



Вестник

ВОЛГОГРАДСКОГО
ГОСУДАРСТВЕННОГО
МЕДИЦИНСКОГО
УНИВЕРСИТЕТА

ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Главный редактор

В. И. Петров, академик РАМН

Зам. главного редактора

М. Е. Стаценко, профессор

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

А. Р. Бабаева, профессор
А. Г. Бебуришвили, профессор
А. А. Воробьев, профессор
С. В. Дмитриенко, профессор
В. В. Жура, доцент
М. Ю. Капитонова, профессор
(научный редактор)
С. В. Клаучек, профессор
Н. И. Латышевская, профессор
В. Б. Мандриков, профессор
И. А. Петрова, профессор
В. И. Сабанов, профессор
Л. В. Ткаченко, профессор
С. В. Туркина (ответственный секретарь)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

А. Б. Зборовский, академик РАМН
(Волгоград)
Н. Н. Седова, профессор
(Волгоград)
А. А. Спасов, чл.-кор. РАМН
(Волгоград)
В. П. Туманов, профессор
(Москва)
Г. П. Котельников, академик РАМН
(Самара)
П. В. Глыбочко, чл.-кор. РАМН
(Москва)
В. А. Батулин, профессор
(Ставрополь)

3 (35)

**ИЮЛЬ–
СЕНТЯБРЬ
2010**

VOX
AUDITA LATET,
LITTERA SCRIPTA
MANET

**ИЗДАТЕЛЬСТВО
ВОЛГМУ**

ISSN 1994-9480



9 771994 948340 >

В ПОМОЩЬ ПРАКТИЧЕСКОМУ ВРАЧУ

УДК 616.379-008.64:616-076:006.05

К ВОПРОСУ СТАНДАРТИЗАЦИИ ПАТОГИСТОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ САХАРНОГО ДИАБЕТА

Г. Л. Снигур, А. В. Смирнов

Кафедра патологической анатомии ВолГМУ, Волгоградский медицинский научный центр

В статье дан краткий обзор патогистологических диагностических критериев биопсийного и аутопсийного материала поджелудочной железы и почек у лиц с сахарным диабетом. Представлено описание алгоритма проведения патогистологического исследования с использованием современных методов.

Ключевые слова: сахарный диабет, поджелудочная железа, почка, биопсия, аутопсия.

TO THE QUESTION OF STANDARDIZATION OF PATHOHISTOLOGICAL DIAGNOSTICS OF THE DIABETES MELLITUS

G. L. Snigur, A. V. Smirnov

A short review of pathohistological diagnostic criteria of biopsy and autopsy material of pancreas and kidneys from patients with diabetes mellitus is given. A description of pathohistological algorithm using modern pathoanatomical methods is presented.

Key words: diabetes mellitus, pancreas, kidney, biopsy, autopsy.

Отсутствие стандартизированного подхода к патогистологическому исследованию и интерпретации полученных данных является актуальной проблемой отечественной патологической анатомии. В настоящее время имеются лишь отдельные разработанные стандарты патогистологического исследования биопсийно-операционного и аутопсийного материала [7].

Являясь социально значимым заболеванием не только в России, но и в мире, сахарный диабет (СД) стоит на третьем месте по частоте среди причин смерти [1]. Как правило, аутопсийная диагностика СД интересна с точки зрения сопоставления клинического и патологоанатомического диагнозов, оценки качества лечения, в случаях кратковременного пребывания больного в стационаре. При проведении аутопсии патологоанатом руководствуется данными визуального осмотра (изменения размеров, консистенции, цвета и других параметров). Однако, определяя только макроскопические изменения, с уверенностью диагностировать сахарный диабет нельзя. Наиболее достоверным для установления патологоанатомического диагноза СД считается обнаружение микроскопических признаков заболевания и изменения данных лабораторных исследований периферической крови (содержание глюкозы, кетоновых тел, лактата и др.). Несмотря на большое значение гистологичес-

кого исследования для постановки диагноза СД, в отечественной патологической анатомии часто для выявления структурных изменений на практике используется лишь рутинная микроскопическая окраска — гематоксилином и эозином, с помощью которой невозможно адекватно дифференцировать типы эндокриноцитов островков Лангерганса или определять состав воспалительного инфильтрата.

