

УДК 616.721.1.089

М.С. Юхта, Н.О. Волкова, О.І. Гончарук, В.І. Грищенко

ПОРІВНЯННЯ ТРАВМАТИЧНОГО І КОМПРЕСІЙНОГО МЕТОДІВ МОДЕЛЮВАННЯ ДЕГЕНЕРАТИВНО-ДИСТРОФІЧНИХ УШКОДЖЕНЬ МІЖХРЕБЦЕВИХ ДИСКІВ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків)

Дана робота є фрагментом наукової теми "Розроблення та впровадження тканиновідновлювальної технології лікування ушкоджень хрящів", номер держ.реєстрації 0109U007758.

Вступ. Стрімкий розвиток науки формує умови для створення нових лікарських речовин, здатних стати лікарськими препаратами. Нові джерела отримання потенційних лікарських засобів значно розширюють можливості терапії основних захворювань людини. Проте, упровадження сучасних препаратів в клінічну практику може бути здійснено лише за умови детального вивчення їх специфічної активності і безпеки на етапі експериментальних досліджень [3].

Основою доклінічних досліджень є оптимальний вибір адекватної моделі патологічного стану людини. Моделювання є одним з інструментів аналізу і базовим методом біомедицини.

У даний час розроблені біомоделі багатьох патологічних станів, які в тій чи іншій мірі відтворюють механізми їх розвитку у людини. Це стосується і моделей дегенеративно-дистрофічних пошкоджень міжхребцевих дисків(МХД).

Всі відомі моделі даної патології можна розділити на три основні групи. До першої групи відносяться травматичні пошкодження драглистого ядра гострими предметами (голками, зуболікарськими борами) і його аспірація [5, 8]. До другої – механічна дія на МХД (дестабілізація диска шляхом руйнування зв'язуючого апарату хребта, моделювання осьового навантаження на міжхребцевий диск за допомогою апаратів типа Іллізарова, функціонального блокування хребтового рухового сегменту) [2, 7]. До третьої групи - пошкодження, що викликані шляхом введення в драглисте ядро різних хімічних агентів (chondroitinase ABC, дексаметазон, папаїн, трипсин, інсулін і т.д.), які призводять до загибелі нотохордальних клітин шляхом індукції апоптозу або за рахунок некротичних змін унаслідок лізису тканини. [6, 9].

Всі перераховані моделі мають свої переваги, але жодна з них належним чином не повторює механізм розвитку дегенеративно-дистрофічних змін МХД у людини. Тому метою нашого дослідження стала розробка і вивчення нової адекватної моделі дегенеративно-дистрофічного пошкодження МХД.

Об'єкт і методи дослідження. Робота була виконана на 42 щурах-самцях масою 300-350 г.

Метою роботи було дослідження і порівняння двох способів моделювання дегенеративно-дис-

трофічного пошкодження МХД: травматичний та компресійний.

У першому випадку тварин (n=7) наркотизували внутрішньом'язовим введенням 5% розчину кетаміну, надійно зафіксували, шкіру хвоста обробляли спиртовим розчином йоду. Потім з дорсальної сторони хвоста в аваскулярній зоні робили поздовжній розріз такого розміру, що забезпечував зручний доступ до МХД $C_{6-VI-VII}$. Дефект цього диску моделювали стерильним зуболікарським бором діаметром 1 мм на глибину 3 мм, який проникав через фіброзне кільце в зону драглистого ядра, після чого рану зашивали. З дослідів тварин виводили на 3 добу після формування дефекту шляхом застосування летальних доз ефіру для наркозу.

