

КОМПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ ДИФФУЗИОННОГО ТРАНСПОРТА И МИКРОСТРУКТУРЫ МЕЖПОЗВОНКОВОГО ДИСКА

В.А.Бывальцев^{1,2,3,6}, С.И.Колесников^{7,8}, Е.Г.Бельх^{1,2}, И.А.Степанов^{1,2},
А.А.Калинин^{1,2}, Л.А.Бардонова^{1,2}, Н.П.Судаков^{1,4}, И.В.Клименков⁴,
С.Б.Никифоров¹, А.В.Семенов⁵, Д.В.Перфильев⁵, И.В.Беспярых⁶,
С.Л.Антипина⁶, М.Гиерс¹, М.Прул¹

¹ФГБНУ Иркутский научный центр хирургии и травматологии, Иркутск, РФ; ²ФГБОУ ВО Иркутский государственный медицинский университет, Иркутск, РФ; ³ФГБОУ ДПО Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования, Иркутск, РФ; ⁴ФГБУН Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, РФ; ⁵ГБУЗ Иркутское областное бюро судебно-медицинской экспертизы, Иркутск, РФ; ⁶НУЗ Дорожная клиническая больница на станции Иркутск-Пассажирский, Иркутск, РФ; ⁷Научный центр проблем здоровья детей и репродукции человека, Иркутск, РФ; ⁸МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва, РФ

Изучена связь между диффузионным транспортом, морфологической и микроструктурной организацией внеклеточного матрикса межпозвонкового диска человека. Образцы поясничных межпозвонковых дисков без вертеброгенной патологии исследованы *ex vivo* методами диффузионно-взвешенной МРТ, гистологическими, иммуногистохимическими и электронно-микроскопическими методами. Определены особенности распределения коэффициента диффузии в различных отделах межпозвонкового диска. Значимая корреляция для каждого диска наблюдалась между значением коэффициента диффузии и клеточной плотностью в области пульпозного ядра, задних отделов фиброзного кольца, а также в замыкательной пластинке на уровне задних отделов фиброзного кольца. В тканях диска с коэффициентом диффузии пульпозного ядра менее 15×10^{-4} мм²/с помимо агрегана, коллагена I и II типов выявлены коллаген X и XI типов. Результаты исследования дополняют представления о влиянии микроструктуры и клеточного состава различных отделов межпозвонкового диска на показатели нутритивного транспорта.

Ключевые слова: диффузионно-взвешенное изображение, магнитно-резонансная томография, дегенерация, межпозвонковый диск, коллаген

Болевой синдром в спине, по данным различных исследований, встречается у 2-49% взрослого населения [5] и преимущественно связан с дегенеративными процессами в межпозвонковых дисках (МПД) [3]. МПД является самой крупной аваскулярной тканью человека и состоит из пульпозного

ядра, окруженного по бокам фиброзным кольцом, и ограничен от тел позвонков замыкательной пластинкой. Учитывая такую структуру, одной из основных причин дегенерации МПД признается нарушение его питания, осуществляемое в основном за счет диффузии [1].

Используемые традиционные методы неинвазивной диагностики МПД не в полной мере позволяют оценить его состояние на ранних стадиях дегенеративного процесса. Ранее мы разработали

способ оценки МПД с помощью диффузионно-взвешенной МРТ (ДВ-МРТ) [2]. Методика ДВ-МРТ оценивает состояние ткани МПД путем мониторинга движения свободных молекул воды на клеточном уровне. При этом степень диффузии представлена в виде измеряемого коэффициента диффузии (КД). Совокупность полученных значений КД каждого вокселя образует функциональную диффузионную карту, которая позволяет комплексно оценить функциональное состояние молекулярной диффузии МПД [4,6].

Цель данного исследования — изучить зависимость изменения КД отделов МПД от морфологического субстрата, в частности, от качественного и количественного состава межклеточного матрикса.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Недегенерированные МПД получали от умерших в возрасте 25-64 года (средний возраст — 44.7 ± 12.1 года) без вертеброгенной патологии, срок наступления смерти — не более 2 сут. Критерии исключения: любая вертеброгенная патология, включая известные травмы и перенесенные оперативные вмешательства на пояснично-крестцовом отделе позвоночника; применение химиотерапевтических препаратов; проведение радиотерапии в области позвоночника; наличие системных заболеваний соединительной ткани.

