

Патоморфология и минеральный состав костной ткани на ранних стадиях экспериментального остеомиелита

Н.С. СТРЕЛКОВ, Н.А. КИРЬЯНОВ, П.О. ШКЛЯЕВ

Ижевская государственная медицинская академия, 426034, г. Ижевск, ул. Коммунаров, 281

Актуальность Изучение патогенетических закономерностей и характера структурных изменений в костной ткани на ранних стадиях острого остеомиелита является актуальным с точки зрения расширения представлений о механизмах развития осложнений у больных и проведения комплекса реабилитационных мероприятий.

Цель работы Комплексная оценка патоморфологических изменений и особенностей минерального состава костной ткани на ранних стадиях развития острого остеомиелита в эксперименте.

Материалы и методы Эксперименты проведены на 35 крольчатах обоего пола, в соответствии с биоэтическими требованиями. Острый гематогенный остеомиелит моделировали путем введения культуры стафилококка в костномозговой канал большеберцовой кости. Всех животных выводили из опыта под кратковременным эфирным наркозом путем воздушной эмболии через 30 мин, 6, 12, 24 и 48 часов после введения культуры стафилококка. На данных сроках эксперимента методами световой, электронной (сканирующей и трансмиссионной) микроскопии и рентгеновского электронно-зондового анализа изучались особенности патоморфологии и минерального состава костной ткани.

Результаты и их обсуждение Во время первых 30 минут эксперимента микро- и ультрамикроскопические изменения в костной ткани были минимальными: сохранялись костные стержни с наибольшими группами эритроцитов, а минеральный состав кости характеризовался снижением объемной доли натрия. На 6 часе эксперимента также не наблюдалось значительных структурных перестроек в костной ткани, однако происходило дальнейшее снижение концентрации натрия и магния, и увеличение объемной доли серы. В то же время, на данном сроке эксперимента отмечено повышение объемных долей кальция и фосфора. Морфологическая картина в последующие 12 часов эксперимента характеризовалась началом деструктивных процессов в костном мозге, с чем, вероятно, связаны некоторые перестройки минерального обмена костной ткани. Наблюдали резкое повышение концентрации натрия, при этом сохранялись высокие значения объемных долей внутрикостного кальция, фосфора и серы, что отражало повышенную минерализацию. К концу 1 суток эксперимента развивались процессы деструкции костной ткани, которые сопровождалась деминерализацией. На 2 сутки отмечалась активация процессов остеогенеза, при этом деминерализация сохранялась.

Заключение Таким образом, в течение 1-х суток от начала эксперимента структурные перестройки костной ткани отсутствуют, а изменения ее минерального состава связаны с процессами адаптации в ответ на активное воспаление в костномозговом канале. На 2-е сутки опыта развивающаяся деструкция костной ткани сопровождается явлениями остеопороза наряду с активацией остеосинтеза. Период в течение 1-х суток от попадания возбудителя можно рассматривать как наиболее благоприятный с точки зрения профилактики последующих осложнений.

Ключевые слова экспериментальный остеомиелит, патоморфология, ранняя диагностика, минеральный состав, остеопороз.

Pathology and mineral composition of bone in the early stages of experimental osteomyelitis

N.S. STRELKOV, N.A. KIRYANOV, P.O. SHKLYAEV

Izhevsk State Medical Academy, 426034, Izhevsk, Udmurt republic, Kommunarov Street, 281

Relevance Study of pathogenetic patterns and the nature of the structural changes in the bone tissue in the early stages of acute osteomyelitis is relevant in terms of increased knowledge about mechanisms of development of complications in patients with orthopedic and rehabilitation of the complex. The purpose of the work comprehensive assessment of pathological changes and features of the mineral composition of bone tissue in the early stages of acute osteomyelitis in the experiment.

Materials and methods The experiments were performed on 35 rabbits of both sexes, in accordance with bioethical requirements. Acute hematogenous osteomyelitis modeled by introducing a culture of *Staphylococcus aureus* in the medullary canal of the tibia. All animals were obtained from a short-term experience under ether anesthesia by air embolism after 30 min, 6, 12, 24 and 48 hours after administration *Staphylococcus aureus* culture. Information on the timing of the experiment by light, electron (scanning and transmission) microscopy and X-ray electron microprobe analysis studies especially pathomorphology and mineral composition of bone tissue.