Другій частині тварин (n=14) моделювалось компресійне дегенеративно-дистрофічне пошкодження МХД за наступною методикою: у наркотизованих тварин в області депілювали шкіру і обробляли спиртовим розчином йоду. Додатково спиртовим розчином йоду дезинфікували шкіру хвоста. Потім у всіх тварин на 1 см краніальніше люмбально-сакрального з'єднання уздовж середньої лінії тіла проводили розріз шкіри і формували підшкірну кишеню та забезпечували гемостаз. Потім проводили резекцію 2/5 довжини хвостового відділу хребта на рівні C_{XX-XI} , забезпечуючи гемостаз з судин хвоста. Куксу, що утворилася при резекції, вводили в сформовану підшкірну кишеню і фіксували безперервним матрацним швом до шкіри спини. З метою більш міцної фіксації хвоста і формування дуги меншого радіусу додатково формували анастомоз між шкірою хвоста і спини довжиною 1,5 см шляхом послідовного накладення в каудальному напрямку від підшитої кукси двох додаткових вузлових швів. У якості шовного матеріалу використовували поліамідну нитку. Операційне поле знов обробляли йодом. З дослідів тварин виводили на 30 і 60 доби з дня формування компресії.

В обох випадках контролем слугували інтактні тварини (n=21).

Оцінку ефективності моделювання патології проводили за допомогою гістологічних методів дослідження і спіральної комп'ютерної томографії (КТ).

Для морфологічного дослідження брали частину хребта на рівні C_{IV-X} . Після фіксації в 10% розчині формаліну проводили декальцинацію препаратів у 5% розчині азотної кислоти. Декальциновані препарати послідовно переносили в 2%, 4% і 8% розчини целюдіну, заливали у ви-

гляді блоків і виготовляли зрізи у горизонтальній площині. Останні фарбували гематоксиліном та еозином і пікрофуксином по Ван-Гізону [1].

Комп'ютерну томографію проводили на рентгенівському спіральному комп'ютерному томографі General electric CT/e Dual із шагом 1 мм.

Результати досліджень та їх обговорення. При дослідженні гістологічних препаратів було виявлено, що у контрольних тварин фіброзне кільце складалося з пластин колагенових волокон, які мали радіальний хід та уздовж яких були розташовані фіброхондроцити. Останні являли собою фібробластоподібні витягнуті клітини із щільними овоїдними ядрами. Драглисте ядро розташовувалося у середині диску та мало округлу форму. Воно складалося з нотохордальних клітин, що щільно контактували між собою та формували синцитій. Межа між фіброзним кільцем та драглистим ядром мала чіткі, рівні контури. Губчаста кісткова тканина тіл хребців в ділянках, які межують з зоною росту, а також у апофізах була представлена сіткою кісткових трабекул дрібнопетлястої організації. У центральних ділянках тіла хребців буди зформовані великопетлястою сіткою кісткових трабекул. Виразених патологічних змін у кістковій тканині не було виявлено. Міжтрабекулярні простори були заповнені жовтим кістковим мозком.

В гістологічних препаратах МХД тварин, яким моделювалось травматичне його пошкодження (рис. 1), виявлялося різке зменшення їх висоти. В більшості випадків у місці травмування пучки колагенових волокон фіброзного кільця були різко фрагментовані, при цьому утворювалися щілини різного розміру. Фрагменти колагенових волокон були розволокнені та розташовувались хаотично. Щільність фіброхондроцитів була знижена. Драглисте ядро – відсутнє. Виразених патологічних змін у структурі суміжних хребців виявлено не було. Міжтрабекулярні простори були заповнені жовтим кістковим мозком.

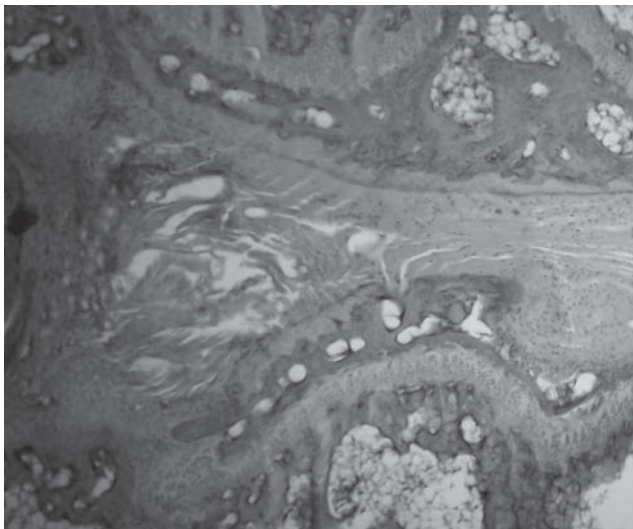


Рис. 1. Травматична модель дегенеративно-дистрофічного пошкодження МХД щура. Мікрофото. Забарвлення гематоксиліном і еозином, $\times 200$.