Извлеченные блок-препараты транспортировали в лабораторию в термоконтейнере при температуре 4°C , помещали в пластиковый контейнер и заливали агар-агаром в вертикальном положении с последующим исследованием на аппарате МРТ с напряженностью магнитного поля 1.5 Тл (“Siemens Magnetom Essenza”) в T1-, T2- и ДВ-режимах [2]. Для оценки степени дегенерации МПД по данным T2-взвешенных МР-изображений использована классификация [7]. Диффузионный транспорт в МПД оценивали посредством построения и количественной оценки карт КД в программе “OsiriX Lite” (“Pixmeo”).

Для морфометрического анализа под 8-кратным увеличением бинокулярной лупы “Eye Mag ProS” (“Carl Zeiss”) выделяли фрагменты ткани МПД размером 0.5 см^3 в срединной сагиттальной плоскости с сохранением целостности замыкательных пластинок: передний отдел фиброзного кольца, область пульпозного ядра и задний отдел фиброзного кольца. Фрагменты ткани фиксировали в 10% растворе формальдегида, декальцинировали в растворе муравьиной кислоты и окрашивали гематоксилином и эозином, сафранином-О (“Sigma-Aldrich”) и зеленым “прочным” (“Sigma-Aldrich”). Гистологические препараты сканировали на микро-

скопе (“Zeiss AxioVertA1”, “AxioCam 506 color”), количественную оценку проводили в программе “Fiji” (NIH) [8] с использованием модуля “Automatic Cell Counting”, плотность клеток выражали в числе клеток/ мм^3 [9].

Для иммуногистохимического анализа фрагменты ткани фиксировали 4% параформальдегидом (“Sigma-Aldrich”). Основные компоненты внеклеточного матрикса МПД определяли с помощью панели первичных IgG антител (“Abcam”): мышинные антитела к коллагену I (ab90395; 1:200), кроличьи — к коллагену II (ab34712; 1:200), мышинные — к коллагену X (ab49945; 1:200), кроличьи — к коллагену XI alpha 2 (ab196613; 1:200) и кроличьи — к аггрегану (ab186414; 1:200), которые окрашивали вторичными IgG антителами, мечеными Alexa Fluor 594 (“Abcam”), к кроличьим (ab150080) или мышинным (ab150116) антителам. Ядра окрашивали Hoechst 33342 (“Life Sciences”). Препараты, заключенные в Prolong gold (“Life Sciences”), сканировали на лазерном конфокальном микроскопе “LSM-710” (“Carl Zeiss”). Полученные Z-стеки анализировали с помощью программ “Imaris 7.2.3” (“Bitplane AG”) и “ZEN” (“Carl Zeiss”).

Для просвечивающей электронной микроскопии фрагменты МПД фиксировали в 2.5% растворе глутарового альдегида на 0.1 М фосфатном буфере (3 ч) с последующей постфиксацией в 2% OsO_4 на том же буфере (12 ч). После дегидратации образцы заливали в эпоксидную смолу, нарезали на ультрамикротоме “Ultracut R” (“Leica”) и исследовали на электронном микроскопе “Leo 906 E” (“Carl Zeiss”).

Статистическую обработку полученных результатов проводили в программах “Microsoft Excel” и “Statistica 9.0.” Количественные данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение. Для оценки значимости различий выборочных совокупностей использовали U критерий Манна—Уитни, критерий Фридмана ANOVA и W критерий Вилкоксона. Оценка связи между количественными признаками проводилась с помощью коэффициента корреляции Пирсона. Порог значимости p выбран равным 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Блок-препараты получали в среднем в течение 20.3 ± 9.9 ч после наступления смерти. Последующее морфологическое, иммуногистохимическое и электронно-микроскопическое исследование показало отсутствие значимых неспецифических посмертных изменений. По данным T2-взвешенных МР-изображений, 1 МПД имел I степень дегенерации по Pfirrmann, 7 МПД — II степень, 5 МПД —

III степень. Степень дегенерации исследованных МПД по Pfirmann на основе оценки T2-изображений имела значимую корреляцию с КД пульпозного ядра ($r=-0.69, p<0.05$). Уровень исследованных МПД, в отличие от степени дегенерации, не имел корреляции со значениями КД ($r=0.17, p=0.2; r=-0.23, p=0.15; r=-0.27, p=0.08$ для МПД L_I-L_{III}, L_{III}-L_V и L_V-L_V соответственно).

