

ДЕГЕНЕРАТИВНАЯ БОЛЕЗНЬ ДИСКА У МОЛОДЫХ: ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ И ФАКТОРЫ АНГИОГЕНЕЗА

А. В. Новикова¹✉, Н. Г. Правдюк¹, В. С. Саклакова², Е. А. Лоломадзе², В. М. Фениксов³, Д. А. Николаев³, К. С. Давыгора¹, В. Т. Тимофеев¹, Н. А. Шостак¹

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

² Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова, Москва, Россия

³ Городская клиническая больница № 1 имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Боль в спине (БС), ассоциированная с дегенеративной болезнью диска (ДБД), — тяжелое социальное и экономическое бремя вследствие ранней инвалидизации и возникновения показаний к оперативному вмешательству уже в молодом возрасте. Патфизиологические основы преждевременной дегенерации межпозвоночного диска (МПД) находятся на стадии активного изучения. Целью исследования было определить профиль воспалительных цитокинов при ДБД и их связь со структурными нарушениями в позвоночнике. У пациентов молодого возраста с БС и грыжей МПД, подвергшихся дискэктомии, и у здоровых лиц проводили молекулярно-генетический анализ представленности генов мРНК методом количественной полимеразной цепной реакции. У больных в ткани МПД выявлен высокий уровень экспрессии TNF α , IL17 ($p < 0,01$); уровни TNF α и IL1 β коррелировали с тяжестью ДБД ($r = 0,301$ и $0,37$; $p < 0,05$). В лейкоцитах периферической крови обнаружена повышенная экспрессия IL1 β , IL6 ($p < 0,01$); уровень IL6 отрицательно коррелировал с I и II стадиями Modic-изменений ($r = -0,31$; $p < 0,05$), IL17 прямо коррелировал с грыжей МПД в сочетании с эрозией замыкательных пластин и Modic ($r = 0,401$; $p < 0,05$). Экспрессия VEGF-A в лейкоцитах крови отрицательно коррелировала со стадией ДБД ($r = -0,85$; $p < 0,001$), указывая на снижение активности васкуляризации в терминальной стадии. Данные, выявленные при ДБД, говорят о вкладе локального низкоиммунного воспаления, сопряженного с активной васкуляризацией диска на более ранних стадиях и ассоциированного с реактивным воспалением тел позвонков. Полученные результаты служат предпосылкой к разработке противовоспалительной и репаративной терапии в зависимости от стадии ДБД и наличия Modic-изменений у лиц молодого возраста с БС.

Ключевые слова: боль в спине, дегенеративная болезнь диска, молодой возраст, дискэктомия, экспрессия цитокинов, мРНК TNF α , IL1 β , IL6, IL17, VEGF-A, Modic-изменения

Благодарности: врачам-нейрохирургам нейрохирургического отделения М. А. Некрасову, В. В. Бабенкову, А. Н. Исаеву, В. А. Смирнову, Д. С. Глухову, Г. В. Габечия, Д. Б. Чориеву, А. Х. Кожеву за помощь в исследовании.

Вклад авторов: А. В. Новикова — анализ литературы, сбор клинических данных и набор биоматериала, выполнение преаналитического этапа работы, анализ и интерпретация данных, подготовка рисунков и графиков; Н. Г. Правдюк — анализ литературы, постановка задачи, разработка дизайна исследования, анализ и интерпретация данных; В. С. Саклакова — анализ литературы, выполнение аналитической части лабораторной работы, определение и статистический анализ уровня представленности мРНК в биоматериале, составление графиков; Е. А. Лоломадзе — анализ лабораторной работы, анализ уровня представленности мРНК в биоматериале; В. М. Фениксов и Д. А. Николаев — допуск к набору клинического материала, неврологический осмотр пациентов, дискэктомия, получение биоматериала; К. С. Давыгора — анализ литературы, анализ лабораторной работы; В. Т. Тимофеев — планирование исследования, выполнение преаналитического этапа работы, оценка полученных данных; Н. А. Шостак — руководство проведением исследования, разработка дизайна исследования, интерпретация данных, редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом РНИМУ им. Н. И. Пирогова (протокол № 181 от 28 января 2019 г.); от всех участников получено информированное согласие на проведение исследования образцов крови и межпозвоночного диска.

✉ **Для корреспонденции:** Анна Владимировна Новикова
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997, Россия; annove2008@mail.ru

Статья получена: 22.11.2021 **Статья принята к печати:** 06.12.2021 **Опубликована онлайн:** 19.12.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.061

DEGENERATIVE DISC DISEASE IN YOUNG ADULTS: CYTOKINE PROFILE AND ANGIOGENIC FACTORS

Novikova AV¹✉, Pravdyuk NG¹, Saklakova VS², Lolomadze EA², Feniksov VM³, Nikolaev DA³, Davygora KS¹, Timofeev VT¹, Shostak NA¹

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

³ Pirogov City Clinical Hospital № 1, Moscow, Russia

Back pain (BP), associated with the degenerative disc disease (DDD), poses a heavy social and economic burden due to early disability and indications to surgery, emerging in young adults. Pathophysiological basis of premature intervertebral disc (IVD) degeneration is being actively studied. The study was aimed to define the profiles of inflammatory cytokines in DDD, as well as their relationship to the structural spine diseases. The molecular genetic analysis of the mRNA gene abundance in patients with BP and herniated IVD after discectomy and healthy individuals was performed by the quantitative polymerase chain reaction method. High expression of TNF α , IL17 was revealed in the IVD tissues of the affected patients ($p < 0.01$); the levels of TNF α and IL1 β correlated with the DDD severity ($r = 0.301$ and 0.37 ; $p < 0.05$). Elevated expression of IL1 β , IL6 was found in peripheral white blood cells ($p < 0.01$); the levels of IL6 negatively correlated with Modic type 1 and 2 changes ($r = -0.31$; $p < 0.05$), and the levels of IL17 positively correlated with the IVD herniation in combination with erosions of the adjacent vertebral body endplates and Modic changes ($r = 0.401$; $p < 0.05$). The expression of VEGF-A in the IVD tissues and white blood cells negatively correlated with the DDD grades ($r = -0.85$; $p < 0.001$), indicating reduced vascularization in the terminal phase of the disease. The findings on DDD demonstrate the contribution of the local low-immune inflammation, coupled with the intense disc vascularization at the earlier stages, and associated with the reactive inflammation in vertebral bodies. The results are prerequisites for developing the anti-inflammatory and reparative therapy based on the DDD grade and the presence of Modic changes in young adults with BP.

Keywords: back pain, degenerative disc disease, young age, discectomy, cytokine expression, mRNA TNF α , IL1 β , IL6, IL17, VEGF-A, Modic-changes

Acknowledgements: we would like to thank neurosurgeons of the Department of Neurosurgery, Nekrasova MA, Babenkova VV, Isaeva AN, Smirnova VA, Glukhova DS, Gabechiya GV, Choriyeva DB, Kozheva AKH, for assistance in our research.

