

На правах рукописи

Курков Александр Витальевич

Морфологические проявления дисплазии соединительной ткани в реберных хрящах при воронковидной и килевидной деформациях грудной клетки у детей

14.03.02 - патологическая анатомия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва, 2019

Работа выполнена в ФГАОУ ВО Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет) Минздрава России.

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Пауков Вячеслав Семенович

Официальные оппоненты:

Берченко Геннадий Николаевич – доктор медицинских наук, профессор, ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени Н.Н. Приорова" Минздрава России, патологоанатомическое отделение, заведующий отделением

Талалаев Александр Гаврилович – доктор медицинских наук, профессор, ГБУЗ «Морозовская детская городская клиническая больница Департамента здравоохранения города Москвы», патологоанатомическое отделение, врач-патологоанатом

Ведущая организация: ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека»

Защита диссертации состоится «___» «_____» 2019 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.040.01 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991 Москва, Трубецкая ул., д.8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1 и на сайте www.sechenov.ru

Автореферат диссертации разослан «___» «_____» 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

доктор медицинских наук,

доцент

Блинова Екатерина Валериевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Воронковидная (pectus excavatum) и килевидная (pectus carinatum) деформации грудной клетки у детей – тяжелые заболевания, приводящие к патологии дыхательной и сердечно-сосудистой систем, косметическому дефекту и болям в грудной клетке, которые могут значительно снижать качество жизни (Fokin A.A. Anatomical, histologic, and genetic characteristics of congenital chest wall deformities // Seminars in thoracic and cardiovascular surgery. WB Saunders. 2009. Vol. 21. Iss. 1. P.44-57; Cobben, J.M. Pectus excavatum and carinatum //European journal of medical genetics. 2014. Vol. 57. Iss. 8. P.414-417). Степень тяжести этих деформаций может варьировать от практически бессимптомного течения до тяжелых функциональных расстройств. Наиболее тяжело протекает воронковидная деформация грудной клетки, поскольку при ней возникает выраженное сдавливание органов средостения (Fokin A.A. Anatomical, histologic, and genetic characteristics of congenital chest wall deformities; Захариу З. Килевидная деформация грудной клетки: обзор и результат ортопедической компрессионной терапии // Медицинский вестник Северного Кавказа. 2016. Т. 11. № 2. С.150-152). Радикальным способом устранения таких деформаций является хирургическая коррекция. Существует более 100 различных методик торакопластики для коррекции деформаций грудной клетки, однако частота неудовлетворительных результатов и послеоперационных рецидивов составляет от 3,5% до 32% (Fonkalsrud E.W. Surgical management of pectus carinatom: 30 years' experience // World journal of surgery. 2001. Vol. 25. Iss. 7. P.898-903.; Williams A. M. Pectus deformities of the anterior chest wall // Paediatric respiratory reviews. 2003. Vol. 4. Iss. 3. P.237-242; Карабеков А.К. Способ фиксации грудинореберного комплекса при воронкообразной деформации грудной клетки: материалы II Евразийского конгресса и II съезда травматологов-ортопедов Кыргызстана, посвященного 75-летию профессора С. К. Кожокматова // Медицина Кыргызстана. 2011. №. 4. С.65; Горемыкин И.В. Соотношение степени воронкообразной деформации грудной клетки с тяжестью дисплазии соединительной ткани у детей // Саратовский научно-медицинский журнал. 2012. Т. 8. № 3). Применяют и консервативные методы, которые малоэффективны (Захариу З. Килевидная деформация грудной клетки: обзор и результат ортопедической компрессионной терапии). При этом более, чем в 50% случаев, после использования консервативных методов возникают

рецидивы заболевания (Разумовский А. Ю. Торакопластика при килевидной деформации грудной клетки у детей // Хирургия. Журнал им. НИ Пирогова. 2011. № 4. С.25-31). Вероятно, подобные результаты связаны с отсутствием четких представлений о механизмах развития этих заболеваний, что препятствует разработке патогенетически обоснованных методов их коррекции (Кулик И.О. Этиология и патогенез воронкообразной деформации грудной клетки у детей // Травматология и ортопедия России. 2013. №. 2 (68) С.136-141).

Этиология и патогенез воронковидной деформации (ВД) и килевидной деформации (КД) грудной клетки выяснены недостаточно: важнейшим фактором в их развитии считают структурно-функциональные изменения хрящевой части ребер, однако результаты проведенных исследований не дают исчерпывающей информации о роли этих изменений в патогенезе обоих видов деформаций (Desmarais T. J. Pectus carinatum // Current opinion in pediatrics. – 2013. Vol. 25. Iss. 3. P.375-381; Fokin A.A. Anatomical, histologic, and genetic characteristics of congenital chest wall deformities; Cobben, J.M. Pectus excavatum and carinatum). Многие исследователи рассматривают ВД и КД грудной клетки как костные проявления дисплазии соединительной ткани (ДСТ), наследственных нарушений соединительной ткани (ННСТ), как дифференцированного, так и недифференцированного типов (Кадурина Т.И. Дисплазия соединительной ткани: руководство для врачей. СПб.: Элби-СПб, 2009, 704 с.; Loeys B.L. The revised Ghent nosology for the Marfan syndrome // Journal of medical genetics. 2010. Vol. 47. Iss. 7. P.476-485; Кадурина Т.И. Дисплазия соединительной ткани: путь к диагнозу // Вестник Ивановской медицинской академии. 2014. Т. 19. № 3. С.5-11). ДСТ (ННСТ) – системная патология с прогрессирующим течением, связанная с нарушениями метаболизма компонентов экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ) соединительной ткани, а также - ее морфогенеза (Кадурина Т.И. Дисплазия соединительной ткани: руководство для врачей; Rimoin D. L. Emery and Rimoin's essential medical genetics. Amsterdam.: Elsevier, 2013. 646 p.; Аникин В.В. Наследственные нарушения соединительной ткани в кардиологии. Диагностика и лечение //Российский кардиологический журнал. 2013. № 1. С.1-32). Несмотря на то, что взаимосвязь ДСТ с ВД и КД грудной клетки предполагается давно (Кадурина Т.И. Дисплазия соединительной ткани: руководство для врачей; Cobben, J.M. Pectus excavatum and carinatum), тем не менее, ни в одном из исследований, не изучена ее роль в развитии этих деформаций. Остается также неизвестным, являются ли ВД и

