

В.А. Бывальцев^{1, 2, 3}, С.Ю. Панасенков², Е.Г. Белых^{1, 2}, Н.А. Иванов⁴, П.Ю. Цыганов⁴,
В.А. Сороковиков^{1, 2, 3}

НАНОСТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ В СРАВНИТЕЛЬНОЙ ОЦЕНКЕ ДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ МЕЖПОЗВОНКОВОГО ДИСКА

¹ Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии СО РАМН (Иркутск)

² НУЗ «Дорожная клиническая больница на ст. Иркутск-Сортировочный» ОАО РЖД (Иркутск)

³ ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования»
Минздравсоцразвития РФ (Иркутск)

⁴ Национальный исследовательский Иркутский государственный технический университет (Иркутск)

С помощью метода атомно-силовой микроскопии проведено исследование анатомического материала, представленного фрагментами ткани межпозвонковых дисков, находящихся на разных стадиях дегенеративного процесса. Исследования проводились с помощью зондовой нанолаборатории с видеомикроскопом Ntegra Prima. В результате получены непосредственные экспериментальные данные, подтверждающие ряд теоретических изысканий, до этого не имевших наглядных представлений.

Ключевые слова: остеохондроз, атомно-силовая микроскопия, межпозвонковый диск

NANOSTRUCTURAL ANALYSIS IN COMPARATIVE ESTIMATION OF DEGENERATIVE CHANGES IN INTERVERTEBRAL DISK

V.A. Byvaltsev^{1, 2, 3}, S.Yu. Panasenkov², E.G. Belykh^{1, 2}, N.A. Ivanov⁴, P.Yu. Tsiganov⁴,
V.A. Sorokovikov^{1, 2, 3}

¹ Scientific Center of Reconstructive and Restorative Surgery SB RAMS, Irkutsk

² Railway Clinical Hospital on the Railway Station Irkutsk-Sortirovochnyi of Russian Railways Ltd.,
Irkutsk

³ Irkutsk State Medical Academy of Continuing Education, Irkutsk

⁴ National Research Irkutsk State Technical University, Irkutsk

By atomic force microscopy we realized the research of anatomic material represented by the fragments of tissue of intervertebral disks of different stages of degenerative process. The researches were carried out with help of probe nanolaboratory with videomicroscope Ntegra Prima. As the result we obtained direct experimental data that proves some theoretical investigation that hadn't had visual proves.

Key words: degenerative disease of spine, atomic force microscopy, intervertebral disc

В современном мире все большее значение приобретают открытия и исследования, совершаемые на стыке наук. Одним из наиболее перспективных в этом плане видится соединение биологических исследований и последних достижений в области физики. Получаемые результаты нередко приводят не только к переосмысливанию концепций наук о живой природе, но и зачастую к значимым практическим результатам [8, 9].

Методы исследований, которые обычно доступны только для физических экспериментов, приносят достойные внимания данные в самых неожиданных областях медицинской биологии. Одной из целей проводимой работы стала разработка метода, позволяющего эффективно оценить морфологические изменения в межпозвонковом диске, происходящие на различных стадиях остеохондроза [1, 4, 5, 8].

Техника наноструктурного анализа внедряется в диагностическую базу клинической медицины. Метод сканирующей зондовой микроскопии (АСМ) позволяет получать данные о структуре поверхности и ее биомеханических характеристиках [1, 8, 9]. Именно этот метод был выбран нами для оценки изменений в межпозвонковом диске, происходящих по мере развития дегенеративного процесса.

Цель исследования: получить наноструктурные характеристики межпозвонкового диска при различных стадиях дегенеративного процесса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Забор материала проводился интраоперационно, для этого отобрано три группы проб с целью оценки изменений ткани межпозвонкового диска (МПД) на уровне $L_{III} - L_{IV}$, $L_{IV} - L_V$, $L_V - S_1$.

