

Д.В.Шатов  
В.С.Пикалюк  
В.В.Шаланин

Симферополь

**Ключевые слова:** морфометрия, лёгкие, повреждение.

Надійшла: 21.08.2016

Прийнята: 12.09.2016

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 характеризуя 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)   |

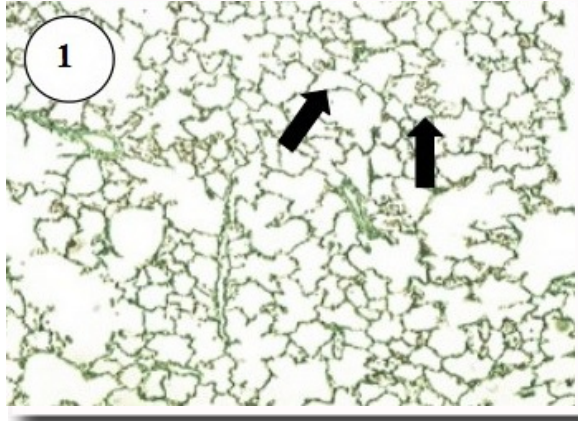


Рис. 1. Фрагмент лёгкого с нормальной легочной структурой (указано стрелками). Окраска соединительной ткани по Массону. ×100.

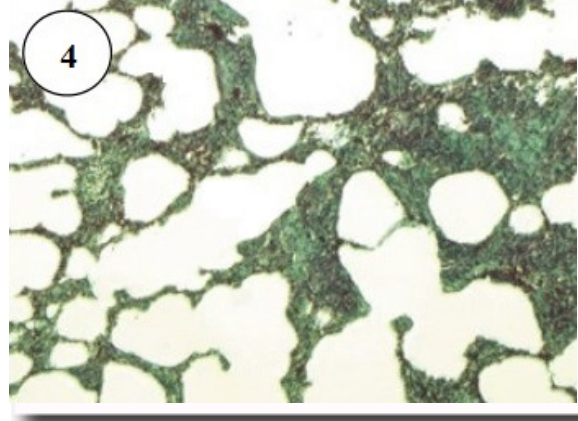


Рис. 4. Фрагмент лёгкого. Сливающиеся фибротические массы. Окраска соединительной ткани по Массону. ×100.

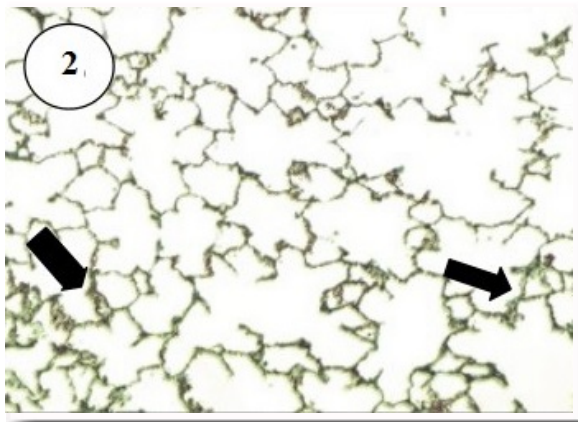


Рис. 2. Фрагмент лёгкого. Стрелками указаны нежные фиброзные изменения в изолированных альвеолярных перегородках. Окраска соединительной ткани по Массону. ×100.

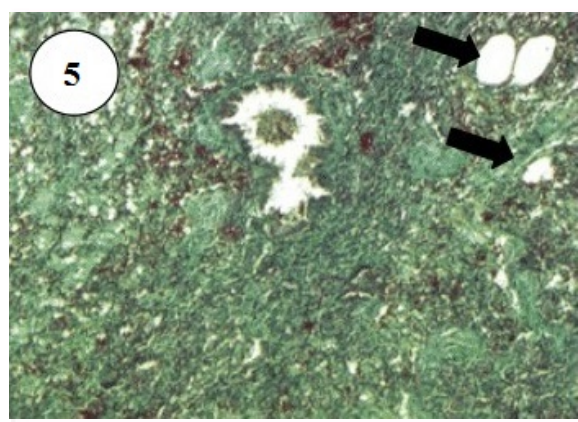


Рис. 5. Фрагмент лёгкого. Появление единичных «воздушных пузырьков» (отмечены стрелками). Окраска соединительной ткани по Массону. ×100.

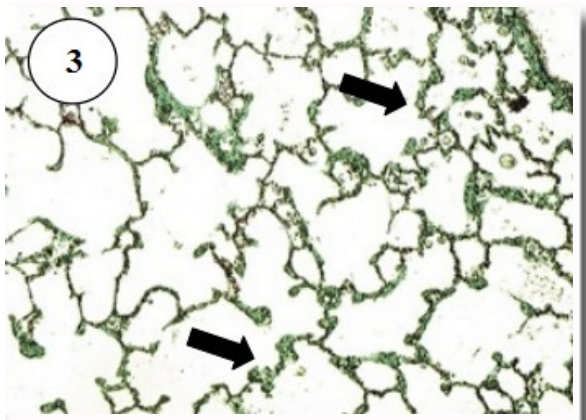


Рис. 3. Фрагмент лёгкого. Стрелками указаны непрерывные фиброзные стенки в альвеолярных перегородках. Окраска соединительной ткани по Массону. ×100.

