

УДК: 616.345.566-344.52:616.567-957.345-02
© Шимон М.В., Дєдх Н.В., Бенгус Л.М., 2012

МОДЕЛЮВАННЯ ГРИЖИ МІЖХРЕБЦЕВОГО ДИСКА У ТВАРИН ТА ЛІКУВАННЯ ЇХ ІНФЛІКСИМАБОМ

Шимон М.В., Дєдх Н.В., Бенгус Л.М.

ДУ «Інституту патології хребта та суглобів ім. проф. М.І.Ситенка НАМН України»

Шимон М.В., Дєдх Н.В., Бенгус Л.М. Моделирование грыжи диска у животных и лечение их инфликсимабом // Український морфологічний альманах. – 2012. – Том 10, № 2. – С. 184-188.

В експерименте на 44 білих лабораторних крысах изучено действие инфликсимаба на нерв в условиях моделирования грыжи диска. Выявлено, что инфликсимаб снижает выраженность воспалительного процесса и отека, и предотвращает деструкцию нервной ткани.

Ключевые слова: грыжа диска, инфликсимаб, нервная ткань

Шимон М.В., Дєдх Н.В., Бенгус Л.М. Моделювання грижі міжхребцевого диска у тварин та лікування їх інфліксимабом // Український морфологічний альманах. – 2012. – Том 10, № 2. – С. 184-188.

У експерименті на 44 білих лабораторних щурах вивчена дія інфліксимабу на нерв в умовах моделювання грижі диска. Виявлено, що інфліксимаб знижує вираженість запального процесу і набряку, і запобігає деструкції нервової тканини.

Ключові слова: грижа диска, інфліксимаб, нервова тканина

Shimon M.V., Diedukh N.V., Bengus L.M. Modeling herniated disk in animals and their treatment by infliximab // Український морфологічний альманах. – 2012. – Том 10, № 2. – С. 184-188.

Effect of infliximab was studied on 44 white laboratory rats with modeling herniation of vertebral disc. Infliximab reduces the severity of inflammation and edema, and it prevents the destruction of nerve tissue.

Keywords: herniated, infliximab, nervous fabric

Дані, які отримані у останні роки, свідчать, що грижі міжхребцевого диска, складовою частиною яких є фіброзне кільце, драглисте ядро та у невелику відсотку гіаліновий хрящ замикальних пластин, синтезують прозапальні цитокини серед яких є значна доля фактора некрозу пухлин альфа та цитокинів 1 та 6 [1, 2]. Це свідчить про те, що поряд з механічною дією тканин грижі на нервові ганглії, присутній так званий «хімічний» фактор, який сприяє розвитку запального процесу [1]. Для вивчення механізмів розвитку запального процесу у нервовій тканині в умовах формування грижі диска використовують різні моделі, серед яких є трансплантація драглистого ядра на нервові закінчення [3, 4].

Мета проведеної роботи – в умовах моделювання запального процесу на нерв шляхом трансплантації драглистого ядра на нерв дослідити дію інфліксимабу при лікуванні тварин. Робота виконана згідно з планом науково-дослідних робіт ДУ «Інститут патології хребта та суглобів імені професора М.І.Ситенка Національної академії медичних наук України» «Вивчити механізми розвитку дегенеративного стенозу поперекового відділу хребтеного каналу» /2010-2012 / Шифр теми ЦФ.2010.1.НАМНУ (фундаментальна). № держреєстрації 0110U002088.

Матеріал і методи дослідження. В експерименті на 44 тваринах моделювали ситуацію, що наближається до такої при пролапсі диска та випадінні драглистого ядра у хребтовий канал, що супроводжується його впливом на нервові ганглії. Для цього аутологічне драглисте ядро, вилучене із міжхребцевого диска хвостового відділу щура, було трансплантовано на великогомілкуву гілку сидничного нерва (ВГТСН).

Особливості оперативного втручання представлено у нашій попередній статті [5].

Проведено 3 серії експериментів.

1 серія – несправжньо оперовані тварини (9 тварин).

2 серія - тварини з модельованою грижею диска (15 тварин)

3 серія - тварини з модельованою грижею диска, яких лікували інфліксимабом (20 тварин).

