опорной и двигательной функции позвонковых сегментов наблюдаются в течение года у каждого третьего пациента. Поэтому поиск новых эффективных подходов к терапии дегенеративно-дистрофических заболеваний МПД лишь набирает обороты.

Активным ходом идет развитие новых методик лечения ортопедических патологий. Перспективным

направлением является и клеточная терапия [40, 41, 43, 45].

В подтверждение этому можно привести результаты I фазы клинического исследования, проведенного в Германии в рамках программы EuroDisc [11].

Клиническое исследование в рамках программы EuroDisc (Германия)

Двенадцати пациентам в возрасте от 18 до 60 лет производилась инъекционная трансплантация в МПД поясничного отдела позвоночника аутологичных хондробластов. Последние были выделены из биоптатов, полученных после малоинвазивной секвестрэктомии, и культивированы в течение 12 недель.

В результате, спустя уже 3 месяца после трансплантации аутологичных хондробластов наблюдали улучшение состояния тканей МПД по сравнению с группой контроля, в которую вошли пациенты (n=16), оперированные по той же малоинвазивной методике секвестрэктомии, но без трансплантации клеток. Эти улучшения проявились в уменьшении и полном исчезновении болевого синдрома в течение 2 лет, а также в регидратации тканей и увеличении высоты диска, выявляемые при магнитно-резонансной томографии.

Морфологическими методами в проведенных предварительно испытаниях на животных с помощью метки бромдеоксиуридина BrdU было показано, что хондроциты выживают после трансплантации, пролиферируют и синтезируют белки межклеточного матрикса (протеогликан и коллаген I и II типов).

Таким образом, проведенное клиническое исследование в рамках I фазы показало безопасность и эффективность трансплантации аутогенных хондробластов для восстановления тканей МПД у пациентов, подвергнутых удалению МПД малоинвазивным способом.

Исследования по программе EuroDisc продолжают. В настоящее время в программу включено 140 пациентов в нескольких медицинских центрах.

Следует отметить, что применение *аутологичных хондробластов, выделенных из ПЯ во время секвестрэктомии*, имеет ряд недостатков.

- *Во-первых*, это ограниченное количество клеток, которые могут быть выделены из биоптата и культивированы. К тому же, за время, необходимое для накопления необходимого количества клеток, в ФК успевает сформироваться фиброзная ткань на месте секвестрированной грыжи, а это негативным образом может сказываться на его свойствах.

- *Во-вторых*, клеточная терапия с помощью аутохондробластов возможна и целесообразна при далеко зашедшем патологическом процессе, когда уже сформирована грыжа и пациенту показана операция [15]. Вопрос же терапии начальных стадий заболевания остается актуальным.

Применение мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в терапии дегенеративно-дистрофических повреждений МПД

Объектом выбора для клеточной терапии в данном случае являются мультипотентные мезенхимальные

стромальные клетки (МСК), обладающие способностью к мультипотентной дифференцировке и высоким регенеративным потенциалом. Одним из преимуществ этих клеток является то, что они могут быть выделены из различных источников. Основным из них и пока наиболее распространенным является *костный мозг*, где МСК представлены немногочисленной популяцией фибробластоподобных клеток (приблизительно 0,01% клеток костного мозга [36]).

Потенциальным источником МСК также является *жировая ткань* [20]. Наименее зрелые прогениторные элементы жировой ткани – стромально-сосудистые клетки, так же, как и мезенхимальные клетки-предшественники костного мозга, способны адгезировать к пластику, обладают остео-, адипо- и хондрогенным потенциалом дифференцировки, позитивны на CD29, CD44, CD73, CD105 и негативны на маркеры гемопоэтических клеток [36].

Кроме этих двух источников, МСК были выделены также из:

- плаценты [12, 23, 30];
- периферической [35] и пуповинной крови [29];
- амниотической жидкости [6];
- мышечной ткани;
- дермы [24];
- поджелудочной железы [28];
- пульпы зуба [38];
- синовиальной жидкости [37];
- тимуса [22].

Такое широкое распространение МСК в организме ряд авторов [7, 9, 14] объясняют локализацией этих клеток вдоль кровеносных сосудов. Ими было доказано не только морфологическое, но и функциональное сходство между МСК и перицитами. Хотя исследователи и отмечают, что перициты могут считаться МСК только после высвобождения их из сосудистой стенки, то есть после утраты межклеточных контактов с эндотелиоцитами, являющихся специфическим критерием перицитов. Таким образом, согласно этой модели первичным индуктором пролиферации и дифференцировки МСК является именно потеря контакта с эндотелием и базальной мембраной, что собственно и наблюдается при любом повреждении ткани.

