

УДК 616.711-007.5-089-092.9:599.323.4

Морфологические особенности тканей в зоне межтелового спондилодеза при экспериментальном моделировании у крыс

Д. Е. Петренко, Н. А. Ашукина, Г. В. Иванов, А. А. Мезенцев

ГУ «Институт патологии позвоночника и суставов им. проф. М. И. Ситенко НАМН Украины», Харьков

The article describes results of an experimental study of morphological peculiarities in the area of interbody fusion in the conditions of the fixing of vertebral bodies with a plate after removal of an intervertebral disk. The experiment was made on the caudal spine of 6 laboratory rats. It was revealed that in order to achieve interbody fusion it was necessary to perform total discectomy in combination with resection of the vertebral end plates.

У дослідженні представлені результати вивчення в експерименті морфологічних особливостей зони спондилодезу в умовах фіксації тіл хребців пластиною після видалення міжхребцевого диска. Експеримент проведено на хвостовому відділі хребта 6 лабораторних щурів. Встановлено, що для досягнення міжтілового спондилодезу необхідно виконувати тотальну дискектомію в поєднанні з резекцією замикальної пластинки тіл хребців.

Ключевые слова: экспериментальное моделирование, крысы, спондилодез, гистология, сколиоз, инструментация позвоночника.

Введение

Основным хирургическим методом лечения сколиотических деформаций позвоночника являются разные виды спондилодеза [1]. Изучению его ближайших и отдаленных результатов и разработке новых технологий посвящено множество фундаментальных и клинических исследований. Однако, несмотря на усовершенствование методов хирургического лечения сколиоза, прогресс биомеханики и разработку новых имплантатов, остаются пациенты, у которых развивается псевдоартроз (1–5 %) или наблюдается потеря хирургической коррекции позвоночника (12–23 %) после корригирующих операций на его вентральных отделах [2]. Механизмы развития этих осложнений и структурно-функциональные изменения в позвоночнике в таких условиях на сегодня недостаточно раскрыты и требуют углубленного изучения.

Одним из подходов к решению проблемы является проведение экспериментальных исследований с помощью методов гистологии, которые позволяют объективно оценить структурные изменения в позвоночных двигательных сегментах на тканевом и клеточном уровнях в условиях моделируемой ситуации, что не всегда возможно в клинической практике [3]. Хвостовой отдел позвоночника крысы

используют для оценки терапевтического эффекта различных фармакологических агентов, динамических имплантатов и биомеханических тестов, а также изучения дегенеративных изменений в межпозвонковом диске [4–6]. В связи с этим мы сочли возможным остановиться на данной модели.

Цель исследования: изучить в эксперименте на крысах морфологические особенности зоны межтелового спондилодеза в условиях фиксации смежных тел позвонков пластиной после удаления межпозвонкового диска.

Материал и методы

Эксперимент проведен на 6 белых лабораторных крысах (возраст 5 мес, масса тела от 430 до 500 г) популяции экспериментально-биологической клиники ИППС им. проф. М. И. Ситенко НАМН Украины. Объектом хирургического вмешательства был избран хвостовой отдел позвоночника в связи с минимальным повреждением окружающих тканей, незначительной кровопотерей и минимальным нарушением нормальных физиологических функций животного [7].

После проведения внутривенного обезболивания (аминазин — 10 мг/кг, кетамин — 50 мг/кг) в условиях асептики в положении животного на животе

разрезали кожу по срединной линии хвоста над планируемым уровнем спондилодеза. Послойно рассекали мягкие ткани, выделяли межпозвоночный диск и два прилежащих к нему тела позвонка. Тупым и острым путем удаляли фиброзное кольцо и пульпозное ядро межпозвоночного диска, а также хрящевые замыкательные пластинки. Смежные позвонки фиксировали при помощи металлической пластины. После аппликации антибактериального препарата рану послойно зашивали. В послеоперационном периоде наблюдали за общим состоянием животных и состоянием послеоперационных ран. По клиническим показаниям выполняли перевязки и при необходимости вводили кардиотонические препараты.

Рентгенологический контроль проводили непосредственно после хирургического вмешательства, а также через 2 и 4 недели (рис. 1). Животных выводили из эксперимента посредством передозировки внутривенных наркотических препаратов через 4 недели после хирургического вмешательства.

Протокол экспериментов был утвержден комиссией по биоэтике Института в соответствии с правилами «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях» и Законом Украины «Про захист тварин від жорстокого поводження» [8, 9].