У якості контролю (серія 1) використані несправжньо оперовані щури, яким аналогічно дослідним тваринам, розрізали шкіру, тупим распатором розводили м'язи і відкривали ВГТСН, обережно відокремлювали нерв від м'язів. Після цього шкіряну рану ушивали. Додатково вилучили драглисте ядро з С1У – СУ хребтеного сегмента хвостового відділу хребта щура, яке в подальшому не використовувалось.

Для вивчення дії інфліксимабу (Ремікейд) на запальний процес, що виникає в разі дії факторів, які експресують драглисте ядро, тваринам, починаючи з другої доби після операції, внутрішньовенно вводили препарат у дозі 1,26 мг на 100 г живої маси.

Тварини в післяопераційному періоді перебували під постійним наглядом. Щурів виводили з експерименту шляхом передозування ефіру для наркозу із додержанням всіх правил гуманного відношення до тварин, згідно Європейської конвенції [6, 7]. Після виведення тварин з експерименту дослідження ВГТСН й навколишньої м'язової та сполучної тканин були проведено на 3 і 7 добу.

Для гістологічних досліджень виділяли ділянки м'яза з імплантованим під нерв драглистим ядром. Матеріал обробляли згідно методам гістологічної проводки та заключали у целоїдин [8]. Гістологічні зрізи фарбували їх гематоксиліном і еозином, а також пікрофуксином за Ван-Гізеном [8]. Аналізували пофарбовані зрізи в мікроскопі MICROS. Фотографували гістологічні ситуації на препаратах за

допомогою цифрової фотокамери Canon EOS-300D.

Для електронної мікроскопії зразки виготовляли згідно до рекомендацій Б.Уикли [9]. Диференційне забарвлення напівтонких зрізів проводили 1% розчином метиленового синього та 1% розчином основного фуксину. Ультратонкі зрізи контрастували цитратом свинцю та ураніацетатом за Reynolds [10]. Ультраструктурний аналіз проводили у трансмісійному електронному мікроскопі EMV-100BP ($\times 3\,000 - 35\,000$).

Морфометричний аналіз проводили з урахуванням наступних показників – ушкодження нервових волокон, дегенерація аксонів, тромбоз судин, набряк. Для визначення двох перших показників були використані напівтонкі зрізи, аналіз проведено у процентному співвідношенні ушкоджених та нормальних нервових волокон. Набряк оцінювали при використанні сітки Автандилова [11] з урахуванням площин набряку на зрізі.

Статистичний аналіз одержаних даних проводили на основі загально прийнятих методів варіаційної статистики з розрахунком середнього арифметичного (M) і його похибки (m) за допомогою пакета прикладних статистичних програм “Excel”, “AtteStat”. Для визначення статистичних відмінностей між групами порівняння застосовували t -критерій Ст'юдента. Статистично значущими вважали відмінності за умов $P < 0,05$.

Власні дослідження та обговорення.

Серія 1 (несправжньо оперовані тварини). На третю добу у несправжньо оперованих тварин рана на шкірі зажила первинним натягом. Набряку у ділянці шкіряної рани у проекції ВГСН не виявлено. На наступні дослідні терміни кінцівка була опорна, набряк також був відсутнім. Щури повністю наступали на кінцівку.

Детальна характеристика запального та деструктивного процесу у нерві під дією драглистого ядра (серія 2) представлено у попередній статті [5]. У наступній представлено дані морфометричного аналізу цієї серії.

При гістологічному дослідженні у тварин, яких лікували інфліксимабом, на 3 добу в гілочці нерва, прилеглого до ділянки трансплантації драглистого ядра, виявляються ознаки запального процесу та деструктивні порушення, які були поширені у периневральних тканинах – сполучної та м'язової.

Сполучна тканина епіневрію не зберігає цілостності, розшарована за рахунок набряку. Пучки колагенових волокон були з розривами, на окремих ділянках епіневрію виявлялись лише фрагменти сполучної тканини (рис.1.). Щільність клітин була високою, стрічкоподібно проміж пучками колагенових волокон розташовувались фіброласти, макрофаги, лімфоцити та поодинокі плазматичні клітини, які відображали перебіг запального процесу. Просвіти епіневральних кровоносних судин були розширені, ендотеліальні клітини у деяких судинах розташовувались у просвіті. Судини мали нерівномірні за контурами та по щільності стінки. Мав місце

тромбоз капілярів, де які з них були оточені інфільтратами.