В первую группу (mild degeneration) вошли 15 проб тканей (фрагменты объемом до $0,1 - 0,3 \text{ см}^3$), полученных путем аспирации зондом «Decompressor» для механической перкутанной нуклеотомии [2] (рис. 1). В данную группу вошли пациенты в возрасте от 25 до 45 лет, в клинко-неврологическом статусе которых превалировала стойкая болевая и мышечно-тоническая симптоматика. Инструментальные методы диагностики демонстрировали начальные проявления остеохондроза (1 – 2-я рентгенологическая стадия), наличие протрузий МПД от 2 до 5 мм [3, 4, 6]. Таким образом, строение полученных образцов ткани считали наиболее близким к нормальному. Вторая группа, состоящая из 30 проб (фрагменты $0,1 - 0,9 \text{ см}^3$) представлена образцами, полученными при традиционной микродискэктомии по Caspar (группы 2md и 2sd). В этой группе процесс дегенера-

ции имел наибольшую степень проявлений, что соответствовало (группа moderate degeneration и группа severe degeneration) 3–4-й рентгенологическим стадиям остеохондроза (рис. 2, 3). Она представлена грыжами межпозвонковых дисков подсвязочной и интраканальной локализации (экструзия и секвестрация межпозвонкового диска) [3, 4, 6].

Исследование полученных образцов позволило изучить «наносемиотику» дегенерации МПД. Мы считали, что использование АСМ в исследовании соединительной ткани МПД является наиболее оптимальным по следующим причинам:

1. Невысокая прочность живых тканей в состоянии *ex vivo* обуславливает необходимость выбора методик, которые вносят наименьшее искажение в результаты за счет упругих и неупругих взаимодействий с поверхностью образца. В этом смысле вариативность используемых в АСМ методов исследования предоставляет выгодное преимущество.

2. Характер исследуемого образца не позволяет исследовать его достаточно эффективно на приборах сканирующей туннельной микроскопии, так как биоткани обладают невысокой естественной проводимостью, и добиться удовлетворительных результатов исследований становится очень сложно [7, 8, 9].

Исследования образцов тканей проводились на зондовой нанолаборатории Ntegra Prima. Краткие спецификации прибора:

- максимальная область сканирования — $75 \times 90 \times 10$ мкм;
- видеомикроскоп с регулировкой увеличения и тонкой фокусировкой;
- система активной виброзащиты;
- широкий диапазон рабочих методик изучения, включая магнитные и электрические методики;
- система активных датчиков устранения артефактов, вызванных определенными особенностями пьезоэлектроники.

Фиксация тканей на стекле происходила естественным образом, после высушивания приготовленного среза с использованием стандартной гистологической техники. Размеры предметных стекол были стандартизированы, все образцы подписывались, имели краткую характеристику как состояния ткани, так и того, какое воздействие проводилось на ткань. Все измерения проводились в лаборатории зондовой микроскопии при комнатных условиях на воздухе:

- температура окружающей среды — 20 ± 5 °C;
- дрейф температуры не превышал 1 °C/ч;
- относительная влажность — не более 30 %;
- атмосферное давление — 760 ± 30 мм рт. ст.;
- в отсутствие прямого света, акустических волн, с включенной активной системой подавления вибраций.

Ввиду достаточной прочности составляющих частей ткани МПД для исследования применялись методики контактной силовой микроскопии. В ряде случаев, когда исследования проводились на свежих препаратах хряща, использовались техники полуконтактной микроскопии с целью максималь-

ного сохранения изначального рельефа поверхности и минимизации упругих деформаций образца жесткими режимами исследований [8].

Способы забора и подготовки материала:

1. Фиксация операционного макропрепарата с последующей подготовкой тонких срезов ткани для исследования (материал, полученный при микро-дискэктомиях).

2. Тонкий срез, подготовленный с помощью «глазного скальпеля» из операционного материала, помещенный в изотонический раствор постоянной температуры (использован для АСМ).

3. Аспирационная биопсия ткани МПД во время проведения малоинвазивных вмешательств (перкутанная нуклеотомия зондом «Stryker») иглой 18 G.

Исследование микропрепаратов проводилось на участках топологически соответствующих друг другу, в случае неокрашенных срезов исследовался один и тот же микропрепарат. Точность исследований обеспечивалась гистологической верификацией, цветной маркировкой исследуемой области.