При мікроскопічному дослідженні гістологічних зрізів МХД, які піддавалися компресійній дії протягом 30 діб (рис. 2), у всіх препаратах визначалися нерівномірність висоти МХД, тобто їх звуження в області компресії. Найбільш виражені зміни як у фіброзному кільці, так і в драглистому ядрі визначалися на рівні Cc_{v-vi} , Cc_{vi-vii} , $Cc_{vii-viii}$. Фіброзне кільце складалося з пластин, представлених колагеновими волокнами, уздовж яких були розташовані фіброхондроцити. З боку компресії хід волокон був порушений, вони мали звивисту форму. З протилежною від області компресії сторони волокна розташовувалися радіально. Колагенові волокна були розволокнені і фрагментовані, між пучками колагенових волокон розташовувалися тріщини і щілини. Навкруги тріщин і щілин густина фіброхондроцитів була знижена. Драглисте ядро було розширено, деформовано і зміщено у бік протилежний компресії. В більшості випадків драглисте ядро, що складалося з нотохордальних клітин, що формували синцитій, було сплюснено і по своїй формі нагадувало трапецію. На ділянках, прилеглих до фіброзного кільця зі сторони компресії, густина нотохордальних клітин знижувалася, виявлялася велика кількість лізованих клітин. Виразені зміни виявлялися і з боку хребців. Будова кісткової тканини апофізів була порушена: виявлялися тріщини і щілини, формування деструктивних порожнин. В зоні росту між стовпчиками хондроцитів визначалися ослизлі ділянки. Організація трабекулярної сітки тіл хребців так само була порушена. Часто зустрічалися стоншені довгі трабекули із сліпими закінченнями. Кількість поперечно зв'язуючих трабекул була досить невелика. Трабекулярна сітка була порушена як за рахунок атрофії кісткових трабекул, так і за рахунок втрати контактів між ними (тобто спостерігалася неврегульоване розташування кісткових трабекул без формування мережі). Частина трабекул була стоншена, аж до появи переривистих «ниткоподібних» структур. В кісткових трабекулах вияв-

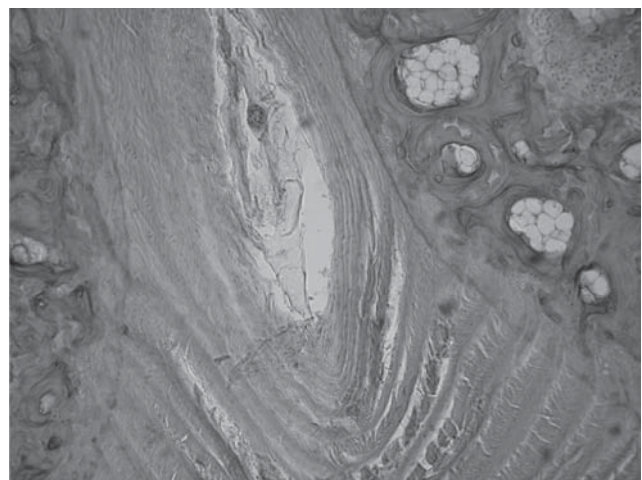


Рис. 2. МХД щура після 30 діб компресії. Мікрофото. Забарвлення гематоксиліном і еозином.

лялися мікропереломи і мікротріщини, а також ділянки базofilного хрящового матриксу. В міжтрабекулярних просторах розташовувався жовтий кістковий мозок.

