

Межрегиональная общественная организация
«Ассоциация хирургов-вертебрологов» России (RASS)
Министерство здравоохранения Иркутской области
Иркутский научный центр хирургии и травматологии
Иркутская государственная медицинская академия
последипломного образования
Иркутский государственный медицинский университет
Департамент здравоохранения ОАО «РЖД»



ИРКУТСКИЙ
НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
ФГБНУ
ХИРУРГИИ
И ТРАВМАТОЛОГИИ



СБОРНИК МАТЕРИАЛОВ

VIII съезд
межрегиональной ассоциации
хирургов-вертебрологов России
с международным участием

**ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ
АСПЕКТЫ ПОРАЖЕНИЙ
И ПОВРЕЖДЕНИЙ ПОЗВОНОЧНИКА**

IV съезд
дорожных нейрохирургов

АНАЛИЗ ДИФфуЗИОННОГО ТРАНСПОРТА И УЛЬТРАМИКРОСТРУКТУРЫ МЕЖПОЗВОНКОВОГО ДИСКА

СТЕПАНОВ И.А.¹, БАРДОНОВА Л.А.¹, БЕЛЫХ Е.Г.^{1,2}, КАЛИНИН А.А.^{1,2,3},
БЫВАЛЬЦЕВ В.А.^{1,2,3,4}

¹ Иркутский государственный медицинский университет, г. Иркутск

² Иркутский научный центр хирургии и травматологии, г. Иркутск

³ Дорожная клиническая больница на станции Иркутск-Пассажирский ОАО «РЖД», г. Иркутск

⁴ Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования, г. Иркутск

Изучена связь между диффузионным транспортом, морфологической и ультрамикроструктурной организацией внеклеточного матрикса межпозвонкового диска человека (МПД). Образцы условно нормальных (1-2-я степень по Pfirmann) трупных МПД исследованы ex vivo методами диффузионно-взвешенной магнитно-резонансной томографии, гистологическими, иммуногистохимическими и электронно-микроскопическими методами. Определены особенности распределения коэффициента диффузии в различных отделах МПД.

ANALYSIS OF DIFFUSION TRANSPORT AND ULTRAMICROSTRUCTURE OF INTERVERTEBRAL DISK

STEPANOV I.A.¹, BARDONOVA L.A.¹, BELYKH E.G.^{1,2}, KALININ A.A.^{1,2,3},
BYVALTSEV V.A.^{1,2,3,4}

¹ Irkutsk State Medical University, Irkutsk

² Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology, Irkutsk

³ Railway Clinical Hospital, Irkutsk

⁴ Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education, Irkutsk

The association between diffusion transport, morphological and microstructural organization of the intervertebral disk (IVD) extracellular matrix has been studied. «Normal» cadaveric intervertebral disc specimens (grade 1-2 by Pfirmann scale) were studied ex vivo using diffusion-weighted magnetic resonance imaging, histological, immunohistochemical methods and electron microscopy. We revealed patterns of diffusion coefficient distribution through various regions of IVD.

ВВЕДЕНИЕ

Болевой синдром в спине – это одно из наиболее распространенных расстройств здоровья в индустриально развитых странах мира, которое встречается по данным различных исследований у 2-49 % взрослого населения [1]. Болевой синдром зачастую связан с дегенеративным заболеванием межпозвонковых дисков (МПД) [5]. МПД является самой крупной аваскулярной тканью человека и состоит из пульпозного ядра, окруженного по бокам фиброзным кольцом и отграниченного от тел позвонков замыкательной пластинкой. Учитывая такую структуру, одной из основных причин дегенерации МПД признается нарушение его питания, осуществляемое в основном за счет диффузии [3]. Используемые методы неинвазивной диагностики МПД с помощью традиционных методик не в полной мере позволяют оценить состояние МПД на ранних стадиях дегенеративного процесса. Ранее мы разработали способ оценки МПД с помощью диффузионно-взвешенной магнитно-резонансной томографии (ДВ МРТ) [2, 4]. 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).

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить зависимость изменения КД различных отделов МПД от морфологического субстрата, в частности, от качественного и количественного состава межклеточного матрикса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на условно нормальных поясничных МПД (1-2-я степень дегенерации по Pfirmann) L_{II}-L_{III} (n = 4), L_{III}-L_{IV} (n = 4), L_{IV}-L_V (n = 5) трупов без вертеброгенной патологии (возраст от 25 до 64 лет, среднее 44,7 ± 12,1 года), забранных в течение 20,3 ± 9,9 часов после наступления смерти. Извлеченные блок-препараты транспортировали в лабораторию в термоконтейнере при температуре +4 °С, помещали в пластиковый контейнер и заливали агар-агаром в вертикальном положении с последующим исследованием на аппарате МРТ. Построение и количественную оценку карт КД осуществляли в программе OsiriX Lite (Pixmeo, Швейцария). Для морфометрического анализа под 8× увеличением бинокулярной лупы Eye Mag ProS (Carl Zeiss AG, Германия) выделяли фрагменты ткани МПД размером 0,5 см³ в срединной сагитальной плоскости с сохранением целостности замыкательных пластинок (ЗП): передний отдел (ПО) фиброзного кольца (ФК), область пульпозного ядра (ПЯ) и задний отдел (ЗО) ФК. Полученные участки

