

Гистологический анализ состояния небных миндалин при хроническом тонзиллите

В.Т. Пальчун

А.В. Гуров , ORCID: 0000-0001-9811-8397, e-mail: alex9999@inbox.ru

Т.К. Дубовая, ORCID: 0000-0001-7936-180X

А.Г. Ермолаев, ORCID: 0000-0003-2642-5173

Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова; 117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, д. 1

Резюме

Статья посвящена проблеме хронического тонзиллита. Целью исследования являлась оценка изменений морфофункционального состояния небных миндалин в условиях хронического воспаления. В исследовании представлены сравнительные данные иммуногистохимического исследования небных миндалин в норме и при хронической тонзиллярной патологии. Использовалась клиническая классификация хронического тонзиллита, разработанная Б.С. Преображенским и В.Т. Пальчуном. В соответствии с этой классификацией описывались гистологические изменения в небных миндалинах при хроническом тонзиллите токсико-аллергической формы II. Контрольную группу составила ткань небных миндалин от пациентов без хронического тонзиллита. Анализ проводился с использованием маркеров апоптоза, антиапоптоза, клеточной пролиферации, а также различных типов лимфоцитов. Описаны методика работы с тканью миндалин, морфофункциональное состояние в каждой исследуемой группе, проведено сравнение исследуемых показателей в двух группах, отражена динамика изменений в небных миндалинах при хроническом тонзиллите. Увеличение показателей апоптотической и антиапоптотической активности в сочетании со снижением показателей клеточной пролиферации, увеличением количества Т-хелперов и В-лимфоцитов говорит о значительном снижении функциональной активности небных миндалин в условиях хронического воспаления. Эти изменения соотносены с клинической картиной для выработки наиболее оптимальной тактики лечения.

Ключевые слова: хронический тонзиллит, небные миндалины, иммуногистохимия, пролиферация, апоптоз, антиапоптоз, Т-лимфоциты, В-лимфоциты

Для цитирования: Пальчун В.Т., Гуров А.В., Дубовая Т.К., Ермолаев А.Г. Гистологический анализ состояния небных миндалин при хроническом тонзиллите. *Медицинский совет*. 2019;(20):68-71. doi: 10.21518/2079-701X-2019-20-68-71.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Histological examination of the palatine tonsils in chronic tonsillitis

Vladimir T. Pal'chun

Aleksandr V. Gurov, ORCID: 0000-0001-9811-8397, e-mail: alex9999@inbox.ru

Tatyana K. Dubovaya, ORCID: 0000-0001-7936-180X

Vladimir G. Ermolaev, ORCID: 0000-0003-2642-5173

Pirogov Russian National Research Medical University; 1 Ostrovityanova St., Moscow, 117997, Russia

Abstract

The article is devoted to the problem of chronic tonsillitis. The aim of the study was to assess changes in the morphofunctional state of the palatine tonsils in chronic inflammation. The study presents comparative data of immunohistochemical examination of the tonsils in normal and chronic tonsillar pathology. The authors used the clinical classification of chronic tonsillitis developed by B.S. Preobrazhensky and V.T. Pal'chun. Histological changes in the palatine tonsils of patients with toxic-allergic form 2 chronic tonsillitis were described in accordance with this classification. The control group represented palatine tonsils tissue taken from patients without chronic tonsillitis. The examination was carried out using markers of apoptosis, antiapoptosis, cell proliferation, as well as various types of lymphocytes. The authors describe a tonsil tissue handling technique, morphological and functional state in each study group, compared the studied parameters in two groups, reflected the dynamics of changes in the palatine tonsils with chronic tonsillitis. Increased apoptotic and anti-apoptotic activity combined with decreased cell proliferation, increased number of T-helpers and B-lymphocytes gives evidence of significantly decreased functional activity of the palatine tonsils in chronic inflammation. These changes are correlated with the clinical picture to develop the most optimal management of the disease.