Забарвлення препаратів по Ван-Гизону показало незначне зниження вмісту колагену у фіброзному кільці в порівнянні з контролем.

При дослідженні гістологічних зрізів МХД, які піддавалися компресійній дії протягом 60 днів (рис. 3), описані вище зміни набували більш вираженого характеру: у фіброзному кільці навкруги тріщин і щілин крім ділянок з пониженою густиною фіброхондроцитів часто зустрічалися місця і з повною їх відсутністю; колагенові волокна були різко розволокнені і дефрагментовані; в драглистому ядрі з боку меншої висоти міжхребцевого диска виявлялись випинання у фіброзне кільце, в окремих препаратах такі випинання містили лізовані нотохордальні клітини драглистого ядра; в окремих препаратах виявлялися тріщини, які зачіпали як кісткову тканину апофізів хребців, так і фіброзне кільце, причому краї тріщин мали виражене базofilне забарвлення, що свідчило про прижиттєве їх формування; кісткові трабекули мали переважно подовжній напрям, попе-

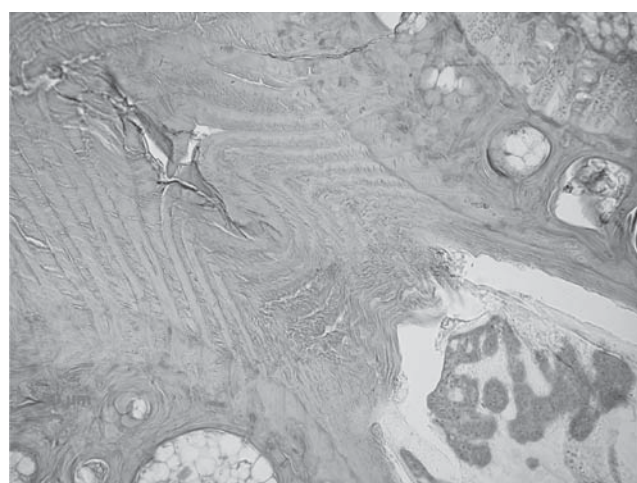
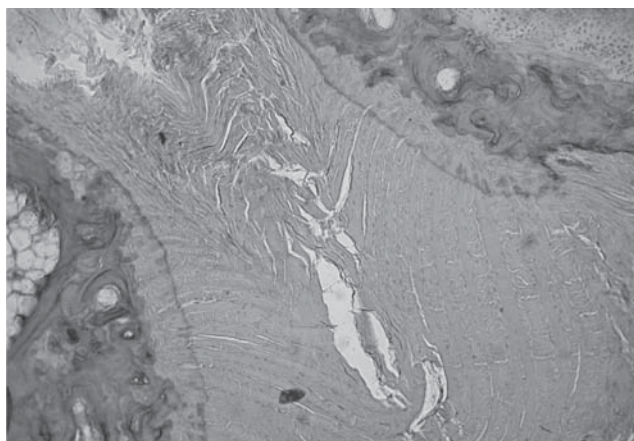


Рис. 3. МХД тварини після 60 днів компресії. Мікрофото. Забарвлення гематоксилином і еозином.

речно зв'язуючі трабекули практично були відсутні; при забарвленні препаратів по Ван-Гизону визначалося різке зниження вмісту колагену у фіброзному кільці.

Так само були проведені морфометричні дослідження гістологічних препаратів МХД щурів експериментальної групи, що піддавалися компресійній дії та щурів з групи контролю. Одержані дані представлені в таблиці 1.

Таблиця 1

Висота МХД інтактних щурів і щурів, які піддавалися компресійному впливу впродовж 30 та 60 днів

Група тварин	Висота МХД на 30 добу дослідження, мм	Висота МХД на 60 добу дослідження, мм
Контрольна група	1,0±0,071	1,1±0,094
Експериментальна група	0,69±0,033*	0,56±0,027*

Примітка: * – результати достовірні відносно контролю (P=0,05)

На величину патологічних змін, які утворюються, вказує і той факт, що після усунення фіксації хвоста він незмінно залишався у зігнутому



Рис. 4. Щури після усунення фіксації хвоста (60 доба дослідження).