Структура нерва також була порушена за рахунок набряку та тромбозу капілярів. Щільність клітин, фіброblastів та макрофагів у периневрії була високою.

Мієлінова оболонка зберігалася у більшості волокон, однак на ділянках мало місце її порушення (рис. 2).

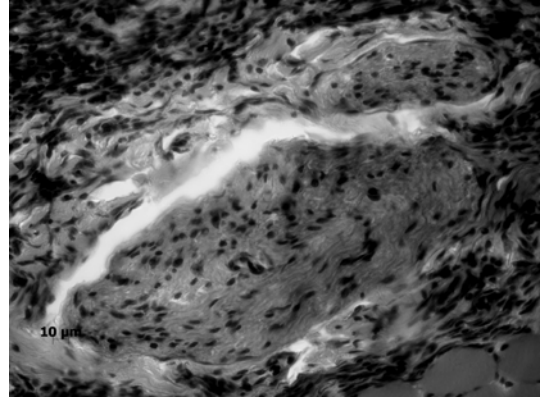


Рис. 1. Клітини запалення у епіневрії. Розшарування пучків колагенових волокон. Розриви пучків. Міжпучковий набряк. Висока щільність лімфоцитів, макрофагів та фіброblastів на поверхні нерва. Гематоксилін та еозин. Ок. 10, об. 40.

У м'язовій тканині спостерігалась висока щільність клітин запалення – лімфоцитів, макрофагів та поодиноких плазматичних клітин, а також проліферація сполучнотканинних клітин – фіброblastів (рис.1). Мав місце лізис м'язової тканини, скупчення клітин запалення.

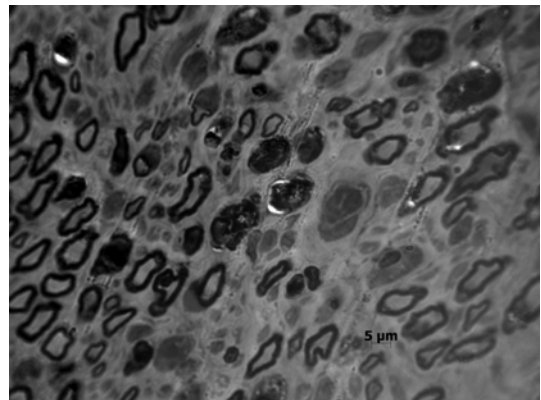


Рис. 2. Тромбоз судин у нерві. Порушення організації мієліну. Висока щільність шванівських клітин, макрофагів та фіброblastів. Метиленовий синій та основний фуксин . Ок. 10, об. 100.

На 7 добу у гілочках нерва зберігалися запальні та деструктивні зміни. Вони мали місце як у структурних компонентах самого нерва, так і прилеглій до ділянки трансплантації сполучної тканини (рис. 3).

У епіневрії, як і на попередній термін дослідження, пучки колагенових волокон були розшаровані. Спостерігалась висока щільність фіброblastів та поодинокі лімфоцити, виявлялись ділянки без клітин.

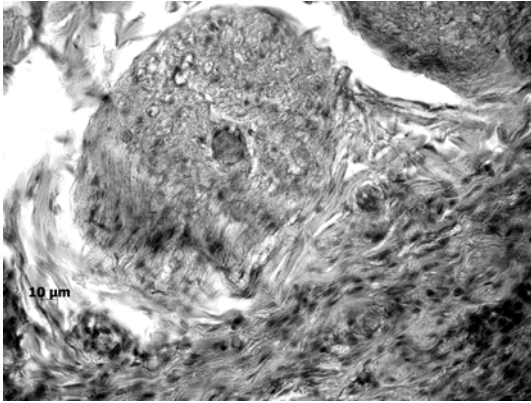


Рис. 3. Висока щільність лімфоцитів та фібробластів у сполучній тканині, яка оточує судинно-нервовий пучок. Тромбоз кровоносної судини у нерві. Набряк у пери- та епіневрії. Розшарування пучків колагенових волокон у епіневрії. Гематоксилін та еозин. Ок. 10, об. 40.