В исследованиях использовались кантилеверы типа NSG-01, CSG-10, стандартные параметры сканирования были следующими: для полуконтактного режима всегда применялся режим сканирования «Метод отображения фазы» для лучшего контраста разных по свойствам компонентов, а также для актуализации мелких составляющих частей хряща. До начала сканирования проводилась амплитудная спектроскопия с целью предварительной оценки возможности сканирования данного участка, а также для предварительного исследования его жесткости и решения о правильности подобранных параметров сканирования.

Частота развертки сканирования — 0,98 — 1,03 Гц, разрешение — 1024×1024 точки, ускорение и шаг сканирования устанавливались по умолчанию. Направление сканирования поперечное, для минимизации эффектов задержки системы обратной связи.

Для контактного режима сканирования использовались следующие параметры. Использовался кантилевер типа CSG-10, из-за своих специфических характеристик более подходящий для сканирования в контактном режиме. Применялся метод сканирования «Метод отображения распределения латеральных сил». Данная методика была выбрана из-за своих возможностей в отображении механических характеристик разных участков поверхности при исследовании гистологических проб. До начала сканирования проводилась силовая спектроскопия пьезоотклика с целью предварительной оценки возможности сканирования данного участка, а также для предварительного исследования его жесткости и решения о правильности подобранных параметров сканирования. Частота развертки сканирования была 0,80 — 0,98 Гц, разрешение — 1024×1024 точки, ускорение и шаг сканирования устанавливались по умолчанию. Направление сканирования поперечное, для минимизации эффектов задержки системы обратной связи.

Все исследования проходили при включенной активной системе виброизоляции, а также

Таблица 1

Межгрупповой сравнительный анализ основных характеристик образцов, получаемых при АСМ-исследовании

Характеристика	Группа 1	Группа 2	p
Amount of sampling (количество точек в исследовании)	262144	262144	–
Max (максимальная высота), нм	674,532 nm	2569,94 nm	0,003
Min (минимальная высота), нм	0 nm	0 nm	–
Ten point height, Sz (высота по десяти точкам), нм	340,781 nm	1283,48 nm	0,001
Average (средний размер неровности на поверхности), нм	336,051 nm	1128,79 nm	–
Average Roughness, Sa (средняя арифметическая шероховатость), нм	69,523 nm	279,223 nm	0,002
Root Mean Square, Sq (среднеквадратичная шероховатость), нм	88,1433 nm	362,834 nm	0,002
Surface skewness, Ssk (мера асимметрии поверхности)	0,260157	0,163054	0,043
Coefficient of kurtosis, Ska (мера эксцесса, отклонение интервала полученных размерностей от усредненной нормы)	0,271134	0,489636	0,021
Entropy (энтропия)	12,0036	13,9718	0,02

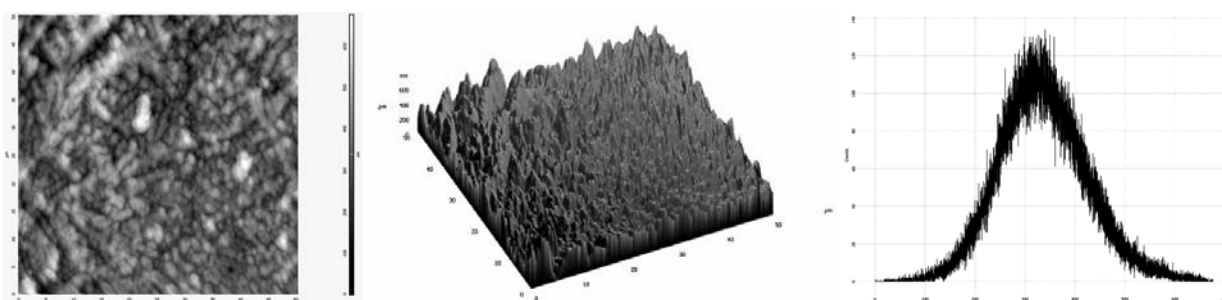


Рис. 1. Группа 1 – mild degeneration (АСМ-изображения). АСМ-снимок поверхности МПД в области пульпозного ядра (группа 1), размер снимка – 50 × 50 мкм. А – 2D-изображение; Б – 3D-изображение; В – график распределения высот. АСМ-картина, характерная для начальной стадии дегенерации. Полученные значения средней шероховатости, меры эксцесса представлены в таблице.