Для гистологического исследования выделяли оперированный сегмент хвостового отдела позвоночника, фиксировали в 10 % нейтральном формалине, декальцинировали в 4 % азотной кислоте, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, затем в спирте с эфиром (1:1) и заключали в целлоидин [10]. Изготовленные срезы окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван-Гизон. Гистопрепараты анализировали под световым микроскопом «Primo Star» (Carl Zeiss), для фотографирования использовали цифровую камеру «Canon Power Short A510».

Результаты и их обсуждение

Клинические наблюдения не выявили изменения активности у животных и потребления ими пищи после операции в течение всего эксперимента. Инфекционных осложнений не зафиксировано.

Рентгенологически через 2 и 4 недели после хирургического вмешательства конструкции оставались стабильными, что было подтверждено и при непосредственном изучении зоны фиксации тел позвонков.

При морфологическом исследовании через 4 недели после хирургического вмешательства на гис-

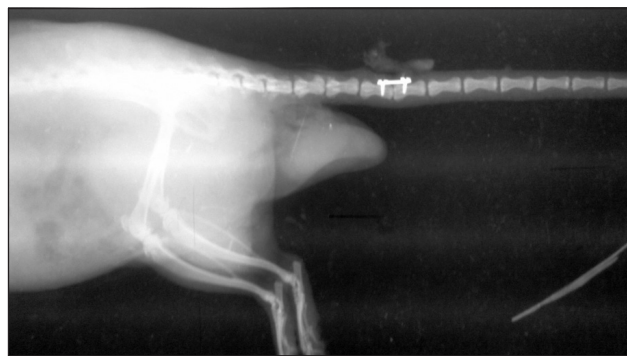


Рис. 1. Фото. Рентгенограмма хвостового отдела позвоночника крысы с фиксированным пластиной сегментом через 4 недели после хирургического вмешательства

топрепаратах в области межтелового промежутка четко определяли зону травматического повреждения, в которой находились фрагменты разрушенного межпозвоночного диска (МПД). Как правило, со стороны, противоположной фиксирующей пластине, т. е. по вентральной стороне, располагались пластины фиброзного кольца с явлениями деструкции и нарушенной гистоархитектоникой: разволокнением пучков коллагеновых волокон, растрескиванием, неравномерным распределением фиброхондроцитов округлой или овальной формы. Внутренние отделы фиброзного кольца были представлены эозинофильным матриксом без клеток. Студенистое ядро у всех животных было удалено в результате операции. Также в значительно суженном, особенно со стороны крепления пластины, межтеловом промежутке обнаруживались гомогенные эозинофильные массы.

Фрагменты поврежденного МПД являлись, на наш взгляд, одной из причин, препятствующей сращению между телами позвонков. Со стороны мягких тканей, расположенных между наружной поверхностью тел позвонков и пластиной, в деструктивный матрикс поврежденного МПД врастали клетки фибробластического дифферона с крупными гиперхромными ядрами, окруженными обильной цитоплазмой, и единичные кровеносные капилляры, формируя предпосылки для образования соединительной ткани [11].

Согласно данным исследований последних лет хрящевая замыкательная пластинка у крыс имеет особенности строения, отличающие ее от таковой у человека. Так, А. J. Hayes и соавт. [12] показали, что хрящевая замыкательная пластинка у крыс представлена несколькими слоями коллагеновых волокон, между которыми располагаются фиброхондроциты, и представляет, таким образом, волокнистый, а не гиалиновый хрящ. Однако, несмотря на структурные отличия, основными функциями хрящевой замыкательной пластины у крыс остаются

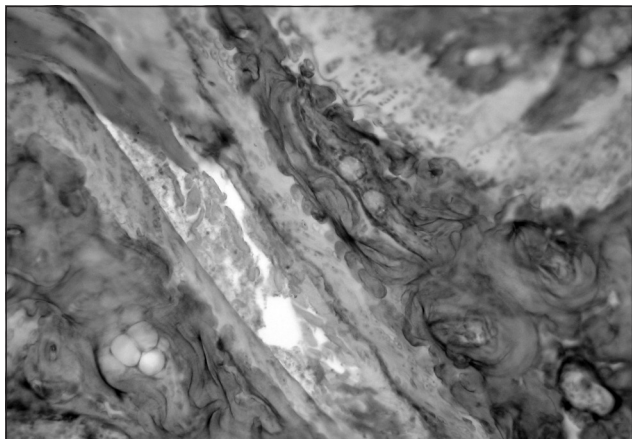


Рис. 2. Микрофото. Зона травматического повреждения. Некротические массы в суженном межтеловом промежутке. Гематоксилин и эозин. Ув. 100

ся отграничение тел смежных позвонков от тканей межпозвоночного диска и обеспечение поступления в него питательных веществ.