Keywords: chronic tonsillitis, immunohistochemistry, proliferation, apoptosis, antiapoptosis, T-lymphocytes, B-lymphocytes

For citation: Pal'chun V.T., Gurov A.V., Dubovaya T.K., Ermolaev A.G. Histological exam of the palatine tonsils in chronic tonsillitis. *Meditsinskiy sovet = Medical Council*. 2019;(20):68-71. (In Russ.) doi: 10.21518/2079-701X-2019-20-68-71.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Высокая частота обращений к врачам амбулаторно-го звена сохраняется на протяжении многих лет, в т. ч. к врачам-оториноларингологам, при этом значительная часть из обращений является повторной. В свою очередь, среди лор-патологии существенную долю занимает патология глотки в целом и небных миндалин в частности. Большой процент повторных обращений вызван хронической тонзиллярной патологией.

Хронический тонзиллит (ХТ) представляет собой хорошо изученную нозологию с выработанными критериями диагностики и алгоритмами лечения. В то же время некоторые вопросы классификации тонзиллярной патологии и подходов к лечению остаются дискуссионными.

В данном исследовании мы использовали классификацию ХТ, разработанную Б.С. Преображенским и В.Т. Пальчуном [1]. Согласно этой классификации выделяют простую форму заболевания, для которой характерны только местные проявления заболевания и рекомендуется консервативная терапия. При токсико-аллергической форме I степени (ТАФ I) с более выраженной патологией, помимо местных признаков, характерных для простой формы, присутствуют общие токсико-аллергические проявления. При данной форме также рекомендуется консервативная терапия, а при отсутствии эффекта – хирургическое лечение. Токсико-аллергическая форма II степени (ТАФ II) характеризуется еще более выраженными симптомами по сравнению с ТАФ I и наличием сопряженных заболеваний (имеющих общую этиологическую основу с β-гемолитическим стрептококком группы А). При данной форме ХТ рекомендовано хирургическое лечение.

Учитывая, что ХТ является очаговой инфекцией, большое значение имеет своевременная диагностика формы заболевания и выбор тактики лечения, что способствует не только повышению качества жизни пациента, но и предупреждению развития метатонзиллярной патологии, а также снижению экономических затрат на лечение, связанных с повторными обращениями к врачу и уменьшением количества дней нетрудоспособности [2].

Существует большое количество способов консервативной терапии ХТ, но наиболее дискуссионным является вопрос необходимости хирургического лечения, а именно того момента, когда стоит уже отказаться от консервативной терапии и выполнить тонзиллэктомию. Для ответа на данный вопрос необходимо углубленное исследование состояния небных миндалин. В связи с этим целью нашей работы является проведение морфофункционального исследования состояния небных миндалин в норме и при хронической тонзиллярной патологии.

В доступной нам литературе имеется большое количество описаний гистологического строения небных миндалин и динамики развития патологических изменений при ХТ. Однако в подавляющем большинстве случаев используются стандартные гистологические методы, дающие лишь общее представление о строении небных миндалин в норме и при хронической тонзиллярной патологии [3, 4].

В настоящее время в гистологических и патолого-анатомических исследованиях используются более информативные методы, в частности иммуногистохимические (ИГХ). В литературе есть данные о применении этих методов при изучении ХТ, и при их получении были использованы одновременно в одном исследовании не более 2–3 маркеров, что не позволяло получить полноценное представление о состоянии объекта исследования [5, 6].

В настоящей работе для оценки морфофункционального состояния небных миндалин было сформировано две исследуемые группы пациентов и, соответственно, получено два блока биоматериала (образцов ткани миндалин) от этих пациентов.

Первую группу, контрольную, составили пациенты, не имеющие клинических признаков ХТ с отрицательным результатом микробиологического исследования в отношении *Streptococcus pyogenes*. Забор материала для исследования был произведен при проведении тонзиллотомии у пациентов с папилломами небных миндалин (n = 3) и тонзиллэктомии при увулопалатофарингопластике (n = 2). Общее количество в данной группе составило 5 человек (из них двое мужчин и три женщины) в возрастном диапазоне от 27 до 46 лет, средний возраст 37,4 года.

Во вторую группу, экспериментальную, вошли пациенты с клинически диагностированным и лабораторно подтвержденным диагнозом «ХТ ТАФ II». Образцы ткани для исследования были получены при проведении плановых и экстренных тонзиллэктомий. Общее количество пациентов, включенных в данную группу, составило 42 человека (из них 24 мужчины и 18 женщин) в возрастном диапазоне от 18 до 58 лет, средний возраст 35,57 года.