Results and their discussion During the first 30 minutes of the experiment micro- and ultramicroscopic changes in bone were minimal: preserved bone rods with small groups of red blood cells, and the mineral content of bones was characterized by a decrease in the volume fraction of sodium. At the 6 hour experiment there was also no significant structural rearrangements of bone, but there was a further reduction in the concentration of sodium and magnesium, and increase the volume fraction of sulfur. At the same time, this period of the experiment was an increase in volume fraction of calcium and phosphorus. Morphological picture

in the next 12 hours of the experiment were characterized by the beginning of the destructive processes in the bone marrow, with what is likely to involve some adjustment of mineral metabolism of bone tissue. There was a sharp increase in the concentration of sodium while maintaining high values of volume fractions of intraosseous calcium, phosphorus and sulfur, reflecting the increased mineralization. By the end of first day of the experiment to develop the process of destruction of bone tissue, which were accompanied by demineralization. Second day from start of the experiment were activated processes of bone formation, and the demineralization persisted.

Conclusions *Thus, within one day of the experiment structural rearrangements missing bone, and its mineral composition change associated with the adaptation process active in response to inflammation in the medullary canal. Second day experience of developing bone destruction is accompanied by phenomena of osteoporosis, along with activation of osteosynthesis. Period for first day from entering the pathogen can be considered as the most favorable in terms of prevention of subsequent orthopedic complications.*

Key words *experimental osteomyelitis, patomorfologija, early diagnosis, mineral composition, osteoporosis*

Острый гематогенный остеомиелит (ОГО) в настоящее время продолжает оставаться актуальной проблемой детской хирургии [1]. Изучение патогенетических механизмов развития ОГО затруднено тем, что больные зачастую поступают на поздних сроках от начала заболевания, а от момента первичного попадания возбудителя до развития клинических симптомов может пройти несколько суток [2]. Знание патогенетических закономерностей и характера структурных изменений в костной ткани на ранних стадиях заболевания позволяет определять вероятность развития осложнений у больных, уточнить прогноз и расширить комплекс реабилитационных мероприятий [6, 7]. В предыдущих исследованиях изучены особенности патоморфологии на ранних стадиях развития экспериментального остеомиелита [3], однако комплексного анализа с учетом патогистологической картины и особенностей минерального состава костной ткани не проводилось.

Целью работы явилась комплексная оценка патоморфологических изменений и особенностей минерального состава костной ткани на ранних стадиях развития остеомиелита в эксперименте.

Материалы и методы

Эксперименты проведены на 35 крольчатах обоего пола с массой тела 1200-1600 г, содержащихся в стандартных условиях специализированного вивария. Работа выполнена в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 года), и согласно приказу № 267 МЗ РФ от 19.06.2003 г.

Выделяли контрольную (n=5) и экспериментальную группы животных (n=30). У животных экспериментальной группы острый гематогенный остеомиелит моделировали по методике Н.С. Стрелкова [3] путем введения культуры золотистого стафилококка в костномозговой канал большеберцовой кости кроликов. Взвесь патогенных микроорганизмов растворяли в 0,5 мл суспензии коллагена (10 мг/мл), разведенной в физиологическом растворе. Животных выводили из опыта под кратковременным эфирным наркозом путем воздушной эмболии через 30 мин, 6, 12, 24, 48 и 60 часов после введения культуры стафилококка.

Большеберцовые кости освобождали от мягких тканей, фиксировали в 10% растворе формалина с глутаральдегидом, после чего заливали в парафин (после декальцинации) и в аралдит (без декальцинации).

Из аралдитовых блоков изготавливали ультратонкие срезы на ультрамикротоме с помощью стеклянных и алмазных ножей, затем на рентгеновском электронно-зондовом микроанализаторе «LINK 860-500» определяли содержание в образцах костной ткани натрия, магния, фосфора, серы, калия, кальция. Патогистологические особенности костной ткани исследовали при помощи сканирующего электронного микроскопа JSM-840 (Jeol, Япония), а также трансмиссионного электронного микроскопа JEM-2010 (Jeol, Япония).

