

Д.В.Шатов
В.С.Пикалюк
В.В.Шаланин

Симферополь

Ключевые слова: морфометрия, лёгкие, повреждение.

Надійшла: 21.08.2016

Прийнята: 12.09.2016

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2016.3.389-394>

УДК: 616.24:572.51.085

ОБЗОР МЕТОДОВ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ ПОВРЕЖДЕНИЯ ЛЁГКИХ

Реферат. В статье приведен обзор методов, применяемых иностранными авторами для количественного оценивания легочного повреждения в экспериментальных исследованиях. Предлагаются различные способы ранжирования повреждения паренхиматозного и стромального компонентов лёгких, а также их сочетание для последующей статистической обработки полученных данных.

Morphologia. – 2016. – Т. 10, № 3. – С. 389-394.

© Д.В.Шатов, В.С.Пикалюк, В.В.Шаланин, 2016

✉ dmitrii_shatov@mail.ru

Shatov D.V., Pikalyuk V.S., Shalanin V.V. Review of quantitative methods for assessing lung injury.

ABSTRACT. Background. Modern possibilities allow for the statistical processing of the research results in the shortest possible time. This allows the researcher to move from a qualitative assessment of detected changes to the definition and quantification of integrated indicators characterizing the degree of lung injury. **Objective.** Demonstration of different options to quantify lung injury proposed by different authors. **Methods.** The study was conducted by analyzing publications in PubMed using key words «lung injury». **Results.** The article gives an overview of the methods used by foreign authors for the quantitative assessment of lung injury in experimental studies. It offers a variety of ways ranging damage of parenchymal and stromal components of the lungs, as well as their combination for subsequent statistical processing of the data. **Conclusion.** In our study we have demonstrated different methods for evaluation of experimental lung injury.

Key words: morphometry, lung injury.

Citation:

Shatov DV, Pikalyuk VS, Shalanin VV. [Review of quantitative methods for assessing lung injury]. Morphologia. 2016;10(3):389-94. Russian.

Морфологические исследования, направленные на изучение изменений лёгких, возникающих в результате воздействия повреждающих агентов и применения потенциальных корректоров, нередко носят описательный характер. Количественная оценка выявленных изменений, подвергаемая статистической обработке, носит изолированный характер, заключающийся в оценивании толщины межальвеолярной перегородки, диаметра сосудов и т.п., не характеризующая обнаруженные изменения системно.

В то же время, современные возможности позволяют проводить статистическую обработку полученных результатов исследований в крат-

чайшие сроки, что позволяет исследователю перейти от качественной оценки обнаруженных изменений к количественной и определению интегральных показателей, характеризующих степень повреждения лёгких.

Целью нашего обзора является демонстрация различных вариантов количественной оценки повреждения лёгких.

В 1988 году Т. Ashcroft, J.M. Simpson, T.V. Timbrell опубликовали статью, посвященную оценке тяжести фиброза лёгких, вызванного влиянием асбеста, с помощью цифровой шкалы (таблица 1) [1].

Таблица 1
Характеристика шкал легочного фиброза, предложенного Т. Ashcroft, J.M. Simpson, T.V. Timbrelli.

Степень фиброза	Критерии
0	Нормальное лёгкое (рис. 1)
1	Минимальное фиброзное утолщение альвеолярной или бронхиальной стенок (рис.2)
3	Умеренное утолщение стенок без явного повреждения легочной архитектуры (рис. 3)
5	Возрастающий фиброз с определённым повреждением легочной структуры и формирование фиброзных полос или маленьких фиброзных масс (рис. 4)
7	Тяжёлое искажение структуры и большие фиброзные поля; «сотовое лёгкое» (рис. 5)
8	Тотальная фиброзная облитерация поля (рис. 6)

