

SUBPOPULACE T-LYMFOCYTŮ V BRONCHOALVEOLÁRNÍ LAVÁŽI U PLICNÍ SARKOIDÓZY A U JINÝCH ONEMOCNĚNÍ PLICNÍHO INTERSTICIA

M. PETŘEK, V. KOLEK

Oddělení imunologie FN Olomouc, přednosta doc. MUDr. E. Weigl, CSc.
Klinika tuberkulózy a respiračních nemocí FN Olomouc, přednosta doc. MUDr. O. Ošťádal, CSc.

Souhrn

V bronchoalveolární laváži 17 pacientů s plicní sarkoidózou a v laváži 18 pacientů s jinými onemocněními plicního intersticia byly pomocí monoklonálních protilátek stanoveny subpopulace T-lymfocytů. V laváži u sarkoidózy výrazně dominovaly pomocné-indukující lymfocyty (CD4+), zatímco u jiných intersticiálních plicních onemocnění byla zjištěna převaha tlumivých-cytotoxických lymfocytů (CD8+). Rozdílné zastoupení CD4+ a CD8+ lymfocytů se projevilo zvláště výrazně při posuzování pomocí poměru CD4/CD8, který u sarkoidózy činil $7,2 \pm 3,5$, zatímco u jiných intersticiálních onemocnění plic jen $0,9 \pm 0,6$. Prezentované výsledky naznačují možnosti praktického využití stanovení lymfocytárních subpopulací v bronchoalveolární laváži pro diferenciální diagnostiku intersticiálních plicních onemocnění.

Klíčová slova: CD4+ a CD8+ lymfocyty, bronchoalveolární laváž, diferenciální diagnostika intersticiálních onemocnění plic.

Summary

Petršek M., Kolek V.: T-lymphocyte Subpopulations in Bronchoalveolar Lavage in Pulmonary Sarcoidosis and in Other Diseases of the Pulmonary Interstitium

In the bronchoalveolar lavage of 17 patients with pulmonary sarcoidosis and in the lavage of 18 patients with other diseases of the pulmonary interstitium the authors assessed by means of monoclonal antibodies, T-lymphocyte subpopulations. In the lavage from sarcoidosis helper-inducer lymphocytes (CD4+) dominated markedly, while in other interstitial pulmonary diseases a predominance of suppressor-cytotoxic lymphocytes (CD8+) was found. The different ratio of CD4+ and CD8+ lymphocytes was manifested particularly markedly when for evaluation the CD4/CD8 ratio was used: in sarcoidosis it was 7.2 ± 3.5 , while in other interstitial lung diseases only 0.9 ± 0.6 . The presented results indicate possible practical use of assessment of lymphocyte subpopulations in bronchoalveolar lavage for the differential diagnosis of interstitial lung diseases.

Key words: CD4+ and CD8+ lymphocytes, bronchoalveolar lavage, differential diagnosis of interstitial lung diseases.

Čas. Lék. Čes., 132, 1993, No. 12, p. 365–368.

■

Úvod

Odlišení plicní sarkoidózy od ostatních onemocnění, postihujících plicní intersticiu (např. exogenní alergické alveolitidy, pneumokoniózy, plicní fibrózy), je často problematické [5, 6]. V patogenézi těchto onemocnění se uplatňují imunitní me-

chanismy. Na narušené imunitní odpovědi vedoucí až ke vzniku granulomů nebo plicní fibrózy se důležitou měrou podílejí makrofágy a T-lymfocyty [7, 11, 14, 16]. U sarkoidózy jsou plicní alveoly infiltrovány převážně CD4+ lymfocyty [2, 3, 8, 10, 16], údajů o fenotypu lymfocytů v plicích pacientů s jinými intersticiálními procesy je méně [4, 8, 12].

Sledovali jsme proto zastoupení T-lymfocytů a jejich subpopulací v bronchoalveolární laváži pacientů s plicní sarkoidózou a pacientů s jinými intersticiálními plicními onemocněními. O získaných výsledcích a o možnostech jejich využití v diferenciální diagnostice intersticiálních onemocnění plic informuje toto sdělení.

