

Гринберг Л.М.^{1,2,3}, Валамина И.Е.¹,
Мещерякова Е.Ю.^{1,2}, Неволин А.Н.¹, Зубарев И.В.⁴

УДК 616.24-003.6
DOI 10.25694/URMJ.2018.05.67

Методы выявления и верификации минеральных частиц в легких

1 — ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, г. Екатеринбург; 2 — ГБУЗ СО ПТД, г. Екатеринбург; 3 — УНИИФ - филиал ФГБУ «НМИЦ ФПИ» Минздрава России, г. Екатеринбург; 4 — Уральский центр коллективного пользования «Современные нанотехнологии» УрФУ, г. Екатеринбург

Grinberg L.M., Valamina I.E., Meshcheryakova E.U., Nevolin A.N., Zubarev I.V.

Methods for the detection and verification of mineral particles in the lungs

Резюме

В статье рассмотрены морфологические методы выявления минеральных пылевых частиц в легких. Показано, что обнаруженные при поляризационной микроскопии особенности имеют существенное значение в верификации бокситового, титанового и других пневмокониозов, а также тальк-ассоциированных поражений. Рекомендовано использовать сканирующую электронную микроскопию для определения элементного состава пыли в гистологических срезах. Установлено, что комплексное применение различных методов морфологического исследования способствует выявлению и верификации минеральных частиц в ткани легкого.

Ключевые слова: поляризационная микроскопия, сканирующая электронная микроскопия, морфология, пневмокониозы, минеральная пыль

Summary

Morphological methods of revealing mineral dust particles in the lungs are considered in the article. It is shown that the features revealed during polarization microscopy are of significant importance in the verification of bauxite, titanium pneumoconiosis, and talc-associated lesions. It is recommended to use scanning electron microscopy to determine the elemental composition of dust on histological sections. It is established that the integrated application of research methods promotes the identification of mineral particles in lung tissue.

Key words: polarizing microscopy, electron microscopy, morphology, pneumoconiosis, mineral dust

Введение

В современных условиях постоянно ухудшающейся экологической ситуации экологически обусловленная патология человека является весьма актуальной. При этом пылевая патология органов дыхания приобретает особое значение в крупных мегаполисах и регионах с высокой концентрацией промышленного производства, к каковым безусловно относится Свердловская область и Екатеринбург. Среди поражений легких, ассоциированных с воздействием минеральных частиц, значительную часть составляют пылевые поражения органов дыхания. Выявление минеральных частиц в легочной ткани имеет большое диагностическое значение. В некоторых случаях для достоверной верификации пыли в морфологическом субстрате необходимо применение дополнительных методов исследования, среди которых в первую очередь необходимо выделить поляризационную микроскопию.

Поляризационная микроскопия основана на выявлении структур, обладающих свойством двойного лучепреломления, и имеет ряд существенных преимуществ: простота техники выполнения, доступность исследования при использовании двух поляризационных фильтров в дополнение к световому микроскопу, что обеспечивает быстрый переход в режим поляризационной микроскопии при просмотре гистологического препарата. Идентификация анизотропных структур в пылевых скоплениях имеет большое значение при дифференциальной диагностике пылевых поражений легких и внутригрудных лимфатических узлов (ВГЛУ) и в первую очередь пылевых поражений профессиональной природы – пневмокониозов [1-6]. К анизотропным структурам, выявляемым в легочной ткани, относят, в том числе минеральные частицы, обнаружение которых в ряде случаев позволяет достоверно нозологически верифицировать патологию. При этом необходимо учитывать особенности анизо-

тропных минеральных частиц (размер, форма, количество, локализация, цветовой спектр и прочее). Следует подчеркнуть, что кристаллы кварца, обладающие малой дисперсией двулучепреломления, в поляризованном свете имеют нормальные цвета интерференции, игловидную или округлую форму и яркое свечение белого цвета [5,7].

