

УДК 616.71-018.46-002-053.2-085.281

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КОСТНОЙ ТКАНИ И КРАСНОГО КОСТНОГО МОЗГА ПРИ ОСТРОМ ГЕМАТОГЕННОМ ОСТЕОМИЕЛИТЕ У ДЕТЕЙ

*А.Г. Сирак, А.Н. Григорова, М.О. Диденко, М.А. Долгашова, Н.Н. Диденко, Е.И. Пискарева,
Е.И. Пашнева, О.Г. Магомедова, А.П. Арутюнова*

ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
кафедра гистологии

Острый гематогенный остеомиелит (ОГО) является тяжелым заболеванием детского возраста и в 70–87 % случаев приводит к инвалидности. Несмотря на достижения современной науки, методы исследования не всегда способны вовремя диагностировать ОГО у детей. Число научных работ, посвященных ранней диагностике ОГО у детей на основе использования морфофункциональных характеристик костной ткани, ограничено. Материалом для проведения исследования служил биоптат костной ткани и красного костного мозга, полученный после остеоперфорации у детей с ОГО. После предварительной обработки биоптата проводили гистологическое и иммуногистохимическое исследование с последующей оценкой прогностического значения полученных данных. В результате исследования выявили гистологические изменения костной ткани, характерные для интрамедуллярной и экстрамедуллярной фаз ОГО, ИГХ-показатели увеличения популяции цитотоксических Т-лимфоцитов в красном костном мозге, свидетельствующие о развитии тяжелого воспалительного процесса.

Ключевые слова: гематогенный остеомиелит, острое воспаление, Т-лимфоциты, иммуногистохимическая реакция, дети.

DOI 10.19163/1994-9480-2021-2(78)-132-136

HISTOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL FEATURES OF BONE TISSUE AND RED BONE MARROW IN ACUTE HEMATOGENOUS OSTEOMYELITIS IN CHILDREN

*A.G. Sirak, A.N. Grigorova, M.O. Didenko, M.A. Dolgashova, N.N. Didenko, E.I. Piskareva,
E.I. Pashneva, O. G. Magomedova, A.P. Arutyunova*

FSBEI HE «Stavropol State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation,
Department of histology

Acute hematogenous osteomyelitis (AHO) is a severe disease of childhood and leads to disability in 70–87 % of cases. Despite the achievements of modern science, research methods are not always able to diagnose CSO in children in time. The number of scientific works devoted to the early diagnosis of CSO in children based on the use of morphological and functional characteristics of bone tissue is limited. The material for the study was a biopsy of bone tissue and red bone marrow obtained after osteoperforation in children with CSO. After preliminary processing of the biopsy, histological and immunohistochemical studies were performed, followed by an assessment of the prognostic value of the data obtained. The study revealed histological changes in bone tissue characteristic of the intramedullary and extramedullary phases of CSO, IHC indicators of an increase in the population of cytotoxic T-lymphocytes in the red bone marrow, indicating the development of a severe inflammatory process.

Key words: hematogenous osteomyelitis, acute inflammation, T-lymphocytes, immunohistochemical reaction, children.

Проблема диагностики и лечения гематогенного остеомиелита у детей остается наиболее актуальной задачей для практикующих хирургов и травматологов [2, 8]. Частота встречаемости гематогенного остеомиелита в структуре гнойно-хирургических заболеваний варьирует и, по данным разных источников, составляет более 15 % [2].

Так, острый гематогенный остеомиелит (ОГО) встречается у каждого 5 ребенка на 100 000 детского населения. Несмотря на достижения современной

науки, методы исследования не всегда способны вовремя диагностировать ОГО у детей, что способствует быстрому переходу острой формы гематогенного остеомиелита в хроническую, а это, в свою очередь, ведет к высокому проценту (70–87 %) инвалидизации [2].

В научной литературе существует ограниченное число работ, посвященных ранней диагностике ОГО у детей на основе использования морфофункциональных характеристик костной ткани [7].

