

Л.Н. Лепеха, Е.А. Александрова, Г.В. Евгушенко, Н.Н. Макарьянц, О.В. Ловачева

Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза РАМН, Москва, Российская Федерация

Цитологические показатели бронхоальвеолярного лаважа в оценке характера течения экзогенного аллергического альвеолита

Применение комплекса современных цитологических методов исследования бронхоальвеолярного смыва позволило выделить наиболее характерные особенности развития лимфоцитарной и макрофагальной реакции респираторного отдела при разном течении экзогенного аллергического альвеолита. Наиболее показательным в оценке характера его развития является состояние макрофагальной популяции. При остром течении заболевания обнаруживают значительное число молодых активированных и неактивированных макрофагов, повышенное содержание зрелых фагоцитов. Еще более значимое увеличение числа фагоцитирующих макрофагов регистрируют при подостром развитии заболевания, что в первую очередь связано с участием этих клеток в лимфоцитарном апоптозе, интенсивность которого в этот период особенно высока (до 49%). Повышенное содержание зрелых фагоцитов наблюдается и при хроническом течении экзогенного аллергического альвеолита, что в сочетании с самыми низкими величинами индекса Т-хелперы/Т-супрессоры является важным диагностическим признаком этого варианта развития болезни.

Ключевые слова: бронхоальвеолярный лаваж, экзогенный аллергический альвеолит, макрофаги, лимфоциты.

34

Введение

Метод бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) в настоящее время считается одним из наиболее стандартизированных малоинвазивных способов получения адекватного клинического материала из нижних отделов легких [1]. Цитологический анализ бронхоальвеолярных смывов широко используют в диагностике, при оценке активности и прогнозировании исхода различных диссеминированных заболеваний органов дыхания [2–4]. При экзогенном аллергическом альвеолите (ЭАА) целенаправленное цитологическое исследование материала, полученного методом лаважа, выполняют значительно реже, а при анализе результатов не всегда учитывают разные варианты течения заболевания (острое, подострое, хроническое) [5, 6].

Вместе с тем однозначное определение характера развития воспалительного процесса при ЭАА зачастую невозможно из-за значительной вариабельности клинических показателей, отсутствия в анамнезе данных о природе и/или длительности внешнего воздействия. С этой целью представляется перспективным использование метода БАЛ с расширенным цитологическим анализом смыва, который должен включать не только подсчет относительного процентного содержания различных клеточных элементов (эндопульмональной цитограммы), но и дополнительные исследования ключевых звеньев воспалительного ответа — макрофагальной и лимфоцитарной реакции. Одним из них может быть определение макрофагальной формулы, основанное на подсчете относительного процентного содержания

L.N. Lepekha, E.A. Aleksandrova, G.V. Evgushchenko, N.N. Makar'yants, O.V. Lovacheva

Central Tuberculosis Research Institute RAMS, Moscow, Russian Federation

Cytologic Features of Bronchoalveolar Lavage in Evaluation of Course of Exogenous Allergic Alveolitis

Application of complex of modern cytologic methods of research bronchoalveolar lavage allowed to allocate most characteristics of development of lymphocytic and macrophagic reaction of bronchial tree in different course of exogenous allergic alveolitis. The most indicative in assessment of origin of exogenous allergic alveolitis development is the characteristics of macrophagic population. In acute course of exogenous allergic alveolitis the considerable number of young activated and non-activated macrophages, increased number of mature phagocytes is observed. Even more significant increase of phagocytic macrophages is observed at dissemination which is primarily is connected with participation of these cells in lymphocytic apoptosis which takes place in high percentage of lymphocytes (up to 49%). Increased number of mature phagocytes is observed at chronic course of exogenous allergic alveolitis that is an important diagnostic pattern of this option of development of exogenous allergic alveolitis in association with the lowest T-helpers/T-suppressors index.

Key words: bronchoalveolar lavage, exogenous allergic alveolitis, macrophages, lymphocytes.

