

Моделирование дегенеративных изменений межпозвонковых дисков (остеохондроза) у кроликов: макроскопическое и гистологическое изучение

А.Б.Шехтер¹, В.А.Басков², О.Л.Захаркина³, А.Е.Гуллер¹, И.А.Борщенко⁴, И.Ю.Колышев¹, Г.Д.Капанадзе⁵, А.В.Басков^{2,4}, Э.Н.Соболь³

¹Московская медицинская академия им. И.М.Сеченова, Москва

²Кафедра нейрохирургии Российской медицинской академии последипломного образования, Москва

³Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН, Троицк, Московская область

⁴Клиника Ортоспайн, Москва

⁵Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

Целью работы является воспроизведение, а также детальное изучение пункционной модели остеохондроза позвоночника у кроликов при длительном динамическом наблюдении (до 40 недель). Установлено, что в пунктированных дисках формируются остеофиты, происходит деструкция гиалинового хряща замыкательной пластинки, а ткань пульпозного ядра некротизируется и постепенно замещается фиброзным хрящом. В дальнейшем развиваются вторичная дистрофия этой ткани и дезорганизация структуры внутреннего и среднего слоев фиброзного кольца, а также образуются щели между замыкательной пластинкой и фиброзным кольцом. В интактных межпозвонковых дисках, расположенных на ближайших анатомических уровнях с дисками, подвергавшимися экспериментальному воздействию, обнаруживаются умеренные дистрофические процессы в пульпозном ядре, вероятно, связанные с нестабильностью позвоночника. Выявленные изменения близки к дегенеративным изменениям межпозвонковых дисков при остеохондрозе позвоночника у человека, то есть представляют собой адекватную модель для оценки результатов и определения механизмов различных методов лечения данного заболевания, в том числе лазерной реконструкции межпозвонковых дисков.

Ключевые слова: модель остеохондроза, кролики, межпозвонковый диск, морфология.

Дегенерация межпозвонковых дисков (остеохондроз позвоночника) – это хронический процесс, сопровождающийся такими клиническими расстройствами, как боль в спине, ишиалгия, грыжа диска, стеноз позвоночного канала, миелопатия. Традиционный арсенал лечебных воздействий (и хирургических, и терапевтических) направлен, преимущественно, на ликвидацию острых симптомов болезни. И хотя исследования ме-

ханизмов возрастной и патологической дегенерации межпозвонковых дисков (МПД) и поиск подходов к лечению остеохондроза позвоночника ведутся весьма активно [7, 12], имеющаяся информация, остается неполной, поскольку число эффективных методов, обеспечивающих замедление процесса дегенерации или восстановление утраченных в результате патологических процессов хрящевых структур, до сих пор невелико.

Возможности получения биопсийного материала МПД человека ограничены по этическим и юридическим причинам. Поэтому для изучения механизмов и динамики остеохондроза позвоночника часто используют моделирование дегенеративных изменений МПД в экспериментах на животных [18]. В литературе представлен широкий спектр моделей дегенерации дисков, созданных у разных видов животных, и обладающих определенными преимуществами и недостатками [30]. Подробный обзор различных моделей с анализом морфогенетических, биохимических, биомеханических и других различий МПД животных и человека, а также адекватности моделированных изменений дегенеративным заболеваниям человека, представлен в работах [4, 19].

Большое место в литературе о моделях отведено созданию дегенеративных изменений дисков у кроликов [10, 13, 16, 23, 34]. В пользу проведения экспериментов на кроликах свидетельствует то, что исследованию тканей МПД этих животных посвящено значительное число публикаций [6, 8, 11, 14, 26, 29]. Анализ литературы позволяет сделать вывод о сходстве структуры МПД кроликов и человека, как в норме, так и при дегенерации.

Создание и изучение моделей у животных связано не только с фундаментальными аспектами исследования дегенерации МПД, но направлено на использование их для разработки новых методов лечения [15, 21, 22] и, в частности, малоинвазивных хирургических процедур.

В 1999 году нами был предложен новый подход к лечению дегенеративных заболеваний МПД, основанный на нераз-

рушающем термомеханическом воздействии модулированного лазерного излучения – лазерная реконструкция дисков (ЛРД) [2]. Процедура ЛРД представляет собой пункцию МПД, подведение лазерного излучения через иглу в область пульпозного ядра (ПЯ) и лазерное облучение данной области с целью создания условий для запуска репаративных процессов в ткани. Целенаправленное исследование разных режимов лазерного воздействия на интактные МПД кроликов позволило выявить такие режимы необляционного лазерного воздействия, которые индуцируют репаративные процессы: пролиферацию хондроцитов фиброзного кольца (ФК) и ПЯ, метаплазию внутренних слоев ФК и поврежденного ПЯ в переходный фиброгиалиновый или типичный гиалиновый хрящ [1, 32, 33]. Полученные результаты создали фундамент для разработки нового метода в малоинвазивной спинальной хирургии – лазерной реконструкции межпозвоночных дисков, успешно внедряемого в клиническую практику [3].

С целью оценки эффективности неповреждающего лазерного воздействия в отношении индукции регенерации в дегенеративно-измененных тканях МПД и дальнейшего развития метода ЛРД нами был проведен новый длительный комплексный эксперимент. Он состоял в воспроизведении модели дегенерации дисков у кроликов и последующем лечении индуцированной патологии методом ЛРД. В качестве модели была выбрана методика [20, 31], использующая минимальное и дозируемое хирургическое повреждение тканей МПД (неполнослойный прокол ФК), в результате которого развивается дегенерация, протекающая сходно с дегенерацией МПД у человека.

Данная модель является хорошо воспроизводимой и обеспечивает контролируемое прогрессирующее дегенеративное изменение МПД, что является важным при испытании лечебных средств, которые могут быть использованы уже на ранних стадиях остеохондроза позвоночника.

Для оценки дегенеративных изменений МПД в работах [20, 31] использовались рентгенография, магниторезонансная томография и гистологические исследования. Однако систематическое исследование макроскопических изменений и гистологическое изучение дисков в ходе развития индуцированной дегенерации не проводилось. Сопоставление данных макроскопических наблюдений с результатами микроскопии ранее также не было выполнено. Кроме того, максимальный срок наблюдения после индуцирующего дегенерацию экспериментального воздействия в большинстве исследований не превышал полугод. Отсутствовало изучение интактных дисков у экспериментальных животных, хотя на другой модели остеохондроза у кроликов (артродез) было показано [25] наличие мягких дегенеративных изменений в интактных дисках, ближайших по анатомической локализации к искусственно поврежденным дискам. Поэтому мы попытались восполнить указанные пробелы, выполнив сравнительный анализ результатов макроскопического и гистоморфологического исследований и увеличив срок послеоперационного наблюдения.

В настоящей работе мы приводим результаты первого этапа данного исследования. Этот этап включал в себя воспроизведение пункционной модели дегенерации МПД и сопоставление данных

тщательного макроскопического наблюдения, гистологического и гистохимического анализа изменений как интактных, так и дегенеративно-измененных дисков кроликов на протяжении 9-месячного эксперимента. Кроме того, изучались диски с повторным (через 5 недель после первого) проколом ФК с целью: 1) изучения изменений, которые могут возникнуть в результате повторной травмы диска, и 2) получения контрольных образцов для сравнения с облученными лазером дисками, которые пунктировались аналогичной иглой.

Материалы и методы

Эксперименты проведены на 20 скелетно-зрелых физиологически здоровых кроликах породы Шиншилла весом 2,8-3,4 кг. Кролики были получены из филиала «Андреевка» НЦБМТ РАМН. Животных содержали в виварии НЦБМТ в соответствии с зоогиgienическим требованиям. Кормление осуществляли гранулированными комбикормами, поение – очищенной водой вволю. Перед постановкой эксперимента животные прошли карантин. Один кролик оставался контрольным, никаких манипуляций на нем не проводилось. На остальных кроликах эксперимент проводился в 2 этапа. На первом этапе в 4-х поясничных дисках каждого из 19-ти кроликов были инициированы дегенерационные изменения по методу, описанному в статье [31]. Операции проводились под общим наркозом (Zoletil 50, 10 мг/кг и Rometar, 2%, 0,2 мл/1 кг, внутримышечно) в соответствии с нормами GLP. После антибиотикопрофилактики (Цефазолин 1,0 внутримышечно) был произведен доступ к МПД L1-L6 позвонков. Операция выполнялась через

срединный лапаротомный разрез по белой линии живота. Производилась смещение внутренних органов вправо от средней линии. Выполнялось тупое рассечение париетальной брюшины, предпозвоночной фасции, при этом сохранялись все сосудистые образования, благодаря чему операция проходила практически бескровно. Тупым путем осуществлялось скелетирование передней поверхности поясничных позвонков и МПД. На уровне диска L2-L3 на поясничной мышце слева фиксировалась лавсановая метка, которая служила ориентиром при последующем вмешательстве. В вентральной или вентрально-латеральной области 4 поясничных МПД иглой для инъекций 18G со специальным ограничителем выполнялся неполнослойный прокол ФК на глубину 5 мм. Операция завершалась послойным ушиванием операционной раны узловыми швами. Длительность операции в среднем составляла 20 мин. Кровопотеря в среднем составляла 5-10 мл. В течение 5 дней после операции оперированным животным проводилась антибиотикопрофилактика (Cefazolin 1,0 внутримышечно).

На втором этапе через 5 недель после начала эксперимента 19-ти животным была выполнена повторная операция по вышеописанной схеме с использованием того же хирургического доступа (по предыдущему рубцу). Выполнялось разделение рубцов тупым методом, скелетировались позвонки и МПД. По наличию лавсановой метки и внешних изменений выбирали 4 ранее пунктированных диска для повторного воздействия. В вентральной или вентрально-латеральной области 3-х дисков выполнялся полнослойный прокол ФК в область ПЯ пункционной иглой 20G. В 2 диска через иглу вводи-

лось оптическое волокно, через которое было произведено лазерное облучение области ПЯ в различных неабляционных режимах. Один диск после второго прокола не облучался. Длительность операции в среднем составляла 30 мин., а кровопотеря – 5-10 мл. В течение 5 дней после операции проводилась антибиотикопрофилактика. Один кролик после повторной операции не вышел из наркоза.

Таким образом, в результате двух проведенных операций у каждого животного первый диск служил для изучения развития дегенерации, второй – для влияния дополнительного прокола на эти дегенеративные изменения, а два диска – для исследования эффективности лазерного воздействия на дегенеративно-измененные ткани МПД.

Животные выводились из эксперимента с помощью передозировки барбитурата (Pentobarbital sodium 1,2 г/кг). Животные опытной группы были забиты через 6 недель (4 кролика), 10 (3 кролика), 18 (4 кролика), 32 (4 кролика) и 40 (3 кролика) недель после начала эксперимента.

Фрагменты позвоночника (Th12-S1 позвонков) вырезали сразу после вскрытия и механически отделяли от мышечной ткани и связок. По местоположению лавсановой метки проводилась идентификация дисков, как интактных, так и дисков с одним или двумя проколами.

Всего для макроскопического и морфологического исследования было получено 120 межпозвоночных дисков. Из них 48 дисков были интактными, 18 дисков с моделированием дегенерации, 18 дисков с повторным проколом и 36 дисков, подвергнутых лазерному воздействию. Часть дисков была извлечена вместе с костными фрагментами при-

лежащих позвонков для приготовления в дальнейшем гистологических срезов, отражающих структуру дисков в сагиттальной плоскости. При выделении другой части дисков вырезку проводили параллельно видимым границам замыкательных пластин (ЗП) и тел позвонков; гистологические препараты для этой части биопсийного материала отражали структуру срезов дисков во фронтальной плоскости.

До погружения биоптатов в фиксирующий 10%-й раствор нейтрального формалина были проведены измерения высоты МПД в вентральной и обеих латеральных областях (по наружной поверхности дисков). При наличии остеофита измеряли его внешний диаметр. Кроме того, для дисков, вырезанных вдоль поверхностей ЗП, были измерены максимальный (продольный, между двумя крайними латеральными точками) и минимальный (поперечный, между крайними спинальной и вентральной точками) размеры диска в целом и ПЯ в отдельности, а также высота остеофита (при его наличии). Кроме того, выполнялось фотографирование дисков, их детальное визуальное изучение и систематическое описание, включавшее оценку по 18 наборам признаков.