Изучение особенностей иммунологической реактивности детей разного возраста при ОГО является очень важным для понимания иммунопатогенеза заболевания. Так, в проведенных исследованиях (Смирнов И.Е., Рошаль Л.М., Кучеренко А.Г. и др.) авторы отмечают значимую роль дисбаланса количественных показателей субпопуляционного состава лимфоцитов при гематогенном остеомиелите у детей: увеличение содержания субпопуляции Т-хелперных лимфоцитов 2-го типа отражает преимущественную направленность иммунного ответа у детей с ОГО на развитие гуморального ответа с повышением продукции интерлейкинов [6]. В других работах в формировании хронического процесса важная роль отводится высокодифференцированным клеткам памяти и экспрессии CD8+ [4, 5]. По мнению некоторых ученых, развитие различных форм гематогенного остеомиелита связано не только с дефектом отдельных звеньев иммунной системы, но и с ее гиперактивацией на фоне общей иммуносупрессии организма [1]. Существование аутоиммунного компонента в патогенезе остеомиелита с представлением возможности прогнозирования течения остеомиелита в зависимости от разного уровня супрессии Т-звена иммунной системы и степени гиперактивации В-звена также отражено в ряде исследований [3, 7].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Проведение гистологического и иммуногистохимического анализа костной ткани и красного костного мозга при остром гематогенном остеомиелите у детей.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В отделении хирургии ГБУЗ СК «Краевая детская клиническая больница» г. Ставрополя находились на лечении 73 ребенка с диагнозом «острый гематогенный остеомиелит» (с 2013 по 2019 г.). Для выполнения исследовательской работы были получены добровольное информированное согласие родителей пациентов и разрешение локального этического комитета ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава России (протокол № 68 от 22 апреля 2013 г.).

Всем пациентам было проведено экстренное хирургическое вмешательство, выполнена остеоперфорация пораженной кости. Произведен забор костной ткани и биоптата красного костного мозга для гистологического и ИГХ-исследования. Материал биоптата доставлен в лабораторию в течение 6 часов с момента забора. Полученные образцы фиксировали в 10%-м забуференном формалине, затем дегидратировали и заключали в парафин по стандартной методике.

Гистологические срезы толщиной 7–8 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван Гизону. ИГХ-исследование осуществляли по стандартному протоколу с использованием кроличьих моноклональных антител к Т-лимфоцитам, в том числе, Т-хелперам и Т-цитотоксическим клеткам. Для этого использовали концентрированные антитела к CD3+, клон СВС.37 (Diagnostic BioSystems, США), к CD4+, клон 1f6 (Bond RTU Primary, Leica Biosystems, США), в разведении 1:30 и к CD8+, клон 144В (Bond RTU Primary, Leica Biosystems, США) в разведении 1:50. ИГХ-исследование выполнялось на иммуногистостейнере Leica Bond maX (Leica Biosystems, Великобритания) с применением системы детекции Bond Polymer Refine Detection (Leica Biosystems, Великобритания).

При выполнении ИГХ-исследования костного мозга для выявления пусковых факторов, являющихся предикторами хронизации гематогенного остеомиелита, особое внимание уделялось расчету площади, занятой иммунопозитивными структурами.

Интенсивность экспрессии при ИГХ исследовании иммунореактивного материала в лимфоцитах оценивали полуколичественным методом по интенсивности окрашивания: 0 – реакция отсутствует; 1 – слабая экспрессия; 2 – реакция умеренная; 3 – реакция интенсивная. Для оценки экспрессии CD3+, CD4+, CD8+-маркеров и их прогностического значения использовали метод, предложенный Л.Е. Гуревич (2003). Для оценки прогностического значения описанных типов экспрессии в клетках была использована следующая шкала: отсутствие иммунореактивности – 0 баллов; мембранный тип – 1 балл; сочетание мембранного типа с гранулярно-цитоплазматическим – 2 балла; крупногранулярный тип – 3 балла.

Для количественной оценки результатов иммуногистохимического исследования получали по 10 микрофотографий соответственно 10 случайно выбранным полям зрения на увеличении $\times 200$ для каждого образца. В дальнейшем с помощью программы компьютерного анализа изображений «Морфология 5.0» (ВидеоТест, Россия) оценивали площадь, занятую иммунопозитивными структурами, относили ее к общей площади кадра и рассчитывали показатель относительной площади (в %), который выражал экспрессию исследуемых маркеров.