У м'язовій тканині, що оточує судинно-нервовий пучок, розташовувались тяжкі клітин запалення та периваскулярні інфільтрати.

У м'язовій тканині мав місце лізис м'язових волокон з заміщенням їх сполучною тканиною з високою щільністю фібробластів.

На 15 добу ознаки запального процесу та деструктивні порушення зберігалися, однак їх вираженість була значно меншою, ніж у контролі. Так, у сполучній тканині судинно-нервового пучка навколо капілярів розташовувалися периваскулярні інфільтрати, зберігалися капіляри з ознаками стазу (рис. 4). Однак щільність судин на поверхні нерва була низькою, периваскулярна інфільтрація була відсутня. Епіневральна оболонка навколо нерва складалась з пучків колагенових волокон, які лише на невеликих ділянках були розшаровані. На поверхні нерва розташовувалися лише поодинокі лімфоцити та фібробласти.

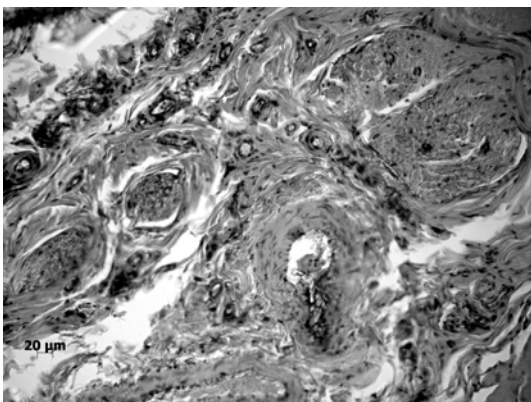


Рис. 4. Периваскулярні інфільтрати у сполучній тканині судинно-нервового пучка. Периневрій та епіневрії з незначним розшаруванням колагенових волокон. Поодинокі клітини запалення на пілочках нерва. Гематоксилін та еозин. Об. 10, об. 20.

Мієлінові оболонки нервів в основному зберігали структурну організацію, однак на ділянках нерва мало місце їх порушення (рис.5).

При детальному дослідженні нерва під елект-

ронним мікроскопом виявлено, що у нервовому стовбурі тварин, котрі одержали ін'єкцію інфліксимабу, визначалися численні мієлінові волокна типової структури (рис. 6). Мієлінові волокна мали округлу форму та рівномірне на протязі мієлінове покриття. Траплялися волокна з тонким шаром мієліну, що вказує на те, що ці волокна є новоутвореними. Появу таких волокон можна пов'язати із лікуванням інфліксимабом.

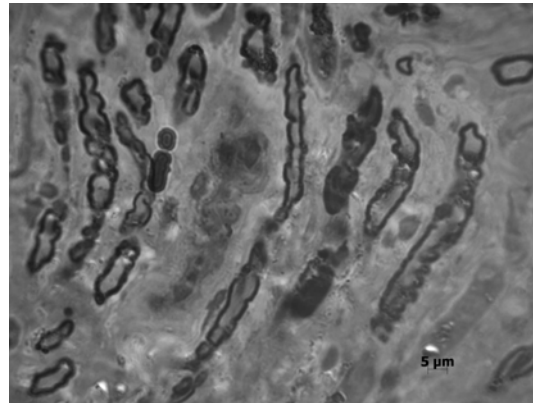


Рис. 5. Мієлінові оболонки ушкоджені. Метилєновий синій та основний фуксин. Ок. 10, об. 100.

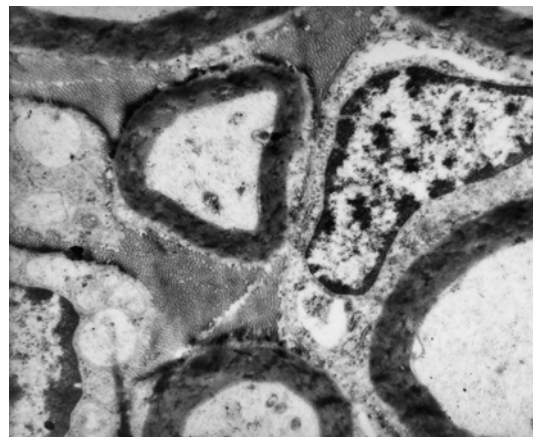


Рис. 6. Шванівська клітина поруч з мієліновим волокном типової структури. Пучок безмієлинових волокон кабельного типу. Контрастування за Рейчольдс. x10000