После фиксации и декальцинации биоптатов изготавливали парафиновые срезы толщиной 4-5 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван-Гизону для изучения коллагеновых волокон, а также толуидиновым синим для выявления протеогликанов. Препараты исследовали и фотографировали с использованием светового микроскопа OLYMPUS BX51, оснащенного цифровой видеокамерой Sanyo, при увеличении от 40x до 1000x.

Статистический анализ результатов исследования был выполнен при помощи стандартного пакета статистических программ SPSS 13.0 for Windows и стандартной программы Microsoft Excel 2000. Описание и анализ морфометрических параметров и макроскопических признаков интактных и дегенеративно-измененных дисков проводились с использованием параметрических и непараметрических статистических тестов с учетом типов переменных и вида распределения их значений. Сравнение наблюдаемых частот проявлений номинальных признаков, а также выявление признаков, между которыми существует статистически значимая связь, проводили путем анализа таблиц сопряженности с использованием критерия Крамера (V) и точного критерия Фишера (F). Для оценки статистической значимости различий морфометрических признаков МПД применяли дисперсионный анализ ANOVA (при условии нормальности распределения значений исследуемых признаков), Н-тест Краскела-Уоллиса (KW) и U-тест Манна-Уитни (MW). Взаимосвязи количественных, а также порядковых и дихотомических признаков изучали с использованием корреляционного анализа (коэффициент корреляции Спирмэна, Rs). Во всех случаях использовали двусторонние критерии при 5%-м уровне значимости.

Результаты

Макроскопическое исследование межпозвонковых дисков

Интактные диски. Со стороны фронтальных поверхностей интактные МПД кроликов имеют специфическую анатомическую форму, в целом, при-

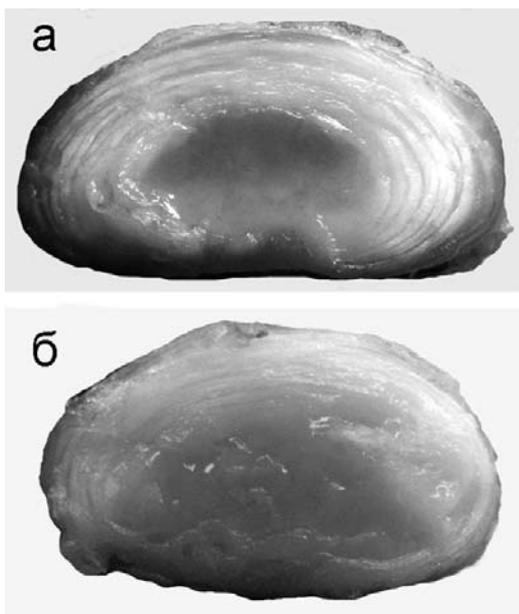


Рис. 1. Интактные диски; а - диск L7-S1; срок 6 недель. Отчетливо видны слоистое ФК и полупрозрачное ПЯ; б - диск L6-L7; срок 32 недели. Диффузное помутнение ПЯ.

ближенную к бобовидной, с выпуклой вентральной поверхностью и небольшим подковообразным изгибом, направленным к центру диска, на спинальном полюсе. В дисках, расположенных краинальнее (L1-L2, L2-L3), этот изгиб выражен сильнее, чем в дисках, находящихся в каудальной части поясничного отдела позвоночника (L5-L6, L6-L7, L7-S1). ПЯ интактных дисков обладает овальной или округлой формой и, как правило, расположено в центре диска.

Ткань ПЯ – желеобразная, на ощупь мягкоупругая. В дисках контрольного кролика и более чем в половине дисков опытных животных она полупрозрачная (рис. 1а), однако, в других интактных дисках наблюдается очаговое или диффузное помутнение ткани ПЯ различной степени. В дисках каудальной части поясничного отдела помутнение и уплотне-

ние ткани обнаруживается чаще. Данное наблюдение подтверждается обнаруженной положительной корреляцией между признаками «Анатомическая позиция МПД» и «Выраженность диффузного помутнения ткани ПЯ» ($R_s=0,7$; $p = 0,016$; $N= 47$) (рис. 1б).

Граница ФК и ПЯ во всех интактных дисках выделяется отчетливо, благодаря различиям в цвете и консистенции ткани. Ткань ФК – молочно-белая, блестящая, с различной волокнистостью, плотная. Толщина ФК в интактных дисках относительно равномерная, иногда (в задних поясничных дисках) отмечается утолщение ФК в боковых порциях.

Высота интактных МПД, измеренная по средней линии вентральной поверхности, изменялась от 3,5 (для дисков L1L2) до 6,5 мм (для дисков L7S1) и составляла, в среднем, $4,7\pm 0,9$ мм. В боковых порциях дисков она была несколько меньше ($3,8\pm 0,5$ мм), минимальные значения этого показателя отмечались в верхних дисках поясничного отдела позвоночника (2,6 мм в L1L2), а максимальные – в нижних дисках (4,8 мм в L7S1).

Расстояние между двумя крайними латеральными точками МПД (максимальный диаметр) было, в среднем, равно $11,3\pm 2,1$ мм. Минимальный диаметр (расстояние между крайней спинальной и крайней вентральной точками диска) – $6,6\pm 1,1$ мм. Значения обоих указанных параметров были наибольшими для дисков каудальной части поясничного отдела (в L7S1 максимальный диаметр до 15,5 мм и минимальный диаметр до 8,0 мм) и наименьшими – для верхних поясничных дисков (в L1L2 максимальный диаметр до 9,0 мм и минимальный диаметр до 5,0 мм).

Максимальный и минимальный диа-

Таблица 1

Динамика морфометрических параметров интактных МПД кроликов за время эксперимента

Этап эксперимента	Показатель	Н1, мм	Н2, мм	Дмакс, мм	Дмин, мм	ПЯ макс, мм	ПЯ мин, мм
Начальный (до 6 недель)	Среднее±Ст. откл.	4,7±0,9	3,8±0,5	11,3±2,1	6,5±0,9	6,6±1,0	3,8±0,6
	N	19	19	9	9	9	9
Промежуточный (10-18 недель)	Среднее±Ст. откл.	4,2±0,5	3,7±0,4	10,3±1,7	6,0±0,6	7,5±0,7	3,5±0,1
	N	10	10	5	5	2	2
Заключительный (32 –40 недель)	Среднее±Ст. откл.	4,1±0,6	3,6±1,0	12,7±1,0	6,6±0,4	7,7±1,0	3,5±0,6
	N	14	14	4	4	4	4
Всего	Среднее±Ст. откл.	4,4±0,7	3,7±0,7	11,3±1,9	6,4±0,8	7,0±1,1	3,6±0,5
	P1 (тест KW)	0,10	0,45	0,16	0,11	0,28	0,49
	Rs	-0,325*	-0,192	0,214	-0,008	0,417	-0,307
	P2 (Rs)	0,033	0,217	0,393	0,975	0,122	0,265
	N	43	43	18	18	15	15

Н1 – высота диска, измеренная по средней линии вентральной поверхности;
 Н2 – средняя высота диска, измеренная по боковым поверхностям;
 Дмакс – максимальный диаметр диска; Дмин – минимальный диаметр диска; ПЯмакс – максимальный диаметр пульпозного ядра; ПЯмин – минимальный диаметр пульпозного ядра;
 P1 – статистическая значимость различий между группами по данным теста KW;
 P2 – статистическая значимость коэффициента корреляции Rs;
 Rs – коэффициент корреляции Спирмена между морфометрическими признаками и этапом эксперимента.

метры ПЯ заметно варьировали даже у дисков, располагавшихся на одном и том же анатомическом уровне у разных животных (различия до 1-1,5 мм). В среднем, максимальный и минимальный диаметры ПЯ составляли примерно 59±8% от соответствующих диаметров интактных МПД.

В целом, отмечалось увеличение размеров дисков, располагающихся на различных анатомических уровнях, в

направлении от краниального к каудальному концам поясничного отдела позвоночника. Однако статистически значимые различия между дисками по перечисленным морфометрическим признакам отсутствовали. Вместе с тем, в интактных дисках все описанные морфометрические признаки статистически значимо коррелировали между собой (т.е. изменение геометрии диска по какой-либо оси сопровождалось измене-

нием по другим осям).

За время эксперимента (9 мес.) в интактных дисках наблюдался ряд изменений макроскопических признаков и морфометрических параметров (табл. 1), которые можно интерпретировать как проявление естественных процессов (старение), а также результат спонтанной дегенерации, обусловленной механической нестабильностью позвоночника, возникшей после экспериментального повреждения других МПД поясничного отдела при создании модели (см. Обсуждение результатов).

Высота интактных дисков, измеренная по средней линии их вентральной поверхности, за все время эксперимента уменьшалась. Об этом свидетельствует слабая статистически значимая отрицательная корреляция между значениями данного морфометрического признака и сроком наблюдения ($R_s = -0,348$; $p = 0,016$; $N = 47$). Кроме того, по данным U-теста Манна-Уитни, этот показатель статистически значимо снижается к концу периода наблюдения (не ранее 32-й недели), по сравнению с начальным этапом эксперимента (MW , $p = 0,037$; $N = 33$). Статистически значимых изменений высоты МПД в латеральных порциях, максимальных и минимальных диаметров интактных дисков и ПЯ за время эксперимента не наблюдалось. Эти факты свидетельствуют о действии на вентральные отделы интактных МПД сжимающей нагрузки, направленной вдоль оси позвоночника и возникающей, вероятно, как вторичный эффект пункционной модели дегенерации дисков.

По мере увеличения срока наблюдения, в интактных дисках увеличивалась частота встречаемости диффузного помутнения ПЯ ($R_s = 0,630$; $p = 0,004$; $N =$

19), а также выраженность диффузного помутнения ($R_s = 0,651$; $p = 0,003$ $N = 19$).

Начальные признаки формирования остеофитов отмечались в 4 из 48 интактных дисков (на 18-й и 32-й неделях эксперимента). В одном из интактных дисков на 40-й неделе эксперимента был обнаружен сформированный остеофит. Все остеофиты локализовались на вентролатеральных поверхностях МПД. Образование остеофитов происходило вне связи с каким-либо конкретным анатомическим уровнем, а также не было различий между «верхними» и «нижними» дисками по частоте развития остеофитов.

Форма ПЯ и толщина ФК интактных дисков изменялись незначительно. Граница между ФК и ПЯ была хорошо различима в течение всего периода наблюдения.

Пункционная модель дегенерации МПД. Макроскопически было изучено 18 дисков, подвергавшихся однократному неполнослойному проколу, из них 6 дисков – вырезанных вдоль поверхностей ЗП (с обнажением фронтальных поверхностей) и 12 дисков, вырезанных вместе с прилежащими фрагментами тел позвонков.

Морфометрическое исследование не выявило статистически значимых различий высот и диаметров дисков, а также диаметров ПЯ между модельными и интактными дисками. Однако, в отличие от интактных МПД, высота и другие морфометрические параметры дисков, подвергшихся проколу, статистически значимо не изменялась за весь период наблюдения. Нельзя исключить, что стабилизация морфометрических параметров обусловлена изменением механических характеристик пунктированных дисков.