стані, тобто формувалося скривлення хвостового відділу хребта (рис.4).

З метою отримання більш повного уявлення про вплив фіксації хвоста на МХД тварини нами паралельно були проведені і комп'ютерно томографічні дослідження.

Дані КТ підтвердили зменшення висоти МХД, особливо на рівні С_{v-VI}, С_{VI-VII}, С_{VII-VIII}, в порівнянні з такою до формування компресії. Якщо у піддослідних тварин висота МХД на вказаному рівні зразу ж після формування компресії складала 1,0±0,08 мм, то на 60-у добу безперервної компресії вона зменшувалася до 0,5±0,062 мм. При цьому на томограмах чітко візуалізувалися зміни не тільки висоти МХД, але і його форми.

В перший день після формування компресії на томограмах міжхребцеві проміжки мали форму прямокутника, що відповідало нормі для щурів (рис. 5). А на 60-у добу - трикутника, вершиною обернутого у бік меншої кривизни сформованої дуги хвостового відділу хребта (рис. 6). Тобто компресійні сили впливали на МХД нерівномірно: менше з однієї його сторони і більше з протилежної. В цілому саме така картина відповідає розподілу навантаження на МХД у фізіологічних вигинах хребта, які формуються у людини в результаті прямоходження.

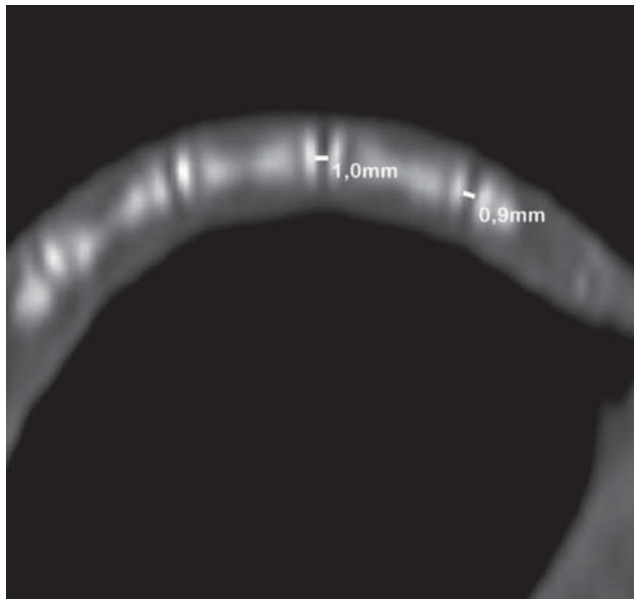


Рис. 5. Томограма хвостового відділу хребта щура, яка була отримана безпосередньо після формування компресії (стрілками вказані МХД C_{v-vi} та C_{vi-vii}).

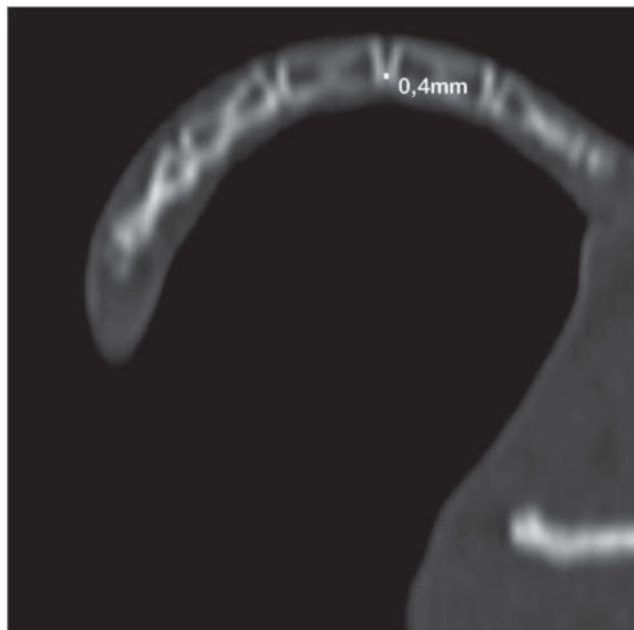


Рис. 6. Томограма хвостового відділу хребта щура на 60 добу формування компресії. Чітко виявляється зменшення висоти МХД C_{v-vi} , що вказано стрілкою.