в БАЛ разных фенотипов макрофагов, которое уже нашло свое применение в диагностике туберкулеза и саркоидоза легких [2, 3]. Среди показателей состояния лимфоцитов в настоящее время применяют индекс Тх/Тс, который определен для многих интерстициальных заболеваний легких, в т.ч. ЭАА, хотя и без учета варианта развития заболевания [7]. Учитывая патогенез ЭАА, практический интерес для оценки характера иммунокомплексного воспаления может иметь анализ жизнеспособности лимфоцитарных элементов с определением интенсивности некроза и апоптоза популяции. Вместе с тем возможности такого методического подхода до конца не ясны, требуют специального изучения в комплексе с другими цитологическими показателями БАЛ.

Цель исследования: провести сравнительный анализ различных цитологических показателей БАЛ при разных вариантах течения ЭАА.

Пациенты и методы

Участники исследования

В цитологическое исследование был включен материал БАЛ от 92 больных ЭАА в возрасте от 19 до 75 лет (54 женщины, 48 мужчин). В качестве группы сравнения использовали БАЛ 8 больных без легочной патологии. Характер течения ЭАА определяли по степени выраженности основных клинико-рентгенологических изменений, результатам гистологического исследования легочной ткани, лабораторным и функциональным показателям. По итогам обследования были выделены 3 группы наблюдения: с острым (23 человека), подострым (55 человек) и хроническим (14 человек) течением заболевания.

Методы исследования

Материалом для цитологического исследования послужил клеточный осадок БАЛ, который пропустили

через марлевый фильтр для очистки от слизи, центрифугировали и затем промывали в 2 сменах фосфатного буфера PBS (pH =7,2–7,4) при комнатной температуре. Изучение и подсчет эндопульмональной цитограммы (табл. 1) проводили у всех больных на мазках, окрашенных по методу Романовского–Гимзы [8]. Используя этот же материал, у 42 больных определяли макрофагальную формулу [2], для чего подсчитывали относительное процентное содержание молодых и зрелых макрофагов с разным фенотипом (табл. 2). Кроме того, проводили количественный анализ бронхоальвеолярного смыва у 38 больных ЭАА с различным течением заболевания на проточном цитофлуориметре «FACS Calibur» (BD Biosciences Immunocytometry Systems, США) с программным обеспечением «Cell Quest» с использованием прижизненной иммунологической окраски клеток антителами и флуоресцентными красителями по протоколу для иммунологических исследований. Анализ клеточного состава БАЛ проводили по следующим параметрам: число жизнеспособных и гибнущих клеток, интенсивность некроза и апоптоза среди них, соотношение Тх/Тс. Окраску для определения интенсивности некроза и апоптоза проводили прижизненным методом с помощью специфического маркера Annexin-V, меченного зеленым флуорохромом и пропидия йодида. Определение субпопуляций лимфоцитов осуществляли с использованием поверхностных CD-маркеров из иммунологического набора «BD Simultest IMK-Lymphocyte» (Becton Dickinson, США). Специфичность и качество окраски клеток для последующей проточной цитометрии также параллельно контролировали в люминесцентном микроскопе. Для этого оставшиеся после количественного анализа окрашенные образцы переносили на предметное стекло и просматривали в лазерном сканирующем конфокальном микроскопе «SPE» (Leika, Германия).

Статистическая обработка результатов выполнена с использованием методов непараметрической статистики на персональном компьютере с примене-

Таблица 1. Особенности эндопульмональной цитограммы материала, полученного методом бронхоальвеолярного лаважа, при разных вариантах течения экзогенного аллергического альвеолита

Группы наблюдения	Клеток в 1 мл, $\times 10^6$	Клеточные элементы, % (M \pm m)				
		Макрофаги	Лимфоциты	Нейтрофилы	Эозинофилы	Тучные клетки
Группа сравнения, n = 8	0,12 \pm 0,09	81,02 \pm 6,09	10,86 \pm 3,91	3,93 \pm 1,02	0,38 \pm 0,24	0,21 \pm 0,29
Течение ЭАА: острое, n = 23	0,59\pm0,10**	23,79\pm7,59**	63,86\pm3,23**	8,79\pm2,44*	1,76 \pm 1,58	1,08 \pm 1,10
подострое, n = 55	0,38\pm0,05*	57,68\pm8,89*	33,49\pm5,08*	5,42 \pm 3,29	2,99 \pm 1,97	1,92 \pm 1,23
хроническое, n = 14	0,08 \pm 0,02	81,39 \pm 6,49	12,90 \pm 5,20	3,96 \pm 1,92	0,97 \pm 0,95	0,53 \pm 0,76

Примечание. Достоверные различия по сравнению с контролем: * — $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. ЭАА — экзогенный аллергический альвеолит. Значения представлены в виде «средняя \pm ошибка средней» (M \pm m).

