

нистого компонента и основного вещества в межклеточном матриксе, отмечается различная ориентация волокон.

После 61 года в **межсосудистой соединительной** ткани такого чёткого разделения на зоны не наблюдается. Для пожилого и старческого возраста характерно наличие крупных грубых коллагеновых тяжей при резком уменьшении процентного содержания эластических и ретикулярных волокон, вплоть до полного отсутствия последних в некоторых препаратах.

ВЫВОД

Описанные возрастные изменения в структурной организации межсосудистой соединительной ткани оказывают непосредственное влияние на формирование неблагоприятных условий для местного кровотока. С возрастом формируется не только ригидность сосудистой стенки, которая тесно связана со снижением количества эластина,

обеспечивающего сократительную способность ткани, но и ригидность соединительной ткани, расположенной между кровеносными сосудами, что не может не влиять на специфику гемодинамики в органе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. — М.: Медицина, 1990. — 384 с.
2. Атакулов Б.М., Ашуров А.А., Габченко А.Г. Морфологические изменения соединительной ткани в сосудах лёгких при пневмонии пенициллезной этиологии у детей до года // Морфология. — 2002. — №2-3. — С. 14.
3. Высоцкий Ю.А., Лепилов А.В., Деханд Е.П. Возрастные особенности организации соединительнотканного остова некоторых органов человека. — Красноярск, 2005. — С. 46.
4. Дусчанов Б.А., Рузметов У.А., Курызов А.К. Изменения лёгких при экспериментальном хроническом воспалении // Морфология. — 2004. — №4. — С. 44.
5. Елисеев В.Г. Основы гистологии и гистологической техники. — М.: Медицина, 1967. — 268 с.
6. Устюжанинова Н.В., Шишкин Г.С. Возрастные изменения межальвеолярных перегородок и их отношение к замедлению газообмена // Морфология. — 2002. — №1. — С. 84-88.

УДК 616.379-008.64: 617.586-089.873: 616.5-007.23-053.9: 616-073.582-074-076.3-079

T12

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЭПИДЕРМИСА АМПУТИРОВАННОЙ КОНЕЧНОСТИ БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

Галина Николаевна Горишунова¹, Родион Арсланович Дзамуков²,
Виктор Владимирович Валиуллин^{1*}

¹Казанский государственный медицинский университет,

²Республиканская клиническая больница, г. Казань

Реферат

Цель. Оценка морфологических изменений кожи в различных зонах ампутированной нижней конечности больных сахарным диабетом.

Методы. С помощью иммуногистохимического метода изучены образцы ткани кожи нижних конечностей 6 хирургических больных с синдромом диабетической стопы. Оценивали пролиферацию клеток эпидермиса, их устойчивость к апоптозу, а также степень дифференцировки с использованием антител к ядерному антигену пролиферирующих клеток, маркёру антиапоптотической активности Bcl-2, маркёру терминальной дифференцировки эпидермоцитов цитокератину I. Интенсивность окрашивания рассчитывали с помощью пакета ImageJ и выражали в виде «средней интенсивности серого пикселя» (интегральная величина, суммирующая яркость окраски по трём основным цветам — красному, зелёному, синему — на основании формулы $V=0,299R+0,587G+0,114B$, где V — средняя интенсивность среднего пикселя, R, G, B — соответственно яркость свечения красного, зелёного и синего пикселей изображения).

Результаты. У пациентов с синдромом диабетической стопы отмечены снижение пролиферативной активности клеток эпидермиса по мере приближения к поражённому гангреной участку конечности и ослабление устойчивости эпидермоцитов в тех же областях к апоптозу. В коже, взятой с области, поражённой гангреной (n=6), доля клеток, позитивных на ядерный антиген пролиферирующих клеток, составила 58,74±4,8%, в образцах кожи контрольной группы (n=6) — 77,41±3% (p < 0,005). При оценке экспрессии Bcl-2 клетками кожи, взятыми с поражённой гангреной области (n=6), средняя интенсивность серого пикселя достигала 57,74±4,3, что значительно ниже показателя образцов кожи людей, не страдающих сахарным диабетом (n=6) — 89,69±3,4 (p < 0,005). На основании изучения экспрессии цитокератинов было показано, что клетки супрабазальных слоёв эпидермиса менее дифференцированы по сравнению с теми же клетками эпидермиса кожи контрольной группы.

