

РОГОЖИН
Дмитрий Викторович

**ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА
ГИГАНТОКЛЕТОЧНЫХ ПОРАЖЕНИЙ КОСТЕЙ У ДЕТЕЙ**

Автореферат диссертации на соискание
ученой степени доктора медицинских наук

14.03.02 - патологическая анатомия

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России

Научный консультант:

Талалаев Александр Гаврилович доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты:

Франк Георгий Авраамович доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии ФГБОУ ДПО РМАНПО Министерства здравоохранения Российской Федерации

Карселадзе Аполлон Иродионович доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Министерства здравоохранения Российской Федерации

Мякова Наталья Валериевна доктор медицинских наук, профессор, зам. главного врача по лечебной работе ФГБУ НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, г. Москва.

Защита диссертации состоится г. в на заседании специализированного совета **Д208.072.04** при ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова (117997 Москва, ул. Островитянова, 1).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеках ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова (117997 Москва, ул. Островитянова, 1) и факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова (119192 Москва, Ломоносовский просп., 27, к.1).

Автореферат разосланг.

Ученый секретарь диссертационного совета,

доктор медицинских наук

Леонова Людмила Васильевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы и степень разработанности темы

Первичные опухоли костей среди всех неопластических поражений встречаются достаточно редко. Частота выявления доброкачественных опухолей костей и опухолеподобных поражений неизвестна, так как многие из них протекают клинически бессимптомно, и часто являются случайной находкой во время обследования по поводу других причин (травмы, мероприятия по диспансеризации и др.).

По данным ВОЗ частота регистрации злокачественных опухолей костей составляет 0,2% среди всех опухолей. В США выявляется до 2900 новых случаев злокачественных костных опухолей в год. Для сравнения рак легкого регистрируется с частотой 169500 случаев в год, рак молочной железы 193700 в год [Christopher D.M. Fletcher, 2013].

Анализ нашего материала показал, что в структуре неопластических поражений костей у детей преобладают доброкачественные опухоли и опухолеподобные поражения (56,47%), злокачественные опухоли составили 37,31%. При этом, значительная часть доброкачественных опухолей встречается в рамках различных синдромов (6,01%), среди которых преобладает синдром множественных остеохондром [Рогожин Д.В., 2014].

Отличительной особенностью диагностики и лечения заболеваний костей (прежде всего, опухолей) является неоспоримость мультидисциплинарного подхода. Он заключается в обязательном сборе клинических данных (жалобы пациента, клинические проявления заболевания), адекватной интерпретации данных лучевой диагностики и МРТ-исследования (если есть), разумному планированию тактики биопсии опухоли, внимательной оценке морфологической картины и при необходимости, использовании других методов, необходимых для формулировки диагноза (гистохимия, иммуногистохимия, цитогенетическое исследование, секвенирование и др.).

В большинстве случаев, жалобы пациентов с опухолями костей однотипны и не отличаются специфичностью (болевые ощущения, реже увеличение объема в месте поражения). Поэтому, одним из простых, дешевых, доступных и надежных методов диагностики по настоящее время остается рентгеновский снимок, выполненный в двух проекциях. При этом только небольшое количество первичных неопластических поражений костей могут быть выявлены при дополнительном использовании КТ и МРТ-исследования [Thomas L. Pope, 2015].

Одной из особенностей неопластических процессов в костной ткани является присутствие в очаге поражения гигантских многоядерных клеток (остеокластов), участвующих в процессах резорбции и ремоделировании костной ткани. Обнаружение данных клеток при различных опухолях костей в ряде случаев значительно затрудняет дифференциальную диагностику и приводит к большому количеству диагностических ошибок, которые, в свою очередь ведут к выбору неверной тактики лечения таких пациентов.

Цель исследования: разработать новые морфологические критерии дифференциальной диагностики гигантоклеточных поражений костей (ГКП) у детей на основе современных методов исследования.

Задачи исследования:

1. Проанализировать морфологические особенности различных ГКП костей у детей.
2. Показать морфологические, иммунофенотипические и генетические различия ГКП костей у детей (ГКО, ЦГКГ, АКК, ХБ, МФД/НОФ, гигантоклеточного варианта КО и ГКП в рамках синдромов) на основе собственных наблюдений.
3. Выявить корреляцию гистологического варианта строения опухоли, ее иммунофенотипа (G34W и K36M), данных секвенирования по Сенгеру, цитогенетических методов (USP6), рентгенологических особенностей, клиники и течения заболевания на основе собственных наблюдений.

4. Разработать новые информативные критерии в диагностике различных вариантов ГКП костей у детей.

Научная новизна исследования

Используя междисциплинарный подход, впервые были разработаны новые морфологические критерии диагностики ГКП костей у детей. Было показано, что гигантские многоядерные клетки не являются клетками опухоли при ГКП у детей, несмотря на то что их присутствие значительно затрудняет дифференциальную диагностику.

Впервые было показано, что несмотря на схожие морфологические характеристики, ГКП костей у детей имеют не только четкие клинические, морфологические и иммунофенотипические, но также и генетические различия. В результате данного исследования был представлен дифференциально-диагностический алгоритм, который может широко применяться в практической работе патологоанатомов, ортопедов, хирургов, онкологов и рентгенологов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в работе данные значительно углубляют фундаментальные представления о ГКП костей у детей.

Разработаны принципы диагностики ГКП костей у детей для патологоанатомов, ортопедов, хирургов, онкологов и рентгенологов.

Методология и методы диссертационного исследования

При выполнении диссертационного исследования были проанализированы 997 случаев опухолей костей у детей, при этом, поражения, содержащие гигантские многоядерные клетки были выделены в отдельную, наименее изученную группу ГКП (ГКО, ЦГКГ, АКК, ХБ, МФД/НОФ, гигантоклеточный вариант КО, херувизм и синдром Яффе-Кампаначи). Помимо тщательного анализа морфологических и иммунофенотипических особенностей ГКП костей у детей, для понимания их сути были проанализированы клинические данные (возраст, пол, локализация поражения), данные инструментальной диагностики (рентгеновские снимки,

КТ/МРТ-исследования), а также проведены секвенирование по Сенгеру и FISH-исследование, что отражает методологию диссертационной работы.

При выполнении диссертационного исследования применялись следующие методы:

1. Анализ клинической информации (возраст, пол, локализация поражения).
2. Сопоставление с данными инструментальной диагностики (рентгеновские снимки, КТ/МРТ-исследование, при наличии).
3. Гистологическое исследование (гематоксилин и эозин).
4. Иммуногистохимическое исследование (G34W и K36M).
5. Секвенирование по Сенгеру (исследование мутаций генов H3F3A и H3F3B).
6. FISH-исследование (поиск перестройки гена USP6).
7. Построение дифференциально-диагностического алгоритма.

Положения, выносимые на защиту:

1. Использование в практике патологоанатомов междисциплинарного подхода в диагностике ГКП костей у детей (анализ клинической информации, радиологических данных и сопоставление с морфологической картиной) значительно повышает достоверность диагноза.
2. Несмотря на низкую морфологическую гетерогенность различных ГКП у детей, присутствуют морфологические признаки, определяющие нозологическую форму.
3. ГКП костей у детей (ГКО, ЦГКГ, АКК, ХБ, МФД/НОФ, гигантоклеточный вариант КО и ГКП в рамках синдромов) имеют иммунофенотипические и генетические различия.
4. Предложены наиболее эффективные критерии в диагностике различных вариантов ГКП костей у детей.

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены на 10th Asia Pacific Musculoskeletal Tumor Society (APMSTS) Meeting. 9-11 Apr. 2014. Melbourne, Australia, 26th European Congress of Pathology, London, 2014, P. S196, 27th Annual Meeting of the European Musculo-Skeletal Oncology Society (E.M.S.O.S.). May 21-23, 2014 – Vienna, Austria, 28th Annual Meeting of the European Musculo-Skeletal Oncology Society. 29 April – 1 May, 2015, Athens, Greece, The International Skeletal Society Meeting 2015, Grand Wailea – A Waldorf Astoria Resort Maui, Hawaii, USA, The International Skeletal Society Meeting 2016, Paris, France, The International Skeletal Society Meeting 2017, New York, USA. Материалы диссертации использовались при проведении школ-семинаров по диагностике и лечению опухолей костей и мягких тканей в Санкт-Петербурге 16-17 февраля 2017 года, в Чебоксарах 29-30 мая 2017 года, в Москве 6-7 октября 2017 года, в Краснодаре 3-4 ноября 2017 года, в Тюмени 18-19 января 2018 года.

Результаты работы прошли апробацию на кафедре патологической анатомии и клинической патологической анатомии лечебного факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова» Минздрава России 28 марта 2018 года.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации было опубликовано 19 печатных работ, в том числе 10 из них в изданиях, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из трех основных частей – введения, основной части и заключения.

Введение состоит из актуальности, формулировки цели и задач исследования, научной новизны и значимости работы, а также из положений выносимых на защиту, степени достоверности результатов, апробации и

внедрения результатов, указанием на количество опубликованных работ (в том числе, в изданиях, рекомендованных ВАК).

Основная часть диссертации состоит из обзора литературы, материалов и методов исследования, а также представленных результатов.

Заключение состоит из обсуждения полученных результатов исследования, выводов и практических рекомендаций.

Диссертация изложена на 216 страницах машинописного текста, содержит 71 рисунок и 20 таблиц. Библиография состоит из 141 источника литературы, из которых 8 отечественных и 133 зарубежных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Собственные наблюдения составили 997 случаев опухолей костей у детей от момента рождения до 18 лет с января 2009 по декабрь 2017 года, структура которых в соответствии с классификацией ВОЗ и в зависимости от возраста пациентов показана в таблице 1.

Большую часть в составе собственных наблюдений составили доброкачественные опухоли костей у детей (563 случая, 56,47%), среди которых наиболее распространенными были остеохондрома (115 наблюдений), АКК (75), фиброзная дисплазия (69), НОФ/МФД (55), остеоид остеома (25), простая костная киста (24), ЦГКГ (22), ювенильная оссифицирующая фиброма (16) и десмопластическая фиброма (14 случаев).

Количество диагностированных доброкачественных опухолей костей у детей увеличивалось с возрастом. Так например, при рождении было выявлено всего 4 случая неопластических костных поражений (3 наблюдения назальной хондромезенхимальной гамартомы и один случай меланотической нейроэктодермальной опухоли младенцев), что составило всего 0,71% среди всех доброкачественных опухолей костей у детей на нашем материале.

Таблица 1.

Общая структура опухолей костей согласно классификации ВОЗ (2013 год) с распределением по возрасту.