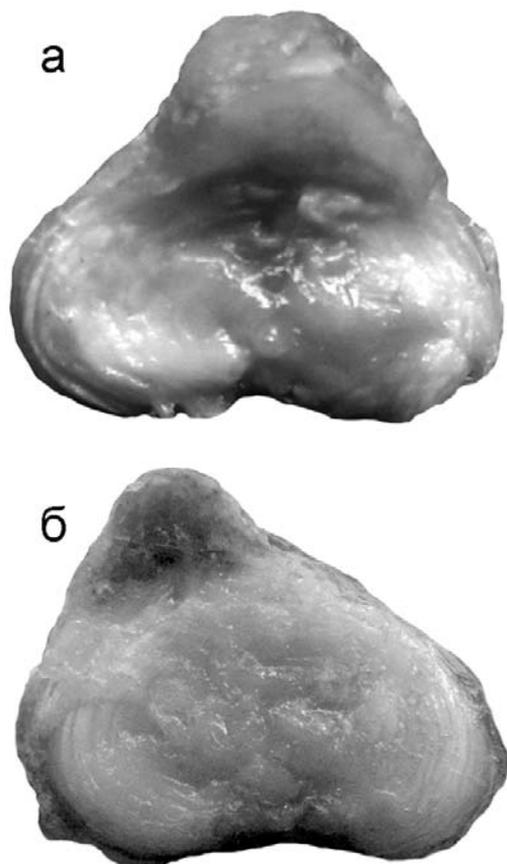


Рис. 2. Дегенеративно-измененные диски; а - диск L4-L5, срок 6 недель; вверху крупный хрящевой остеофит; диффузно-очаговое помутнение ПЯ; участки гомогенизации ФК; б - диск L3-L4, срок 32 недели; вверху костно-хрящевой остеофит; резко выраженное помутнение ПЯ и отсутствие четкой границы между ФК и ПЯ.

Диски, подвергавшиеся однократному проколу, резко отличались от интактных по своим макроскопическим признакам на всех этапах эксперимента (табл. 2). Уже к 6-й неделе после операции в половине пунктированных дисков отмечались начальные признаки образования остеофитов, а, начиная с 12-й недели эксперимента, у большинства из них обнаруживались сформированные

остеофиты. Они возникали в зоне прокола ФК на вентральной или левой вентролатеральной стороне диска. На ранних сроках (6-10 недель) остеофиты состояли преимущественно из хрящевой ткани, позже они, как правило, были костнохрящевыми (рис. 2а, б).

Наибольшие изменения в дегенеративно-измененных дисках, по сравнению с интактными, претерпевает ткань ПЯ. В ранние сроки наблюдения на фоне всегда выраженного диффузного помутнения ткани ПЯ имеются локальные уплотнения молочно-белого цвета. В дальнейшем область ПЯ замещается рыхлой молочно-белой непрозрачной тканью, по цвету почти неотличимой от ФК (рис. 2а, б). На сроке 40 недель ФК и ПЯ практически не различаются по структуре, цвету и консистенции. В ткани ПЯ наблюдаются также дефекты: полости и трещины.

Граница между ФК и ПЯ становилась нечеткой, определялась только за счет разницы в консистенции тканей (с 6-й по 10-ю недели эксперимента), а затем практически полностью исчезала (начиная с 18-й недели наблюдений). Выраженность границы ФК и ПЯ отрицательно статистически значимо коррелировала со сроком эксперимента ($R_s = -0,840$, $p = 0,036$; $N = 6$). В двух дисках в зоне контакта ФК и ПЯ были обнаружены отдельные небольшие (0,5 мм) каменно-плотные зерна, вероятно, кальцинаты. В некоторых дисках на отдельных участках границы ФК и ПЯ определялась борозда.

В ФК происходило выраженное увеличение толщины внутреннего слоя, который приобретал молочно-белый цвет и сходную с тканью ПЯ консистенцию. Волокнистость ФК сохранялась только в его наружной трети. На спинальном

Таблица 2

Сравнение макроскопических признаков дегенеративно-измененных и интактных дисков

Признак	Субкатегории признака	Контроль, % от числа наблюдений	Модель, % от числа наблюдений	Результаты статистического анализа
Формирование остеофитов	Нет признаков	89,6	5,9	V, $p < 0,001$; N=65; Rs=0,810, $p < 0,001$; N=65
	Начальные признаки	8,3	35,3	
	Сформированный	2,1	58,8	
Частота встречаемости диффузного помутнения в ПЯ		47,4	100	F, $p = 0,051$; N= 25; V, $p = 0,022$; N=25; Rs=0,459; $p = 0,021$; N=25
Выраженность диффузного помутнения в ПЯ	Отсутствует	21,1	0	V, $p = 0,003$; N= 25; Rs=0,650; $p < 0,001$; N=25
	Слабое	36,8	0	
	Умеренное	26,3	0	
	Выраженное	15,8	100	
Выраженность границы ФК и ПЯ	Граница почти не различима	0	66,7	V, $p < 0,001$; N= 25; Rs= - 0,786; $p < 0,001$; N=25
	Различима	21,1	33,3	
	Четко выражена	78,9	0	
Плотность ткани ПЯ	Однородная	89,5	50,0	F, $p = 0,070$; N= 25; V, $p = 0,035$; N=25; Rs=0,421; $p = 0,036$; N=25
	Неоднородная	10,5	50,0	
Очаговое истончение ФК	Отсутствует	89,5	33,3	F, $p = 0,015$; N= 25; V, $p = 0,005$; N=25; Rs=0,561; $p = 0,004$; N=25
	Имеется	10,5	66,7	
«Гомогенизация» ФК в спинальной области диска	Отсутствует	84,2	33,3	F, $p = 0,032$; N=25; V, $p = 0,016$; N=25; Rs=0,484; $p = 0,014$; N=25
	Имеется	15,8	66,7	

полусе ткань ФК в наибольшей степени становилась визуальнo гомогенной. В крайней спинальной точке некоторых дисков обнаруживалось резко выраженное истончение ФК.

Статистически значимые различия по частоте встречаемости и выраженности ряда макроскопических признаков между дегенеративно-измененными МПД, подвергавшимися однократному неполнослойному проколу и интактных дисков, представлены в табл. 2.

Дегенеративно-измененные диски, подвергавшиеся двум последовательным проколам. При сравнении МПД, подвергавшихся однократному неполнослойному проколу (модель дегенерации), с дисками, где был произведен вторичный (полнослойный) прокол, было обнаружено принципиальное сходство наблюдаемых макроскопических изменений. Статистически значимых различий по частоте встречаемости и выраженности каких-либо отдельных макроскопи-

ческих изменений, а также по значениям морфометрических параметров дисков между указанными двумя подгруппами также не выявлено.

Гистологическое и гистохимическое изучение интактных и дегенеративно-измененных межпозвоноковых дисков

Были изучены 8 МПД из поясничного отдела позвоночника (включая диски, пограничные с грудным и крестцовым отделами) одного контрольного животного, а также 40 интактных дисков, которые не подвергались никаким воздействиям, от 18 опытных животных. Кроме того, изучались 18 дисков с моделированием дегенерации и 18 дисков, которые вторично пунктировались через 5 недель после первой пункции. Так как статистически значимых различий между двумя последними группами дисков по 18 макроскопическим и 36 микроскопическим показателям не было обнаружено ни макро-, ни микроскопически, то мы приводим их общее описание.

Интактные диски. На сагиттальных гистологических срезах МПД состоит из ФК, ПЯ, занимающего центральную область диска, и ЗП, отделяющих ФК от костной ткани позвонков. ЗП в свою очередь состоит из наружного слоя гиалинового хряща и внутреннего слоя костной ткани, которая чаще непосредственно граничит с наружными пластинами ФК, реже отделена от них очень тонким слоем (2-3 ряда клеток) гиалинового хряща. Этот слой обнаруживается не во всех дисках и только в его средней части. Такая слоистая структура ЗП, характерная для кроликов, отличает ее от ЗП человека, состоящей только из гиалинового хряща.

Хрящевой слой ЗП образован типичными для гиалинового хряща хондроци-

тами, окруженными широкой лакуной (рис. 3а). Клетки образуют колонки. Межклеточный матрикс гомогенный, базофильный при окраске гематоксилином и эозином. При окраске толуидиновым синим матрикс хряща ярко метакроматичен, что указывает на высокое содержание протеогликанов (агреканов). Костный слой ЗП имеет структуру, идентичную костной ткани позвонков: губчатая кость с широкими трабекулами, формирующими полости, заполненные костным мозгом.

Диск на сагиттальных срезах вытянут в вентрально-спинальном направлении, имеет форму песочных часов, так как ЗП на его середине несколько вдавливается в диск. ФК образовано фиброзным (волокнистым) хрящом и состоит из плотно прилегающих друг к другу пластин (ламелл). Ламеллы имеют циркулярную структуру, окружая со всех сторон ПЯ. При этом на спинальном полюсе ламеллы образуют крутой остроугольный изгиб, а на вентральном изгибаются плавно (U-образно). На каудальной стороне диска структуры ФК истончаются, и ткань ядра часто контактирует с костным слоем ЗП, либо с внутренними тонкими прослойками гиалинового хряща. ПЯ на сагиттальных срезах имеет удлинненную овальную форму или форму песочных часов. На фронтальных (т. е. перпендикулярных оси позвоночника) срезах весь диск и ПЯ в его центре имеют слабо вытянутую форму овала.

Ламеллы ФК образованы коллагеновыми волокнами приблизительно одинаковой толщины, которые ориентированы в соседних ламеллах под углом друг к другу. Наиболее плотно волокна в ламеллах и сами ламеллы упакованы в наружном слое ФК. Клетки там представлены,

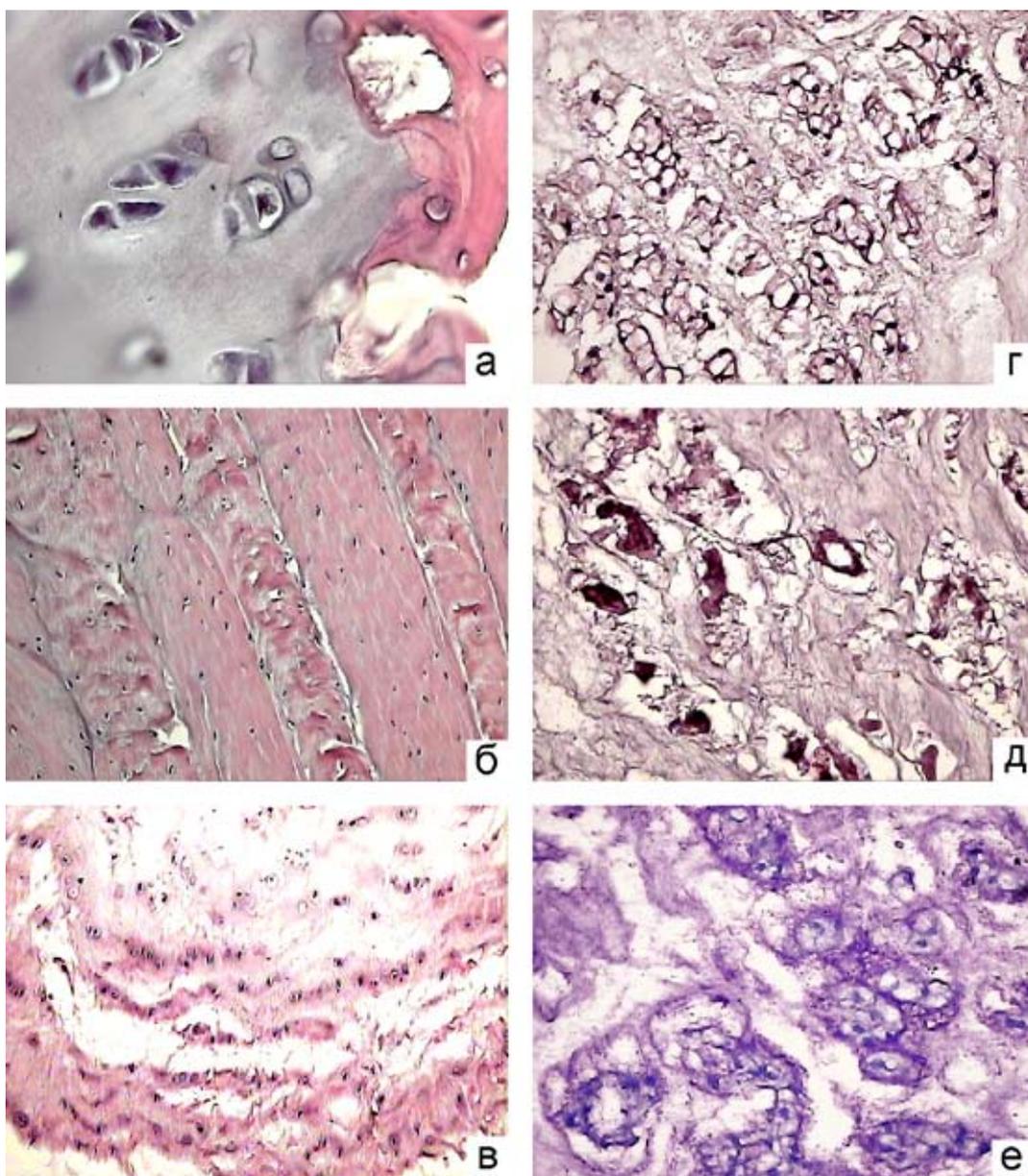


Рис. 3. Нативные структуры МПД в интактных дисках.