В нашем исследовании при гистологической оценке хрящевых замыкательных пластинок после выполнения хирургического вмешательства зафиксированы три ситуации. В первой хрящевые замыкательные пластинки сохранялись на обоих телах позвонков в виде узкой полоски и характеризовались выраженными деструктивными изменениями: в слабо эозинофильном матриксе располагались фиброхондроциты в состоянии некроза и некробиоза, значительное количество клеток-теней. Хрящевые замыкательные пластинки играли роль барьера, препятствующего проникновению в область травматического повреждения из субхондральной кости клеток и кровеносных капилляров, необходимых для регенераторного процесса [13, 14]. В суженном межтеловом промежутке находились некротические массы без признаков реорганизации (рис. 2).

Во втором случае хрящевая замыкательная пластинка с описанной выше структурой отграничивала одно из тел позвонков от зоны повреждения. На втором она была удалена в результате хирургического вмешательства практически на всем протяжении (рис. 3, а). В третьей ситуации отсутствовали хрящевые замыкательные пластинки на обоих телах позвонков, прилежащих к травмированному МПД, за исключением участка, где были сохранены фрагменты фиброзного кольца (рис. 3, б).

Если хрящевая замыкательная пластинка была разрушена в результате травматического вмешательства, в субхондральной кости отмечали перестройку и активизацию остеорепаративного процесса. Это проявлялось образованием фиброретикулярной ткани остеогенного типа с большим количеством кровеносных капилляров и фибро- и остеобластов, содержащих крупные гиперхромные ядра и базофильную цитоплазму, что свидетельствует о биосинтезе компонентов матрикса. На участках в ней формировались молодые костные трабекулы, содержащие остециты, расположенные в лакунах. Матрикс молодых костных трабекул окрашивался базофильно (рис. 4, а). Обращало на себя внимание большое количество многоядерных клеток, относящихся к макрофагической системе. Они располагались на деструктивно измененных фрагментах диска (рис. 4, б), участвуя путем фагоцитоза в очищении зоны травматического повреждения от некротических масс. На костных фрагментах находились остеокласты, что свидетельствует об их резорбции. Отмечали небольшие участки хондроиды в краевых отделах. Однако, по всей видимости, функциональных способностей многоядерных клеток оказалось недостаточно для ликвидации удаленных фрагментов МПД, препятствующих формированию костного сращения между телами позвонков.

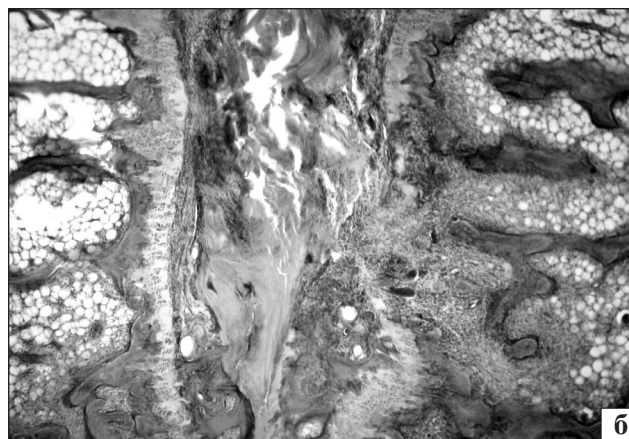
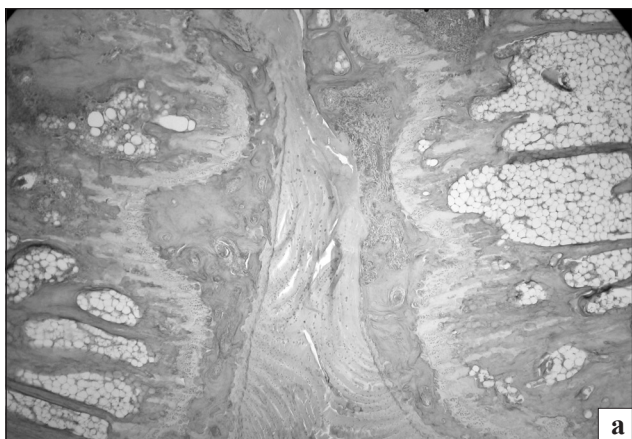


Рис. 3. Микрофото. Зона травматического повреждения. Фрагменты фиброзного кольца в суженном межтеловом промежутке. Хрящевая замыкательная пластинка разрушена на одном (а) или обоих (б) телах позвонков. Гематоксилин и эозин. Ув. 40