Soubor nemocných a použité metody

Vyšetřili jsme celkem 35 nemocných, z toho 17 pacientů s plicní sarkoidózou a 18 nemocných s jinými intersticiálními plicními onemocněními, průměrný věk v obou skupinách byl prakticky stejný (45–50 let). Diagnóza sarkoidózy u našich pacientů byla souběžně nebo později potvrzena biopsicky, popř. Kveimovým testem. Do skupiny jiných intersticiálních onemocnění jsme zařadili exogenní alergickou alveolitidu (5 nemocných), difúzní fibrotizující alveolitidu (5 pacientů), 3 nemocné pneumokoniózou (2krát asbestóza, 1krát svářečská plicce) a také 5 pacientů s jinými diseminovanými plicními procesy (alveolární proteinóza, aspergillóza, bronchoalveolární karcinom, eozinofilní granulom a karcinomatózní lymfangitida). Žádný z nemocných nebyl před vyšetřením léčen kortikosteroidy.

Bronchoalveolární laváž

Bronchoalveolární laváž (dále BAL) byla provedena pomocí fibrobronchoskopu (Olympus BF 1 T 10, event. Pentax FB 18 X). Do subsegmentálního, popř. segmentálního bronchu středního plicního laloku nebo linguly bylo postupně instilováno 7 x 20 ml sterilního fyziologického roztoku. Z odebraného vzorku BAL bylo k vyšetření lymfocytárních subpopulací použito cca 50 ml aspirované tekutiny. Zbývající část laváže sloužila k cytologickému vyšetření (stanovení celkového počtu buněk hemocytometrem a diferenciálního rozpočtu barvením podle May-Grünwald-Giemsa).

Isolace bronchoalveolárních lymfocytů a stanovení lymfocytárních subpopulací

Filtrací přes gázu byly z vyšetřovaného vzorku odstraněny epitelié, hlen a další nežádoucí příměsi. Poté byl vzorek centrifugován (2000 ot/min po dobu 5 min.) a buněčný sediment byl resuspendován v 8 ml fosfátového fyziologického roztoku (PBS). Další postup se nelišil od izolace mononukleárních buněk z periferní krve [1]: 2 ml buněčné suspenze bylo opatrně navrstveno na 3 ml Ficoll–Verografinového hustotního gradientu (specifická hmotnost 1077 kg/m³) a zkumavky byly centrifugovány 30 minut při 3000 ot/min. Prstenec mononukleárních buněk viditelný proti světlu na rozhraní gradientu

a ostatní tekutiny byl šetrně aspirován Pasteurovou pipetou. Získané buňky byly po proprání v PBS adjustovány na koncentraci přibližně $1,5 \cdot 10^6/\text{ml}$.

Identifikace lymfocytárních subpopulací byla provedena nepřímou imunofluorescenční technikou formou mikrometody [13]. Na primární monoklonální protilátky série OKT (Ortho Diagnostics, Raritan, N. J.) byly ve druhém stupni navázány prasečí-proti-myší imunoglobuliny konjugované s fluoresceinizothiocyanátem (SwAM-FITC, ÚSOL Praha). CD4+ lymfocyty byly u 12 pacientů stanoveny i přímou imunofluorescencí s monoklonální protilátkou konjugovanou s Phycoerythrinem (Leu 3a-PE, Becton-Dickinson, Heidelberg). Vyhodnocování bylo provedeno pomocí fluorescenčního mikroskopu Leitz-Diavert (Leitz-Wetzlar, SRN) při celkovém zvětšení 315krát, počet hodnocených buněk činil 150–200.

Statistická významnost rozdílů v zastoupení sledovaných lymfocytárních subpopulací u sarkoidózy a u jiných intersticiálních onemocnění plic byla hodnocena pomocí Wilcoxonova [Mann-Whitneyova] neparametrického testu pro dva nezávislé výběry.