В ряде работ [16, 44] косвенно было доказана перспективность применения МСК для регенерации МПД. Оказалось, что при сокультивировании МСК и клеток ПЯ при условии наличия клеточных контактов между ними происходит активация экспрессии генов SOX-9, коллагена II и IV типов и агрекана [27]. Таким образом, МСК приобретают фенотип клеток ПЯ.

Хотя вопрос о целесообразности применения дифференцированных МСК остается открытым в виду того, что в современной литературе существуют работы, говорящие в пользу применения нативных МСК при дегенеративно-дистрофических заболеваниях МПД. Так, T. Svanvik at al. [21] показали, что при совместном культивировании *in vitro* МСК оказывают позитивное влияние на синтез клетками ПЯ таких компонентов внеклеточного матрикса, как протеогликаны и коллаген II типа.

Экспериментальное изучение эффективности применения МСК *in vivo*

Нами также проводятся эксперименты по изучению эффективности применения МСК *in vivo* на асимметричной компрессионной модели дегенеративно-дистрофического повреждения МПД. Суть последней заключается в формировании изгиба хвостового отдела позвоночника путем фиксации кончика частично резецированного хвоста к коже спины немного выше люмбально-сакрального сочленения. Таким образом, моделируется физиологический изгиб позвоночника человека и повторяется компрессионный механизм развития дегенеративно-дистрофических повреждений тканей МПД.

Исследования этой модели показали, что спустя 60 дней со дня формирования компрессии достоверно уменьшается высота МПД (особенно на уровне C_{V-VIII}) по сравнению с таковой до начала воздействия. Кроме того, происходит расслоение и фрагментация пучков коллагеновых волокон, образуются трещины и щели в ФК, обнаруживаются участки полного отсутствия фиброхондроцитов, а в ПЯ – лизированные нотохордальные клетки.

Через 60 дней животным *опытной* группы в зону компрессии на коллагеновой губке вводили суспензию, содержащую 10⁶ МСК, а животным *контрольной* группы – точно также физиологический раствор NaCl в том же объеме.

На данном этапе исследований с уверенностью можно сказать, что спустя уже месяц после локального введения недифференцированных аллогенных МСК в зону дефекта обнаруживаются достаточно четкие признаки восстановления МПД: увеличивается его высота, исчезают разволокнения коллагеновых волокон, трещины и щели, а главное – происходит восстановление клеточности его структурных элементов.

Результаты этих экспериментов достаточно наглядно подтверждают высокий регенеративный потенциал МСК и способность разорвать тот замкнутый круг патологических процессов дегенерации МПД, о котором упоминалось выше.

Таким образом, в настоящий момент накоплено уже достаточно большой объем знаний об этиологии и патогенезе дегенеративно-дистрофических повреждений МПД, что позволяет надеяться на разработку в ближайшее время новых и эффективных методов их лечения.

Литература

1. Бегун П. И. Биомеханика / П. И. Бегун, Ю. А. Шукейло. – СПб.: Политехника, 1995. – 160 л., ил.
2. Корж А. А. Остеохондроз позвоночника: концептуальное моделирование / А. А. Корж, Б. И. Сименач // Междунар. мед. журн. – 1999. – № 4. – С. 52–58.
3. Корнацький В. М. Хвороби кістково-м'язової системи: стан проблеми в Україні та Європі / В. М. Корнацький // Укр. мед. часоп. – 2001. – № 4. – С. 139–141.
4. Показники та аналіз надання травматолого-ортопедичної допомоги населенню України 2001–2002 рр. – К., 2003. – 132 с.

