

# Альвеолярные макрофаги, нагруженные липидами, в индуцированной мокроте у больных гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью

Волкова Л.И.<sup>1</sup>, Аничкина О.А.<sup>1</sup>, Суходоло И.В.<sup>1</sup>, Плешко Р.И.<sup>1</sup>, Богомягков В.С.<sup>2</sup>

## Lipid-laden alveolar macrophages in induced sputum in patients with gastroesophageal reflux disease

*Volkova L.I., Anichkina O.A., Sukhodolo I.V., Pleshko R.I., Bogomyagkov V.S.*

<sup>1</sup> Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

<sup>2</sup> Городская больница № 3, г. Томск

© Волкова Л.И., Аничкина О.А., Суходоло И.В. и др.

С целью оценить диагностическую роль липидного индекса альвеолярных макрофагов в индуцированной мокроте как маркера аспирации кислого желудочного содержимого обследовано 17 больных с установленным диагнозом гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (ГЭРБ) и 10 практически здоровых лиц без патологии пищеварительного тракта. В группе пациентов с ГЭРБ выявлено максимальное число клеток с положительной реакцией на липиды ( $31,70 \pm 17,55$ ) и максимальный липидный индекс ( $45,06 \pm 17,15$ ), превышающий этот показатель в группе контроля в 5 раз ( $p < 0,05$ ).

Выявление нагруженных липидами альвеолярных макрофагов с высоким липидным индексом может стать скрининговым методом для обнаружения у больного гастроэзофагеального рефлюкса, что требует дальнейшего обследования для уточнения его причины.

Ключевые слова: гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь, индуцированная мокрота, альвеолярные макрофаги, нагруженные липидами, липидный индекс.

The aim of the study was to evaluate the diagnostic role of a lipid index of macrophages in induced sputum as a marker of aspiration of acidic gastric contents. 17 patients with the diagnosis of gastroesophageal reflux disease (GERD) and 10 healthy volunteers without any chronic digestive disorder were examined. In the group of patients with GERD, the maximal number of cells with positive reaction to lipids ( $31,70 \pm 17,55$ ) and maximal lipid index ( $45,06 \pm 17,15$ ), exceeding the control value five times, were found ( $p < 0,05$ ).

The detection of lipid-laden alveolar macrophages in induced sputum can become a screenings method for diagnostics of gastroesophageal reflux. This requires the further investigations to clear up its causes.

**Key words:** gastroesophageal reflux disease, induced sputum, lipid-laden alveolar macrophages, lipid index.

УДК 616.329./33-002

В последние годы гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь (ГЭРБ) привлекает повышенное внимание [2] как отечественных, так и зарубежных исследователей, что связано со следующими обстоятельствами.

В развитых странах мира наблюдается отчетливая тенденция к увеличению частоты ГЭРБ, значение которой определяется не только ее

распространенностью, но и утяжелением течения. За последние 10 лет в 2–3 раза чаще стали наблюдаться тяжелые рефлюкс-эзофагиты (РЭ). У 10–20% больных РЭ развивается пищевод Барретта, который является предраковым состоянием. Кроме того, установлено, что в генезе ряда ЛОР- и легочных заболеваний важное место занимает гастроэзофагеальный рефлюкс [3].

Уровень клинической диагностики ГЭРБ, особенно в стационарах широкого терапевтического профиля, остается достаточно низким. Как известно, ее диагноз базируется на использовании комплекса диагностических мероприятий, включающих эндоскопию пищевода, суточную (24-часовую) рН-метрию, рентгенографию и манометрию пищевода. Однако данные исследования трудоемки и требуют больших экономических затрат. По этой причине особую значимость приобретает поиск менее дорогих, но доступных методов диагностики аспирации желудочного содержимого.

Согласно данным литературы, наличие липидных гранул в альвеолярных макрофагах является следствием аспирации желудочного содержимого или же следствием аспирации экзогенного жира при «жировой» пневмонии [5, 6, 8, 9, 12–14]. Выявление нагруженных липидами альвеолярных макрофагов (АМ) еще до 1928 г. считалось ценным методом для диагностики пневмоний, вызванных аспирацией жиров. Метод определения альвеолярных макрофагов индуцированной мокроты и бронхоальвеолярной лаважной жидкости и в настоящее время используется зарубежными исследователями для диагностики жировой эмболии [10, 11, 16].