КД грудной клетки проявлением дифференцированного или недифференцированного типов ДСТ. Также остается неизученным и морфологический субстрат ДСТ в реберных хрящах – то есть морфологические изменения структурных компонентов реберных хрящей, посредством которых ДСТ приводит к формированию ВД или КД грудной клетки у детей.

Степень разработанности темы исследования

Анализ мировой литературы показывает, что детальных исследований, посвященных патогенезу ВД и КД грудной клетки и роли ДСТ реберных хрящей в развитии этих деформаций, нет (Fokin A.A. Anatomical, histologic, and genetic characteristics of congenital chest wall deformities; Cobben, J.M. Pectus excavatum and carinatum). Молекулярные механизмы, лежащие в основе патогенеза ВД и КД грудной клетки, детально не изучены, результаты отдельных работ, нередко, противоречивы, а морфологический субстрат, свидетельствующий о ДСТ в хрящевой ткани при этих заболеваниях ни в одной из работ не показан. Следует особо подчеркнуть, что такие важные структурные элементы реберных хрящей, как хрящевые каналы, содержащие кровеносные и лимфатические сосуды и обеспечивающие трофику хрящевой ткани, при ВД и КД грудной клетки не изучены ни в одной из работ, а фокусы амиантоидной трансформации (АТ) матрикса описаны лишь в единственном исследовании (Бардахчян Э.А. Особенности ультраструктурных изменений реберного хряща детей при различных деформациях грудной клетки // Архив патологии. 2002. Т. 64. № 5. С.40-45.) без детального ее изучения. Кроме того, ни в одной из работ, посвященных ВД и КД грудной клетки, не была проведена морфометрия фокусов АТ с последующей статистической обработкой полученных данных.

Таким образом, ни отечественные, ни зарубежные исследования не дают полное представление о патогенезе ВД и КД грудной клетки и роли ДСТ реберных хрящей в развитии этих заболеваний, что затрудняет разработку их патогенетической терапии.

Цель исследования

Выявить характерные морфологические проявления ДСТ в реберных хрящах у детей с воронковидной и килевидной деформациями грудной клетки.

Задачи исследования

1. Изучить гистологическое строение, а также – гистохимические, иммуногистохимические, ультраструктурные, оптические и морфометрические

характеристики реберных хрящей у детей 8-17 лет с нормальной грудной клеткой, у детей 8-17 лет с ВД и у детей 9-17 лет с КД грудной клетки.

2. Для каждой из групп исследования дать сравнительную характеристику различных типов очагов фибриллизации (АТ) матрикса реберных хрящей, определить количество и состояние хрящевых лакун с хондроцитами, а также – хрящевых каналов.

3. Во всех группах исследования определить диапазон морфометрических показателей реберных хрящей и с помощью методов математической статистики провести сравнительный анализ полученных результатов между группами.

4. На основании сравнения полученных результатов в группах исследования выделить характерные морфологические проявления ДСТ в реберных хрящах у детей с ВД и КД грудной клетки.

Научная новизна

1. Впервые в мире показана взаимосвязь количества хрящевых каналов и хрящевых лакун с развитием ВД и КД грудной клетки у детей.

2. Впервые в мире выделены и описаны три ранее неизвестных типа фокусов АТ матрикса реберных хрящей, обозначенные нами как «переплетенный», «тонковолокнистый» и «внутрилакунарный», которые встречаются как в норме, так и при ВД и КД грудной клетки у детей. Кроме того, детально исследована структура ранее известного типа этой трансформации, названного нами «каноническим».

3. Также, впервые показано, что в реберном хряще, как в норме, так и при деформациях грудной клетки амиантоидные волокна (АВ) в очагах АТ состоят из коллагена II типа, являясь, таким образом, производными нативного матрикса. При этом в ходе АТ матрикса не образуются коллагены I и III типов.

4. Впервые в мире показана взаимосвязь развития ВД и КД грудной клетки с количественными изменениями фокусов АТ разных типов и взаимосвязь этой трансформации со степенью клинических проявлений ДСТ.

5. Впервые в мире систематизированы морфологические изменения реберных хрящей у детей с ВД и КД грудной клетки, позволяющие отнести эти деформации к ДСТ.