5. Юмашев Г. С. Остеохондрозы позвоночника / Г. С. Юмашев, Л. Е. Фурман. – М.: Медицина, 1984. – 384 с., ил.
6. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation / In't Anker P. S., Scherjon S. A., Kleijburg-van der Keur C. [et al.] // Blood. – 2003. – Vol. 102. – P. 1548–1549.
7. Arnold I. C. All MSCs Are Pericytes? / I. C. Arnold // Cell Stem Cell. – Vol. 3 (3). – P. 229–230.
8. Benjamin P. B. Tow Disc Regeneration: A Glimpse of the Future / Benjamin P. B. Tow, Wellington K. H., Jeffrey C. Wang // Clinical Neurosurgery. – 2007. – Vol. 54. – P. 122–128.
9. Bone marrow Derived Pluripotent Cells are Pericytes which Contribute to Vascularization / Xiaoxiao C., Yunfeng L., Claudia C. F. [et al.] // Stem. Cell. Reviews and Reports. – 2009. – Vol. 5, №. 4. – P. 437–445.
10. Changes in mRNA and protein levels of proteoglycans of the annulus fibrosus and nucleus pulposus during intervertebral disc degeneration / Cs-Szabo G., Ragasa-San Juan D., Turumella V. [et al.] // Spine (Phila Pa 1976). – 2002. – Vol. 27 (20). – P. 2212–2219.
11. Clinical experience in cell-based therapeutics: intervention and outcome / Meisel H. J., Ganey T., Hutton W. C. [et al.] // Eur. Spine J. – 2006. – Vol. 15 (3). – P. 397–405.
12. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international workshop on placenta derived stem cells / Parolini O., Alviano F., Bagnara G. P. [et al.] // Stem. Cells. – 2008. – Vol. 26. – P. 300–311.
13. Connective tissue growth factor expression in human intervertebral disc: implications for angiogenesis in intervertebral disc degeneration / Ali R., Le Maitre C.L., Richardson S.M. [et al.] // Biotechnic and Histochemistry. – 2008. – Vol. 83. – P. 239–245.
14. Crisan M. A. perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs / M. Crisan // Cell. Stem. Cell. – 2008. – Vol. 3. – P. 301–313.
15. Daniel Ireland Molecular mechanisms involved in intervertebral disc degeneration and potential new treatment strategies / Daniel Ireland // Bioscience Horizons. – 2009. – Vol. 2, № 1. – P. 83–89.
16. Differentiation of rodent bone marrow mesenchymal stem cells into intervertebral disk-like cells following coculture with rat disk tissue / Aiqun W., Sylvia A., Chung H. T. [et al.] // Tissue engineering. Part A. – 2009. – Vol. 15 (9). – P. 2581–2595.
17. Expression of chondrocyte markers by cells of normal and degenerate intervertebral discs / Sive J. L., Baird P., Jeziorski M. [et al.] // J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol. – 2002. – Vol. 55 (2). – P. 91–97.
18. Fibronectin and its fragments increase with degeneration in the human intervertebral disc / Oegema T. R., Johnson S. L., Aguiar D. J., Ogilvie J. W. // Spine (Phila Pa 1976). – 2000. – Vol. 25 (21). – P. 2742–2747.
19. Hoyland J. A. Investigation of the role of IL-1 and TNF in matrix degradation in the intervertebral disc / Hoyland J. A., Le Maitre C. L., Freemont A. J. // Rheumatology. – 2008. – Vol. 47. – P. 809–814.
20. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells / Zuk P. A., Zhu M., Ashjian P. [et al.] // Mol. Biology Cell. – 2002. – Vol. 13, № 12. – P. 4279–4295.
21. Human Disk Cells from Degenerated Disks and Mesenchymal Stem Cells in Co-Culture Result in Increased Matrix Production / Svanvik T., Barreto H. H., Karlsson C. [et al.] // Cells Tissues Organs. – 2010. – Vol. 191 (1). – P. 2–11.
22. Human neonatal thymus-derived mesenchymal stromal cells: characterization, differentiation, and immunomodulatory pro-