	Врожденные:	До 1 года	От 1 до 3 лет	От 3 до 7 лет	От 7 до 12 лет	С 12 до 18 лет	Все го:	Мальчики	Девочки
Хрящеобразующие опухоли:									
Остеохондрома	0	0	1	13	47	54	115	74	41
Хондрома	0	0	0	6	10	5	21	6	15
Хондробластома	0	0	0	0	5	21	26	16	10
Хондромиксоидная фиброма	0	0	0	0	1	3	4	0	4
Подногтевой экзостоз	0	0	0	0	2	4	6	1	5
Синовиальный хондроматоз	0	0	0	0	1	0	1	1	0
Костеобразующие опухоли:									
Остеома	0	0	0	0	0	7	7	3	4
Остеоид-остеома	0	0	0	3	11	11	25	16	9
Остеобластома	0	0	0	1	5	7	13	9	4
Фиброгенные опухоли:									
Десмопластическая фиброма	0	1	1	4	4	4	14	8	6
Фиброгистиоцитарные опухоли:									
Неоссифицирующая фиброма и доброкачественная фиброзная гистиоцитома	0	0	0	3	19	33	55	24	31
Гигантоклеточные поражения:									
Гигантоклеточная опухоль	0	0	0	0	0	10	10	3	7
Гигантоклеточная репаративная гранулема	0	0	0	4	7	11	22	12	10
Нейроэктодермальные опухоли:									
Меланотическая нейроэктодермальная опухоль младенцев	1	4	0	0	0	0	5	4	1
Одонтогенные опухоли:	0	1	0	1	11	10	23	8	15

Таблица 1 (продолжение).

Сосудистые поражения:									
Гемангиома	0	0	1	1	8	2	12	2	10
Доброкачественные мягкотканые опухоли костей:									
Неврилеммома	0	0	0	0	0	1	1	0	1
Доброкачественное миофибробластическ ое поражение	0	0	0	0	0	2	2	2	0
Undefined neoplastic nature:									
Аневризмальная костная киста	0	0	2	14	21	38	75	38	37
Простая костная киста	0	0	0	6	8	10	24	17	7
Фиброзная дисплазия	0	0	2	8	26	33	69	38	31
Ювенильная оссифицирующая фиброма	0	0	1	2	5	8	16	10	6
Доброкачественные фиброзно-костные поражения костей черепа	0	0	0	0	2	3	5	3	2
Остеофиброзная дисплазия	0	1	1	3	2	1	8	2	6
Доброкачественная нотохордальная опухоль	0	0	0	0	0	1	1	0	1
Хондромезенхималь ная гамартома	3	1	1	0	0	0	5	1	4
Всего:	4	8	10	69	193	277	563	297	266
Хрящеобразующие опухоли:									
Хондросаркома	0	0	0	1	1	5	7	6	1
Костеобразующие опухоли:									
Остеосаркома	0	0	1	12	56	109	178	93	85
Нейроэктодермальные опухоли:									
Саркома Юинга:	0	1	12	8	30	63	114	66	48
Нотохордальные опухоли:									
Хордома	0	0	1	1	1	2	5	4	1
Адамантинома:	0	0	0	1	0	1	2	1	1

Таблица 1 (продолжение).

Гемопозитические опухоли:									
Диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома	0	0	0	0	0	1	1	1	0
ALTCL, ALK negative	0	0	0	0	1	0	1	0	1
Гистиоцитоз из клеток Лангерганса	0	6	11	15	11	9	52	29	23
Histiocytic/Dendritic cell tumour, NOS	0	0	0	0	0	1	1	0	1
Злокачественные мягкотканые опухоли костей:									
Злокачественная опухоль из оболочек периферических нервов	0	0	0	0	1	0	1	1	0
Эмбриональная рабдомиосаркома	0	0	0	2	0	0	2	0	2
Альвеолярная рабдомиосаркома	0	0	0	0	0	1	1	1	0
Злокачественная солитарная фиброзная опухоль	0	0	0	1	0	0	1	1	0
Неклассифицируемая опухоль:	0	0	0	3	0	3	6	5	1
Всего:	0	7	25	43	100	194	372	207	164
Опухолевые синдромы с поражением костей:									
Множественные остеохондромы	21	2	10	5	6	3	47	31	16
Болезнь Олье	0	0	1	3	2	0	6	3	3
Херувизм	0	0	0	2	1	1	4	2	2
Синдром Олбрайта	0	0	1	1	0	0	2	1	1
Яффе-Кампаначи	0	0	1	0	0	0	1	1	0
Всего:	21	2	12	11	9	4	60	38	22
Итого:	25	17	47	123	302	475	997	544	452

Наибольшее количество доброкачественных опухолей костей зарегистрировано в старших возрастных группах (от 7 до 12 лет – 193, от 12 до 18 лет – 277 случаев). Соотношение мальчиков/девочек 297/266. Среди отдельных опухолей распределение по половому признаку различалось в пользу того или иного пола.

Так например, хондромы различных локализаций более чем в два раза реже регистрировались у мальчиков (6 случаев), по сравнению с девочками (15 случаев), а остеод остеомы наблюдалась чаще у мальчиков с соотношением 16/9.

Злокачественные неопластические поражения костей встретились в 372 случаях (37,31%). Среди злокачественных опухолей костей у детей чаще встречались остеосаркомы и саркома Юинга (109 и 63 случая соответственно). В структуре всех остеосарком у детей и подростков чаще всего встречается классическая (конвенциональная) остеосаркома, одним из самых редких гистологических вариантов которой является гигантоклеточный (одно наблюдение). Значительную долю среди злокачественных поражений костей занимает ГКЛ – 52 случая (13,97%). Редкими злокачественными опухолями костей были хондросаркома (7), хордома (5), адамантинома (2), эмбриональная рабдомиосаркома (2), альвеолярная рабдомиосаркома (1), диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (1), анапластическая крупноклеточная лимфома (1 случай) и др. Неклассифицированная злокачественная опухоль зарегистрирована в 6 наблюдениях (1,61%).

Немалую долю в структуре онкологической костной патологии у детей занимали различные доброкачественные опухоли костей в рамках различных синдромов (60 наблюдений, 6,01% в общей структуре всех опухолей). Одним из самых распространенных синдромов являлся синдром множественных остеохондром (47 случаев, 78,33%), обусловленный поломками генов EHT1 и/или EHT2. При этом 25 детям, страдающим множественными остеохондромами, хирургические вмешательства проводились 2 и более раз

(53,19%). Среди пациентов почти в два раза преобладали мальчики с соотношением 31/16. На втором месте по частоте встречаемости находится болезнь Олье (один из видов энхондроматозов). Соотношение полов было равным – 3/3.

У 4 пациентов был диагностирован херувизм, морфологическим субстратом которого является ЦГКГ с симметричным поражением верхней и нижней челюсти.

В одном случае синдром Яффе-Кампаначи (мальчик, манифестация первых симптомов с 1,5-2 лет), при котором обнаруживались множественные НОФ костей, сопровождающиеся повторяющимися патологическими переломами.

В общей структуре исследованного материала опухолей костей у детей и подростков ГКП встретились у 194 пациентов (19,46%). Больше количество наблюдений составили АКК (75), МФД/НОФ (55), ХБ (26) и ЦГКГ (22 случая). Реже встречались такие ГКП как ГКО (10), херувизм (4), гигантоклеточный вариант КО (1) и синдром Яффе-Кампаначи (1 наблюдение).

Учитывая, что гистологическая картина при выше обозначенных ГКП может быть сходной, вероятность ошибочного морфологического диагноза достаточно велика, особенно в тех случаях, когда не применяется комплексный междисциплинарный подход в процессе диагностики.

Биопсийный и операционный материал для гистологического исследования был получен при выполнении хирургических резекций опухолей, в результате кюретажа, а также после проведения открытых и игольных биопсий образований костной ткани.

Материал был незамедлительно помещен в 10% забуференный раствор формалина. Объем формалина превышал объем фиксируемой ткани минимум в 10-15 раз. Большие фрагменты тканей (полученные после радикальных хирургических резекций en-block, операций

эндопротезирования и др.) перед фиксацией распиливались при помощи специальной медицинской пилы EXAKT 312.

Этап декальцинации проводился только с использованием специальных декальцинирующих растворов. Применение различных неорганических кислот (азотная, серная и др.) было строго исключено. Исключение составили консультативные случаи из других лечебных учреждений, так как особенности технологии декальцинации исследованного материала в таких случаях были неизвестны.

Применялась автоматизированная гистологическая проводка материала с использованием аппарата для гистологической проводки вакуумного типа Sakura Tissue-Tek VIP5 Jr (Sakura).

Гистологическая заливка исследуемых тканей осуществлялась на автоматизированной станции Slee MPS/P.

Все полученные срезы окрашивались гематоксилином и эозином (Tissue-Tek Prisma, Sakura) по специальному протоколу и накрывались автоматически (Tissue-Tek Film, Sakura).

Толщина срезов не превышала 3-4 мкм. Срез был равномерно окрашен, все клеточные элементы и костные структуры располагались в одной плоскости.

К микроскопическому описанию гистологических препаратов приступали только после ознакомления с клинической информацией о пациенте и изучения рентгеновских снимков (и/или КТ/МРТ исследований).

Подробно описывали из каких компонентов состоит образование с подробной характеристикой каждого, распространенность (вовлечение в патологический процесс надкостницы, мягких тканей и др.), митотическая активность, наличие клеточной атипии, зон некроза. Указывались особенности перифокальных реактивных изменений костной ткани и прилежащих мягких тканей.

Во время описания гистологических изменений проводилось сопоставление с рентгеновскими снимками (и/или КТ/МРТ-исследованиями

при их наличии) и клиническими данными пациентов (анализировались соответствующие истории болезни, амбулаторные карты и выписки в случае консультативного материала).

В исследовании были использованы два антитела к гистоновым белкам: H3.3 G34W (кроличье моноклональное антитело RM263, RevMAb Biosciences USA) и H3F3 K36M (кроличье моноклональное антитело RM193, RevMAb Biosciences USA).

Рабочие разведения (для всех антител 1:1000) были подобраны на контрольных блоках ГКО и ХБ с наличием соответствующих мутаций гистоновых белков H3F3A (для ГКО) и H3F3B (для ХБ), выявленных при секвенировании по Сенгеру. Позитивным результатом считалось наличие ядерной экспрессии соответствующих антител. Отрицательным результатом считалось отсутствие ядерной экспрессии. Все этапы иммуногистохимического исследования были проведены с использованием полностью автоматизированной системы Ventana Bench-Mark Ultra с последующим докрасиванием гематоксилином (Tissue-Tek Prisma, Sakura) по специальному протоколу и накрывались покровной пленкой автоматически (Tissue-Tek Film, Sakura). Далее готовые препараты оценивались методом световой микроскопии.

Для выявления транслокаций, вовлекающих ген USP6, локализованный в районе 17p13.2, был использован зонд Zyto Light SPEC USP6 Dual Color Break Apart Probe (Pl 107, ZitoVizion GmbH, Germany).