Теоретическая и практическая значимость работы

Предложена обоснованная схема патогенеза ВД и КД грудной клетки, разработанная на основе выявленных морфологических изменений реберных хрящей,

которые являются проявлениями их ДСТ. Эта схема может способствовать разработке в клинической практике новых методов коррекции деформаций грудной клетки и усовершенствованию уже существующих.

Предложен алгоритм комплексной морфологической оценки строения гиалиновой хрящевой ткани, включающий в себя оценку ее клеточного компонента и экстрацеллюлярного матрикса. Это позволит детально изучать морфологические изменения гиалиновых хрящей при других их патологиях, связанных с ДСТ (например, трахеобронхомаляция).

Методология и методы исследования

Для доказательства связи ВД и КД грудной клетки с ДСТ реберных хрящей у детей были изучены структурные компоненты хрящей, как с помощью традиционных морфологических методов, так и с помощью нелинейно-оптической (НЛОМ), атомно-силовой (АСМ), трансмиссионной (ТЭМ) и сканирующей (СЭМ) электронной микроскопии, позволяющих выявить и оценить изменения структурных компонентов реберного хряща и найти особенности этих изменений при различных вариантах деформации грудной клетки у детей. При этом объективность полученных данных была подтверждена статистической обработкой результатов морфометрии.

Положения, выносимые на защиту

1. Фокусы фибриллизации являются компонентом матрикса реберных хрящей у детей, как с нормальной грудной клеткой, так и с ее ВД и КД и представляют собой различные типы АТ: «тонковолокнистый», «переплетенный», «канонический» и «внутрилакунарный». Каждый из них обладает определенными морфологическими характеристиками и формируется из нативного матрикса.

2. В основе развития ВД и КД грудной клетки у детей лежат морфологические изменения реберных хрящей, характеризующиеся уменьшением количества хрящевых каналов и хрящевых лакун с хондроцитами, ремоделированием экстрацеллюлярного матрикса в виде увеличения частоты встречаемости и площади фокусов АТ, а также – изменения корреляций между этими структурными перестройками реберных хрящей и возрастом обследованных, что можно рассматривать как проявления ДСТ реберных хрящей при ВД и КД грудной клетки у детей.

3. Наличие одинаковых морфологических изменений в реберных хрящах у детей с ВД и КД грудной клетки при незначительных различиях позволяют рассматривать оба вида деформаций как разные варианты течения одного заболевания – ДСТ.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным количеством исследуемых образцов, взятых от 34 детей, а также применением широкого спектра морфологических методов (гистологические, гистохимические, иммуногистохимические (ИГХ), НЛОМ, ТЭМ, СЭМ, АСМ, морфометрия) с учетом клинических и анамнестических данных и использованием методов математической статистики.

Апробация диссертации состоялась на конференции кафедры патологической анатомии имени академика А.И. Струкова ФГАОУ ВО Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет) Минздрава России 12 декабря 2018 года.

Результаты исследования были доложены на V Съезде Российского общества патологоанатомов (Челябинск, июнь 2017) и на Всероссийской конференции «современные проблемы гистологии и патологии скелетных тканей» (Рязань, октябрь 2018).

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования используются в клинической практике и при обучении студентов, ординаторов и аспирантов кафедры патологической анатомии имени академика А.И. Струкова, а также – в лаборатории экспериментальной морфологии Института регенеративной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет) Минздрава России.

Личный вклад автора в выполнении работы

Лично автором выполнены обзор и анализ литературы, сбор операционного и аутопсийного материала, гистологическое, морфометрическое и гистохимическое исследования, статистическая обработка, а также – анализ и систематизация полученных результатов. Автор принимал непосредственное участие в сборе и изучении клинических данных, ИГХ-исследовании, НЛОМ, ТЭМ, СЭМ и АСМ.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Основные научные положения соответствуют паспорту специальности 14.03.02 - патологическая анатомия, а именно – области исследований: «Исследование патогенетических механизмов развития заболеваний в целом и отдельных их проявлений (симптомы, синдромы), создание основ патогенетической терапии».

Публикации

Основное содержание диссертационного исследования достаточно полно отражено в 7 научных работах аспиранта, в том числе в 3 статьях в журнале, рекомендованном ВАК Минобрнауки России (2 оригинальных исследования, 1 обзор литературы).

Объем и структура работы

Диссертационная работа изложена на 181 странице машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, изложения результатов исследования и их обсуждения, выводов, списка сокращений и списка литературы. В работе использовано 7 таблиц, 94 рисунка. Список литературы представлен на 13 страницах и включает 117 источников литературы, в том числе 26 отечественных и 91 зарубежный.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Исследуемые реберные хрящи, взятые от 34 детей в возрасте от 8 до 17 лет, были разделены на три группы. В группе контроля (1-ая группа) материал был получен при аутопсиях, проведенных в ГБУЗ «Бюро судебно-медицинской экспертизы ДЗМ» у 10 детей 8-17 лет без деформаций грудной клетки. Во 2-ой группе материал был получен в ходе торакопластики, выполненной в ГБУЗ города Москвы НИИ Неотложной детской хирургии и травматологии ДЗМ у 12 детей 8-17 лет с ВД грудной клетки, в 3-ей – у 12 детей 9-17 лет с КД грудной клетки. У всех пациентов были получено добровольное согласие на морфологическое исследование операционного материала. В предоперационном периоде при клиническом исследовании изучали степень ДСТ с помощью полуколичественных методов (Кадурина Т.И. и др., 2014 г), также выясняли наследственный анамнез. В исследование не были включены пациенты или умершие с травмами грудной клетки, патологией органов грудной клетки и с системными

заболеваниями опорно-двигательного аппарата (рахит, злокачественные новообразования и др.).