а - диск L1-L2, срок 6 недель. Замыкательная пластинка. Справа - костная ткань тела позвонка, слева - гиалиновый хрящ ЗП. Ув. 1000. б - диск L7-S1, срок 6 недель. Наружный слой ФК. Видны ламеллы, прочно прилежащие друг к другу, между коллагеновыми волокнами - хондроциты. Ув. 200. в - диск L7-S1, срок 6 недель. Внизу - внутренний слой, сверху - переходной слой ФК. Ув. 200. г - диск L7-S1, срок 6 недель. ПЯ с рыхлым матриксом, кластерами нотохордальных клеток. Ув. 200. д - диск L7-S1, срок 6 недель. ПЯ с уплотненным матриксом, кластеры хондроцитоподобных клеток. Ув. 400. е - диск L7-S1, срок 6 недель. Накопление протеогликанов вокруг одиночных клеток и кластеров ХПК в ПЯ. Ув. 400. а-д - окраска гематоксилином и эозином; е - окраска толуидиновым синим.

в основном, фибробластоподобными, вытянутыми элементами, чаще всего без лакун. В среднем слое клетки имеют овальные ядра, слабо вытянутую цитоплазму, но, часто и округлые ядра с четкими лакунами (рис. 3б).

Внутренний слой ФК представлен более рыхлой тканью, а ламеллярная структура выражена менее четко. Клеточные элементы внутреннего слоя ФК имеют округлые или овальные ядра, часто четкую лауну. Тонкий переходный слой, расположенный на границе ФК и ПЯ, содержит небольшое количество клеточных элементов и рыхлый матрикс (рис. 3в). При окраске по Ван-Гизону коллагеновые волокна наружного и среднего слоя ФК ярко фуксинофильны, а во внутреннем и переходном слое они окрашиваются слабее, особенно в рыхлых участках. Содержание протеогликанов во всех слоях высокое.

ПЯ состоит из очень рыхлого богатого протеогликанами матрикса, образованного двумя компонентами – тонкофибриллярным и тонкогранулярным. Преобладает тонкофибриллярный компонент, который окрашивается по Ван-Гизону в розовый цвет. В матриксе неравномерно распределены многоклеточные кластеры (рис. 3г), содержащие от 3 до 20 клеток. Они состоят из нотохордальных клеток (НХК), имеющих округлое плотное ядро и светлую, сильно вакуолизированную цитоплазму. Среди этих клеток (особенно в спинальной части ПЯ) имеется от 10 до 20% так называемых хондроцитоподобных клеток (ХПК). У этих клеток цитоплазма плотная, эозинофильная, ядра мелкие, округлые. ХПК в основном расположены отдельно, но местами формируют небольшие кластеры (рис. 3д). Матрикс в участках скопления ХПК богаче

тонковолокнистыми структурами и протеогликанами, он плотнее, чем в зонах, содержащих кластеры НХК (рис. 3е).

Такая нативная структура имела в подавляющем числе изученных дисков контрольного кролика и интактных дисков опытных кроликов через 5 недель после начала опыта. Однако в диске L7-S1 у контрольного животного и в таком же диске у одного из опытных животных во внутренней трети ФК отмечаются дистрофические изменения, проявляющиеся в кариорексисе и кариолизе части ядер, наличии пустых лакун, разрыхлении матрикса. В ПЯ часть ядер в кластерах НХК имеет признаки кариопикноза и кариолиза, видны также относительно крупные бесклеточные участки матрикса (рис. 4а). При окраске толуидиновым синим в рыхлой ткани внутреннего слоя ФК метакромазия матрикса ослабевает и остается интенсивной в основном вокруг клеток. В ПЯ метакроматическая субстанция матрикса более интенсивно окрашивается вокруг кластеров НХК. Особенно большое содержание протеогликанов обнаруживается вокруг кластеров и одиночных ХПК. Там они иногда формируют слоистые ободки (чехлы).

Через 10 недель после начала эксперимента в интактных дисках у опытных животных структура ЗП, наружного и среднего слоев ФК не меняется. Внутренний слой ФК и ПЯ у большинства животных также остаются неизменными. Только в диске L5-L6 одного из животных во внутреннем и промежуточном слоях ФК, в также в ПЯ часть клеток имеет признаки дистрофии, а другая часть – крупное ядро и цитоплазму, занимающую практически всю лауну (рис. 4б). Вокруг последних клеток отмечается пояс отложения протеогликанов (яркая

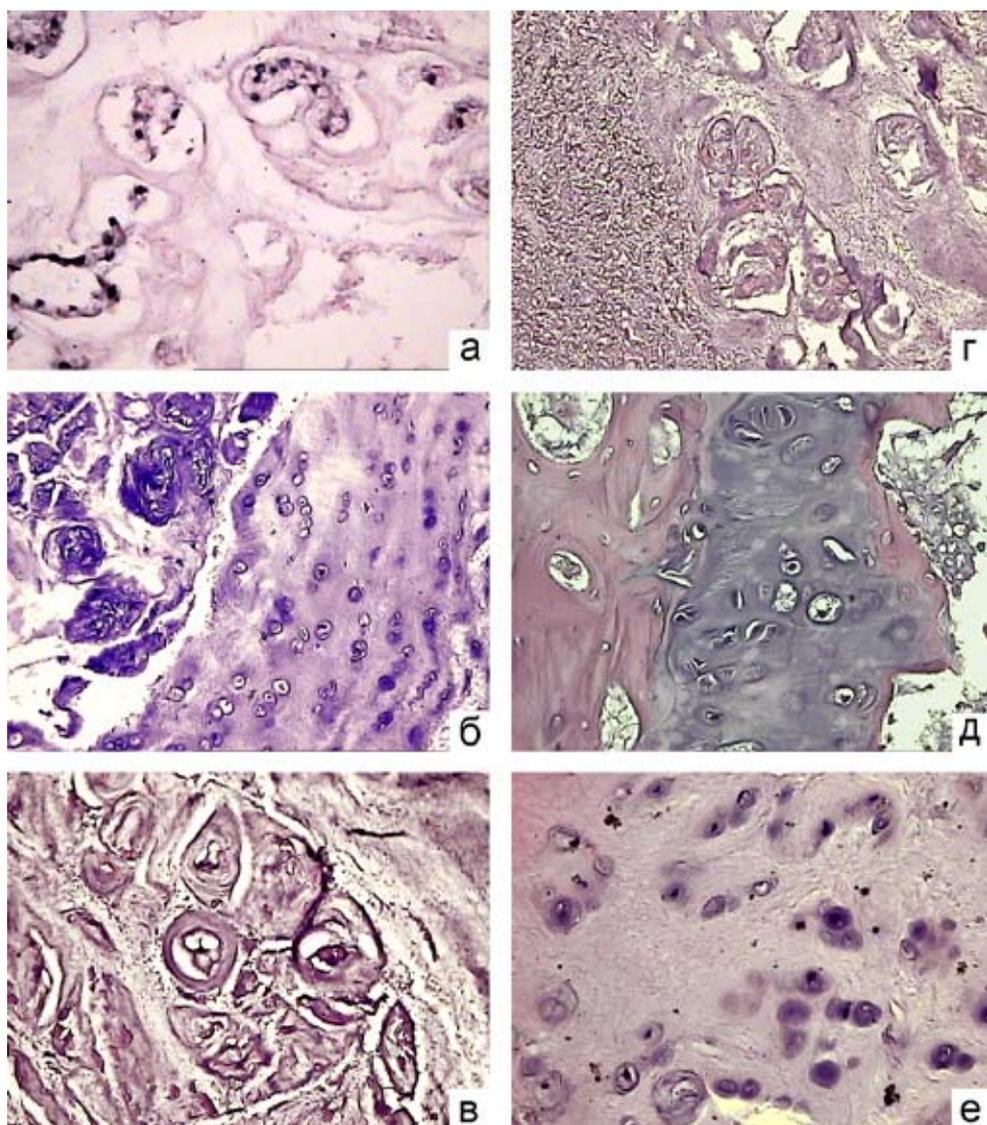


Рис. 4. Гистологические изменения интактных дисков.

а - диск L7-S1 контрольного кролика. Участок ПЯ с дистрофически измененными НХК. Ув. 400. б - диск L5-L6, срок 10 недель. Во внутреннем и промежуточном слоях ФК часть клеток в состоянии дистрофии, часть - пролиферирующие активные хондроциты. В ПЯ большие кластеры дистрофически измененных НХК, внутри и вокруг них протеогликаны. Ув. 200. в - диск L1-L2, срок 18 недель. Участок ПЯ с уплотненным матриксом («чехлы») вокруг клеточных кластеров и отдельных ХПК. Между кластерами зернистый распад матрикса. Ув. 400. г - диск L6-L7, срок 32 недели. ПЯ с уплотненным матриксом вокруг кластеров и дистрофией клеток в них. Слева - поля зернистого распада матрикса и некроз клеток. Ув. 200. д - диск L1-L2, срок 40 недель. Гиалиновый слой ЗП, участки некроза, оссификации и фибриллизации матрикса, видны также реактивные хондробласты. Ув. 400. е - диск L1-L2, срок 40 недель. Участок измененной структуры во внутреннем и переходном слоях ФК. Преобладают крупные активные хондроциты, но слева видны дистрофически измененные клетки. Ув. 400. а, в-г - окраска гематоксилином и и эозином; б - окраска толуидиновым синим.

метахромазия). Это признаки биосинтетической активности хондроцитов в ответ на дистрофию и некроз части клеток. В ПЯ увеличивается также доля ХПК.

Через 18 недель в интактных дисках прогрессируют дегенеративные изменения. У трех животных из четырех в большей или меньшей степени выявляются эти изменения, причем не только в задних, но и в передних дисках. В хрящевом слое ЗП обнаруживаются небольшие участки истончения, дистрофии и некроза клеток, кальциноза и оссификации хряща. Большую часть ПЯ занимают ХПК, между которыми видны маленькие кластеры НХК. На вентральном полюсе ПЯ матрикс рыхловолокнистый, но значительно более плотный, чем в интактном ПЯ ранних сроков. На противоположном полюсе видны участки, где кластеры НХК окружены ободком из плотной метахроматичной субстанции (рис. 4в). Видны также крупные поля бесклеточного матрикса. Кроме того, редко встречаются небольшие фокusy зернистого распада ткани. Клетки при этом подвергаются дистрофии, либо частично исчезают. И только в центре ядра сохраняются участки, где видны кластеры НХК, отдельные клетки ХПК, а матрикс такой же рыхлый, как в норме. В ряде дисков во внутреннем и промежуточном слоях ФК наряду с участками дистрофии увеличивается содержание активных хондроцитов с тонким ободком из протеогликанов.

Через 32 недели после начала опыта дегенеративные изменения еще больше усиливаются. В хрящевом слое ЗП увеличивается число и размеры участков кальциноза, оссификации, деструкции ткани, дистрофии и некроза хондроцитов. В одном диске у одного животного

в ПЯ видны крупные поля деструкции клеток и матрикса с образованием зернистой вакуолизированной массы (рис. 4г). В других дисках грубые некротические изменения отсутствуют, ПЯ сохраняет кластерную структуру, НХК во все большей степени замещаются ХПК, матрикс уплотняется, особенно вокруг клеток и кластеров. Во внутреннем слое ФК продолжается процесс дистрофии хондроцитов.