- erties / *Siepe M., Thomsen A. R., Duerkopp N. [et al.] // Tissue Eng. – Part A. – 2009. – Vol. 15 (7). – P. 1787–1796.*
23. Human placenta-derived cells have mesenchymal stem-progenitor cell potential / *Fukuchi Y., Nakajima H., Sugiyama D. [et al.] // Stem. Cells. – 2004. – Vol. 22. – P. 649–658.*
 24. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors / *Young H. E., Steele T. A., Bray R. A. [et al.] // Anat. Rec. – 2001. – Vol. 264. – P. 51–62.*
 25. Immunolocalization of type X collagen in human lumbar intervertebral discs during ageing and degeneration / *Boos N., Nerlich A., Wiest I., von der Mark K., Aebi M. // Histochem Cell Biol. – 1997. – Vol. 108 (6). – P. 471–480.*
 26. Induction of matrix metalloproteinase-2 and -3 activity in ovine nucleus pulposus cells grown in three-dimensional agarose gel culture by interleukin-1beta : a potential pathway of disc degeneration / *Shen B., Melrose J., Ghosh P., Taylor F. // Eur. Spine J. – 2003. – Vol. 12 (1). – P. 66–75.*
 27. Intervertebral disc cell-mediated mesenchymal stem cell differentiation / *Richardson S. M., Walker R. V., Parker S. [et al.] // Stem Cells. – 2006. – Vol. 24 (3). – P. 707–716.*
 28. Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas / *Ying H., Lianming L., Qiuying W. [et al.] // J. Laboratory and Clinical Medicine. – 2003. – Vol. 141 (5). – P. 342–349.*
 29. Isolation of mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood / *Lee M. W., Yang M. S., Park J. S. [et al.] // Int. J. Hematol. – 2005. – Vol. 81, № 2. – P. 126–130.*
 30. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta / *In't Anker P. S., Scherjon S. A., Kleijburg-van der Keur C. [et al.] // Stem Cells. – 2004. – Vol. 22 (7). – P. 1338–1345.*
 31. Le Maitre C. L. Localization of degradative enzymes and their inhibitors in the degenerate human intervertebral disc / *Le Maitre C. L., Freemont A. J., Hoyland J. A. // J. Pathol. – 2004. – Vol. 204 (1). – P. 47–54.*
 32. Le Maitre C. L. Human disc degeneration is associated with increased MMP 7 expression / *Le Maitre C. L., Freemont A. J., Hoyland J. A. // Biotech. Histochem. – 2006. – Vol. 81 (4–6). – P. 125–31.*
 33. Marchand F. Investigation of the laminate structure of lumbar disc annulus fibrosus / *F. Marchand, A. M. Ahmed // Spine. – 1990. – Vol. 15 (5). – P. 402–410.*
 34. Matrix synthesis and degradation in human intervertebral disc degeneration / *Le Maitre C. L., Pockert A., Buttle D. J. [et al.] // Biochem. Soc. Trans. – 2007. – Vol. 35. – P. 652–655.*
 35. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals / *Zvaifler N. J., Marinova-Mutafchieva L., Adams G. [et al.] // Arthritis Res. – 2000. – Vol. 2. – P. 477–88.*
 36. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells / *Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C. [et al.] // Science. – 1999. – Vol. 284. – P. 143–147.*
 37. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane / *De Bari C., Dell'Accio F., Tylzanowski P., Luyten F. P. // Arthritis Rheum. – 2001. – Vol. 44. – P. 1928–1942.*
 38. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp / *Pierdomenico L., Bonis L., Calvitti M. [et al.] // Transplantation. – 2005. – Vol. 80 (6). – P. 836–842.*
 39. Nerve ingrowth into diseased intervertebral disc in chronic back pain / *Freemont A. J., Peacock T. E., Goupille P. [et al.] // Lancet. – 1997. – Vol. 350. – P. 178–181.*
 40. Regeneration of intervertebral disc by mesenchymal stem cells : potentials, limitations, and future direction / *Victor Y. L. Leung, Danny Chan, Kenneth M. C. Cheung // European Spine J. – 2006. – Vol. 15, № 3. – P. 406–413.*
 41. Reinsertion of stimulated nucleus pulposus cells retards intervertebral disc degeneration: an *in vitro* and *in vivo* experimental study / *Okuma M., Mochida J., Nishimura K. [et al.] // J. Orthop. Res. – 2000. – Vol. 18, № 6. – P. 988–997.*
 42. Relative increase of biglycan and decorin and altered chondroitin sulfate epitopes in the degenerating human intervertebral disc / *Inkinen R. I., Lammi M. J., Lehtonen S. [et al.] // J. Rheumatol. – 1998. – Vol. 25 (3). – P. 506–514.*
 43. Stem cell repair of physal cartilage / *Abn J. I., Terry Canale S., Butler S. D., Hasty K. A. // J. Orthop. Res. – 2004. – № 6. – P. 1215–1221.*
 44. Stem cell therapy for intervertebral disk degeneration : *in vitro* study / *Vadala G., Denaro E., Sobajima S. [et al.] // J. Bone Jt Surg. – 2005. – Vol. 87-B. – P. 204–205.*
 45. Stem cell-mediated regeneration of the intervertebral disc : cellular and molecular challenges / *Rahul Jandial, Henry E. Aryan, John Park [et al.] // Neurosurgical focus. – 2008. – Vol. 24, № 3–4. – P. 85–88.*
 46. The Biomechanics of Back Pain / *Adams M., Bogduk N., Burton K. [et al.]. – Edinburgh : Churchill Livingstone, 2002. – P. 238.*
 47. Type-II collagen gene expression is transiently upregulated in experimentally induced degeneration of rabbit intervertebral disc / *Takaishi H., Nemoto O., Shiota M. [et al.] // J. Orthop. Res. – 1997. – Vol. 15. – P. 528–538.*
 48. Yu J. Elastic tissues of the intervertebral disc / *J. Yu // Biochemical Society Transactions. – 2002. – Vol. 30. – P. 848–852.*