Корреляционный анализ клеточной плотности и КД в различных отделах МПД, выполненный на 8 МПД (рис. 1, таблица), выявил значимую обратную ранговую корреляцию ($r=-0.49, p<0.05$). Значитель-

ная доля в данной связи принадлежит пульпозному ядру, обладающему низкой клеточной плотностью при наиболее высоком показателе КД. При оценке задних отделов МПД наблюдалась прямая корреляция между значением КД и клеточной плотностью в области задних отделов фиброзного кольца ($r=0.84, p<0.05$), а также в замыкательной пластинке на уровне задних отделов фиброзного кольца ($r=0.86, p<0.05$). В целом сравнительный анализ показал, что исследованные отделы МПД обладают различными показателями клеточной плотности и диффузионного транспорта. Наблюдающаяся корреляция

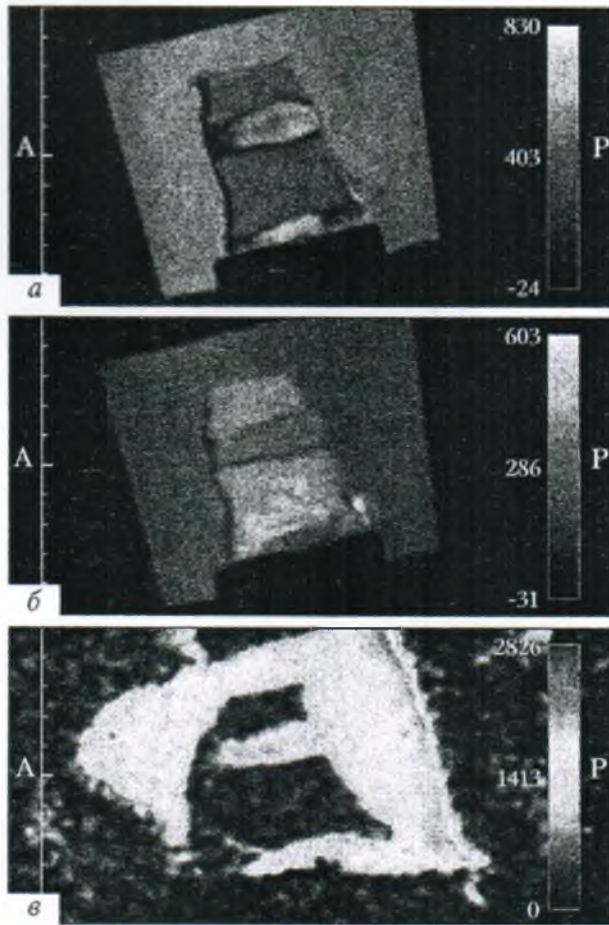
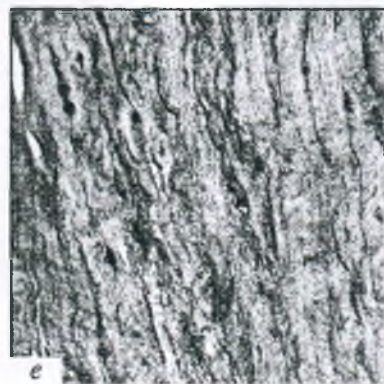
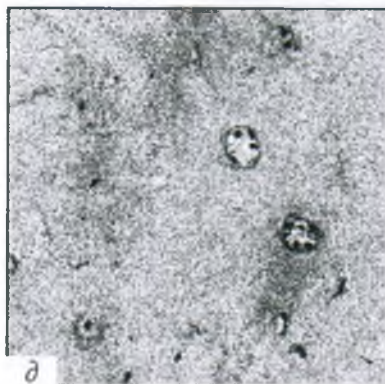
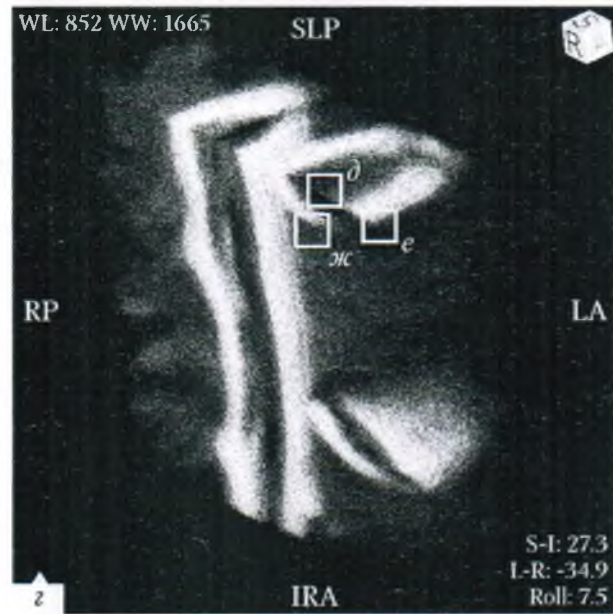