Вывод. В далеко зашедших случаях у больных сахарным диабетом суммарным эффектом становятся снижение количества пролиферирующих клеток эпидермиса, уменьшение их антиапоптотической активности и гибель кожи как органа.

Ключевые слова: сахарный диабет, регенерация кожи, пролиферация кератиноцитов, апоптоз, ангиопатия, иммуногистохимия, дифференцировка клеток.

EPIDERMIS OF AMPUTATED LIMBS IN PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS - IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY G.N. Gorshunova¹, R.A. Dзамukov², V.V. Valiullin¹. ¹Kazan State Medical University, Kazan, Russia. ²Republican Clinical Hospital, Kazan, Russia. **Aim.** To examine the skin morphological changes in different areas of the amputated lower limbs of patients with diabetes mellitus. **Methods.** Skin samples of lower limbs of 6 patients with diabetic foot syndrome were studied using immunohistochemistry methods. Proliferation of epidermal cells, their resistance to apoptosis, as well as the degree of cells differentiation (using antibodies to proliferating cell nuclear antigen, Bcl-2 anti-apoptotic activity marker, epidermal cells terminal differentiation marker cytokeratin 1) were assessed. The color intensity was assessed using ImageJ software and was displayed as «mean greyscale intensity» (an integral value summarizing color intensity of three basic colors – red, green and blue – by $V=0,299R+0,587G+0,114B$ formula, where V – mean intensity of a mean pixel, R, G, B – color intensity of red, green and blue pixels appropriately). **Results.** Patients with diabetic foot syndrome had reduced proliferative activity of epidermal cells as they approach the sphacelous area of the affected limb, together with decreased resistance to apoptosis in the same areas. The share of cells positive for proliferating cell nuclear antigen was $58.74\pm 4.8\%$ in skin samples from the area of necrosis (n=6) compared to $77.41\pm 3\%$ (p < 0.005) in skin samples of the healthy controls. The study of Bcl-2 marker expression by cells of the sphacelous area (n=6) revealed that mean greyscale intensity in patients with diabetic foot syndrome was 57.74 ± 4.3 , which was significantly lower compared to skin samples of the healthy controls (n=6, 89.69 ± 3.4 , p < 0.005). Based on the expression of cytokeratin, it was shown that suprabasal layers of the epidermis cells were less differentiated in case of diabetic foot syndrome compared to the same cells of the epidermis of the control group. **Conclusion.** In advanced stages of diabetes, the combined effect of the disease is reduced number of epidermis proliferating cells, the reduction of their anti-apoptotic activity and loss of skin as an organ.

Keywords: diabetes mellitus, skin regeneration, keratinocyte proliferation, apoptosis, angiopathy, immunohistochemistry, cell differentiation.

Лечение сахарного диабета (СД) – одна из социально значимых задач медицинской науки и здравоохранения в целом. Тяжёлые метаболические нарушения, лежащие в основе патогенеза СД, приводят к патологическим изменениям почти во всех органах и тканях организма, в том числе и в коже. Этиология кожных поражений при СД, безусловно, связана с нарушением углеводного обмена и накоплением соответствующих продуктов нарушенного метаболизма, что приводит к структурным изменениям в дерме и эпидермисе [5]. Осложнения этого грозного заболевания приводят к ранней инвалидизации и летальности, причём повсеместно отмечают тенденцию к росту количества больных с синдромом диабетической стопы (СДС), доля которых составляет в России 4–10% больных СД [1, 2, 4].

Визуальные границы повреждения тканей в области стопы при СД, как правило, не соответствуют истинному распространению патологического процесса, достаточно часто существует клинически скрытый участок некроза, поэтому неадекватный объём оперативного вмешательства часто не даёт ожидаемого результата. У больных с СДС часто обнаруживают реактивный отёк голени на поражённой конечности, захватывающий эпидермис и дерму. Отёк мягких тканей голени у таких больных приводит к региональному нарушению кровоснабжения, вызывает явления интоксикации и обуславливает риск прогрессирования воспалительного и некротического процессов, что приводит к необходимости повторных оперативных вмешательств. Следствием становятся высокие ампутации и значительная летальность [7].