Таблица 2. Особенности макрофагальной формулы материала, полученного методом бронхоальвеолярного лаважа, при разных вариантах течения экзогенного аллергического альвеолита

Группы наблюдения	Различные фенотипы макрофагов, % (M \pm m)				
	Молодые макрофаги		Зрелые макрофаги		
	Неактивированные	Активированные	Фагоцитирующие	Секретирующие	Со смешанной функцией
Группа сравнения, n = 8	21,90 \pm 1,04	15,00 \pm 0,97	38,80 \pm 1,16	3,30 \pm 0,15	21,00 \pm 1,12
Течение ЭАА: острое, n = 10	31,81\pm3,08**	12,03 \pm 1,05	47,71\pm2,17*	5,01 \pm 0,91	3,01 \pm 1,13
подострое, n = 8	12,71\pm2,11*	19,18\pm2,17*	66,05\pm3,82**	4,29 \pm 1,25	7,81 \pm 2,12
хроническое, n = 24	19,81 \pm 4,05	12,97 \pm 4,05	53,43 \pm 2,08**	6,37 \pm 2,97	9,70 \pm 2,31

Примечание. Достоверные различия по сравнению с контролем: * — $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. ЭАА — экзогенный аллергический альвеолит. Значения представлены в виде «средняя \pm ошибка средней» (M \pm m).

нием пакета прикладных программ STATISTICA v.6.0. Критической величиной уровня значимости считали $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Исследование показало, что во всех случаях острой формы заболевания число клеток в 1 мл смыва превышало контрольный уровень почти в 5 раз. При этом 95% больных имели лимфоцитарный или лимфоцитарно-макрофагальный тип лаваж. Содержание лимфоидных элементов в составе эндопульмональной цитогаммы достигало $63,86 \pm 3,23\%$ (см. табл. 1), что согласуется с данными литературы и отражает развитие в респираторном отделе легких мононуклеарного альвеолита [5, 6].

Другой характерной особенностью остро протекающего ЭАА оказалось повышение в эндопульмональной цитогамме доли полинуклеарных клеток. При этом число нейтрофильных лейкоцитов возрастало почти в 2 раза, на что обращали внимание лишь единичные исследователи [5, 9]. Среди гранулоцитов определялись эозинофильные и базофильные лейкоциты, число которых было заметно повышено по сравнению с нормальными значениями, но значительно варьировало у разных больных (см. табл. 1). Повышалась частота выявления зрелых плазматических (особенно тучных) клеток, которые в группе сравнения наблюдали крайне редко. Увеличение в эндопульмональной цитогамме процентного содержания лимфоцитов и гранулоцитов сопровождалось достоверным уменьшением содержания макрофагов до $23,79 \pm 7,59\%$ (в норме $81,02 \pm 6,09\%$). Характерно, что при подостром варианте ЭАА доля лимфоцитов в цитогамме БАЛ составляла $33,49 \pm 5,08\%$, а макрофагов — $57,68 \pm 8,89\%$ (см. табл. 1), что также характерно для саркоидоза, фиброзирующего альвеолита и некоторых других интерстициальных заболеваний легких [1, 9]. Более того, при хроническом варианте ЭАА цитогамма имела близкие к норме величины, что существенно ограничивает ее использование в повседневной практике.

Анализ макрофагальных элементов БАЛ показал, что независимо от характера течения ЭАА, преобладающее большинство среди зрелых клеток составляли альвеолярные фагоциты (см. табл. 2). Характерно, что при остром течении заболевания в составе макрофагальной формулы было достоверно повышено содер-

жание молодых (10–18 мкм в диаметре) клеток со светлой цитоплазмой, бобовидным или округлым ядром (неактивированные макрофаги). При этом содержание макрофагов без признаков фагоцитоза, но с выраженной базофилией ядра и цитоплазмы (активированные биосинтезирующие макрофаги) имеет тенденцию к снижению. Это отражает активное созревание в респираторном отделе легких мононуклеарных фагоцитов и составляет характерную особенность остро протекающего ЭАА.