Через 40 недель интенсивность дегенеративных процессов уже мало увеличивается, но они захватывают большую часть интактных дисков у всех животных, хотя в задних дисках эти изменения выражены несколько сильнее, чем в передних. Хрящевой слой ЗП несколько истончен (больше с краниальной стороны), имеет участки оссификации, дистрофии клеток и фибриллизации матрикса (рис. 4д), т.е. обнажения его коллагеновых структур вследствие очагового распада протеогликанов. ПЯ в двух дисках имеет крупные участки зернистого распада матрикса с некрозом клеток: в основном ХПК, не образующих кластеров. Такие участки занимают часть ПЯ, а другая часть сохраняет кластерную структуру. Матрикс сгущен вокруг кластеров, а внутри кластеров имеются дистрофические изменения клеток. В других дисках такая деструкция отсутствует, но имеются участки с уплотненным, богатым протеогликанами матриксом. Общее количество как НХК, так и ХПК значительно уменьшено, оставшиеся кластеры сдавлены матриксом, большая часть клеток в них имеет дистрофические и некротические изменения.

Во внутреннем и переходном слоях ФК обнаруживаются такие же изменения, как и в предыдущем сроке. В одном

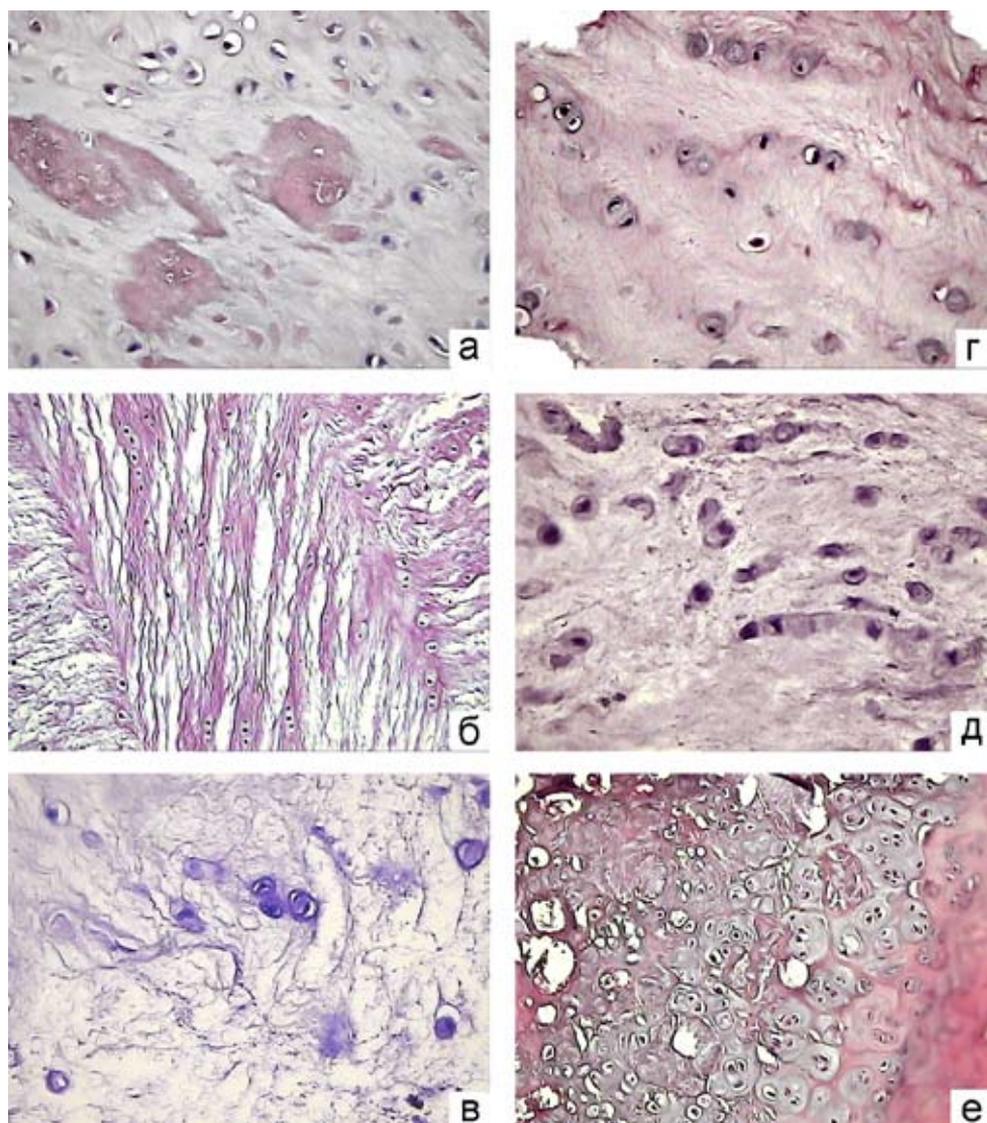


Рис. 5. Дегенеративно-измененные диски (модель) через 6 недель после начала опыта
а – диск L5-L6 (один прокол). Остеофит. Среди хрящевой ткани гиалинового и фиброзного типов видны провизорные остеоидные балки. Ув.400. б – диск L5-L6 (один прокол). Средний слой ФК, разрыхление коллагенового каркаса в пластинах, округлые и овальные хондроциты разных размеров. Ув. 200. в – диск L5-L6 (один прокол). Рыхлая ткань внутреннего слоя ФК с сетчото-ячеестым строением. Часть клеток с дистрофическими изменениями. Видны также крупные активные клетки с метахромазией цитоплазмы и окружающего матрикса. В матриксе метахромазия снижена. Ув. 400. г – диск L5-L6 (один прокол). Фрагмент ПЯ с началом перехода в фиброзный хрящ. Ув. 400. д – диск L3-L4 (один прокол). Трансформация ткани ПЯ в фиброзный хрящ. Видны многочисленные активированные хондроциты и небольшие изогенные группы. Матрикс тонковолокнистый. Ув. 200. е – диск L1-L2 (один прокол). Утолщение и дезорганизация хрящевого слоя ЗП, многочисленные изогенные группы, перемешивание хрящевой ткани и костных трабекул, кальциноз и оссификация хряща. Ув.200. а, б, г-е – окраска гематоксилином и эозином; в – окраска толуидиновым синим.

диске в этих слоях имеются участки ткани, близкой по структуре к фиброзному хрящу (рис. 4е): матрикс тонковолокнистый, клетки в основном активные, хондроциты с толстыми «чехлами» вокруг. Однако в участках, граничащих с ПЯ, много клеток в состоянии дистрофии и некроза.

Модель дегенерации межпозвоноковых дисков. Через 6 недель после начала опыта во всех дисках с одним или двумя проколами на наружной поверхности в местах прокола иглой обнаруживаются остеоциты разных размеров, состоящие на этот срок в основном из хрящевой ткани. Костная ткань представлена в виде отдельных сравнительно небольших балок внутри хряща (рис. 5а). Большую же часть ткани занимает хрящевая ткань, местами гиалинового, местами фиброзного типов. При окраске толуидиновым синим матрикс этой ткани резко метакроматичен, а при окраске по Ван-Гизону умеренно фуксинофилен. Непосредственно под остеоцитами часто видны крупные области некроза в наружной части ФК (результат первоначального прокола).

В большинстве дисков, за исключением области прокола, наружный слой ФК практически не изменен, но в среднем слое ФК в отличие от интактных дисков часто встречаются крупные поля в вентральной части диска, где ткань резко разрыхлена и практически не прослеживается циркулярная структура ламелл. Ламеллы резко истончены, разрыхлены, вплоть до формирования тонких и беспорядочно ориентированных волокон (рис. 5б). Реже аналогичные по структуре участки, но меньших размеров, имеются в среднем слое ФК и на спинальном полюсе диска. В основном, однако, в

среднем слое ФК ламеллярная структура и клеточные элементы сохранены.

Внутренний слой ФК и ПЯ у разных животных изменены в разной степени. В четырех дисках из восьми на этот срок ПЯ еще сохраняет свою структуру, хотя и претерпевает изменения, более выраженные, чем в интактных дисках даже на поздних сроках. Внутренний слой ФК в этих дисках отличается очень рыхлой структурой матрикса, местами сетчатоячеистой. Большая часть клеток находится в состоянии дистрофии или некроза. При окраске толуидиновым синим (рис. 5в) в этой очень рыхлой ткани резко снижается метакромазия матрикса. Она остается лишь в цитоплазме отдельных активных клеток и вокруг них.

Ткань ПЯ в участках, расположенных ближе к вентральному полюсу, полностью лишена клеток. Матрикс в этой области рыхлый, имеет сетчатоячеистую структуру и беден протеогликанами. В центре ПЯ матрикс становится более плотным, там сохраняются клетки, относящиеся, практически, только к ХПК. Часть клеток находится в состоянии дистрофии, вплоть до некроза. Клетки не образуют кластеров. Ближе к спинальному полюсу диска ткань ПЯ имеет рыхло-волокнистый матрикс, но значительно более плотный, чем в нативном ПЯ. Часть клеток не имеют лакун, отличаются умеренно окрашенным ядром и слабо оксифильной цитоплазмой (ХПК). Другая часть клеток представлена окруженными лакунами клетками с округлым плотным ядром, нечетко видимой цитоплазмой (хондроциты) (рис. 5г). Обе субпопуляции клеток перемешаны между собой и распределены в пространстве неравномерно. Все это свидетельствует о том, что в этом участке ПЯ начинает за-