Обговорення результатів. Таким чином, при травматичному моделюванні ми спостерігаємо окремі ознаки дегенеративно-дистрофічного ушкодження МХД: зменшення його висоти, фрагментація пучків колагенових волокон, утворення щілин у фіброзному кільці, зниження щільності фіброхондроцитів. Але при цьому відбуваються досить грубі пошкодження драглистого ядра, що призводять до його редукції та як наслідок, втрачають характерної для МХД гістологічної структури. Крім того всі ці зміни мають травматичний генез, тоді як найважливішою ланкою в походженні дегенеративно-дистрофічних захворювань МХД у людини є постійний вертикальний тиск маси тіла на його структури [4]. До того ж однією з особливостей цієї дії є нерівномірний характер, обумовлений наявністю у людини природних вигинів хребта. Подібну ситуацію ми намагаємось моделювати, формуючи дугу хвостового відділу хребта шляхом фіксації його до спини тварини. Згідно даних КТ досліджень компресійні сили при цьому впливають саме на вигин цієї дуги, яка імітує фізіологічні вигини хребта людини.

Результатом дії тиску маси тіла людини на структури МХД є виникнення дисбалансу між синтезом і деградацією компонентів міжклітинної речовини на користь останнього. При цьому перш за все відбувається обезводнення драглистого ядра, зниження його тургору через зниження вмісту протеогліканів, що у свою чергу посилює навантаження, яке доводиться на фіброзне кільце, поступово викликаючи його розтягування, розволокнення, утворення в ньому тріщин і з часом приводячи до загибелі хондроцитів та протрузії тканин МХД за межі країв тіл прилеглих до нього хребців [4]. Подібні гістологічні зміни ми спостерігаємо і при моделюванні компресійної дії шляхом формування вигину хвостового відділу хребта. Зокрема спостерігаються зниження клітинності структурних елементів фіброзного кільця, формування в ньому тріщин і щілин, розволокнення і дефрагментація колагенових волокон, втрата чіткої межі між фіброзним кільцем і драглистим ядром, випинання драглистого ядра у фіброзне кільце, які містять лізовані нотохордальні клітини, різке зниження вмісту колагену у фіброзному кільці.

Слід зазначити, що результатом моделювання компресійної дії так само було зниження висоти МХД C_{v-vi} , C_{vi-vii} , $C_{vii-viii}$. І хоча ступінь зниження висоти ураженого МХД і не завжди корелює із ступенем вираженості клінічних проявів, даний симптом є неодмінним супутником дегенеративно-дистрофічної патології МХД у людини.

Висновки. Таким чином, одержані рентгенологічні і гістологічні зміни у цілому дозволяють говорити про розвиток дегенеративно-дистрофічних пошкоджень МХД на рівні C_{v-vi} , C_{vi-vii} , $C_{vii-viii}$ вже протягом 60 днів моделювання компресійної дії шляхом формування вигину хвостового відділу хребта. При цьому варіанті моделювання механізм формування дегенеративно-дистрофічних

пошкоджень МХД більш достеменно повторює механізм формування патологічних змін у людини, ніж при травматичному моделюванні цієї патології.

Перспективи подальших досліджень. Експериментальна компресійна модель дегенеративно-дистрофічних ушкоджень МХД буде використана для подальших досліджень з ефективності застосування різних терапевтичних методів.