Флуоресцентная гибридизация *in situ* проводилась на препаратах, изготовленных путем помещения срезов исследуемой ткани толщиной 4-5 мкм на специальные предметные стекла (SuperFrost), которые оставляли на нагревательном столике в течение 8 часов при температуре 60 градусов по Цельсию, затем помещали в ксилол (3 раза по 5 минут при комнатной температуре). Далее два раза проводили в 96% этаноле по 3 минуты. Гидратация срезов производилась выдерживанием препаратов последовательно по 3 минуты в 85% и 70% этаноле и дистиллированной воде

при комнатной температуре. Затем препараты переносили в 0,01 М раствор цитрата натрия и инкубировали 15 минут при 96 градусах по Цельсию с последующей промывкой в дистиллированной воде два раза по 2 минуты. Срезы обрабатывали раствором пепсина (LK-101B, Kreatech Diagnostics, Leica Biosystems, Germany) 20-50 минут при комнатной температуре, промывали дистиллированной водой и оставляли на 5 минут в растворе 2xSSC pH 7,0. Затем срезы дегидратировали в 70%, 85% и 96% этаноле (1 минута в каждом растворе). На высушенный препарат наносили 8-10 мкл зонда USP6, растворенного в гибридизационной смеси (Zyto Light SPEC USP6 Dual Color Break Apart Probe), и накрывали покровным стеклом 18x18 или 22x22 (в зависимости от размера среза). Далее препарат подлежал окантовке резиновым клеем для предотвращения высыхания с последующей денатурацией 10 минут при температуре 75 градусов по Цельсию с использованием твердотельного термостата. Переносили препарат во влажную камеру и оставляли для гибридизации при температуре 37 градусов на 12-18 часов в термостате. Затем клей удаляли. Снятие покровного стекла и постгибридизационную отмывку проводили в соответствии с протоколом производителя (ZytoLightFISH, ZitoVizion, Germany).

Анализ результатов FISH-исследования проводили на флуоресцентном микроскопе, оснащённом светофильтрами, необходимыми для просмотра флуорохромов ZyGreen и ZyOrange, которыми мечен зонд Zyto Light SPEC USP6 Dual Color Break Apart Probe. Фотосъёмку производили с использованием черно-белой CCD-камеры. Цветные изображения получали в среде компьютерной графической программы Adobe Photoshop CC 2014.

Использовали метод прямого секвенирования по Сенгеру для определения мутаций в 27, 28, 35 и 37 кодонах гена H3F3A и 35 и 37 кодонах гена H3F3B каждого образца. Геномную ДНК выделяли из опухолевой ткани фиксированной формалином и залитой в парафин с использованием набора PCR Qiagen (Qiagen, Valencia, CA, США) в соответствии с инструкциями производителя. Полимеразную цепную реакцию проводили с

использованием следующих пар праймеров: H3F3A_F 5'-GTCTCTGTACCATGGCTCG-3' и H3F3A_R 5'-AGTTTTCTGTATCCATCTTTTG-3'; H3F3B_F 5'-ATCTTCGGGGCGTCTTTCTTAGGTG-3' и H3F3B_R1 5'-AGGGGAGGAGTGAGCGGAC-3'. Реакционная смесь для амплификации содержала 5-20 нг ДНК, 1х ПЦР-буфера, по 200 мкмоль/л dATP, dCTP, dGTP и dTTP, 3 ммоль/л MgCl₂, ДНК-полимеразу SynTaq (Синтол), и 200 нмоль/л каждого ПЦР-праймера, MQ до 25 мкл. Условия амплификации были следующими: 95 °C -5 мин; 40 циклов: 95°C – 30 сек, 63°C – 30 сек, 72°C – 30 сек; 72°C – 5 мин. Продукты ПЦР детектировали методом электрофореза в 2% агарозном геле, очищали с использованием набора для очистки Cleanup Mini (Евроген) и затем секвенировали с использованием Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) в соответствии с инструкциями производителя. Полученные данные последовательности были проанализированы с использованием программного обеспечения Sequence Scanner Software 2.

Заключение было сформулировано с учетом анамнеза, локализации патологического очага, данных лучевой диагностики и обязательной корреляцией с морфологической картиной, иммунофенотипом и результатами секвенирования по Сенгеру (для тех случаев, при которых оно проводилось).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ собственного материала ГКП костей у детей представлял собой сложную многокомпонентную задачу на всех этапах диагностического поиска. Для успешного решения такой задачи применялся комплексный междисциплинарный подход в плане адекватной оценки и сопоставления информации о пациенте и его заболевании на всех этапах, начиная от подробного анамнеза и оценки данных лучевой диагностики до этапа интерпретации морфологической картины и применения дополнительных

методов исследования (иммуногистохимия, FISH-исследование и секвенирование по Сенгеру).

Так как основным компонентом всех ГКП костей у детей является присутствие в разных количествах и соотношениях гигантских многоядерных остеокластоподобных клеток, данное обстоятельство зачастую обуславливает наличие «одинаковых» клинических и морфологических признаков. Так, при многих ГКП костей жалобы пациентов похожи и не имеют какой-либо определенной специфики. При анализе данных лучевой диагностики и МРТ-исследований при всех ГКП обнаруживается литический компонент поражения, связанный в большей степени, с наличием остеолитического потенциала гигантских многоядерных клеток.

Проведенные исследования показали, что даже несмотря на комплексный междисциплинарный подход в диагностике ГКП костей у детей, часть случаев были переквалифицированы в рамках данной группы с учетом полученных нами данных иммуногистохимического исследования (G34W и K36M) и результатов секвенирования по Сенгеру. Данные изменения диагнозов лишний раз подчеркивают актуальность и необходимость дифференциальной диагностики различных опухолей, входящих в группу ГКП. Основные ключевые пункты для дифференциальной диагностики ГКП у детей отражены в таблице 2.

Гигантоклеточная опухоль (ГКО)

На основании проведенных нами исследований, из 19 первоначально документированных случаев ГКО у детей, в итоге остались только 6. Данное обстоятельство отражает гипердиагностику ГКО у детей вследствие отсутствия междисциплинарного подхода при постановке диагноза и применения высокоспецифичных антител (G34W и K36M) в практической работе патологоанатомов. Важную роль в постановке диагноза играют результаты секвенирования по Сенгеру, особенно в случаях редких мутаций в гене H3F3A.

Таблица 2.

Дифференциально-диагностические критерии ГКП костей у детей.

Признаки:		ГКО	ЦГКГ	АКК	ХБ	МДФ/ НОФ	КО (гигант оклето чный вариан т)	Теланг изхат и ческая остеоа срома	Херуви зм	Синдр ом Яффе- Кампа начи
Общее количество (194)		6/194	22/194	77/194	27/194	55/194	1/194	1/194	4/194	1/194
Мальчики (96), возраст	до 1 года	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	От 1 до 3 лет	0	0	2	0	0	0	0	0	1
	От 3 до 7 лет	0	2	9	0	2	0	0	1	0
	От 7 до 12 лет	0	5	9	1	6	0	0	1	0
	От 12 до 18 лет	1	5	20	16	13	0	0	0	0
Девочки (98), возраст	до 1 года	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	От 1 до 3 лет	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	От 3 до 7 лет	0	2	4	0	0	0	1	0	0
	От 7 до 12 лет	0	2	12	4	15	1	0	1	0
	От 12 до 18 лет	5	6	21	6	19	0	0	1	0
Локализа ция (скелет)	Плечевая	0	0	17	10	1	0	0	0	1
	Локтевая	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Лучевая	0	0	2	0	0	0	0	0	0
	Лопатка	0	0	1	1	0	0	0	0	0
	Колючица	0	0	2	0	0	0	0	0	0
	Кости кисти	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	Ребро	1	0	1	0	0	0	0	0	0
	Позвонок	0	0	4	0	0	0	0	0	0
	Кости таза	1	0	9	1	0	0	0	0	0
	Бедренная	1	0	14	5	27	1	0	0	0
	Большеберцо вая	3	0	9	7	23	0	1	0	0
	Малоберцовая	0	0	6	1	4	0	0	0	0
	Надколенник	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	Кости стопы	0	0	6	1	0	0	0	0	0
	Челюсти	0	21	3	0	0	0	0	4	0
	Кости черепа	0	1	2	0	0	0	0	0	0
Локализация в длинных трубчатых костях	Эпифиз	(-)	(-)	(-)	+	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Метафиз	(-)	(-)	(-)	(-)	+	+	+	(-)	+
	Эпифиз+ Метафиз	+	(-)	+	+	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Диафиз	(-)	(-)	+	(-)	(-)	+	+	(-)	+
	Не применимо	(-)	+	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	(-)
Пораже ние:	Солитарное	6	22	77	27	54	1	1	0	0
	Множествен ное	0	0	0	0	1	0	0	4	1
Жалобы	Болевые ощущения	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	+	+	(+/-)	(-)
	Увеличение объема	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(-)	+	+	+	(-)
	Патологичес кий перелом	1	0	17	0	6	0	1	0	1
Рентгенологическ ие признаки (рентген и КТ)	Медуллярное поражение	+	+	(-)	+	(-)	+	+	+	(-)
	Кортикальное поражение	(-)	(-)	(-)	(-)	+	(-)	(-)	(-)	+
	Смешанное поражение	(-)	(-)	+	(-)	+	+	+		+
	Литический очаг	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Септирован ность	(-)	(+/-)	+	(-)	(+/-)	(-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)

Таблица 2 (продолжение).

Рентгенологическ ие признаки (рентген и КТ)	Кортикальный слой сохранен	(+/-)	+	+	+	+	(-)	(-)	+	+
	Кортикальный слой разрушен	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(-)	(-)	+	+	(-)	(-)
	Матрикс	(-)	(-)	(-)	(+/-)	(-)	(+/-)	(+/-)	(-)	(-)
	Периостальная реакция в виде скорлупы	+	+	+	(-)	(-)	(-)	(-)	+	(-)
	Периостальная реакция "козырек Кодман"	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	+	(-)	(-)
	Периостальная реакция в виде спикул	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	+	(-)	(-)
	Внекостный компонент	(+/-)	(-)	(+/-)	(-)	(-)	+	+	(-)	(-)
МРТ:	Экспансивный характер роста	+	+	+	+	+	(-)	(-)	+	+
	Инфильтратив ный характер роста	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	+	(-)	(-)
	Кистозный компонент	(+/-)	(+/-)	+	(+/-)	(+/-)	(+/-)	+	(+/-)	(+/-)
Морфоло гия:	Солидный компонент - моноклеары	+	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Солидный компонент – веретеновид- ные клетки	(+/-)	+	+	(-)	+	(+/-)	(+/-)	+	+
	Бороздки в ядрах	(-)	(-)	(-)	+	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Структуры blue bone	(-)	(-)	30%	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Кистозный компонент	50%	27,27%	92,21%	44,44%	30,90%		100%	25%	
	Митотическая активность (0- 4 в 10 hpf)	+	+	+	+	+	(-)	(-)	+	+
	Митотическая активность (5- 9 в 10 hpf)	(+/-)	(-)	(+/-)	(+/-)	(-)	(+/-)	(-)	(-)	(-)
	Митотическая активность (10 и более в 10 hpf)	(-)	(-)	(+/-)	(-)	(-)	(+/-)	+	(-)	(-)
	Патологичес- кие фигуры митозов	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	+	(-)	(-)
	Инвазивный характер роста	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	+	(-)	(-)
	Клетки опухоли в сосудах	(+/-)	(-)	(-)	(+/-)	(-)	+	+	(-)	(-)
	Метастазы в легких	(+/-)	(-)	(-)	(+/-)	(-)	(+/-)	(+/-)	(-)	(-)
Иммуногистохими я:	G34W	98%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	K36M	0%	0%	0%	98%	0%	0%	0%	0%	0%
FISH:	USP6	0%	0%	70%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Секвенирование по Сентгеру	H3F3A	70%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

При анализе данных доступной медицинской литературы было показано, что для ГКО характерен следующий набор основных признаков: возраст от 20 до 40 лет (опухоль зрелого скелета с закрытыми зонами роста), в половине случаев поражаются длинные трубчатые кости формирующие

коленный сустав (бедренная и большеберцовая), при этом поражение метафизарно-эпифизарный характер. Так же как и у взрослых, у детей большая часть ГКО в наших наблюдениях локализовалась в длинных трубчатых костях, формирующих коленный сустав [Vipin Sharma, 2015]. Возраст пациентов в наших наблюдениях варьировал от 13 до 17 лет. Девочек было 5, мальчиков 1, что соответствует данным литературы [Anshul Sobti, 2016].