Наиболее высокое содержание фагоцитирующих клеток в макрофагальной формуле наблюдали при подостром течении ЭАА, где оно достигало максимальных значений ($66,05 \pm 3,82\%$; в норме $38,80 \pm 1,16\%$). Это коррелировало с данными гистологических исследований, в которых отмечали активное формирование в этот период в нижних отделах респираторного тракта многочисленных макрофагально-лимфоцитарных гранул [5, 6, 8]. Согласно нашим данным, повышенное число фагоцитирующих макрофагов сохранялось в БАЛ и при хроническом течении ЭАА ($56,43 \pm 2,08\%$), что позволяет рассматривать макрофагальную формулу в качестве более адекватного, по сравнению с эндопульмональной цитогаммой, дифференциально-диагностического теста.

При анализе популяции макрофагов важно также учитывать качественный состав фагоцитов. Так, при остром варианте развития ЭАА в лаваже можно было видеть пенистые клетки — липофаги, содержащие в цитоплазме многочисленные гранулы фосфолипидной природы, связанные с активным участием альвеолярных фагоцитов в метаболизме легочного сурфактанта [10, 11]. Содержание таких макрофагов варьировало у разных больных и было характерной особенностью этого варианта заболевания. При подостром и хроническом развитии воспаления в БАЛ появлялось небольшое число эпителиоидноподобных клеток, которые после электронномикроскопического анализа были идентифицированы как гистициты с ультраструктурными признаками фагоцитарной и секреторной способности [12]. В нашем исследовании к таким клеткам со смешанной функцией были отнесены макрофаги с гомогенной серовато-синей цитоплазмой без крупных включений или с единичными небольшими вакуолями, тогда как основной объем фагоцитоза выполняется альвеолярными макрофагами, в фагосомах которых чаще всего можно видеть целые лимфоциты, их фрагменты и апоптотные тельца.

При изучении клеток БАЛ в сканирующем лазерном конфокальном микроскопе стало очевидно, что именно лимфоциты, среди которых определялись клетки как на ранней, так и на поздней стадии апоптоза, преимущественно подвергались гибели (рис. 1). Как показало цитометрическое исследование БАЛ (рис. 2), апоптотическая гибель лимфоцитов наблюдалась при всех вариантах течения ЭАА. Процент гибнущих клеток значительно варьировал в разных группах больных. Характерно, что при подостром течении заболевания этот показатель был особенно высок. Так, у большинства больных данной группы (71%) суммарный уровень апоптоза (раннего и позднего) достиг 22–49%, у остальных из этой же группы — 7–13%. Напротив, при остром развитии заболевания преобладали случаи (62%), где апоптоз лимфоцитов составлял лишь 2–8%, и только у 38% больных он колебался в пределах 29–42%. При хроническом течении ЭАА интенсивность лимфоцитарного апоптоза варьировала от 2 до 13%.

Необходимо также отметить, что интенсивность гибели лимфоцитов посредством некроза встречалась только при остром течении ЭАА (см. рис. 2).