У структурі нерва значну питому вагу займали безмієлинові волокна, котрі характеризувались варіабельним діаметром та мали типову будову (рис. 7). Серед безмієлинових волокон траплялися як поодинокі аксони, так і волокна кабельного типу (рис. 7), котрі були оточені Шванівськими клітинами, що формують їх гліальну оболонку. Значна кількість молодих безмієлинових волокон дрібного калібру може бути обумовлена проведеною нами терапією, котра пригнічує запальний та, відповідно, деструктивний процеси у нерві, тим самим створюючи умови для регенерації аксонів.

Поруч з мієліновими волокнами типової структури часто були локалізовані Шванівські клітини, котрі мали крупне ядро з переважанням еухроматину та цитоплазму з короткими канальцями гранулярної ендоплазматичної сітки та вільними рибосомами.

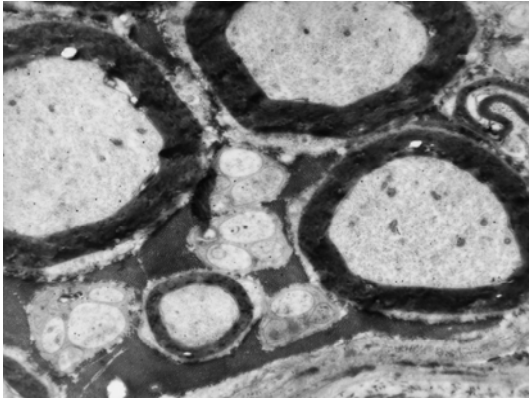


Рис. 7. Мієлінові волокна округлої форми з типовою структурою мієліну. Молоді безмієлінові волокна та волокна з тонким шаром мієліну. Контрастування за Рейнольдс. x 8000.

В ендоневрії виявлялися ознаки ревазуляризації нерва, на що вказували присутні у ньому крупні капіляри синусоїдного типу. Ендотеліальна стінка таких капілярів була представлена крупними щільно розташованими ендотеліоцитами.

Поряд з ознаками відновлення структури нерва, на фоні консервативного лікування препаратом інфліксимаб, спостерігалися й прояви деструктивних змін, що мали місце після моделювання нами запального та деструктивного процесів у ВГСН щурів. Так, частина нервових мієлінових волокон мала нерівні контури, варіабельність діаметру та помірно виражену деструкцію мієлінового шару. Траплялися мієлінові волокна з різною товщиною мієлінового покриття на ділянках.

Визначався епі-периневральний набряк (рис. 8). У безмієлінових волокон кабельного типу були присутні невеличкі осередки деструкції та апоптоз Шванівських клітин. В окремих волокнах в мієліновій оболонці мала місце вакуолізація. Дрібні вакуоли були розташовані поруч та на відстані. В периневрії виявлялися клітини фібробластичного диферону, котрі мали гіпохромне продовгувате ядро з численними ядерними порами, що свідчить про активний ядерно-цитоплазматичний транспорт синтезованих макромолекул. На межі пери- та ендоневрію визначалися мієлінові волокна з різною товщиною мієлінового покриття на ділянках.

В ендоневрії виявлялися ознаки ревазуляризації нерва, на що вказували присутні у ньому крупні капіляри синусоїдного типу. Ендотеліальна стінка таких капілярів була представлена крупними щільно розташованими ендотеліоцитами.

Поряд з ознаками відновлення структури нерва, на фоні консервативного лікування препаратом інфліксимаб, спостерігалися й прояви деструктивних змін, що мали місце після моделювання нами запального та деструктивного процесів у ВГСН щурів. Так, частина нервових мієлінових волокон мала нерівні контури, варіабельність діаметру та помірно виражену деструкцію мієлінового шару. Траплялися мієлінові волокна з різною товщиною мієлінового покриття на ділянках.