При рентгенологическом исследовании опухоль была представлена эксцентричным литическим очагом, часто с разрушением кортикального слоя и вовлечением в патологический процесс прилежащих мягких тканей. Причем, агрессивного типа периостальной реакции (спикулы, козырек Кодман) не было выявлено ни в одном наблюдении.

При гистологическом исследовании ГКО состояла из двух типов клеток – мононуклеаров и гигантских многоядерных клеток, причем ядра обоих клеточных компонентов имели схожее морфологическое строение, что является важным диагностическим признаком.

При секвенировании по Сенгеру было обнаружено, что ГКО имеет аберрацию Н3.3 (Н3F3А) [Nade`ge Presneau, 2015], в том числе, в наших наблюдениях. Несмотря на это, клинический диагноз ГКО часто фигурировал в направлениях пациентов с новообразованиями краниофациальной локализации.

Дифференциальная диагностика ГКО проводится с другими ГКП костей – ЦГКГ, АКК (прежде всего с солидным вариантом), ХБ [Григоровский В.В., 2012; Егоренков В.В., 2010], МФД/НОФ и классической остеосаркомой (вариант богатый гигантскими клетками).

Несмотря на схожие гистологические характеристики, ЦГКГ встречается преимущественно у детей младших возрастных групп в челюстно-лицевой локализации (в основном, верхняя и нижняя челюсть), что не характерно для ГКО. Основным компонентом ЦГКГ при гистологическом исследовании являются веретеновидные клетки, при этом, гигантские

многоядерные клетки обнаруживаются в виде кластеров и чаще вокруг очагов кровоизлияний. При иммуногистохимическом исследовании ЦГКГ не экспрессируют G34W в отличие от ГКО и не имеют мутаций гена H3F3A.

Большинство случаев АКК встречаются в более младшей возрастной категории, локализуются чаще в метафизе длинных трубчатых костей, имеют четкие границы на рентгенограмме (как правило, окружены так называемым «ободком»). При гистологическом исследовании в септах преобладает веретеночлесточный компонент, гигантские многоядерные клетки располагаются кластерами. Веретеночлесточный компонент при АКК не экспрессирует G34W. При цитогенетическом исследовании АКК по данным литературы [Christopher D.M. Fletcher, 2013] в 70% обнаруживается перестройка USP6 гена.

ХБ чаще регистрируется у детей в возрастной группе от 12 до 18 лет (80,77%), локализуется в эпифизах длинных трубчатых костей, имеет четкие границы, иногда с незначительными склеротическими изменениями по периферии опухоли. При больших размерах может наблюдаться метафизарно-эпифизарное поражение, но в отличие от ГКО не обладает признаками локально агрессивного роста (как правило, четкие границы). При морфологическом исследовании состоит из овальных и неправильной формы клеток с вытянутыми ядрами, в которых выявляются продольные бороздки, чего не наблюдается при ГКО, легко обнаруживается хондроидный межклеточный матрикс. При иммуногистохимическом исследовании неопластические клетки при ХБ не выявляют позитивной реакции с антителом к G34W, при этом обнаруживается позитивная ядерная экспрессия K36M. При секвенировании по Сенгеру в клетках опухоли при ХБ в большинстве случаев выявляется точечная мутация в гене H3F3B.

МФД/НОФ чаще встречается у детей в возрастной категории от 12 до 18 лет (60%), имеет метафизарную локализацию в кортикальном слое, четкие границы и склонность к самопроизвольной регрессии. При морфологическом исследовании состоит из веретеновидных клеток с небольшими скоплениями

гемосидерофагов и ксантомных клеток. Гигантские многоядерные клетки обычно не столь многочисленны как при ГКО и, как правило, меньших размеров. При иммуногистохимическом исследовании веретенноклеточный компонент при МФД/НОФ не экспрессирует G34W. Секвенирование по Сенгеру не выявляет мутаций в генах H3F3A и H3F3B.

Классическая остеосаркома также может вызывать сложности в дифференциальной диагностике с ГКО, особенно при варианте богатом гигантскими многоядерными клетками. Стоит отметить, что классическая остеосаркома клинически протекает агрессивно, встречается у детей чаще чем ГКО. При исследовании рентгенологических данных, для КО характерно поражение метафизов, реже диафизов длинных трубчатых костей. В большинстве случаев удается обнаружить «облаковидный» инфильтрат за счет продукции опухолью костного матрикса, а также агрессивный тип периостальной реакции (козырек Кодман, спикулообразная или сочетание). При гистологическом исследовании, несмотря на большое количество гигантских многоядерных клеток, при КО всегда можно найти признаки клеточной атипии и высокую митотическую активность, в том числе за счет многочисленных атипических мультиполярных митозов. В том или ином количестве обнаруживается неопластический остеоид. Данные признаки не характерны для ГКО. При иммуногистохимическом исследовании клетки опухоли при КО не экспрессируют G34W, в отличие от ГКО, и не содержат мутаций в гене H3F3A.

Из 10 проанализированных случаев ГКО у детей, в 9 случаях нами было выполнено иммуногистохимическое исследования с оценкой экспрессии гистонового белка G34W, высокоспецифичного для ГКО. Параллельно выполнялось секвенирование по Сенгеру с целью поиска соответствующей мутации. В 5 наблюдениях была выявлена экспрессия G34W (ядерный локус). Данные результаты полностью совпали с результатами секвенирования (при условии адекватности исследованного материала). В одном случае ГКО правой бедренной кости у пациентки 14 лет

не было выявлено экспрессии G34W. Однако, при секвенировании по Сенгеру в данном наблюдении была обнаружена мутация G35L, что полностью объяснило отсутствие экспрессии G34W и достоверно подтвердило диагноз ГКО. У трех пациентов была найдена мутация G35R (H3F3A, Codon 35), что напрямую коррелировало с позитивной реакцией с антителом к G34W.

В одном случае у пациентки 14 лет с ГКО правой большеберцовой кости через полтора года было обнаружено метастатическое поражение легких. При этом, при иммуногистохимическом исследовании метастазов также была выявлена ядерная экспрессия G34W.

Позитивной реакции с K36M не было обнаружено ни в одном случае ГКО.

Основываясь на наших исследованиях, диагноз ГКО был очевидным и доказательным в 6 из 10 случаев. В остальных 4 случаях наиболее очевидным диагнозом был «АКК, солидный вариант».

В последних работах [Fernanda Amary, 2017; Julian Luke, 2017] была показана высокая специфичность антитела G34W для верификации ГКО. Учитывая вышеизложенное, часть публикаций с описанием случаев ГКО без соответствующего подтверждения (G34W, H3F3A) представляются сомнительными [Svetoslav A. Slavchev, 2017].

Интересной представляется работа, в которой авторы не обнаружили мутаций в гене H3F3A при ГКО ни у одного из пациентов в азиатской популяции, при этом была обнаружена мутация гена IDH2 в 80% случаев [Kato Kaneko, M., 2014]. Позже было сделано предположение, что для ГКО, возникающих у белого населения, драйверной мутацией в ГКО является H3F3A, а у азиатского населения IDH2 [Giuseppina Divisato, 2017]. Однако, данный вопрос требует дальнейших исследований.

Таким образом, результаты наших исследований показали, что клинический диагноз ГКО до этапа морфологического и иммуногистохимического исследования был выставлен в половине случаев.

При этом следует учитывать имеющуюся гипердиагностику ГКО среди неопластических поражений костей у детей как патологоанатомами, так и докторами других медицинских специальностей. Так например, следует помнить, что ГКО у детей встречается крайне редко (0,6% в структуре всех ГКП у детей по нашим данным) и только в старшей возрастной группе от 12 до 18 лет (100%). Самая ранняя презентация ГКО была зарегистрирована у пациентки в возрасте 13 лет (опухоль правой большеберцовой кости). Среди 6 случаев ГКО преобладали девочки (5). При морфологическом исследовании важным критерием для диагностики является обнаружение моноклеарных неопластических клеток, ядерные характеристики которых сходны с таковыми в гигантских многоядерных клетках. При этом следует учитывать, что в ГКО у детей можно встретить веретенноклеточный компонент, а также кистозные изменения по типу вторичной АКК, что значительно затрудняет дифференциальную диагностику с другими представителями ГКП костей. Наши исследования показали, что для достоверной диагностики ГКО у детей характерно наличие ядерного локуса экспрессии G34W, что согласуется с данными других исследователей [Fernanda Amary, 2017; Julian Luke, 2017]. Секвенирование по Сенгеру выявило мутации в гене H3F3A в 4 случаях, причем результаты полностью сопоставимы с данными иммуногистохимического определения белка G34W. Однако, следует учитывать, что чувствительность данного метода ниже чем иммуногистохимического, и составляет порядка 69% по данным литературы [Cleven АН, 2015]. При этом, часть исследованного нами материала составили консультативные случаи из других лечебных учреждений, и возможно, имели место погрешности на этапах гистологического процессинга (длительная декальцинация в агрессивных кислотах).

Центральная гигантоклеточная гранулема (ЦГКГ)

Собственные наблюдения показали, что ЦГКГ чаще возникает у детей на второй декаде жизни (50% в группе от 12 до 18 лет), излюбленная локализация данного образования – это верхняя и нижняя челюсть, имеет

солитарный тип поражения (если не в рамках херувизма или нейрофиброматоза 1 типа), медленные темпы роста (от нескольких месяцев до нескольких лет), представлена литическим очагом поражения с четкими границами. При гистологическом исследовании выявляется веретеночлесточный компонент без признаков атипии клеток и низкой митотической активностью, гигантские многоядерные клетки располагаются неравномерно, в виде кластеров, чаще вокруг очагов кровоизлияний. Каких-либо специфически значимых цитогенетических аномалий при ЦГКГ не выявлено.

Дифференциальная диагностика ЦГКГ проводится с другими ГКП: ГКО, АКК, ХБ и КО (вариант богатый гигантскими многоядерными клетками).

ГКО чаще встречается у детей крайне редко (0,6% по нашим наблюдениям) и только в старшей возрастной группе (все случаи от 13 до 18 лет), излюбленная локализация – длинные трубчатые кости скелета. Ни одного случая ГКО не было зарегистрировано в челюстях и костях черепа, что полностью согласуется с данными литературы. При рентгенологическом исследовании ГКО также выявляется литический очаг, однако в отличие от ЦГКГ он не имеет четкой границы, разрушает кортикальный слой и может распространяться на прилежащие к очагу поражения мягкие ткани. При гистологическом исследовании ГКО состоит из двух клеточных компонентов, один из которых моноклеарный, в отличие от преобладания веретеночлесточного компонента при ЦГКГ. В редких случаях, при ЦГКГ веретеночлесточный компонент по морфологии может приближаться к моноклеарному, что вызывает сложности в дифференциальной диагностике. Гигантоклесточный компонент при ГКО состоит из гигантских многоядерных клеток большего размера чем при ЦГКГ, в которых может насчитываться более 50 или даже 100 ядер. При этом, многоядерные клетки в ГКО распределяются более равномерно, чем при ЦГКГ. Ядра моноклеарных и гигантских многоядерных клеток в ГКО имеют сходные

морфологические характеристики. При иммуногистохимическом исследовании при ЦГКГ не обнаруживается позитивной реакции с G34W. Секвенирование по Сенгеру не выявляет мутации в гене H3F3A, в отличие от ГКО.