В литературе подробно представлены исследования о выявлении в легочной ткани анизотропных кварцосодержащих кристаллов при воздействии ингаляционной минеральной пыли, содержащей соединения кремния (силикоз, силикатозы, легкое «курильщика», бытовой антракокозиоз и пр.) [1,5,7 и др.]. Следует отметить, что при фиксации тканевых образцов в формалине при кислотном значении pH возможно выпадение формалинового пигмента в виде мелких зерен, обладающего слабой поляризацией. Данное обстоятельство следует учитывать в ходе дифференциальной диагностики пылевых поражений легких. Кроме того, нельзя забывать о возможности развития талькового пневмокозиоза, послеоперационного (в современных условиях встречается крайне редко) и так называемого «ангиогенного талькоза», который развивается при хронической интравенозной наркомании. При этом в легочной ткани определяются крупные анизотропные кристаллы талька, что может сопровождаться гранулематозной реакцией [8] (рис.1 - *этот и другие рисунки к статье см. на специальной цветной вкладке журнала - прим. ред.*).

Метод поляризационной микроскопии – доступный и весьма эффективный – не позволяет оценить физико-химические особенности ингаляционной минеральной пыли. Поэтому в сложных случаях появляется необходимость применения сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с рентгеноспектральным микроанализом для выявления качественного и полуколичественного элементного состава минеральных частиц [9-13]. Сканирующая электронная микроскопия при исследовании пылевых частиц в легких обладает рядом преимуществ по сравнению с просвечивающей электронной микроскопией: возможность исследования относительно крупных частиц, которыми являются минеральные пыли, фиксация образцов в формалине, большая площадь анализа, возможность работать с депарафинированными гистологическими срезами. Данный метод диагностики пылевых частиц может быть использован для верификации сложных случаев пылевой патологии легких [14].

Цель исследования – представить современные рекомендации к использованию различных методов выявления минеральных частиц в легких, что будет способствовать совершенствованию морфологической диагностики пневмокозиозов и других пылевых поражений органов дыхания.

Материалы и методы

Исследование выполнено на базе патологоанатомического отделения и клиники легочной хирургии ГБУЗ СО ПТД г. Екатеринбурга за период 2010-2016 гг. Работа основана на морфологической верификации пылевых поражений на операционном материале – 315 резектатов

легких и лимфоузлов при первичном раке легкого. Изучались данные о профессиональном пылевом стаже, анамнезе курения. Морфологическое исследование операционного материала выполнялось по стандартной схеме. При макроскопическом исследовании из различных отделов опухоли, респираторной ткани и лимфоузлов для гистологического исследования забирались наиболее измененные участки. Применяли дополнительные гистохимические окраски (пикрофуксином по ван Гизону, комбинированная окраска пикрофуксином и фукселином, реакция Перлса, окраска по Циль-Нильсену и др.). В отдельных наблюдениях выполнено ИГХ-исследование опухоли.

Тканевые образцы легких, внутригрудных лимфатических узлов исследовали в поляризованном свете для выявления анизотропных минеральных частиц, используя поляризационные фильтры (анализатор проходящего света U-ANT с пластинкой-адаптером U-TAD и поляризатор U-POT) для светового микроскопа Olympus CX41. С помощью поляризационной микроскопии получали информацию о количестве, особенностях гистопографического распределения анизотропных частиц, размере, форме и цветовой анизотропии. В нескольких случаях тканевые образцы исследовали в сканирующем электронном микроскопе AURIGA FIB-SEM workstation («Carl Zeiss & MT», Германия) на базе УЦКП «Современные нанотехнологии» ИЕНиМ УрФУ.

Результаты и обсуждение

Для выявления и верификации пылевых частиц в легких на материале резекций проведено комплексное морфологическое исследование.