Критериями включения в обе группы исследования, помимо описанных выше, явилось отсутствие у пациентов тяжелых сопутствующих заболеваний, которые прямо или косвенно могли повлиять на результаты исследования (сахарный диабет, ангиопатии, иммунокомпетентные состояния, эндокринные заболевания, онкологические заболевания, туберкулез, гепатиты, ВИЧ).

Образцы ткани небных миндалин, получаемые непосредственно при их удалении, в условиях операционной помещались в 10%-ный раствор нейтрального забуференного формалина для фиксации.

Лабораторный этап исследования. Фиксация материала в растворе формалина в течение 3–5 дней → дегидратация в растворах спиртов восходящей концентрации → просветление в ксилоле → заливка в парафине → изготовление парафиновых блоков с последующим изготовлением срезов толщиной 3–4 мкм. Срезы помещали на стекла, покрытые адгезивным составом.

Следующим этапом работы было депарафинирование срезов (стекла помещали в термостат при температуре 60 °С на 30 минут, затем двукратно обрабатывали ксилолом по 3 минуты, далее двукратно по 3 минуты выдерживали в 100%-ном растворе спирта, после этого двукратно по 3 минуты помещали в 95%-ный раствор спирта и аккуратно промывали проточной водой). Влажные стекла окрашивали соответствующими ИГХ-красителями. Для анализа полученных срезов использовался светоопти-

ческий микроскоп. Для количественной и полуколичественной оценки реакций на маркеры использовались соответствующие методы морфометрической оценки. Оценивалась площадь участков, занимаемых мечеными клетками, которая выражалась в баллах от 1 до 5, а также по интенсивности окрашивания от 1 до 3 баллов. Баллы суммировались. Следующим этапом проводили статистическую обработку полученных результатов и их сопоставление с клиническими данными.

При окрашивании использовали моноклональные антитела, которые характеризуются единообразием в разных партиях. Этот метод имеет значительные преимущества по сравнению с использованием поликлональных антител.

В каждом исследовании ставили положительный и отрицательный контроли.

При ИГХ-исследовании проводили оценку биологических характеристик лимфоцитов и их субпопуляций в небных миндалинах, уровень их пролиферативной активности и апоптоза, а также элементов микроокружения (табл.).

● **Таблица 1.** Используемые моноклональные иммуногистохимические антитела и маркируемые объекты

● **Table 1.** Used monoclonal immunohistochemical antibodies and labelled objects

Название маркера	Показатель
Ki-67	Белок клеточной пролиферации
Bcl-2	Маркер антиапоптотической активности
Каспаза-3	Маркер апоптотической активности
CD-4	Маркер Т-лимфоцитов, хелперов
CD-19	Маркер В-лимфоцитов
CD-20	Маркер про-В-лимфоцитов

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты, полученные в первой группе (контроль). Маркирование на Ki-67 по их локализации в лимфоидных узелках было тождественно в обеих небных миндалинах. Высокую экспрессию в 6–7 баллов при этом отмечали в темных зонах герминативных центров, а умеренную в 4–5 баллов – в светлых и мантийных. При этом лимфоциты в межфолликулярных пространствах были негативными на исследуемый маркер, за исключением единичных, диффузно расположенных клеток.

При проведении реакции на выявление белка Bcl-2 окрашенные клетки регистрировались только в лимфоцитах мантийной зоны лимфоидных фолликулов (2–3 балла) при отсутствии окрашивания в герминативном центре.

Слабую ИГХ-реакцию в 2–3 балла визуализировали на каспазу-3 в герминативном центре и мантийных зонах лимфоидных фолликулов.

Низкую экспрессию CD4 в 2–3 балла отмечали в лимфоцитах герминативного центра лимфоидных фолликулов.

CD19 экспрессировались лимфоцитами мантийной зоны лимфоидных фолликулов в 3–4 балла.

При исследовании с используемыми антителами к CD20 отмечали слабое, в 1–2 балла, окрашивание клеток герминативного центра лимфоидных фолликулов.

Результаты, полученные во второй группе (экспериментальной). Маркирование на Ki-67 в лимфоидных узелках демонстрировало умеренную экспрессию в 3–4 балла в лимфоцитах герминативных центров лимфоидных фолликулов.