При сравнительной ретроспективной оценке признаков дифференциальной диагностики ЦГКГ и ГКО интересной представляется работа Resnick et al., 2010. В ней говорится о том, что между данными новообразованиями больше общего, чем различий, и что эти два заболевания могут быть одной и той же опухолью. При этом данными авторами было проанализировано 93 наблюдения ГКП (45 поражений челюстей и 48 опухолей костей аксиального и добавочного скелета). Различия в возрастных группах пациентов они объяснили тем, что вследствие периодического скрининга ГКП челюстей выявляются раньше, чем ГКП других локализаций. Однако, следует учитывать, что авторы не рассматривали вопросы дифференциальной диагностики ГКО и ЦГКГ на основании иммуногистохимического и мутационного профиля, так как первые подобные сообщения появились позже.

Трудности возникают при дифференциальной диагностике АКК (особенно солидного варианта) и ЦГКГ. В большинстве случаев, рентгенологически и морфологически эти новообразования практически не различимы, поэтому, долгое время считались синонимами [Peter G. Bullough, 2010]. В 2014 году Narasimhan P Agaram et al. исследовали ГКП мелких костей кистей и стоп и ЦГКГ челюстей на предмет перестройки USP6 гена. Оказалось, что ГКП кистей и стоп в 8 из 9 случаев содержала перестроенный USP6 ген, в то время как ЦГКГ верхней и нижней челюсти такой перестройки не имели. На основании этого был сделан вывод о том, что термин ЦГКГ должен быть ограничен для использования только при локализации образования в челюстях. И самое главное, случаи гигантоклеточных гранулем мелких костей кистей и стоп было рекомендовано перекалфицировать в солидный вариант АКК.

ХБ реже возникает в челюстях и костях черепа (чаще височная кость), составляя 6,6 – 7,1% всех случаев. При этом, средний возраст пациентов старше (39,4 лет), чем при локализации опухоли в эпифизах длинных трубчатых костей [Jonathan Liu, 2015; Andrew P. Carlson, 2011]. В наших наблюдениях у детей таких случаев не зарегистрировано. При рентгенологическом исследовании и МРТ ХБ имеет четкие границы, но в отличие от ЦГКГ может определяться матрикс. При гистологическом исследовании при ХБ обнаруживается два вида клеток – мононуклеарные клетки и гигантские многоядерные остеокластоподобные клетки. Мононуклеарные клетки по морфологии напоминают хондробласты, с хорошо различимыми клеточными границами, овальной или неправильной формы и бледно эозинофильной цитоплазмой. Ядра овальной формы, в части из них выявляется продольная бороздка (coffee bean). Митотическая активность низкая или умеренная, патологические митозы не определяются. В одной трети случаев удается обнаружить участки с нежной перицеллюлярной кальцификацией, которые носят название проволоочной сетки или куриной сетки (chicken wire). Гигантские многоядерные клетки могут быть многочисленными, содержат порядка 10 и более ядер, хотя их количество варьирует. При иммуногистохимическом исследовании в неопластических клетках ХБ выявляется позитивная реакция с К36М (ядерный локус), чего никогда не бывает при ЦГКГ. При секвенировании по Сенгеру в ЦГКГ не обнаруживается мутации в гене H3F3B (характерна для ХБ).

Несмотря на то что КО одна из самых частых злокачественных опухолей костей у детей, она крайне редко возникает в костях черепа и челюстях, излюбленная локализация это метафизы длинных трубчатых костей. В отличие от ЦГКГ, КО всегда имеет локальные признаки агрессивного роста по рентгенологическим данным и МРТ-исследовании (разрушение кортикального слоя, вовлечение в патологический процесс

мягких тканей), наблюдается наличие костного матрикса, чего не отмечается при ЦГКГ.

Мы провели иммуногистохимическое исследование 16 доступных случаев ЦГКГ с антителами к G34W и K36M. Ни в одном наблюдении не было выявлено позитивных реакций с данными антителами, что доказывает отсутствие среди этих случаев ГКО и ХБ. В одном наблюдении (опухоль нижней челюсти, мальчик 7 лет) была выявлена мутация R27R в 27 кодоне гена H3F3A. Однако, в данном случае это была синонимичная (Silent-мутация, не приводящая к замене аминокислоты), которая не имела никакого клинического значения (учитывались только Miscense-мутации). Данное обстоятельство согласуется с данными Flanagan и соавт., 2014, что ЦГКГ и ГКО являются генетически различными опухолями, при этом ГКО не встречается в челюстях и костях черепа у детей, несмотря на их морфологическое сходство.

Таким образом, до этапа морфологического исследования диагноз ЦГКГ был выставлен только в 3 случаях (13,64%), что отражает низкий уровень осведомленности клинических докторов и специалистов лучевой диагностики в отношении данного заболевания. Интересно отметить, что в клиническом диагнозе в большинстве случаев фигурировала ГКО (8 пациентов, 36,36%). Данные цифры говорят о гипердиагностике ГКО у детей и отсутствии осознания важности комплексного учета информации о пациенте, в частности речь идет о таких важных признаках как возраст и локализация поражения. При гистологическом исследовании важно обращать внимание на то что морфологическим субстратом поражения при ЦГКГ являются веретеновидные клетки, гигантские многоядерные клетки располагаются кластерами вокруг очагов геморрагий, отсутствуют признаки атипии, митотическая активность низкая или не определяется и имеются депозиты гемосидерина. При иммуногистохимическом исследовании в ЦГКГ не определяется экспрессия G34W и K36M, а секвенирование по Сенгеру не обнаруживает мутаций генов H3F3A и H3F3B.

Аневризмальная костная киста (АКК)

Наши наблюдения показали что АКК чаще встречается у детей в метафизарной зоне длинных трубчатых костей (61,33%), реже в коротких трубчатых костях кистей и стоп (4%), плоских костях (17,33%). Поражение позвонков встретилось в 5 наблюдениях (6,66%). Возраст пациентов варьировал от 2 до 18 лет, с пиком инцидентности в период от 12 до 18 лет – 38 наблюдений (50,67%). В результате проведенного комплексного анализа, два случая АКК из 75 были переквалифицированы в ХБ и телангиэктатическую остеосаркому.

Дифференциальная диагностика АКК проводится прежде всего с телангиэктатической остеосаркомой, ГКО, ЦГКГ, ХБ и МФД/НОФ.

Телангиэктатическая остеосаркома имеет много общих характеристик с АКК, в частности, клинические проявления, рентгенологические характеристики, макроскопические особенности, а также очень напоминает АКК при малом увеличении микроскопа. Однако, при тщательном анализе можно обнаружить, что телангиэктатическая остеосаркома имеет более агрессивное клиническое поведение. При оценке данных лучевой диагностики выявляются очевидные признаки локальной агрессивности патологического процесса (разрушение кортикального слоя на большом протяжении, периостальная реакция прерывистая по типу козырька Кодман или спикуюобразная, иногда очаговый «облаковидный» инфильтрат, свидетельствующий о продукции опухолью костного матрикса). При анализе гистологической картины, помимо множественных кистозных полостей как при АКК, обращает на себя внимание, что опухоль плохо ограничена от окружающих тканей, с признаками инвазивного роста. Достаточно легко обнаруживаются признаки клеточной атипии и полиморфизма неопластических клеток. Митотическая активность, как правило, очень высокая, в том числе, за счет многочисленных патологических мультиполярных форм. Могут выявляться очаги некротических изменений опухоли. Один из наших 75 случаев АКК был переквалифицирован в

телангиэктатическую остеосаркому на основании того что при каждом последующем локальном рецидиве, гистологическая картина становилась все более «агрессивной» (нарастание митотической активности, появление крупных клеток с признаками атипии, увеличение количества гигантских многоядерных клеток). При КТ-исследовании легких было обнаружено два солидных метастатических очага размером до 0,5 и 0,7 см диаметром.

ГКО встречается в более старших возрастных группах (3-5 декада жизни), при закрытых зонах роста (зрелый скелет). В наших наблюдениях мы не встретили случаев ГКО у детей младше 13 лет. Чаще локализуется в метафизарно-эпифизарной зоне длинных трубчатых костей в виде плохо ограниченного литического очага с частым разрушением кортикального слоя и вовлечением в патологический процесс прилежащих мягких тканей, что не характерно для АКК. При гистологическом исследовании ГКО состоит из двух клеточных компонентов: моноклеарного и гигантоклеточного. При типичной гистологической картине в комплексе с вышеперечисленными данными, не вызывает каких-либо сложностей в дифференциальной диагностике. Однако, ГКО часто сопровождается кистозными изменениями (вторичная АКК), а при локализации в длинных трубчатых костях, моноклеарный компонент местами может выглядеть как веретеночлеточный, что вызывает диагностические сложности. В таких ситуациях кроме комплекса всех прочих признаков может помочь обнаружение перестройки USP6 гена (характерно для АКК). При иммуногистохимическом исследовании в АКК не обнаруживается экспрессия G34W, при секвенировании по Сенгеру не выявляются мутация гена H3F3A (характерно для ГКО).

Солидный вариант АКК и гигантоклеточная гранулема (в том числе, ЦГКГ) многими авторами рассматриваются как абсолютные синонимы, так как не существовало работ, позволяющих обнаружить какие-либо дифференциальные признаки. Однако, в 2014 году Narasimhan P Agaram et al. исследовали обнаружили, что поражения мелких костей кистей и стоп имеет

перестройку USP6 гена, а ЦГКГ с поражением челюстных костей нет. Был сделан вывод, что поражения костей кистей и стоп следует переквалифицировать в солидный вариант АКК.

ХБ у детей в большинстве случаев локализуется в эпифизах длинных трубчатых костей (92,3% на нашем материале), в то время как АКК в зоне метафизов трубчатых костей. При анализе данных инструментальной диагностики можно отметить, что для ХБ не характерно «вздувание» кости и септированность, кроме того, при ХБ обнаруживается неравномерно распределяющийся матрикс (АКК – литическое образование). При гистологическом исследовании ХБ состоит из округлых и овальных клеток, в ядрах которых определяется продольная бороздка. При иммуногистохимическом исследовании отмечается экспрессия К36М, в АКК данной реакции не обнаруживается.

НОФ/МФД часто встречается у детей и подростков в виде кортикального четко ограниченного литического очага, локализуется в зоне метафизов длинных трубчатых костей (подавляющее большинство случаев – длинные трубчатые кости, образующие коленный сустав). Иногда содержит кистозный компонент по типу вторичной АКК. При этом, выявляется веретенноклеточный шториформный компонент. Клетки без признаков атипии, митотическая активность низкая или не выявляется. Почти всегда видны кластеры крупных ксантомных клеток, а также гемосидерофаги, что позволяет поставить диагноз.