включенных емкостных датчиках, устраняющих артефакты, вызванные особенностями пьезоэлементов сканера.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Применение метода АСМ позволило получить количественные признаки, характеризующие поверхность изученных образцов (табл. 1) с различной выраженностью дегенеративного процесса [3, 4, 6].

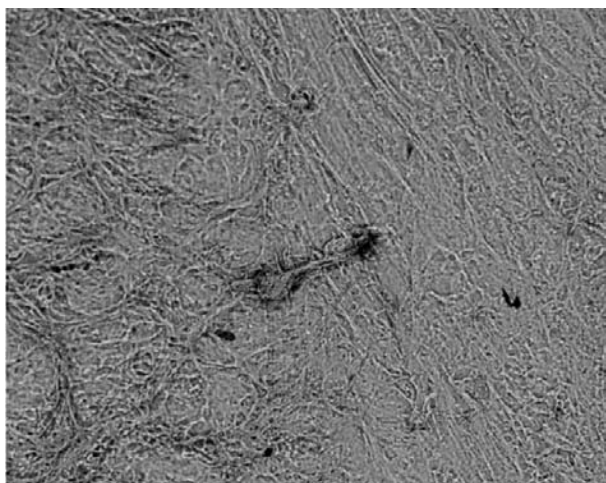


Рис 2. Оптическая картина полученная при исследовании неокрашенного среза МПД на уровне LVSI сегмента. Ув. × 500 (+ цифровое увеличение).

В результате проведенного исследования получен ряд параметров, важных для разработки математической модели развития дегенеративных процессов в межпозвоночных дисках.

Параметр среднеквадратичной шероховатости играет важную роль в характеристике оптических свойств поверхности (степень поглощения, рассеяния, отражения электромагнитного излучения).

Параметр асимметрии поверхности может быть использован как одно из средств диагностики степени выраженности происходящих дегенеративных изменений.

Мера эксцесса характеризует отклонения гистограммы высот от формы гауссова пика, характеризует амплитуду колебания высот исследуемого образца поверхности.

На основании анализа этих параметров получены характеристики поверхности МПД при начальных и финальных проявлениях дегенеративного процесса.

При начальной степени дегенерации (группа 1 – mild degeneration (рис. 1А, Б, В – АСМ-изображения; рис. 2 – оптическая микроскопия)) выявляются меньшие значения показателей шероховатости с изменением параметра от 10,032 нм до 160,014 нм с характерной большей однородностью поверхности. Показатели асимметрии поверхности изменяются от 0,12 до 0,22.

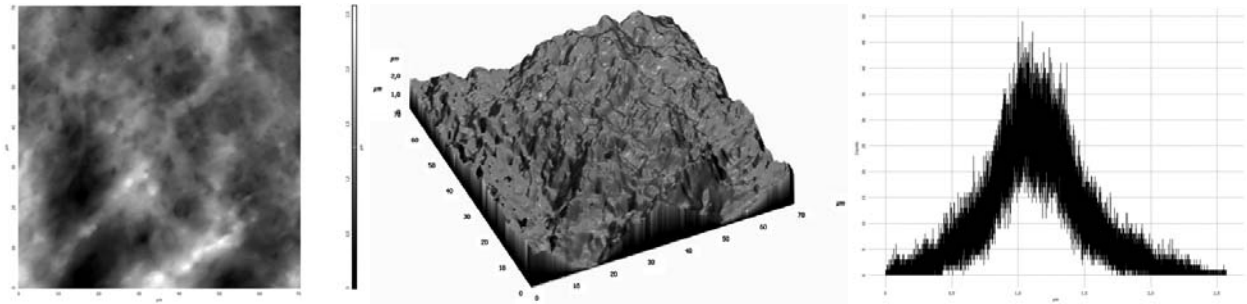


Рис. 3. Группа 2md – moderate degeneration. АСМ-снимок поверхности экструзии МПД (группа 2), контактный режим «распределения латеральных сил», размер снимка – 70×70 мкм, кол-во точек – 512×512 . А – 2D-изображение; Б – 3D-изображение; В – график распределения высот. Полученные значения средней шероховатости, меры эксцесса представлены в таблице.