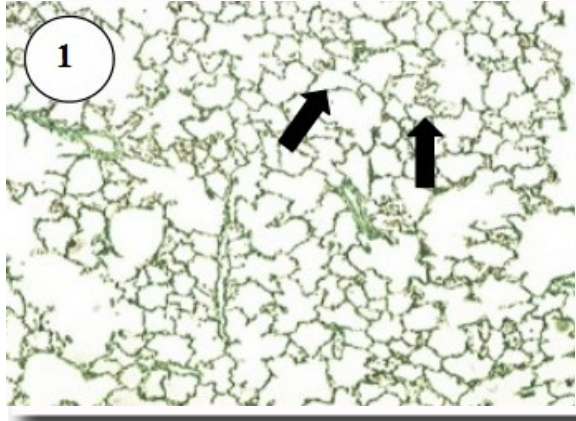


Рис. 1. Фрагмент лёгкого с нормальной легочной структурой (указано стрелками). Окраска соединительной ткани по Массону. $\times 100$.

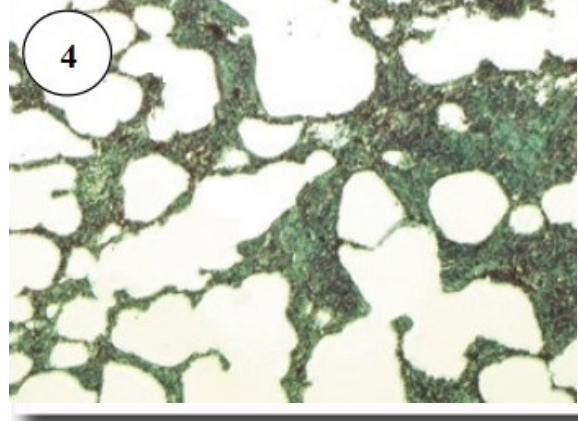


Рис. 4. Фрагмент лёгкого. Сливающиеся фибротические массы. Окраска соединительной ткани по Массону. $\times 100$.

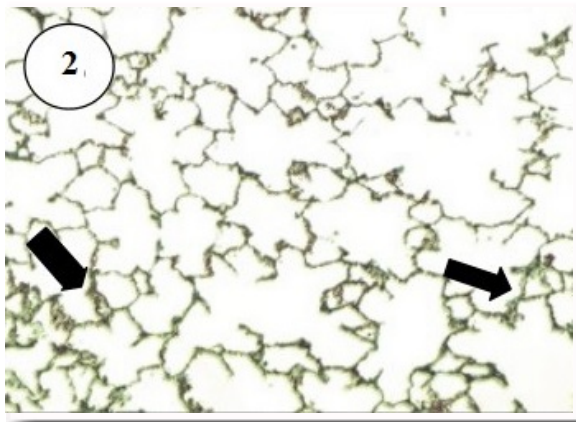


Рис. 2. Фрагмент лёгкого. Стрелками указаны нежные фиброзные изменения в изолированных альвеолярных перегородках. Окраска соединительной ткани по Массону. $\times 100$.

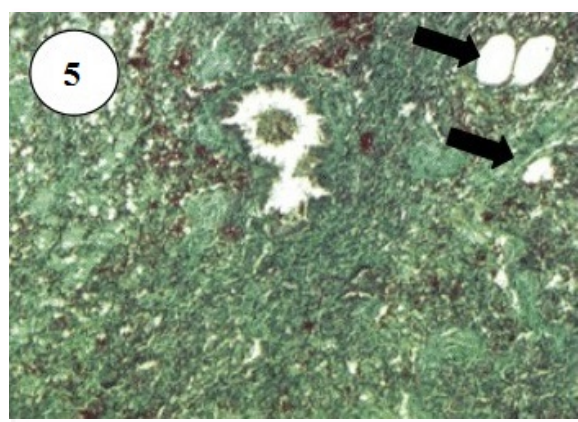


Рис. 5. Фрагмент лёгкого. Появление единичных «воздушных пузырьков» (отмечены стрелками). Окраска соединительной ткани по Массону. $\times 100$.