Мы провели иммуногистохимическое исследование с антителами к G34W и K36M в 46 случаях АКК у детей. Во всех случаях не было отмечено позитивной реакции с G34W. В 45 наблюдениях экспрессии K36M также не выявлено. Однако, в 1 наблюдении у пациента 14 лет с кистозным поражением пяточной кости была получена позитивная реакция с K36M. При повторном анализе и пересмотре гистологического материала у данного пациента в септах, разделяющих полости были выявлены участки, состоящие из клеток с морфологией хондробластов. Диагноз в данном случае был

изменен на ХБ с преобладанием кистозного компонента по типу вторичной АКК.

В 10 случаях у пациентов с АКК было проведено секвенирование по Сенгеру. В 4 наблюдениях материал оказался неинформативным. В остальных случаях был выявлен дикий тип в различных кодонах генов H3F3A и H3F3B. Причем, в данную группу были включены 3 случая с солидным вариантом АКК, морфологическая картина которых очень сходна с другими ГКП, в частности с ГКО.

В 4 случаях АКК было проведено FISH-исследование на предмет выявления характерной перестройки гена USP6. Во всех исследованных случаях данная перестройка была обнаружена. Интересен факт, что в ядрах гигантских многоядерных клеток перестройка гена USP6 не выявлена, что согласуется с данными других исследователей [Andre M. Oliveira, 2004].

Таким образом, АКК это одна из самых частых доброкачественных опухолей костей у детей, составляет 7,32% среди всех опухолей костей и 37,62% среди ГКП костей у детей. Клинический диагноз АКК до этапа морфологического исследования был выставлен только в 27,76% случаев. В 16,43% в клиническом диагнозе фигурировала ГКО. При морфологическом исследовании следует обращать внимание на наличие кистозного компонента (92,21%), преобладание в септах веретеновидных фибробластоподобных клеток и отсутствие признаков клеточной атипии. При иммуногистохимическом исследовании в АКК не обнаруживается экспрессии с антителами к G34W и K36M, при секвенировании по Сенгеру не выявляются мутации генов H3F3A и H3F3B. Важным признаком является наличие перестройки гена USP6 в 70% случаев первичной АКК по данным литературы [Christopher D.M. Fletcher, 2013].

Хондробластома (ХБ)

По нашим данным ХБ встречается редко и составляет 2,7% среди всех опухолей костей у детей и 13,91% среди ГКП. В большинстве случаев

локализуется в эпифизах длинных трубчатых костей (92,3% на нашем материале).

Дифференциальная диагностика при ХБ проводится с ГКО, ЦКГГ, АКК, МФД/НОФ и КО (вариант богатый гигантскими многоядерными клетками).

ГКО встречается в старших возрастных группах (на втором и третьем десятилетии жизни), когда закрыты зоны роста. При рентгенологическом исследовании ГКО имеет метафизарно-эпифизарную локализацию, представлена литическим очагом, часто с разрушением кортикального слоя и вовлечением в патологический процесс прилежащих мягких тканей, что не характерно для ХБ. При гистологическом исследовании ГКО состоит из моноклеарных клеток и гигантских многоядерных клеток, причем ядра обоих клеточных компонентов аналогичны по морфологическим характеристикам. При ХБ гигантские многоядерные клетки располагаются неравномерно, меньших размеров, чем при ГКО. Такие морфологические признаки как хондроидный матрикс, перицеллюлярная кальцификация и продольные бороздки в ядрах неопластических клеток характерны только для ХБ. При иммуногистохимическом исследовании в моноклеарных клетках ГКО не обнаруживается экспрессия K36M, а при секвенировании по Сенгеру нет мутации в гене H3F3B.

АКК тоже содержит гигантоклеточный компонент, причем в трети случаев также можно выявить нежную базофильную кальцификацию (blue bone). Однако, в отличие от ХБ, АКК чаще обнаруживается в зоне метафиза и не распространяется на эпифиз, «вздувает» кость, выходя за ее нормальные анатомические границы, имеет уровни жидкости при МРТ-исследовании. Следует внимательно относиться к случаям выявления признаков АКК с эпифизарной локализацией, так как данные находки могут скрывать ХБ. При цитогенетическом исследовании первичная АКК имеет перестройку USP6 гена в 70% наблюдений.

МФД/НОФ в отличие от ХБ всегда локализуется в метафизах длинных трубчатых костей и располагается кортикально. При больших размерах НОФ возможно вторичное распространение опухоли в медуллярном направлении. При гистологическом исследовании обнаруживается веретенноклеточный компонент с кластерами ксантомных клеток и депозиты гемосидерина. При иммуногистохимическом исследовании в МФД/НОФ не выявляется реакции с K36M.

Для КО характерно поражение метафизов с агрессивными локальными рентгенологическими характеристиками (разрушение кортикального слоя с вовлечением в патологический процесс мягких тканей), а также наличием признаков клеточной атипии и высокой митотической активностью при морфологическом исследовании, отсутствием экспрессии K36M и мутации H3F3V.

Из 26 случаев ХБ доступных для анализа, в 21 было выполнено иммуногистохимическое исследование с антителами к G34W и K36M. Позитивной реакции с G34W не выявлено ни в одном случае, что позволило провести дифференциальную диагностику с ГКО. Экспрессия K36M на клетках опухоли обнаружена в 20 наблюдениях. У одного пациента 9 лет с поражением левой плечевой кости отрицательная реакция с K36M коррелирует с отсутствием мутаций гена H3F3V (секвенирование по Сенгеру). В данном случае применялись агрессивные методики декальцинации, в результате чего можно предположить утрату иммунореактивности данного материала.

В 16 наблюдениях ХБ было проведено секвенирование по Сенгеру. При этом, в 2 случаях материал был неинформативным. В 8 из 14 случаев (57,14%) была выявлена мутация в 37 кодоне гена H3F3V. В остальных 6 случаях характерная мутация не обнаружена. Однако, в 4 случаях при отсутствии мутации гена H3F3V, при иммуногистохимическом исследовании была выявлена экспрессия K36M, в одном случае иммуногистохимическое исследование провести не удалось (материал утрачен). Вероятно, данное

обстоятельство можно объяснить малым объемом биопсийного материала в этих наблюдениях и попаданием «нормальной» ткани с отсутствием мутации K36M в клетках. Отсутствие экспрессии гистонового белка K36M и мутации H3F3B у одного из пациентов с ХБ левой плечевой кости может быть связано с применением агрессивных методов декальцинации и изначально сниженной иммунореактивностью исследованного материала.

Таким образом, ХБ это доброкачественная опухоль с пиком инцидентности в период от 12 до 18 лет, которая чаще поражает эпифизы длинных трубчатых костей и встречается в 2,7% среди всех опухолей костей у детей. Клинический диагноз ХБ до этапа морфологического исследования был выставлен в 13 случаях (48,14%). Основными морфологическими характеристиками ХБ являются цитологические характеристики клеток опухоли (овальные клетки, продольная бороздка в ядре), зоны перицеллюлярного обызвествления (chicken wire), хондроидный межклеточный матрикс, низкая или умеренная митотическая активность. При иммуногистохимическом исследовании характерна экспрессия K36M (ядерный локус), при секвенировании по Сенгеру обнаруживается мутация гена H3F3B. В наших наблюдениях данная мутация выявлена в 57,14% случаев. По данным литературы чувствительность секвенирования по Сенгеру материала из парафиновых блоков ниже чем иммуногистохимического исследования, и составляет порядка 70% [Cleven АН, Hocker S, 2015]. При этом, часть исследованного нами материала составили консультативные случаи из других лечебных учреждений, и возможно, имели место погрешности на этапах гистологического процессинга (длительная декальцинация в агрессивных кислотах).

Метафизарный фиброзный дефект / Неоссифицирующая фиброма (МФД/НОФ)

Анализ собственного материала показал, что МФД/НОФ является одним из самых частых поражений костей у детей и имеет типичные рентгенологические характеристики, подробно описанные еще Ritschl P. et

al., в 1988 году. В подавляющем большинстве случаев МФД/НОФ регрессирует со временем и бесследно исчезает без каких-либо врачебных манипуляций. Тем не менее, в наших наблюдениях абсолютно всем пациентам было выполнено хирургическое вмешательство (чаще, кюреттаж), что свидетельствует о низкой осведомленности специалистов лучевой диагностики, хирургов и патологоанатомов в отношении данной патологии у детей. Данное поражение большинством авторов отнесено к группе так называемых «leave me alone lesions» [Picci P., 2014].

МФД/НОФ регистрировалась в 5,51% среди всех опухолей костей у детей, и в 28,35% среди группы ГКП по нашим наблюдениям.

Дифференциальную диагностику следует проводить с ГКО, ЦГКГ, АКК и ХБ.

ГКО в отличие от МФД/НОФ обнаруживается в метафизрно-метафизарной зоне, разрушает кортикальный слой, имеет тенденцию к локальному агрессивному поведению. При гистологическом исследовании основным морфологическим компонентом ГКО являются моноклеарные клетки овальной формы, ядра моноклеаров в ГКО идентичны по морфологии ядрам многоядерных остеокластоподобных клеток [G. Petur Nielsen, 2013]. Однако, в виду того что при ГКО может встречаться веретеночлечный компонент, при отсутствии комплексного анализа локализации опухоли и данных лучевой диагностики, патологоанатомом могут быть допущены диагностические ошибки. При иммуногистохимическом исследовании веретеновидные клетки при МФД/НОФ не экспрессируют G34W, в отличие от ГКО.

ЦГКГ в отличие от МФД/НОФ имеет другую локализацию – в челюстях и костях черепа. При отсутствии комплексного анализа клинической информации при гистологическом исследовании этих образований патологоанатомом могут быть допущены диагностические ошибки, так как морфологическая картина МФД/НОФ и ЦГКГ может быть сходной.

Редко встречается солидный вариант аневризмальной костной кисты (АКК). Чаще локализуется в длинных трубчатых костях. При рентгенологическом исследовании АКК, как правило, в виде литического очага, хорошо ограничена, часто выходит за нормальные анатомические пределы кости, иногда четкая граница с мягкотканым компонентом может утрачиваться. При гистологическом исследовании нет выраженного шториформного паттерна как при МФД/НОФ, обнаруживаются множественные фокусы реактивного остеогенеза (woven bone). В первичной АКК обнаруживается t(16;17) с перестройкой UPS6 гена.

Дифференциальная диагностика с ХБ не вызывает затруднений при комплексном анализе клинической информации. При иммуногистохимическом исследовании в неопластических клетках ХБ выявляется позитивная реакция с K36M (ядерный локус), чего никогда не бывает при МФД/НОФ. При секвенировании по Сенгеру в ХБ обнаруживается мутация в гене H3F3B.

В 42 случаях МФД/НОФ было проведено иммуногистохимическое исследование с белками G34W и K36M. Позитивных реакций не было получено ни в одном наблюдении. Данные результаты позволяют достоверно исключить ГКО и ХБ среди этих наблюдений.