Один из главных факторов в развитии ангиопатий при СД – гипергликемия. Накопление конечных продуктов гликозилирования в тканях сосудов, окислительный стресс, нарушение реологии крови (изменение вязкости, повышение проницаемости сосудистой стенки, нарушения гемодинамики и осмотического давления крови) приводят к разнообразным поражениям кожи [8].

В течение последних двух десятилетий накоплен большой клинический и научный опыт, позволивший с новых позиций осветить механизмы СДС и проводить патогенетически обоснованное лечение и профилактику этой патологии. Наиболее важный аспект, на который обращено внимание исследователей, – поражение микроциркуляторного русла кожи вследствие диабетической микроангиопатии [10]. Работ, посвящённых морфологическим изменениям кожи стопы при СД, сравнительно немного, в ряде других исследований изучали кожу живота, бедра, предплечья [12]. Вместе с тем при сравнении полученных данных оказывается, что при СД кожа различных областей претерпевает в целом сходные изменения, которые заключаются в повреждении базальной мембраны микроциркуляторного русла и гибели эндотелиальных клеток. При СДС избыточное давление может приводить к некрозу кожи в определённых участках (с гиперкератозом), однако эти изменения при всей тяжести поражения вызваны локальными причинами, и их следует отличать от диффузного поражения, вызванного хронической гипергликемией [9].

Хотя факт нарушения регуляции тонуса микрососудов при СД не вызывает сомнений, несмотря на многочисленные данные

о корреляции между морфологическими изменениями эпидермиса и дермы и нарушениями функций капилляров, способность микроангиопатии самостоятельно приводить к некрозу тканей стопы не доказана [13].

В связи с тем, что морфологическая структура кожи при СД может отражать аналогичные изменения различных свойств и в других нижележащих тканях, а также ввиду относительной простоты биопсии кожи, перспективно её использование в научных и клинических целях для выявления маркёров осложнений СД, угрожающих внутренним органам [9].

Фундаментальными процессами, определяющими постоянство структурно-функциональной организации ткани, являются клеточное обновление, дифференцировка и клеточная гибель [6]. В качестве индикатора, отражающего специфические особенности регуляторных систем в коже при изменении её регенераторной способности, можно использовать показатели экспрессии маркёра пролиферации — ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA — от англ. Proliferating Cell Nuclear Antigen) [3, 11].

Для оценки устойчивости клеток эпидермиса к апоптозу при нарушенной микроциркуляции кожи в условиях диабетической ангиопатии приемлемо иммуногистохимическое исследование экспрессии белка Bcl-2. Вероятность вступления в апоптоз клеток, экспрессирующих Bcl-2, минимальна. В то же время маркёр терминальной дифференцировки кератиноцитов цитокератин 1 позволяет судить о зрелости клеток: в эпидермисе экспрессия отсутствует в базальном слое, появляется в первых надбазальных слоях и увеличивается к гранулированному слою, что в свою очередь связано с созреванием кератиноцитов.

Установлено, что у людей выраженное снижение пролиферативной активности клеток базального слоя эпидермиса нормальной кожи происходит лишь после 80 лет. Это обусловлено существенным снижением регенераторных возможностей организма в этом возрасте.

Цель настоящего исследования — оценка морфологических изменений кожи в различных зонах ампутированной нижней конечности больных СД.

В настоящем исследовании была определена группа из 6 больных с СДС в возрасте от 62 до 83 лет. Все пациенты страдали СД 2-го типа, длительность заболевания варьи-



Рис. 1. Зоны забора материала.

ровала от 10 до 17 лет. Очаги поражения локализовались на дистальных участках нижних конечностей, в области голени.

Все пациенты консультированы сосудистым хирургом, проведена ультразвуковая доплерография сосудов нижних конечностей.

