

**Т. А. Перцева, И. В. Ивах**  
**ОСОБЕННОСТИ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ**  
**СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ БРОНХОВ У БОЛЬНЫХ ХОЗЛ**  
**В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТАДИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ**

*Днепропетровская государственная медицинская академия*

Заболеваемость ХОЗЛ характеризуется прогрессирующим ростом и, согласно прогнозам ВОЗ, к 2020 году ХОЗЛ может занять 5-е место в мире по распространенности и 3-е место среди причин смерти. Широкая распространенность ХОЗЛ с высоким уровнем инвалидизации лиц трудоспособного возраста обуславливает необходимость как усовершенствования и стандартизации методов обследования, так и поиска терапевтических подходов с учетом полной клинико-морфологической характеристики заболевания [7, 8].

Согласно последним рекомендациям международной программы GOLD (2008), обязательным для постановки диагноза ХОЗЛ является исследование функции внешнего дыхания у больных с проведением пробы на обратимость бронхообструкции. Это исследование необходимо не только для постановки диагноза, но и для определения степени тяжести заболевания, подбора терапии, оценки ее эффективности, уточнения прогноза заболевания и экспертизы трудоспособности [7].

Характерной особенностью течения ХОЗЛ является неуклонное прогрессирование заболевания. Даже на ранних этапах, когда человек не ощущает себя больным из-за отсутствия одышки, формирование патологических изменений в респираторной системе уже наступает. Как правило, отказ от курения, прекращение контакта с вредными поллютантами и лечебные мероприятия способны уменьшить скорость прогрессирования болезни, однако остановить его не удается. Почти всегда диагностика ХОЗЛ проводится на инвалидизирующих стадиях болезни. И, как следствие, количество больных ХОЗЛ ежегодно увеличивается, в среднем на 5 % [1].

Наиболее чувствительным и реактивным при развитии ХОЗЛ является эпителий бронхиального дерева, т.к. он первым контактирует с агентами, содержащимися во вдыхаемом воздухе (табачный дым, промышленная пыль и химические соединения).

Одними из главных звеньев патогенеза ХОЗЛ являются: 1) изменение активности мукоцилиарного клиренса; 2) нарушение общего и местного иммунитета; 3) фиброз, а затем и склероз стенки бронхов. Все это в свою очередь приводит к снижению активности репаративной функции эпителия и перестройке гистоархитектоники бронхиального дерева вплоть до метаплазии.

Таким образом, цитоморфологическая верификация хронизации воспалительного процесса должна учитывать весь спектр клинических, лабораторных и инструментальных данных.

Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование цитологического материала позволяет визуализировать глубину и интенсивность как воспалительного процесса,

так и метапластических изменений, а также оценить репаративный потенциал эпителия, и способствует формированию групп декретированных пациентов с выраженными тенденциями к фиброзированию и склерозированию бронхов.

В основе иммуногистохимического метода исследования лежит специфическое взаимодействие поли- или моноклональных антител с искомыми антигенами, которое можно оценить на светооптическом уровне.

Эта методика позволяет выявить различные структурные элементы, рецепторы или продукты синтеза клеток или экстрацеллюлярного матрикса. Для демонстрации взаимодействия антител и антигенов используются разные системы визуализации.

В системах визуализации последних поколений применяются полимерные молекулы декстранов с депозитами вторичных антител (иммуноспецифичных к искомым первичным антителам), с большим количеством молекул пероксидазы хрена, что способствует упрощению процедуры, а также исключению из системы биотина (применявшегося в системах предыдущих поколений), что может приводить к ложнопозитивному неспецифическому результату.

Особый интерес в качестве маркеров, способствующих оценке регенеративной способности эпителия, а также обратимости изменений клеток слизистой бронхиального дерева представляют Ki-67 как маркер пролиферации, цитokerатины (СК) 8 и 34βE12 как индикаторы генеза эпителия.