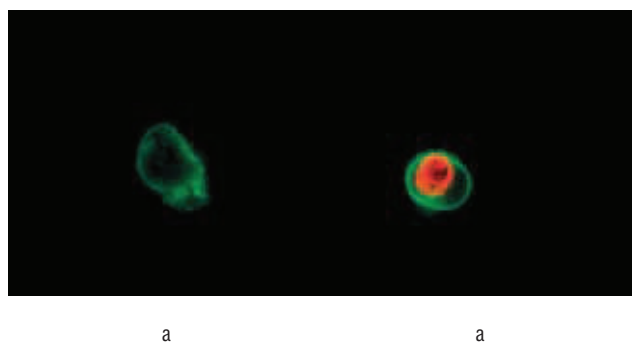
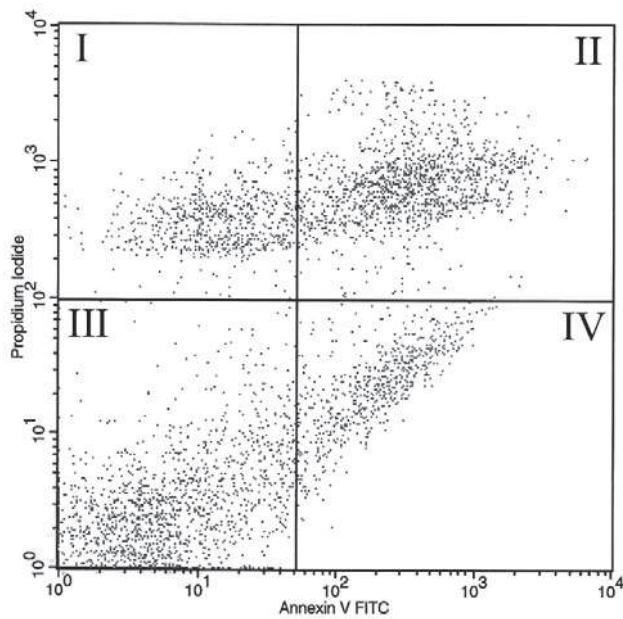
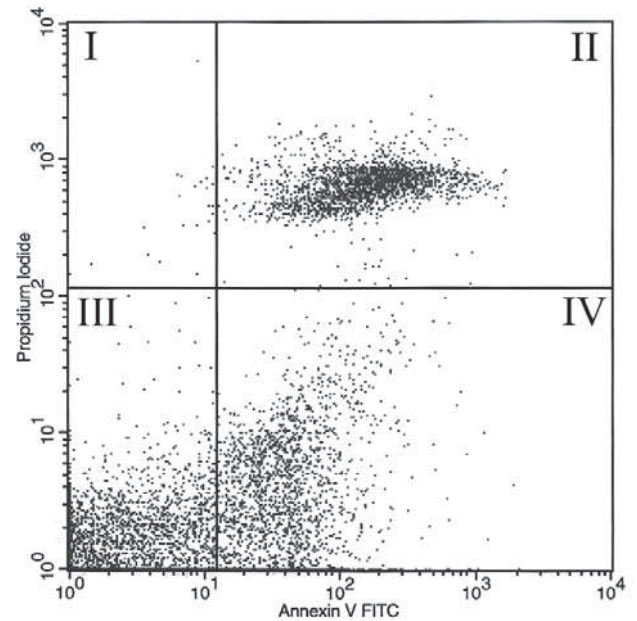


Рис. 1. Характер окрашивания лимфоцитов, полученных посредством бронхоальвеолярного лаваж, красителями Annexin-V и пропидия йодидом. Увел. $\times 1660$.

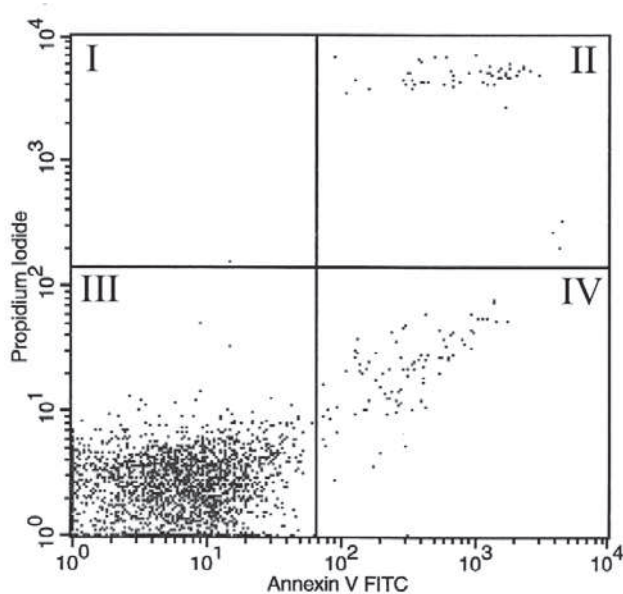
Примечание. а) ранняя стадия апоптоза с окраской мембраны (ядро не окрашено); б) поздняя стадия апоптоза с окраской ядра и мембраны клетки.