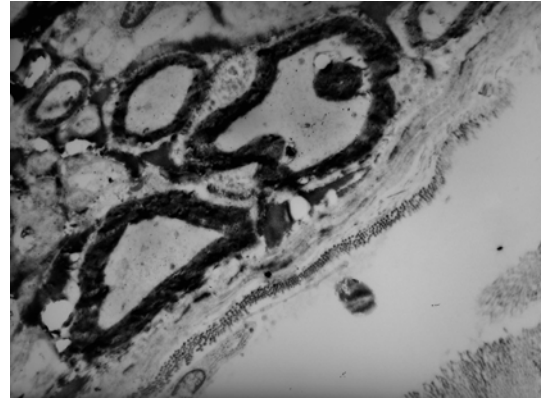


Рис. 8. Нерівні контури, варіабельність діаметру та деструкція мієлінових волокон. Епі-периневральний набряк. Контрастування за Рейнольдс. x6000.

В периневрії виявлялися клітини фібробластичного диферону, котрі мали гіпохромне продовгувате ядро з численними ядерними порами, що свідчить про активний ядерно-цитоплазматичний транспорт синтезованих макромолекул. На межі пери- та ендоневрію визначалися мієлінові волокна з різною товщиною мієлінового покриття на ділянках.

Визначалися осередки гіперплазії периневрію, представлені сполучною тканиною, що містила молоді форми фібробластів з крупним еухромним ядром. У судинах ендоневрію відзначено деструкцію ендотелію та апоптоз окремих перицитів.

Морфометричний аналіз після лікування тварин препаратом інфліксимаб було проведено на 15 добу при порівнянні з нелікованими тваринами. Процент дегенеративних волокон у нерві складав 26,3 %, у той час як у тварин з трансплантацією драглистого ядра без лікування цей показник складав 72,6 % (рис. 9). Площа, яка приходилась на набряк (у епі- та периневрії) у лікованих тварин 22,9 %, у тварин без лікування – 58,8 % (рис. 10).

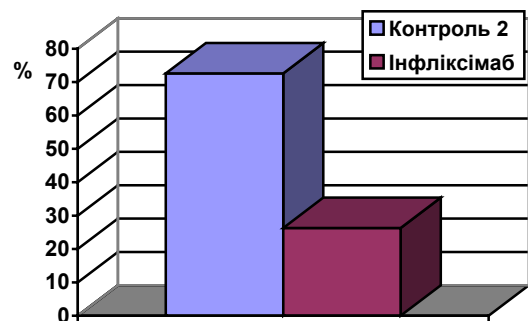


Рис. 9. Дегенерація нервових волокон (%). Контроль 2 – тварини з модельованою грижею міжхребцевого диска

Наведені дані, доповнюючи результати гістологічного аналізу, свідчать, що препарат біологічної терапії значно знижує прояви запалення, та сприяє збереженню структури нерва. Однак повного відновлення морфологічної структури нерва

не виявлено. На досліджений термін ознаки набряку оболонки нерва зберігались, хоч і були значно знижені. З даних літератури відомо, що у пацієнтів з грижами міжхребцевого диска, яких лікували інфліксимабом, отримані неоднозначні результати. У рандомізованому контрольованому дослідженні, яке включало 21 пацієнта, було досліджено дію інфліксимаба на резорбцію грижі диску [12]. При контролі МРТ було показано, що інфліксимаб не сприяв резорбції грижі диска на кінцевий термін дослідження - 6 місяців, однак зменшував біль у хребті. Ефективність лікування інфліксимабом вивчалася іншими дослідниками [4, 13]. При узагальненні отриманих нами даних та результатів представлених у літературних джерелах, можливо зробити висновок, що зменшення запального процесу, індукованого грижею диска, сприяє зниженню набряку та болі у хребті.

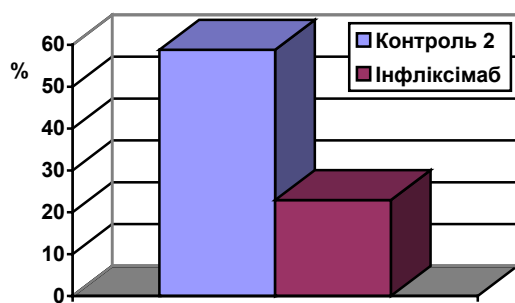


Рис. 10. Площа неврального та периневрального набряку (%). Контроль 2 – тварини з модельованою грижею міжхребцевого диска

Таким чином, в умовах експериментально змодельованого запального процесу у периферичному нерві та периневральних тканинах, у якому використано аутологічне драглисте ядро, як складова грижі диска, який синтезує прозапальні цитокіни, провідним з котрих є фактор некрозу пухлин-альфа, доведена ефективність використання його антагоністу – інфліксимабу.