Author contribution: Novikova AV — literature analysis, clinical data acquisition and biomaterial collection, preanalytical phase of the study, data analysis and interpretation, preparation of figures and graphs; Pravdyuk NG — literature analysis, task definition, study design, data analysis and interpretation; Saklakova VS — literature analysis, analytic phase of laboratory testing, definition and statistical analysis of mRNA abundance in biomaterial, scheduling; Lolomadze EA — analysis of laboratory work, analysis of mRNA abundance in biomaterial; Feniksov VM and Nikolaev DA — admission to clinical data acquisition, neurological examination of patients, discectomy, biomaterial collection; Davygora KS — literature analysis, analysis of laboratory work; Timofeev VT — study planning, preanalytical phase of the study, evaluation of the data obtained; Shostak NA — research management, study design, data interpretation, manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Pirogov Russian National Research Medical University (protocol № 181 dated January 28, 2019); the informed consent to blood testing and investigation of intervertebral disc was obtained from all participants.

✉ **Correspondence should be addressed:** Anna V. Novikova
Ostrovitianova, 1, Moscow, 117997, Russia; annove2008@mail.ru

Received: 22.11.2021 **Accepted:** 06.12.2021 **Published online:** 19.12.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.061

Боль в спине (БС) — одна из основных причин инвалидизации пациентов в развитых странах мира, вызывающая стойкую потерю трудоспособности. БС встречается во всех возрастных группах. Так, по данным польского исследования, у 85% мужчин и 86% женщин с дебютом БС в 14-летнем возрасте в течение 34 последующих лет БС носила рецидивирующий характер [1]. Одним из прогностически неблагоприятных вариантов БС является дегенеративная болезнь диска (ДБД), в основе которой лежат процессы дегенерации и воспаления в ткани межпозвоночного диска (МПД) [2]. ДБД — хроническое состояние с тенденцией к прогрессированию. Несмотря на то что до сих пор нет однозначных критериев разграничения «естественного» физиологического старения диска и патологической дегенерации, встречающейся и у молодых лиц, термин ДБД используют и клиницисты, и патоморфологи для обозначения дезинтеграции межклеточного матрикса диска с нарушением гомеостаза и индукцией воспалительной активности в пространстве диска [3]. Клинически проявления ДБД хорошо изучены: это БС механического характера, связанная с осевой нагрузкой (усиливается при физической нагрузке, переносе груза, сгибании, уменьшается в покое) и/или стенозом позвоночного канала, радикулопатией, реже — с миелопатией. ДБД является одной из причин хронической нестабильности позвоночноводвигательных сегментов (ПДС) и ранней инвалидизации пациентов трудоспособного возраста. Исследования показали, что дегенерация МПД является многофакторным процессом, включающим апоптоз, воспаление, старение и биомеханические нарушения [4]. В последнее время большое внимание уделяют изучению влияния воспалительных цитокинов на развитие ДБД, дисбалансу провоспалительных и противовоспалительных цитокинов [5].

Показано, что воспалительный паттерн запускает катаболические процессы в матриксе хряща скомпрометированного ПДС, дальнейшую дегенерацию экстрацеллюлярного матрикса и дегидратацию пульпозного ядра (ПЯ) и фиброзного кольца (ФК) [5, 6]. Потеря структурной целостности диска и микротрещины ФК являются причиной пролабирования содержимого ПЯ в ткань ФК и за его пределы с формированием протрузий, экструзий и секвестров. В литературе обсуждается роль TNF α , IL1 β , гиперэкспрессии IL6 и моноцитов CD16 в возникновении и прогрессировании дегенеративных изменений. Важно отметить, что экспрессия цитокинов может коррелировать с тяжестью дегенерации МПД. Роль IL6 в дегенерации диска и формировании грыжи изучена во многих работах [7]. Гипотеза об участии IL6 в дегенерации МПД человека была подтверждена тем, что при усилении экспрессии IL6 повышается представленность транскриптов катаболических генов и подавляется экспрессия генов протеогликанов [8]. Изучение роли IL17 в воспалительном каскаде при ДБД показало, что воздействие на человеческие NP-клетки IL17 и TNF α способствовало увеличению высвобождения IL6 *in vitro* и экспрессии молекул межклеточной адгезии ICAM-1 на поверхности клеток ПЯ и ФК [9]. Установлена ассоциация между интенсивностью болевого синдрома, грыжей МПД и воспалительным ответом. Указанные биомаркеры было предложено рассматривать в качестве предполагаемых потенциальных маркеров начала, интенсивности и прогрессирования заболевания.

Продемонстрирована возможность определения биомаркеров воспаления в сыворотке крови для

идентификации процессов дегенерации и воспаления в ткани МПД у больных с ДБД [7, 10]. Для разработки подходов к репаративной терапии ДБД были изучены молекулярные механизмы дегенерации и воспаления непосредственно в ткани самого диска [3]. IL1 β , TNF α , VEGF были верифицированы иммуногистохимическим методом у лиц разного возраста без симптомов БС [11], уровень их экспрессии в ткани диска практически не различался между группами молодых и пожилых лиц в отсутствие симптомов заболевания. Соответственно, измерение уровня цитокинов поврежденного диска является важной задачей с точки зрения поиска патогенетически обоснованной противовоспалительной и репаративной терапии. Недавно была продемонстрирована роль фактора роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF, VFA) в васкуляризации ткани диска (в норме являющегося аваскулярной структурой) на всех стадиях дегенерации МПД. Активность VEGF реализуется путем регуляции экспрессии растворимого рецептора фактора роста эндотелия сосудов 1 (soluble vascular endothelial growth factor receptor 1) [12].

Японские исследователи, изучая механизм резорбции грыжи у больных ДБД (подтвержденный данными МРТ), проанализировали цепочку взаимодействия TNF α –VEGF–MMP (matrix metalloproteinases MMP-3 и MMP-7, участвующих в дегенерации белков экстрацеллюлярного матрикса МПД — агрекана и коллагена) и установили, что уровень экспрессии мРНК и белка VEGF был повышен в ситуации контакта макрофагов с тканью диска человека *in vitro* и напрямую зависит от уровня экспрессии TNF α [13]. Таким образом, было показано, что неоваскуляризация способствует «обратному развитию» межпозвоночной грыжи. Процесс вставания капилляров в ткань МПД был подтвержден при помощи магнитно-резонансной томографии (МРТ) с использованием гадолиния и может служить дополнительным критерием резорбции экструзии [14].

Взаимосвязь маркеров асептического воспаления и репарации МПД в ткани диска и их представленность в периферической крови у пациентов молодого возраста с продвинутой стадией ДБД до конца не определена. Имеются различные данные о преимущественной роли того или иного цитокина в изменении иммунологического гомеостаза МПД. Изучение профиля цитокинов (в сочетании с особенностями поражения ПДС) позволит выделить иммунные фенотипы пациентов для разработки биологических мишеней терапии и прогноза заболевания. Цель исследования заключалась в определении профиля наиболее значимых биомаркеров воспалительного повреждения (TNF α , IL6, IL17, IL1 β) и ангиогенеза (изоформ фактора роста эндотелия сосудов А — VEGF121, VEGF165 и VEGF189) в хрящевой ткани МПД и в лейкоцитах крови больных молодого возраста с ДБД, подвергшихся дискэктомии, в сравнении с контрольной группой.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на базе нейрохирургического отделения ГКБ № 1 имени Н. И. Пирогова и кафедры факультетской терапии имени А. И. Нестерова РНИМУ имени Н. И. Пирогова в период с 2019 по 2021 г. В нем приняли участие 87 человек (40 мужчин и 48 женщин) молодого возраста (по классификации ВОЗ 2012 г. от 18 до 44 лет). Критерии включения в основную группу: молодые пациенты (медиана возраста — 37,01 лет [35,54–