С добровольного согласия пациентов у них был произведён забор биоптатов кожи с ампутированных конечностей в ходе операции по поводу диабетической гангрены. Забор биоптатов производили с трёх зон: зоны ампутации, средней области между поражённой гангреной частью конечности и зоной операционного поля, с области гангрены (рис. 1).

Контрольную группу составили 6 человек (3 женщины и 3 мужчины) в возрасте от 60 до 80 лет, у которых фрагменты кожи были получены при хирургических операциях из аналогичных зон в травматологических отделениях.

Иммуногистохимические исследования образцов кожи осуществляли на парафиновых срезах по стандартной методике с применением проявляющей системы «Dako», Denmark, 3,3'-диаминобензидаина. Для иммунофенотипирования использовали иммуногистохимическую панель из поликлональных антител к Bcl-2 (Santa Cruz), PCNA (Santa Cruz), моноклональных антител к цитокератину 1 (Novocastra).

Исследование полученных препаратов кожи проводили с использованием светово-

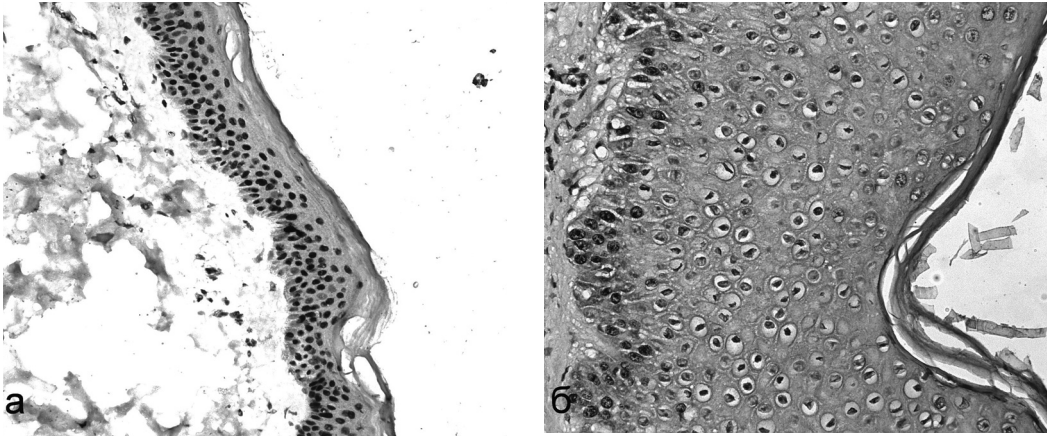


Рис. 2. Эпидермис. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к ядерному антигену пролиферирующих клеток (PCNA): а – контрольная группа; б – при сахарном диабете. Иммунопероксидазная реакция (ув. об. 20, ок. 10).

го микроскопа Leica DM1000. Все полученные результаты документировали, фотографируя цифровой камерой Leica DFC290.

Иммуногистохимические препараты оценивали по проценту окрашенных ядер, экспрессировавших PCNA на 300 клеток, при просмотре трёх полей зрения при увеличении объектива $\times 20$. Индекс пролиферации рассчитывали для всей толщи эпидермиса.

Изображения срезов кожи, окрашенных с антителами к Vcl-2, подвергали анализу с помощью программного модуля «Colour Deconvolution» графического пакета ImageJ по методике, описанной Ruifrok и Johnston [14]. Данный программный модуль позволяет на основании встроенных алгоритмов произвести субтракцию цветов и выделить окрашивание, обусловленное окрашиванием только 3,3'-диаминобензидином (без влияния гематоксилина). Интенсивность окрашивания 3,3'-диаминобензидином далее рассчитывали с помощью анализа пакетом ImageJ и выражали в виде «средней интенсивности серого пикселя» (интегральная величина, суммирующая яркость окраски по трём основным цветам – красному, зелёному и синему – на основании формулы $V=0,299R+0,587G+0,114B$, где V – средняя интенсивность среднего пикселя, R, G и B – соответственно яркость свечения красного, зелёного и синего пикселей изображения).

