

УДК 611.91:0.11.018+612.017.1-001.8-053.2

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ И АПОПТОЗА В КЛЕТКАХ КОСТНОЙ И ГЕМОПОЭТИЧЕСКОЙ ТКАНЕЙ РУКОЯТКИ ГРУДИНЫ У ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА

Созыкин А.А.¹, Кивва А.Н.¹, Овсиенко Т.Е.¹, Новиков К.А.¹, Войналович-Ханова Ю.А.²

¹ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет Минздрава России», Ростов-на-Дону, Россия (344022, Ростов-на-Дону, Нахичеванский пер., 29), e-mail: okt@rostgmu.ru

²ГБУ РО «Областная клиническая больница №2», Ростов-на-Дону, Россия (344029, Ростов-на-Дону, 1-й Конной Армии ул., 33), e-mail: ob2-polik@mail.ru

Целью работы явилось изучение выраженности процессов апоптоза и пролиферации клеток костной и гемopoэтической тканей в различных отделах рукоятки грудины у детей раннего возраста. У пятерых пациентов раннего возраста, перенесших эзофагопластику, по способу, разработанному в клинике детской хирургии Ростовского государственного медицинского университета, с помощью методов классической гистологии, иммунной гистохимии (выявление маркеров апоптоза P-53 и bcl – 2; маркеров пролиферации Ki – 67 и Cyclin D1t) и определения митотического индекса клеток костной ткани и красного костного мозга, были исследованы гистологические препараты рукояток грудины. Установлено, что костномозговые ячейки распределены равномерно по всему объему губчатого вещества новообразующейся костной ткани и повсеместно заполнены главным образом митотически делящимися клеточными элементами красного костного мозга. «Апоптотический» механизм гибели клеточных элементов костной и миелоидной тканей не обнаруживается. Остеогенные и костномозговые клеточные популяции во всех исследуемых участках развивающейся рукоятки грудины находятся преимущественно в состоянии активной пролиферации. Наиболее выражены эти процессы в верхних отделах рукоятки грудины, что следует учитывать при выполнении оперативных вмешательств.

Ключевые слова: рукоятка грудины, дети, апоптоз, пролиферация.

IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF PROLIFERATION AND APOPTOSIS PROCESSES IN THE CELLS OF BONE AND HEMATOPOIETIC TISSUES OF THE STERNAL MANUBRIUM IN INFANTS

Sozykin A.A.¹, Kivva A.N.¹, Ovsienko T.E.¹, Novikov K.A.¹, Voinalovich-Khanova Y.A.²

¹Rostov State Medical University of the Russian Federation Ministry of Public Health, Rostov-on-Don, Russia (344022 Rostov-on-Don, Nakhichevansky Ave. 29), e-mail: okt@rostgmu.ru

²Regional Clinical Hospital No. 2, Rostov-on-Don, Russia (344029 Rostov-on-Don, 1 Konnoy Armii St. 33), e-mail: ob2-polik@mail.ru

The paper is devoted to the study of proliferation and apoptosis intensity in the cells of bone and hematopoietic tissues of various parts of the manubrium in infants. We used classic histological and immunohistochemical methods (detection of apoptosis-related P-53 and bcl-2 markers, Ki-67 and Cyclin D1t proliferation markers) and mitotic index determination to analyze the bone and red bone marrow cells of histologic specimens from the manubrium of sternum of five infant patients after esophagoplasty performed according to the procedure developed at the Pediatric Surgery Clinic of the Rostov State Medical University. It has been established that medullary spaces are distributed evenly throughout the cancellous tissue of neoformed bone, and everywhere they are mostly filled by mitotically dividing cell components of the red bone marrow. Apoptosis of cell components in the bone and myeloid tissues is not found. Osteogenic and bone-marrow cell populations in all examined parts of the developing sternal manubrium are mainly in the active proliferation state. These processes are most pronounced in the upper parts of the manubrium, the fact should be considered during surgery.

Keywords: sternal manubrium, infants, apoptosis, proliferation.

В настоящее время наблюдается рост оперативных вмешательств на рукоятке грудины [10,11], в том числе и у детей раннего возраста [7]. Практически значимым является поиск оптимальных органосберегающих подходов в детской хирургии при оперативных вмешательствах на рукоятке грудины [6,8]. В связи с этим актуальным является

предпринятое многими авторами дальнейшее всестороннее изучение её строения [1-3,9]. Однако в доступной литературе мы не встретили работ, посвященных выявлению, с помощью метода иммуногистохимии, апоптотической и пролиферативной активности клеток, образующих кость и красный костный мозг в рукоятке развивающейся грудины детей первых трех лет жизни.