38,49)), страдающие БС, ассоциированной с ДБД, подтвержденной инструментальными данными (МРТ) (табл.). Критерии исключения: травма позвоночника на момент исследования и в анамнезе, опухолевое, инфекционное поражение позвоночника и других органов, воспалительные спондилоартриты, хирургические вмешательства в предшествующие 30 дней. Всем лицам основной группы было проведено оперативное вмешательство (микродискэктомия) по поводу грыжи МПД на соответствующем уровне в поясничном отделе позвоночника. Интенсивность болевого синдрома измеряли по визуальной аналоговой шкале (ВАШ) в миллиметрах. Степень функциональных ограничений в поясничном отделе позвоночника оценивали согласно индексу BAI (Backache-Index) [15]. Контрольную группу представляли здоровые добровольцы без БС (20 человек), сопоставимые по полу и возрасту. Всем больным до оперативного вмешательства и лицам группы контроля выполняли МРТ поясничного отдела позвоночника. Дегенерацию МПД оценивали на основании снижения интенсивности сигнала МПД, сужения дискового пространства, изменения структуры диска и потери границы между пульпозным ядром (ПЯ) и фиброзным кольцом (ФК). Стадии дегенерации МПД оценивали согласно классификации С. W. Pfirrmann 2001 г. (стадии дегенерации 1–5). Стадии 3, 4 и 5 рассматривали как необратимые в отношении повреждения диска, а стадии 4 и 5 трактовали как тяжелые стадии ДБД.

Фрагменты дегенерированных МПД были получены во время дискэктомии. Микрочастицы МПД размером менее 1 мм³ сразу погружали в стабилизирующий раствор IntactRNA (нетоксичный водный фиксатор, предназначенный для быстрой стабилизации клеточной РНК в тканях и клеточных культурах, не нарушающий целостность клеток), образцам ткани диска присваивали штрих-код, идентичный штрих-коду образцов крови пациента. Молекулярные маркеры, определяемые в образцах крови и хряща были идентичны, выбраны в соответствии с последними данными на основе обзорных статей и технической доступности лабораторной диагностики («ДНК-Технология»; Россия). Определяли уровни представленности мРНК исследуемых генов в клетках крови — лейкоцитах, ткани МПД с помощью методов обратной транскрипции и количественной полимеразной цепной реакции, используя наборы реагентов («ДНК-Технология»; Россия). Реакцию амплификации проводили в детектирующем амплификаторе DTprime 4 («ДНК-Технология»; Россия).

Получение образцов ткани МПД (1 мм³): выделение РНК проводили, предварительно измельчая хрящевое волокно хирургическим лезвием (скальпель хирургический стерильный одноразовый производства Huaiyin Medical Instruments Co. Ltd., China). После измельчения получали фрагмент размером 1 мм, который дополнительно измельчали растиранием конуса микроцентрифужной пробирки о дно чашки Петри до образования мельчайших частиц и налета. Затем в чашку вносили 320 мкл лизирующего раствора из набора «Проба-НК» («ДНК-Технология»; Россия). Содержимое чашки вместе с измельченным образцом переносили в микроцентрифужные пробирки «Эквиджен» (Эквиджен, Инк.; США), после чего перемешивали на вортексе «Mikrospin» FV-2400 (Biosan; Латвия) в течение 5 с и осаждали. Далее оставляли на лизис в течение 1 ч. Затем выделение РНК проводили набором «Проба-НК» («ДНК-

Технология»; Россия) согласно инструкции производителя. Выделенную РНК в объеме 16,5 мкл немедленно использовали для постановки обратной транскрипции, которую проводили при температуре 40 °С в течение 30 мин с последующей инактивацией обратной транскриптазы при 95 °С в течение 5 мин. Полученный раствор кДНК либо сразу использовали для постановки количественной ПЦР, либо хранили при –20 °С. Амплификацию с регистрацией результатов в режиме «реального времени» осуществляли в объеме 35 мкл по следующей программе: 50 циклов 94 °С — 10 с, 64 °С — 20 с, 72 °С — 10 с. Измерение уровня флуоресценции проводили на каждом цикле при температуре 64 °С.

Забор крови в объеме 4 мл в одноразовые пробирки Vacutainer с ЭДТА (Becton Dickinson; США) проводили за сутки до оперативного вмешательства, далее кровь подвергали обработке для выделения лейкоцитов. Для получения лейкоцитарного кольца использовали набор «Проба-Фиколл» для выделения лимфоцитов из цельной крови. Выделение РНК производили набором «Проба-НК» («ДНК-Технология»; Россия) согласно инструкции производителя. Выделенную РНК в объеме 16,5 мкл немедленно использовали для постановки реакции обратной транскрипции при 40 °С в течение 30 мин с последующей инактивацией обратной транскриптазы при 95 °С в течение 5 мин. Полученный раствор кДНК либо сразу использовали для постановки количественной ПЦР, либо хранили при температуре –20 °С. Амплификацию с регистрацией результатов в режиме «реального времени» осуществляли в объеме 35 мкл по следующей программе: 50 циклов 94 °С — 10 с, 64 °С — 20 с, 72 °С — 10 с. Измерение уровня флуоресценции проводили на каждом цикле при температуре 64 °С.

Исследуемые гены включали TNF α , IL6, IL17, IL1 β , изоформы фактора роста эндотелия сосудов A (VEGF121, VEGF165, VEGF189). Нормировочные гены представлены β 2-микроглобулином (B2m), β -глобулиноидазой (GUSB). Нормировочные значения для мРНК каждого гена рассчитывали с помощью метода $\Delta\Delta Ct$ [16]. Уровень экспрессии мРНК генов выражали в условных единицах относительно нормировочных генов (B2m, GUSB), которые имеют относительно устойчивый уровень экспрессии.

Статистический анализ

Для оценки статистической значимости полученных различий использовали метод непараметрической статистики (U-критерий Манна-Уитни). Количественные показатели проверяли на соответствие нормальному закону распределения с помощью критерия Шапиро-Уилка. Сравнение качественных показателей осуществляли с помощью критерия хи-квадрат и двухстороннего критерия Фишера для малых выборок. Различие групп считали достоверным при $p < 0,01$ и $p < 0,05$. Анализ данных выполняли с помощью программы Statistica v 8.0 и SPSS v.10 и Graph Pad Prism.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клинико-инструментальная характеристика пациентов

Клиническая характеристика молодых пациентов с БС представлена в табл. Среднее значение интенсивности боли соответствовало 68 мм [48,0–88,0]. Острое

Таблица. Демографическая и клинико-инструментальная характеристики изучаемых групп