Рис. 1. Исследование диффузионного транспорта и клеточного состава МПД. T2 (а), T1 (б) взвешенные изображения МПД и плоскостная карта КД (в). Трехмерная карта диффузии (з) показывает неравномерность распределения КД по МПД (костные структуры не визуализируются). д, е, ж — гистологическая картина области пульпозного ядра, фиброзного кольца и замыкательной пластинки соответственно; окрашивание гематоксилином и эозином.



Значения КД и количество клеток в разных отделах МПД ($n=8$; $M \pm SD$)

Показатель	ПОФК	ПЯ	ЗОФК	p (ПОФК-ПЯ)	p (ПОФК-ЗОФК)	p (ЗОФК-ПЯ)
Уровень центра МПД						
КД	874±177	1734±193	1343±318	0.01	0.02	0.049
Количество клеток	2342±748	1245±468	1888±423	<0.01	0.07	<0.01
Уровень замыкательной пластинки МПД						
КД	820±274	1153±259	1023±315	0.01	0.16	0.32
Количество клеток	2244±691	2551±378	3346±750	0.02	<0.01	0.04

Примечание. ПОФК — передние отделы фиброзного кольца; ПЯ — пульпозное ядро; ЗОФК — задние отделы фиброзного кольца.

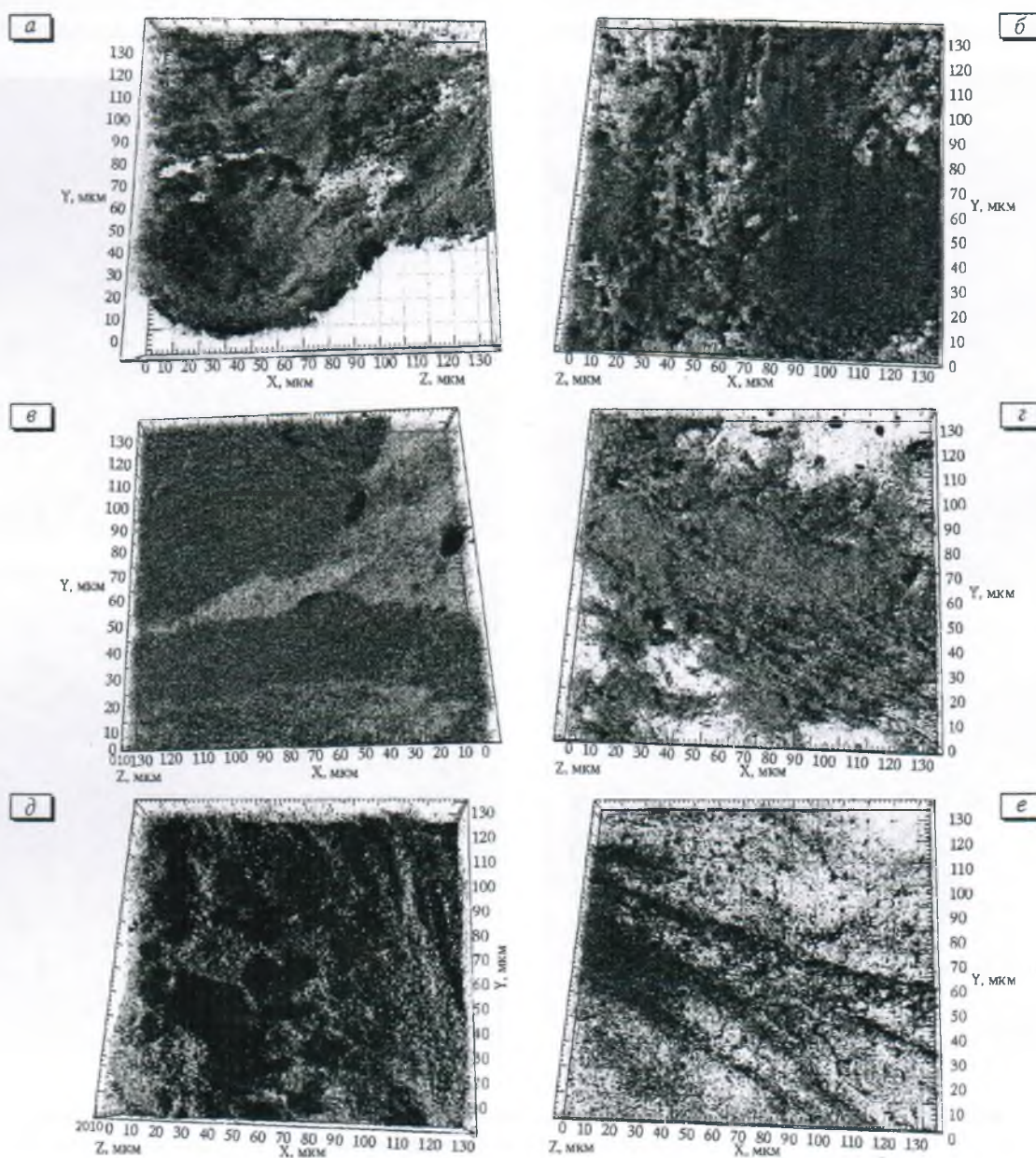


Рис. 2. Трехмерная структура распределения агрекана и коллагена I и II типа в МПД. Иммуногистохимическое окрашивание на агрекан (а, б), коллаген I (в, г), коллаген II (д, е).

умеренной силы позволяет заключить, что клеточная плотность вносит различный по степени вклад в измеряемый КД в зависимости от отделов МПД.