Гистологическое исследование проводили на базе кафедры патологической анатомии имени академика А.И. Струкова и лаборатории экспериментальной морфологии Института регенеративной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет) Минздрава России. Гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином, пикросириусом красным, а также – по методу Маллори в модификации Gallego на коллагеновые волокна, толуидиновым синим на кислые гликозаминогликаны (ГАГ). Готовые препараты изучали при помощи световой, фазово-контрастной, темнопольной и поляризационной микроскопий.

Исследование, анализ и фотографирование гистологических и иммуногистохимических препаратов, а также – полутонких срезов проводили с использованием микроскопа «LEICA DM4000 B LED», оснащенного цифровой видеокамерой «LEICA DFC7000 T» и программного обеспечения «LAS V4.8» (Leica Microsystems, Швейцария).

Для ИГХ-исследования, НЛОМ, СЭМ и АСМ использовали серийные срезы (по 4 среза на каждый метод) с полученных в ходе гистологического исследования парафиновых блоков.

ИГХ-исследование проводили на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. В исследовании использовали первичные мышинные моноклональные антитела к коллагенам человека I типа (клон COL-1, разведение 1:4000, GeneТех, США) и III типа (клон FH-7A, разведение 1:8000, GeneТех), кроличьи поликлональные антитела к коллагену человека II типа (разведение 1:20, ИМТЕК, Россия), а также – вторичные антитела и диаминобензидин для визуализации мест их связывания (Dako REAL EnVision).

НЛОМ-исследование было выполнено на базе ФГАОУ ВО «МФТИ (государственный университет)» на неокрашенных срезах толщиной 10-20 мкм, заключенных в синтетическую среду, с помощью системы микроскопии LSM 510 META (Carl Zeiss, Германия).

ТЭМ и СЭМ были выполнены на базе ФГБОУ ВПО «МГУ имени М.В. Ломоносова» и лаборатории соединительной ткани и клеточных технологий ФГБУ «НМИЦ ТО им. Н.Н. Приорова» Минздрава России. Полутонкие срезы, окрашенные

трехцветным методом с помощью метиленового синего, азура II и основного фуксина (МАФТ). Ультратонкие срезы просматривали и фотографировали в электронном микроскопе ТИСМА-12 (Голландия).

Для СЭМ использовали неокрашенные и не заключенные в синтетическую среду срезы толщиной 20 мкм, которые после нанесения их на адгезивные полилизининовые стекла и напыления золота изучали и фотографировали на микроскопе Zeiss Supra 40VP (Carl Zeiss Group (Германия)) с ускорением электронов 10 кВ и рабочей дистанцией 4,3 мм.

АСМ была выполнена на базе Института регенеративной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет) Минздрава России на неокрашенных и не заключенных в синтетическую среду срезах толщиной 5 мкм, нанесенных на адгезивные полилизининовые стекла. Срезы изучали с использованием техники PeakForce Quantitative Nanomechanical Mapping mode (PeakForce QNM) на микроскопе MultiMode 8 atomic force microscope with a Nanoscope V controller and E scanner (Bruker) с помощью зондов RTESPA-150 (Bruker) с номинальным модулем упругости 5 Н/м, номинальной частотой 150 кГц и номинальным радиусом кончика 8 нм. Нативные АСМ-изображения были обработаны и проанализированы программой NanoScope Analysis v.1.10 software (Bruker).

Статистическая обработка полученных данных морфометрии была проведена с использованием лицензионного стандартного пакета программ IBM SPSS Statistics 20.

Результаты собственных исследований и их обсуждение

В группе контроля реберные хрящи были представлены гиалиновой хрящевой тканью, покрытой снаружи надхрящницей и формирующей хрящевые каналы, достигающие глубоких отделов. В надхрящнице определялись фиброзный и хондрогенные слои, содержащие, соответственно, коллагеновые волокна с фибробластами, а также – хондробласты. Хрящевые каналы содержали кровеносные и лимфатические сосуды, окруженные рыхлой волокнистой соединительной тканью. Топографически в хрящевой ткани определялись субперихондрий, расположенный непосредственно под надхрящницей, и центральная зона, расположенная в глубоких отделах. Основными клетками гиалиновой хрящевой ткани были хондроциты, находящиеся внутри хрящевых лакун. В экстрацеллюлярном матриксе (ЭЦМ) реберных хрящей хрящевые лакуны располагались неравномерно, нередко формируя гипер- или