Цель исследования

Целью настоящего исследования явилось изучение выраженности процессов апоптоза и пролиферации клеток костной и гемопоэтической тканей в различных отделах рукоятки грудины у детей раннего возраста.

Материалы и методы исследования

Материалом исследования явились рукоятки грудины пятерых детей в возрасте от 1 до 3 лет, отсеченные при выполнении эзофагопластики по методу, разработанному в клинике детской хирургии Ростовского государственного медицинского университета [6].

Фрагменты рукоятки грудины фиксировались, обезживались, выполнялась их декальцинация, заливка в парафин. Из блоков исследуемых биологических объектов изготавливались серийные срезы с последующим окрашиванием гематоксилином-эозином. Особенности строения рукоятки грудины в различных её отделах оценивались на гистологических препаратах.

Для выявления в костной и кроветворной ткани присутствия апоптотических клеток, а также выраженности процессов пролиферации применялись гистологическое и иммуногистохимическое исследования. На срезах рукоятки грудины в клетках костной и миелоидной (кроветворной) тканей определялась активность основного регулятора апоптоза Р-53, клон DO-7 и ключевого маркера пролиферации Ki-67 клоны MIB -5, TEC- 3. Ставились специфические реакции на выявление активности факторов, регулирующих апоптотическую активность – bcl-2 клон DO-7 и пролиферативную активность Cyclin D1t клон DCS-6, клон DO-7. Затем, с помощью светооптического микроскопа ZEISS Prinio Star 415501 – 1800 - 000 во всех полях зрения учитывались клетки на различных стадиях проявления пролиферации. Определялись митотические индексы для костной и для гемопоэтической тканей как проценты делящихся клеток от общего числа увиденных клеток.

Для сравнения полученных показателей использовался непараметрический порядковый критерий Манна – Уитни.

Результаты исследования и их обсуждение

Исходя из особенностей гистотопографического строения рукоятки грудины, целесообразно разделить и переднюю, и заднюю области рукоятки грудины на верхний и нижний отделы, условной линией проходящей по нижнему краю первого ребра.

Проведенное гистологическое исследование позволило установить, что передняя часть рукоятки формирующейся грудины, уже у ребенка 1 года жизни, и в верхнем, и нижнем её отделах состоит из пластинчатой костной ткани. На поверхности она представлена тонким слоем компактного минерализующегося вещества – параллельно ориентированных костных пластинок, а в глубине состоит из губчатого вещества, также представленного костными пластинками, сформированными в трабекулы губчатого вещества. Сами трабекулы разнонаправлены, еще слабо минерализованы и, сливаясь, образуют дуги, арки, которые, в свою очередь, формируют сообщающиеся между собой полости (ячейки) различного объема с неровными краями (рис.1).

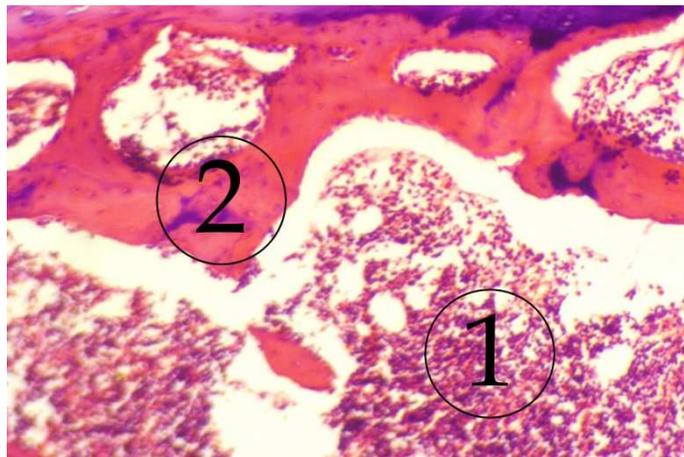


Рис.1. Костные трабекулы в новообразующейся костной ткани передней области рукоятки грудины. Ребенок 1 год 8 месяцев. Окраска гематоксилином-эозином. Ув.х20.

1-костные ячейки, заполненные структурами красного костного мозга.