Конфокальная микроскопия позволила изучить основные компоненты внеклеточного матрикса в различных отделах МПД: агрекан и коллаген I и II типов (рис. 2, а-е). В МПД с высоким показателем диффузии (среднее КД пульпозного ядра $1784 \pm 193 \times 10^{-6} \text{ мм}^2/\text{с}$) трехмерная структура компонентов экстрацеллюлярного матрикса имела в основном диффузную, реже — упорядоченную волокнистую форму, ориентированную в разном порядке. При этом в исследованных образцах не выявлен коллаген X и XI типов, что соответствует антигенному спектру матрикса нормального МПД. Преобладание агреканов, имеющих диф-

фузное, глыбчатое распределение в пульпозном ядре по сравнению с фиброзным кольцом, обуславливает различия диффузионного транспорта. В 2 образцах МПД с начальной степенью дегенерации (III степень по Pfirmann, КД $1215 \pm 345 \times 10^{-6} \text{ мм}^2/\text{с}$) определялись коллаген X и XI типов, хондроциты с признаками дистрофии.

МПД со значением КД $> 1500 \times 10^{-6} \text{ мм}^2$ ($n=3$) были исследованы методом трансмиссионной электронной микроскопии для оценки их ультрамикроструктуры. Это позволило определить в ткани МПД отдельные, хорошо сохраненные хондроциты, среди которых располагались многочисленные, разнообразно ориентированные нити коллагена с разной степенью структурной организации. Плотные пучки микрофибрилл толщиной 5-7 нм имели длину от 0.1