Первоначально проводят макроскопическое исследование поджелудочной железы и определяют ее массу на предмет обнаружения атрофии. Вырезка аутопсийного или операционного материала ткани поджелудочной железы должна осуществляться с соблюдением правил маркировки материала с учетом анатомического разделения железы на головку, тело и хвост. Фиксация проводится в 4%-м растворе нейтрального забуференного формалина в течение 24—48 ч при комнатной температуре. Данный способ позволяет в дальнейшем использовать широкий спектр гистологических окрасок, в том числе проведение иммуногистохимического исследования. После фиксации изготавливают парафиновые блоки и срезы толщиной от 3 до 5 мкм (при необходимости математического анализа делают серийные срезы).

Для светоптической микроскопии используется рутинная окраска гематоксилином и эозином, с

помощью которой оценивается общий план строения железы, наличие или отсутствие воспаления, повреждения и репарации клеток панкреатических островков. Для оценки степени склерозирования возможно использование окрасок по методу ван Гизона или по Массону (предпочтительно). Незаслуженно забыт метод выявления секреторных гранул β -клеток с помощью красителя «Фенаф», основными преимуществами которого, по сравнению с иммуногистохимическими методами, являются простота и низкая стоимость реактивов [4].

Для выявления α -, β -клеток (островковой и внеостровковой локализации), определения состава клеточного инфильтрата при воспалении, выявления механизмов клеточной гибели, оценки индекса пролиферативной активности предшественников β -клеток и выявления других патологических процессов необходимо применение методов иммуногистохимического исследования. Данный вид исследования выполняется по стандартным протоколам в соответствии с инструкциями фирм-производителей реактивов. Оценка результатов иммуногистохимической реакции осуществляется по интенсивности окраски с использованием полуколичественной шкалы (негативная, слабая, умеренная, выраженная).

В сложных дифференциально-диагностических случаях необходимо проведение электронно-микроскопического исследования. Материал поджелудочной железы (фрагменты ткани размером не более 1 мм³) достаточно фиксировать в течение 12 ч в 4%-м растворе параформальдегида на 0,1M какодилатном буфере с последующей постфиксацией в течение 2 ч в 1%-м растворе тетраоксида осмия на 0,1M какодилатном буфере (pH = 7,4) при температуре +4 °C. После промывки в растворе какодилатного буфера материал необходимо дегидратировать в спиртах возрастающей концентрации и залить в смесь эпон и аралдита. Ультратонкие срезы толщиной 50—90 нм после контрастирования в 2,5%-м растворе уранилацетата на 50° этаноле в течение 40 мин и 0,3%-м растворе цитрата свинца в течение 20 мин можно изучать в электронном микроскопе.

Одним из важнейших методов, позволяющим на основе математической доказательной базы судить о количественных изменениях в эндокринном аппарате поджелудочной железы, является морфометрический анализ, проведение которого проводится по классическим методикам и может включать следующие показатели:

- площадь (объемная доля), занимаемая α - и β -клетками по отношению к панкреатическому островку;

- площадь (объемная доля) островков Лангерганса по отношению к ткани поджелудочной железы.

Гетерогенность пусковых механизмов СД значительно затрудняет выявление ранних структурных изменений в поджелудочной железе. Так для диабе-

та первого типа в первые годы наиболее характерными изменениями являются выраженное повреждение инсулярного аппарата островков Лангерганса в виде дегрануляции β -клеток, уменьшения количества островков и их коллапса за счет деструкции и прогрессирующей утраты β -эндокриноцитов, а также наличие воспалительной инфильтрации — «инсулиты». Однако изменения в островках Лангерганса могут представлять полиморфную картину: в некоторых островках воспалительная инфильтрация может отсутствовать, в других определяются нормальные или гипертрофированные β -клетки. Наравне с неизменными островками могут встречаться панкреатические островки с выраженной лимфо-макрофагальной инфильтрацией (как правило, при манифесте СД). Гетерогенность повреждения может быть обусловлена отсутствием начальной деструкции клеток в отдельных островках или отсутствием специфических реактивных Т-лимфоцитов, а также возможностью развития репаративной регенерации уже поврежденных β -клеток [5]. Наравне с дегенеративно-дистрофическими и воспалительными изменениями в части β -эндокриноцитов определяются выраженные регенераторные изменения — гипертрофия, гиперплазия. Спустя несколько лет от манифестации заболевания в поджелудочной железе отмечается практически полное отсутствие β -эндокриноцитов. Ацинарная ткань может сохранять свое нормальное гистологическое строение или сочетать признаки фиброза с выраженными атрофическими изменениями долек.