Характеристика больных	Основная группа		Контрольная группа		P I-II
	Me	LQ-UQ	Me	LQ-UQ	
Число пациентов	67		20		
женщин	30		10		
мужчин	37		10		
Средний возраст, лет	37,01	[35,54–38,49]	34,5	[29,26–39,74]	< 0,01
Стадия дегенерации по Pfirrmann на уровне L1–L5 (среднее значение)	2,62	[2,4–3,0]	1,2	[1,1–1,8]	< 0,01
Стадия дегенерации по Pfirrmann на уровне оперируемого МПД (среднее значение)	M	σ	M	σ	
	4,26	±0,59	2,15	±1,18	< 0,01
Число больных с грыжами МПД на уровне L4–L5 на уровне L5–S1	Абс. (%)		Абс. (%)		
	24 (43) 36 (64)		1 (5) 0		< 0,01
Число больных с изменениями типа Modic (суммарно)	47 (70)		1 (5)		< 0,01
	Modic 1 21 (45)		0		< 0,01
	Modic 2 26 (55)		1 (5)		< 0,01
	Modic 3 0		0		< 0,01
Основная группа					
Характеристика больных	Me		LQ-UQ		
Длительность заболевания, годы	5		[2,0–10,0]		
Продолжительность последнего болевого эпизода, недели	6		[3,0–12,0]		
Интенсивность боли (ВАШ, мм)	68		[48,0–88,0]		
Вариант течения болевого синдрома	Абс.		%		
	острый 12		18		
хронический 55		82			
Степень функциональных нарушений (индекс БС (BAI))					
	легкая 11		18		
	средняя 16		24		
	тяжелая 40		58		

течение болевого синдрома (не более 12 недель) имели 18% больных, хроническое — 82%. Средняя продолжительность заболевания у последних составила 5 лет [2,0–10,0]. У 82% больных отмечена средняя и тяжелая степени функциональных нарушений согласно индексу ВАИ. Результаты МРТ поясничного отдела позвоночника продемонстрировали значительное сужение межпозвоночного пространства, исчезновение границы между ПЯ и ФК и снижение интенсивности сигнала от ПЯ. На уровне оперируемого диска стадия дегенерации МПД по Pfirrmann соответствовала 4-й и 5-й стадиям у 66% и 33% пациентов основной группы соответственно. Грыжи локализовались на уровнях L4–L5, L5–S1 в соотношении 36 и 64% соответственно. У 70% больных при МР-визуализации на уровне оперируемого диска были выявлены изменения интенсивности МР-сигнала от костного мозга в T2-взвешенном изображении и режиме подавления жировой ткани (STIR), отражавшие почти в равном соотношении отек костного мозга — Modic I (45% больных) (рис. 1) и жировую дегенерацию — Modic II (55%). В группе контроля Modic-изменения были выявлены только у 1 (5%) пациента из 20, и они также были ассоциированы с тяжелой стадией ДБД и наличием грыжи МПД, имевшей бессимптомное течение. У 37 лиц (53,6%) основной группы по данным МРТ было выявлено сочетание грыжи МПД с эрозивным поражением замыкательных пластин прилежащих тел позвонков (ЗП)

и наличием Modic-изменений. Такое «тройное сочетание» ассоциировалось с большей продолжительностью БС в годах, болью в утренние часы и персистирующим течением хронической боли без «светлых промежутков» ($p < 0,05$) по сравнению с пациентами без эрозивного поражения ЗП и/или Modic-изменений. У пациентов основной группы среднее значение стадии ДБД по Pfirrmann и частота встречаемости Modic-изменений статистически значимо отличались от контрольной группы (4,4 и 2,8 для стадии ДБД, 70 и 5% для Modic; $p < 0,01$). Полученные данные подтверждают взаимосвязь Modic-изменений с наличием грыжи МПД и тяжелой стадией ДБД.

Представленность мРНК цитокинов и изоформ фактора роста эндотелия сосудов в ткани МПД

Из всего профиля мРНК исследуемых генов цитокинов и изоформ фактора роста эндотелия сосудов в хрящевой ткани экспрессия TNF α , IL17, VEGF121, VEGF165 была статистически значимо повышена ($p < 0,01$) по сравнению с контрольной группой (рис. 2). Сопоставление уровня экспрессии мРНК всех исследуемых генов основной группы со стадией дегенерации МПД по Pfirrmann выявило положительную корреляцию уровня экспрессии TNF α со стадией дегенерации МПД ($r = 0,301$; $p < 0,05$) (рис. 3). Несмотря на то что уровень экспрессии мРНК IL1 β не имел статистически значимых различий с группой контроля,

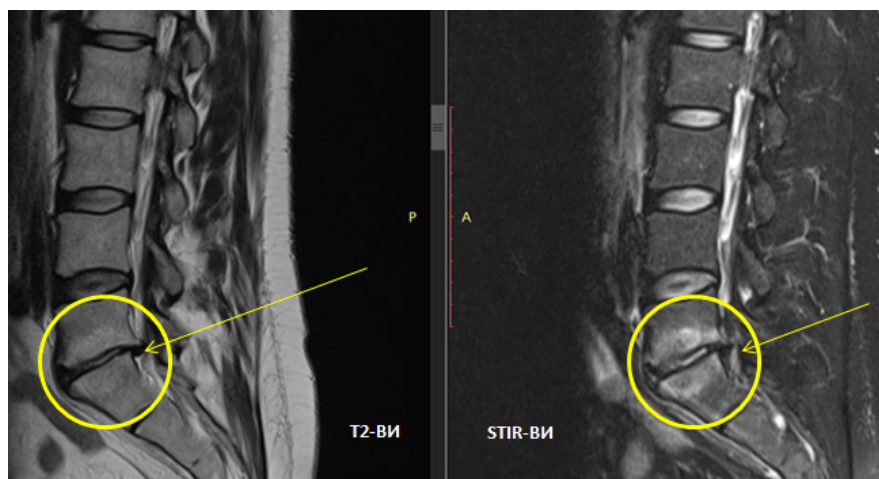


Рис. 1. Пациент К. 37 лет, с БС, ДБД 4-й стадии по Pfirmann на уровне L5–S1 с грыжей МПД (стрелка) и изменениями тел позвонков по типу Modic-1 (желтый контур). T2- и STIR-взвешенные изображения

представленность этого гена в ткани диска коррелировала с тяжестью его дегенерации ($r = 0,37$; $p < 0,05$) (рис. 4).

С точки зрения прогрессирования дезорганизации вещества МПД интересно было оценить маркеры васкуляризации хряща на 4-й и 5-й стадиях дегенерации МПД. Для факторов роста эндотелия сосудов была выявлена статистически значимая обратная корреляционная зависимость уровня VEGF121 со стадией дегенерации МПД ($r = -0,85$; $p < 0,001$), что может свидетельствовать о снижении интенсивности ангиогенеза в диске на продвинутых стадиях ДБД.

Анализ представленности генов в клетках крови

Дальнейший анализ был направлен на определение мРНК цитокинов и ростовых факторов в лейкоцитах периферической крови. В нашем исследовании выявлено статистически значимое повышение уровня представленности генов интерлейкинов IL1 β , IL6 ($p < 0,01$) (рис. 5). Анализ зависимости уровня экспрессии мРНК

цитокина IL6 в периферической крови со стадией дегенерации МПД показал снижение уровня цитокина на последней стадии дегенерации диска по Pfir ($r = -0,347$; $p < 0,05$), свидетельствуя о его значимом вкладе в дегенерацию на более ранних стадиях.