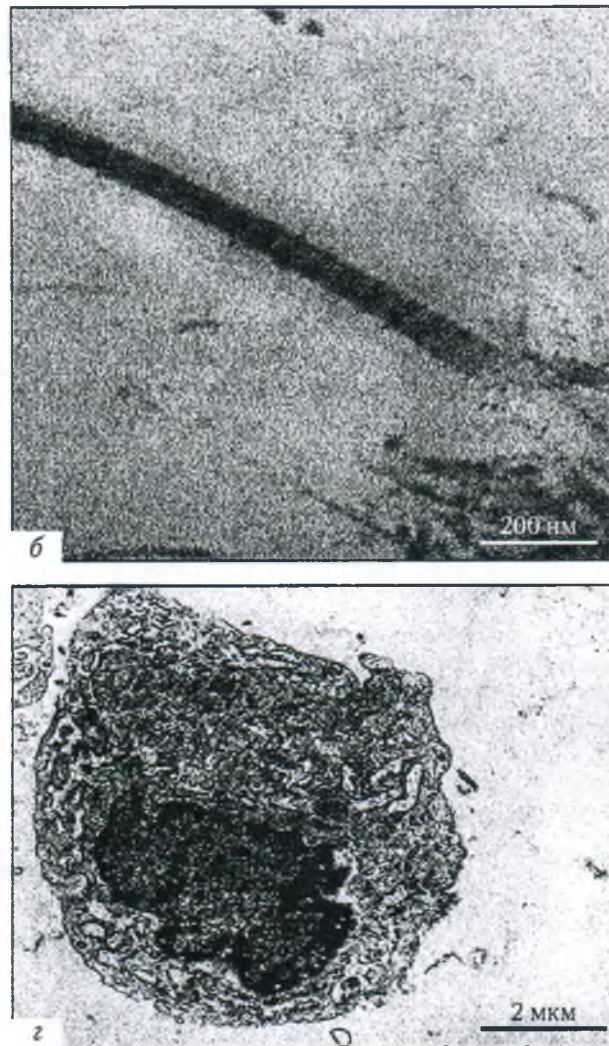
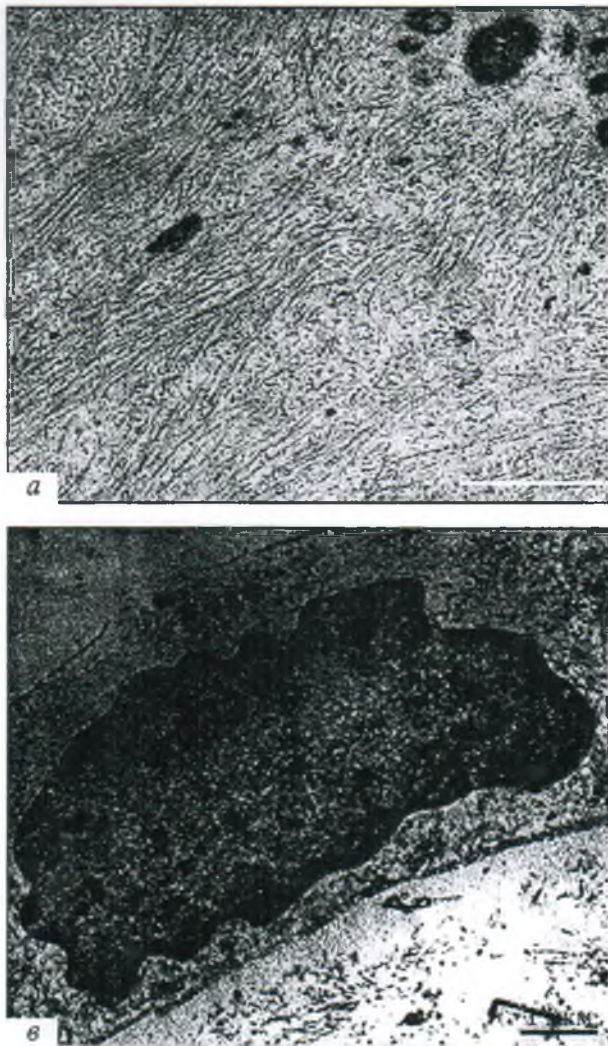


Рис. 3. Визуализация ультраструктуры области фиброзного кольца МПД с помощью просвечивающей электронной микроскопии. Определяются разнонаправленные слои пучков коллагеновых волокон, одного из основных структурных компонентов внеклеточного матрикса фиброзного кольца МПД (а, б), отдельная фибрилла коллагена II (б), ультраструктура хондроцитов (в, г).