МПД изучали путем конфокальной и электронной микроскопий.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2010 и Statistica 9.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Степень дегенерации исследованных МПД по Pfirrmann 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 $L_{II}-L_{III}, L_{III}-L_{IV}$ и $L_{V}-L_{VI}$ соответственно). Средние значения КД для ПЯ, переднего и заднего отделов ФК МПД (2-я степень по Pfirrmann) составили соответственно $1784 \pm 193 \times 10^{-6}, 874 \pm 177 \times 10^{-6}$ и $1343 \pm 318 \times 10^{-6} \text{ мм}^2/\text{с}$ ($p_{ANOVA} < 0,01$).

Анализ связи между значением КД и клеточной плотностью различных отделов МПД показал значимую обратную ранговую корреляцию ($r = -0,49, p < 0,05$). Значительный вес в данную связь вносит ПЯ, обладающее низкой клеточной плотностью при наиболее высоком показателе КД ($1755,7 \times 10^{-6} \text{ мм}^2/\text{с}$). При оценке задних отделов МПД наблюдалась прямая корреляция между значением КД и клеточной плотностью в области задних отделов ФК ($r = 0,84, p < 0,05$), а также в замыкательной пластинке на уровне задних отделов ФК ($r = 0,86, p < 0,05$). Конфокальная микроскопия позволила изучить основные компоненты внеклеточного матрикса в различных отделах МПД: агрекан и коллаген I и II типов. В МПД с высоким показателем диффузии (КД ПЯ $1784 \pm 193 \times 10^{-6} \text{ мм}^2/\text{с}$) трёхмерная структура компонентов экстрацеллюлярного матрикса имела в основном диффузную, реже упорядоченную волокнистую форму, ориентированную в различном порядке. При этом в исследованных образцах не выявлены коллагены X и XI типов, что соответствует антигенному спектру матрикса нормального МПД. Преобладание агреканов, имеющих диффузное, глыбчатое распределение в ПЯ по сравнению с ФК, обуславливает различия диффузионного транспорта. В образцах МПД с начальной степенью дегенерации (3-я степень по Pfirrmann, КД $1215 \pm 345 \times 10^{-6} \text{ мм}^2/\text{с}, n = 2$) определялись коллагены X и XI типов, хондроциты с признаками дистрофии.

Часть МПД со значением КД выше $1500 \times 10^{-6} \text{ мм}^2$ ($n = 3$) была исследована методом трансмиссион-

ной электронной микроскопии с целью оценки ультрамикроструктуры МПД. Это позволило определить в ткани МПД отдельные, хорошо сохранённые 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 до 1,5 мкм. Менее многочисленные высокополимеризованные формы коллагена представлены фибриллами толщиной 40–70 нм и длиной 0,5–2,5 мкм.

ВЫВОДЫ

Выявлено, что значение КД в области ПЯ, задних отделов ФК, а также в области замыкательной пластинки на уровне задних отделов ФК МПД в значимой степени ассоциировано с клеточной плотностью. Анализ областей ПЯ и ФК МПД методами лазерной конфокальной и трансмиссионной микроскопии подтвердил взаимосвязь между значением КД и состоянием МПД: при снижении значения КД ПЯ ниже $15 \times 10^{-4} \text{ мм}^2/\text{с}$ в ткани МПД определялись морфологические и иммуногистохимические признаки дегенерации.

Исследование было поддержано грантом Российского научного Фонда 15-15-30037.

ЛИТЕРАТУРА

1. Диффузионно-взвешенная магнитно-резонансная томография в диагностике дегенерации межпозвоноковых дисков пояснично-крестцового отдела позвоночника / В. А. Бывальцев, И. А. Степанов, А. А. Калинин, Е. Г. Белых // Вестник рентгенологии и радиологии. 2016. Т. 97. № 6. С. 357–364.
2. Biomechanical and endplate effects on nutrient transport in the intervertebral disc / M. B. Giers, B. T. Munter, K. J. Eyster, G. D. Ide et al. // World Neurosurgery. 2017. Vol. 16, N 1. P. 78–87.
3. Diffusion-Weighted Magnetic Resonance Tomography in the Diagnosis of Intervertebral Disk Degeneration / V. A. Byvaltsev, I. A. Stepanov, A. A. Kalinin, K. V. Shashkov // Biomedical Engineering. 2016. Vol. 50, N 4. P. 253–256.
4. 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.
5. The role of bone morphogenetic proteins 2, 7, and 14 in approaches for intervertebral disk restoration / E. Belykh, M. Giers, L. Bardanova, N. Theodore et al. // World Neurosurg. 2015. Vol. 84, N 4. P. 871–873.