Výsledky

T-lymfocyty (CD 3+) představují u sarkoidózy i u ostatních sledovaných plicních onemocnění asi tři čtvrtiny bronchoalveolárních lymfocytů (tab. 1 a graf 1 a 2). Obě skupiny onemocnění se však výrazně liší zastoupením CD 4+ (pomocných-indukujících) a CD 8+ (tlumivých-cytotoxických) lymfocytů. V BAL u sarkoidózy značně převažují CD 4+ lymfocyty nad CD 8+ lymfocyty ($P < 0,01$). Naproti tomu u jiných intersticiálních onemocnění plic jsou CD 4+ lymfocyty v menšině a v laváži převládají CD 8+ lymfocyty ($P < 0,05$). Rozdíly v zastoupení subpopulací bronchoalveolárních T-lymfocytů se projeví zvláště výrazně při posuzování pomocí poměru CD 4/CD 8: neobvykle vysoká hodnota tohoto ukazatele u pacientů se sarkoidózou kontrastuje s jeho nízkou hodnotou u pacientů s jinými intersticiálními plicními procesy.

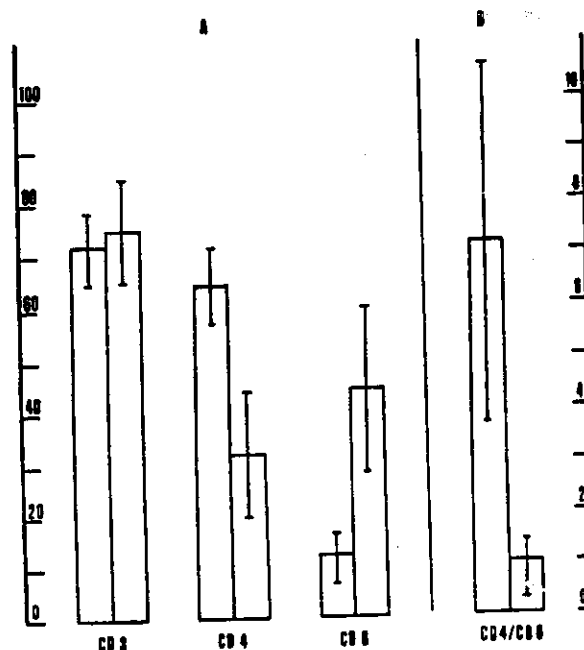
Tab. 1. Zastoupení T-lymfocytů a jejich subpopulací v BAL (v %) u sarkoidózy a u jiných onemocnění plicního intersticia

	n	CD 3	CD 4	CD 8	CD 4/CD 8
Sarkoidóza	17	72 ± 7	64 ± 7	11 ± 5	$7,2 \pm 3,5$
Jiná onemocnění	18	75 ± 10	32 ± 12	44 ± 16	$0,9 \pm 0,6$
Statist. významnost		NS	**	**	**

n (počet pacientů), ** ($p < 0,01$), NS (nevýznamný rozdíl)

U 16 ze 17 vyšetřených pacientů se sarkoidózou je poměr CD 4/CD 8 vyšší než 3,2 (graf 2), což odpovídá 90 % specificitě správné diagnózy sarkoidózy podle Costabela [4]. Průměrná hodnota poměru CD 4/CD 8 zaznamenaná v našem souboru pak dosahuje 98% specificity správné diagnózy. Vyhodnocení zastoupení bronchoalveolárních lymfocytárních subpopulací u našich pacientů s různými rtg-stadii sarkoidózy ukázalo, že převažuje CD 4+ lymfocytů je nejvýraznější u II. rtg-stadia (tab. 2).

U většiny (72 %) pacientů s jinými intersticiálními procesy nepřesahuje poměr CD 4/CD 8 hodnotu 1,0, pouze u 1 pacienta je vyšší než 2,0 (graf 2).



Graf 1. Průměrné hodnoty (v %) zastoupení subpopulací T-lymfocytů (A) a průměrné hodnoty poměru CD 4/CD 8 (B) v bronchoalveolární laváži u sarkoidózy (první sloupec ve skupině) a v laváži u jiných intersticiálních onemocnění (druhý sloupec), CD 3: celkové T-lymfocyty, CD 4: pomocné-indukující T-lymfocyty, CD 8: tlumivé-cytotoxické T-lymfocyty

Zastoupení CD 4+ a CD 8+ lymfocytů je u všech onemocnění zařazených do této heterogenní skupiny přibližně stejné, pouze u pneumokonióz jsme zaznamenali relativně nejnížší počet CD 4+ lymfocytů (tab. 3).