Учитывая высокую частоту встречаемости реактивных изменений тел позвонков по типу Modic (70%) в основной группе, мы проанализировали взаимосвязь уровня экспрессии цитокинов с наличием Modic-изменений. Была выявлена статистически значимая обратная корреляционная зависимость уровня IL6 в клетках крови со стадиями Modic-изменений I и II ($r = -0,31$; $p < 0,05$), что свидетельствует о повышенной экспрессии цитокина на стадии воспалительного отека костного мозга по сравнению со стадией жировой трансформации прилежащих тел позвонков. Было выявлено повышение уровня экспрессии IL17 в периферической крови у лиц с более тяжелым поражением позвоночно-двигательного сегмента — тройным сочетанием (грыжа + эрозия ЗП + Modic) ($r = 0,401$; $p < 0,05$) по сравнению с лицами при

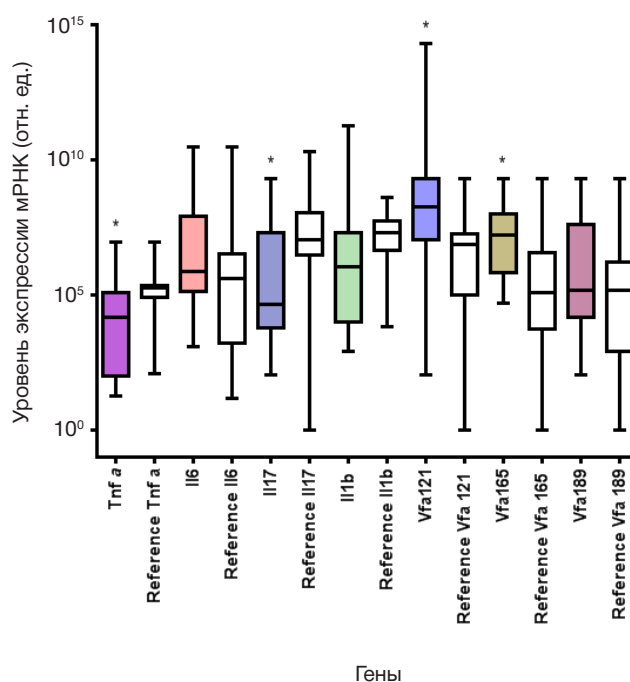


Рис. 2. Уровень экспрессии мРНК исследуемых генов относительно нормировочных генов (B2m, GUSB) в ткани МПД пациентов основной и контрольной групп (* — $p < 0,01$)

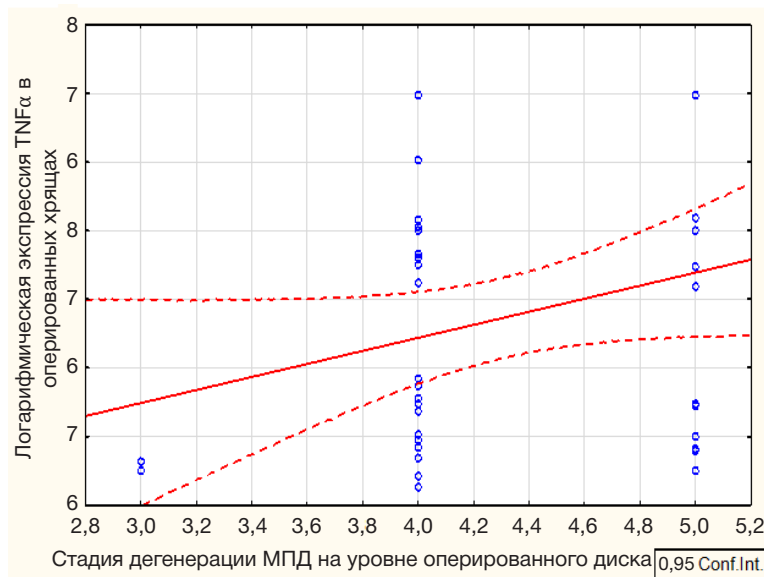


Рис. 3. Корреляционная зависимость уровня экспрессии мРНК TNF α в ткани МПД со стадией дегенерации по Pfirrmann у пациентов основной группы

наличию только грыжи. Несмотря на низкий уровень представленности биомаркеров ангиогенеза в крови пациентов с БС, мы решили проследить, изменяется ли уровень экспрессии фактора роста эндотелия сосудов (его изоформ 121, 165, 189) в зависимости от стадий дегенерации МПД: для всех трех изоформ была получена обратная, статистически значимая, корреляция ($r = -0,44$; $-0,33$ и $-0,45$ соответственно; $p < 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изучение патофизиологии БС у молодых пациентов подтвердило наличие иммуновоспалительного звена в дегенерации диска. Высокие уровни экспрессии TNF α и рецепторов к TNF α , особенно в ткани ФК, были выявлены у пациентов с ДБД и в других работах [17, 18]. Именно этот цитокин описывается в экспериментах как выраженный индуктор деградации матрикса, особенно на ранних стадиях, по сравнению с другими медиаторами [19]. Выявленная нами сопряженная экспрессия TNF α и IL17 обнаружена в двух работах китайских исследователей и подтверждена влиянием этанерцепта (ингибитор рецептора TNF α), которых способен блокировать весь воспалительный

каскад в ткани ПЯ диска [20, 21]. Патогенетическая связь иммунного воспаления с васкуляризацией диска в нашей работе продемонстрирована в зарубежных работах на людях и на животных [22, 23].

Ассоциация повышенной экспрессии гена IL6 в периферической крови с изменениями Modic, а именно со стадией воспалительного отека костного мозга, продемонстрирована также в работе китайских исследователей, в которой уровень экспрессии IL6 был значимо повышен у пожилых пациентов с ДБД и Modic I в сравнении с Modic-изменениями II типа [24]. Выявленные изменения подтверждают факт развития реактивного асептического спондилита у пациентов с тяжелой ДБД. Выявление повышенной экспрессии IL17 у лиц с тройным вариантом поражения ПДС позволяет говорить о наличии неблагоприятного клинико-инструментального фенотипа БС с иммунологическим маркером на системном уровне.

Известно, что по классификации Pfirrmann 5-я стадия дегенерации МПД характеризуется резким снижением высоты МПД, низкоинтенсивным и неоднородным сигналом от ПЯ, что соответствует тяжелой, почти полной дегидратации ПЯ с дезинтеграцией межклеточного вещества и замещением центрального пространства

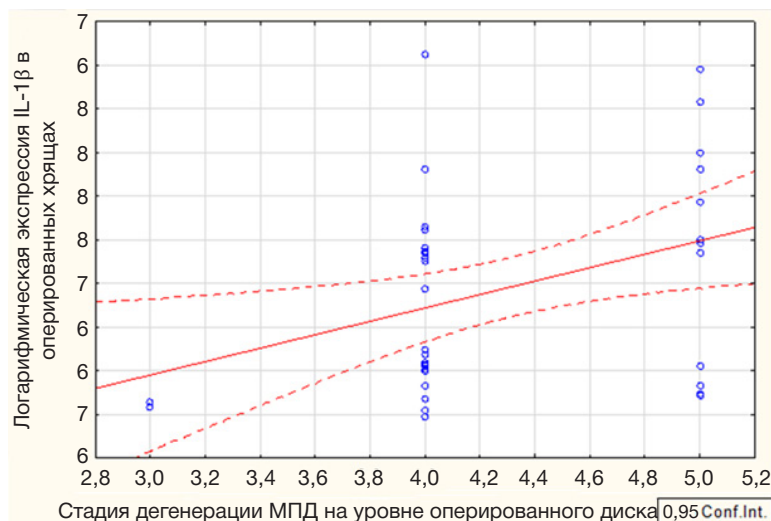


Рис. 4. Корреляционная зависимость уровня экспрессии мРНК IL1 β в ткани МПД со стадией дегенерации по Pfirrmann у пациентов основной группы