При диагностике СД первого типа для визуализации β -эндокриноцитов с последующим определением их количества и размерных характеристик в поджелудочной железе помимо иммуногистохимического исследования с антителами к инсулину рекомендуется использовать известную методику окраски красителем «Фенаф» [4]. В экспериментальных условиях продемонстрированы значимые обратные корреляционные связи между изменениями морфометрических параметров β -эндокриноцитов и тяжестью СД [3].

При СД второго типа поджелудочная железа может быть увеличена в размерах за счет меж- и внутريدолькового разрастания жировой (липоматоз) или соединительной ткани (склероз). Количество островков, содержание β -клеток в пределах возрастной нормы. В ряде случаев в панкреатических островках выявляются отложения амилина (очаговый амилоидоз). В стадию начальной инсулинорезистентности и компенсации в поджелудочной железе возникает гиперфункция β -клеток за счет их гипертрофии, что приводит к увеличению уровня инсулина и нормогликемии. Стадия выраженной инсулинорезистентности и относительной инсулиновой недостаточности характеризуется избыточным формированием у больных жировой ткани, в том числе и поджелудочной железы. В стадию клинической манифестации СД регенераторные возможности β -клеток истощаются, отме-

чается прогрессирующая дегрануляция и гибель β -эндокриноцитов, уменьшение размеров и количества панкреатических островков.

Для СД второго типа изменения эндокринного аппарата поджелудочной железы могут характеризоваться незначительными структурными изменениями, а в отдельных случаях выявляются только при изучении серийных срезов с помощью методов математического анализа и иммуногистохимии, что не всегда возможно при проведении рутинного патологоанатомического исследования.

Однако как при диабете первого так и второго типов структурные изменения затрагивают не только инсулярный аппарат, но определяются выраженные изменения в стенках сосудов — макро- и микроангиопатии [1, 2, 6, 9]. Как известно, к наиболее тяжелым проявлениям СД относятся распространенная диабетическая микро- и макроангиопатия, лежащие в основе кардиопатии, нейропатии, ретинопатии и нефропатии. Почти половина больных СД первого типа и около 35 % с СД второго типа умирают от хронической почечной недостаточности, обусловленной диабетической нефропатией. У пациентов, страдающих СД, в 17 раз чаще, чем в популяции, возникают заболевания почек, а уремия является причиной смерти в 80 % случаев [6, 8, 9]. Таким образом, у лиц с СД диабетическая нефропатия определяет прогноз заболевания.

Необходимость своевременной диагностики ранних стадий поражения почек с учетом тяжести и скорости прогрессирования СД представляется чрезвычайно важной, так как еще до возникновения клинических признаков нефропатии обнаруживается ряд функциональных и морфологических признаков поражения почек. В мировой практике широко используется метод пункционной биопсии почки не только для выявления диабетической нефропатии, но и для дифференциальной диагностики с другими заболеваниями почек у лиц с СД (болезнь минимальных изменений, постинфекционный и полунунный гломерулонефрит и др.) [8, 9].

Для адекватного выявления структурных изменений в почках необходимо строго соблюдать методы фиксации биопсийного материала в фиксирующих растворах. Наиболее адекватной является фиксация в нейтральном (рН = 7,0) забуференном растворе формалина в течение 3 ч при комнатной температуре или жидкости Боуэна (4—6 ч при комнатной температуре). Для электронной микроскопии используется фиксация в 3%-м глутаральдегиде на 0,2 М какодилатном буфере с дополнительной фиксацией тетроксидом осмия и изготавление полутонких срезов (1,0—1,5 мкм) с окрашиванием метиленовым (толудиновым) синим. Ультратонкие срезы (0,6—0,8 мкм) контрастируют уранил-ацетатом и цитратом свинца.

После фиксации и изготавления парафинового блока микропрепараты толщиной 3 мкм окрашивают-

ся следующими окрасками: гематоксилином и эозином, ШИК(PAS)-реакция, трихромом по Массону, конго-красным и импрегнация солями серебра по Джонсу. При проведении иммунофлюоресценции ткань окрашивают антисыворотками к IgG, IgA, IgM, C1q и C3с фракциям комплемента, альбумину, фибриногену, lambda и kappa легким цепям иммуноглобулинов, а также проводится электронная микроскопия.