гиполакунарные зоны. При этом в части лакун сохранные хондроциты отсутствовали (пустые лакуны). При световой микроскопии, как в группе контроля, так и у детей с ВД и КД грудной клетки, ЭЦМ реберных хрящей имел гомогенное (нативный матрикс) либо фибриллярное строение (фокусы фибриллизации). В составе фокусов фибриллизации определялись многочисленные волокна разной толщины и с разной архитектурой. Так, один из типов фокусов фибриллизации матрикса представлял собой скопления относительно толстых, параллельных волокон, среди которых нередко встречались хрящевые лакуны. Часть таких лакун достигала гигантских размеров за счет многочисленных хондроцитов. В отдельных лакунах были видны резко выраженные дистрофические изменения клеток с их последующим разрушением и формированием гомогенного содержимого. Этот тип фибриллизации матрикса был обозначен нами как первый тип (Ф1 тип). Второй тип фибриллизации матрикса (Ф2 тип) отличался от типа 1 лишь выраженным переплетением волокон, иногда формирующим фигуры в виде звезды. В очагах Ф1 и Ф2 типов фибриллизации, в отличие от нативного матрикса, хондронная структура матрикса, для которой характерно наличие территориального и интертерриториального матрикса, отсутствовала. Также в очагах Ф1 и Ф2 типов отмечались фокусы «коллагенолиза» волокон, находящихся в их составе, с образованием гомогенных масс («луж»). Третий тип фибриллизации матрикса (Ф3 тип) был расположен внутри пустых хрящевых лакун вблизи или внутри очагов Ф1 и Ф2 типов. При разрушении стенки лакун их содержимое попадало в окружающий матрикс, при этом волокна Ф3 типа встраивались в состав волокон Ф1 и Ф2 типов фибриллизации матрикса. Четвертый тип фибриллизации матрикса (Ф4 тип) имел сходное с нативным матриксом строение: в нем сохранялась хондронная структура, отсутствовали признаки коллагенолиза. В то же время, при световой микроскопии на увеличениях $\times 400$ и $\times 1000$ в матриксе Ф4 типа была видна нежная сеточка, состоящая из тонких волокон, без четких границ переходящая в нативный матрикс.

Тинкториальные свойства волокон в составе Ф1-Ф4 типов очагов фибриллизации ЭЦМ реберных хрящей в группе контроля были близки: все они давали красное окрашивание при окраске пикросириусом красным, темно-синее – при окраске по Маллори (за исключением Ф4 типа), не окрашивались толуидиновым синим. При окраске гематоксилином и эозином волокна всех типов очагов фибриллизации давали розовое окрашивание, при этом в отдельных препаратах Ф1 и Ф2 типы проявляли

умеренную базофилию. При окраске толуидиновым синим ЭЦМ в области очагов Ф1-Ф4 отличался от нативного более неравномерной метахромазией.

При ИГХ-исследовании и нативный матрикс, и волокна Ф1-Ф4 типов давали положительное окрашивание с антителами к коллагену II типа и негативное – к коллагенам I и III типов. При НЛОМ и нативный матрикс, и волокна Ф1-Ф4 типов давали выраженный сигнал генерации второй гармоники, что подтверждало их коллагеновую природу. При этом интенсивность сигнала от очагов фибриллизации была значительно выше, чем в нативном матриксе. При ТЭМ и АСМ и нативный матрикс, и волокна Ф1-Ф4 типов состояли из фибрилл с периодом поперечной исчерченности 56-65 нм, что также подтверждало их коллагеновую природу.

При ТЭМ, СЭМ и АСМ и в нативном матриксе, и в очагах Ф1-Ф4 типов были выявлены признаки латеральной агрегации тонких коллагеновых фибрилл с формированием более толстых. Однако, диаметр фибрилл нативного матрикса составлял менее 120 нм. В то же время, диаметр фибрилл в очагах фибриллизации всех типов был значительно выше, чем в нативном матриксе (более 120 нм вплоть до 5000 нм у крупных агрегатов фибрилл).

При ТЭМ, СЭМ и АСМ трехмерная структура нативного матрикса и Ф4 типа были близки: матрикс в их составе формировал сеть из разнонаправленных фибрилл. Однако, в нативном матриксе диаметр фибрилл был значительно меньше (менее 120 нм) и отсутствовали их крупные агрегаты. Трехмерная структура Ф1-Ф3 типов была идентична их гистологическому строению.

У детей с ВД грудной клетки реберные хрящи имели аналогичное строение, но хрящевые каналы встречались несколько реже и занимали меньшую площадь, чем в контроле. Однако, полученные различия между группами оказались недостоверны. Кроме того, в реберных хрящах у детей с ВД грудной клетки общее количество хрящевых лакун, а также – гиперлакунарных зон было достоверно меньше, чем в группе контроля, в то время, как количество гиполакунарных зон оказалось достоверно больше. Доля пустых лакун в реберных хрящах при ВД грудной клетки была несколько выше, чем в остальных группах, однако полученные различия не достигли уровня статистической значимости.

У детей с ВД грудной клетки также, как и у детей с нормальной грудной клеткой, в матриксе реберных хрящей были выявлены фокусы фибриллизации Ф1-Ф4 типов.

Гистологическое, гистохимическое и ИГХ-исследования, а также НЛОМ, ТЭМ, СЭМ и АСМ показали сходство этих фокусов с фокусами фибриллизации в группе контроля. Однако, у детей с ВД грудной клетки общая площадь очагов фибриллизации, а также частота встречаемости и площадь очагов Ф2 типа были достоверно больше, чем в группе контроля. При этом частота встречаемости фокусов Ф2 типа достигала максимальных значений среди всех исследуемых групп. Кроме того, у детей с ВД грудной клетки очаги Ф1 типа встречались достоверно чаще, а очаги Ф4 типа занимали достоверно большую площадь, чем у детей с нормальной грудной клеткой.