а



б



в

Рис. 2. Диаграммы распределения лимфоцитов, полученных посредством бронхоальвеолярного лаважа, на живые и гнущие путем некроза или апоптоза у больных с разными вариантами течения экзогенного аллергического альвеолита.

Примечание. а) острое течение; б) подострое течение; в) хроническое течение. Окраска — Annexin-V и пропидия йодид. Квадрант I — некроз, II — поздний апоптоз, III — живые клетки, IV — ранний апоптоз.

Таблица 3. Сравнительная характеристика показателей индекса Т-хелперы/Т-супрессоры при разных вариантах течения экзогенного аллергического альвеолита

Течение ЭАА	Т хелперы	Т супрессоры	Тх/Тс
Острое	14,2±3,3	27,5±9,5	1,15±0,45
Подострое	5,9±2,8*	17,3±10,5	0,61±0,13*
Хроническое	8,3±0,4*	21±1,1	0,4±0,02**

Примечание. Достоверные различия по сравнению с острым вариантом заболевания: * — $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. ЭАА — экзогенный аллергический альвеолит. Значения представлены в виде «средняя ± ошибка средней» ($M \pm m$).

Не менее чем у 50% таких больных некрозу подверглось 15–17% лимфоцитов БАЛ, у остальных этот показатель колебался от 0,5 до 1,5%. У больных с подострым течением заболевания случаи повышенного уровня некроза были единичными и не превышали 0,8%, а при хроническом его варианты зафиксированы не были.

Дополнительным методом оценки развития различных вариантов течения ЭАА может послужить субпопуляционный анализ лимфоцитов с определением индекса Тх/Тс. Как показало цитометрическое исследование, величина индекса заметно варьировала при разных вариантах течения заболевания (табл. 3). При остром он достигал 1,15±0,45, тогда как при подостром и особенно хроническом был значительно ниже единицы (0,61±0,13 и 0,4±0,02, соответственно). Крайне низкое значение индекса Тх/Тс при хроническом течении заболевания, по всей вероятности, связано со снижением активности

воспалительного ответа, нарастанием интенсивности процессов фиброобразования, что коррелирует с гистологической картиной заболевания в этот период [4, 5].

Специфичность иммунологической окраски Т хелперов и Т супрессоров была подтверждена при помощи метода конфокальной лазерной микроскопии. Лимфоциты, присутствующие в материале БАЛ, специфично связывали маркеры CD4 (Т хелпер), меченные зеленым флуорохромом, или CD8 (Т супрессор), меченные красным флуорохромом. Клеток, одновременно окрашиваемых обоими маркерами, определено не было.

Заключение

Применение комплекса современных цитологических методов исследования БАЛ позволило выделить наиболее характерные особенности развития лимфо-

цитарной и макрофагальной реакции респираторного отдела при разном течении ЭАА, определить их диагностическую и дифференциально-диагностическую значимость. Одним из характерных проявлений заболевания является концентрация в БАЛ значительного числа лимфоцитов. Оно максимально при остром развитии воспаления, что находит свое отражение в эндопульмональной цитограмме. При остальных вариантах ЭАА этот показатель существенно не отличается от такового при других диссеминированных заболеваниях легких (саркоидоз, туберкулез и др.), может иметь близкие к нормальным значения, что ограничивает применение эндопульмональной цитограммы в дифференциально-диагностических целях. Более показательной при оценке характера развития иммунокомплексного воспаления при ЭАА является оценка состояния макрофагальной популяции. В отличие от гранулематозных заболеваний, при которых происходит форми-

рование гранулем, содержащих секреторно-активные эпителиоидные клетки, макрофагальная формула при ЭАА отражает динамику активации исключительно фагоцитарной функции макрофагов. При остром течении заболевания в составе макрофагальной формулы наблюдается значительное число молодых активированных и неактивированных макрофагов, повышенное содержание зрелых фагоцитов, особенно фосфолипофагов и некрофагов. Еще более значимое увеличение числа фагоцитирующих макрофагов можно зафиксировать при подостром развитии заболевания, что в первую очередь связано с участием этих клеток в лимфоцитарном апоптозе, интенсивность которого в этот период особенно высока (до 49%). Повышенное содержание зрелых фагоцитов встречается и при хроническом течении ЭАА, что в сочетании с самыми низкими величинами индекса Тх/Тс является важным диагностическим признаком этого варианта развития воспалительного процесса.