Таким образом, МФД/НОФ обнаруживается в кортикальном слое метафизов длинных трубчатых костей и чаще в возрастной группе от 12 до 18 лет (60%) имеет характерные признаки при рентгенологическом исследовании и МРТ, в подавляющем большинстве случаев не требует хирургического лечения. При этом клинический диагноз МФД/НОФ до этапа морфологического исследования был выставлен только у 9 пациентов (16,36%), что напрямую свидетельствовало о низком уровне осведомленности о данной патологии. При гистологическом исследовании состоит из вытянутых фибробластоподобных клеток без признаков атипии, кластеров ксантомных клеток и депозитов гемосидерина. При

иммуногистохимическом исследовании отсутствует реакция с антителами к G34W и K36M.

Классическая остеосаркома (КО), гигантоклеточный вариант

Среди 178 случаев остеосарком у детей и 154 наблюдений КО, гигантоклеточный вариант встретился только у одной пациентки, что свидетельствует о редкости данного гистологического варианта и обуславливает значительные сложности его диагностики.

Дифференциальная диагностика гигантоклеточного варианта КО может основываться на наличии жалоб (нарастающие болевые ощущения, увеличение объема пораженной зоны, отек), признаков локальной агрессивности при инструментальных методах исследования (разрушение кортикального слоя, вовлечение в патологический процесс прилежащих мягких тканей). Выявляются признаки атипии при морфологическом исследовании, высокая митотическая активность, участки формирования патологического остеоида). При иммуногистохимическом исследовании отсутствуют реакции с G34W и K36M.

Гигантоклеточные поражения костей в рамках синдромов (херувизм, синдром Яффе-Кампаначи)

Диагноз «херувизм» при комплексном исследовании был выставлен нами у четырех пациентов при условии множественного симметричного поражения верхней и нижней челюсти, морфологическим субстратом которого была ЦГКГ. Как правило, при комплексном анализе и сопоставлении клинической информации, инструментальных методов диагностики (рентгеновское исследование, КТ/МРТ) и сопоставлении последних с морфологической картиной заболевания (ЦГКГ), всегда удается выставить данный диагноз.

Дифференциальный диагноз не представляет сложностей при условии комплексного анализа клинической информации, локализации и симметричности поражения. Морфологическая картина идентична ЦГКГ.

При иммуногистохимическом исследовании не выявляется экспрессия G34W и K36M.

Синдром Яффе-Кампаначи – редкое заболевание, характеризующееся множественным поражением костей (НОФ), пятнами на коже (*café-au-lait spots*), чаще в сочетании с клиническими проявлениями нейрофиброматоза 1 типа [Picci P., 2014; Stéphane Cherix, 2014]. В рамках данной работы мы наблюдали одного пациента с синдромом Яффе-Кампаначи.

Сложности диагностики заключались в редкости данной патологии, отсутствии комплексного анализа (анамнез, возраст пациента, особенности оценки инструментальных данных и сопоставлении этих признаков с морфологической картиной заболевания). В данном случае выяснение анамнеза позволило заподозрить наследственный характер патологии (клинические проявления нейрофиброматоза 1 типа у матери в течение нескольких лет), начало заболевания у ребенка с 1,5-2 летнего возраста (появление множественных кофейных пятен на коже), мягкотканное образование правой затылочной области, парциальный гигантизм правой стопы, кортикальный эксцентричный литический очаг в проксимальном метафизе правой большеберцовой кости и наличие рецидивирующих патологических переломов левой плечевой кости. При морфологическом исследовании материала полученного при ревизии литических очагов левой плечевой кости, патологические изменения соответствовали НОФ. Вышеуказанный комплекс симптомов послужил поводом для проведения поиска патогенных мутаций, ассоциированных с нейрофиброматозом, а также наследственными заболеваниями со сходными фенотипическими проявлениями. При этом была обнаружена гетерозиготная мутация в гене NF1 (экзон 9, chr17:29528053A>G, rs1060500358), приводящая к нарушению канонического сайта сплайсинга (c.1063-2A>G, NM_001042492.2), что подтвердило диагноз синдрома Яффе-Кампаначи в рамках семейного нейрофиброматоза 1 типа. Интересным является тот факт, что данная

мутация не была зарегистрирована в контрольных выборках «1000 геномов», ESP6500 и Exome Aggregation Consortium (ExAC).

Дифференциальную диагностику данного синдрома следует проводить с другими представителями группы ГКП костей у детей, прежде всего МФД/НОФ. Однако, в спорадических случаях МФД/НОФ чаще всего являются солитарным поражением (множественный характер – 2 очага наблюдался только у одного пациента – 1,81%) и встречается в более старших возрастных группах с наибольшим количеством наблюдений у детей от 12 до 18 лет (60% по нашим данным), а клинические проявления синдрома Яффе-Кампаначи регистрируются в младших возрастных группах. Стоит отметить особенности локализации патологического процесса. Так, МФД/НОФ всегда выявлялись в зоне метафизов с вторичным вовлечением медуллярного канала при условии большого объема патологического очага, редко сопровождалась патологическим переломом (10,9%). При синдроме Яффе-Кампаначи патологический очаг, как правило, не ограничивается только метафизарной зоной, а распространяется на диафиз длинных трубчатых костей.

Нами было проведено иммуногистохимическое исследование с антителами G34W и K36M, позитивных реакций обнаружено не было, что позволило провести дифференциальную диагностику с такими ГКП костей у детей как ГКО и ХБ. Следует также отметить, что данные опухоли не встречались в данной возрастной группе и имели другую локализацию (ХБ – эпифиз длинных трубчатых костей, ГКО – эпифизарно-метафизарная зона) и характерные морфологические особенности строения.

Заключение

Проведенные исследования показали, что ГКП костей у детей имеют сходные характеристики при морфологическом исследовании, в результате чего могут быть причиной диагностических ошибок. Все представители данной группы состоят из двух основных клеточных компонентов – клеток опухоли и гигантских многоядерных клеток в различных сочетаниях. Клетки

опухоли могут быть представлены мононуклеарами (ГКО, ХБ) или веретенновидными клетками (АКК, ЦГКГ, МФД/НОФ). В большинстве случаев в различных полях зрения можно обнаружить сочетание клеток с морфологией мононуклеаров и вытянутых веретенновидных клеток. Присутствие гигантских многоядерных клеток обуславливает основной литический потенциал данной группы опухолей и делает различные образования морфологически схожими или идентичными.

Интересным фактом является то что гигантские многоядерные клетки не являются субстратом опухоли в ГКП костей у детей. Их присутствие в ткани опухоли обусловлено продукцией определенных цитокинов клетками опухоли и привлечением циркулирующих моноцитов в патологический очаг с последующим формированием гигантских многоядерных клеток. Доказательством их «вторичности» в опухоли является то что ни мы, ни другие исследователи не обнаружили в них экспрессии гистоновых белков G34W (ГКО) и K36M (ХБ), перестройки гена USP6 (АКК), а также мутаций H3F3A (ГКО) и H3F3B (ХБ).

В процессе работы был использован комплексный междисциплинарный подход, что легло в основу дифференциальной диагностики ГКП костей у детей. Так например, было показано, что ГКО у детей встречается очень редко (3,09% среди всех ГКП и 0,6% среди всех опухолей костей у детей), только в старшей возрастной группе (13-18 лет), среди пациентов значительно преобладают девочки (соотношение 1:6), при этом никогда не локализуется в челюстях и костях черепа. При этом, на долю ГКО у взрослых приходится порядка 5% в структуре всех опухолей костей и 20% среди доброкачественных новообразований костей [Jury Brandolini, 2017, Chenglei Liu, 2016]. Напротив, ЦГКГ локализуется исключительно в челюстях и костях черепа и обнаруживается у детей в возрасте от 5 до 17 лет. Излюбленной локализацией для ХБ являются эпифизы длинных трубчатых костей, пик инцидентности отмечается в возрастной группе от 12 до 18 лет.

МФД/НОФ встречаются преимущественно в возрастной группе от 12 до 18 лет (60%) в метафизах длинных трубчатых костей.

ГКП костей у детей имеют много общего при инструментальных методах исследования (литический очаг). Однако существуют и отличительные особенности. Например, ГКО представлена эксцентричным литическим очагом в метафизарно-эпифизарной зоне с разрушением кортикального слоя, АКК хорошо ограниченное поражение в метафизарной зоне с наличием септированности, «вздуванием» кости, МФД/НОФ всегда располагается в кортикальном слое метафизов длинных трубчатых костей.

Несмотря на схожие гистологические характеристики ГКП при морфологическом исследовании существуют признаки, более характерные для той или иной опухоли. Так, при ГКО морфология ядер моноклеаров идентична таковой в гигантских многоядерных клетках, в ядрах клеток ХБ есть продольные бороздки и в трети случаев присутствуют элементы перицеллюлярного обызвествления (*chicken wire*), в АКК в трети случаев удается обнаружить структуры *blue bone*, в ЦГКГ гигантские многоядерные клетки располагаются кластерами в зонах кровоизлияний, в МФД/НОФ веретенноклеточный компонент строит шториформный паттерн и присутствуют кластеры ксантомных клеток и т.д.

Важным диагностическим инструментом для дифференциальной диагностики ГКП у детей послужило применение высокоспецифичных антител к G34W и K36M. В последних немногочисленных работах была показана их высокая диагностическая ценность и специфичность у взрослых при ГКО и ХБ [Fernanda Amargy, 2017; Julian Luke, 2017]. Ввиду того что чувствительность секвенирования по Сенгеру при обнаружении специфических мутаций для ГКО и ХБ не превышает 69% и 70% соответственно [Cleven АН, 2015], а доступность секвенирования в практической работе ограничена, данные антитела могут быть рекомендованы в практической работе патологоанатомов. Высокая диагностическая ценность иммуногистохимического исследования с

антителами к G34W и K36M заключается также в том, что позитивные реакции выявляются не только в зонах с «типичной» гистологической картиной ГКО или ХБ, а также в зонах вторичной АКК при данных опухолях. Данное обстоятельство может быть решающим в морфологической диагностике при малых объемах диагностического материала и в отсутствии в материале гистологических признаков, характерных для ГКО и ХБ.

В итоге, после комплексного анализа 194 случаев ГКП костей у детей (возраст, локализация поражения, данные лучевой диагностики, морфологическая картина опухоли), применения иммуногистохимического исследования с антителами к G34W и K36M, секвенирования по Сенгеру и FISH-исследования на предмет перестройки гена USP6, 15 диагнозов были изменены (7,73%). Наибольшее количество изменений диагнозов было в группе детей с ГКО (изначально документировано 19, подтверждено 6), что свидетельствует о редкости данной патологии у детей и сложностях ее морфологической диагностики.

Таким образом, дифференциальная диагностика ГКП костей у детей представляет большие сложности и возможна только с применением комплексного клинико-морфологического анализа (клиническая информация, данные рентгенологических методов исследования и МРТ, гистологическое и иммуногистохимическое исследование (G34W и K36M), секвенирование по Сенгеру и FISH-исследование на предмет перестройки гена USP6).

ВЫВОДЫ

1. Несмотря на общепринятые критерии дифференциальной диагностики ГКП у детей имеют много общего при гистологическом исследовании, что влечет за собой большое количество диагностических ошибок.
2. ГКО у детей встречается крайне редко (0,6% в структуре всех ГКП костей у детей по нашим данным), при этом только в возрастном интервале от 13 до 18 лет.