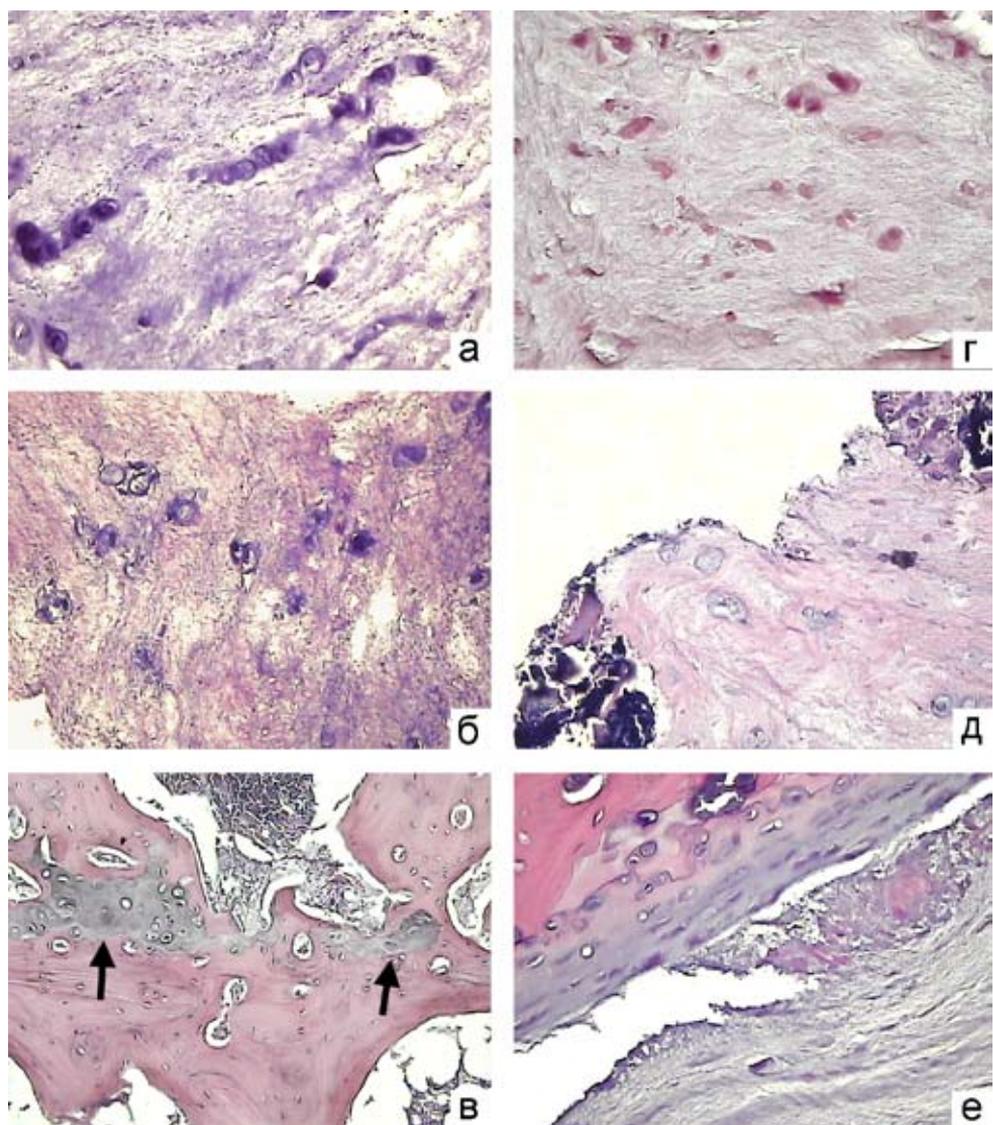


Рис. 6. Дегенеративно-измененные диски (модель) через 10 и 18 недель после начала опыта. а – диск L2-L3 (два прокола), срок 10 недель. Участок во внутреннем слое ФК с увеличением числа активных хондроцитов и мелкой зернистостью в матриксе (отложение солей извести). Ув. 400. б – диск L2-L3 (два прокола), срок 10 недель. Фрагмент ПЯ фиброзного типа с дистрофически измененными клетками и отложением извести в матриксе. Матрикс местами разрыхлен. Ув. 400. в – диск L5-L6 (один прокол), срок 10 недель. Истончение, фрагментация и деструкция хрящевого слоя ЗП; пазушное рассасывание кости. Стрелками обозначены фрагменты хряща. Ув. 200. г – диск L2-L3 (один прокол), срок 10 недель. Ткань фиброзного хряща заместившего ПЯ Ув. 400. д – диск L3-L4 (один прокол), срок 18 недель. Фиброзный хрящ во внутреннем слое ФК с некротически измененными клетками и очагами кальциноза (справа вверху и слева внизу). Ув. 400. е – диск L5-L6 (один прокол), срок 18 недель. Между ЗП и ФК видны слой гиалинового хряща и щель между ЗП и диском, заполненная зернистым распадом ткани, правее – фиброзный хрящ ФК. Ув. 200. а-е – окраска гематоксилином и эозином.

мещаться фиброзным хрящом, т.к. ХПК дифференцируются в хондроциты.

У двух животных на этот срок ПЯ уже полностью замещено тканью, имеющей структуру фиброзного хряща. В одних участках этой ткани клеточные структуры многочисленны. Там преобладают активизированные хондроциты с большими ядрами и вакуолизированной цитоплазмой. Местами они соединяются в двух- трехклеточные изогенные группы. Матрикс в этих участках тонко фибриллярный, но значительно более плотный, чем в нативном ПЯ (рис. 5д). Внутренний слой ФК имеет аналогичную структуру, видимая граница между ними отсутствует.

На сагиттальных срезах отмечаются изменения хрящевого слоя ЗП, особенно на краниальной стороне диска. В этом слое видны участки дистрофии и некроза части хондроцитов, очаги разрыхления и фибриллизации матрикса вплоть до резорбции хрящевой ткани и образования микрополостей. В двух дисках имеются обширные участки утолщения хрящевого слоя ЗП с краниальной стороны. В таких участках в хрящевой ткани видны фокусы костной ткани, т.к., по-видимому, происходит одновременный процесс оссификации хряща и вставания гиалиновой хрящевой ткани в костный слой ЗП и в кость позвонка. В хрящевом слое ЗП полностью нарушена колончатая архитектура клеток, преобладают многоядерные изогенные группы хондроцитов и много активных одиночных молодых клеток (хондробластов), при этом видны участки дистрофии клеток с отложением там извести (рис. 5е). Таким образом, деструкция ЗП, дистрофические и некротические изменения в хрящевом ее слое и оссификация хряща сочетаются с ре-

активными репаративными процессами роста хрящевой ткани.

Кроме того, в двух дисках, в которых ПЯ замещено фиброзным хрящом, образуются разрывы между ЗП и телом позвонка или между оссифицированной и неоссифицированной частями хрящевого слоя. Возможно, это происходит потому, что в результате разрушения и замещения ПЯ возникает перераспределение механической нагрузки вследствие изменения плотности ткани ПЯ.

Через 10 недель остеофиты выявляются во всех дисках, ткань их созревает, что выражается в появлении зрелых костных балок и сосудов. Однако основания остеофитов по-прежнему состоят из гиалинового и/или фиброзного хряща.

Наружный слой ФК изменен мало, за исключением области прокола, окруженного очагами некроза и регенерации за счет активных хондробластов и изогенных групп клеток. В среднем слое ФК есть участки, где в ламеллах происходит разрыхление упаковки и усиление волнистости коллагеновых волокон, а также расщепление самих ламелл.

Во внутреннем слое ФК есть небольшие участки разрыхления, но преобладают участки уплотнения коллагеновых волокон. Клетки в участках уплотнения в основном активные гипертрофические хондроциты, иногда с вакуолизированной цитоплазмой (рис 6а). Часть клеток подвергается дистрофическим изменениям. Характерно, что в таких участках на большом увеличении видно отложение мелкозернистого материала, (известь). Матрикс волокнистый, ламеллярная структура отсутствует.

Ткань ПЯ замещена фиброзным хрящом разной структуры. Местами матрикс состоит из плотноупакованных, но очень

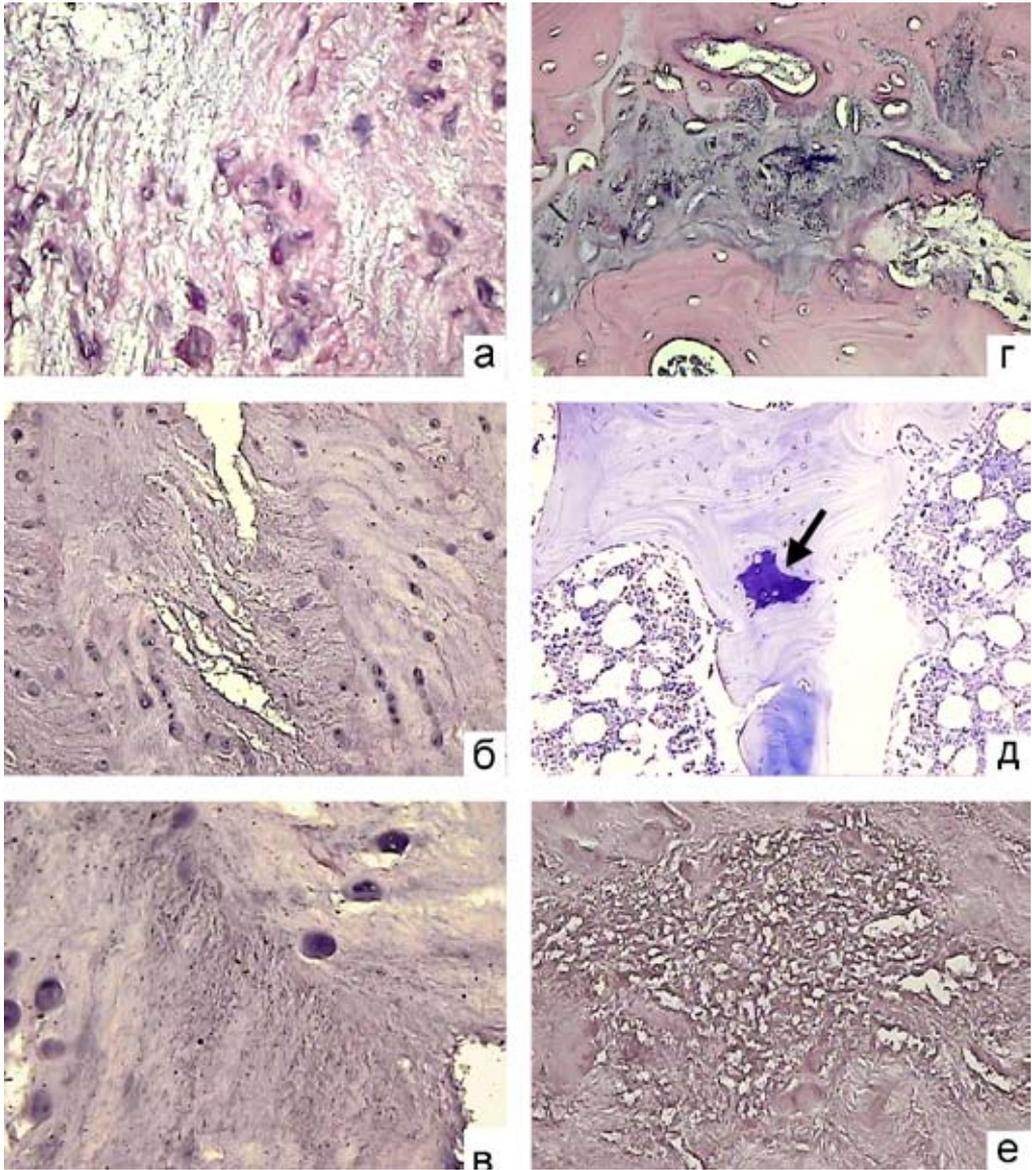


Рис. 7. Дегенеративно-измененные диски (модель) через 32 и 40 недель после начала опыта
а – диск L4-L5 (один прокол), срок 32 недели. ПЯ, замещённое фиброзным хрящом. Справа – участок уплотнения, слева – разрыхления матрикса. Хондроциты дистрофически изменённые и не активные. Ув. 400. б – диск L2-L3 (один прокол), срок 40 недель. Граница внутреннего и среднего слоя ФК, в середине участок некроза и разрыхления с образованием трещин. Ув. 200. в – диск L2-L3 (один прокол), срок 40 недель. Участок фиброзного хряща с зернистой деструкцией волокон матрикса. Ув. 400. г – диск L5-L6 (два прокола), срок 40 недель. Отложение солей извести (гранулы) и участки деструкции в хрящевой ткани ЗП. Ув. 400. д – диск L3-L4 (один прокол), срок 40 недель. В центре небольшой фрагмент гиалинового хряща (стрелка), остающегося после резорбции гиалинового слоя ЗП. Ув. 200. е – диск L2-L3 (два прокола), срок 40 недель. Фокус зернисто-вакуольной деструкции ткани в среднем слое ФК. Ув. 400.
а- г, е – окраска гематоксилином и эозином; д – окраска толуидиновым синим.

тонких волокон с умеренной метахромазией, а клетки частично дистрофичны. а частично представлены гипертрофическими активными хондроцитами. Местами в клетках и матриксе имеются мелкогранулярные отложения извести. Таким образом, внутренний слой ФК и ПЯ состоят из ткани типа фиброзного хряща, но с выраженными дистрофическими изменениями и отложением извести (рис. 6б).

В хрящевом слое ЗП видны участки резорбции хрящевой ткани, замещенные костной тканью. При этом на краниальной стороне дисков таких участков больше, а гиалиновый хрящ истончен в большей степени, чем на каудальной стороне (рис. 6в). Кроме того, вблизи участков наибольшей резорбции хряща происходит также пазушное рассасывание костных балок. Местами в гиалиновом слое встречаются локальные очаги утолщения гиалинового хряща, вдающегося в костную ткань позвонка.

На сагитальном срезе диск имеет форму овала, сужающегося в середине. Наружные слои ФК не изменены, средние слои имеют участки разрыхления. Внутренние слои неотличимы от ПЯ. Последнее представлено фиброзным хрящом, оно смещено к краниальной стороне диска. Ткань, заместившая ПЯ, состоит из относительно тонких, местами плотно упакованных, в других участках рыхло упакованных коллагеновых волокон и крупных клеток в основном без лакун (единичные клетки с лакунами) (рис. 6г). Плотность упаковки матрикса неравномерная – есть рыхлые и плотные участки.