Ki-67 представляет собой моноклональное антитело, позволяющее идентифицировать все клетки, вышедшие из G<sub>0</sub> фазы, т.е. пул всех клеток, потенциально готовых к делению, что отражает пролиферативный потенциал и позволяет судить об активности как физиологической, так и патологической регенерации эпителия [3, 4, 5].

Цитокератины 8 являются одними из наиболее универсальных маркеров клеток аденогенного происхождения, характерных для интактного эпителия слизистой бронхов, в связи с чем изучение наличия и распространенности экспрессии цитокератинов 34βE12 как маркеров плоского эпителия позволяет составить мнение не только о наличии плоскоклеточной метаплазии, но также и об обратимости изменений бронхиального эпителия при условии одномоментной коэкспрессии обоих маркеров в клетках [6].

Важными условиями специфичных и качественных реакций является правильно подобранный титр антител, время инкубации и температурные условия.

#### **Материалы и методы**

Нами было проведено обследование 37 больных с I и II стадиями ХОЗЛ (мужчин — 32, женщин — 5, средний

возраст —  $52,3 \pm 4,5$  лет). Больные были разделены на 2 группы в зависимости от стадий заболевания: 1-я группа — больные с ХОЗЛ I ст. (10 чел. (27%)), 2-я группа — больные с ХОЗЛ II ст. (27 чел. (73%)).

Всем больным было проведено исследование вентиляционной функции легких с проведением проб на обратимость бронхообструкции и последующая фибро-бронхоскопия ("Olympus" BF type TE) с взятием гистологического материала. Эндоскопическое заключение базировалось на определении основных признаков изменений со стороны трахеобронхиального дерева: 1) вид слизистой оболочки трахеи и бронхов; 2) вид и качество секрета; 3) эластичность стенок трахеи и бронхов; 4) кровоточивость слизистой оболочки при инструментальной пальпации; 5) вид и подвижность шпор и устьев бронхиального дерева; 6) вид сосудистого рисунка слизистой оболочки; 7) дистония трахеи и бронхов [2].

Для оценки качественных трансформаций эпителия бронхиального дерева, а также для анализа репаративного потенциала с учетом спектра клинично-лабораторных данных проводилось иммуногистохимическое исследование.

Материал наносился на предварительно обработанные адгезивной жидкостью стекла (Super Frost Plus) с последующей фиксацией согласно принятым стандартам.

В качестве первичных антител были использованы моноклональные антитела к цитокератинам с высокой молекулярной массой (моноклон 34 $\beta$ E12, Dako Cytomation), цитокератинам 8 (клон N1560, Dako Cytomation), Ki-67 (клон MIB-1, Dako Cytomation).

Титр антител подбирался индивидуально для каждого маркера в соответствии с требованиями, указанными в спецификациях. Антитела разводили с помощью специального растворителя антител (antibody diluent).

Учитывая рекомендации, разведение Ki-67 использовали в соотношении 1:150. Цитокератины 8 и цитокератины 34 $\beta$ E12 являлись RTU-растворами (Ready-To-Use) и не требовали предварительного разведения.

Экспозиция стекол с нанесенными первичными антителами в камерах при температуре 23° — 25°C составляла 30 мин. После нанесения первичных антител стекла инкубировались в камерах в течение 30 мин с промыванием в ТРИС-буферном растворе.

Идентификация реакции проводилась при нанесении хромогена DAB (диаминобензидина) под визуальным контролем с помощью микроскопического оборудования от 20 с до 3 мин. Продукт реакции имел коричневый цвет с распределением метки в ядре или на мембране в зависимости от локализации искомого структур.

Антигенные детерминанты цитокератинов плоского эпителия (цитокератины 34 $\beta$ E12, цитокератины 8) локализовались на мембране или субмембранно, Ki-67 — интрануклеарно, при этом оценка экспрессии цитокератинов проводилась в виде анализа качественной реакции (т.е. оценка наличия выпадения солей DAB непрерывно по всей окружности мембраны), а при оценке Ki-67 — количественная (% прореагировавших ядер на 100 клеток в 10 полях зрения).

С целью исключения ложноположительного или ложноотрицательного результата для каждого маркера производили контрольные исследования.