При макроскопическом исследовании операционного материала в резектатах легкого и ВГЛУ запыление той или иной степени выраженности наблюдалось во всех случаях. При бытовом антракокозиозе легкие и ВГЛУ серо-черного цвета, интерстициальный фиброз обычно выражен слабо. Пылевые отложения хорошо определяются в висцеральной плевре. Имеются признаки краевой эмфиземы. Случаи силикоза и антракосиликоза наряду с отложением пыли характеризовались развитием узелкового или диффузного фиброза легочной ткани. Следует подчеркнуть, что макроскопически легкие при бокситовом пневмокозиозе имеют буровато-коричневую окраску, что обусловлено высоким процентным содержанием соединений железа в бокситах.

При микроскопическом исследовании легочной ткани и ВГЛУ оценивали выраженность запыления, распределение пылевых частиц в ткани, клеточную реакцию, развитие фиброза, а также наличие характерных для определенных поражений гистологических структур (асбестовые, железосодержащие тельца, фиброногиалиновые узелки, гранулемы различного характера и пр.). В ходе исследования выявлены существенные различия и морфологические особенности в зависимости от характера пылевых поражений. При антракокозиозе определялось отложение грубодисперсной пыли черного-коричневого цвета в интерстициальной ткани легкого

и в лимфатических узлах, развитие интерстициального кониофиброза и кониотической атрофии лимфоидной ткани при выраженной степени запыления. Изменения, ассоциированные с курением, прежде всего, представлены скоплениями альвеолярных макрофагов, содержащих в цитоплазме пигмент золотисто-коричневого цвета.

В 34 случаях (10,8%) были выявлены морфологические признаки, которые наряду с наличием соответствующего профессионального анамнеза, подтвержденного врачом профпатологом, и клинико-рентгенологических данных, позволили диагностировать пневмокониозы профессиональной природы, к которым отнесены: силикоз и антракосиликоз, пневмокониоз газозлектросварщика, бокситовый пневмокониоз, пневмокониоз, вызванный пылью титана, асбест-ассоциированные поражения и пневмокониоз, вызванный пылью смешанного состава. Морфологическая картина пылевых поражений профессиональной природы имела характерные особенности [5]. Так, при пневмокониозе электросварщика при умеренном запылении в легочной ткани наблюдались железосодержащие тельца, при асбест-ассоциированных поражениях (единичные наблюдения) определялись асбестовые тельца без признаков интерстициального фиброза и альвеолита. В случаях силикоза и антракосиликоза наблюдали признаки интерстициального фиброза с формированием своеобразных периваскулярных, перибронхиальных и перибронхиолярных клеточно-пылевых "муфт" и образование в единичных наблюдениях классических силикотических фиброзно-гиалиновых узелков. При бокситовом пневмокониозе обнаружено отложение пыли коричневого и черно-коричневого цвета в интерстиции легких и ВГЛУ, развитие слабо выраженного интерстициального фиброза и в некоторых случаях кониотическая атрофия лимфоидной ткани. Основные подходы в морфологической диагностике пылевых поражений легких отражены в соответствующем алгоритме [15].

Метод поляризационной микроскопии дает возможность идентифицировать анизотропные структуры, обладающие свойством двойного лучепреломления, в пылевых скоплениях. С помощью поляризационной микроскопии получали информацию о количестве, особенностях гистотопографического распределения анизотропных частиц, их размере и форме. При исследовании в поляризационном свете гистологических срезов легких и лимфоузлов практически во всех случаях (при бытовом и профессиональном запылении) выявлены кварцсодержащие кристаллы в различном количестве. При этом в ряде случаев обнаружены пылевые структуры и скопления, обладающие характерной структурной и цветовой анизотропией. Соединения алюминия и титана обладают слабым двулучепреломлением и характерным цветовым свечением в поляризованном свете, выявленные особенности определялись в легочной ткани и лимфоузлах при бокситовом пневмокониозе (8 случаев, 23,5%, рис.2) и титан-ассоциированном поражении (2 случая, 5,9%). Цветовые особенности анизотропии пылевых частиц при бокситовом фиброзе представлены в соответствующем патенте на изобретение [14].