2- костные трабекулы губчатой кости

Формирующаяся ячеистость заполнена элементами красного костного мозга с признаками активной пролиферативной активности стромального и гемопоэтического компонентов, что подтверждается иммуногистохимическим исследованием.

По краям костных балок небольшими группами или «цепочками» располагаются остеобласты с признаками синтетической активности: крупными ядрами, 2–3 ядрышками, базофильной цитоплазмой. Вдоль границ костных пластин обнаруживаются отросчатые остециты с небольшими ядрами и оксифильной цитоплазмой.

Задняя часть рукоятки грудины в верхнем отделе также представлена компактным и губчатым веществом пластинчатой костной ткани. Здесь вдоль пластин и трабекул обнаруживаются остеобласты (некоторые на стадиях про-; мета-; и ана- фазах митоза) и, вдоль костных пластин, немногочисленные мелкие остециты с невыраженной базофилией цитоплазмы.

Задняя часть грудины в нижнем отделе лишь наполовину представлена трабекулярной костью, а в областях суставных креплений сохраняет хрящевую основу (остатки эмбриональной «хрящевой модели»), постепенно преобразующуюся в костную ткань за исключением непосредственно суставных поверхностей. В клетках красного костного мозга, как в кроветворной его части, так и в стромальном компоненте обнаруживаются фигуры митоза. Жировые клетки стромы – адипоциты присутствуют в незначительных количествах во всех исследуемых отделах.

При прицельном иммуногистохимическом исследовании во всех исследуемых отделах рукоятки грудины клеточных масс красного костного мозга и костной ткани маркерами апоптоза Р-53 и bcl – 2, гибнущих путем запрограммированной клеточной гибели клеток не обнаружено. Реакция негативна.

Не обнаруженная в нашем исследовании положительная реакция на белок Р-53 (одного из ключевых регуляторов клеточного цикла) позволяет утверждать об отсутствии блокировки пролиферации остеобластов и кроветворных бластных клеток в фазе G1. По активации Р-53 судят не только о включении механизмов клеточного самоуничтожения, но и регистрируют различные сигналы при внешних воздействиях на клетку (вирусная инфекция, гипоксия). Оценивается также состояние повреждения ядерной ДНК, активация онкогенов, и поскольку реакция отрицательная, подобных состояний в исследуемом материале не обнаружено. Также можно утверждать о сохранении неповрежденными геномов исследуемых клеток.

Отрицательная реакция на bcl – 2 свидетельствует о блокировке каспаз и, следовательно, отсутствии запуска необратимых «смертельных» реакций в стромальных и гемопоэтических клетках красного костного мозга, остеобластического дифферона, стенок сосудов микроциркуляторного русла. Полученные нами результаты отсутствия апоптотически гибнущих клеточных элементов в рукоятке грудины детей раннего возраста согласуются с данными [5] о задействованных других способах замены эмбриональной соединительной, хрящевой тканей на костную ткань.

Маркеры пролиферации Ki - 67 (Рис.2.) и Cyclin D1t (Рис.3.) во всех исследуемых областях рукоятки грудины дают положительную реакцию, как в клетках красного костного мозга, так и в остеобластах.

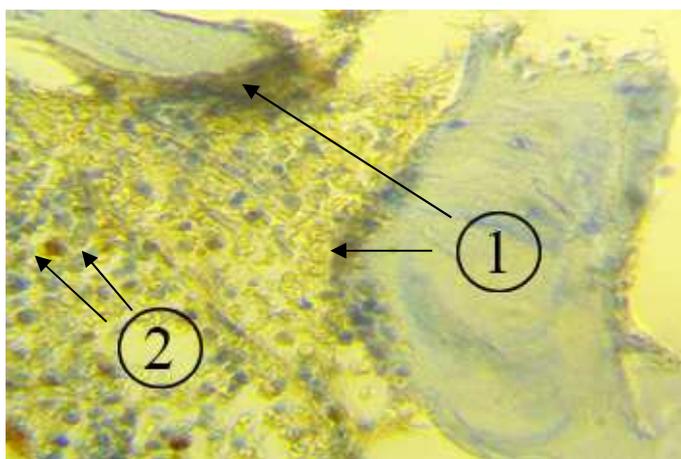


Рис. 2. Ребенок 2года 1 месяца. Ув.х60. В качестве примера указана стрелками положительная реакция Ki-67 в некоторых: 1– остеобластах. 2 – клетках красного костного мозга