Для дифференцировки структур ткани материал дополнительно окрашивался гематоксилином Майера на протяжении 1–3 мин. Затем проводили дегидратацию и заключение в бальзам согласно стандартным подходам.

### Результаты исследования

При оценке эндоскопических критериев изменений слизистой оболочки бронхиального дерева у больных ХОЗЛ I ст. и ХОЗЛ II ст. были выявлены изменения, соответствующие атрофическому эндобронхиту II ст.

При иммуногистохимическом исследовании гистологического материала у всех больных ХОЗЛ I ст. отмечалась яркая позитивная мембранная реакция с цитокератинами 8 как в мерцательном, так и в базальном эпителии (рис. 1) на фоне отсутствия экспрессии цитокератинов плоского эпителия (34 $\beta$ E12), а также слабовыраженная (Ki-67 до 3 %) пролиферация базального эпителия (рис. 2).

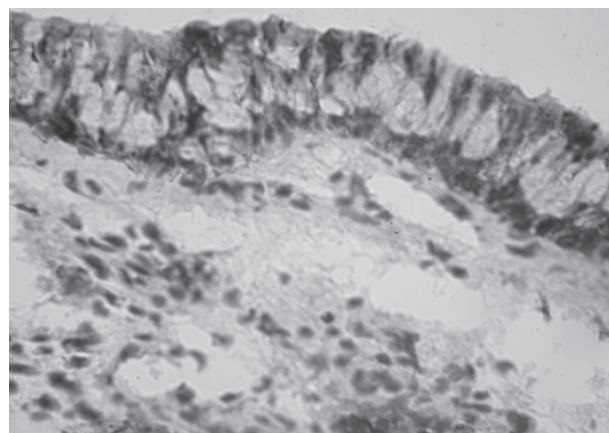


Рис. 1. Интенсивная позитивная мембранная реакция с СК 8 в базальном и мерцательном эпителии. ИГХ метод, дополнительное окрашивание гематоксилином Майера. Ув.  $\times 1000$

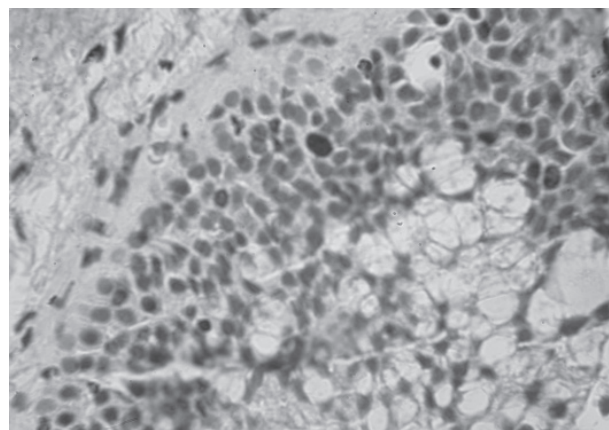
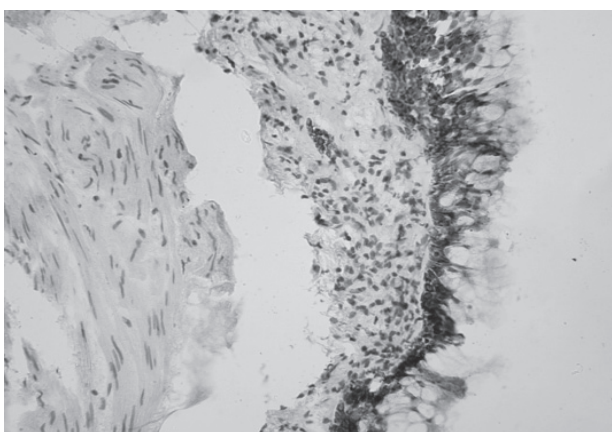


Рис. 2. Позитивная интрануклеарная реакция с Ki-67 базального эпителия слизистой бронхов. ИГХ метод, дополнительное окрашивание гематоксилином Майера. Ув.  $\times 1000$