U všech našich pacientů jsme provedli také cytologické vyšetření bronchoalveolární laváže (tab. 4). Mezi sarkoidózou a jinými intersticiálními procesy

nebyl nalezen podstatný rozdíl v celkovém počtu buněk, ani v relativním zastoupení lymfocytů, ma-

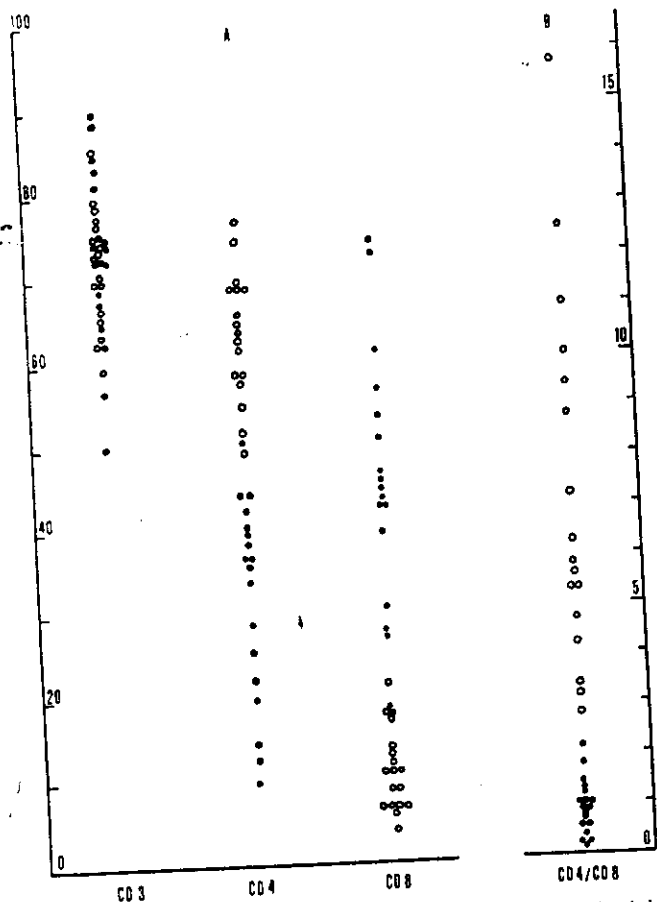
Tab. 2. CD 4+ a CD 8+ lymfocyty v BAL (v %) u I., II. a III. rentgenologického stadia sarkoidózy

	n	CD 4	CD 8	CD 4/CD 8
I	8	61 ± 7	12 ± 5	$6,6 \pm 4,2$
II	5	70 ± 6	9 ± 5	$9,3 \pm 3,1$
III	4	61 ± 7	11 ± 2	$5,6 \pm 1,4$

Diskuse

Současné názory na etiopatogenezi sarkoidózy vycházejí z představy, že aktivované makrofágy předkládají CD 4+ lymfocytům zatím blíže neurčený antigen, a tím je zahájen sled imunitních reakcí vedoucích k tvorbě granulomů, fibróze, event. až k systémovému postižení [11, 16]. Převahu CD 4+ lymfocytů typickou pro alveolitidu u sarkoidózy popsal Hunninghake [10]. Další autoři pak analyzovali fenotyp CD 4+ lymfocytů [2, 8], korelovali zastoupení CD 4+ lymfocytů s aktivitou onemocnění [3] a rozebírali význam zvýšení bronchoalveolárních CD 4+ lymfocytů pro prognózu onemocnění [17]. Většinové zastoupení CD 4+ lymfocytů, zjištěné v BAL všech našich pacientů, uvedené literární údaje potvrzuje a doplňuje je o předběžný závěr (malý počet pacientů), že CD 4+ lymfocyty dominují zejména v BAL pacientů s II. rtg-stádiem onemocnění.