Робота була виконана за рахунок бюджетних коштів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Волкова О.В. Основы гистологии с гистологической техникой / Волкова О.В., Елецкий Ю.К. – М. : Медицина, 1982. – 304 с., ил.
2. Гонгальский В. В. Дистрофический процесс в тканях позвоночника при моделировании функционального блокирования позвоночного двигательного сегмента / Гонгальский В. В., Мороз Н. Ф. // Лікарська справа. – 1998. – №7. – С. 89-91.
3. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ/Под общей редакцией Р.У.Хабриева – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2005 – 832 с.:ил.
4. Юмашев Г. С. Остеохондрозы позвоночника / Г. С. Юмашев, Л. Е. Фурман. – М. : Медицина, 1984. – 384 с., ил..
5. A slowly progressive and reproducible animal model of intervertebral disc degeneration characterized by MRI, X-ray, and histology / Sobajima S., Kompel J. F., Kim J. S. [et al.] // Spine. – 2005. – Vol.30(1). – P. 15-24.
6. An in vivo model of degenerative disc disease / Norcross J. P., Lester G. E., Weinhold P., Dahners L. E. // J Orthop Res. – 2003. – Vol. 21 – P. 183-185.
7. Compression-induced changes in intervertebral disc properties in a rat tail model / Iatridis J. C., Mente P. L., Stokes, I. A. [et al.] // Spine – 1999. –Vol. 24 – P. 996-1002.
8. Disc degeneration in the rabbit: a biochemical and radiological comparison between four disc injury models / Kim KS, Yoon ST, Li J [et al.] // Spine. – 2005. – Vol. 30(1). – P.33-7.
9. Kern S. An Animal models for human disc degeneration / Kern S., Koichi M., Howard S. // The Spine Journal. – 2005. – Vol. 5, № 6. – P. 267-279.

УДК 616.721.1.089

СРАВНЕНИЕ ТРАВМАТИЧЕСКОГО И КОМПРЕССИОННОГО МЕТОДОВ МОДЕЛИРОВАНИЯ ДЕГЕНЕРАТИВНО-ДИСТРОФИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ МЕЖПОЗВОНКОВЫХ ДИСКОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Юхта М.С., Волкова Н.А., Гончарук Е.И., Грищенко В.И.

Резюме: Представлены результаты собственных исследований по сравнению двух моделей дегенеративно-дистрофических заболеваний межпозвонковых дисков: травматической и компрессионной. С помощью гистологических и компьютернотомографических исследований показаны преимущества использования экспериментальной компрессионной модели в научных целях.

Ключевые слова: межпозвонковый диск, дегенеративно-дистрофическое повреждение, моделирование, прямохождение, крыса.

УДК 616.721.1.089

ПОРІВНЯННЯ ТРАВМАТИЧНОГО І КОМПРЕСІЙНОГО МЕТОДІВ МОДЕЛЮВАННЯ ДЕГЕНЕРАТИВНО-ДИСТРОФІЧНИХ ПОШКОДЖЕНЬ МІЖХРЕБЦЕВИХ ДИСКІВ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Юхта М.С., Волкова Н.О., Гончарук О.І., Грищенко В.І.

Резюме. Представлені результати власних досліджень з порівнянням двох моделей дегенеративно-дистрофічних захворювань міжхребцевих дисків: травматичної і компресійної. За допомогою гістологічних і комп'ютернотомографічних досліджень показані переваги використання експериментальної компресійної моделі у наукових цілях.

Ключові слова: міжхребцевий диск, дегенеративно-дистрофічне ушкодження, моделювання, прямоходження, щур.

UDC 616.721.1.089

COMPARISON of TRAUMATIC and COMPRESSION METHODS of INTERVERTEBRAL DISK DEGENERATION MODELING in EXPERIMENT

Iukhta M. S., Volkova N.A., Goncharuk E.I., Grischenko V. I.

Summary. The results of own studies on comparison of two intervertebral disk degeneration models are represented: traumatic and compressive. The experimental using advantages of compressive model in scientific aims are shown by histological and computer tomography researches.

Key words: intervertebral disk, degenerative damage, modeling, upright walking, rat.

Стаття надійшла 8.12.2010 р.