Статистическую обработку полученных данных проводили в программе Statistica 6.0 for Windows.Ru сетевая версия Serial number AXXR006E676618FAN30 (Ижевская государственная медицинская академия). В качестве критерия оценки достоверности различий использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Различия признавали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Во время первых 30 минут эксперимента микро- и ультрамикроскопические изменения в костной ткани были минимальными: сохранялись костные стержни с небольшими группами эритроцитов, а минеральный состав кости характеризовался снижением объемной доли натрия (табл. 1).

В период от 30 мин. до 6 часов эксперимента также не наблюдали значительных структурных перестроек с костной ткани, однако со стороны минерального состава произошли некоторые изменения: констатировали дальнейшее снижение концентрации натрия относительно значений на 30 минуте, наряду с этим снизилась объемная доля магния, а концентрация серы достоверно увеличилась. В то же время, на данном сроке эксперимента отмечено повышение объемных долей кальция и фосфора (табл. 1).

Отсутствие патоморфологических сдвигов и наличие выраженных перестроек минерального состава костной ткани можно объяснить тем, что в период до 6 часов экспериментального остеомиелита патологический процесс развивается преимущественно в

Таблица 1

Концентрация микроэлементов в костной ткани при экспериментальном остеомиелите

Микроэлементы костной ткани	контроль	30 мин	6 час	12 час	24 час	48 час
	концентрация, об.%					
Натрий	0,70±0,060	0,40±0,120*	0,64±0,010 ^{##}	0,66±0,020 ^{SS}	0,58±0,032 ^{SS}	0,49±0,048 ^{SS}
Магний	0,01±0,003	0,02±0,002	0,01±0,002	0,01±0,003	0,01±0,002	0,02±0,007
Фосфор	0,17±0,010	0,16±0,020	0,35±0,074 ^{##}	0,33±0,061 ^{SS}	0,10±0,030 ^{%%}	0,16±0,019 ^{%%}
Сера	0,23±0,010	0,19±0,010	0,47±0,030 ^{##}	0,47±0,021 ^S	0,53±0,053 ^S	0,68±0,017 [%]
Калий	0,09±0,060	0,03±0,010	0,05±0,020	0,05±0,011 ^{SS}	0,28±0,028 ^{%%}	0,29±0,014 ^{%%}
Кальций	0,13±0,060	0,15±0,030	0,41±0,110 ^{##}	0,37±0,090 ^{SS}	0,12±0,020 [%]	0,20±0,040 [%]

Примечание:

* - достоверность относительно контроля; # – достоверность относительно 30 мин; \$ – достоверность относительно 6 часов; % – достоверность относительно 12 часов; & – достоверность относительно 24 часов

** , ## , \$\$, %% , && – p<0,01; * , # , \$, % , & – p<0,05

Table 1

The concentration of trace elements in bone tissue in experimental osteomyelitis

Bone minerals	Control	30 min	6 hours	12 hours	24 hours	48 hours
	Concentration vol.%					
Sodium	0,70±0,060	0,40±0,120*	0,64±0,010 ^{##}	0,66±0,020 ^{SS}	0,58±0,032 ^{SS}	0,49±0,048 ^{SS}
Magnesium	0,01±0,003	0,02±0,002	0,01±0,002	0,01±0,003	0,01±0,002	0,02±0,007
Phosphorus	0,17±0,010	0,16±0,020	0,35±0,074 ^{##}	0,33±0,061 ^{SS}	0,10±0,030 ^{%%}	0,16±0,019 ^{%%}
Sulfur	0,23±0,010	0,19±0,010	0,47±0,030 ^{##}	0,47±0,021 ^S	0,53±0,053 ^S	0,68±0,017 [%]
Potassium	0,09±0,060	0,03±0,010	0,05±0,020	0,05±0,011 ^{SS}	0,28±0,028 ^{%%}	0,29±0,014 ^{%%}
Calcium	0,13±0,060	0,15±0,030	0,41±0,110 ^{##}	0,37±0,090 ^{SS}	0,12±0,020 [%]	0,20±0,040 [%]

Note:

* - significant differences relative to controls; # - significant differences relative to 30 minutes; \$ - significant differences relative of 6 hours; % - significant differences relative to 12 hours; & - significant differences relative of 24 hours

** , ## , \$\$, %% , && - P < 0,01; * , # , \$, % , & - P < 0,05

костном мозге [2, 3, 5, 8]. Процессы минерализации, по-видимому, являются закономерным исходом развившейся активации ферментных систем остеона, что можно трактовать как адаптивную реакцию кости с развитием остеосинтеза в ответ на прогрессирующее воспаление в костномозговом канале [4].