Статистическая обработка результатов исследований проводилась с помощью программ Excel 2010 (Microsoft, США) и Statistica 10.0 (StatSoft, США). Для оценки достоверности различий количественных показателей применяли критерий Пирсона (χ^2), критерий Стьюдента с применением методов вариационной статистики и непараметрический критерий

Манна – Уитни. Различия признавали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При гистологическом исследовании в биоптате костной ткани наблюдали формирование сладж-феномена (депонирования крови в сосудах) с одновременным повышением проницаемости сосудистой стенки, выходом лимфоцитов и макрофагов в окружающую ткань. Отмечали формирование отека вследствие накопления серозного экссудата внутри гаверсовых каналов. Выявили начальные явления гладкой резорбции костных балок без участия остеокластов под воздействием экссудата и вследствие формирования микроциркуляторных расстройств. В костном мозге определили очаги геморрагий с большим количеством нейтрофильных лейкоцитов, моноцитов и эритроцитов. Установленные гистологические изменения костной ткани характерны для интрамедуллярной фазы ОГО в периоде сосудистых расстройств и свидетельствует о развитии заболевания в течение первых суток.

При исследовании биоптата костной ткани, взятого в более поздние сроки от начала заболевания, между костными балками наблюдали формирование крупных гнойных очагов, сообщающихся между собой. Отмечали расширение гаверсовых и фолькмановых каналов за счет неравномерного скопления экссудата, порознозность костной ткани. В препаратах красного костного мозга определяли элементы стромы красного и желтого костного мозга с диффузной обильной лейкоцитарной инфильтрацией, кровоизлияния в костномозговые пространства (рис. 1).

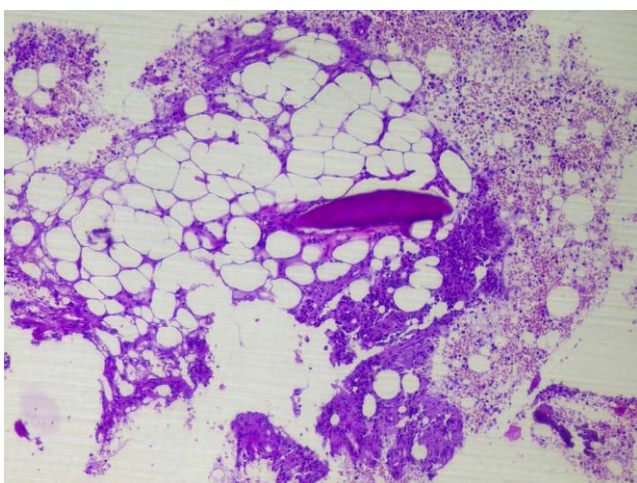


Рис. 1. Элементы желтого и красного костного мозга с диффузной обильной лейкоцитарной инфильтрацией. Окраска: гематоксилин и эозин, увеличение: ок. 10, об. 20

В биоптатах костной ткани выявили микропереломы костных балок (рис. 2), участки некроза костных балок, обширные зоны резко выраженного аутолитического рассасывания, что соответствует экстремедулярной фазе ОГО.

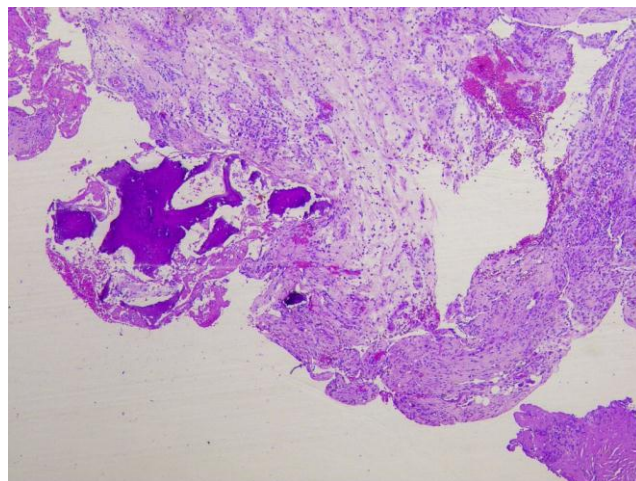


Рис. 2. Зона резорбции костной ткани, патологические микропереломы костных балок. Окраска: гематоксилин и эозином, увеличение: ок. 10, об. 20