При макроскопической оценке почек выраженные структурные изменения определяются только в терминальных стадиях хронической почечной недостаточности в виде симметричного уменьшения размеров, мелкозернистой деформации поверхности и выраженного уплотнения паренхимы. При микроскопии производят оценку изменений в клубочках, канальцах, сосудистой стенке и интерстиции. В отличие от ранних структурных изменений почек при СД поздние изменения хорошо известны как на светооптическом, так и на иммуноморфологическом и электронно-микроскопическом уровнях исследования. Выраженные структурные изменения определяются в гломерулярном аппарате и стенках артериальных сосудов. За счет ранней пролиферации мезангиальных клеток в области «рукоятки» клубочка и выработки ими мембраноподобного вещества с образованием гомогенных эозинофильных округлых образований (ШИК-положительных) формируется специфичный для СД узелковый гломерулосклероз (патогномоничный признак). Наравне с узелковым гломерулосклерозом могут выявляться диффузные и смешанные варианты диабетического гломерулосклероза. В капиллярных петлях клубочков может возникать гиалиноз не только приносящих, но и выносящих артериол (наряду с гиалинозом и склерозом более крупных артериальных сосудов). При декомпенсации СД возможно развитие экссудативных проявлений диабетической гломерулопатии в виде «фибриновых шапочек» (эозинофильные липидсодержащие образования в просвете капиллярных петель клубочков) и «капсульных капель» (гомогенные различных размеров массы, локализованные между гломерулярной базальной мембраной и эпителием капсулы клубочка). Выраженные изменения артериол клубочка характеризуются сочетанием склероза и гиалиноза. Узелковый гломерулосклероз и гиалиноз артериол клубочков (положительная ШИК-реакция) определяется у 100 % лиц с длительностью СД более 25 лет.

В эпителии канальцев выявляется белковая (вплоть до вакуольной) и жировая (при наличии нефротического синдрома) дистрофия. В проксимальных канальцах часто определяется гликогенная инфильтрация эпителия. Отмечается утолщение тубулярной базальной мембраны без признаков атрофии или с выраженной атрофией эпителия канальцев и диффузным фиброзом интерстиция. Однако изменения интерстициальной ткани почек при СД не носят специфического характера и могут служить в качестве

диагностических критериев только при учете изменений клубочкового аппарата.

При иммунофлюоресцентном исследовании обычно отмечается диффузная линейная экспрессия IgG вдоль гломерулярной базальной мембраны иногда с примесью IgM, IgA, фибриногена, альбумина.

Таким образом, при патологоанатомическом исследовании поджелудочной железы и почек у лиц с сахарным диабетом необходимо использование комплексной морфологической оценки, что позволит определять не только степень тяжести поражения тканей, но и клинически прогнозировать течение заболевания и его возможные осложнения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балаболкин М. И., Клебанова Е. М., Креминская В. М. Лечение сахарного диабета и его осложнений (руководство для врачей). — М.: Медицина, 2005. — 511 с.
2. Витворт Дж. А., Лоренс Дж. Р. Руководство по нефрологии: Пер. с англ. / Под ред. Дж. А. Витворт, Дж. Р. Лоренса — М.: Медицина, 2000. — 480 с.
3. Воронкова М. П. Противодиабетические свойства гимнемовых кислот: дис.... д-ра биол. наук. — Волгоград. — 2009. — 268 с.

4. Должиков А. А., Тверской А. В. // Человек и его здоровье. — 2006. — № 1. — С. 11—20.

5. Севергина Э. С. Инсулинозависимый сахарный диабет — взгляд морфолога. — М.: Видар-М, 2002. — 152 с.

6. Тареева И. Е. Нефрология: Руководство для врачей, 2-е изд., перераб. и доп. — М.: Медицина, 2000. — 688 с.

7. Хабриев Р. У., Пальцев М. А. Система добровольной сертификации процессов выполнения патоморфологических (патологоанатомических) исследований и патологоанатомических услуг: сборник нормативно-методических документов по вопросам патологоанатомических (патоморфологических) исследований. — М.: Медицина для всех, 2007. — Вып. I. — 480 с.

8. Fogo A. B., Cohen A. H., Charles J. J., et al. // Fundamentals of Renal Pathology. — 2006. — P. 221.

9. Charles J. J., Jean O. L., Melvin S. M., Fred S. G. // Hepinstall's Pathology of the Kidney, 6th Edition. — Lippincott Williams & Wilkins, 2007. — P. 1196.