Обработку данных осуществляли с помощью программ Origin и Excel. Для статистической обработки полученных данных использовали параметрический t-критерий Стьюдента.

При иммуногистохимическом исследовании с использованием антител к PCNA

отмечено снижение уровня пролиферации клеток в эпидермисе кожи ампутированной конечности больных по сравнению с контролем (рис. 2). В образцах кожи контрольной группы иммунопозитивные клетки локализовались как в базальных, так и в супрабазальных слоях эпидермиса. В коже области гангрены иммунопозитивные клетки к маркёру пролиферации присутствовали преимущественно в базальных слоях эпидермиса.

В коже зоны операционного поля процентное содержание иммунопозитивных к PCNA клеток превышало показатели, полученные не только с области, поражённой гангреной, но и с кожи контрольной группы (рис. 3).

Антиапоптотическую способность в эпидермисе у больных обеих групп определяли по показателю «средней интенсивности серого пикселя» (рис. 4).

В образцах кожи, взятых с области зоны ампутации нижней конечности, средняя

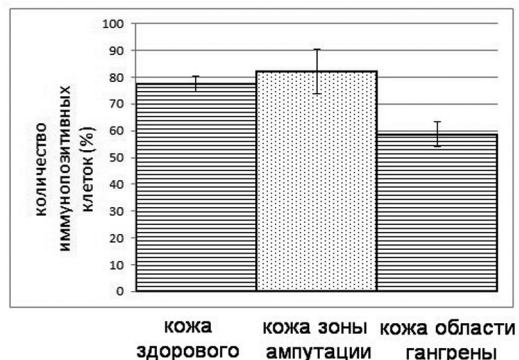


Рис. 3. Гистограмма распределения иммунопозитивных клеток в эпидермисе к ядерному антигену пролиферирующих клеток (PCNA).

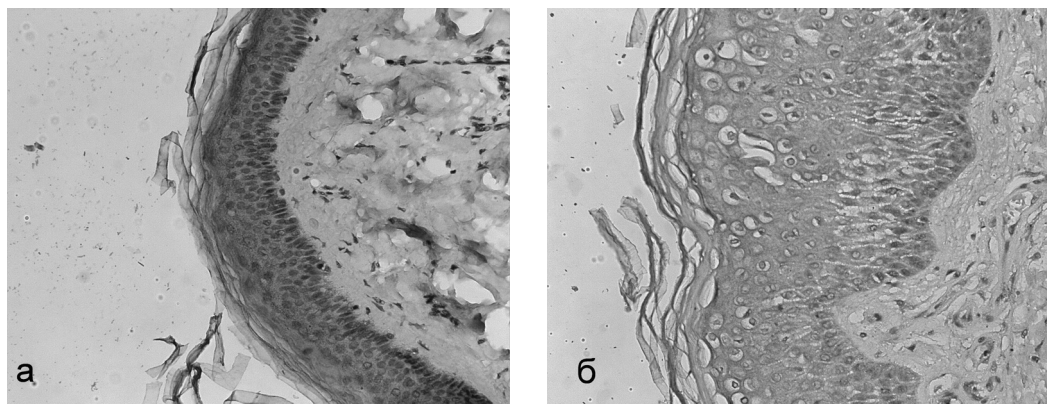


Рис. 4. Эпидермис. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к протеину Vcl-2 в кератиноцитах: а – здоровая кожа; б – кожа больного сахарным диабетом. Иммунопероксидазный метод (ув. об. 20, ок. 10).

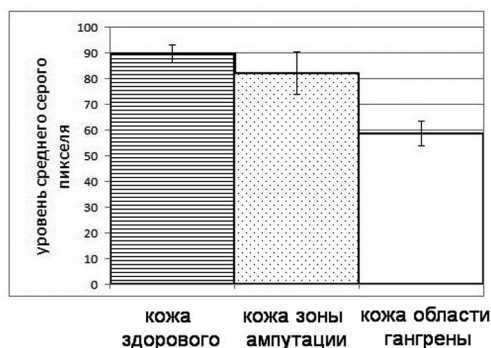


Рис. 5. Интенсивность иммуногистохимического окрашивания клеток эпидермиса антителами к маркеру Vcl-2.