до 1.5 мкм (рис. 3, а-г). Менее многочисленные высокополимеризованные формы коллагена представлены фибриллами толщиной 40-70 нм и длиной 0.5-2.5 мкм.

Диффузионный транспорт в области пульпозного ядра, задних отделов фиброзного кольца, а также в области замыкательной пластинки на уровне задних отделов фиброзного кольца МПД в значимой степени ассоциирован с клеточной плотностью. Анализ областей пульпозного ядра и фиброзного кольца МПД методами лазерной конфокальной и трансмиссионной микроскопии подтвердил взаимосвязь значения КД и состояния МПД: при значении КД пульпозного ядра менее 15×10^{-4} мм²/с в ткани МПД определялись морфологические и иммуногистохимические признаки дегенерации.

Результаты проведенного исследования дополняют полученные ранее в клинических [2,6] и экспериментальных работах [10] представления об изменении диффузионного транспорта при дегенерации МПД. Применение метода ДВ-МРТ с определением КД позволило объективно охарактеризовать диффузию в МПД на тканевом уровне, которая коррелировала с ранними морфологическими и ультраструктурными признаками дегенеративно-дистрофического поражения МПД. Это подтверждает значительный потенциал ДВ-МРТ для ранней прецизионной оценки функциональных и структурных изменений межклеточного матрикса МПД.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 15-15-30037).

ЛИТЕРАТУРА

1. Belykh E., Giers M., Bardonova L., Theodore N., Preul M., Byvaltsev V. The Role of bone morphogenetic proteins 2, 7, and 14 in approaches for intervertebral disk restoration // *World Neurosurg.* 2015. Vol. 84, N 4. P. 871-873.
2. Byvaltsev V.A., Kalinin A.A., Stepanov I.A., Shashkov K.V. Diffusion-weighted magnetic resonance tomography in the diagnosis of intervertebral disk degeneration // *Biomed. Engineering.* 2016. Vol. 50, N 4. P. 253-256.
3. Giers M.B., Munter B.T., Eyster K.J., Ide G.D., Newcomb AGUS, Lehrman J.N., Belykh E., Byvaltsev V.A., Kelly B.P., Preul M.C., Theodore N. Biomechanical and endplate effects on nutrient transport in the intervertebral disc // *World Neurosurg.* 2017. Vol. 99. P. 395-402.
4. Kealey S.M., Aho T., DeLong D., Barboriak D.P., Provenzale J.M., Eastwood J.D. Assessment of apparent diffusion coefficient in normal and degenerated intervertebral lumbar disks: initial experience // *Radiology.* 2005. Vol. 235, N 2. P. 569-574.
5. Manek N.J., MacGregor A.J. Epidemiology of back disorders: prevalence, risk factors, and prognosis // *Curr. Opin. Rheumatol.* 2005. Vol. 17, N 2. P. 134-140.
6. Niinimäki J., Korkiakoski A., Ojala O., Karppinen J., Ruohonen J., Haapea M., Korpelainen R., Natri A., Tervonen O. Association between visual degeneration of intervertebral discs and the apparent diffusion coefficient // *Magn. Reson. Imaging.* 2009. Vol. 27, N 5. P. 641-647.
7. Pfirrmann C.W., Metzdorf A., Zanetti M., Hodler J., Boos N. Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration // *Spine (Phila Pa 1976).* 2001. Vol. 26, N 17. P. 1873-1878.
8. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J.Y., White D.J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis // *Nat. Methods.* 2012. Vol. 9, N 7. P. 676-682.
9. Tomaszewski K.A., Walocha J.A., Mizia E., Giadysz T., Giowacki R., Tomaszewska R. Age- and degeneration-related variations in cell density and glycosaminoglycan content in the human cervical intervertebral disc and its endplates // *Pol. J. Pathol.* 2015. Vol. 66, N 3. P. 296-309.
10. Wang A.M., Cao P., Yee A., Chan D., Wu E.X. Detection of extracellular matrix degradation in intervertebral disc degeneration by diffusion magnetic resonance spectroscopy // *Magn. Reson. Med.* 2015. Vol. 73, N 5. P. 1703-1712.

Получено 03.03.17