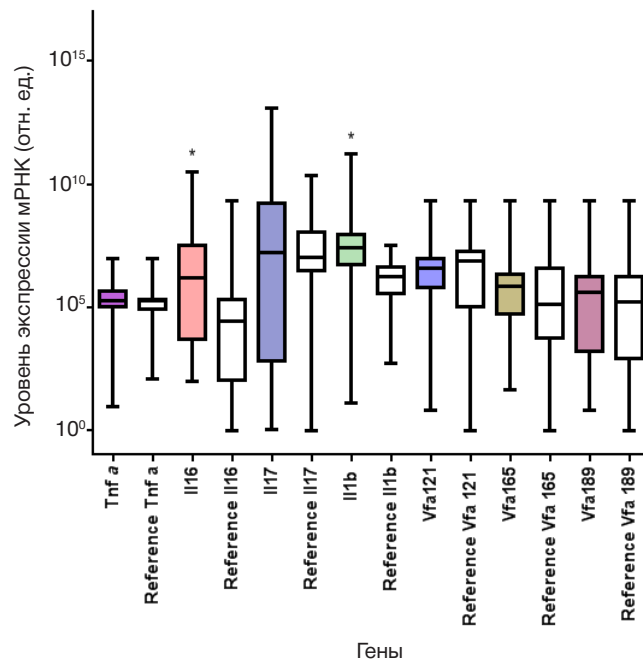


Рис. 5. Уровень экспрессии мРНК исследуемых генов относительно нормировочных генов (B2m, GUSB) в лейкоцитах крови пациентов основной и контрольной групп ($p < 0,01$)

диска коллагеном 1-го типа и стиранием границы между ПЯ и ФК [25]. Различная процесс естественной дегенерации диска, ассоциированной с возрастом, и патологической дегенерации, мы хотим подчеркнуть принципиальную роль воспалительных маркеров в развитии второго варианта, особенно ярко проявляющегося тяжелой степенью дегенерации у лиц молодого возраста [26]. К четвертому году жизни диск теряет кровеносные сосуды и капилляры и становится полностью аваскулярной структурой [27]. По мере развития «низкоиммунного» воспаления в ткани МПД неоваскуляризация является способом доставки иммунокомпетентных клеток из системного кровотока в хрящевую ткань с последующей активацией катаболических процессов [28] и резорбции ткани выпавшего за пределы ФК фрагмента. Фактор роста эндотелия сосудов А (VEGF) является одним из основных регуляторов ангиогенеза. Он играет важную роль в процессе физиологической и патологической неоваскуляризации [29]. Стимуляцию экспрессии VEGF обеспечивает активность хондроцитов, находящихся в виде кластеров в ПЯ. При 5-й стадии ДБД диск полностью утрачивает ПЯ вместе со всем его клеточным содержимым, что, вероятнее всего, прерывает цепочку стимуляции ангиогенеза в этой ситуации. Эти данные не противоречат исследованию, показавшему, что уровни экспрессии ангиогенного фактора VEGF в слабодегенерированных образцах МПД были статистически значимо выше, чем на продвинутых стадиях дегенерации [12]. Учитывая низкие репаративные способности диска на 5-й стадии дегенерации, наиболее перспективно использование биоинженерной терапии с

применением тканевой инженерии и восстановлением трехмерного каркаса МПД с последующим ведением клеточной терапии.

ВЫВОДЫ

Выполненное исследование помогает уточнить спектр активированных генов, экспрессирующих цитокины, и демонстрирует их воспалительный профиль в ткани МПД и периферической крови в зависимости от выраженности ДБД и распространенности поражения ПДС. Представленность мРНК изучаемых цитокинов и изоформ фактора роста эндотелия сосудов в ткани МПД (TNF α , IL17, VEGF121, VEGF165) была повышена для лиц с БС и ДБД. Уровень экспрессии фактора роста эндотелия сосудов, отражающий возможные процессы неоваскуляризации, показал резкий спад на последней стадии ДБД как в ткани МПД, так и в периферической крови, в то время как уровни цитокинов TNF α и IL1 β в хрящевой ткани прямо коррелировали с тяжестью дегенерации МПД, что согласуется с теорией иммунного воспаления при ДБД. Уровни экспрессии гена IL6 в лейкоцитах крови оказались повышенными при Modic-изменениях и в большей степени ассоциировались с воспалительным отеком костного мозга прилежащих тел позвонков на уровне скомпрометированного сегмента, а уровни экспрессии IL17 — повышенным при наличии грыжи в сочетании с эрозией ЗП и Modic-изменениями. Полученные результаты помогут определить молекулярные мишени и новые направления в противовоспалительной и репаративной терапии ДБД.

Литература

- Zwierzchowska A, Tuz J. Evaluation of the impact of sagittal spinal curvatures on musculoskeletal disorders in young people. *Med Pr.* 2018; 69 (1): 29–36. DOI: 10.13075/mp.5893.00558.
- Fujii K, Yamazaki M, Kang JD, Risbud MV, Cho SK, Qureshi SA, et al. Discogenic Back Pain: Literature Review of Definition, Diagnosis, and Treatment *JBMR Plus.* 2019; 3 (5): e10180. DOI: 10.1002/jbmr4.10180.
- Anitua E, Padilla S. Biologic therapies to enhance intervertebral disc repair. *RegenMed.* 2018; 13 (1): 55–72. DOI: 10.2217/rme-2017-0111.