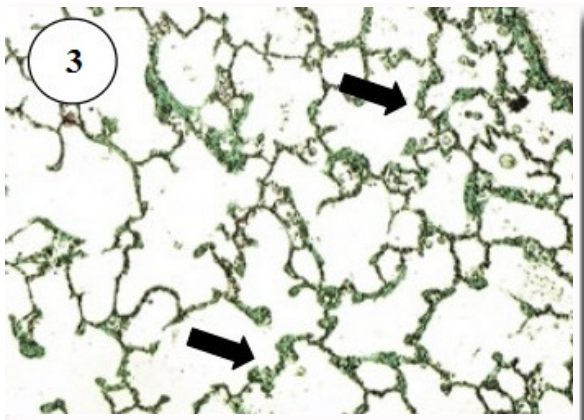


Рис. 3. Фрагмент лёгкого. Стрелками указаны непрерывные фиброзные стенки в альвеолярных перегородках. Окраска соединительной ткани по Массону. $\times 100$.

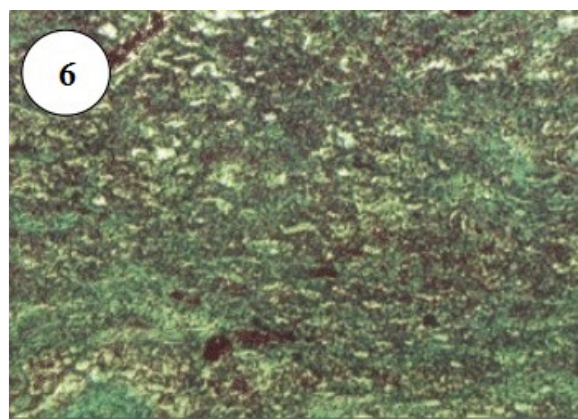


Рис. 6. Фрагмент лёгкого. Фиброзная облитерация. Окраска соединительной ткани по Массону. $\times 100$.

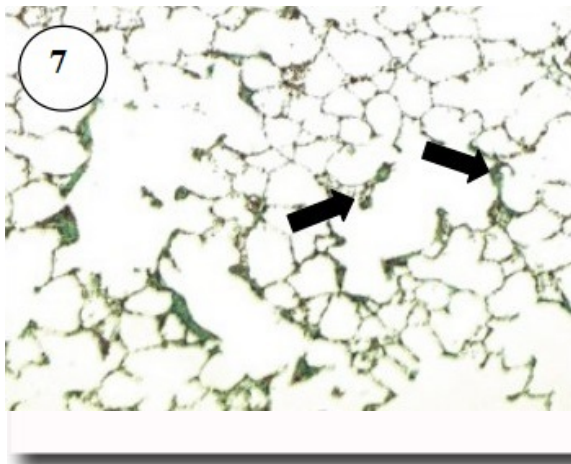


Рис. 7. Фрагмент лёгкого. Фибротические изменения альвеолярных перегородок в виде сучков (отмечены стрелками). Окраска соединительной ткани по Массону. $\times 100$.

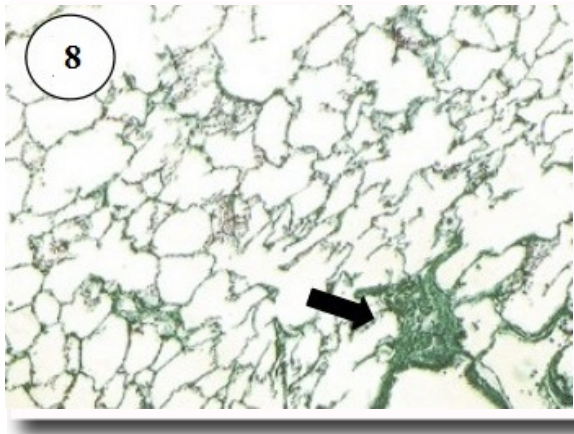


Рис. 8. Фрагмент лёгкого. Стрелкой указана единичная фибротическая масса. Окраска соединительной ткани по Массону. $\times 100$.