Умеренную положительную реакцию на Bcl-2 в 3–4 балла отмечали только в мантийной зоне лимфоидных фолликулов.

Маркирование на выявление каспазы-3 положительно в герминативном центре и мантийных зонах лимфоидных фолликулов в 5–6 баллов.

CD4 экспрессировались главным образом клетками герминативного центра в 6–7 баллов и в меньшей степени лимфоцитами мантийной зоны лимфоидных фолликулов в 4–5 баллов.

CD19 экспрессировались в 3–4 балла лимфоцитами мантийной зоны лимфоидных фолликулов.

При исследовании с использованием антител к CD20 отмечалось выраженное окрашивание в 7–8 баллов светлой зоны герминативного центра лимфоидных фолликулов. Кроме того, высокую экспрессию наблюдали в единичных лимфоцитах многослойного плоского неороговевающего эпителия крипт.

Анализ полученных результатов. Высокие значения *индекса пролиферации (Ki-67) лимфоцитов* указывают на выраженную митотическую активность ($87,0 \pm 0,34\%$, $p < 0,01$) в образцах ткани миндалин, полученных от пациентов контрольной группы, и снижение данного показателя почти в два раза при ХТ ($41,0 \pm 0,1\%$, $p < 0,01$).

Анализ маркирования на Bcl-2 свидетельствовал о том, что *антиапоптотическая активность* превалирует в лимфоцитах мантийной зоны лимфоидных фолликулов у пациентов 2-й группы ($43,2 \pm 0,44\%$, $p < 0,01$) по сравнению с группой контроля ($21,0 \pm 0,1\%$, $p < 0,01$).

Показатель *фазы терминации запрограммированной гибели клеток (каспаза-3)* наиболее интенсивно демонстрировали лимфоциты при ХТ ($53,1 \pm 0,1\%$, $p < 0,01$) в отличие от клеток биоматериала, полученного от пациентов контрольной группы ($26,2 \pm 0,3\%$, $p < 0,01$).

Количество Т-лимфоцитов-хелперов было значительно выше у пациентов с ХТ по сравнению с контролем ($62,2 \pm 0,3$ и $28,1 \pm 0,1\%$ соответственно, $p < 0,01$).

Доля В-лимфоцитов в биоматериале, полученном от пациентов, оказалась в обеих группах практически на одинаковом уровне (вторая группа – $38,4 \pm 0,1\%$; контроль – $42,5 \pm 0,2\%$, $p < 0,01$).

Количество В-лимфоцитов (лимфобластов), согласно маркированию на CD-20, было повышено у пациентов второй группы ($78,0 \pm 0,14\%$, $p < 0,01$) по сравнению с первой контрольной ($44,0 \pm 0,21\%$, $p < 0,01$). Это указывает на интенсификацию лимфоцитопоза на территории, занимаемой лимфоидными фолликулами, а также процессов дифференцировки и пролиферации в условиях антигенной стимуляции.

Полученные данные свидетельствуют о выраженном изменении citoархитектоники небных миндалин при ХТ ТАФ II. Значительно снижается иммунокомпетентная и барьерная функции, что приводит к формированию в миндалинах очага хронической инфекции.

При сопоставлении данных, полученных путем иммуногистохимического исследования, с клинической картиной за-

болевания и соответствующей лечебной тактикой, применяемой согласно классификации ХТ по Б.С. Преображенскому и В.Т. Пальчуну, наглядно видно, что хирургическое лечение является наиболее обоснованным при ХТ ТАФ II.