Imunitní mechanismy se uplatňují nejen v patogenezi sarkoidózy, ale i při vzniku a rozvoji řady jiných onemocnění postihujících plicní intersticiu [15]. Na rozdíl od sarkoidózy, údaje o zastoupení bronchoalveolárních T-lymfocytů u jiných intersticiálních onemocnění plic jsou skromnější. Např. Ginns [9] popsal mírnou dominanci CD 8+ lymfocytů v laváži u idiopatických plicních fibróz, podobné nálezy byly zaznamenány i u některých alergických alveolitid [12]. Naše výsledky jsou s těmito pozorováními ve shodě. Většinové zastoupení CD 8+ lymfocytů jsme našli nejen u obou výše citovaných onemocnění, ale i u pneumokoniózy a u ostatních diseminovaných plicních procesů [např. u alveolární proteínózy, u aspergilózy apod.]. Z hlediska bližšího určení povahy imunologických změn provázejících intersticiální plicní onemocnění je zajímavé naše pozorování velmi nízkého počtu CD 4+ lymfocytů v BAL u pneumokoniózy. Tento předběžný nálezy je však třeba prověřit na rozsáhlejší souboru nemocných.



Graf 2. Distribuce subpopulací bronchoalveolárních T-lymfocytů (A) a hodnot poměru CD 4/CD 8 (B) v souboru 17 pacientů se sarkoidózou (prázdné kroužky) a ve skupině 18 pacientů s jinými onemocněními plicního intersticia (plné kroužky). Ostatní v legendě u grafu 1

krofágů a neutrofilů. Nebyl také pozorován žádný vztah mezi cytologickými parametry a zastoupením subpopulací T-lymfocytů v BAL.

Tab. 3. CD 4+ a CD 8+ lymfocyty v BAL (v %) u onemocnění zařazených do skupiny intersticiálních plicních procesů

	n	CD 4	CD 8	CD 4/CD 8
Exogenní alergická alveolitida	5	35 ± 11	42 ± 15	1,0 ± 0,5
Difúzní fibrotizující alveolitida	5	36 ± 9	44 ± 14	0,9 ± 0,2
Pneumokoniózy	3	30 ± 12	46 ± 6	0,7 ± 0,3
Jiné diseminované plicní procesy	5	36 ± 13	37 ± 9	1,0 ± 0,6

Tab. 4. Procentuální zastoupení lymfocytů (L), makrofágů (M) a neutrofilů (N) u sarkoidózy a jiných intersticiálních plicních onemocnění (C – celkový počet buněk v laváži)

	n	L	M	N	C
Sarkoidóza	14	21 ± 11	78 ± 11	1 ± 1	(7,7 ± 6,0) · 10 ⁶ /l
Jiná onemocnění	14	14 ± 13	77 ± 16	5 ± 8	(7,2 ± 8,1) · 10 ⁶ /l

Výsledky prezentované v této práci jednoznačně ukazují, že sarkoidóza a jiná intersticiální onemocnění plic se výrazně liší zastoupením CD 4+ a CD 8+ lymfocytů v bronchoalveolární laváži. Této skutečnosti lze prakticky využít k diferenciálně diagnostickému odlišení plicní sarkoidózy od jiných onemocnění plicního intersticia.

Autoři děkují D. Tomanové a A. Špidlové za pomoc při izolaci a značení lymfocytů.

Literatura

1. **Boyum, A.:** Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *J. clin. Lab. Invest.*, 21, suppl. 97, 1968, s. 77–78. — 2. **Ballin, A. et al.:** Bronchoalveolar Lavage bei Sarkoidosepatienten — Methodische Aspekte der Gewinnung, immunologische Charakterisierung von Lymphozyten und Untersuchung zum Immunoglobulingehalt. *Z. Erkrang. Atm. Org.*, 170, 1988, s. 108–117. — 3. **Ceuppens, J. L. et al.:** Alveolar T-cell subsets in pulmonary sarcoidosis: correlation with disease activity and effect of steroid treatment. *Amer. Rev. respir. Dis.*, 129, 1984, s. 563–568. — 4. **Costabel, U., Kroegel, H., Teschler, H.:** Immunologische Befunde in Blut und bronchoalveolar Lavage bei interstitiellen Lungenerkrankungen. *Med. Welt*, 39, 1988, s. 623–627. — 5. **DeRemee, R. A.:** Sarcoidosis — current perspectives on diagnosis and treatment. *Postgrad. Med.*, 76, 1984, s. 167–172. — 6. **DeRemee, R. A.:** Diffuse interstitial pulmonary disease from the perspective of the clinician. *Chest*, 92, 1987, s. 1068–1073. — 7. **Fick, R. B., Hunninghake, G. W.:** Sarcoidosis. In: Samter, M. (ed.): *Clinical Immunology*, Oxford Blackwell Scientific Publications