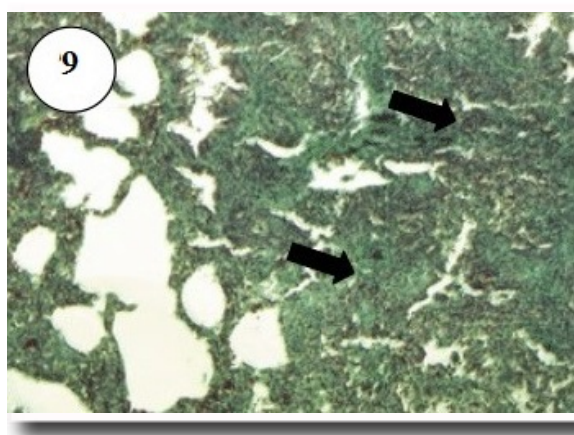


Рис. 9. Фрагмент лёгкого. Стрелками указаны большие непрерывные фибротические массы. Окраска соединительной ткани по Массону. $\times 100$.

Исследование проводилось под увеличением $\times 100$. Каждое исследуемое поле оценивалось по выраженности интерстициального фиброза согласно предложенным критериям. Если в исследуемых полях критерий занимал более половины площади, то ему присваивалась соответствующая степень фиброза. В том случае, если выраженность фиброза не соответствовала нечётным шкалам, занимая промежуточное положение, этому полю присваивался чётный номер. Поля зрения в основном занятые частями крупных бронхов или сосудов или злокачественными опухолевыми отложениями, не подсчитывались, а поля частично занятые этими структурами оценивались авторами на основании преобладания степени фиброза оставшейся части поля. Участки эмфиземы, инфильтрации воспалительными клетками игнорировались. В последующем определялся средний балл, что позволяло проводить статистическую обработку полученных данных.

20 лет спустя Hübner R.-H., Gitter W., El Mokhtari N.E. и др. предложили модифицированную шкалу (таблица 2), в которой «чётным» шкалам были предложены соответствующие критерии, а сама характеристика степени фиброза расширена дополнительными критериями, которые характеризовали альвеолярные перегородки и легочную структуру [2]. Исследование предлагалось проводить при увеличении $\times 200$.

В другом исследовании корейскими авторами предложена методика по оценке легочных изменений по трёхбальной шкале, где «1» соответствовал минимальному повреждению, а «3» - значительному повреждению [3]. Авторы предлагают исследовать паренхиматозные коллапс и уплотнение, кровоизлияние, изменения альвеолярных эпителиальных клеток, бронхиальный эпителий, периваскулярный отёк, кровеносные сосуды (таблица 3). После изучения изменений в лёгких производили сравнение количества того или иного признака между исследуемыми группами.

G. Matute-Bello, R.K. Winn, M. Jonas и соавт. в своём исследовании использовали методику количественной оценки повреждения лёгких (таблица 4) [4]. Всего исследованию подверглись 300 альвеол под увеличением $\times 400$.

Полученные оценки использовались для вычисления степени легочного повреждения по следующей формуле.

$$\text{Степень повреждения} = (B/N + 2 \times D/N + 3 \times C/N + A/N) / \Sigma N,$$

где A – альвеолярные перегородки, B – альвеолярные кровоизлияния, C – интральвеолярный фибрин, D – интральвеолярные инфильтраты, N – количество полей зрения, ΣN – суммарное количество полей.

Характеристика шкал легочного фиброза, предложенная Hübner R.-H., Gitter W., El Mokhtari N.E. с соавт.