Экспрессия иммунореактивного материала – CD3+ в красном костном мозге в экстремедулярной фазе ОГО интенсивная (3 балла). Иммунореактивный материал мелкогранулярный, рассеянный в цитоплазме клеток в сочетании мембранного типа с гранулярно-цитоплазматическим (2 балла). CD3+ лимфоциты визуализировали в красном костном мозге повсеместно, единичными элементами или небольшими скоплениями клеток в количестве от 2 до 4 между волокнами ретикулярной ткани и в инфильтрате вокруг свищевого хода. В зонах роста молодой грануляционной ткани между клетками и внеклеточным матриксом отмечали формирование небольших «клеточных дорожек» CD3+ клеток (рис. 3).

Экспрессия маркера Т-лимфоцитов-хелперов, или CD4+ в экстремедулярной фазе ОГО умеренная (2 балла). Иммунореактивный материал мелкогранулярный, цитоплазматически рассеянный, в сочетании мембранного типа с гранулярно-цитоплазматическим (2 балла). CD4+ лимфоциты в красном костном мозге выявили повсеместно. Клетки были локализованы поодиночке, в основном сопровождая артериолы. Кроме периваскулярной локализации, CD4+ клетки окружали область свищевого хода. Наблюдали продвижение CD4+ лимфоцитов вместе с молодой грануляционной тканью в область патологического очага (рис. 4).

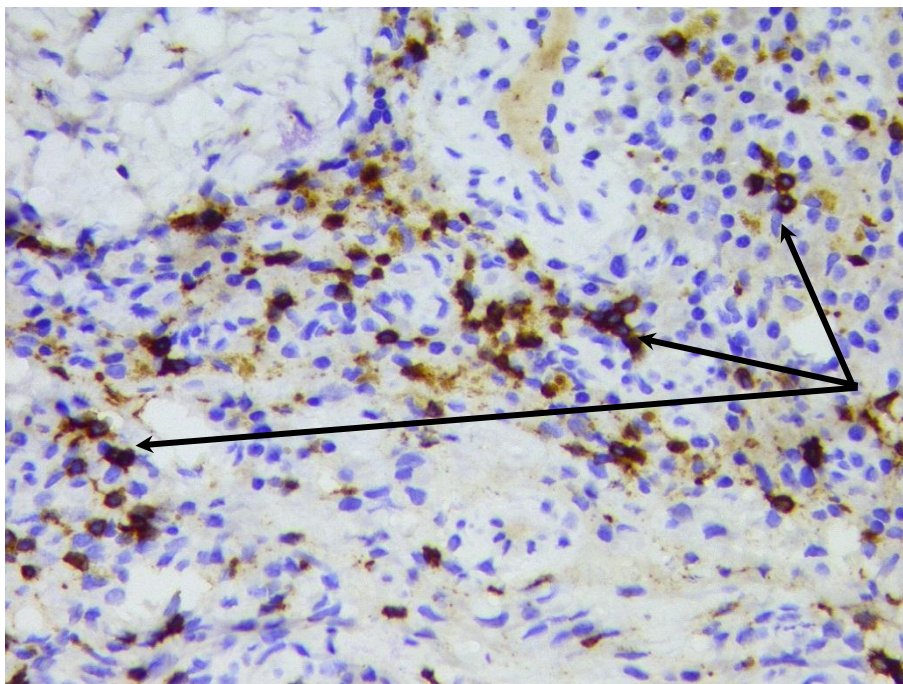


Рис. 3. Скопления CD3+ клеток в воспалительном инфильтрате (ИГХ-реакция на CD3+).
Продукт реакции коричневого цвета, увеличение: ок. 10, об. 40