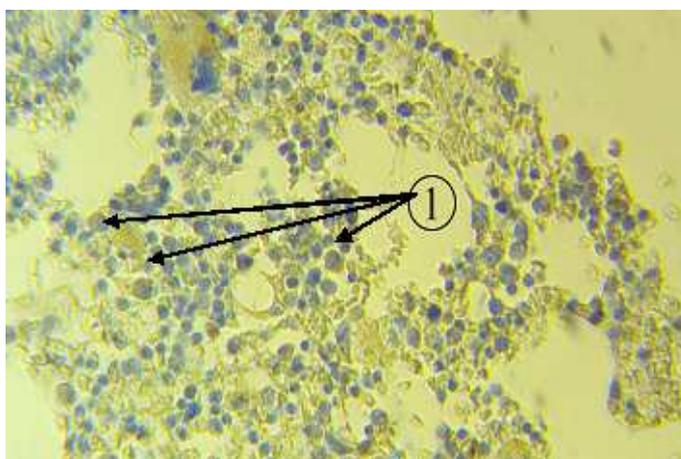


Рис. 3. Активность Cyclin D1t в клеточных элементах миелоидного кроветворения, заполняющих костномозговые полости передней области рукоятки грудины. Ребенок 1 год 1 месяца. Ув. х 40. 1 – пример клеток красного костного мозга с положительной реакцией

Такая выявленная синхронная пролиферативная активность связана с продолжающимся активным развитием красного костного мозга и кости рукоятки грудины как органов, а также с тесным функциональным взаимодействием разнонаправлено дифференцирующихся клеточных элементов. Это согласуется с данными исследования и костей конечностей [4], согласно которым в развивающихся трубчатых костях функционирует так называемая «ниша стволовой кроветворной клетки». Она образована несколькими представителями системы стромальных клеток костного мозга, происходящими из общей мезенхимной клетки. Остеобласты и их предшественники в эндосте – внутренней выстилке костномозговых ячеек, играют важную роль в создании «ниши», участвуя в созревании и поддержании пролиферации стволовой кроветворной

клетки. Пограничные с «нишей» остеобласты взаимодействуют с клетками-партнерами, вырабатывая молекулы адгезии, специфичные цитокины и факторы роста.

Ki 67 является не только одним из ключевых маркеров пролиферации, но и косвенным определителем скорости деления клеток. Следовательно, выявленная одномоментная положительная реакция на этот маркер во многих клетках костной и кроветворной тканях рукоятки грудины указывает на высокую скорость созидания клеточных элементов исследуемых тканей.

Циклины различаются экспрессией на определенных стадиях клеточного цикла и, соответственно, на различных стадиях регулируют митотическое деление клетки. Следовательно, выявленная положительная реакция на них в клетках костной и кроветворной тканей отражает цикличность процессов сборки и разборки макромолекулярного комплекса в процессе каждого клеточного цикла.

Данные гистологического и иммуногистохимических исследований подтверждены подсчетом митотического индекса клеток костной ткани и красного костного мозга во всех изучаемых нами отделах рукоятки грудины у детей раннего возраста.

Установлено, что во всех исследуемых отделах передней области грудины митотический индекс клеток костной ткани более высок по сравнению с аналогичными показателями, определяемыми в задней области рукоятки грудины. Вместе с тем показатели митотического индекса клеток костной ткани верхних отделов и в передней и в задней областях рукоятки грудины преобладают над показателями, зарегистрированными в соответствующих нижних отделах. Так митотический индекс клеток костной ткани в верхнем отделе передней области рукоятки грудины составил $71 \pm 2,6$ %, что статистически значимо выше, чем митотический индекс клеток костной ткани в нижнем отделе передней области рукоятки грудины ($54 \pm 1,3$ %). А митотический индекс клеток костной ткани в верхнем отделе задней области рукоятки грудины ($53 \pm 1,1$ %) статистически достоверно выше митотического индекса костной ткани ($38 \pm 1,04$ %), определенного в нижнем отделе задней области рукоятки грудины. Полученные данные свидетельствуют о более интенсивном развитии костной ткани в передней области рукоятки грудины по сравнению с задней, что может быть обусловлено внешними механическими нагрузками на переднюю поверхность рукоятки.

