

# Применение метода индуцированной мокроты у детей с впервые выявленной бронхиальной астмой: цитологические особенности

Я.И. Жаков, О.Г. Рыбакова, М.С. Бабайлов

## Clinical application of induced sputum in children with newly diagnosed asthma: cellular and immunologic characteristics

Y.I. Zhakov, O.G. Rybakova, M.S. Babaylov

### Резюме

Проводился подсчет клеток и определение иммунологических факторов в индуцированной мокроте у детей с впервые выявленной бронхиальной астмой и здоровых детей без атопии. Целью исследования было выявление цитологических особенностей индуцированной мокроты у детей раннего возраста с впервые выявленной бронхиальной астмой. В исследовании приняли участие 35 детей в возрасте 1,5-5 лет (средний возраст 3,5г.); 18 детей с впервые выявленной бронхиальной астмой и 17 практически здоровых детей без атопии – контрольная группа. У всех детей в исследовании в течение предшествующего месяца не было зарегистрировано эпизодов респираторной инфекции. Индукция мокроты проводилась по модифицированному нами протоколу с использованием гипертонического раствора хлорида натрия. Прототипом явился метод, разработанный Pin et al., исследовался клеточный состав (%) (макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, лимфоциты) и иммунологический профиль (IgE, sIgA, IgG4, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-8, IL-13, TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ , NO $_3$ , NOX) индуцированной мокроты.

**Результаты.** У детей с впервые выявленной бронхиальной астмой в индуцированной мокроте уровень эозинофилов (%) достоверно выше, а уровень макрофагов (%) достоверно ниже по сравнению со здоровыми детьми без атопии. Так же у детей с бронхиальной астмой выявлены более высокие концентрации провоспалительных цитокинов (ФНО $\alpha$ , ИЛ 4, IL-1 $\beta$ , ИЛ8, ИЛ 13), иммуноглобулинов (IgE, IgG4) участвующих в аллергическом воспалении бронхов при бронхиальной астме и конечных стабильных метаболитов оксида азота (NO $_3$ , NOX) по сравнению с показателями здоровых детей без атопии.

**Ключевые слова:** дети с впервые выявленной бронхиальной астмой, индуцированная мокрота, макрофаги мокроты, эозинофилы мокроты, иммунологический профиль индуцированной мокроты.

### Summary

Authors investigate cells and immunologic factors of induced sputum in children with newly diagnosed asthma and healthy children without atopy. The aim of the study was to find out the differences of cellular and immunologic profiles of induced sputum in children with newly diagnosed asthma.

35 children aged 1.5-5 years old (Me = 3.5 years) were include in this study: 18 children with newly diagnosed asthma and 17 children (control group) without allergic diseases, which had no respiratory symptoms during last month. Sputum induction carried out according to our modification of protocol developed by Pin et al. The levels of IgE, sIgA, IgG4, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-8, IL-13, TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ , NO $_3$ , NOX and cells percentage (macrophages, neutrophils, eosinophils, lymphocytes) were evaluated in sputum.

**Results.** The percentage of eosinophils was significantly higher and the percentage of macrophages was significantly lower in induced sputum of children with newly diagnosed asthma. The levels of proinflammatory factors (IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-8, IL-13, TNF $\alpha$ ), immunoglobulins, which participate in allergic inflammation (IgE, sIgA, IgG4) and stable metabolites of NO (NO $_3$ , NOX) in sputum were also significantly higher in children with newly diagnosed asthma.

**Key words:** children with newly diagnosed asthma, induced sputum, macrophages in sputum, eosinophils in sputum, immunologic profiles of induced sputum.

### Введение

Актуальность проблемы бронхиальной астмы у детей обусловлена ее большой распространенностью, которая в разных странах варьируется от 0 до 30%, «омоложением», не менее 50% детей заболевают в первые 3 года жизни, отсутствием типичной клинической картины [1,2,3,5,6,18]. У детей в возрасте до 5 лет астма недостаточно изучена, и до 2008 года не существовало ни одного международного согласительного документа для детей данной возрастной группы [6].

В последнее время, бронхиальная астма рассматривается как заболевание, в основе которого лежит хроническое аллергическое воспаление дыхательных путей, характеризующееся инфильтрацией слизистой дыхательных пу-

---

*Я.И. Жаков д.м.н, профессор, зав. кафедрой детских болезней и поликлинической педиатрии №1 ЧелГМА г. Челябинск.*

*О.Г. Рыбакова, врач аллерголог-иммунолог, очный аспирант кафедры детских болезней и поликлинической педиатрии №1 ЧелГМА г. Челябинск.*

*М.С. Бабайлов, врач аллергоотделения МУЗ ГКБ №1 г. Челябинск, очный аспирант кафедры детских болезней и поликлинической педиатрии №1 ЧелГМА г. Челябинск.*

тей эозинофилами, тучными клетками, активированными Т-лимфоцитами, с участием медиаторов воспаления [2,6,19]. Многими исследователями отмечено повышение уровня эозинофилов в мокроте у больных с бронхиальной астмой по сравнению со здоровыми людьми [2,6,19,20].

Воспалительные изменения (клеточные, иммунологические) на уровне бронхов в детском возрасте остаются недостаточно изученными. Своевременное выявление и оценка активности аллергического воспаления дыхательных путей важны для диагностики и контроля бронхиальной астмы [20, 19].