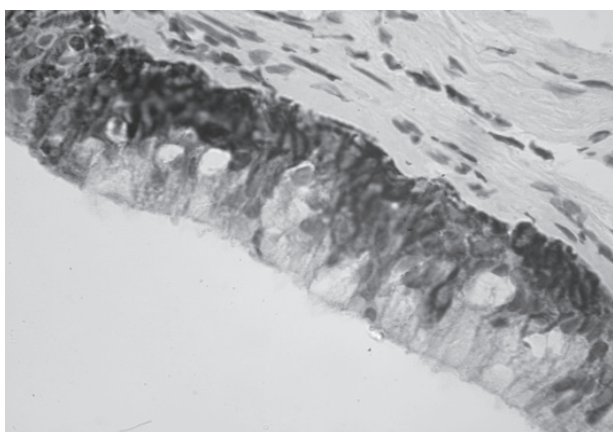
У больных ХОЗЛ II ст. отмечалась как очаговая, так и диффузная лимфоцитарно-плазмоцитарно-макрофагальная инфильтрация, вплоть до формирования лимфоидных фолликулов, отек собственной пластинки слизистой, дистрофические и некробиотические изменения слизистой оболочки и коллагеновых волокон. При



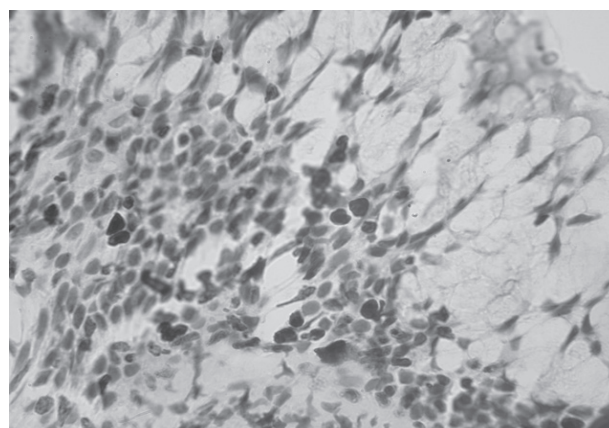
этом морфологическое сходство клеток при рутинном окрашивании не позволяло дифференцировать их гистогенетическую принадлежность, особенно в очагах выраженной воспалительной инфильтрации. При проведении ИГХ исследования у больных с ХОЗЛ II ст. была обнаружена интенсивная позитивная мембранная и цитоплазматическая реакция с цитокератинами 8 в бокаловидных и базальных клетках с признаками гиперплазии (рис. 3). Одновременно встречались очаги с экспрессией цитокератинов 34βЕ12 в клетках с морфологическими признаками плоского и железистого эпителия (рис. 4), что отражало тенденцию к перестройке типа эпителия из железистого в плоский. Наиболее высокий пролиферативный индекс был в клетках с «диморфной» морфологией и базальном эпителии над очагами воспалительной инфильтрации. Активация пролиферации базального эпителия преимущественно в зонах лимфоцитарной и макрофагальной инфильтрации отражала высокую реактивность неизмененного бронхиального эпителия — Ki-67 5–7 % (рис. 5).



**Рис. 3.** Интенсивная позитивная мембранная реакция с СК 8 в базальном эпителии и бокаловидных клетках. ИГХ метод, дополнительное окрашивание гематоксилином Майера. Ув. x 400



**Рис. 4.** Интенсивная позитивная мембранная и цитоплазматическая реакция базального эпителия с цитокератинами 34βЕ12. Экспрессия цитокератинов 34βЕ12 клетками плоского и железистого эпителия. ИГХ метод, дополнительное окрашивание гематоксилином Майера. Ув. x 1000



**Рис. 5.** Интенсивная интрануклеарная реакция с Ki-67 базального эпителия слизистой бронхов. ИГХ метод, дополнительное окрашивание гематоксилином Майера. Ув. x 1000

### Выводы

1. При проведении бронхоскопического исследования у больных ХОЗЛ I ст. и ХОЗЛ II ст. достоверно значимых визуальных отличий состояния слизистой бронхиального дерева выявлено не было.