При анализе результатов определения митотического индекса клеток красного костного мозга выявлено преобладание этого показателя в верхних отделах рукоятки грудины над нижними отделами, как в передней, так и в задней областях. Так в передней области рукоятки грудины митотический индекс клеток красного костного мозга в верхнем отделе достигает $71 \pm 1,9$ %, что статистически значимо выше аналогичного показателя

($36\pm 3,4$ %), регистрируемого в нижнем отделе. Подобное же соотношение наблюдается и в задней области рукоятки грудины, где митотический индекс клеток красного костного мозга в нижнем отделе равняется $62\pm 3,7$ %, что статистически достоверно ниже, чем митотический индекс клеток красного костного мозга в верхнем отделе ($81\pm 4,1$ %). Следовательно, во всех областях грудины идут интенсивные процессы размножения клеток красного костного мозга, наиболее выраженные в верхних отделах рукоятки грудины, что следует учитывать при выполнении оперативных вмешательств.

Заключение

Таким образом, гистологическое и иммуногистохимическое изучение основных клеточных дифферонов развивающейся рукоятки грудины детей раннего возраста, а также подсчет митотического индекса клеток костной и кроветворной тканей позволили убедиться, что:

1. Костномозговые ячейки распределены равномерно по всему объему губчатого вещества новообразующейся костной ткани и повсеместно заполнены, главным образом, митотически делящимися клеточными элементами красного костного мозга.
- 2.. «Апоптотический» механизм гибели клеточных элементов костной и миелоидной тканей не обнаруживается.
3. Остеогенные и костномозговые клеточные популяции во всех исследуемых участках развивающейся рукоятки грудины находятся преимущественно в состоянии активной пролиферации. Наиболее выражены эти процессы в верхних отделах рукоятки грудины, что следует учитывать при выполнении оперативных вмешательств.

Список литературы

1. Кивва А.Н., Новиков К.А., Каймакчи М.Ю., Войналович-Ханова Ю.А., Дошина М.Ю. Ультразвуковое исследование толщины рукоятки грудины в разных её отделах у детей раннего возраста // *Фундаментальные исследования*. – 2015. – № 1-7. – С. 1366-1369.
2. Созыкин А.А., Кивва А.Н., Новиков К.А. Относительные объемы морфологических компонентов, составляющих рукоятку грудины у детей раннего возраста // *Медицинский вестник Юга России*. – 2014. – № 3. – С.136-139.
3. Созыкин А.А., Кивва А.Н., Новиков К.А. Гистотопографические особенности мышц, расположенных на рукоятке грудины у детей раннего возраста // *Современные проблемы науки и образования*. – 2014. – № 5; URL: www.science-education.ru/119-14737 (дата обращения: 03.10.2014).

4. Улумбеков Э.Г., Челышев Ю.А. Гистология: введение в патологию. – М: ГОЭТАР, 2002. – 465 с.
5. Хэм А., Кормак Д. Гистология. – М: Мир. 1982. – Т. 2. – 272 с.
6. Чепурной Г.И., Кивва А.Н., Чепурной М.Г., Новиков К.А., Каймакчи М.Ю., Войналович-Ханова Ю.А. Способ наложения шейного эзофагоколоанастомоза при пластике пищевода у детей // Патент России. № 2552095. 2015. Бюл. № 3.
7. Чепурной М.Г. Хирургические приемы, улучшающие функцию толстокишечного искусственного пищевода: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Ростов-на-Дону, 2009. – 24 с.
8. Чепурной М.Г., Чепурной Г.И., Кацупеев В.Б. Способ наложения шейного эзофагоколоанастомоза при пластике пищевода у детей // Патент России №. 2438606. 2012. Бюл. № 1.
9. Weaver A.A. Morphometric analysis of variation in the sternum with sex and age / Weaver A.A, Schoell S.L, Nguyen C.M, et al. // J. Morphol. 2014. Vol. 275. P. 1284-1299.
10. Xiu P. Anatomic and morphometric analysis of manubrium sterni as a source of autograft for anterior cervical fusion surgery using quantitative 3-dimensional computed tomographic scans / Xiu P., Shui D., Wang Q., et al. // Spine. 2012. Vol. 37. P. 935-941.
11. Zhang G. Autogenous rib grafts for reconstruction of the manubrium after resection: Technical refinements and outcomes / Zhang G., Liang C., Gang Shen M.M, et al. // Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. 2014. Vol. P. 1-6.

Рецензенты:

Дерижанова И.С., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону;

Татьянченко В.К., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой оперативной хирургии, клинической анатомии и патологической анатомии ФПК и ППС ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону.