



© СС © Коллектив авторов, 2020
УДК 616.379-008.61-053.1-079.4
DOI: 10.24884/1607-4181-2020-27-3-41-49

А. А. Перминова*, Л. Б. Митрофанова, А. А. Сухоцкая, В. Г. Баиров

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ФОРМ ВРОЖДЕННОГО ГИПЕРИНСУЛИНИЗМА ДО ЭТАПА ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ЗАЛИТЫХ ПРЕПАРАТОВ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ДЕТЕЙ

Поступила в редакцию 14.05.2020 г.; принята к печати 06.11.2020 г.

Резюме

Введение. Дифференциальную диагностику между различными формами врожденного гиперинсулинизма (ВГ) требуется проводить на этапе срочного гистологического исследования, но на замороженных срезах различие между экзо- и эндокринной частями поджелудочной железы (ПЖ) визуализируется очень плохо.

Цель — поиск дифференциально-диагностических критериев очаговой и диффузной форм ВГ, пригодных для срочного гистологического исследования.

Методы и материалы. Операционный материал ПЖ от 25 детей с ВГ, из них 15 случаев очаговой формы (ОВГ) и 10 — диффузной (ДВГ), и аутопсийный материал от 10 детей без ВГ (К). Из ткани ПЖ были изготовлены замороженные и парафиновые срезы, окрашенные гематоксилин-эозином и гистохимическими окрасками. Было оценено число эндокриноцитов с крупными ядрами в 10 полях зрения для каждого случая.

Результаты. Средняя доля эндокриноцитов с крупными ядрами была статистически значимо ($p < 0,01$) больше по сравнению с контролем как при ОВГ (в зоне поражения), так и при ДВГ (ОВГ — $1,82 \pm 0,50$), ДВГ — $4,68 \pm 1,66$), К — $0,34 \pm 0,21$ %). Была выявлена тенденция к обнаружению большего абсолютного числа клеток с крупными ядрами при ОВГ ($4,95 \pm 1,24$) ОВГ и ($3,71 \pm 1,56$) ДВГ). Окрашивание азур-эозином, пикро Маллори и PAS-реакция давали непостоянный результат, а окраски толуидиновым синим и по Май — Грюнвальду не позволяли дифференцировать экзо- и эндокринные части ПЖ.

Заключение. Критерий увеличения в размерах ядер эндокриноцитов непригоден для дифференциальной диагностики форм ВГ, а гистохимические окраски не дают стабильно качественного результата. Для срочного биопсийного исследования необходимы скоростные иммуногистохимические методики.

Ключевые слова: формы врожденного гиперинсулинизма, срочное морфологическое исследование биопсий поджелудочной железы, гипертрофия ядер эндокриноцитов

Для цитирования: Перминова А. А., Митрофанова Л. Б., Сухоцкая А. А., Баиров В. Г. Клинико-морфологическая дифференциальная диагностика форм врожденного гиперинсулинизма до этапа иммуногистохимического исследования залитых препаратов поджелудочной железы у детей. *Ученые записки СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова.* 2020;27(3):41–49. DOI: 10.24884/1607-4181-2020-27-3-41-49.

* Автор для связи: Анастасия Аркадьевна Перминова, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, 197341, Россия, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2. E-mail: perminova_aa@almazovcentre.ru.

Anastasiia A. Perminova*, Lubov B. Mitrofanova, Anna A. Sukhotskaya, Vladimir G. Bairov

Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

CLINICAL AND MORPHOLOGICAL DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF CONGENITAL HYPERINSULINISM BEFORE THE STAGE OF IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF PARAFFIN-EMBEDDED SPECIMENS OF PANCREAS IN CHILDREN

Received 14.05.2020; accepted 06.11.2020

Summary

Introduction. Differential diagnosis of various forms of congenital hyperinsulinism (CH) is required at the stage of urgent histological examination, but the difference between the exo- and endocrine parts of the pancreas in frozen sections is visualized very poorly.

The objective was to search for differential diagnostic criteria of focal and diffuse forms of CH, suitable for urgent histological examination.

Methods and materials. Pancreatic surgery material from 25 children with CH, of which 15 cases of focal form (FCH) and 10 cases of diffuse (DCH), and autopsy material from 10 children without CH (K). Frozen and paraffin sections stained with hematoxylin-eosin and histochemical stains were made from the tissue of the pancreas. The number of endocrinocytes with large nuclei was estimated in 10 fields of view for each case.

Results. The average proportion of endocrinocytes with large nuclei was significantly ($p < 0.01$) higher compared to the control both with FCH (in the affected area) and DCH (FCH — 1.82 ± 0.50 %), DCH — 4.68 ± 1.66 %, K — 0.34 ± 0.21 %). We found a tendency to detect a higher absolute number of cells with large nuclei in DCH (4.95 ± 1.24) DCH and (3.71 ± 1.56) FCH). Staining with azure-eosin, picro Mallory and the PAS reaction gave unstable result, and staining with toluidine blue and May-Grunwald did not allow differentiating exo- and endocrine parts of the pancreas.

Conclusion. An increase in the size of the endocrinocyte nuclei was the unsuitable criterion for the differential diagnosis of CH forms, and histochemical stains did not give a stable qualitative result. For urgent biopsy examination, new immunohistochemical methods are needed.

Keywords: forms of congenital hyperinsulinism, urgent morphological examination of pancreatic biopsies, hypertrophy of endocrinocyte nuclei

For citation: Perminova A. A., Mitrofanova L. B., Sukhotskaya A. A., Bairov V. G. Clinical and morphological differential diagnosis of congenital hyperinsulinism before the stage of immunohistochemical study of paraffin-embedded specimens of pancreas in children. *The Scientific Notes of Pavlov University*. 2020;27(3):41–49. (In Russ.). DOI: 10.24884/1607-4181-2020-27-3-41-49.

* **Corresponding author:** Anastasiia A. Perminova, Almazov National Medical Research Centre, 2, Akkuratova str., Saint Petersburg, 197341, Russia. E-mail: perminova_aa@almazovcentre.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Врожденный гиперинсулинизм (ВГ) представляет собой гетерогенную группу расстройств, характеризующихся развитием персистирующей гипогликемии. Персистирующая гипогликемия, в свою очередь, вызывает необратимое повреждение коры головного мозга с последующей инвалидизацией таких больных [1]. ВГ является наиболее частой причиной персистирующей гипогликемии у детей грудного возраста, однако его следует отличать от гипогликемии, связанной с перинатальным стрессом, ятрогенными вмешательствами и генетическими синдромами, а также от инсулиномы [2]. Ранее ВГ называли незидиобластозом, персистирующей гиперинсулинемической гипогликемией младенцев и идиопатической спонтанно возникающей гипогликемией младенцев, но на сегодняшний день все эти термины признаны устаревшими [3].

ВГ является достаточно редкой патологией в европейской популяции: он обнаруживается у 1 из 40 000 – 50 000 живорожденных детей [4]. Вместе с тем в тех регионах, где распространены близкородственные браки, частота встречаемости может достигать 1:2500 [5].

Что касается этиологии, то на сегодняшний день обнаружено порядка 15 генов, мутации в которых могут приводить к ВГ [6]. Однако наиболее часто патогенные мутации возникают в генах *ABCC8* и *KCNJ11*, кодирующих компоненты АТФ-зависимого калиевого канала. Нарушение работы АТФ-зависимых калиевых каналов в β -клетках островков Лангерганса приводит к неконтролируемой инсулиновой секреции и развитию персистирующей гипогликемии.

Неоднородна не только этиология, но и патоморфология ВГ. В зависимости от объема поражения принято выделять три морфологические формы: очаговую, диффузную и атипичную [7, 8].

При очаговой форме поражается ограниченный участок поджелудочной железы (ПЖ), в котором развивается аденоматозная гиперплазия β -клеток, приводящая к слиянию островков Лангерганса. При этом, в отличие от инсулиномы, сохраняется дольчатая и островковая архитектоника с участием не- β -эндокриноцитов в пораженной области. Для диффузной формы характерна гиперплазия островков Лангерганса с появлением в них гипертрофированных и гиперхромных ядер эндокриноцитов, причем такие изменения наблюдаются во всей ткани ПЖ. Атипичная же форма отличается морфологическим мозаицизмом: может наблюдаться сосуществование нормальных и гиперплазированных островков Лангерганса, и, кроме того, может быть поражена только часть ПЖ, без развития в этой области характерной для очаговой формы аденоматозной гиперплазии [9]. Выявление того или иного морфологического варианта ВГ принципиально важно, поскольку разные его формы имеют разный потенциал к излечению: в частности, хирургическое лечение очаговой формы в 94 % случаев приводит к выздоровлению, в то время как для диффузной формы этот показатель составляет лишь 25 % [10].

Несмотря на то, что в большинстве случаев возможна диагностика различных форм ВГ методом позитронно-эмиссионной компьютерной томографии (ПЭТ-КТ) с ^{18}F -DOPA уже на предоперационном этапе [11], окончательно подтвердить тот или иной морфологический вариант возможно только при гистологическом исследовании. Но вследствие того, что объем хирургического вмешательства напрямую зависит от формы ВГ [10], дифференциальную диагностику между очаговой и остальными формами требуется проводить уже на этапе срочного гистологического исследования. Кроме того, во время хирургического вмешательства часто бывает затруднительным пальпаторно

определить точную локализацию пораженного участка ПЖ, что также делает обязательной интраоперационную гистологическую верификацию.

Однако срочное гистологическое исследование ткани ПЖ оказывается весьма затруднительным даже для опытных патологоанатомов, поскольку на замороженных срезах различие между экзокринной и эндокринной частями визуализируется крайне плохо. В связи с этим для диагностики диффузной формы ВГ некоторыми авторами [7, 12] было предложено выявлять увеличенные в 2–3 раза по сравнению с нормой ядра эндокриноцитов. Но, как показывает практика, этот признак далеко не всегда помогает в установлении правильного диагноза.

Цель исследования — поиск гистологических и гистохимических критериев для дифференциальной диагностики между очаговой и диффузной формами ВГ, которые могут быть использованы на этапе срочного гистологического исследования.

МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ

Материалом для исследования послужили фрагменты резецированной ПЖ от 25 детей с ВГ, среди которых у 15 была очаговая форма, а у 10 — диффузная. Средний возраст на момент операции детей с очаговой формой составил $(4,2 \pm 1,9)$ месяца (диапазон — от 2 до 8 месяцев), а у 8 детей с диффузной — $(1,6 \pm 0,7)$ месяца (диапазон — от 1 до 3 месяцев). При этом у оставшихся 2 детей с диффузной формой возраст был 2 года 9 месяцев и 4 года 10 месяцев. В качестве контроля был использован аутопсийный материал ПЖ от 10 детей возрастом от 1 до 10 месяцев (средний возраст — $(3,2 \pm 2,9)$ месяца), умерших от пороков сердечно-сосудистой системы.

Данные о результатах молекулярно-генетического исследования и ПЭТ-КТ были получены из историй болезни. Из нефиксированного операционного материала ПЖ от детей с ВГ на замораживающем микротоме были изготовлены серийные срезы, окрашенные по стандартной методике гематоксилином и эозином, а также толуидиновым синим, азур-эозином, пикро Маллори, реагентом Шиффа (PAS-реакция) и красителем Май — Грюнвальда. После фиксации в нейтральном 10 %-м забуференном растворе формалина из операционного и аутопсийного материала были изготовлены залитые препараты, окрашенные по стандартной методике гематоксилином и эозином.

Морфометрический анализ залитых препаратов включал в себя подсчет в островках Лангерганса клеток с увеличенными в 2–3 раза (по сравнению с окружающими эндокриноцитами) ядрами в 1 поле зрения при увеличении $\times 400$ с дальнейшим вычислением соотношения числа клеток с крупными ядрами к общему числу эндокриноцитов в этой же зоне. В каждом микропрепарате было оценено по 10 полей зрения, а в случае очаговой формы

ВГ — по 20 (по 10 полей зрения в зоне аденоматозных изменений и за их пределами). Подсчет клеток производили с помощью программы «ImageJ».

Статистический анализ проводили с помощью «Statistica v.10 software» (StatSoft, Россия). Значимость различий в количественных характеристиках интерпретировали с использованием t-критерия Стьюдента (для нормальных распределений) и с помощью критерия Манна — Уитни (в случае других типов распределения). Значимость различий в частоте встречаемости какого-либо признака оценивали с помощью χ^2 -критерия Пирсона. Различия между группами были определены как статистически значимые при $p < 0,01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анамнестические данные. По данным анамнеза, у 56 % детей с ВГ вес при рождении был более 4000 г. Для диффузной формы этот показатель составил 60 % (причем 2 из этих детей родились путем операции кесарева сечения на 34-й и 35-й неделях гестации), а для очаговой — 53,3 %. Исходя из данных литературы [13, 14], частота рождения детей с макросомией в популяции составляет лишь около 8,6–10,0 %. Таким образом, среди детей с ВГ доля тех, кто родился с массой тела более 4000 г, было статистически значимо больше, чем в популяции ($p < 0,01$). Однако различия между частотой встречаемости макросомии при очаговой и диффузной формах оказались статистически не значимыми.

Клинические проявления ВГ в виде гипогликемии, а в некоторых случаях и судорожного синдрома, наблюдались у всех 25 детей уже в течение 1-й недели жизни (у большинства — с рождения) вне зависимости от морфологической формы заболевания.

Для большинства пациентов были известны данные генетического исследования. В частности, у всех обследованных детей с очаговой формой ВГ ($n = 11$) был обнаружен гетерозиготный вариант мутации либо в гене *ABCC8* (9 случаев), либо в гене *KCNJ11* (1 случай). В 2 оставшихся случаях гетерозиготные мутации были обнаружены одновременно и в гене *ABCC8*, и в гене *KCNJ11*. Что касается диффузной формы ($n = 8$), то данные молекулярно-генетического исследования в ней не столь однородны. В частности, у 2 детей был обнаружен гомозиготный вариант мутации в гене *ABCC8*, у 1 ребенка — компаунд-гетерозиготность по двум мутациям в гене *ABCC8*, а еще у 1 пациента — гомозиготный вариант мутации в гене *KCNJ11*. Кроме того, у 1 обследованного была выявлена гетерозиготная мутация в гене *HNF4A*, а у еще 3 было исключено наличие каких-либо мутаций в генах *ABCC8* и *KCNJ11*. Таким образом, наличие гетерозиготной мутации в генах *ABCC8* и *KCNJ11*, кодирующих компоненты АТФ-зависимых калиевых

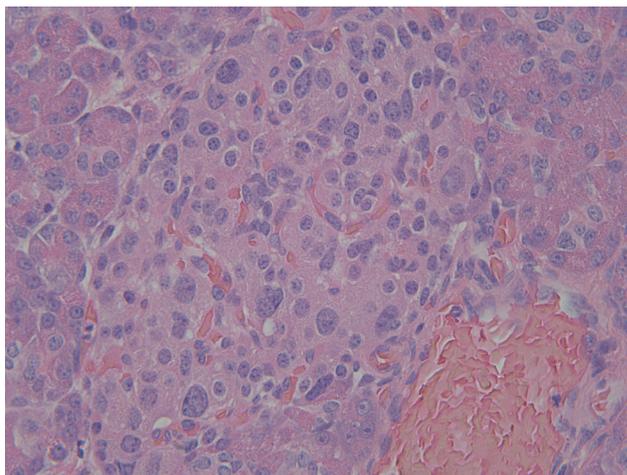


Рис. 1. Диффузная форма ВГ: островок Лангерганса с увеличенными в размерах ядрами эндокриноцитов. Окрашивание гематоксилин-эозином, залитой препарат, ув. $\times 400$

Fig. 1. Diffuse form of CH: a Langerhans islet with enlarged endocrinocyte nuclei. Hematoxylin-eosin staining, paraffin-embedded slide, $\times 400$

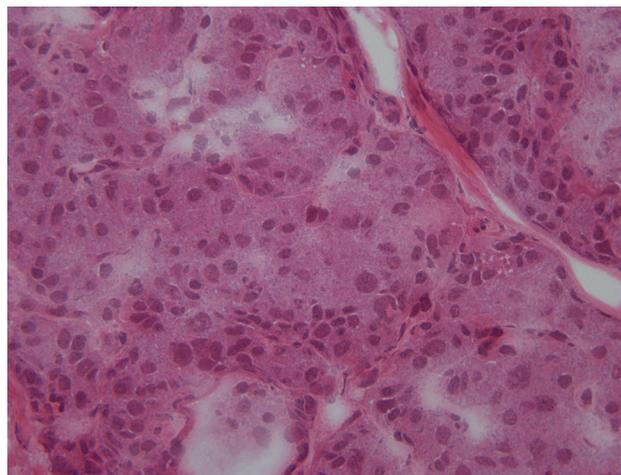


Рис. 2. Очаговая форма ВГ, зона аденоматозной гиперплазии с увеличенными в размерах ядрами эндокриноцитов. Окраска гематоксилином и эозином, замороженный срез, ув. $\times 400$

Fig. 2. Focal form of CH, adenomatous hyperplasia zone with enlarged endocrinocyte nuclei. Hematoxylin-eosin staining, frozen slide, $\times 400$

каналов, было характерно исключительно для очаговой формы ВГ. В то же время при диффузной форме, если и выявлялись мутации в генах *ABCC8* и *KCNJ11*, то они всегда захватывали оба аллеля: возникал либо гомозиготный вариант мутации, либо две разные мутации в каждом аллеле.

Перед проведением хирургической операции 24 из 25 пациентов была выполнена ПЭТ-КТ с ^{18}F -DOPA. Во всех случаях морфологическая форма ВГ и локализация пораженного участка были определены верно. Однако при проведении ПЭТ-КТ-исследования пациенту, у которого ранее была выявлена мутация в гене *HNF4A*, не удалось установить, какой характер носит поражение — очаговый или диффузный. У пациентов с очаговой формой пораженный участок наиболее часто локализовался в головке (у 9 пациентов), несколько реже — в теле и хвосте ПЖ (у 4 и 2 пациентов соответственно).

Морфометрический анализ. Увеличение в размерах ядер эндокриноцитов мы наблюдали как при диффузной, так и при очаговой форме ВГ (рис. 1–3). При диффузной форме доля клеток с крупными ядрами относительно общего числа эндокриноцитов в поле зрения составила $(4,49 \pm 1,67)\%$, в то время как в контроле — лишь $(0,44 \pm 0,24)\%$ (различие статистически значимо: $p < 0,01$).

Несколько иная картина была в случае очаговой формы: в пораженном участке было обнаружено $(1,82 \pm 0,50)\%$ клетки с увеличенными в размерах ядрами, а за его пределами — всего $(0,63 \pm 0,36)\%$. Таким образом, при очаговой форме в пораженной зоне ПЖ доля клеток с крупными ядрами была статистически значимо выше, чем в контроле или за пределами очага аденоматозной гиперплазии (в обоих случаях $p < 0,01$). В свою очередь, доля

таких клеток за пределами пораженного участка не отличалась от контроля. Однако необходимо заметить, что в приграничных к зоне поражения участках ПЖ эндокриноциты с увеличенными в размерах ядрами встречались несколько чаще, чем в остальной неизменной эндокринной ткани.

Кроме того, при сравнении доли эндокриноцитов с крупными ядрами в случае диффузной и очаговой форм ВГ оказалось, что при диффузной форме клетки с увеличенными в размерах ядрами встречаются статистически значимо чаще, чем в пораженной зоне при очаговой форме ($(4,49 \pm 1,67)\%$ против $(1,82 \pm 0,50)\%$, $p < 0,01$).

Что касается абсолютного числа эндокриноцитов с крупными ядрами в поле зрения (рис. 4), то, как и в случае подсчета относительных величин, нами наблюдалось статистически значимое ($p < 0,01$) по сравнению с контролем увеличение их числа как при диффузной, так и при очаговой (но только в участке аденоматозной гиперплазии) форме. В частности, были получены следующие данные: $(4,95 \pm 1,24)$ клетки с крупными ядрами в пораженном участке при очаговой форме, $(0,36 \pm 0,17)$ — за пределами зоны поражения, $(3,86 \pm 1,55)$ — при диффузной форме и $(0,34 \pm 0,19)$ — в контроле. В то же время абсолютное число клеток в поле зрения с увеличенными в размерах ядрами при различных формах ВГ не имело между собой достоверных различий. Более того, отмечалась тенденция к обнаружению большего числа увеличенных ядер в поле зрения в зоне аденоматозной гиперплазии (очаговая форма), чем в диффузно измененной ткани ПЖ. Этот факт, вероятно, объясняется тем, что в пораженном участке при очаговой форме практически все поле зрения было занято эндокринной тканью.

Гистохимическое исследование. Гистохимическое исследование нефиксированной ткани ПЖ проводили на материале 4 пациентов с очаговой формой, 1 пациента с диффузной, а также 1 аутопсийного исследования.

При проведении PAS-реакции (рис. 5) вне зависимости от наличия или отсутствия у пациента врожденного гиперинсулинизма в некоторых экзокриноцитах обнаруживались PAS-позитивные гранулы, полностью отсутствовавшие в эндокринной ткани. Однако эти гранулы выявлялись далеко не во всех ацинарных клетках. Число клеток с прокрашенными гранулами варьировало в широких пределах не только у разных пациентов, но и в разных полях зрения в одном и том же микропрепарате.

Похожая ситуация возникала и при окрашивании азур-эозином (рис. 6): в некоторых случаях светло-красные цитоплазматические гранулы присутствовали практически во всех экзокриноцитах, а в некоторых — практически не обнаруживались. В то же время цитоплазма эндокриноцитов, не содержащая зимогеновых гранул, всегда окрашивалась в равномерный бледно-розовый цвет.

Что касается окраски пикро Маллори (рис. 7), то окрашенная в ярко-синий цвет соединительная ткань позволяла несколько лучше различать островки Лангерганса и зону аденоматозной гиперплазии. Кроме того, в некоторых случаях цитоплазматические гранулы экзокриноцитов окрашивались в красный цвет, что создавало контраст между экзо- и эндокринной частями, поскольку цитоплазма эндокриноцитов всегда имела бледно-розовый оттенок.

Окрашивание толуидиновым синим (рис. 8) не позволяло дифференцировать экзо- и эндокринные части ПЖ ни в контроле, ни при ВГ. При окрашивании по Май — Грюнвальду (рис. 9) ситуация была аналогичной.

Описанная нами макросомия при рождении у детей с ВГ хорошо согласуется с имеющимися данными литературы [15]. В основе появления макросомии у таких детей лежит, вероятно, почти такой же патогенетический механизм, как и при диабетической фетопатии. При последней патологии в ответ на постоянную гипергликемию развивается гиперплазия островков Лангерганса, приводящая к гиперпродукции инсулина.

Хотя установлено, что дебют заболевания может наступать в течение 1-го года жизни [2, 16], у всех изученных нами пациентов клинические проявления ВГ наблюдались уже в первые дни после рождения вне зависимости от той или иной морфологической формы. Это несколько неожиданно, поскольку, если при очаговой форме поражена не вся железа, то, казалось бы, заболевание должно протекать легче, а значит, и дебютировать позже. Возможно, полученные нами данные связаны с тем, что в нашей выборке оказались только

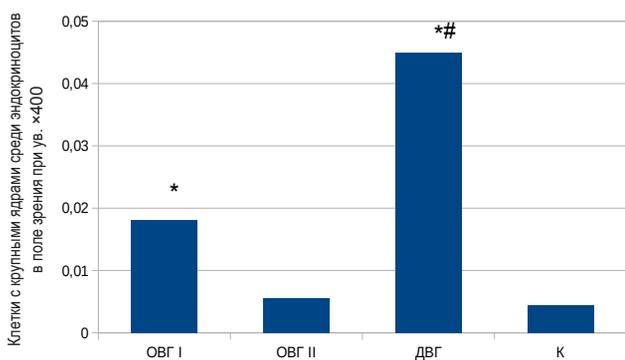


Рис. 3. Доля клеток с крупными ядрами среди эндокриноцитов ПЖ (в процентах). Данные представлены в виде (M±SD): * — разница по сравнению с контролем статистически значима при p<0,01; # — разница по сравнению с зоной аденоматозной гиперплазии (очаговая форма ВГ) статистически значима при p<0,01; ОВГ I — аденоматозный узел, ОВГ II — островки Лангерганса вне узла, ДВГ — диффузная форма врожденного гиперинсулинизма, К — контроль

Fig. 3. The percentage of cells with large nuclei among endocrinocytes of the pancreas (in percent). Data are presented as (M±SD): * — the difference compared with the control is statistically significant at p<0.01; # — the difference compared with the zone of adenomatous hyperplasia (focal form of CH) is statistically significant at p<0.01; FCH I — focal form of CH, adenomatous hyperplasia zone, FCH II — islets of Langerhans are outside the node, DCH — diffuse form of congenital hyperinsulinism, K — control

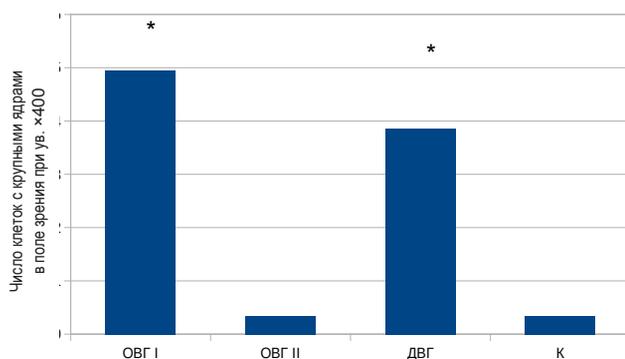


Рис. 4. Абсолютное число клеток с крупными ядрами в поле зрения при увеличении ×400. Данные представлены в виде (M±SD): * — разница по сравнению с контролем статистически значима при p<0,01

Fig. 4. The absolute number of cells with large nuclei in the field of view at the magnification of ×400. Data are presented as (M±SD): * — the difference compared with the control is statistically significant at p<0.01

больные с тяжело протекавшими формами ВГ, не поддававшимися медикаментозной терапии.

В литературных источниках [6] подробно описаны характерные морфологические формы только для различных мутаций в генах *ABCC8* и *KCNJ11*. В частности, к возникновению очаговой формы приводит гетерозиготный вариант рецессивной мутации в сочетании с последующей соматической потерей здорового аллеля в каком-либо участке ткани ПЖ. Диффузная форма, в свою очередь, обусловлена либо гомозиготными мутациями, либо доминантной одноаллельной мутацией. Эти исследования хорошо согласуются с полученными нами данными о том, что у всех

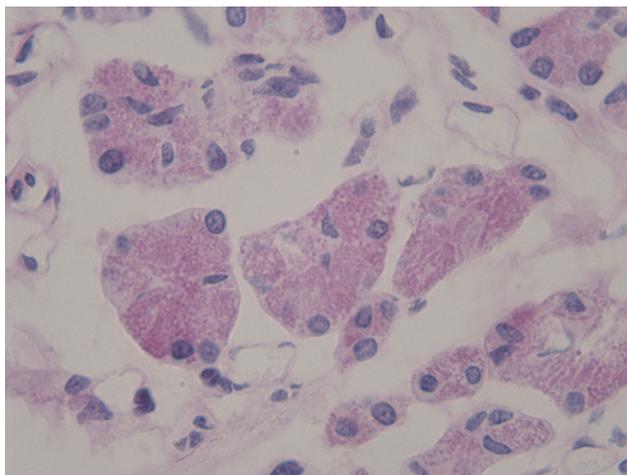


Рис. 5. Диффузная форма ВГ. PAS-позитивные гранулы в цитоплазме экзокриноцитов. ШИК-реакция, замороженный срез, ув. $\times 1000$

Fig. 5. The diffuse form of CH. PAS-positive granules in the cytoplasm of exocrinocytes. PAS reaction, frozen slide, $\times 1000$

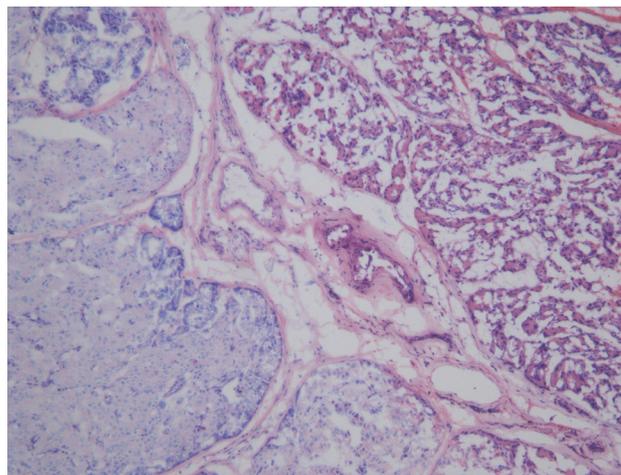


Рис. 6. Очаговая форма ВГ. Слева — узел аденоматозной гиперплазии, справа — экзокринная часть. Окрашенные зимогеновые гранулы придают более яркий красноватый цвет. Окраска азур-эозином, замороженный срез, ув. $\times 100$

Fig. 6. Focal form of CH. On the left side is the node of adenomatous hyperplasia, on the right — the exocrine part, to which the colored zymogen granules give a brighter reddish color. Azure-eosin staining, frozen slide, $\times 100$

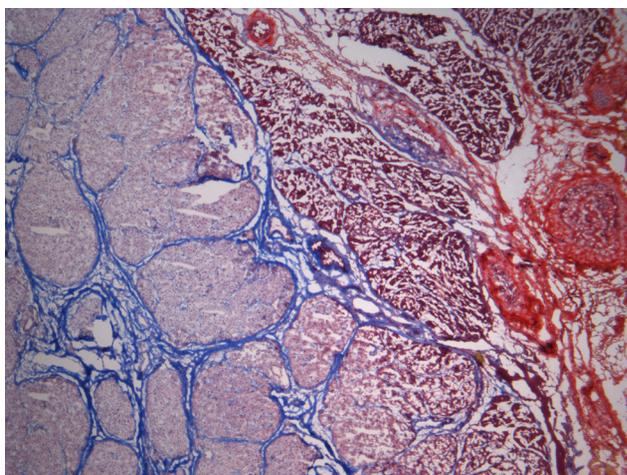


Рис. 7. Очаговая форма ВГ. Слева — узел аденоматозной гиперплазии, справа — экзокринная часть. Окрашенные зимогеновые гранулы придают более яркий красно-коричневый цвет экзокринной части. Синие стромальные тяжи контурируют границы узлов аденоматозной гиперплазии. Окрашивание пикро Маллори, замороженный срез, ув. $\times 40$

Fig. 7. Focal form of CH. On the left side is the node of adenomatous hyperplasia, on the right — the exocrine part, to which the colored zymogen granules give a brighter red-brown color. Blue-colored stromal cords contour the nodes of adenomatous hyperplasia. Picro Mallory staining, frozen slide, $\times 40$

обследованных нами больных с очаговой формой был выявлен гетерозиготный вариант мутации в генах *ABCC8* и *KCNJ11* (только в одном или сразу в обоих); в то время как у больных с диффузной формой мутации в этих генах захватывали сразу оба аллеля. Что касается других мутаций, приводящих к развитию ВГ, то их соответствие той или иной морфологической форме изучено мало. Вместе с тем, учитывая гетерогенность мутаций в описанной нами группе пациентов с диффузной формой, а также в некоторых случаях отсутствие

у них мутаций в генах *ABCC8* и *KCNJ11*, можно сделать вывод о том, что требуются дальнейшие исследования генотипа больных, страдающих диффузным вариантом ВГ.

На сегодняшний день метод ПЭТ-КТ успешно используется для предоперационной дифференциальной диагностики между различными формами ВГ, а также для определения локализации очага поражения при очаговой форме [11, 17]. Полученные нами данные еще раз подтвердили его точность при определении вышеназванных параметров. Но, несмотря на это, у хирургов во время операции все равно регулярно возникали трудности при поиске узла аденоматозной гиперплазии в ПЖ, что делало обязательным проведение срочного гистологического исследования. Кроме того, в связи с тем, что субтотальная панкреатэктомия при диффузной форме часто приводит к дальнейшей инвалидизации больных [18], крайне желательно, наряду с заключением ПЭТ-КТ, иметь и морфологическое подтверждение данной формы при срочном гистологическом исследовании, чтобы в случае необходимости скорректировать объем операции.

Но, как уже было сказано выше, срочное гистологическое исследование ПЖ сопряжено с большими трудностями. В отличие от некоторых авторов [2, 7, 12], считающих, что появление увеличенных в 2–3 раза ядер эндокриноцитов — надежный признак диффузной формы ВГ, полученные нами данные говорят об обратном. Эндокриноциты с крупными ядрами были выявлены как при диффузной, так и при очаговой формах ВГ. И хотя их число относительно окружающих эндокринных клеток было статистически значимо больше при диффузной форме, абсолютное число таких клеток

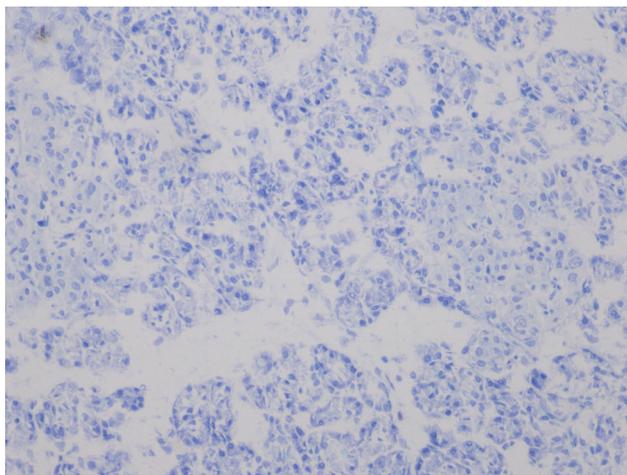


Рис. 8. Диффузная форма ВГ. Окрашивание толуидиновым синим, замороженный срез, ув. ×200
Fig. 8. The diffuse form of CH. Toluidine blue staining, frozen slide, ×200

в поле зрения было выше при очаговой форме из-за того, что практически все поле зрения было занято эндокринной тканью. А учитывая то, что на замороженных срезах экзо- и эндокринная части ПЖ различаются плохо, подсчет увеличенных ядер неизбежно будет производиться без учета количества эндокринной ткани в поле зрения, что, в конечном итоге, может привести к ошибочному диагнозу очаговой формы ВГ.

Для решения этой проблемы при приготовлении замороженных микропрепаратов вместо гематоксилина и эозина мы попытались использовать гистохимические красители, которые, согласно данным литературных источников [19 – 21], использовались в доиммуногистохимическую эру при работе с залитым в парафин материалом для различения экзо- и эндокринной частей ПЖ. Но как в те времена, так и в нашем случае все гистохимические окраски давали непостоянный результат, изменчивость которого могла еще более усугубляться использованием замороженных срезов. Таким образом, полученные результаты не позволяют на данный момент говорить о преимуществах гистохимии перед стандартным окрашиванием гематоксилином и эозином микропрепаратов для срочного гистологического исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день ВГ остается малоизученным заболеванием. Его этиология и патогенез требуют дальнейшего изучения для расширения возможностей диагностики и медикаментозной терапии. Гипертрофированные ядра эндокриноцитов не являются критерием выбора для дифференциального диагноза форм ВГ. Проанализированные гистохимические окраски также не объективизируют диагноз по срочной биопсии. Необходимы новые скоростные иммуногистохимические методики.

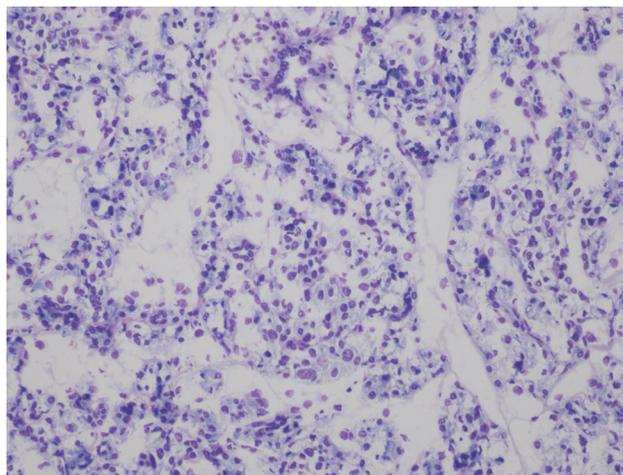


Рис. 9. Диффузная форма ВГ. Окрашивание по Май – Грюнвальду, замороженный срез, ув. ×200
Fig. 9. The diffuse form of CH. May – Grunwald staining, frozen slide, ×200

Благодарности

Коллектив авторов благодарит за приготовление гистохимических препаратов замороженных срезов поджелудочной железы, а также залитых гистологических препаратов лабораторного техника В. Г. Миренбург, ординаторов 2-го года обучения по специальности «Патологическая анатомия» Е. Г. Кошевую и М. Г. Оганесян.

Acknowledgments

The authors thanks a laboratory technician V. G. Mirenburg and 2nd year residents in pathology E. G. Koshevaya and M. G. Oganesyanyan for the making of histological and histochemical preparations.

Конфликт интересов

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest.

Соответствие нормам этики

Авторы подтверждают, что соблюдены права людей, принимавших участие в исследовании, включая получение информированного согласия в тех случаях, когда оно необходимо, и правила обращения с животными в случаях их использования в работе. Подробная информация содержится в Правилах для авторов. Исследование было одобрено Этическим комитетом НМИЦ им. В. А. Алмазова. Протокол № 10-19 от 14.10.2019.

Compliance with ethical principles

The authors confirm that they respect the rights of the people participated in the study, including obtaining informed consent when it is necessary, and the rules of treatment of animals when they are used in the study. Author Guidelines contains the detailed information. The study was approved by the Ethics Committee of Almazov National Medical Research Centre. Protocol № 10-19 of 14.10.19.

ЛИТЕРАТУРА

1. Menni F, de Lonlay P, Sevin C. et al. Neurologic outcomes of 90 neonates and infants with persistent hyperinsulinemic hypoglycemia // *Pediatrics*. – 2001. – Vol. 107. – P. 476–479. Doi: 10.1542/peds.107.3.476.

2. Lord K., De León D. D. Hyperinsulinism in the Neonate // *Clinics in Perinatology*. – 2018. – Vol. 45, № 1. – P. 61–74. Doi: 10.1016/j.clp.2017.10.007.
3. Stanley C. A. Advances in diagnosis and treatment of hyperinsulinism in infants and children // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2002. – Vol. 87. – P. 4857–4859. Doi: 10.1210/jc.2002-021403.
4. Otonkoski T., Ammala C., Huopio H. et al. A point mutation inactivating the sulfonylurea receptor causes the severe form of persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy in Finland // *Diabetes*. – 1999. – Vol. 48, № 2. – P. 408–415. Doi: 10.2337/diabetes.48.2.408.
5. Mathew P. M., Young J. M., Abu-Osba Y. K. et al. Persistent neonatal hyperinsulinism // *Clinical Pediatrics (Phila)*. – 1988. – Vol. 27, № 3. – P. 148–151. Doi: 10.1177/000992288802700307.
6. Galcheva S., Demirbilek H., Al-Khawaga S. et al. The genetic and molecular mechanisms of congenital hyperinsulinism // *Front. Endocrinol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 111. Doi: 10.3389/fendo.2019.00111.
7. Sempoux Ch., Guiot Y., Jaubert F. et al. Focal and diffuse forms of congenital hyperinsulinism: the keys for differential diagnosis // *Endocrine Pathology*. – 2004. – Vol. 15, № 3. – P. 241–246. Doi: 10.1385/ep:15:3:241.
8. Han B., Mohamed Z., Estebanez M. S. et al. Atypical forms of congenital hyperinsulinism in infancy are associated with mosaic patterns of immature islet cells // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2017. – Vol. 102, № 9. – P. 3261–3267. Doi: 10.1210/jc.2017-00158.
9. Houghton J., Banerjee I., Shaikh G. et al. Unravelling the genetic causes of mosaic islet morphology in congenital hyperinsulinism // *J. Pathol. Clin. Res.* – 2020. – Vol. 6, № 1. – P. 12–16. Doi: 10.1002/cjp2.144.
10. Lord K., Dzata E., Snider K. E. et al. Clinical presentation and management of children with diffuse and focal hyperinsulinism: a review of 223 cases // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2013. – Vol. 98, № 11. – P. E1786–1789. Doi: 10.1210/jc.2013-2094.
11. Ni J., Ge J., Zhang M. et al. Genotype and phenotype analysis of a cohort of patients with congenital hyperinsulinism based on DOPA-PET CT scanning // *European Journal of Pediatrics*. – 2019. – Vol. 178. – P. 1161–1169. Doi: 10.1007/s00431-019-03408-6.
12. Han B., Newbould M., Batra G. et al. Enhanced islet cell nucleomegaly defines diffuse congenital hyperinsulinism in infancy but not other forms of the disease // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2016. – Vol. 145. – P. 757–768. Doi: 10.1093/ajcp/aqw075.
13. Usta A., Usta C. S., Yildiz A. et al. Frequency of fetal macrosomia and the associated risk factors in pregnancies without gestational diabetes mellitus // *Pan. Afr. Med. J.* – 2017. – Vol. 26. – P. 62. Doi: 10.11604/pamj.2017.26.62.11440.
14. Júnior A. E., Peixoto A. B., Zamarian A. C. et al. Macrosomia // *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* – 2017. – Vol. 38. – P. 83–96. Doi: 10.1016/j.bpobgyn.2016.08.003.
15. Ping F., Wang Z., Xiao X. Clinical and enzymatic phenotypes in congenital hyperinsulinemic hypoglycemia due to glucokinase-activating mutations: a report of two cases and a brief overview of the literature // *J. Diabetes Investig.* – 2019. – Vol. 10, № 6. – P. 1454–1462. Doi: 10.1111/jdi.13072.
16. Rosenfeld E., Ganguly A., De Leon D. D. Congenital hyperinsulinism disorders: genetic and clinical characteristics // *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* – 2019. – Vol. 181, № 4. – P. 682–692. Doi: 10.1002/ajmg.c.31737.
17. Christiansen C. D., Petersen H., Nielsen A. L. et al. 18F-DO-PA PET/CT and 68Ga-DOTANOC PET/CT scans as diagnostic tools in focal congenital hyperinsulinism: a blinded evaluation // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. – 2018. – Vol. 45, № 2. – P. 250–261. Doi: 10.1007/s00259-017-3867-1.
18. Lord K., Radcliffe J., Gallagher P. R. et al. High risk of diabetes and neurobehavioral deficits in individuals with surgically treated hyperinsulinism // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2015. – Vol. 100, № 11. – P. 4133–4139. Doi: 10.1210/jc.2015-2539.
19. Bensley R. R. Studies on the pancreas of the Guinea pig // *Am. J. Anat.* – 1911. – Vol. 12, № 3. – P. 308–311.
20. Bowie D. J. Cytological studies of the islets of Langerhans in a teleost, *Neomaenid griseus* // *Anat. Rec.* – 1924. – Vol. 29, № 1. – P. 57–73.
21. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. – М.: МИР, 1969. – С. 274–279.

REFERENCES

1. Menni F., de Lonlay P., Sevin C. et al. Neurologic outcomes of 90 neonates and infants with persistent hyperinsulinemic hypoglycemia. *Pediatrics*. 2001;107:476–479. Doi: 10.1542/peds.107.3.476.
2. Lord K., De León D. D. Hyperinsulinism in the Neonate. *Clinics in Perinatology*. 2018;45(1):61–74. Doi: 10.1016/j.clp.2017.10.007.
3. Stanley C. A. Advances in diagnosis and treatment of hyperinsulinism in infants and children. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:4857–4859. Doi: 10.1210/jc.2002-021403.
4. Otonkoski T., Ammala C., Huopio H. et al. A point mutation inactivating the sulfonylurea receptor causes the severe form of persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy in Finland. *Diabetes*. 1999;48(2):408–415. Doi: 10.2337/diabetes.48.2.408.
5. Mathew P. M., Young J. M., Abu-Osba Y. K. et al. Persistent neonatal hyperinsulinism. *Clinical Pediatrics (Phila)*. 1988; 27(3):148–151. Doi: 10.1177/000992288802700307.
6. Galcheva S., Demirbilek H., Al-Khawaga S. et al. The genetic and molecular mechanisms of congenital hyperinsulinism. *Front Endocrinol*. 2019;10:111. Doi: 10.3389/fendo.2019.00111.
7. Sempoux Ch., Guiot Y., Jaubert F. et al. Focal and diffuse forms of congenital hyperinsulinism: the keys for differential diagnosis. *Endocrine Pathology*. 2004;15(3):241–246. Doi: 10.1385/ep:15:3:241.
8. Han B., Mohamed Z., Estebanez M. S. et al. Atypical forms of congenital hyperinsulinism in infancy are associated with mosaic patterns of immature islet cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017; 102(9):3261–3267. Doi: 10.1210/jc.2017-00158.
9. Houghton J., Banerjee I., Shaikh G. et al. Unravelling the genetic causes of mosaic islet morphology in congenital hyperinsulinism. *J Pathol Clin Res*. 2020;6(1):12–16. Doi: 10.1002/cjp2.144.
10. Lord K., Dzata E., Snider K. E. et al. Clinical presentation and management of children with diffuse and focal hyperinsulinism: a review of 223 cases. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013; 98(11):E1786–1789. Doi: 10.1210/jc.2013-2094.
11. Ni J., Ge J., Zhang M. et al. Genotype and phenotype analysis of a cohort of patients with congenital hyperinsulinism based on DOPA-PET CT scanning. *European Journal of Pediatrics*. 2019; 178:1161–1169. Doi: 10.1007/s00431-019-03408-6.
12. Han B., Newbould M., Batra G. et al. Enhanced islet cell nucleomegaly defines diffuse congenital hyperinsulinism in infancy but not other forms of the disease. *Am J Clin Pathol*. 2016;145:757–768. Doi: 10.1093/ajcp/aqw075.
13. Usta A., Usta C. S., Yildiz A. et al. Frequency of fetal macrosomia and the associated risk factors in pregnancies without gestational diabetes mellitus. *Pan Afr Med J*. 2017;26:62. Doi: 10.11604/pamj.2017.26.62.11440.
14. Júnior A. E., Peixoto A. B., Zamarian A. C. et al. Macrosomia. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2017;38:83–96. Doi: 10.1016/j.bpobgyn.2016.08.003.
15. Ping F., Wang Z., Xiao X. Clinical and enzymatic phenotypes in congenital hyperinsulinemic hypoglycemia due to glucokinase-activating mutations: a report of two cases and a brief overview of the literature. *J Diabetes Investig*. 2019;10(6):1454–1462. Doi: 10.1111/jdi.13072.
16. Rosenfeld E., Ganguly A., De Leon D. D. Congenital hyperinsulinism disorders: genetic and clinical characteristics. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2019;181(4):682–692. Doi: 10.1002/ajmg.c.31737.
17. Christiansen C. D., Petersen H., Nielsen A. L. et al. 18F-DO-PA PET/CT and 68Ga-DOTANOC PET/CT scans as diagnostic tools in focal congenital hyperinsulinism: a blinded evaluation.

Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2018;45(2):250–261. Doi: 10.1007/s00259-017-3867-1.

18. Lord K., Radcliffe J., Gallagher P. R. et al. High risk of diabetes and neurobehavioral deficits in individuals with surgically treated hyperinsulinism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(11):4133–4139. Doi: 10.1210/jc.2015-2539.

19. Bensley R. R. Studies on the pancreas of the Guinea pig. *Am J Anat.* 1911;12(3): 308–311.

20. Bowie D. J. Cytological studies of the islets of Langerhans in a teleost, *Neomaenis griseus*. *Anat Rec.* 1924;29(1):57–73.

21. Lillie R. D. Histopathologic technic and practical histochemistry. Moscow, MIR, 1969:274–279. (In Russ.).

Информация об авторах

Перминова Анастасия Аркадьевна, врач-патологоанатом, очный аспирант 1-го года обучения Института медицинского образования, Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова (Санкт-Петербург, Россия), ORCID: 0000-0002-1946-0029; **Митрофанова Любовь Борисовна**, доктор медицинских наук, профессор кафедры патологии Института медицинского образования, главный научный сотрудник НИЛ патоморфологии, Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова (Санкт-Петербург, Россия), ORCID: 0000-0003-0735-7822; **Сухоцкая Анна Андреевна**, кандидат медицинских наук, доцент, зав. отделением детской хирургии пороков развития Института перинатологии и педиатрии, Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова (Санкт-Петербург, Россия), ORCID: 0000-0002-8734-2227; **Байров Владимир Гиреевич**, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник НИЛ хирургии врожденной и наследственной патологии Института перинатологии и педиатрии, профессор кафедры хирургических болезней Института медицинского образования, Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова (Санкт-Петербург, Россия), ORCID: 0000-0002-8446-830X.

Information about authors

Perminova Anastasiia A., Pathologist, 1st year Postgraduate Student, Almazov National Medical Research Centre (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0002-1946-0029; **Mitrofanova Lubov B.**, Dr. of Sci. (Med.), Professor of the Department of Pathology of the Institute of Medical Education, Chief Research Fellow of the Scientific Research Laboratory of Pathomorphology, Almazov National Medical Research Centre (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0003-0735-7822; **Sukhotskaya Anna A.**, Cand. of Sci. (Med.), Associate Professor, Head of the Department of Pediatric Surgery for Congenital Pathology, Almazov National Medical Research Centre (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0002-8734-2227; **Bairov Vladimir G.**, Dr. of Sci. (Med.), Professor, Chief Research Fellow of the Scientific Research Laboratory of Surgery for Congenital and Genetic Pathology, Institute of Perinatology and Pediatrics, Professor of the Department of Surgical Diseases of the Institute of Medical Education, Almazov National Medical Research Centre (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0002-8446-830X.