Морфологическая картина в последующие 12 часов эксперимента характеризовала начало деструктивных процессов в костном мозге, с чем, вероятно, связана значительная перестройка минерального обмена костной ткани. Регистрировали резкое повышение концентрации натрия, при этом сохранялись высокие значения объемных долей внутрикостного кальция, фосфора и серы, что отражало повышенную минерализацию (табл. 1).

Период в течение 1-х суток от попадания возбудителя можно рассматривать как наиболее благоприятный с точки зрения профилактики последующих ортопедических осложнений, поскольку отсутствуют структурные преобразования костной ткани и ее микробное обсеменение, а развивающиеся сдвиги минерального состава связаны с адаптацией костной ткани к вероятному развитию воспаления в ней.

Прогрессирующая деструкция сосудов микроциркуляторного русла к 24 часам эксперимента приводила к активному микробному обсеменению и переходу патологического процесса на костную ткань. Между костными трабекулами развивалось экссудативное воспаление, при этом экссудат распространялся в гаверсовы каналы. Также наблюдали рассасывание костных стержней, что не сопровождалось активацией остеокластов, а было, вероятно, связано с деминерализацией костной ткани, что подтверждалось снижением массовой доли кальция и фосфора. Каких-либо существенных изменений концентраций натрия, магния и серы на данной стадии эксперимента не происходило, вместе с тем отмечали увеличение содержания калия (табл. 1).

К концу 2-х суток эксперимента наблюдали активацию остеобластов в костной ткани и развитие процессов остеосинтеза, с чем может быть связано увеличение массовой доли серы, что косвенно свидетельствует об изменении содержания сульфатированных гликозаминогликанов, которые способствуют накоплению кальция в созревающей костной ткани [4]. Несмотря на усиление процессов остеосинтеза, на данном сроке эксперимента в костной ткани сохранялась

выраженная деминерализация, что можно рассматривать как проявление остеопороза.

Заключение

Таким образом, в течение 1-х суток эксперимента структурные перестройки костной ткани отсутствуют, а изменения ее минерального состава связаны с процессами адаптации в ответ на активное воспаление

в костномозговом канале. На 2-е сутки опыта развивающаяся деструкция костной ткани сопровождается явлениями остеопороза наряду с активацией остеосинтеза. Период в течение 1-х суток от попадания возбудителя можно рассматривать как наиболее благоприятный с точки зрения профилактики последующих осложнений.

Список литературы

1. В.А. Тараканов, В.М. Надгериев, В.М. Старченко, А.Е. Стрюковский, А.Н. Луняка, Е.Г. Колесников, Н.К. Барова. Оптимальные критерии ранней диагностики и лечения острого гематогенного остеомиелита у детей. Кубанский научный медицинский вестник. 2013; 7: 118-120.
2. С.Н. Гисак, А.А. Шестаков, Д.А. Баранов, Е.А. Склярова. Современные особенности этиопатогенеза острого гематогенного остеомиелита у детей и оптимизация лечения больных. Вестник новых медицинских технологий. 2012; XIX: 2: 106-108.
3. Стрелков, Н.С. Патогенетические методы ранней диагностики и лечения острого гематогенного остеомиелита у детей. Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Уфа, 1999; 23.
4. Bouvier, M. In vitro mineralization of a three-dimensional collagen matrix by human dental pulp cells in the presence of chondroitin sulphate. M. Bouvier, A. Joffre, H. Magloire. Arch Oral Biol. 1990; 35: 4: 301-309.
5. Lew, D.P. Osteomyelitis. D.P. Lew, F.A. Waldvogel. Lancet. 2004; 364: 369-379.
6. Mustafa, M. Osteomyelitis: pathogenesis, clinical and therapeutic challenge. M. Mustafa, S.M. Yusof, M. Iftikhar. International Journal of Medicine and Pharmaceutical Sciences. 2014; 4: 9-18.
7. Pathologic fractures in children with acute Staphylococcus aureus osteomyelitis. M.V. Belthur, S.B. Birchansky, A.A. Verdugo, E.O. Jr. Mason, K.G. Hulten, S.L. Kaplan, E.O. Smith, W.A. Phillips, J. Weinberg. J. Bone Joint Surg. Am. 2012; 94: 1: 34-42.
8. Song, K.M. Acute Hematogenous Osteomyelitis in Children. K.M. Song, J.F. Sloboda. Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons. 2001; 9: 3: 34-42.