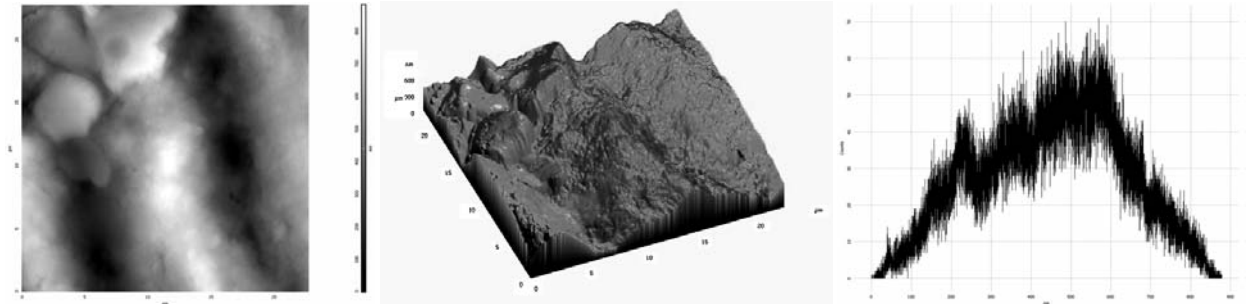


Рис. 5. Группа 2sd – severe degeneration. АСМ-снимок поверхности МПД на границе пульпозного ядра (группа 2: интраканальные секвестрированных фрагментов МПД), размер снимка – 20×20 мкм, кол-во точек – 512×512 . А – 2D-изображение; Б – 3D-изображение; В – график распределения высот. Характерны высокая средняя шероховатость и мера эксцесса.

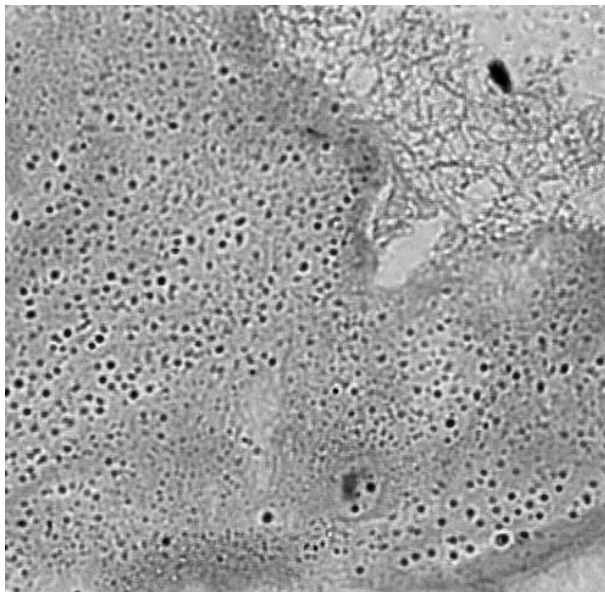


Рис. 4. Фрагмент секвестрированной грыжи МПД, окраска гематоксилин-эозином. Ув. $\times 200$.

При значительной степени дегенерации (группа 2md – moderate degeneration (рис. 3А, Б, В), группа 2sd – severe degeneration (рис. 5А, Б, В)) зарегистрирована максимальная разнородность показателей асимметрии от 0,04 до 0,31. Размеры и форма Гауссова распределения, характеризующего меру эксцесса (степень энтропии), также изменяются в сторону уменьшения упорядоченности при III – IV стадиях остеохондроза.

ВЫВОДЫ

1. Выявлена и подтверждена практическая ценность и эффективность исследований биологических объектов с помощью методик АСМ.

2. Получены убедительные результаты эффективности использования АСМ в качестве средства диагностики и изучения ткани МПД за счет большого количества измерительных методик.

3. Характеристики изменений свойств поверхности МПД; параметры шероховатости и асимметрии поверхности – имеют прямую положительную корреляцию со стадиями остеохондроза.

4. Мера эксцесса демонстрирует значительные отклонения гистограммы высот при 2–3-й рентгенологической стадии остеохондроза, но при дегенеративных изменениях на 4-й стадии отклонения гистограммы уменьшаются, а параметры шероховатости на некоторых участках близки к таковым у образцов с начальной степенью дегенерации.