Корреляционный анализ показал, что при ВД грудной клетки отсутствовали отрицательные корреляции между средней относительной площадью хрящевых каналов и долей пустых лакун, а также – отрицательные корреляции между средним числом лакун и площадью Ф1 типа, в то время, как они были выявлены в группе контроля. Кроме того, при ВД грудной клетки отсутствовали положительные корреляции между суммарной площадью всех типов АТ и возрастом обследованных детей, а также – между площадью Ф1 типа и возрастом, характерные для группы контроля. В то же время, в отличие от реберных хрящей, взятых у детей с нормальной грудной клеткой, для хрящей при ее ВД характерно отсутствие положительных корреляций между площадью фокусов Ф1, Ф2 и Ф3 типов при наличии отрицательных корреляции между площадью Ф4 и Ф1 типов, а также – Ф2 и Ф4 типов. Необходимо отметить, что у детей из этой группы степень тяжести внешних и внутренних признаков ДСТ коррелировала с площадью фокусов Ф2 и Ф3 типов.

Строение реберных хрящей у детей с КД грудной клетки также было близко к строению хрящей у детей из остальных исследованных групп. Однако, при КД грудной клетки хрящевые каналы в реберных хрящах встречались наиболее редко среди всех исследованных групп, при этом обнаруженные статистически достоверные различия были отмечены только с группой контроля. Хрящевые каналы у детей с КД грудной клетки также занимали наименьшую площадь среди всех исследуемых групп, однако полученные различия между группами были недостоверны.

По сравнению с остальными группами, в реберных хрящах у детей с КД грудной клетки отмечалось наименьшее количество хрящевых лакун, а также – гиперлакунарных зон, в то время, как количество гиполакунарных зон оказалось наибольшим. При этом полученные различия достигали уровня статистической значимости только с группой

контроля. Доля пустых лакун в хрящевой ткани была практически одинакова с группой контроля.

У детей с КД грудной клетки в матриксе реберных хрящей были выявлены фокусы Ф1-Ф4 типов, сходные по строению с фокусами в матриксе реберных хрящей у детей из остальных групп, что было подтверждено при гистологическом, гистохимическом и ИГХ-исследованиях, а также – при НЛОМ, ТЭМ, СЭМ и АСМ. Изменения частоты встречаемости и площади фокусов фибриллизации матрикса хрящей у детей с КД имели значительные сходства с реберными хрящами у детей с ВД грудной клетки. Так, у детей с КД грудной клетки увеличивалась общая площадь очагов фибриллизации, частота встречаемости фокусов Ф1 типа, а также – частота встречаемости и площадь очагов Ф4 типа, достигая максимальных значений среди всех исследуемых групп. При этом частота встречаемости фокусов Ф2 типа в группе с КД грудной клетки была достоверно ниже, чем у детей с ее ВД. Однако, достоверные различия с реберными хрящами у детей с ВД грудной клетки по суммарной площади фокусов фибриллизации и по площади каждого типа фибриллизации в отдельности отсутствовали. В то же время, по сравнению с остальными группами, у детей с КД грудной клетки частота встречаемости очагов Ф1 и Ф4 типов достоверно больше.

Корреляционный анализ показал, что в реберных хрящах при КД грудной клетки, как и при ее ВД, отсутствуют отрицательные корреляции между средней относительной площадью хрящевых каналов и долей пустых лакун, а также – отрицательные корреляции между средним числом лакун и площадью Ф1 типа, что отличает обе группы с деформациями от группы контроля. Кроме того, при КД грудной клетки, также, как и при ее ВД, отсутствуют положительные корреляции между суммарной площадью всех типов АТ и возрастом обследованных детей, а также – между площадью Ф1 типа и возрастом, что характерно для группы контроля. Также, как и при ВД грудной клетки, для хрящей у детей с ее КД характерно отсутствие положительных корреляций между площадью фокусов Ф1, Ф2 и Ф3 типов при наличии отрицательных корреляций между площадью Ф4 и Ф1 типов. Однако, при КД грудной клетки встречаются корреляции, не характерные для группы детей с ВД грудной клетки и не встречающиеся в контроле. Так, при КД появляются отрицательные корреляции между долей пустых лакун и возрастом, между средним числом хрящевых лакун и Ф3 типов, исчезают положительные корреляции между площадью Ф2 типа и возрастом и отрицательные

корреляции между средним числом хрящевых лакун и площадью Ф2 типа. В то же время, при КД грудной клетки появление отрицательной корреляции между площадью очагов Ф2 и Ф4 типов, характерной для группы с ВД грудной клетки, не обнаружено. Необходимо отметить, что у детей из этой группы, также, как и у детей с ВД грудной клетки, степень тяжести внешних и внутренних признаков ДСТ коррелировала с площадью фокусов Ф3 типа, в то время как при КД грудной клетки были выявлены положительные корреляции этих признаков с фокусами Ф1 типа при отсутствии таковых с фокусами Ф2 типа.

Полученные нами данные указывают на взаимосвязь морфологических изменений реберных хрящей с развитием ВД и КД грудной клетки у детей. Эти изменения проявляются в виде уменьшения количества хрящевых лакун и каналов в сочетании с глубокой структурной перестройки ЭЦМ, выражающейся в изменениях процессов его фибриллизации. Уменьшение количества хрящевых лакун с хондроцитами и хрящевых каналов, вероятнее всего, приводит к ухудшению метаболизма, а изменения ЭЦМ – к изменениям механических свойств реберных хрящей.