Степень фиброза	Критерии
0	<u>Альвеолярная перегородка</u> : отсутствуют отложения фибрина в неубедительных и наименьших волокнах в некоторых стенках альвеол. <u>Легочная структура</u> : нормальное лёгкое (рис. 1).
1	<u>Альвеолярная перегородка</u> : Изолированные нежные фиброзные изменения (толщина перегородка ≤ 3 нормальных размеров). <u>Легочная структура</u> : Альвеолы частично увеличены и разрежены, но фиброзные массы отсутствуют (рис. 2).
2	<u>Альвеолярная перегородка</u> : Отчётливые фиброзные изменения (толщина перегородки > 3 нормальных размеров) в виде сучков, не соединённых друг с другом. <u>Легочная структура</u> : Альвеолы частично увеличены и разрежены, но фиброзные массы отсутствуют (рис. 7).
3	<u>Альвеолярная перегородка</u> : Непрерывные фиброзные стенки (толщина перегородки > 3 нормальных размеров), преобладают в целом микроскопическом поле. <u>Легочная структура</u> : Альвеолы частично увеличенный и разреженный, но фиброзные массы отсутствуют (рис. 3).
4	<u>Альвеолярная перегородка</u> : Вариабельная <u>Легочная структура</u> : единичные фиброзные массы ($\leq 10\%$ микроскопического поля) (рис. 8).
5	<u>Альвеолярная перегородка</u> : Вариабельная <u>Легочная структура</u> : Слившиеся фиброзные массы ($> 10\%$ и $\leq 50\%$ микроскопического поля). Структура легких сильно повреждена, но сохранена (рис. 4).
6	<u>Альвеолярная перегородка</u> : Вариабельная, в основном не различима. <u>Легочная структура</u> : Большие непрерывные фиброзные массы ($> 50\%$ микроскопического поля). Архитектура легких в большинстве случаев не сохранена (рис. 9).
7	<u>Альвеолярная перегородка</u> : Не различима. <u>Легочная структура</u> : Альвеолы почти облитерированы фиброзными массами, различимы до пяти «воздушных пузырьков» (рис. 5).
8	<u>Альвеолярная перегородка</u> : Не различима. <u>Легочная структура</u> : Микроскопическое поле полностью облитерировано фиброзными массами (рис. 6).

Градация гистопатологических находок, предложенная Но L.K., Rhee K.H.

Паренхиматозные коллапс и уплотнение, кровоизлияние и изменения альвеолярных эпителиальных клеток	
1	Менее 10% изменённой легочной паренхимы
2	10-50% изменённой легочной паренхимы
3	Более 50%изменённой легочной паренхимы
Бронхиальный эпителий	
1	Мягкая пролиферация эпителия
2	Умеренная пролиферация с папиллярной конфигурацией
3	Отмечается пролиферация эпителия с отщеплением эпителиальных клеток
Периваскулярный отёк	
1	Мягкое накопление отёчной жидкости
2	Умеренное накопление отёчной жидкости
3	Отмечается накопление отёчной жидкости с отложением фибрина
Кровеносные сосуды	
1	Вакуолизация эндотелиоцитов
2	Вакуолизация мышечной оболочки сосудов
3	Отмечается дегенерация сосудистой стенки или утолщение мышечной стенки с сужение просвета сосудов

Количественная гистопатологическая шкала оценки повреждения лёгких

Признак	0	1	2	3
Альвеолярные перегородки	Все перегородки тонкие и изящные	Утолщение < 1/3 всего поля	Утолщение от 1/3 до 2/3 поля	Утолщение > 2/3 поля
Альвеолярное кровоизлияние (минимум 5 эритроцитов)	Нет	В 1-5 альвеолах	В 5-10 альвеолах	В > 10 альвеолах
Интральвеолярный фибрин	Нет	< 1/3 поля	1/3 – 2/3 поля	> 2/3 поля
Интральвеолярные инфильтраты	< 5 клеток	5-10 клеток	10-20 клеток	> 20 клеток

В 2011 году был опубликован отчёт Американского торакального общества, посвящённого особенностям и измерениям при моделировании экспериментального острого легочного повреждения у животных [5]. Среди прочего, в нём были предложены для измерения гистологические признаки тканевой травмы, разделённые на две группы по релевантности. К первой, очень релевантной, отнесли накопление нейтрофилов в альвеолярном или в интерстициальных про-

странствах, формирование гиалиновых мембран, наличие белковых включений в альвеолярном пространстве (например, фибриновых нитей), утолщение альвеолярной стенки, увеличение степени травмы, измеренной с помощью стандартизированной гистологической шкалы (табл. 5). Ко второй, отчасти релевантные, отнесены кровоизлияния, области ателектаза, грубые макрокопические изменения лёгких.