2. Иммуногистохимическое исследование гистологического материала слизистой оболочки бронхиального дерева может служить методом для оценки темпов прогрессирования необратимых изменений со стороны эпителия бронхов.

3. У больных ХОЗЛ I ст. имеют место высокие компенсаторные возможности к восстановлению нормальной гистоархитектоники эпителия слизистой стенки бронхов.

4. Обнаруженная реакция с Ki-67 в клетках с «двойной» (железисто-плоскоклеточной) дифференцировкой у больных ХОЗЛ II ст. может свидетельствовать о неблагоприятном течении заболевания, т. е. о возможной необратимости произошедших изменений в эпителии бронхиального дерева.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Клинические рекомендации: Хроническая обструктивная болезнь легких / Под редакцией Чучалина А. Г. 2-е изд., испр. и доп. — Москва: Издательский дом «Атмосфера», 2007. — 240 с.
2. Бронхопневмонология / Под ред. Лукомский Г. И., Шулуток А. М., Овчинников А. А. — Москва: Медицина, 1982. — 400 с.
3. Dabbs D. J. Diagnostic immunohistochemistry. — Churchill Livingstone, 2002. — 676 p.
4. Comparative analysis of the nuclear proliferative index (Ki-67) in benign prostate, prostatic intraepithelial neoplasia, and prostatic carcinoma / Tamboli P., Amin M. B., Schultz D. S. et al. // Mod. Pathol. — 1996. — Vol. 9, № 10. — P. 1015–1019.
5. Moll R., Franke W.W., Schiller D.L. et al. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells // Cell. — 1982. — Vol. 31(1). — P. 11–24.
6. Nagle R.B., Moll R., Weidauer H. et al. Different patterns of cytokeratin expression in the normal epithelia of the upper respiratory tract // Differentiation. — 1985. — Vol. 30(2). — P. 130–140.
7. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (Updated 2008) // Electronic Resources: www.goldcopd.com
8. Lodenkemper R, Gibson G.J., Sibille et al. European Lung White Book. The first comprehensive survey on respiratory health in Europe, 2003. — P. 34–43.

**ОСОБЕННОСТИ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ БРОНХОВ У БОЛЬНЫХ ХОЗЛ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТАДИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ****Т. А. Перцева, И. В. Ивах***Резюме*

Проведено изучение особенностей морфологических изменений слизистой оболочки бронхов у больных ХОЗЛ в зависимости от стадии заболевания. У больных ХОЗЛ I ст. имеют место высокие компенсаторные возможности к восстановлению нормальной гистоархитектоники эпителия слизистой стенки бронхов. Обнаруженная реакция с Ki-67 в клетках с «двойной» (железисто-плоскоклеточной) дифференцировкой у больных ХОЗЛ II ст. может свидетельствовать о неблагоприятном течении заболевания, т. е. о возможной необратимости произошедших изменений в эпителии бронхиального дерева. Иммуногистохимическое исследование гистологического материала слизистой оболочки бронхиального дерева может служить методом для оценки темпов прогрессирования необратимых изменений со стороны эпителия бронхов.

**PECULIARITIES OF MORPHOLOGICAL CHANGES IN MUCOUS MEMBRANE OF BRONCHI IN COPD PATIENTS DEPENDING ON THE STAGE OF DISEASE****T. A. Pertseva, I. V. Ivakh***Summary*

We studied peculiarities of morphological changes in mucous membrane of bronchi in COPD patients depending on the stage of disease. In patients with stage I COPD strong compensatory capacities exist for restoration of normal histoarchitectonics of bronchial mucosa epithelium. We detected Ki-67 reaction in double differentiated cells (both glandular and flat cells) in COPD stage II patients, which could predict unfavorable course of disease, being a sign of irreversible changes of bronchial tree epithelium. Immune histochemical analysis of bronchial mucosa samples may serve as a method of evaluation of the rate of progression of irreversible changes in bronchial mucous membrane epithelium.