Сканирующую электронную микроскопию и рентгеноструктурный микроанализ следует применять для идентификации пылевых частиц в особо сложных и конфликтных диагностических случаях, а также при проведении научных исследований с использованием высокотехнологичных методов исследования. При этом важным этапом, обеспечивающим успех исследования гистологических срезов данным методом, является подготовка образца ткани. Важно, что наличие фонового сигнала от предметного стекла может быть причиной ложноположительных результатов исследования. Разработанная нами методика позволяет исследовать обычные фиксированные в формалине ткани и полученные из них обеспарафиненные гистологические срезы в сканирующем электронном микроскопе и проводить рентгено-спектральный анализ материала. В нашем исследовании для сканирующей электронной микроскопии мы использовали гистологические срезы операционного материала толщиной 10 мкм, срезы монтировали на покровное стекло, покрытое специальным скотчем для элиминации фонового сигнала. Проводили тестирование и ряда других методик подготовки образца (медный скотч на металлической подложке, предметное стекло с напылением олова и др.). Следует подчеркнуть, что с помощью СЭМ было доказано наличие алюминия в гистологических срезах легкого и лимфоузлов при бокситовом пневмокониозе, а также титана при пневмокониозе, вызванном пылью титана.

Таким образом, выявление и верификация минеральных частиц в легком является важной и актуальной задачей в диагностике пылевых поражений легких при проведении морфологического исследования операционного материала и биопсий.

Выводы

1. Только при комплексном морфологическом исследовании возможно адекватное выявление и идентификация минеральных частиц в легочной ткани. Такое исследование должно включать традиционные этапы макроскопического и микроскопического изучения легочной ткани, обязательное применение поляризационной микроскопии и, в части случаев, СЭМ с микроанализом минеральных частиц.

2. Поляризационную микроскопию применяют с целью обнаружения анизотропных частиц в пылевых скоплениях. При этом необходимо учитывать особенности анизотропии различных структур, исключать возможные артефициальные изменения и проводить дифференциальную диагностику (кристаллы кварца, талька, отложения титана и алюминия, и пр.).

3. Выявление кварцсодержащих анизотропных кристаллов не является патогномичным признаком профессиональной природы пылевых поражений легких и встречается с различной степенью выраженности практически во всех случаях.

4. Высокотехнологичные методы, такие как электронная микроскопия, имеют большое значение при дифференциальной диагностике пылевых поражений, при этом методом выбора следует считать сканирующую электронную микроскопию с энергодисперсионным микроанализом. ■

Гринберг Л.М., д.м.н., профессор, зав. кафедрой патологической анатомии ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, главный научный сотрудник Уральского НИИ фтизиопульмонологии. **Валамина И.Е.**, к.м.н., доцент кафедры патологической анатомии, заведующая гистологической лабораторией ЦНИЛ ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, г. Екатеринбург. **Меццякова Е.Ю.**, врач-патологоанатом, м.н.с. ЦНИЛ ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, г. Екатеринбург, врач клинической лабораторной диагностики ГБУЗ СО ПТД, г. Екатеринбург. **Неволин А.Н.**, врач судебно-медицинский эксперт, СО БСМЭ, г. Екатеринбург. **Зубарев И.В.**, с.н.с., к.б.н. УЦКП «Современные нанотехнологии» УрФУ, г. Екатеринбург. Автор, ответственный за переписку — Гринберг Л.М., 620149, г. Екатеринбург, ул. Онуфриева, д.20-а, lev_grin@mail.ru

Литература:

1. Thomas A. Sporn. *Pneumoconiosis, Mineral and Vegetable / Dail and Hammar's // Pulmonary Pathology Volume I: Nonneoplastic Lung Disease. Third Edition.* – 2008. – P. 911-949.
2. *Lung Pathology in U.S. Coal Workers with Rapidly Progressive Pneumoconiosis Implicates Silica and Silicates / R. A. Cohen, E. L. Petsonk, C. Rose, B. Young // Am J Respir Crit Care Med.* – 2016. – Vol. 193, № 6. – P. 673–680.
3. Oyeboode A. Taiwo *Diffuse Parenchymal Diseases Associated With Aluminum Use and Primary Aluminum Production.* – 2014. – Vol. 56. – P. S71-72.
4. *Vauxite mining and alumina refining process description and occupational health risks / D. A. Michael, N. Frisch, G. D. O. Hyg, D. Olney // JOEM.* – 2014. – Vol. 56, № 5. – P. S12-17.
5. Гринберг, Л.М. Патоморфология пылевых поражений органов дыхания при раке легких / Л.М. Гринберг, И.Е. Валамина, Е.Ю. Меццякова // Уральский медицинский журнал. – 2014. – №8. – С. 52-56.
6. *Coal mine dust lung disease in the modern era / J. L. Perret, B. Plush, P. Lachapelle, T. S. Hinks [et al.] // Respirology.* – 2017. – Vol. 22, Iss. 4. – P. 662–670.
7. McDonald, JW. *Detection of silica particles in lung tissue by polarizing light microscopy / JW McDonald, VL Roggli // Arch Pathol Lab Med.* – 1995. - № 119(3). – P. 242-6.
8. Неволин, А.Н. Патоморфология тальк-ассоциированных изменений внутренних органов при интравенозной наркомании / А.Н. Неволин, Л.М. Гринберг, Д.Л. Кондрашов // Уральский медицинский журнал. – 2011. – №1. – С. 39-43.
9. Fassina, A. *Detection of silica particles in lung tissue by environmental scanning electron microscopy / A. Fassina, M. Corradin, B. Murer, C. Furlan, A. Guolo, L. Ventura, M. Montisci // Inhal Toxicol.* – 2009. - #21(2). – P. 133-40.
10. *Растровая электронная микроскопия и рентгено-спектральный анализ в комплексной морфологической диагностике пневмокозиозов и кониотуберкулеза: пособие для врачей / Л. М. Гринберг, Л. А. Скрыбин.* – Екатеринбург, 2000. – С.9-20.
11. *Takada, T. Elemental analysis of occupational and environmental lung diseases by electron probe microanalyzer with wavelength dispersive spectrometer / T. Takada, H. Moriyama, E. Suzuki // Respir Investig.* – 2014. – Vol. 52, Iss. 1. – P. 5–13
12. *Chino, H. Pulmonary Aluminosis Diagnosed with In-air Microparticle Induced X-ray Emission Analysis of Particles / H. Chino, E. Hagiwara, M. Sugisaki // Intern Med.* – 2015. – Vol. 54, № 16. – P. 2035–2040.
13. *Inorganic dust exposure causes pulmonary fibrosis in smokers: analysis using light microscopy, scanning electron microscopy, and energy dispersive X-ray spectroscopy / M. R. Nasr, D. Savici, L. Tudor, D. Abou Abdallah [et al.] // Arch Environ Occup Health.* – 2006. – Vol. 61, Iss. 2. – P. 53–60.
14. Патент РФ № 201712706, 06.07.2018. Гринберг Л.М., Валамина И.Е., Меццякова Е.Ю., Зубарев И.В., Шур В.Я., Рослая Н.А. Способ морфологической диагностики алюминоза (бокситового пневмокозиоза) легкого с помощью поляризационной микроскопии // Патент России № 2660589.2018.
15. Патент РФ № 2017505345, 01.08.18. Гринберг Л.М., Валамина И.Е., Меццякова Е.Ю. Схема «Алгоритм морфологической диагностики пылевых поражений органов дыхания при опухолях легких на материале резекций» // Патент России №110088.2018.