Детальное морфологическое изучение фокусов фибриллизации матрикса позволило выделить и охарактеризовать четыре ее типа (Ф1-Ф4). Каждый из них содержал фибриллы и волокна коллагена II типа, относительно толстые, по сравнению с нативным матриксом, что при световой микроскопии придавало этим фокусам фибриллярное строение на фоне гомогенного нативного матрикса. Морфологические характеристики этих фибрилл и волокон полностью соответствовали характеристикам описанных в литературе амиантоидных волокон (АВ) (Eyden В. Structural variations of collagen in normal and pathological tissues: role of electron microscopy // *Micron*. 2001. Vol. 32, Iss 3. P.287-300.). Таким образом, фокусы фибриллизации матрикса Ф1-Ф4 типов являются фокусами его АТ и, на основании морфологических характеристик, мы выделили 4 типа АТ: «канонический» тип (Ф1 тип), строение очагов которого соответствует описанному в литературе (Кюнель В. Цветной атлас по цитологии, гистологии и микроскопической анатомии. М.: Астрель, АСТ, Времена 2, 2007. 533 с.), а также – три новых типа, к которым относятся «переплетенный» (Ф2 тип), «внутрилакунарный» (Ф3 тип) и «тонковолокнистый» (Ф4 тип).

С учетом особенностей строения каждого типа АТ, можно предположить, что «тонковолокнистый» тип АТ обеспечивает большую жесткость хрящевой ткани, по

сравнению с нативным матриксом, «переплетенный» и «внутрилакунарный» тип отражают процессы распада в очагах АТ, а «канонический» тип и выполняет механическую функцию, и отражает «дегенеративные» процессы в фокусах АТ. На основании полученных результатов была предложена концепция о морфогенезе фокусов АТ в норме и при деформациях грудной клетки. Так, за счет процессов латеральной агрегации фибриллы коллагена II типа в нативном матриксе утолщаются и формируется «тонковолокнистый» тип АТ. Далее, утолщенные коллагеновые фибриллы и агрегаты фибрилл выстраиваются параллельно друг другу с формированием «переплетенного» и «канонического» типов АТ. При этом хондроциты в лакунах, находящихся в этих двух типах АТ либо разрушаются, либо перед разрушением синтезируют «внутрилакунарный» тип АТ. Таким образом, содержимое лакун в фокусах «переплетенного» и «канонического» типов представляет собой либо скопление АВ «внутрилакунарного» типа АТ, либо клеточный детрит. При разрушении стенки таких лакун их содержимое попадает в окружающий матрикс: АВ «внутрилакунарного» типа АТ сливаются с АВ «переплетенного» и «канонического» типов либо АВ «переплетенного» и «канонического» типов АТ пропитываются клеточным детритом. Возможно, именно за счет контакта клеточного детрита с АВ, в «каноническом» и «переплетенном» типах отмечается коллагенолиз.

Полученные результаты указывают на изменения процессов АТ матрикса при ВД и КД грудной клетки, связанные с нарушением клеточно-матриксных взаимодействий и ухудшением трофики хрящевой ткани. Эти изменения приводят к избыточному накоплению «переплетенного» типа при ВД, а также – «канонического» типа при КД грудной клетки с компенсаторным усилением образования «тонковолокнистого» типа АТ и формированием порочных кругов при обоих видах деформаций (см. рисунок 1).

Таким образом, на основании этих результатов и с учетом корреляций морфологических изменений со степенью тяжести ДСТ, мы считаем, что все выявленные нами изменения можно рассматривать, как ДСТ реберных хрящей, приводящую к изменениям их биомеханических характеристик, что лежит в основе патогенеза ВД и КД грудной клетки.



Рисунок 1. Схема патогенеза ВД и КД грудной клетки у детей.

Выводы

1. В реберных хрящах грудной клетки у детей, как в группе контроля, так и при ее ВД и КД, помимо известного («канонического») типа АТ матрикса хряща, выявлены три неизвестных ранее типа этой трансформации, обозначенные нами как «переплетенный», «тонковолокнистый» и «внутрилакунарный».

2. Полученные данные позволяют считать, что «переплетенный» и «внутрилакунарный» типы АТ отражают деградацию ЭЦМ хрящевой ткани, «канонический» тип обеспечивает его локальную прочность на разрыв, однако в ходе функционирования может подвергаться деградации, а формирование «тонковолокнистого» типа из нативного матрикса, отражает компенсаторную реакцию хряща на увеличение механической нагрузки при ВД и КД грудной клетки.

3. В основе развития ВД и КД грудной клетки у детей лежат характерные морфологические особенности реберных хрящей в виде изменений количества хрящевых каналов, обеспечивающих кровоснабжение и лимфоотток, лакун с хондроцитами, регулирующих метаболизм хрящевой ткани, а также - изменения экстрацеллюлярного матрикса.

4. При КД грудной клетки у детей, по сравнению с контролем, в реберных хрящах отмечается наиболее редкое расположение хрящевых каналов и лакун с хондроцитами, что указывает на ухудшение питания хондроцитов, нарушение их функций и снижение метаболизма хрящевой ткани в целом. При ВД грудной клетки аналогичные изменения выражены меньше.