интенсивность серого пикселя была ниже показателя, полученного с образцов ткани кожи контрольной группы. При этом в образцах кожи, забор которых производили с поражённой гангреной области, отмечено значительное снижение экспрессии белка Vcl-2 по сравнению с показателями кожи

как контрольной группы, так и зоны ампутации (рис. 5). Так, в образцах кожи, взятых с области зоны ампутации (n=6), средняя интенсивность серого пикселя достигала $83,76 \pm 6,5$, что незначительно ниже показателя в контрольной группе (n=6) – $89,69 \pm 3,4$, в то время как в поражённой гангреной области (n=6) средняя интенсивность серого пикселя составила $57,74 \pm 4,3$ ($p < 0,005$). Выявлено повышение уровня средней интенсивности серого пикселя до $98,36 \pm 8,8$ (n=6, $p < 0,005$) в зоне, занимающей среднюю область между поражённой гангреной частью конечности и зоной операционного поля. Анализ срезов кожи больных с СДС, окрашенных с антителами к Vcl-2, позволяет судить о снижении устойчивости к апоптозу тканей, подвергшихся деструктивным изменениям в условиях ангиопатии при СД.

Минимальная толщина эпидермиса пациентов с диабетической гангреной нижних конечностей в коже сформированной культи составила $54,4 \pm 8$ мкм (n=6, $p < 0,005$),

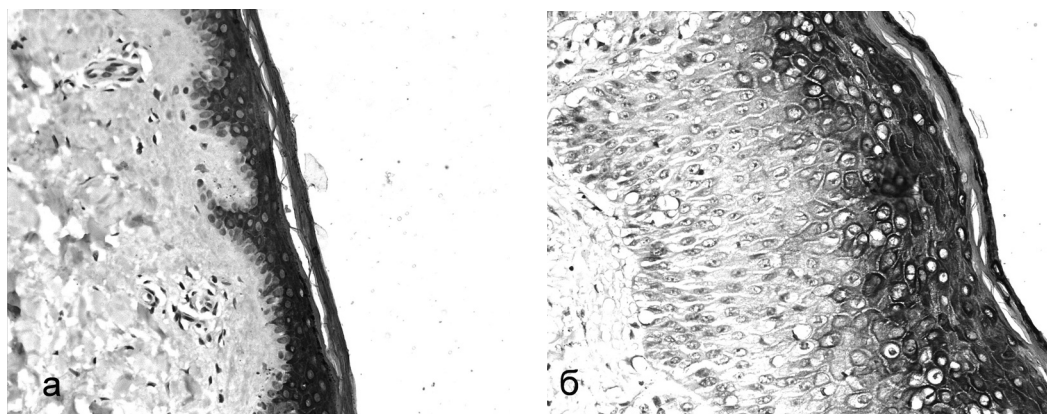


Рис. 6. Эпидермис. Иммуногистохимическое окрашивание к цитокератину I: а – контроль; б – при сахарном диабете. Иммунопероксидазная реакция (ув. об. 20, ок. 10).

максимальная — $148,2 \pm 13$ мкм ($n=6$, $p < 0,005$); минимальная толщина эпидермиса в образцах кожи, забор которых производили с поражённой гангреной области, составила $139,2 \pm 23$ мкм ($n=6$, $p < 0,005$), а максимальная — $157,3 \pm 18,6$ мкм ($n=6$, $p < 0,005$). Толщина эпидермиса людей, не страдающих СД, составила от 35 до 92 мкм.

Экспрессия маркера терминальной дифференцировки кератиноцитов в коже контрольной группы была выражена во всех супрабазальных слоях эпидермиса, а при СД зарегистрирована негативная иммуногистохимическая реакция не только в базальном слое кератиноцитов, но и в вышележащих слоях эпидермиса (рис. 6).

