

Г. Л. Снигур, А. В. Смирнов

Лаборатория морфологии и иммуногистохимии Волгоградского медицинского научного центра, кафедры патологической анатомии ВолГМУ

АЛГОРИТМ ПАТОГИСТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ЭНДОКРИННОГО АППАРАТА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

УДК 616.379-008.64-085.252.349

Разработанный алгоритм патологоанатомического исследования эндокринного аппарата поджелудочной железы позволяет выявить наиболее значимые морфологические критерии развития сахарного диабета и стандартизировать данные гистологического исследования при экспериментальном диабете у лабораторных животных.

Ключевые слова: сахарный диабет, поджелудочная железа, патогистология.

G. L. Snigur, A. V. Smirnov

ALGORITHM OF PATHOHISTOLOGICAL INVESTIGATION OF PANCREAS IN EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

Novel algorithm of pathohistological investigation of pancreas demonstrates the most significant morphological criteria of diabetes mellitus development and allows a standartisation of histological results in experimental diabetes mellitus.

Key words: diabetes mellitus, pancreas, pathohistology.

Несмотря на активное изучение сахарного диабета (СД) и разнообразие его экспериментальных моделей (аллоксановый, стрептозотоциновый, иммунозависимый и др.), до настоящего времени отсутствует единый подход к методам проведения гистологического исследования и интерпретации изменений, возникающих в поджелудочной железе лабораторных животных. Гетерогенность пусковых механизмов СД значительно затрудняет выявление ранних изменений в панкреатических островках. Для достоверного заключения о степени тяжести экспериментального СД необходимо проведение комплексного патогистологического исследования, включающего макроскопическое исследование, светооптическую микроскопию, иммуногистохимическое и электронно-микроскопическое исследование с последующей математической обработкой полученных результатов.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Разработать алгоритм морфологического исследования, основанный на выявлении наиболее значимых патогистологических изменений в островках Лангерганса поджелудочной железы.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

При макроскопической оценке для лучшей визуализации ткани поджелудочной железы необходимо проведение предварительной фиксации в течение 30 с в смеси формалина с уксусной кислотой [5, 4], затем фиксацию продолжают в 4%-м

растворе забуференного нейтрального 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 осуществляется вырезка материала с соблюдением анатомического разделения железы на головку, тело и хвост (у грызунов — кишечный, желудочный и селезеночный отделы) [2]. В дальнейшем с парафиновых блоков изготавливаются серийные срезы толщиной от 3 до 5 мкм.

Для светооптической микроскопии используется рутинная окраска гематоксилином и эозином [3], 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 его простота и низкая стоимость реактивов.

Для выявления α -, β -клеток (островковой и внеостровковой локализации), определения состава клеточного инфильтрата при воспалении, выявления механизмов клеточной гибели, оценки индекса пролиферативной активности предшествен-

ников β -клеток [6] 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).

Для проведения электронно-микроскопического исследования достаточно фиксировать фрагменты поджелудочной железы размером не более 1 мм^3 в течение 12 ч в 4%-м растворе параформина на 0,1M какодилатном буфере с последующей постфиксацией в течение 2 ч в 1%-м растворе тетраоксида осмия на 0,1M какодилатном буфере ($\text{pH} = 7,4$) при температуре $+4^\circ\text{C}$. После промывки в растворе какодилатного буфера материал необходимо дегидратировать в спиртах возрастающей концентрации и залить в смесь эпона и аралдита. Ультратонкие срезы толщиной 50—90 нм после контрастирования в 2,5%-м растворе уранилацетата на 50° -м этаноле в течение 40 мин и 0,3%-м растворе цитрата свинца в течение 20 мин можно изучать в электронном микроскопе.

Проведение морфометрического анализа проводится по классическим методикам [1] и включает следующие показатели:

- относительный и абсолютный размер α - и β -эндокриноцитов;
- относительный и абсолютный размер ядер α - и β -эндокриноцитов;
- площадь (объемная доля) занимаемая α - и β -клетками по отношению к панкреатическому островку;
- площадь (объемная доля) островков Лангерганса по отношению к ткани поджелудочной железы;

- индекс пролиферативной активности, индекс апоптоза (процент иммунопозитивных клеток на 100 исследуемых клеток);

- площадь (объемная доля), диаметр секторных гранул α -, β - и других эндокринных клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В многочисленных экспериментальных исследованиях, проведенных в ВМНЦ, полученные с помощью разработанного алгоритма данные о состоянии структуры эндокринного аппарата поджелудочной железы демонстрировали высокую степень корреляции с биохимическими показателями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, использование комплексной патогистологической оценки эндокринного аппарата поджелудочной железы в морфологических исследованиях по экспериментальному моделированию СД характеризуется высокой информативностью полученных данных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г. Г. Основы количественной патологической анатомии. — М.: Медицина. — 2002. — 240 с.
2. Захарова И. В. Строение поджелудочной железы крысы в норме и после воздействия гравитационных перегрузок (экспериментальное морфологическое исследование): автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб, 2006. — 22 с.
3. Коржевский Д. Э. Краткое изложение основ гистологической техники для врачей и лаборантов-гистологов. — СПб, 2005. — 48 с.
4. Снигур Г. Л., Самохина М. П. // Бюллетень Волгоградского научного центра РАМН и Администрации Волгоградской области. — 2006. — № 4. — С. 23—24.
5. Newell K. J., Sawka B. W., Rudrick B. F., Dirman D. K. // Arch Pathol Lab Med. — 2001. — № 125. — P. 642—645.
6. Trucco M. // J. Clin. Investigation. — 2005. — Vol. 115, № 1. — P. 5—12.