1988, s. 1587–1607. — 8. **Gerli, R. et al.:** Analysis of CD 4 positive T cell subpopulation in sarcoidosis. *Clin. exp. Immunol.*, 73, 1988, s. 226–229. — 9. **Ginns, L. C. et al.:** T-Lymphocyte Subsets in Peripheral Blood and Lung Lavage in Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Sarcoidosis: Analysis by Monoclonal Antibodies and Flow Cytometry. *Clin. Immunol. Immunopat.*, 25, 1982, s. 11–20. — 10. **Hunninghake, G. W., Crystal, R. G.:** Pulmonary Sarcoidosis: A disorder mediated by excess helper T-lymphocytes activity at sites of disease activity. *New Engl. J. Med.*, 305, 1981, s. 429–434. — 11. **James, D. G.:** What makes granulomas tick? *Thorax*, 46, 1991, s. 734–736. — 12. **Keller, R. H. et al.:** Immunoregulation in Hypersensitivity Pneumonitis: Phenotypic and Functional Studies of Bronchoalveolar Lavage Lymphocytes. *Amer. Rev. respir. Dis.*, 130, 1984, s. 766–771. — 13. **Petfek, M.:** Identification of lymphocyte subpopulations by indirect immunofluorescence — a micromethod. *Acta Univ. Palack. Olomucensis, Fac. Med.* 129, 1991, s. 51–56. — 14. **Spiteri, M. A. et al.:** Phenotypic and functional changes in alveolar macrophages contribute to the pathogenesis of pulmonary sarcoidosis. *Clin. exp. Immunol.*, 74, 1988, s. 359–364. — 15. **Stankus, R. P., Salvaggio, J. E.:** Infiltrative Lung Disease: Hypersensitivity Pneumonitis, Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis and the Inorganic Dust Pneumoconioses. In: Samter, M.: *Clinical Immunology*, Oxford, Blackwell Scientific Publications 1988, s. 1561–1585. — 16. **Thomas, P. D., Hunninghake, G. W.:** Current concepts of the pathogenesis of sarcoidosis. *Amer. Rev. Respir. Dis.*, 135, 1987, s. 747–760. — 17. **Verstraeten, A. et al.:** Predictive Value of Bronchoalveolar Lavage in Pulmonary Sarcoidosis. *Chest*, 98, 1990, s. 560–567.

Adresa: M. P., 775 20 Olomouc., I. P. Pavlova 6

Vážený čtenáři,

pokud toto číslo ČASOPISU LÉKAŘŮ ČESKÝCH, které jste právě dočetl, nepatří Vám — pak je to jenom proto, že jste si dosud tento časopis nepředplatil. **NEZAPOMĚŇTE TAK UDĚLATI**

Časopis lékařů českých je

- náš nejstarší lékařský časopis (vychází již 132 let — bez přerušení!)
- náš prestižní časopis (největší počet cen odborných lékařských společností připadá na práce otištěné právě v něm; je náš nejcitovanější časopis)
- časopis, v němž najdete právě ty články, které potřebujete (typu postgraduálního doškolení, souhrnné články — informativní — na aktuální témata psaná našimi i zahraničními odborníky, informace o nových vyšetřovacích metodách v klinice a laboratoři i o novinkách v terapii, zprávy ze sjezdů, symposií a medicíně v zahraničí)
- časopis přinášející zprávy o dění v České lékařské společnosti, České lékařské komoře, Svazu českých lékařů, Spolku českých lékařů — o dění v lékařském světě doma i v zahraničí
- původní vědecké práce ze všech oborů medicíny, monotematická čísla k významným tématům, medicínské etice aj.

PŘEDPLACENÍM Časopisu lékařů českých si zaručujete ZDROJ MODERNÍCH INFORMACÍ potřebných pro Vaši každodenní práci i proto, abyste byli „UP-TO-DATE“.

Česká lékařská společnost
Nakladatelské středisko
Sokolská 31, 120 26 Praha 2
Tel. a fax 02 / 20 27 88