REFERENCES

1. Antipova A.V. Diagnostika ekzogennykh alveolitov razlichnoi prirody. *Avtoref. diss ... kand. med. nauk. M.* 2010.
2. Erokhin V.V., Gedymin L.E., Lepekha L.N., Dvorakovskaya I.V. Interstitial'nye bolezni legkikh. Ruk-vo dlya vrachei «Kletochnaya biologiya legkikh v norme i pri patologii». Pod red. V.V. Erokhina, L.K. Romanovoi. *M.: Meditsina.* 2000. S. 393–397.
3. Lepekha L.N. Makrofagi i dendritnye kletki legkikh. V kn. «Respiratornaya meditsina». Pod red. A.G. Chuchalina. *M.: GEOTAR-Media.* 2007. S. 174–186.
4. Lepekha L.N., Chernichenko N.V., Lovacheva O.V. Osobennosti makrofagal'noi formuly bronkhoal'veolyarnogo smyva u bol'nykh destruktivnym tuberkulezom legkikh. *Probl. tub.* 2003; 12: 17–21.
5. Lepekha L.N., Makar'yants N.N., Antipova A.V. Morfologicheskie osobennosti legkikh pri ekzogennykh alveolitakh razlichnoi prirody. Sb. trudov XX Nats. kongr. po boleznyam organov dykhaniya. *M.* 16–19 noyabrya 2010. 213 s.
6. Makar'yants N.N., Lepekha L.N., Sivokozov I.V., Shmelev E.I. Opyt primeneniya Lazolvana v lechenii bol'nykh ekzogennym allergicheskim alveolitom podostrogo techeniya. *Doktor.ru.* 2011; 6 (65): 54–57.
7. Nikolaeva G.M. Tsitologiya tuberkuleza i drugikh granulematozov legkikh. *M.* 2004.
8. Samsonova M.V. Bronkhoal'veolyarnyi lavazh: tsitologicheskaya diagnostika zabolevaniy legkikh. *Novosti klinicheskoi tsitologii Rossii.* 2007; 11 (3–4): 12–15.
9. Chernyaev A.L., Samsonova M.V. Patologicheskaya anatomiya legkikh. Atlas. *M.: Atmosfera.* 2011.
10. Filippov V.P. Bronkhoal'veolyarnyi lavazh pri diffuznykh porazheniyakh legkikh. *M.: Meditsina.* 2006.
11. Drent M., Jacobs J.A., Wagenaar S.S. Bronchoalveolar lavage. *Eur. Resp. Mon.* 2000; 14: 63–78.
12. Schagat T.L., Wofford J.A., Wright J.R. Surfactant protein A enhances alveolar macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils. *J. Immunol.* 2001; 166: 2727–2733.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Лепеха Лариса Николаевна, доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией патоморфологии ФГБУ ЦНИИТ РАМН

Адрес: 107564, Москва, Яузская аллея, д. 2

Тел.: (499) 785-91-79

E-mail: ler3@yandex.ru

Александрова Екатерина Анатольевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории патоморфологии ФГБУ ЦНИИТ РАМН

Адрес: 107564, Москва, Яузская аллея, д. 2

Тел.: (499) 785-91-79

Евгущенко Галина Владимировна, кандидат медицинских наук, заведующая клинико-диагностической лабораторией ФГБУ ЦНИИТ РАМН

Адрес: 107564, Москва, Яузская аллея, д. 2

Тел.: (499) 785-91-94

Макарьянц Наталья Николаевна, кандидат медицинских наук, научный сотрудник отдела гранулематозных болезней ФГБУ ЦНИИТ РАМН

Адрес: 107564, Москва, Яузская аллея, д. 2

Тел.: (499) 785-91-56

Ловачева Ольга Викторовна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая отделением эндоскопии ФГБУ ЦНИИТ РАМН

Адрес: 107564, Москва, Яузская аллея, д. 2

Тел.: (499) 785-91-76