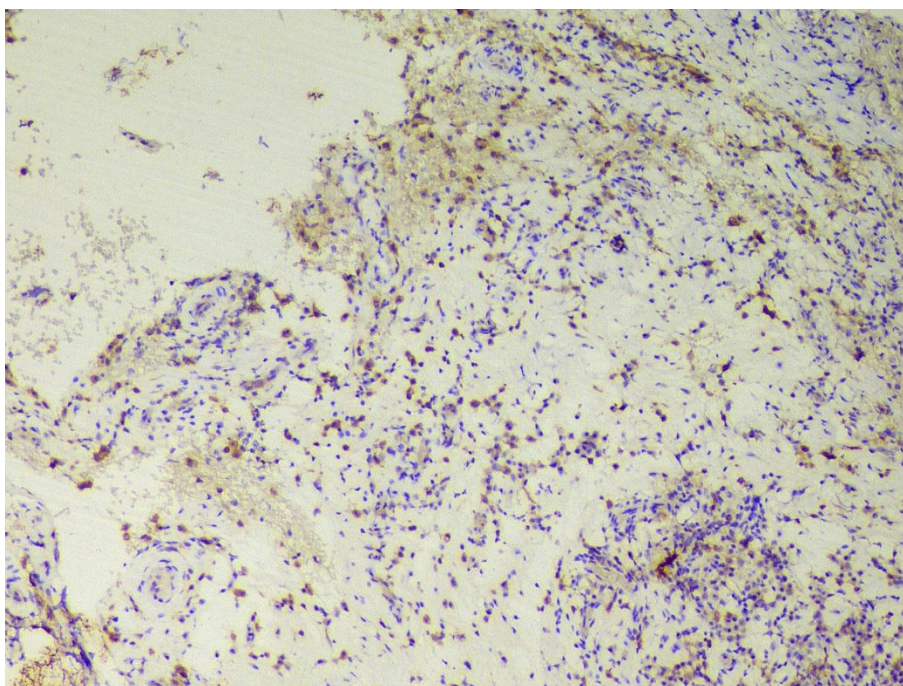


Рис. 4. CD4+ клетки в области стенки свищевого хода. ИГХ-реакция на CD4+.
Продукт реакции коричневого цвета, увеличение: ок. 10, об. 20

Экспрессия маркера цитотоксических Т-лимфоцитов, или CD8+ в экстрамедуллярной фазе ОГО умеренная (2 балла). Иммунореактивный материал – крупногранулярный, цитоплазматически рассеянный (3 балла). Регистрировали скопления CD8+ лимфоцитов в количестве от 4–6 до 20–30. Данные лимфоциты

сопровождали кровеносные сосуды микроциркуляторного русла, либо окружали их плотным кольцом, либо встраивались в их стенку. Возле единичных кровеносных сосудов отмечали скопления CD8+ лимфоцитов в виде цепочек клеток из 25–35 элементов, анастомозирующих между собой. Выявили движение

CD8+ клеток в очаг воспаления. Единичными элементами отмечали CD8+ лимфоциты в зоне стенки свищевого хода между внеклеточным матриксом грануляционной ткани.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, признаки концентрации субпопуляций лимфоцитов, в частности, популяции эффекторных Т-клеток, или CD3+/CD4+/CD8+-лимфоцитов в красном костном мозге при остром гематогенном остеомиелите у детей свидетельствует о снижении иммунорегуляторного индекса организма в целом и указывает на наличие тяжелого воспалительного процесса и угрозе развития осложнений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гаврилюк В.П., Конопля А.И., Ефременков А.М. Цитокины, система комплемента и функциональная активность нейтрофилов при остром гематогенном остеомиелите у детей // Медицинская иммунология. – 2019. – Т. 19, № 5. – С. 341.
2. Железнов Д.С., Соловьева А.А. Анализ заболеваемости острым гематогенным остеомиелитом у детей // Неделя молодежной науки – 2020: Материалы Всероссийского научного форума. – СПб.: Печатник, 2020. – С. 162.
3. Костин С.В., Гаврилюк В.П., Северинов Д.А., Сталина М.И. Современные аспекты патогенеза острого гематогенного остеомиелита // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2018. – Т. 41, № 4. – С. 539–546.
4. Сирак А.Г., Пискарева Е.И., Магомедова О.Г. и др. Роль нефагоцитирующих гранулоцитов периферической крови в клеточных реакциях при воспалении // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2019. – Т.14, № 1–2. – С. 238–242.
5. Сирак А.Г., Пискарева Е.И., Долгашова М.А. и др. Гемопоз и функциональное состояние лейкоцитов крови при воспалении на фоне локального удаления нефагоцитирующих гранулоцитов // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2020. – № 2 (74). – С. 153–156.
6. Смирнов И.Е., Рошаль Л.М., Кучеренко А.Г., и др. Изменения содержания костных биомаркёров и цитокинов в сыворотке крови при сочетанной травме у детей // Российский Педиатрический Журнал. – 2017. – № 20 (6). – С. 371–378.
7. Canavese F., Samba A., Rousset M. Pathological fractures in children: Diagnosis and treatment options // Orthop. Traumatol. Surg. Res. – 2016. – No. 102. – P. 149–159.
8. Schreiber V.M., Illingworth K.D., Ward W.T. Treating orthopaedic infections in pediatric patients // Oper. Tech. Orthop. – 2016. – No. 26 (1). – P. 12–19.