4. Hu S, Fu Y, Yan B, Shen Z, Lan T. Analysis of key genes and pathways associated with the pathogenesis of intervertebral disc degeneration. *J Orthop Surg Res.* 2020; 15 (1): 371. DOI: 10.1186/s13018-020-01902-4.
5. Li Y, Liu J, Liu Z, Duan D. Inflammation in low back pain may be detected from the peripheral blood: suggestions for biomarker. *Biosci Rep.* 2016; 36 (4): e00361. DOI: 10.1042/BSR20160187.
6. Hodgkinson T, Shen B, Diwan A, Hoyland JA, Richardson SM. Therapeutic potential of growth differentiation factors in the treatment of degenerative disc diseases. *Spine.* 2019; 2 (1): e1045. DOI: 10.1002/jsp2.1045.
7. Kraychete DC, Sakata RK, Issy AM, Bacellar O, Santos-Jesus R, Carvalho EM. Serum cytokine levels in patients with chronic low back pain due to herniated disc: analytical cross-sectional study. *Sao Paulo Med J.* 2010; 128 (5): 259–62. DOI: 10.1590/s1516-31802010000500003.
8. Studer RK, Vo N, Sowa G, Ondeck C, Kang J. Human nucleus pulposus cells react to IL6: independent actions and amplification of response to IL1 and TNF α . *Spine.* 36: 593–9. DOI: 10.1097/BRS.0b013e3181da38d5
9. Gabr MA, Jing L, Helbling AR, Sinclair SM, Allen KD, Shamji MF, et al. Interleukin-17 synergizes with IFN γ or TNF α to promote inflammatory mediator release and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in human intervertebral disc cells. *J Orthop Res.* 2011; 29 (1): 1–7. DOI: 10.1002/jor.21206.
10. Rodrigues LMR, Oliveira LZ, Silva MBRD, Accardo CM, Giglio ABD, Pinhal MADS. Inflammatory biomarkers in sera of patients with intervertebral disc degeneration. *Einstein (Sao Paulo).* 2019; 17 (4): eAO4637. DOI: 10.31744/einstein_journal/2019AO4637.
11. Baptista JS, Traynelis VC, Liberti EA, Fontes RBV. Expression of degenerative markers in intervertebral discs of young and elderly asymptomatic individuals. *PLoS One.* 2020; 15 (1): e0228155. DOI: 10.1371/journal.pone.0228155.
12. Capossela S, Bertolo A, Gunasekera K, Pötzel T, Baur M, Stoyanov JV. VEGF vascularization pathway in human intervertebral disc does not change during the disc degeneration process. *BMC Res Notes.* 2018; 11: 333 DOI: 10.1186/s13104-018-3441-3.
13. Haro H, Kato T, Komori H, Osada M, Shinomiya K. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced angiogenesis in herniated disc resorption. *J Orthop Res.* 2002; 20 (3): 409–15. DOI: 10.1016/S0736-0266(01)00150-4
14. Autio RA, Karppinen J, Niinimäki J, Ojala R, Kurunlahti M, Haapea M, et al. Determinants of spontaneous resorption of intervertebral disc herniations. *Spine.* 2006; 31 (11): 1247–52. DOI: 10.1097/01.brs.0000217681.83524.4a.
15. Longo UG, Loppini M, Denaro L, Maffulli N, Denaro V. Rating scales for low back pain. *Br Med Bull.* 2010; 94: 81–144. DOI: 10.1093/bmb/ldp052.
16. Farasyn A, Meeusen R. Validity of the new Backache Index (BAI) in patients with low back pain. *Spine J.* 2006; 6 (5): 565–71. DOI: 10.1016/j.spinee.2006.01.021.
17. Ребриков Д. В., Саматов Г. А., Трофимов Д. Ю. ПЦР в реальном времени. М.: Лаборатория знаний, 2019; 216 с.
18. Andrade P, Visser-Vandewalle V, Philippens M, Daemen MA, Steinbusch HWM, Buurman WA, et al. TNF-alpha levels correlate with postoperative pain severity in lumbar disc hernia patients: opposite clinical effects between TNF receptor 1 and 2. *Pain.* 2011; 152: 2645–52. DOI: 10.1016/j.pain.2011.08.012.
19. Altun I. Cytokine profile in degenerated painful intervertebral disc: variability with respect to duration of symptoms and type of disease. *Spine J.* 2016; 16 (7): 857–61. DOI: 10.1016/j.spinee.2016.03.019.
20. Kang R, Li H, Rickers K, Ringgaard S, Xie L, Büniger C. Intervertebral disc degenerative changes after intradiscal injection of TNF α in a porcine model. *Eur Spine J.* 2015; 24 (9): 2010–6. DOI: 10.1007/s00586-015-3926-x.
21. Wang S, Wei J, Fan Y, Ding H, Tian H, Zhou X, et al. Progranulin Is Positively Associated with Intervertebral Disc Degeneration by Interaction with IL10 and IL17 Through TNF Pathways. *Inflammation.* 2018; 41 (5): 1852–63. DOI: 10.1007/s10753-018-0828-1.
22. Wang SS, Zhang W, Zhang YQ, Zhao Y, Liu Y, Li JK, et al. IL17A enhances ADAMTS-7 expression through regulation of TNF α in human nucleus pulposus cells. *J Mol Histol.* 2015; 46 (6): 475–83. DOI: 10.1007/s10735-015-9640-5.
23. Ohba T, Haro H, Ando T, Wako M, Suenaga F, Aso Y, et al. TNF-alpha-induced NF-kappaB signaling reverses age-related declines in VEGF induction and angiogenic activity in intervertebral disc tissues. *J Orthop Res.* 2009; 27 (2): 229–35. DOI: 10.1002/jor.20727.
24. Binch AL, Cole AA, Breakwell LM, Michael AL, Chiverton N, Cross AK, et al. Expression and regulation of neurotrophic and angiogenic factors during human intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res Ther.* 2014; 16 (5): 416. DOI: 10.1186/s13075-014-0416-1.
25. Zhang JF, Wang GL, Zhou ZJ, Fang XQ, Chen S, Fan SW. Expression of Matrix Metalloproteinases, Tissue Inhibitors of Metalloproteinases, and Interleukins in Vertebral Cartilage Endplate. *Orthop Surg.* 2018; 10 (4): 306–11. DOI: 10.1111/os.12409.
26. Oh CH, Yoon SH. Whole Spine Disc Degeneration Survey according to the Ages and Sex Using Pfirrmann Disc Degeneration Grades. *Korean J Spine.* 2017; 14 (4): 148–54. DOI: 10.14245/kjs.2017.14.4.148.
27. Akyol S, Eraslan BS, Etyemez H, Tanriverdi T, Hanci M. Catabolic cytokine expressions in patients with degenerative disc disease. *Turk Neurosurg.* 2010; 20 (4): 492–9. DOI: 10.5137/1019-5149.JTN.3394-10.1.
28. Takeno K, Kobayashi S, Negoro K, Uchida K, Miyazaki T, Yayama T, et al. Physical limitations to tissue engineering of intervertebral disc cells: effect of extracellular osmotic change on glycosaminoglycan production and cell metabolism. *Laboratory investigation. J Neurosurg Spine.* 2007; 7 (6): 637–44. DOI: 10.3171/SPI-07/12/637.
29. Chung SA, Khan SN, Diwan AD. The molecular basis of intervertebral disk degeneration. *Orthop Clin North Am.* 2003; 34 (2): 209–19. DOI: 10.1016/s0030-5898(03)00026-9.