Кроме того, в ПЯ обнаруживаются небольшие очаги зернистой деструкции ткани и мелкие кисты, оставшиеся, по-видимому, после резорбции бывших

участков некроза. Только в одном диске в ПЯ остается фрагмент ядра, где сохранились кластеры НХК, но преобладают ХПК. Показательно, что вокруг сохранившихся кластеров и отдельных клеток видны «чехлы», состоящие из протеогликанов. Следует отметить, что клетки окруженные «чехлами» находятся в состоянии выраженной дистрофии либо деструкции. При окраске толуидиновым синим «чехлы» уплотнены и метахроматичны, а ткань между ними более рыхлая, хотя также сохраняет метахромазию. В других фрагментах ПЯ некротизировано, ткань уплотнена, но бесклеточна.

Следует отметить, что в части дисков отмечается обратный (в сторону центра) изгиб ламелл среднего и внутреннего слоя ФК на вентральном и каудальном полюсе – ретракция ламелл.

Через 18 недель после начала опыта остеофиты обнаружены во всех дисках. В большинстве дисков они состоят в основном из костной ткани, в основании остается гиалиновый хрящ. В одном диске обнаружен небольшой незрелый остеофит, состоящий преимущественно из хрящевой ткани.

В среднем слое ФК есть участки разрыхления и расслоения ламелл, извитых волокон. Наружные ламеллы ФК по полюсам диска изменены мало, но средние ламеллы изгибаются к центру. С вентральной и каудальной сторон ламеллы прослеживаются нечетко. Ткань там состоит из тонких коллагеновых волокон, образующих кримпы, в клетках имеются дистрофические изменения. Во внутреннем слое изменения заключаются в уплотнении матрикса, в котором коллагеновые волокна расположены более беспорядочно, чем в интактном диске, а также в значительном увеличении размеров

клеток. Хондроциты округлые с умеренным увеличением цитоплазмы, с четким и относительно широким ободком плотной метахроматической субстанцией вокруг клеток.

ПЯ большей частью представлено фиброзным хрящом, близким по строению к внутреннему слою ФК. Отмечается множество клеток, аналогичных выше описанным, но волокнистый матрикс более рыхлый. В самом центре в некоторых дисках сохраняются небольшие участки ПЯ с некротизированными ХПК, вокруг которых еще остается «чехол» из протеогликанов.

Необходимо отметить, что на этот срок в большей части дисков усиливаются дистрофические и даже некротические изменения в фиброзном хряще, заместившем внутренний слой ФК и ПЯ. Во внутреннем слое ФК на границе с ПЯ видны участки ткани с тонковолокнистым матриксом, большая часть клеток которых некротизирована. Там же имеются несколько фокусов тканевого распада с отложением солей кальция (рис. 6д). ПЯ полностью замещено фиброзным хрящом. Однако, в отличие от ткани, заместившей внутренний слой ФК, в ней преобладают дистрофически измененные, либо некротизированные клеточные элементы, а крупные округлые клетки с «чехлами» выявляются лишь в небольшой части ПЯ. При окраске толуидиновым синим новообразованная ткань, заместившая ПЯ, имеет сравнительно слабую метахромазию, но там, где клеток больше, метахромазия выше. В ПЯ имеются фокусы зернистого распада.

На сагиттальных срезах отмечается одновременное протекание двух противоположных процессов в слоях гиалинового хряща ЗП: деструктивных и ре-

паративных. На краниальной стороне усиливается фрагментация этого слоя, т.к. значительные его участки замещены костной тканью. Остаются фокусы деструкции и некроза хряща, но одновременно в ряде дисков на краниальной и каудальной стороне усиливаются репаративные процессы в виде пролиферации активных молодых хондробластов с гиперхромным ядром. Эти клетки не имеют лакун, иногда образуют изогенные группы. Часто они встречаются вокруг очагов некроза и замещают их.

В части дисков с краниальной стороны между ЗП и ФК сформирована относительно узкая прослойка гиалинового хряща. Клетки в этой прослойке имеют дистрофические изменения, часть из них отличаются вытянутой формой. Между этой прослойкой и ФК формируется щель, частично заполненная тканью, находящейся в состоянии зернистой деструкции (рис. 6е).

Через 32 недели зрелые костнохрящевые остеофиты обнаруживаются во всех дисках.

Гиалиновый слой ЗП с обеих сторон, особенно с краниальной стороны, имеет многочисленные участки дезорганизации и оссификации хрящевой ткани, а также выраженные признаки регенерации, в виде образования комплексов активных хондробластов и немногочисленных небольших изогенных групп.

Средний и внутренний слои ФК вогнуты в сторону центра диска. Внутренний слой ФК и ПЯ не отличаются друг от друга, так как трансформированы в фиброзный хрящ с практически одинаковой структурой. В этой ткани есть участки резко разрыхленного и уплотненного матрикса. Клетки в обоих этих участках представлены в основном дистрофиче-

скими формами или хондроцитами без признаков биосинтетической активности (рис. 7а). Матрикс в этих участках разрыхленный; содержание протеогликанов снижено.

Через 40 недель после начала опыта во всех дисках имелись остеофиты. Наружный слой ФК мало изменен, в среднем слое видны участки разрыхления, расщепления ламелл, местами нечетко выраженное ламеллярное строение. Внутренний слой ФК и ПЯ в основном замещены тканью фиброзного хряща, в котором остаются большие некротические бесклеточные зоны. Там же образуются множественные щели (трещины) (рис. 7б). Характерно, что сохранившиеся клетки принадлежат к активным хондроцитам с «чехлами» в то время, как рядом много дистрофических и некротизированных клеток. Матрикс в основном тонковолокнистый, но местами он разрушается, и формируются очаги зернистого распада (рис. 7в). Все это свидетельствует об усилении вторичной дистрофии и дезорганизации фиброзного хряща, замещившего ПЯ в этот срок.

Гиалиновый слой ЗП в одних дисках на каудальной стороне сохранен, но в нем имеются участки оссификации, деструкции и регенерации. На краниальной стороне слой истончен, местами сильно фрагментирован. В сохранившейся хрящевой ткани видно отложение солей извести (рис. 7г). В других дисках на краниальной стороне гиалиновый слой практически исчез. На его месте в костной ткани ЗП остается лишь несколько небольших фрагментов хрящевой ткани (рис. 7д). Наружный слой ФК обычный, средний и внутренний слои изогнуты в сторону ФК. В среднем слое имеются несколько фокусов разрыхления, вплоть

до распада ткани, где отсутствуют клетки (рис. 7е). Внутренний слой ФК, как и ПЯ, замещен фиброзным хрящом, однако в зоне бывшего ПЯ в этом хряще видны несколько глубоких щелей. Они образуются в дистрофически измененной ткани, где сохраняется плотный волокнистый матрикс, но большая часть клеток подвергается дистрофическим и некротическим изменениям.

Обсуждение результатов

Одной из целей данного исследования было изучение изменений в интактных МПД кроликов при моделировании дегенерации в других дисках опытных животных

Из литературы известно, что диски кроликов, в основном ПЯ, подвергаются определенным возрастным изменениям [9]. С возрастом в ПЯ происходит постепенное замещение НХК на ХПК. При этом происходит уплотнение матрикса ПЯ. У 4-5-летних животных изменения МПД достигают степени дегенерации [36]. Известно также, что у человека выраженные возрастные изменения МПД, начинаются уже со второго десятилетия жизни [5, 28].

В наших исследованиях у контрольных животных в возрасте 6-7 месяцев, а также в интактных дисках опытных животных, через 6 недель после начала эксперимента в подавляющем числе дисков изменения отсутствуют. ФК сохраняет характерную ламеллярную структуру, а ПЯ свой рыхлый матрикс и кластеры преимущественно НХК. Макроскопически этому соответствуют плотное слоистое ФК и мягко-упругое полупрозрачное ПЯ с четкой границей между ними. Только в единичных дисках (2-х из 19)

в ПЯ обнаруживались очаги дистрофических изменений НХК вплоть до их некроза, а также уплотнение матрикса вокруг клеток. Характерно, что оба этих диска располагались в каудальной части позвоночника (L7-S1). Макроскопически ПЯ в этих дисках имело диффузное помутнение и уплотнение.

Начиная с 10-й недели опыта и до его окончания через 40 недель, гистологически постепенно нарастали дистрофические и некротические изменения в ПЯ: все большее замещение НХК хондроцитоподобными клетками, уплотнение матрикса вокруг кластеров, уменьшение содержания протеогликанов, некроз клеток, появление бесклеточных участков и очагов зернистого распада ткани (клеток и коллагеновых волокон). Во внутреннем слое ФК возникают очаги перестройки ткани с исчезновением ламеллярной структуры. Развиваются дистрофия и некроз части хондроцитов. В гиалиновом слое ЗП появляются небольшие очаги деструкции. Подобные изменения структуры дисков в среднем выражены сильнее в МПД каудального полюса поясничного отдела позвоночника (L6-L7 и L7-S1), чем в дисках краниального полюса. Все эти изменения, однако, не достигают степени разрушения ПЯ, которое, в основном, сохраняет свою нативную кластерную структуру и не трансформируется в фиброзный хрящ. Гистологические изменения подтверждаются макроскопическим исследованием: постепенно нарастающим диффузным и очаговым помутнением ПЯ и менее четкой границей между ФК и ПЯ в ряде дисков, особенно на поздних сроках.

Возникает вопрос – являются описанные изменения проявлением возрастной инволюции дисков или связаны с нарастаю-

щей нестабильностью позвоночника, причиной которой становятся дегенеративные процессы в других дисках этих животных, вызванные моделированием? В работе [25] описаны гистологические особенности интактных МПД кроликов, соседних с дегенеративно измененными дисками (модель с использованием артродеза).

В наших исследованиях мы сравнивали интенсивность дистрофических изменений в интактных дисках в зависимости от того, расположены ли они в непосредственном соседстве с моделированными дисками или отстоят от них на два позвонка. Оказалось, что относительно выраженные изменения были только в первом случае, независимо от того спереди или сзади находились эти диски по отношению к дискам, подвергавшимся экспериментальному воздействию. Это позволяет думать, что нестабильность позвоночника является более важным фактором для изменений в интактных дисках, чем возраст животных. Тем более что даже в конце опыта возраст животных был равен в среднем 80-ти неделям (это не является большим возрастом для кроликов, живущих в среднем 6-8 лет). Кроме того, по нашим данным в дисках, расположенных на границе поясничного и крестцового отделов, дегенеративные изменения выражены сильнее; возможно, на них больше влияет нестабильность позвоночника.

Моделирование дегенеративных изменений в МПД (независимо от одного или двух последовательных проколов ФК) ведет к значительно более выраженным изменениям диска, чем вышеописанные изменения интактных дисков. В местах проколов на наружной поверхности ФК уже через 6 недель возникают остеофиты; в последующем они лишь по-

степенно созревают от преимущественно хрящевой (гиалиновый и фиброзный хрящ) до преимущественно костной структуры путем энхондральной ossификации хряща. Следует отметить, что остеоциты по данным литературы являются неперменной и важной составляющей дегенеративно-измененных дисков у человека при остеохондрозе, а также при экспериментальном моделировании [17, 31].

Наиболее важные изменения при использованной нами модели дегенерации возникают в ПЯ и внутреннем слое ФК. Эти изменения обнаруживаются уже через 6 недель после начала опыта и постепенно прогрессируют вплоть до его окончания (40 недель). Уже в 6 недель в половине дисков (4 из 8) ПЯ и внутренний слой ФК полностью замещаются фиброзным хрящом, в котором отсутствует ламеллярная структура. Наряду с отдельными некротизированными клетками бывшего ПЯ в этом хряще преобладают активные хондроциты, синтезирующие коллаген и протеогликаны, формирующие волокнистый матрикс. В других дисках ПЯ сохраняется, но частично некротизируется, частично в нем происходит замещение НХК на ХПК, которые затем либо некротизируются, либо дифференцируются в хондроциты. Так как в этот период во внутреннем слое ФК преобладают дистрофические процессы, и отсутствует пролиферация хондроцитов, можно считать, что основным источником клеток, формирующих новообразованный фиброзный хрящ, являются ХПК пульпозного ядра, а не клетки ФК. Макроскопически этому соответствует разная степень уплотнения, диффузного или очагового помутнения ПЯ и исчезновения границы между ФК и ПЯ.