REFERENCES

1. Gavriluyuk V.P., Konoplya A.I., Efremenkov A.M. Tsitokiny, sistema komplemena i funktsional'naya aktivnost' neytrofilov pri ostrom gematogennom osteomyelite u detey [Cytokines, complement system and functional activity of neutrophils in acute hematogenous osteomyelitis in children]. *Meditsinskaya immunologiya* [Medical Immunology], 2019, vol. 19, no. 5, pp. 341. (In Russ.; abstr. in Engl.).
2. Zheleznov D.S., Solovyova A.A. Analiz zabolevayemosti ostrym gematogennym osteomyelitom u detey [Analysis of the incidence of acute hematogenous osteomyelitis in children]. *Nedelya molodezhnoy nauki – 2020: Materialy Vserossiyskogo nauchnogo foruma* [Youth Science Week – 2020: Materials of the All-Russian Scientific Forum]. St. Petersburg, Pechatnik Publ., 2020, pp. 162. (In Russ.; abstr. in Engl.).
3. Kostin S.V., Gavriluyuk V.P., Severinov D.A., Statina M.I. Sovremennyye aspekty patogeneza ostrogo gematogennogo osteomyelita [Modern aspects of the pathogenesis of acute hematogenous osteomyelitis]. *Nauchnyye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Meditsina. Farmatsiya* [Scientific Bulletin of Belgorod State University. Series: Medicine. Pharmacy], 2018, vol. 41, no. 4, pp. 539–546. (In Russ.; abstr. in Engl.).
4. Sirak A.G., Piskareva E.I., Magomedova O.G., et al. Rol' nefagotsitiruyushchikh granulotsitov perifericheskoy krovi v kletochnykh reaktsiyakh pri vospalenii [The role of nongocytic granulocytes of peripheral blood in cellular reactions in inflammation]. *Meditsinskiy vestnik Severnogo Kavkaza* [Medical Bulletin of the North Caucasus], 2019, vol. 14, no. 1–2, pp. 238–242. (In Russ.; abstr. in Engl.).
5. Sirak A.G., Piskareva E.I., Dolgashova M.A., et al. Gemopoez i funktsional'noye sostoyaniye leykotsitov krovi pri vospalenii na fone lokal'nogo udaleniya nefagotsitiruyushchikh granulotsitov [Hematopoiesis and the functional state of blood leukocytes in inflammation against the background of local removal of non-gocytic granulocytes]. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta* [Journal of the Volgograd State Medical University], 2020, no. 2 (74), pp. 153–156. (In Russ.; abstr. in Engl.).
6. Smirnov I.E., Roshal L.M., Kucherenko A.G., et al. Izmeneniya soderzhaniya kostnykh biomarkorov i tsitokinov v syvorotke krovi pri sochetannoy travme u detey [Changes in the content of bone biomarkers and cytokines in blood serum in concomitant trauma in children]. *Rossiyskiy pediatricheskiy zhurnal* [Russian Pediatric Journal], 2017, no. 20 (6), pp. 371–378. (In Russ.; abstr. in Engl.).
7. Canavese F., Samba A., Rousset M. Pathological fractures in children: Diagnosis and treatment options. *Orthop. Traumatol. Surg. Res*, 2016, no. 102, pp. 149–159.
8. Schreiber V.M., Illingworth K.D., Ward W.T. Treating orthopedic infections in pediatric patients. *Oper. Tech. Orthop*, 2016, no. 26 (1), pp. 12–19.

Контактная информация

Сирак Алла Григорьевна – д. м. н., профессор, зав. кафедрой гистологии, Ставропольский государственный медицинский университет, e-mail: sergejsirak@yandex.ru