R.W. Corwin и R.S. Irwin [9] в 1985 г. предложили индекс липидной нагрузки макрофагов, который вычислялся на основании анализа 100 АМ, нагруженных липидами, полученных из бронхолаважной жидкости с оценкой степени загрузки каждой клетки в баллах (от 0 до 4). Сумму балльных оценок 100 альвеолярных макрофагов назвали липидным индексом. Эти авторы обследовали 9 взрослых с аспирацией желудочного содержимого, подтвержденной другими методами, и сопоставили данные с таковыми у 40 пациентов с хроническими заболеваниями дыхательных путей и у 9 здоровых добровольцев. Индекс, равный или больший 100, был на 100% чувствителен для выявления аспирации, но специфичен только на 57%. Авторы заключили, что наличие макрофагов, нагруженных липидами, в секрете нижних дыхательных путей и липидный индекс могут быть маркером аспирации [9].

Метод, предложенный R.L. Gorwin и R.S. Irwin, стал применяться и другими исследователями, в основном в педиатрической практике. E. Nissabaum и соавт. [13] сравнили данные, полученные в группе 74 детей с хроническими заболеваниями дыхательных путей и доказанным желудочно-пищеводным рефлюксом, с данными у 41 ребенка, страдающего только хроническими заболеваниями органов дыхания. Альвеолярные макрофаги, нагруженные липидами, были обнаружены у 85% больных с желудочно-пищеводным рефлюксом в бронхоальвеолярной лаважной жидкости и у 19% детей без него [14]. В работе I.K. Carney липидный индекс у детей с аспирационной пневмонией был 8–223, в среднем 150, тогда как в контрольной группе – 0–4, в среднем 1,3 [6].

В связи с вышеизложенным представляло интерес изучение АМ, содержащихся в бронхиальном секрете, на предмет наличия в них липидных гранул как диагностического критерия гастроэзофагеального заброса и микроаспирации желудочного содержимого [7, 10, 12]. В отечественной литературе данных о методе определения в бронхиальном секрете альвеолярных макрофагов, содержащих липиды, не встретилось.

Интерпретация значений липидного индекса требует знания показателей этой величины у здоровых. Однако до настоящего времени не существует общепринятых норм о количестве гранул липидов в альвеолярных макрофагах индуцированной мокроты и бронхоальвеолярной лаважной жидкости. Исследование контрольных здоровых лиц проводилось лишь в единичных работах [15, 16].

Целью работы явилось изучение альвеолярных макрофагов, нагруженных липидами, в индуцированной мокроте как маркера гастроэзофагеального рефлюкса.

## Материал и методы

Обследовано 17 больных (9 мужчин, 8 женщин) в возрасте 20–67 лет, средний возраст  $(35,9 \pm 13,4)$  года, с установленным диагнозом ГЭРБ и 10 практически здоровых лиц без патологии пищеваритель-

ного тракта. Диагноз ГЭРБ базировался на основании данных соответствующей клинической картины, эндоскопического осмотра эзофагогастральной зоны с морфологическим исследованием биоптата слизистой оболочки нижней трети пищевода. У всех включенных в исследование больных не было патологии со стороны органов грудной клетки.

Материалом для исследования явилось отделяемое бронхов, полученное с помощью метода индукцирования [1], в основе которого лежит ингаляция больным 3–5%-го раствора хлорида натрия через ультразвуковой небулайзер. Если после первого сеанса ингаляции пациент мокроту не откашливал, концентрацию хлорида натрия повышали на 1%, т.е. последовательно использовали 3-, 4-, 5%-й солевые растворы. После ингаляции пациенты тщательно полоскали рот и старались откашливать мокроту в стерильные контейнеры.

Мокрота исследовалась не позднее 2 ч после ее получения. Для цитологического исследования полученный материал гомогенизировали, после чего проводился подсчет абсолютного числа клеток в расчете на 1 мл. Затем готовили цитологические препараты путем нанесения взвеси клеток в виде тонкого мазка на предметное стекло (не менее 2 стекол на каждого пациента). Мазки мокроты фиксировали в 10%-м растворе нейтрального формалина и окрашивали суданом-III. Эта методика дает возможность прямого обнаружения капелек жира в альвеолярных макрофагах [4]. При этом ядра окрашиваются в синий цвет, липиды – в оранжево-красный. Подсчитывались 100 последовательно попавших в поле зрения макрофагов и рассчитывался липидный индекс; оценка результатов производилась в соответствии с 5-балльной шкалой, рекомендованной Gorwin и Irvin [7, 9] (табл. 1).