5. Применение метода атомно-силовой микроскопии для изучения ультраструктуры межпозвоночных дисков позволяет производить математическое моделирование стохастических процессов с возможностью оценки объемных характеристик поверхности на основании анализа 3-мерных свойств объекта.

Работа выполнена при поддержке гранта президента Российской Федерации МД-6662.2012.7

ЛИТЕРАТУРА

1. Баграташвили В.Н., Басков А.В., Борщенко И.А. и др. Лазерная инженерия хрящей. — М.: ФИЗМАТЛИТ, 2006. — 488 с.
2. Бывальцев В.А., Егоров А.В., Сорокинов В.А. и др. Пункционная чрезкожная микро-дискэктомия декомпрессором «Stryker» в лечении диско-радикулярного конфликта на пояснично-крестцовом уровне // Актуальные вопросы хирургической практики на ВСЖД: сб. науч.-практ. работ врачей хирургического профиля. — Иркутск, 2010. — С. 62—64.
3. Корж Н.А., Продан А.И., Барыш А.Е. Дегенеративные заболевания позвоночника и их структурно-функциональная классификация // Украинский нейрохирургический журнал. — 2004. — № 3. — С. 71—80.
4. Цивьян Я.Л., Бурухин А.А. Дегенерация межпозвоночного диска // Ортопедия, травматология и протезирование. — 1988. — № 6. — С. 27—30.
5. Byvaltsev V., Belykh E., Panasenkov S. et al. Nanostructural changes of intervertebral disc after diode laser ablation // World Neurosurgery. — 2012. — Vol. 77, Iss. 1. — P. 6—7.
6. Fardon D.F., Milette P.C. Nomenclature and classification of lumbar disc pathology // Spine. — 2001. — Vol. 26, N 5. — P. E93—E113.
7. McElfresh M., Baesu E., Balhorn R. et al. Combining constitutive materials modeling with atomic force microscopy to understand the mechanical properties of living cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2002. — Vol. 30; N 99 (Suppl. 2). — P. 6493—6497.
8. Naama T.L., Mohammad A.H., Jeremy J.M. Investigation of nano-mechanical properties of annulus fibrosus using atomic force microscopy // Micron. — 2008. — Vol. 39 (7). — P. 1008—1019.
9. Schnake K.J., Putzier M., Norbert P.H., Kandzi-ora F. Mechanical concepts for disc regeneration // Eur. Spine J. — 2006. — Vol. 15 (Suppl. 3). — P. S354—S360.

Сведения об авторах

Бывальцев Вадим Анатольевич — доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник Научного центра реконструктивной и восстановительной хирургии СО РАМН, заведующий нейрохирургическим отделением НУЗ «Дорожная клиническая больница на ст. Иркутск-Сортировочный» ОАО РЖД, профессор кафедры травматологии, ортопедии и нейрохирургии ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования» Минздравсоцразвития РФ (тел.: 8 (3952) 63-85-28; e-mail: byval75vadim@yandex.ru, byvaltsev_vadim@mail.ru)

Панасенков Сергей Юрьевич — врач-нейрохирург НУЗ «Дорожная клиническая больница на ст. Иркутск-Сортировочный» ОАО РЖД (e-mail: s.panasenkov@mail.ru)

Белых Евгений Георгиевич — младший научный сотрудник Научного центра реконструктивной и восстановительной хирургии СО РАМН (e-mail: belykh_e@mail.ru)

Иванов Николай Аркадьевич — кандидат физико-математических наук, научный руководитель научно-исследовательской лаборатории рентгеноструктурного анализа Национального исследовательского Иркутского государственного технического университета (тел.: 8 (3952) 40-59-03; e-mail: ivnik@istu.edu)

Цыганов Павел Юрьевич — аспирант Национального исследовательского Иркутского государственного технического университета (e-mail: pavel.cyganov@inbox.ru)

Сорокинов Владимир Алексеевич — доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора центра по научной работе — директор ИТО Научного центра реконструктивной и восстановительной хирургии СО РАМН, заведующий кафедрой травматологии, ортопедии и нейрохирургии ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования» Минздравсоцразвития РФ (664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1; тел.: 8 (3952) 29-03-45; e-mail: vasorokovikov@mail.ru)