References

1. Zwierzchowska A, Tuz J. Evaluation of the impact of sagittal spinal curvatures on musculoskeletal disorders in young people. *Med Pr.* 2018; 69 (1): 29–36. DOI: 10.13075/mp.5893.00558.
2. Fujii K, Yamazaki M, Kang JD, Risbud MV, Cho SK, Qureshi SA, et al. Discogenic Back Pain: Literature Review of Definition, Diagnosis, and Treatment *JBMR Plus.* 2019; 3 (5): e10180. DOI: 10.1002/jbm4.10180.
3. Anitua E, Padilla S. Biologic therapies to enhance intervertebral disc repair. *RegenMed.* 2018; 13 (1): 55–72. DOI: 10.2217/rme-2017-0111.
4. Hu S, Fu Y, Yan B, Shen Z, Lan T. Analysis of key genes and pathways associated with the pathogenesis of intervertebral disc degeneration. *J Orthop Surg Res.* 2020; 15 (1): 371. DOI: 10.1186/s13018-020-01902-4.
5. Li Y, Liu J, Liu Z, Duan D. Inflammation in low back pain may be detected from the peripheral blood: suggestions for biomarker. *Biosci Rep.* 2016; 36 (4): e00361. DOI: 10.1042/BSR20160187.
6. Hodgkinson T, Shen B, Diwan A, Hoyland JA, Richardson SM. Therapeutic potential of growth differentiation factors in the treatment of degenerative disc diseases. *Spine.* 2019; 2 (1): e1045. DOI: 10.1002/jsp2.1045.
7. Kraychete DC, Sakata RK, Issy AM, Bacellar O, Santos-Jesus R, Carvalho EM. Serum cytokine levels in patients with chronic low back pain due to herniated disc: analytical cross-sectional study. *Sao Paulo Med J.* 2010; 128 (5): 259–62. DOI: 10.1590/s1516-31802010000500003.
8. Studer RK, Vo N, Sowa G, Ondeck C, Kang J. Human nucleus pulposus cells react to IL6: independent actions and amplification of response to IL1 and TNF α . *Spine.* 36: 593–9. DOI: 10.1097/BRS.0b013e3181da38d5
9. Gabr MA, Jing L, Helbling AR, Sinclair SM, Allen KD, Shamji MF, et al. Interleukin-17 synergizes with IFN γ or TNF α to promote

- inflammatory mediator release and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in human intervertebral disc cells. *J Orthop Res.* 2011; 29 (1): 1–7. DOI: 10.1002/jor.21206.
10. Rodrigues LMR, Oliveira LZ, Silva MBRD, Accardo CM, Giglio ABD, Pinhal MADS. Inflammatory biomarkers in sera of patients with intervertebral disc degeneration. *Einstein (Sao Paulo).* 2019; 17 (4): eAO4637. DOI: 10.31744/einstein_journal/2019AO4637.
 11. Baptista JS, Traynelis VC, Liberti EA, Fontes RBV. Expression of degenerative markers in intervertebral discs of young and elderly asymptomatic individuals. *PLoS One.* 2020; 15 (1): e0228155. DOI: 10.1371/journal.pone.0228155.
 12. Capossela S, Bertolo A, Gunasekera K, Pötzel T, Baur M, Stoyanov JV. VEGF vascularization pathway in human intervertebral disc does not change during the disc degeneration process. *BMC Res Notes.* 2018; 11: 333 DOI: 10.1186/s13104-018-3441-3.
 13. Haro H, Kato T, Komori H, Osada M, Shinomiya K. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced angiogenesis in herniated disc resorption. *J Orthop Res.* 2002; 20 (3): 409–15. DOI: 10.1016/S0736-0266(01)00150-4
 14. Autio RA, Karppinen J, Niinimäki J, Ojala R, Kurunlahti M, Haapea M, et al. Determinants of spontaneous resorption of intervertebral disc herniations. *Spine.* 2006; 31 (11): 1247–52. DOI: 10.1097/01.brs.0000217681.83524.4a.
 15. Longo UG, Loppini M, Denaro L, Maffulli N, Denaro V. Rating scales for low back pain. *Br Med Bull.* 2010; 94: 81–144. DOI: 10.1093/bmb/ldp052.
 16. Farasyn A, Meeusen R. Validity of the new Backache Index (BAI) in patients with low back pain. *Spine J.* 2006; 6 (5): 565–71. DOI: 10.1016/j.spinee.2006.01.021.
 17. Rebrikov DV, Samatov GA, Trofimov DYU. PCR v real'nom vremeni. M.: Laboratorija znanij, 2019; 216s.
 18. Andrade P, Visser-Vandewalle V, Philippens M, Daemen MA, Steinbusch HWM, Buurman WA, et al. TNF-alpha levels correlate with postoperative pain severity in lumbar disc hernia patients: opposite clinical effects between TNF receptor 1 and 2. *Pain.* 2011; 152: 2645–52. DOI: 10.1016/j.pain.2011.08.012.
 19. Altun I. Cytokine profile in degenerated painful intervertebral disc: variability with respect to duration of symptoms and type of disease. *Spine J.* 2016; 16 (7): 857–61. DOI: 10.1016/j.spinee.2016.03.019.
 20. Kang R, Li H, Rickers K, Ringgaard S, Xie L, Bünger C. Intervertebral disc degenerative changes after intradiscal injection of TNF α in a porcine model. *Eur Spine J.* 2015; 24 (9): 2010–6. DOI: 10.1007/s00586-015-3926-x.
 21. Wang S, Wei J, Fan Y, Ding H, Tian H, Zhou X, et al. Progranulin Is Positively Associated with Intervertebral Disc Degeneration by Interaction with IL10 and IL17 Through TNF Pathways. *Inflammation.* 2018; 41 (5): 1852–63. DOI: 10.1007/s10753-018-0828-1.
 22. Wang SS, Zhang W, Zhang YQ, Zhao Y, Liu Y, Li JK, et al. IL17A enhances ADAMTS-7 expression through regulation of TNF α in human nucleus pulposus cells. *J Mol Histol.* 2015; 46 (6): 475–83. DOI: 10.1007/s10735-015-9640-5.
 23. Ohba T, Haro H, Ando T, Wako M, Suenaga F, Aso Y, et al. TNF-alpha-induced NF-kappaB signaling reverses age-related declines in VEGF induction and angiogenic activity in intervertebral disc tissues. *J Orthop Res.* 2009; 27 (2): 229–35. DOI: 10.1002/jor.20727.
 24. Binch AL, Cole AA, Breakwell LM, Michael AL, Chiverton N, Cross AK, et al. Expression and regulation of neurotrophic and angiogenic factors during human intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res Ther.* 2014; 16 (5): 416. DOI: 10.1186/s13075-014-0416-1.
 25. Zhang JF, Wang GL, Zhou ZJ, Fang XQ, Chen S, Fan SW. Expression of Matrix Metalloproteinases, Tissue Inhibitors of Metalloproteinases, and Interleukins in Vertebral Cartilage Endplate. *Orthop Surg.* 2018; 10 (4): 306–11. DOI: 10.1111/os.12409.
 26. Oh CH, Yoon SH. Whole Spine Disc Degeneration Survey according to the Ages and Sex Using Pfirrmann Disc Degeneration Grades. *Korean J Spine.* 2017; 14 (4): 148–54. DOI: 10.14245/kjs.2017.14.4.148.
 27. Akyol S, Eraslan BS, Etyemez H, Tanriverdi T, Hanci M. Catabolic cytokine expressions in patients with degenerative disc disease. *Turk Neurosurg.* 2010; 20 (4): 492–9. DOI: 10.5137/1019-5149.JTN.3394-10.1.
 28. Takeno K, Kobayashi S, Negoro K, Uchida K, Miyazaki T, Yayama T, et al. Physical limitations to tissue engineering of intervertebral disc cells: effect of extracellular osmotic change on glycosaminoglycan production and cell metabolism. Laboratory investigation. *J Neurosurg Spine.* 2007; 7 (6): 637–44. DOI: 10.3171/SPI-07/12/637.
 29. Chung SA, Khan SN, Diwan AD. The molecular basis of intervertebral disk degeneration. *Orthop Clin North Am.* 2003; 34 (2): 209–19. DOI: 10.1016/S0030-5898(03)00026-9.