Липидный индекс вычислялся по следующей формуле:

$$(1 \cdot N_1) + (2 \cdot N_2) + (3 \cdot N_3) + (4 \cdot N_4),$$

где цифры – число баллов;  $N_1, N_2, N_3, N_4$  – число альвеолярных макрофагов 1-й, 2-й, 3-й, 4-й степени нагруженности гранулами липидов.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета программ Statistica for Windows 6.0 с

использованием непараметрического критерия Манна–Уитни для независимых совокупностей. Данные исследования представлены в виде  $M \pm SD$ , где  $M$  – среднее значение;  $SD$  – стандартное отклонение. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Индуцированную мокроту удалось получить у всех обследуемых. Липидный индекс также был рассчитан во всех случаях.

Проведенное цитохимическое исследование альвеолярных макрофагов индуцированной мокроты с подсчетом в них гранул липидов показало увеличение количества клеток с положительной реакцией на липиды в группе больных ГЭРБ по сравнению со здоровыми (табл. 2), что совпадает с данными литературы [6, 10]. В группе здоровых людей в среднем найдено  $8,2 \pm 0,86$  альвеолярных макрофагов, нагруженных липидами, липидный индекс в среднем составил  $8,2 \pm 0,86$ . Все они были со степенью нагруженности в 1 балл, т.е. в цитоплазме макрофагов обнаруживалось не более 5 липидных гранул.

Таблица 1

Оценка альвеолярного макрофага по степени содержания в нем гранул липидов

Степень нагруженности альвеолярного макрофага липидами	Количество гранул	Оценка нагруженности альвеолярного макрофага липидами, балл
1-я	До 5	1
2-я	До 10	2
3-я	Гранулы заполняют всю цитоплазму	3
4-я	Гранулы заполняют всю цитоплазму и располагаются на ядре	4

Таблица 2

Количество альвеолярных макрофагов, нагруженных липидами в индуцированной мокроте и липидный индекс у здоровых и больных ГЭРБ ( $M \pm SD$ )

Показатель	Контроль (n = 10)	Больные ГЭРБ (n = 17)	p
Число альвеолярных макрофагов с положительной реакцией на липиды	$8,2 \pm 0,86$ (от 3–10)	$31,70 \pm 17,55$ (от 16–80)	0,0003
Число альвеолярных макрофагов со степенью нагруженности липидами:			
в 1 балл	$8,2 \pm 0,86$ (от 3–10)	$17,47 \pm 3,99$ (от 13–24)	0,00001
в 2 балла	0	$5,35 \pm 4,00$ (от 0–12)	0,0003
в 3 балла	0	$3,71 \pm 9,55$ (от 0–40)	
в 4 балла	0	$1,24 \pm 3,61$ (от 0–15)	
Липидный индекс, балл	$8,2 \pm 0,86$ (от 3–10)	$45,06 \pm 17,15$ (от 16–217)	0,02

Примечание. В скобках указаны минимальная и максимальная величины показателей.

В группе пациентов с ГЭРБ выявлено максимальное число клеток с положительной реакцией на липиды, оно превышало контрольные показатели в среднем 3,9 раза. Количество альвеолярных макрофагов со степенью нагруженности липидами в 1 балл составило в среднем  $17,47 \pm 3,99$ , число клеток со степенью нагруженности в 2 балла –  $5,35 \pm 4,00$ . Только у больных

найжены клетки со степенью нагруженности в 3 балла, где вся цитоплазма была заполнена гранулами липидов. Также у них встречались альвеолярные макрофаги, в которых гранулы липидов располагались даже на ядре (нагруженность липидами в 4 балла), количество таких клеток составило в среднем  $1,24 \pm 3,61$ . Липидный индекс у больных рефлюкс-эзофагитом составил

45,06 ± 17,15, что превышало контрольные значения в 5 раз (табл. 2).