Контактная информация:

Снигур Григорий Леонидович — к. м. н., доцент кафедры патологической анатомии ВолГМУ, e-mail: sgrigoryl@mail.ru

<i>Абриталин Е. Ю.</i> ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ «ТОНКОЙ» СТРУКТУРНОЙ НЕЙРОВИЗУАЛИЗАЦИИ В ДИАГНОСТИКЕ ДЕПРЕССИВНЫХ РАССТРОЙСТВ	89	<i>Abritalin E. Y.</i> THE VOXEL-BASED MORPHOMETRY AND DIFFUSION-TENSOR IMAGING METHODS IN DIAGNOSTICS OF DEPRESSIVE DISORDERS	89
<i>Каде А. Х., Дробот Е. В.</i> К ВОПРОСУ О ГЕМОДИНАМИКЕ ПОСТПРАНДИАЛЬНОГО ПЕРИОДА У БОЛЬНЫХ ЯЗВЕННОЙ БОЛЕЗНЬЮ	92	<i>Kade A. H., Drobot E. V.</i> TO THE QUESTION OF HEMODYNAMICS OF POSTPRANDIAL PERIOD IN PATIENTS WITH DUODENAL ULCER	92
<i>Шебашев А. В., Ежов И. Ю., Короткин А. А., Щетинин С. Б., Хлебородов Д. Г.</i> ОПЫТ РЕЭНДОПРОТЕЗИРОВАНИЯ ТАЗОБЕДРЕННОГО СУСТАВА	95	<i>Shebashev A. V., Ezhov I. Yu., Korytkin A. A., Shetinin S. B., Hleborodov D. G.</i> REVISION TOTAL HIP REPLACEMENT	95
<i>Бабанов С. А., Воробьева Е. В., Васюков П. А., Гайлис П. В.</i> ПРОФЕССИОНАЛЬНАЯ ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ В САМАРСКОЙ ОБЛАСТИ	98	<i>Babanov S. A., Vorobiova E. V., Vasiukov P. A., Gailis P. V.</i> OCCUPATIONAL MORBIDITY IN SAMARA REGION	98
<i>Святенко И. А., Белобородова Э. И., Святенко Л. А.</i> ОСОБЕННОСТИ УЛЬТРАЗВУКОВОЙ КАРТИНЫ ПАТОЛОГИИ ЖЕЛЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ДЛИТЕЛЬНОСТИ ОПИСТОРХОЗНОЙ ИНВАЗИИ	101	<i>Svyatenko I. A., Beloborodova E. I., Svyatenko L. A.</i> FEATURES OF ULTRASOUND CHARACTERISTICS OF PATHOLOGY OF BILE-EXCRETING TRACTS ACCORDING TO THE DURATION OF OPISTHORCHOSIS INVASION	101
<i>Бабаева Д. О.</i> НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ОПУХОЛЕВОГО КРОВОТОКА ПРИ СОЧЕТАНИИ ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ МАТКИ И ЯИЧНИКОВ	105	<i>Babaeva D. O.</i> SOME SPECIFIC FEATURES OF TUMOR BLOOD FLOW IN COMBINATION OF BENIGN UTERINE AND OVARIAN NEOPLASMS	105
<i>Бийболатова Д. Т.</i> ГЕМОДИНАМИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ В СОСУДАХ ФЕТОПЛАЦЕНТАРНОГО КОМПЛЕКСА У ЖЕНЩИН С РЕЗУС-ОТРИЦАТЕЛЬНОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТЬЮ КРОВИ И ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНОЙ АНЕМИЕЙ	108	<i>Bijbolatova D. T.</i> HEMODYNAMIC DISTURBANCE IN VESSELS OF FETOPLACENTAL COMPLEX IN WOMEN WITH RHESUS-NEGATIVE BLOOD AND IRON DEFICIENCY ANEMIA	108
В ПОМОЩЬ ПРАКТИЧЕСКОМУ ВРАЧУ		GUIDE FOR GENERAL PRACTITIONERS	
<i>Снигур Г. Л., Смирнов А. В.</i> К ВОПРОСУ СТАНДАРТИЗАЦИИ ПАТОГИСТОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ САХАРНОГО ДИАБЕТА	112	<i>Snigur G. L., Smirnov A. V.</i> TO THE QUESTION OF STANDARDIZATION OF PATHOHISTOLOGICAL DIAGNOSTICS OF THE DIABETES MELLITUS	112