Сведения об авторах

1. Стрелков Николай Сергеевич - д.м.н., проф., ректор Ижевской государственной медицинской академии
2. Кирьянов Николай Александрович - д.м.н., проф., зав. кафедрой патологической анатомии Ижевской государственной медицинской академии
3. Шкляев Павел Олегович - аспирант кафедры хирургических болезней детского возраста Ижевской государственной медицинской академии; e-mail: medic_82@mail.ru

References

1. V.A. Tarakanov, V.M. Nadgeriev, V.M. Starchenko, A.E. Stryukovskiy, A.N. Lunyaka, E.G. Kolesnikov, N.K. Barova. Optimal'nye kriterii ranney diagnostiki i lecheniya ostrogo gematogennogo osteomyelita u detey [Optimum criteria for early diagnostics and treatment of children's acute hematogenous osteomyelitis. Kuban scientific medical herald]. 2013; 7: 118-120 (in Russ.).
2. S.N. Gisak, A.A. Shestakov, D.A. Baranov, E.A. Sklyarova. Sovremennye osobennosti etiopatogeneza ostrogo gematogennogo osteomyelita u detey i optimizatsiya lecheniya bol'nykh. Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy [Modern particulars for children's aetiopathogenesis of acute hematogenous osteomyelitis and optimization of patient treatment. Herald of new health technology]. 2012; XIX: 2: 106-108 (in Russ.).
3. Strelkov, N.S. Patogeneticheskie metody ranney diagnostiki i lecheniya ostrogo gematogennogo osteomyelita u detey: avtoref. dis. ... d-ra med. nauk [Pathogenetic methods for early diagnostics and treatment of children's acute hematogenous osteomyelitis. Abstract Diss. Doc. Med.]. 1999; 23 (in Russ.).
4. Bouvier, M. In vitro mineralization of a three-dimensional collagen matrix by human dental pulp cells in the presence of chondroitin sulphate. M. Bouvier, A. Joffre, H. Magloire. Arch Oral Biol. 1990; 35: 4: 301-309.
5. Lew, D.P. Osteomyelitis. D.P. Lew, F.A. Waldvogel. Lancet. 2004; 364: 369-379.
6. Mustafa, M. Osteomyelitis: pathogenesis, clinical and therapeutic challenge. M. Mustafa, S.M. Yusof, M. Iftikhar. International Journal of Medicine and Pharmaceutical Sciences. 2014; 4: 9-18.
7. Pathologic fractures in children with acute Staphylococcus aureus osteomyelitis. M.V. Belthur, S.B. Birchansky, A.A. Verdugo, E.O. Jr. Mason, K.G. Hulten, S.L. Kaplan, E.O. Smith, W.A. Phillips, J. Weinberg. J. Bone Joint Surg. Am. 2012; 94: 1: 34-42.
8. Song, K.M. Acute Hematogenous Osteomyelitis in Children. K.M. Song, J.F. Sloboda. Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons. 2001; 9: 3: 34-42.

Information about the Authors

1. Strelkov N.S. Professor, MD, Izhevsk State Medical Academy
2. Kiryanov N.A. Professor, MD. Izhevsk State Medical Academy
3. Shklyaev P.O. Graduate student of surgical diseases of childhood, Izhevsk State Medical Academy; e-mail: medic_82@mail.ru