У разі консервативного лікування щурів з експериментальним запаленням та деструкцією периферичних нервів препаратом інфліксимаб спостерігалися ознаки збереження типової ультраструктурної організації великогомілкової гілки сідничного нерву (нейропротекторний ефект) та окремі прояви активізації репаративних процесів у нерві - формування безмілінових нервових волокон (молодих аксонів), а також новоутворених мілінових волокон, на що вказує тонкий шар мієліну в їх оболонці.

На вказані терміни дослідження спостерігався набряк як поміж окремими нервовими волокнами, так і у сполучно-тканинній оболонці, що оточує пучок нервових волокон. Однак інтенсивність цього процесу була меншою у порівнянні з нелікованими тваринами.

Слід зауважити, що у контрольній групі тварин мав місце виражений епі-периневральний набряк, котрий був присутній на всі терміни дослідження. У тварин пролікованої групи прояви набряку спостерігалися, однак,

розпочинаючи з 7 доби, вони були значно меншими у порівнянні з контрольною групою.

Підсумовуючи наведені дані, слід відзначити, що препарат інфліксимаб не в змозі повністю усунути всі ті деструктивні зміни, що відбулися у периферичному нерві на фоні впливу фактору некрозу пухлин-альфа після трансплантації аутологічного драглистого ядра щурів до великогомілкової гілки сідничного нерву. Однак, зниження запального процесу та набряку сприяло затримці деструкції нервової тканини за рахунок пригнічення їх активності.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Olmarker K. Pathogenesis of sciatic pain. A study of spontaneous behavior in rats exposed to experimental disc herniation / K. Olmarker, R. Storkson, O.G. Berge // *Spine*. – 2002. – Vol. 27. – P. 1312–1317.
2. Chronic inflammation and compression of the dorsal root contribute to sciatica induced by the intervertebral disc herniation in rats / S.X. Hou, J.G. Tang, H.S. Chen, J. Chen // *Pain*. – 2003. – Vol. 105. – P. 255–264.
3. Comparison of neuropathic pain induced by the application of normal and mechanically compressed nucleus pulposus to lumbar nerve roots in the rat / M. Kawakami, H. Hashizume, H. Nishi [et al.] // *J. Orthop. Res.* – 2003. – Vol. 21. – P. 535–539.
4. Nerve growth factor involvement in pain behavior in a rat model of experimental disc herniation / A. Onda, Y. Murata, B. Rydevik et al.: 31st annual meeting of the International Society for the Study of the Lumbar Spine. – 2004.
5. Дедух Н.В. Вплив драглистого ядра міжхребцевого диска на великогомілкову гілку сідничного нерва / Н.В. Дедух, С.В. Машишкіна, М.В.Шимон // *Український журнал клінічної та лабораторної медицини* – 2011. – P. 48–52.
6. 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.
7. Закон України №3447-IV від 21.02.2006 «Про захист тварин від жорстокого поводження» (Стаття 26).
8. Саркісов Д.С. Микроскопическая техника / Д.С. Саркісов, Ю.А.Перова. – М.: Медицина, 1996. – 542 с.
9. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих / Б.Уикли // М.: «Мир», 1975. – 324 с.
10. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy / E.S. Reynolds // *J. Cell Biol.* – 1963. – Vol. 17. – P. 208–212.
11. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия: [руководство] / Г.Г. Автандилов. – М.: Медицина, 1990. – 384 с.
12. The effect of infliximab, a monoclonal antibody against TNF- α , on disc herniation resorption a randomized controlled study / R.A. Autio, J. Karppinen, J. Niinimäki et al. // *Spine*. – 2006. – Vol. 31. – P. 2641–2645.
13. Selective inhibition of tumor necrosis factor-alpha prevents nucleus pulposus-induced histologic changes in the dorsal root ganglion / Murata Y, Onda A, Rydevik B et al. // *Spine (Phila Pa 1976)*. – 2004. – Vol. 29, № 22. – P. 2477–2484.

Надійшла 14.04.2012 р.
Рецензент: проф. В.І.Лузін