Использованный в исследовании метод оценки липидного индекса альвеолярных макрофагов уже применялся раньше зарубежными исследователями [7, 9, 15]. Но лишь в единичных работах проводилось исследование здоровых лиц. Выявлен невысокий липидный индекс у здоровых людей, что совпадает с данными литературы [15]. Появление нагруженных липидами альвеолярных макрофагов в индуцированной мокроте здоровых людей, вероятно, связано либо с физиологическим гастроэзофагеальным рефлюксом, который может быть и в норме, либо с тем, что альвеолярные макрофаги могут фагоцитировать клетки, в состав мембран которых входят фосфолипиды, которые могут давать положительную реакцию.

Следует подчеркнуть, что у здоровых встречались альвеолярные макрофаги с нагруженностью их липидами не более чем в 1 балл, а альвеолярные макрофаги, степень нагрузки липидами которых превышала 1 балл, имели место у только у больных ГЭРБ [7, 15].

### Заключение

Таким образом, выявление нагруженных липидами альвеолярных макрофагов с высоким липидным индексом может играть роль скрининга для определения наличия у больного гастроэзофагеального рефлюкса, что требует дальнейшего обследования для уточнения его причины.

### Литература

1. Авдеев С.Н., Анаев Э.Х., Чучалин А.Г. Применение метода индуцированной мокроты для оценки интенсивности воспаления дыхательных путей // Пульмонология. 1998. № 2. С. 81–86.
2. Гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь: клиника, диагностика, лечение [Электронный ресурс] / Под ред. А.В. Калинина. Электрон. дан. Режим доступа: [http:// www.nedug.ru](http://www.nedug.ru).

3. Иванова О.В., Исаков В.А., Морозов С.В. и др. Внепищеводные проявления гастроэзофагеальной рефлюксной болезни // Болезни органов пищеварения. 2004. № 2.
4. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. В.В. Меньшикова. М.: Медицина, 1987. 365 с.
5. Bandla H., Davis S., Hopkins N. Lipoid pneumonia: a silent complication of mineral oil aspiration // Pediatrics. 1999. V. 103. P. 19–22.
6. Carney I.K., Gibson P.G., Muree-Allen K. et al. A systemic evaluation of mechanisms in chronic cough // Am. J. Respir. Crit. Care. Med. 1997. V. 156. P. 211–216.
7. Colombo J.L. Pulmonary aspiration and lipid-laden macrophages: in search of gold (standards) // Pediatric Pulmonology. 1999. V. 28. P. 79–82.
8. Colombo J.L., Hallberg T.K. Recurrent aspiration in children: lipid-laden alveolar macrophage quantitation // Pediatr. Pulmonol. 1987. V. 3. P. 86–89.
9. Corwin R.W., Irwin R.S. The lipid-laden alveolar macrophages as a marker of aspiration in parenchymal lung disease // Am. Rev. Respir. Dis. 1985. V. 132. P. 576–581.
10. Godeau B., Schaeffer A., Bachir D. et al. Bronchoalveolar lavage in adult sickle cell patients with acute chest syndrome: value for diagnostic assessment of fat embolism // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1996. V. 153. P. 1691–1696.
11. Kazachkov M.Y., Muhlebach M.S., Livasy C.A., Noah T.L. Lipid-laden macrophage index and inflammation in bronchoalveolar lavage fluids in children // Eur. Respir. J. 2001. V. 18. P. 790–795.
12. Langston C., Pappin A. Lipid-laden alveolar macrophages as an indicator of aspiration pneumonia // Arch. Pathol. Lab. Med. 1996. V. 120. P. 326–329.
13. Nissabaum E., Maggi J.C., Mathis R., Galant S.P. Association of lipid-laden alveolar macrophages and gastroesophageal reflux in children // J. Pediatr. 2002. V. 140. P. 190–194.
14. Okan E., Fan L.L., Giuseppe C. Novel diagnostic method for pulmonary aspiration in a murine model // Am. J. Respir. Crit. Care. Med. 2000. V. 161. P. 622–626.
15. Parameswaran K., Anvari M., Efthimiadis A. et al. Lipid-laden macrophages in induced sputum are a marker of oropharyngeal reflux and possible gastric aspiration // Eur. Respir. J. 2000. V. 16. P. 1119–1122.
16. Vichinsky E., Williams R., Das M. et al. Pulmonary fat embolism: a distinct cause of severe acute chest syndrome in sickle cell anemia // Blood. 1994. V. 83. P. 3107–3112.

Поступила в редакцию 26.01.2006 г.