
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 светооптической 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 параформа на 0,1М какодилатном буфере с последующей постфиксацией в течение 2 ч в 1%-м растворе тетраоксида осмия на 0,1М какодилатном буфере (рН = 7,4) при температуре +4 °С. 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° 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 убыли 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 внутридолькового 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 железе. 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 полунлунный гломеруло-нефрит 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 изополнительной фиксацией тетроксидом осмия и изготовление 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 изготовления 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 C3c 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 (патогномичный 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