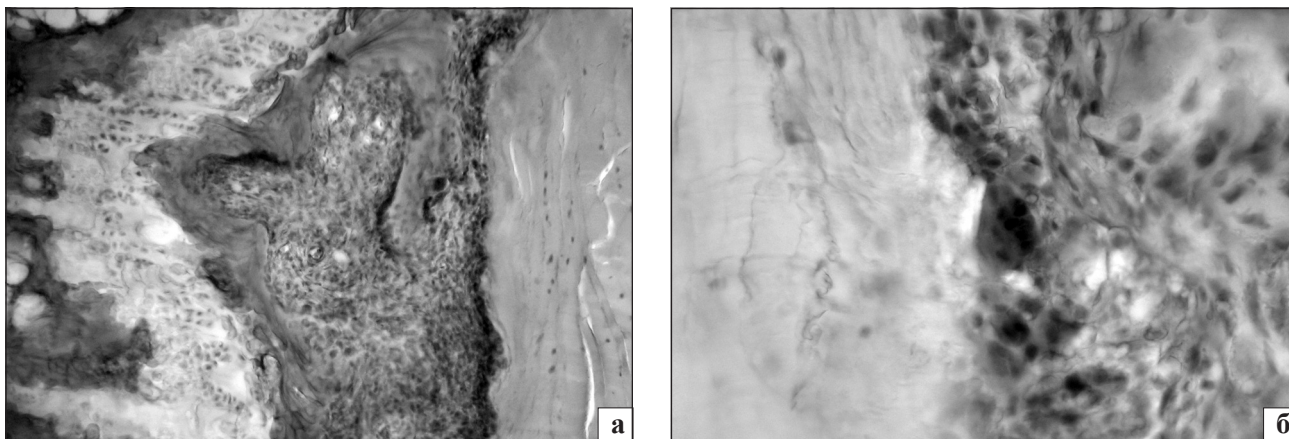


Рис. 4. Микрофото. Зона травматического повреждения. Хрящевая замыкательная пластинка разрушена. Формирование фибро-ретикулярной ткани остеогенного типа, ув. 100 (а). Клетки макрофагической системы расположены на фрагментах фиброзного кольца, ув. 400 (б). Гематоксилин и эозин

В тех случаях, когда хрящевая замыкательная пластинка частично сохранялась, субхондральная кость была с явлениями реактивной перестройки, которая проявлялась формированием ретикуло-фиброзной ткани в межтрабекулярных пространствах, наслоением остеоида на костных трабекулах.

У животных эпифизарный хрящ в обоих телах позвонков был без особенностей и по строению соответствовал возрастной норме.

По наружной поверхности тел позвонков со стороны пластины отмечен активный остеогенез с формированием мелкопетлистых костных трабекул (рис. 5) и очаги хондроида. Однако вновь образованная костная ткань не перекрывала зону травматического повреждения.

Место расположения пластины визуализировалось четко. Вокруг нее формировалась широкая соединительнотканная капсула.

Между пластиной и позвоночным двигательным сегментом зафиксировано разрастание грануляци-

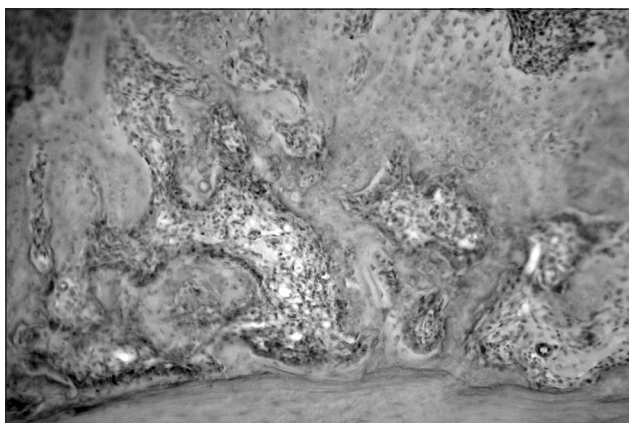


Рис. 5. Микрофото. Периостальный остеогенез. Формирование мелкопетлистых костных трабекул. Гематоксилин и эозин. Ув. 100

онной ткани разной степени зрелости, содержащей большое количество кровеносных капилляров разного диаметра и имеющей высокую плотность клеток (фибробласты, лимфоциты, единичные сегментоядерные лейкоциты).