Таблица 5

Система оценивания легочного повреждения

Параметр	Оценка за поле		
	0	1	2
Нейтрофилы в альвеолярном пространстве	Нет	1-5	> 5
Нейтрофилы в интерстициальном пространстве	Нет	1-5	> 5
Гиалиновые мембраны	Нет	1	> 1
Белковые включения, заполняющие воздушные пространства	Нет	1	> 1
Утолщение альвеолярной перегородки	< 2x	2x-4x	> 4x

В связи с неоднородным характером легочного повреждения, исследованию подлежат не менее 20 случайных полей при увеличении $\times 400$, случайно выбранных. Более строгий выбор полей может быть выполнен с использованием генерации координат (x, y) на срезе. Могут быть использованы и более сложные алгоритмы по выбору полей исследования. Исследованию подлежат только те поля, 50% и более которых заняты альвеолами. Из оценивания толщины межальвеолярных перегородок исключались те, которые непосредственно примыкали к кровеносным сосудам и воздухоносным путям. Полученные цифровые значения повреждения лёгких, подвергаются суммированию по следующей формуле:

$$\text{Оценка} = (20 \times A + 14 \times B + 7 \times C + 7 \times D + 2 \times E) / N \times 100,$$

где А – нейтрофилы в альвеолярном про-

странстве, В – нейтрофилы в интерстициальном пространстве, С – гиалиновые мембраны, D – белковые включения, заполняющие воздушные пространства, E – утолщение альвеолярной перегородки, N – число полей.

Вычисленная оценка легочного повреждения является непрерывным значением между нулем и единицей (включительно).

Таким образом, в нашей работе продемонстрированы различные методики оценивания экспериментального повреждения лёгких, которые позволят исследователям по-другому подойти к пониманию обнаруженных изменений при морфометрии. На основании представленных выше методик в дальнейшем возможно создание унифицированного способа оценки степени морфологических изменений лёгких при их повреждении.

Литературные источники
References

1. Ashcroft T, Simpson JM, Timbrelli TV. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J Clin Pathol*. 1988 Apr;41(4):467-70.
2. Ho LK, Rhee KH. Radioprotective effect of cyclo(1-phenylalanyl-1-prolyl) on irradiated rat. *J Microbiol Biotechnol*. 2008 Feb;18(2):369-76.
3. Hübner R-H, Gitter W, El Mokhtari NE, Mathiak M, Both M, Bolte H, Freitag-Wolf S, Bewig B. Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples. *Biotechniques*. 2008 Apr;44(4):507-11, 514-7. doi: 10.2144/000112729.
4. Matute-Bello G, Winn RK, Jonas M, Chi EY, Martin TR, Liles WC. Fas (CD95) induced alveolar epithelial cell apoptosis in vivo. Implications for acute pulmonary inflammation. *American Journal of Pathology*. 2001; 158 (1): 153-161. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63953-3/
5. Matute-Bello G, Downey G, Moore BB, Groshong SD, Matthay MA, Slutsky AS, Kuebler WM; Acute Lung Injury in Animals Study Group. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011 May;44(5):725-38. doi: 10.1165/rcmb.2009-0210ST.

Шатов Д.В., Пикалюк В.С., Шаланін В.В. Огляд методів кількісної оцінки пошкодження легень.

Реферат. В статті приведений огляд методів, які застосовуються іноземними авторами для кількісного оцінювання легеневого пошкодження в експериментальних дослідженнях. Пропонуються різноманітні способи ранжування пошкодження паренхіматозного та стромального компонентів легень, а також їх поєднання для послідувочої статистичної обробки отриманих даних.

Ключові слова: морфометрія, легені, пошкодження.