ВЫВОДЫ

1. Иммуногистохимическое изучение кожи ампутированной конечности больных сахарным диабетом показало, что в условиях ангиопатии у них происходит снижение пролиферативного потенциала эпидермиса, вследствие чего нарушается регенерация кожи. Так, в коже в зоне операционного поля процентное содержание иммунопозитивных на ядерный антиген пролиферирующих клеток составило $82,08 \pm 6,5\%$, в области гангрены — $58,74 \pm 4,8\%$ ($p < 0,005$), а в контрольной группе — $77,41 \pm 3\%$ ($p < 0,005$).

2. Тенденция к снижению экспрессии белка Vcl-2 кератиноцитами в коже ампутированной конечности может свидетельствовать о снижении устойчивости к апоптозу в эпидермисе в условиях диабетической ангиопатии.

3. Морфологический анализ кожи ампутированной конечности больных сахарным диабетом показал, что в условиях диабетической ангиопатии происходит утолщение эпидермиса. При этом кератиноциты супрабазальных слоёв имеют структурно-функциональные нарушения, о чём свидетельствует экспрессия цитокератина 1, что также вносит свой вклад в нарушение процессов регенерации.

4. Таким образом, на фоне сахарного диабета происходят снижение пролиферативной активности клеток эпидермиса, ослабление устойчивости клеток эпидермиса

к апоптозу, снижение степени дифференцировки клеток супрабазальных слоёв эпидермиса по сравнению с контрольной группой. Проведённое нами исследование позволяет заключить, что суммарным эффектом вышеописанных изменений стеновится гибель кожи как органа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бахарев И.В., Редькин Ю.А. Синдром диабетической стопы: диагностика, лечение, профилактика // Сахарн. диабет. — 2003. — №1. — С. 33-41.
2. Бегма А.Н., Бегма И.В., Дёмин Д.И. и др. Оптимизация лечения нейроишемической формы синдрома диабетической стопы // Здравоохран. Урала. — 2003. — №9. — <http://begma.ru/press.php?id=17> (дата обращения: 01.02.14).
3. Горишнуова Г.Н., Валиуллин В.В. Морфологические изменения кожи при диабетической ангиопатии // Ж. анатом. и гистопатол. — 2012. — №3. — С. 44-46.
4. Грекова Н.М., Бордуновский В.Н. Хирургия диабетической стопы. — М.: Медпрактика-М, 2009. — 188 с.
5. Лыкова С.Г., Немчинова О.Б. Поражения кожи при сахарном диабете (патогенез, патоморфология, клиника, терапия). — Новосибирск: Новосибирск. мед. ин-т, 1997. — 44 с.
6. Мяделец О.Д., Адаскевич В.П. Функциональная морфология и общая патология кожи. — Витебск: Изд-во Витебского мед. ин-та, 1997. — 271 с.
7. Светухин А.М., Земляной А.Б. Гнойно-некротические формы синдрома диабетической стопы // Consil. med. — 2002. — Т. 4, №10. — С. 537-544.
8. Севергина Э.С. Инсулинозависимый сахарный диабет — взгляд морфолога. — М.: Видар-М, 2002. — 152 с.
9. Удовиченко О.В., Токмакова А.Ю. Диабетическая микроангиопатия в генезе синдрома диабетической стопы // Сахарн. диабет. — 2001. — №2. — С. 14-18.
10. Anand P., Terenghi G., Warner G. et al. The role of endogenous nerve growth factor in human diabetic neuropathy // Nat. Med. — 1996. — Vol. 2, N 6. — P. 703-707.
11. Hall P.A., Levison D.A., Woods A.L. et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms // J. Pathol. — 1990. — Vol. 162. — P. 285-294.
12. Rayman G., Malik R.A., Sharma A.K., Day J.L. Microvascular response to tissue injury and capillary ultrastructure in the foot skin of type I diabetic patients // Clin. Sei. (Colch.). — 1995. — Vol. 89, N 5. — P. 467-474.
13. Shami S.K., Chittenden S.J. Microangiopathy in diabetes mellitus: II. Features, complications and investigation // Diabetes Res. — 1991. — Vol. 17, N 4. — P. 157-168.
14. Ruirok A.C., Johnston D.A. Quantification of histochemical staining by color deconvolution // Anal. Quant. Cytol. Histol. — 2001. — Vol. 23. — P. 291-299.