Поступила / Received
Отрецензирована / Review
Принята в печать / Accepted

Список литературы

1. Пальчун В.Т. Классификация и лечебная тактика при хроническом тонзиллите. *Вестник оториноларингологии*. 2013;78(3):8-11. Режим доступа: <https://www.mediasphera.ru/issues/vestnik-otorinolaringologii/2013/3/030042-4668201332>.
2. Bhattachatya N., Kepnes L.J. Economic Benefit of Tonsillectomy in Adults with Chronic Tonsillitis. *Annals of Otolaryngology & Rhinology*. 2013;122(12):2153-2157. doi: 10.1097/00006123-201312000-00008.
3. Пальчун В.Т., Гуров А.В., Гусева О.А. Патогенетические особенности формирования хронической тонзиллярной патологии. *Вестник оториноларингологии*. 2018;83(2):30-33. doi: 10.17116/otorino201883230-33.
4. Преображенский Б.С., Попова Г.Н. *Ангина, хронический тонзиллит, сопряженные с ними общие заболевания*. М.: Медицина; 1970.
5. Lange M.J., Lasiter J.C., Misfeldt M.L. Toll-like receptors in tonsillar epithelial cells. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 2009;73(4):613-621. doi: 10.1016/j.ijporl.2008.12.013.
6. Avramović V., Petrović V., Jović M., Vlahović P. Quantification of cells expressing markers of proliferation and apoptosis in chronic tonsillitis. *Acta Otorhinolaryngologica Italica*. 2015;35(4):277-84. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4731890/>.

References

1. Pal'chun V.T. Classification and therapeutic strategy for chronic tonsillitis. *Vestnik otorinolaringologii = Bulletin of Otorhinolaryngology*. 2013;78(3):8-11. (In Russ.) Available at: <https://www.mediasphera.ru/issues/vestnik-otorinolaringologii/2013/3/030042-4668201332>.
2. Bhattachatya N., Kepnes L.J. Economic Benefit of Tonsillectomy in Adults with Chronic Tonsillitis. *Annals of Otolaryngology & Rhinology*. 2013;122(12):2153-2157. doi: 10.1097/00006123-201312000-00008.
3. Pal'chun V.T., Gurov A.V., Guseva O.A. The specific pathogenetic features of the development of chronic tonsillar pathology. *Vestnik otorinolaringologii = Bulletin of Otorhinolaryngology*. 2018;83(2):30-33. (In Russ.) doi: 10.17116/otorino201883230-33.
4. Preobrazhenskiiy B.S., Popova G.N. *Angina, chronic tonsillitis, related general diseases*. Moscow: Medicine; 1970. (In Russ.)
5. Lange M.J., Lasiter J.C., Misfeldt M.L. Toll-like receptors in tonsillar epithelial cells. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 2009;73(4):613-621. doi: 10.1016/j.ijporl.2008.12.013.
6. Avramović V., Petrović V., Jović M., Vlahović P. Quantification of cells expressing markers of proliferation and apoptosis in chronic tonsillitis. *Acta Otorhinolaryngologica Italica*. 2015;35(4):277-84. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4731890/>.

Информация об авторах:

Пальчун Владимир Тимофеевич, чл.-корр. РАН, д.м.н., профессор, кафедра оториноларингологии лечебного факультета, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; 117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, д. 1

Гуров Александр Владимирович, д.м.н., профессор кафедры оториноларингологии лечебного факультета, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; 117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, д. 1; e-mail: alex9999@inbox.ru

Дубовая Татьяна Клеоповна, д.м.н., профессор, кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии лечебного факультета, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; 117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, д. 1

Ермолаев Александр Геннадьевич, аспирант, кафедра оториноларингологии лечебного факультета, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; 117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, д. 1

Information about the authors:

Vladimir T. Pal'chun, Corr. Member of RAS, Dr. of Sci. (Med.), Professor, Chair for Otorhinolaryngology, Faculty of General Medicine, Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "Pirogov Russian National Research Medical University" of the Ministry of Health of the Russian Federation; 1 Ostrovityanova St., Moscow, 117997, Russia

Aleksandr V. Gurov, Dr. of Sci. (Med.), Professor of the Department of Otorhinolaryngology named after Acad. B.S. Preobrazhensky of the Medical Faculty, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Pirogov Russian National Research Medical University" of the Ministry of Health of the Russian Federation; 1, Ostrovityanova st., Moscow, 117997, Russia; e-mail: alex9999@inbox.ru

Tatyana K. Dubovaya, Dr. of Sci. (Med.), Professor, Chair for Histology, Embryology and Cytology, Faculty of General Medicine, Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "Pirogov Russian National Research Medical University" of the Ministry of Health of the Russian Federation; 1 Ostrovityanova St., Moscow, 117997, Russia

Aleksandr G. Ermolaev, a postgraduate student, Chair for Otorhinolaryngology, Faculty of General Medicine, Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "Pirogov Russian National Research Medical University" of the Ministry of Health of the Russian Federation; 1 Ostrovityanova St., Moscow, 117997, Russia