5. При обоих типах деформаций грудной клетки у детей, по сравнению с контролем, наблюдается увеличение количества и площади очагов АТ матрикса реберных хрящей, что, очевидно, указывает на изменение биомеханических свойств хрящевой ткани. При этом имеется четкая взаимосвязь ВД грудной клетки с преобладанием «переплетенного» типа и КД с преобладанием «канонического» типа АТ.

6. Полученные данные позволяют считать, что морфологической основой исследованных деформаций грудной клетки у детей являются нарушения клеточно-матриксных взаимодействий в хрящевой ткани, имеющие характерные особенности для каждого вида деформаций и приводящие к нарушению её нормального созревания.

7. Выявленные изменения хрящевой ткани при ВД и КД грудной клетки следует рассматривать как проявления ДСТ реберных хрящей.

8. Полученные результаты позволяют утверждать, что в основе патогенеза ВД и КД грудной клетки у детей лежит ДСТ реберных хрящей, приводящая к снижению питания и ухудшению метаболизма хрящевой ткани, нарушениям процессов АТ матрикса, в результате чего изменяются функциональные характеристики реберных хрящей и возникает тот или иной вид деформации грудной клетки.

Практические рекомендации

1. Обработка биопсийного материала реберных хрящей, помимо процедуры декальцинации и заливки материала в парафин, должна включать с применение уплотнителей. При окрашивании срезов для выявления состояния коллагеновых волокон помимо окраски пикрофуксином по Ван-Гизону необходима окраска по Маллори/Массону и пикросириусом красным. При исследовании микропрепаратов необходимо учитывать гиполакунарные зоны, а также "канонический" и "переплетенный" типы амиантоидной трансформации с участками лизиса волокон. Эти изменения указывают на несостоятельность реберных хрящей, что может оказать помощь в выборе метода оперативного вмешательства.

2. У пациентов с ВД и КД грудной клетки рекомендуется исследование мутаций генов коллагена II типа или генов, связанных с его метаболизмом. Это может помочь в диагностике ДСТ и в профилактике указанных заболеваний у их детей.

Дальнейшие перспективы развития исследования

Нами выявлен морфологический субстрат ДСТ в реберных хрящах у детей с ВД и КД грудной клетки, отражающий их структурно-функциональную несостоятельность, что подтверждает необходимость их оперативного удаления в ходе торакопластики. Выявленные изменения процессов амиантоидной трансформации коллагена II типа в матриксе реберных хрящей у детей с такими деформациями являются основанием для дальнейших молекулярно-генетических исследований этих процессов при патологии хрящевой ткани, а также для изучения роли этой трансформации в патологии гиалиновых хрящей другой локализации.

Список работ, опубликованных автором по теме диссертации

1. **Курков А.В.**, Шехтер А.Б., Гуллер А.Е., Захаркина О.Л. Сравнение световой и нелинейно-оптической микроскопии реберных хрящей в норме и при изучении врожденных деформаций грудной клетки. Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и студентов с международным участием «Медицинская Весна-2015»/ Сборник материалов (г. Москва, 19 мая 2015 года) / Под ред. В.Н. Николенко (ответственный редактор) и др., С. 444–445.

2. **Курков А.В.**, Гуллер А. Е., Плякин В. А., Пауков В. С. Морфологическое и морфометрическое исследование амиантоидной трансформации реберных хрящей в норме и при килевидной деформации грудной клетки у детей // **Архив патологии.** – 2016. – Т. 78. – №. 6. – С. 30–37.

3. **Курков А.В.** Дисплазия соединительной ткани реберных хрящей при воронковидной и килевидной деформациях грудной клетки. VIII Конференция молодых ученых РМАНПО с международным участием «Горизонты медицинской науки»: сборник материалов конференции; ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования». М.: ФГБОУ ДПО РМАНПО, 2017. Т. I. Стр. 249–251.

4. **Курков А.В.**, Шехтер А. Б., Пауков В. С. Структурные и функциональные изменения реберных хрящей при воронковидной и килевидной деформации грудной клетки у детей // **Архив патологии.** – 2017. – Т. 79. – №. 5. – С. 57–62.

5. **А.В. Курков**, А.Б. Шехтер, А.Е. Гуллер, С.Л. Котова, П.С. Тимашев, А.Л. Файзуллин, В.С. Пауков. Амиантоидная трансформация реберного хряща при врожденных деформациях грудной клетки. Сборник тезисов V Съезда Российского общества патологоанатомов – 2017 г. Стр. 175–176.

6. **Курков А.В.**, Пауков В.С., Омельяненко Н.П., Шехтер А.Б. Патологические изменения реберного хряща у детей с воронковидной и килевидной деформациями грудной клетки. Материалы Всероссийской научной конференции «Современные проблемы гистологии и патологии скелетных тканей (Рязань, 5, 6 октября 2018 г.) / под ред. к.м.н. Р.В. Деева; ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. – Рязань: ОТСиОП, 2018. – 108 с. Стр. 96–98.

7. **Курков А. В.**, Пауков В. С., Файзуллин А. Л., Шехтер А. Б. (2018). Изменения реберного хряща при воронковидной и килевидной деформации грудной клетки у детей // **Архив патологии.** – 2018. – Т. 80. – №. 5. – С. 8–15.