В последующие сроки (10, 18, 32 и 40 недель) процесс замещения ПЯ и внутреннего слоя ФК фиброзным хрящом усиливается. Из 26 дисков на эти сроки только в 5-ти оставались фрагменты ПЯ с признаками некроза клеток в кластерах и формированием ободка сгущенного матрикса вокруг них, очагами зернистого распада матрикса, отложением солей извести, бесклеточными полями рыхлого матрикса.

В большинстве дисков ПЯ и внутренний слой ФК полностью замещены фиброзным хрящом. Начиная с 10-й недели опыта, клетки этой ткани представлены в основном формами с ослабленной биосинтетической активностью. Особенно важно отметить, что уже с этого срока в фиброзном хряще, заместившем ПЯ, возникают дистрофические и некротические изменения клеток, появляются бесклеточные участки, отложения извести в матриксе. Снижается также содержание протеогликанов, а коллагеновые волокна подвергаются частичной деструкции. Все это свидетельствует о начинающейся дистрофии хрящевой ткани, которая прогрессирует в дальнейшем. Мы обозначаем это явление как вторичную дистрофию ПЯ по сравнению с первичной дистрофией, возникающей в первый месяц после прокола ФК.

С 18-й недели усиливаются дистрофические и некротические изменения в фиброзном хряще; помимо некроза клеток появляются очаги зернистого распада матрикса. В отдельных дисках возникают мелкие щели (трещины) и полости в замещенном ПЯ, а также крупные щели, отделяющие ЗП от измененной ткани диска. Часть щелей заполняется зернистыми массами тканевого распада. Это свидетельствует о том, что именно деструкция в диске является причиной образования

щелей. Наиболее часто щели в новообразованном фиброзном хряще и между ЗП и диском обнаруживаются через 32-40 недель после начала опыта. В эти же сроки максимально усиливаются дистрофия и некроз клеток фиброзного хряща, увеличиваются поля бесклеточной ткани и зернистого распада.

Следует отметить также своеобразное изменение архитектоники ФК в дегенеративно измененных дисках, которое начинается уже с 10-й недели в части дисков и усиливается в следующие сроки уже во всех дисках. Ламеллы среднего слоя ФК и той части внутреннего слоя, которая еще не подверглась структурной реорганизации, разрыхляются, расщепляются и приобретают извитую форму. При этом ламеллы, ранее имевшие строго циркулярную форму, на вентральном и спинальном полюсе совершают обратный изгиб в сторону центра, т.е. к внутренней области, занятой новообразованным фиброзным хрящом. Это происходит, вероятно, потому, что ПЯ с его уникальной гелеобразной, насыщенной жидкостью, упругой структурой, трансформируясь в фиброзную структуру, уже не давит на ламеллы ФК, а напротив, уменьшаясь в объеме, как рубцовая ткань, ведет к ретракции ткани. Подобное же переориентирование силовых напряжений ведет к отрыву диска от ЗП в участках, где ПЯ ранее наиболее близко подходило к ЗП и где, потом формируются щели.

Нативная структура ФК и ПЯ при отсутствии сосудов в диске обеспечивает питание ткани путем диффузии питательных веществ и кислорода из сосудов костной ткани позвонков и ЗП. В новых условиях при фиброзировании ПЯ, отрыве диска от ЗП, изменении архитектоники и биомеханической функции диска

диффузия питательных веществ затруднена, что и является основной причиной вторичных дистрофических изменений в дегенеративном диске.

Следует также обратить внимание на выраженные изменения в гиалиновом слое ЗП, которые начинаются уже с 6-й недели и затем усиливаются: некроз, деструкция, кальциноз, оссификация, истончение и фрагментация гиалинового хряща, сопровождаемые репаративной реакцией. К 40-й неделе в части дисков в ЗП остаются лишь отдельные фрагменты хряща, окруженные костной тканью. Эти изменения, очевидно, индуцируются резким снижением амортизирующей функции диска при фиброзировании ПЯ, но, в свою очередь, влияют на биомеханику и питание диска. Подобные изменения, особенно оссификация ЗП, были отмечены при моделировании дегенеративных изменений в МПД у кроликов [24], а также при старении и дегенерации МПД у человека [28].

Изменение архитектоники ламелл и разрыхление коллагенового каркаса ФК ведет к ослаблению биомеханической прочности ФК. В условиях использованной нами экспериментальной модели это не приводило к образованию протрузий и грыж (во многом из-за быстрого фиброирования ПЯ), но в человеческой патологии эти осложнения остеохондроза являются важнейшими в его клинических проявлениях.

Таким образом, изученная нами на кроликах модель дегенерации МПД по своим морфологическим проявлениям весьма близка к остеохондрозу человека [27, 35] и может быть адекватно использована для изучения механизма действия различных лечебных факторов, в том числе лазерно-индуцированной реконструкции МПД.

Выводы

1. Экспериментальная модель дегенерации межпозвонковых дисков у кроликов с помощью одного или двух последовательных проколов фиброзного кольца дает результаты, близкие к остеохондрозу человека.

2. Наблюдались некроз и деструкция ткани пульпозного ядра, которое замещается фиброзным хрящом с постепенным развитием в нем вторичных дистрофических и некротических изменений. Возникает дезорганизация и последующая реорганизация внутреннего и среднего слоев фиброзного кольца с расщеплением ламелл, их ретракцией, разрыхлением коллагеновых волокон. Одновременно наступает деструкция гиалинового хряща замыкательной пластинки с частичным отрывом ее от фиброзной капсулы, в местах проколов формируются остеофиты.

3. В интактных дисках опытных животных (особенно ближайших с дегенеративно-измененными) в результате нестабильности позвоночника возникают изменения в виде дистрофии и некроза нотохордальных клеток и замещения их хондроцитоподобными, частичной деструкции ткани пульпозного ядра, но без замещения его фиброзным хрящом.

Авторы благодарят РФФИ (грант 07-02-12080-офи), МНТЦ (грант 3360) и корпорацию Аркью Медикал Инк. за финансовую поддержку работы.

Литература

1. Басков А.В., Шехтер А.Б., Соболев Э.Н. и др. Влияние лазерного излучения на процессы регенерации хрящевой ткани межпозвонковых дисков. 1. Предварительное сообщение // *Лазерная медицина*, № 6(2), с.18-23, 2002.

2. Лазерная инженерия хрящей. / Под ред. В.Н. Баграташвили, Э.Н. Соболя,

А.Б. Шехтера. – М.: Физматгиз, 2006.

3. Соболев Э.Н., Басков А.В., Свиридов А.П., Захаркина О.Л. Технология и оборудование для лазерной реконструкции межпозвонковых дисков // *Альманах клинической медицины*, № 17(2), с.242-245, 2008.

4. Alini M., Eisenstein S.M., Ito K. et al. Are animal models useful for studying human disc disorders/degeneration? // *Eur Spine J.*, 17:2-19, 2008.

5. Boos N., Weissbach S., Rohrbach H. et al. Classification of age-related changes in lumbar intervertebral discs: 2002 Volvo Award in basic science // *Spine*, 27(23):2631-44, 2002.

6. Cavanaugh J.M., Kallakuri S., Ozaktay A.C. Innervation of the rabbit lumbar intervertebral disc and posterior longitudinal ligament // *Spine*, 20(19):2080-2085, 1995.

7. Freemont A.J., Watkins A., Le Maitre C. et al. Current understanding of cellular and molecular events in intervertebral disc degeneration: implications for therapy // *J. Pathol.* 196: 374–379, 2002.

8. Gan J.C., Ducheyne P., Vresilovic E.J. et al. Intervertebral disc tissue engineering I: characterization of the nucleus pulposus // *Clin. Orthop. Relat. Res.*, (411):305-314, 2003.

9. Green P.W.B., Fox R.R., Sokoloff L. Spontaneous degenerative spinal disease in the laboratory rabbit // *J. Orthop. Res.*, 2:161-168, 1984.

10. Hadjipavlou A.G., Simmons J.W., Yang J.P. et al. Torsional injury resulting in disc degeneration: I. An in vivo rabbit model // *J. Spinal Disord.*, 11(4):312-317, 1998.

11. Hirano N., Tsuji H., Ohshima H. et al. Analysis of rabbit intervertebral disc physiology based on water metabolism. I. Factors influencing metabolism of the normal intervertebral discs // *Spine*, 13(11):1291-1296, 1988.

12. Ireland D. Molecular mechanisms involved in intervertebral disc degeneration and potential new treatment strategies //

Bioscience Horizons, 2(1):83-89, 2009.

13. Iwahashi M., Matsuzaki H., Tokuhashi Y. et al. Mechanism of intervertebral disc degeneration caused by nicotine in rabbits to explicate intervertebral disc disorders caused by smoking // *Spine*, 27(13):1396-401, 2002.

14. Kim K.W., Lim T.H., Kim J.G. et al. The origin of chondrocytes in the nucleus pulposus and histologic findings associated with the transition of a notochordal nucleus pulposus to a fibrocartilaginous nucleus pulposus in intact rabbit intervertebral discs // *Spine*, 28(10):982-990, 2003.

15. Kroeber M.W., Unglaub F., Wang H. et al. New in vivo animal model to create intervertebral disc degeneration and to investigate the effects of therapeutic strategies to stimulate disc regeneration // *Spine*, 27(23): 2684-2690, 2002.

16. Lipson S.J., Muir H. Experimental intervertebral disc degeneration: morphologic and proteoglycan changes over time // *Arthritis Rheum.*, 24(1): 12-21, 1981.

17. Lipson S.J., Muir H. Vertebral osteophyte formation in experimental disc degeneration. Morphologic and proteoglycan changes over time // *Arthritis Rheum.*, 23(3): 319-24, 1980.

18. Lotz J.C., Ulrich J.A. Innervation, inflammation, and hypermobility may characterize pathologic disc degeneration: review of animal model data // *J. Bone Joint. Surg. Am.*, 88 Suppl. 2:76-82, 2006.

19. Lotz J.C. Animal models of intervertebral disc degeneration: lessons learned // *Spine*, 29(23):2742-50, 2004.

20. Masuda K., Aota Y., Muehleman C. et al. A novel rabbit model of mild, reproducible disc degeneration by an anulus needle puncture: correlation between the degree of disc injury and radiological and histological appearances of disc degeneration // *Spine*, 30(1):5-14, 2005.

21. Masuda K., Imai Y., Okuma M. et al. Osteogenic protein-1 injection into a degenerated disc induces the restoration of disc height and structural changes in the rabbit anular puncture model // *Spine*, 31(7):742-54, 2006.

22. Nomura T., Mochida J., Okuma M. et al. Nucleus pulposus allograft retards intervertebral disc degeneration // *Clin. Orthop. Relat. Res.*, (389):94-101, 2001.

23. Omlor G.W., Lorenz H., Engelleiter K. et al. Changes in gene expression and protein distribution at different stages of mechanically induced disc degeneration - an in vivo study on the New Zealand white rabbit // *J. Orthop. Res.*, 24(3):385-92, 2006.

24. Peng B., Hou S., Shi Q., Jia L. The relationship between cartilage end-plate calcification and disc degeneration: an experimental study // *Chin. Med. J. (Engl.)*, 114(3):308-12, 2001.

25. Phillips F.M., Reuben J., Wetzel F.T. Intervertebral disc degeneration adjacent to a lumbar fusion. An experimental rabbit model // *J. Bone Joint Surg. Br.*, 84-B:289-294, 2002.

26. Poiraudreau S., Monteiro I., Anract P. et al. Phenotypic characteristics of rabbit intervertebral disc cells. Comparison with cartilage cells from the same animals // *Spine*, 24(9):837-844, 1999.

27. Roberts S. Disc morphology in health and disease // *Biochem. Soc. Trans.* 30(6):864-86, 2002.

28. Roughley P.J. Biology of intervertebral disc aging and degeneration: involvement of the extracellular matrix // *Spine*, 29(23):2691-9, 2004.

29. Scott N.A., Harris P.F., Bagnall K.M. A morphological and histological study of the postnatal development of intervertebral discs in the lumbar spine of the rabbit // *J. Anat.* 130(Pt 1):75-81, 1980.

30. Singh K., Masuda K., An H.S.