Выводы

В результате проведенного хирургического вмешательства — удаления межпозвонкового диска и фиксации позвоночного двигательного сегмента хвостового отдела крысы пластиной — не удалось достичь прямого сращения тел позвонков на сроке до 4 недель. Барьером для формирования костной ткани в межтеловом промежутке служили деструктивно измененные фрагменты межпозвонкового диска и хрящевые замыкательные пластинки. Препятствием для проникновения в зону травматического повреждения малодифференцированных стромальных клеток и кровеносных капилляров из вторичной спонгиозы был эпифизарный хрящ. Обнаруженные репаративные проявления со стороны субхондральной кости и периоста оказались недостаточными для формирования костного сращения в течение срока наблюдения. В участках разрушения субхондральной пластинки отмечали проявления остеорепаративного процесса.

Полученные данные свидетельствуют о том, что для достижения межтелового спондилодеза необходимо осуществлять тотальную дискэктомию в сочетании с резекцией замыкательной пластины тел позвонков.

Список литературы

1. Мезенцев А. А. Хирургическое лечение сколиотических деформаций позвоночника: дис... докт. мед. наук: 14.01.21 / Мезенцев Андрей Алексеевич. — Х., 2009. — 372 с.
2. Complication in spinal fusion for adolescent idiopathic scoliosis

- sis in the new millennium. A report of the Scoliosis Research Society Morbidity and Mortality Committee / J. D. Coe, V. Arlet, W. Donaldson, S. Berven // *Spine*. — 2006. — Vol. 31. — P. 345–349.
3. Малышкина С. В. Экспериментальное моделирование в научных исследованиях Института патологии позвоночника и суставов им. проф. М. И. Ситенко / С. В. Малышкина // *Ортопедия, травматология и протезирование*. — 2007. — № 4. — P. 5–16.
 4. Федак В. І. Дегенеративні захворювання суміжних (до оперованого) сегментів хребта (експериментально-клінічне дослідження): автореф... дис. канд. мед. наук: спец. 14.01.21 «Травматологія та ортопедія» / Федак Володимир Іванович. — Х., 2010. — 20 с.
 5. Espinoza Orias A. A. Rat disc torsional mechanics: effect of lumbar and caudal levels and axial compression load / A. A. Espinoza Orias, N. R. Malhotra, D. M. Elliott // *Spine J*. — 2009. — Vol. 9. — P. 204–209.
 6. In vivo remodeling of intervertebral discs in response to short- and long-term dynamic compression / K. Wuertz, K. Godburn, J. J. MacLean et al. // *J. Orthop. Res.* — 2009. — Vol. 27. — P. 1235–1242.
 7. Are animal models useful for studying human disc disorders/ degeneration? / M. Alini, S. M. Eisenstein, K. Ito et al. // *Eur. Spine J*. — 2008. — Vol. 17. — P. 2–19.
 8. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. Страсбург, 18 березня 1986 року: офіційний переклад [Електронний ресурс] / Верховна Рада України. — Офіц. веб-сайт. — (Міжнародний документ Ради Європи). — Режим доступу до документа: http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=994_137
 9. Про захист тварин від жорстокого поводження: Закон України № 3447-IV від 21.02.2006 р. [Електронний ресурс] / Верховна Рада України. — Офіц. веб-сайт. — Режим доступу до документа: <http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=3447-15>.
 10. Саркисов Д. С. Микроскопическая техника / Д. С. Саркисов, Ю. Л. Перова. — М.: Медицина, 1996. — 542 с.
 11. Шехтер А. Б. Воспаление, адаптивная регенерация и дис-регенерация (анализ межклеточных взаимодействий) / А. Б. Шехтер, В. В. Серов // *Архив патологии* — 1991. — Т. 53, № 7. — С. 7–14.
 12. Collagen fibrillogenesis in the development of the annulus fibrosus of the intervertebral disc / A. J. Hayes, M. D. Isaacs, C. Hughes et al. // *Eur. Cell and Materials*. — 2011. — Vol. 22. — P. 226–241.
 13. Morphometric analysis of chondrocyte apoptosis and degeneration of vertebral cartilage endplate in rats / W. Jing-ping, Z. Bin, D. Lei et al. // *Fudan. Univ. J. Med. Sci.* — 2010. — Vol. 37, № 2. — P. 140–145.
 14. Данилов Р. К. Экспериментально-гистологический анализ гистогенеза и регенерации тканей (некоторые итоги XX в. и перспективы дальнейших исследований) / Р. К. Данилов, Т. Г. Боровая, Н. Д. Клочков // *Морфология*. — 2000. — Т. 117, № 4. — С. 7–16.
 15. Лаврищева Г. И. Морфологические и клинические аспекты репаративной регенерации опорных органов и тканей / Г. И. Лаврищева, Г. А. Оноприенко. — М.: Медицина. — 1996. — 208 с.

Статья поступила в редакцию 01.10.2012