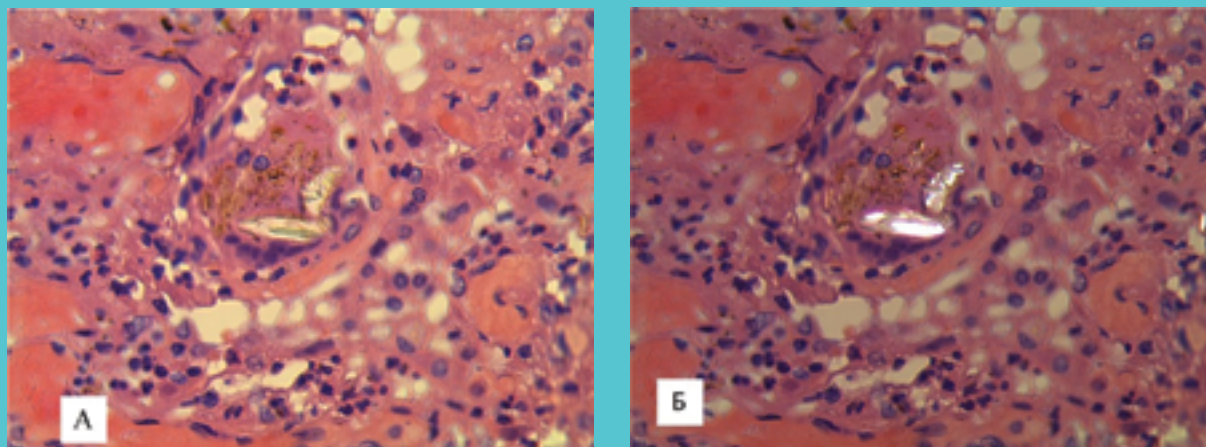


Рис. 1. Анизотропия минеральных частиц в легком при хронической интравенозной наркомании.
А - Кристаллы интраваскулярно в легком при ХИН. Окр. гематоксилин-эозин. Ув. $\times 400$. Б - тот же препарат в поляризованном свете. Кристаллы обладают эффектом двойного лучепреломления.

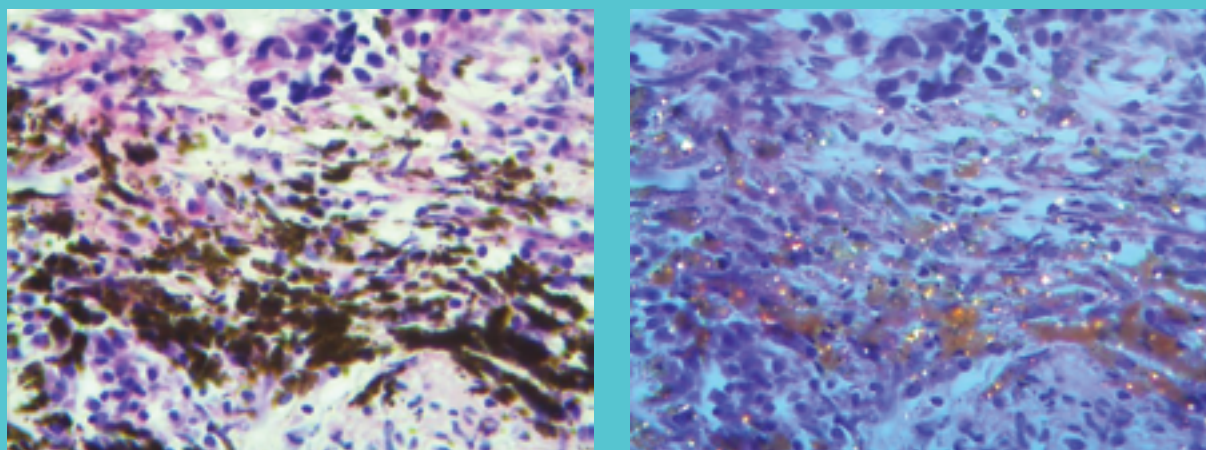


Рис. 2. Анизотропия минеральных частиц в легком при бокситовом пневмокониозе.
А - Отложения пыли в респираторной ткани при бокситовом пневмокониозе. Окр. гематоксилин-эозин. Ув. $\times 400$. Б - анизотропные структуры в пылевых отложениях (кварцсодержащие кристаллы и свечение оранжевого цвета).