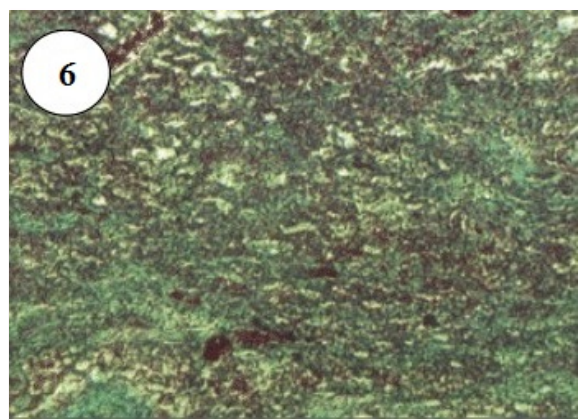


Рис. 6. Фрагмент лёгкого. Фиброзная облитерация. Окраска соединительной ткани по Массону. ×100.

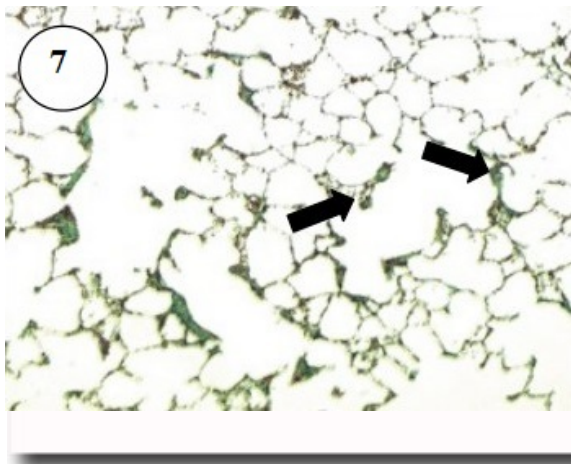


Рис. 7. Фрагмент лёгкого. Фибротические изменения альвеолярных перегородок в виде сучков (отмечены стрелками). Окраска соединительной ткани по Массону.  $\times 100$ .

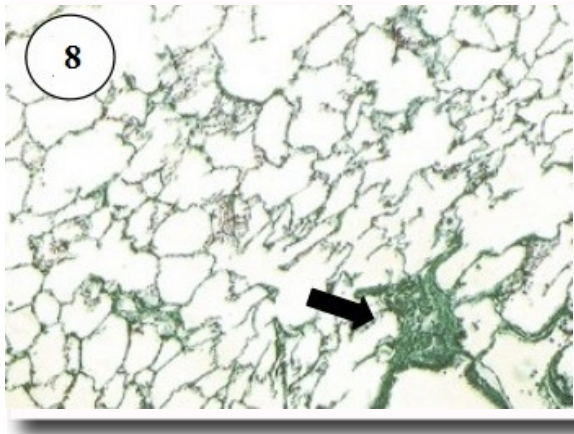


Рис. 8. Фрагмент лёгкого. Стрелкой указана единичная фибротическая масса. Окраска соединительной ткани по Массону.  $\times 100$ .

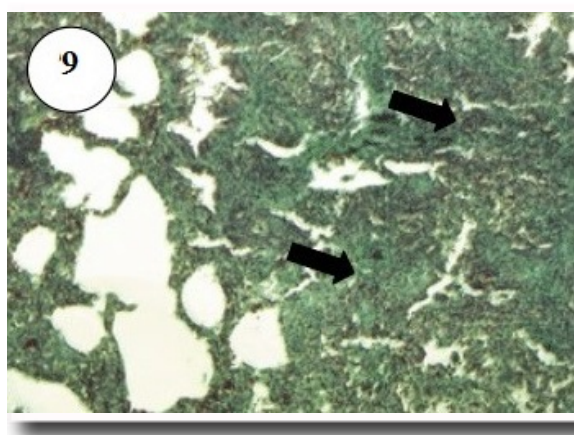


Рис. 9. Фрагмент лёгкого. Стрелками указаны большие непрерывные фибротические массы. Окраска соединительной ткани по Массону.  $\times 100$ .

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 трёхбалльной 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,  $\Sigma N$  – 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.<br><u>Легочная структура</u> : нормальное лёгкое (рис. 1).  |
| 1               | <u>Альвеолярная перегородка</u> : Изолированные нежные фиброзные изменения (толщина перегородка $\leq 3$ нормальных размеров).<br><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.<br><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.<br><u>Легочная структура</u> : Альвеолы частично увеличенный и разреженный, но фиброзные массы отсутствуют (рис. 3). |
| 4               | <u>Альвеолярная перегородка</u> : Вариабельная<br><u>Легочная структура</u> : единичные фиброзные массы ( $\leq 10\%$ микроскопического поля) (рис. 8).   |
| 5               | <u>Альвеолярная перегородка</u> : Вариабельная<br><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.<br><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.<br><u>Легочная структура</u> : Альвеолы почти облитерированы фиброзными массами, различимы до пяти «воздушных пузырьков» (рис. 5).  |
| 8               | <u>Альвеолярная перегородка</u> : Не различима.<br><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.