3. Морфологическим субстратом при ГКО, несмотря на формальное название нозологической единицы, являются мононуклеарные клетки круглой, овальной или вытянутой формы, с круглым или овальным ядром и мелким ядрышком. По морфологическим характеристикам ядра мононуклеарных клеток были сходными с ядрами гигантских многоядерных клеток. В половине случаев ГКО у детей обнаруживались участки веретеночлещного строения клеток опухоли. В 1 случае был диагностирован метастаз в легкие.
4. ЦГКГ у детей состоит из веретеночлещных клеток с вытянутыми ядрами. В большинстве случаев (77,27%) выявлялись депозиты гемосидерина (являются характерной, но не постоянной гистологической особенностью). Митотическая активность была низкой или достоверно не определялась во всех анализируемых случаях. В случаях херувизма морфологическим субстратом опухоли является ЦГКГ.
5. При морфологическом исследовании АКК следует обращать внимание на наличие кистозного компонента (92,21%), преобладание в септах веретеночлещных фибробластоподобных клеток и отсутствие признаков клеточной атипичности.
6. Основными морфологическими характеристиками ХБ являются цитологические характеристики клеток опухоли (овальные клетки, продольная бороздка в ядре), зоны перичеллюлярного обызвествления (chicken wire), хондрочидный межклеточный матрикс, низкая или умеренная митотическая активность.
7. МФД/НОФ при гистологическом исследовании состоит из вытянутых фибробластоподобных клеток без признаков атипичности, кластеров ксантомных клеток и депозитов гемосидерина. При синдроме Яффе-Кампаначи морфологическим субстратом поражения является НОФ.
8. В случае КО (гигантоклеточный вариант) выявляются признаки инвазивного роста и клеточной атипичности при морфологическом исследовании, высокая митотическая активность (более 10 митозов на

- 10 полей зрения при увеличении микроскопа x400), участки формирования патологического остеοидного межклеточного матрикса.
9. Гигантские многоядерные клетки при всех ГКП у детей не являются субстратом опухоли, не несут на себе экспрессии характерных гистоновых белков (G34W и K36M) и не содержат специфических мутаций, являясь таким образом всего лишь элементом «реактивного» клеточного микроокружения.
 10. В клетках вторичной аневризмальной костной кисты при ГКО и ХБ, экспрессируются гистоновые белки G34W и K36M. Данное обстоятельство может быть полезным в целях дифференциальной диагностики ГКП у детей при малом объеме биопсии в сложных диагностических случаях.
 11. Результаты секвенирования по Сенгеру показали корреляцию выявленных мутаций H3F3A и H3F3B с иммуногистохимически определяемой экспрессией соответствующих гистоновых белков G34W и K36M. Следовательно, данные антитела могут быть рекомендованы для рутинной диагностики ГКО и ХБ у детей в практической работе патологоанатомов.
 12. Метод секвенирования ДНК является основным для поиска мутаций при диагностике ГКП при различных синдромах у детей.
 13. Разработаны новые информативные критерии дифференциальной диагностики ГКП у детей на основе комплексного клинικο-морфологического подхода, особенностей морфологической картины, результатов иммуногистохимического исследования (G34W и K36M), секвенирования по Сенгеру и FISH-исследования (USP6).
 14. ГКП костей у детей должны дифференцироваться между собой только путем мультидисциплинарного подхода (клинические данные, лучевая диагностика, морфология, иммуногистохимия (G34W и K36M), при необходимости – секвенирование по Сенгеру и FISH).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Точность морфологического диагноза значительно возрастает при комплексном анализе информации (клинические данные, лучевая диагностика, морфология, иммуногистохимия (G34W и K36M), при необходимости – секвенирование по Сенгеру и FISH-исследование).
2. Так как гигантские многоядерные клетки при ГКП костей у детей являются элементом реактивного микроокружения, следует обращать внимание на морфологические характеристики и иммунофенотип клеток, составляющих субстрат опухоли (моноклеары, веретеновидные клетки).
3. В практической работе патологоанатомов применение антител к гистоновым белкам (G34W и K36M) может быть решающим в дифференциальной диагностике ГКО и ХБ с другими представителями ГКП, особенно, при малых объемах диагностического материала.
4. Разработанные критерии дифференциальной диагностики ГКП костей у детей могут быть легко применимы в практической работе не только патологоанатомов, но и ортопедов, хирургов, онкологов и рентгенологов.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Rogozhin D.V., Bolotin M.V., Kisliakov A.N., Ektova A.P., Konovalov D.M., Boulytcheva I.V. Juvenile ossifying fibroma, problems in differential diagnosis // 10th Asia Pacific Musculoskeletal Tumor Society (APMSTS) Meeting. Melbourne, Australia. – 9-11 Apr. 2014.
2. D. Rogozhin, I. Boulytcheva, N. Kushlinskiy, A. Talalaev, D. Konovalov, A. Ektova, V. Roshin, D. Abramov, A. Mitrofanova. Analysis of the bone tumors in children. Virchov Archiv // 26th European Congress of Pathology. London. – 2014. – P. S196.
3. D.V. Rogozhin, I.V. Boulytcheva, A. P. Ektova, M.V. Bolotin, D.M. Konovalov, A.G. Talalaev, V.Y. Roshin, A.V. Lopatin. Analysis of the skull bone tumors in children and adolescents // 27th Annual Meeting of the

European Musculo-Skeletal Oncology Society (E.M.S.O.S.). Vienna, Austria – 21-23 May 2014.

4. Рогожин Д.В., Булычева И.В. Ювенильная оссифицирующая фиброма у детей. Особенности дифференциальной диагностики. // Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи. – 2014. – №1. – С. 70-73 – УДК: 616.091.8.
5. Рогожин Д.В., Булычева И.В., Талалаев А.Г., Коновалов Д.М, Эктова А.П., Рощин В.Ю. Опухоли и опухолеподобные поражения костей у детей и подростков. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2014. – №8. – С. 66-70. – УДК 616-006.34.
6. Рогожин Д.В., Булычева И.В., Кушлинский Н.Е., Соловьев Ю.Н., Bertoni F., Vacchini P., Казакова А.Н. Семинар по костной патологии. Классическая остеосаркома. Новое или хорошо забытое старое? // Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи. – 2014. – №1. – С. 9-18. – УДК: 616-006.36.
7. Бабкина И.В., Тимофеев Ю.С., Тен Е.А., Рогожин Д.В., Соловьев Ю.Н., Руссо Е.Ю., Кадагидзе З.Г. Интерлейкин 16 в сыворотке крови больных с новообразованиями костей. // Молекулярная медицина. – 2014. – №4. – С. 40-43. – УДК 616.71-006.04-078.33.
8. Бабкина И.В., Тимофеев Ю.С., Кузнецов И.Н., Рогожин Д.В, Руссо Е.Ю, Кадагидзе З.Г., Соловьев Ю.Н. Интерлейкины в сыворотке крови больных новообразованиями костей. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2014. – №8. – С. 23-28. – УДК 616-006.34:616.15-078:577.12.08.
9. Rogozhin D.V., Konovalov D.M., Bolotin M.V., Lopatin A.V., Boulytcheva I.V., Roshin V.Yu., Talalaev A.G., Kugushev A.Yu. Fibrous Displasia of Craniofacial Area in Children and Adolescents // 28th Annual Meeting of the European Musculo-Skeletal Oncology Society. Athens, Greece. – 29 April - 1 May 2015.

10. Rogozhin D.V., Konovalov D.M., Bolotin M.V., Lopatin A.V., Boulytcheva I.V., Roshin V.Yu., Ektova A.P., Kuzin A.S., Talalaev A.G. The spectrum of bone Giant Cell Lesions in Children and Adolescents // 28th Annual Meeting of the European Musculo-Skeletal Oncology Society. Athens, Greece. – 29 April - 1 May 2015.
11. Rogozhin D.V., Konovalov D.M., Roshin V.Yu., Bolotin M.V., Lopatin A.V., Boulytcheva I.V., Talalaev A.G. Melanotic Neuroectodermal Tumour of Infancy, analysis of 5 cases // 28th Annual Meeting of the European Musculo-Skeletal Oncology Society. Athens, Greece. – 29 April - 1 May 2015.
12. Rogozhin D.V., Kugushev A.Yu., Konovalov D.M., Roshin V.Yu., Bolotin M.V., Lopatin A.V., Boulytcheva I.V., Talalaev A.G. A case of hemangioma of the frontal bone in a female teenager // 28th Annual Meeting of the European Musculo-Skeletal Oncology Society. Athens, Greece. – 29 April - 1 May 2015.
13. Rogozhin D.V., Konovalov D.M., Michael J. Klein, Abramov D.S. The case of primary histiocytic/dendritic cell tumour of vertebra in a teenager. // The International Skeletal Society Meeting. Grand Wailea – A Waldorf Astoria Resort Maui, Hawaii, USA. – 2015.
14. Рогожин Д.В., Булычева И.В., Кушлинский Н.Е., Коновалов Д.М., Талалаев А.Г., Рошин В.Ю., Эктова А.П., Кушнир Б.Л., Кузин А.С., Бологов А.А. Остеохондрома у детей и подростков. // Архив патологии. – 2015. – 77(3). – С. 37-40. – УДК 616.71-006.33-053.2. doi 10.17116/patol201577337-40.
15. Rogozhin D.V., Bertoni F., Vanel D., Gambarotti M., Righi A., Boulytcheva I.V., Konovalov D.M., Talalaev A.G., Roshin V.Y., Ektova A.P., Bolotin M.V., Lopatin A.V. Benign Fibro-Osseous Lesions of the Craniofacial Area in Children and Adolescents: A Review. // Архив патологии. – 2015. – 77(4). – С. 63-70.
16. Rogozhin DV, Konovalov DM, Vanel D, Campanacci L, Boulytcheva IV, Talalaev AG, Roshin VY, Ektova AP, Bogorodickiy YS, Skapenkov IN and

Strikov VA. Malignant solitary fibrous tumor of the sacrum: A case report. // J Cancer Res Ther. – 2015. – 3(4). – P. 52-55.

17. Рогожин Д.В., Коновалов Д.М., Козлов А.С., Талалаев А.Г., Эктова А.П. Неоссифицирующая фиброма (метафизарный фиброзный дефект). // Архив патологии. – 2016. – 78(2). – С. 36-40. – УДК 616.71-006.327.03-053.2-07-091.8. doi 10.17116/patol201678236-40.
18. Рогожин Д.В., Коновалов Д.М., Талалаев А.Г., Рощин В.Ю., Большаков Н.А., Тихонова М.В., Ремизов А.Н. Центральная остеосаркома с низким злокачественным потенциалом. Обзор литературы. // Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи. – 2016 – №3. – С. 16-21. – УДК 616.71-006-089.23
19. Рогожин Д.В., Коновалов Д.М., Большаков Н.А., Талалаев А.Г., Козлов А.С., Кузин А.С. Аневризмальная костная киста у детей и подростков. // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2017. – № 2. – Т.16. – С. 33-39. – Doi 10/24287/1726-1708-2017-0-0-0-0.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГКП – гигантоклелочные поражения
 ГКО – гигантоклелочная опухоль
 ЦГКГ – центральная гигантоклелочная гранулема
 АКК – аневризмальная костная киста
 ХБ – хондробластома
 МФД – метафизарный фиброзный дефект
 НОФ – неоссифицирующая фиброма
 КО – классическая остеосаркома