Основные патологические изменения при бронхиальной астме происходят на уровне бронхиального дерева, поэтому целесообразно проводить анализ мокроты с целью изучения цито-иммунологических, воспалительных сдвигов на топическом уровне. Для получения мокроты у детей раннего возраста мы использовали модифицированный на нашей кафедре метод индуцированной мокроты, который является неинвазивным, недорогим методом оценки характера и интенсивности воспаления в бронхах и легочной ткани [17,19].

## Цель

Выявить цито-иммунологические изменения в индуцированной мокроте у детей раннего возраста с впервые выявленной бронхиальной астмой.

## Материалы и методы

Набор пациентов для участия в исследовании проводился на базе отделения патологии детей раннего возраста и детского аллергологического центра Муниципального Учреждения Здравоохранения Городской Клинической Больницы №1 г. Челябинска.

До включения в исследование дети с бронхиальной астмой не получали базисной терапии, так же у пациентов не было зафиксировано эпизодов острых респираторных заболеваний в течение предшествующего месяца.

Проводился сбор анамнеза, исследование индуцированной мокроты.

Индукция мокроты проводилась по модифицированному нами протоколу с использованием гипертонического раствора хлорида натрия. Прототипом явился метод, разработанный Pin et al. в модификации Popov et al.

Статистическая обработка материала выполнена на базе пакетов прикладных программ SPSS 12.0, Microsoft Excel xp. Данные представлены в виде Me [Q25-Q75].

## Результаты и обсуждение

В исследование были включены 35 детей в возрасте от 1,5 до 5 лет (средний возраст - медиана – 3г. 6 мес.). Распределение по полу: 20 мальчиков (57%) и 15 девочек (43%).

В соответствии с задачей исследования дети были разделены на группы:

1-я группа – дети с впервые выявленной бронхиальной астмой (больные соответствовали критериям диагноза, изложенным в Национальной программе «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактики», второе издание, Москва, 2006): 18 детей (12 – мальчиков, 6 - девочек);

2-я группа – контрольная, практически здоровые дети без атопии: 17 детей (8 – мальчиков, 9 - девочек).

В соответствии с целями работы изучен анамнез детей, клеточный состав и иммунологический профиль индуцированной мокроты.

В последние годы идет накопление данных о нормах процентного содержания клеток в индуцированной мокроте у здоровых детей разных возрастных групп и фиксация сдвигов клеточного состава, характерных для различных патологических состояний. Данных по индуцированной мокроте у детей младше 5 лет найдено не было. P.G. Gibson et al. (2001) в своем исследовании показал, что уровень эозинофилов в индуцированной мокроте следует считать патологическим когда он составляет  $\geq 2,5\%$ .

В этом исследовании за диагностически значимый уровень эозинофилов в индуцированной мокроте принят показатель  $> 2,5\%$ . Всем пациентам было проведено исследование клеточного состава индуцированной мокроты, данные представлены ниже в таблице №1.

Как видно из таблицы №1 средний уровень эозинофилов в индуцированной мокроте у детей с БА достоверно выше по сравнению с контрольной группой. Причем средний уровень эозинофилов в индуцированной мокроте у детей с БА в 16 раз превышает показатель контрольной группы и в 6,5 раз превышает принятый нами норматив, что не противоречит данным российских и зарубежных авторов, проводивших исследование в старших возрастных группах детей [9,20]. У всех детей с БА в исследовании уровень эозинофилов в индуцированной мокроте был  $> 2,5\%$ , и у 15 детей с БА (83%) уровень эозинофилов в индуцированной мокроте составил  $\geq 5\%$ . У детей контрольной группы максимальное значение уровня эозинофилов в индуцированной мокроте было 2%.

Таблица 1. Процентный состав клеток в индуцированной мокроте у обследованных групп детей.

Пок-ль (%)	БА		Контроль		P
	I		II		
	п	Me Q1- Q3	п	Me Q1- Q3	
Эозинофилы.	18	16,5 5,0-63,5	17	0 0-0,4	$P_{1-2}=0,004$

Нейтрофилы.	18	47,5 15,5-75,75	17	63,0 43,0-80,5	$P_{1,2}=0,01$
Макрофаги.	18	13,5 10,0-30,0	17	30,0 12,0-49,5	$P_{1,2}=0,05$
Лимфоциты.	18	4,5 2,0-9,0	17	4,0 2,5-8,25	

Средний уровень макрофагов в мокроте у детей с БА достоверно в 2 раза ниже по сравнению с детьми контрольной группы, что совпадает с данными исследований, проведенных в нашей стране [8,9,21]. Средний уровень нейтрофилов в индуцированной мокроте у детей первой группы так же достоверно ниже по сравнению с детьми контрольной групп.

В течение долгого времени иммунологические изменения при астме объясняли дисбалансом Th1 и Th2 цитокинов. Однако в настоящее время становится все яснее, что взаимодействия между подтипами Т-клеток и выделяемыми ими цитокинами являются более сложными и отличаются в зависимости от нескольких факторов, включая возраст ребенка и подействовавший стимул [22,23].

Всем пациентам было проведено исследование иммунологического профиля индуцированной мокроты, данные представлены ниже в таблице №2.

Из таблицы № 2 видно, что средний уровень секреторного IgA в индуцированной мокроте у детей с БА достоверно выше по сравнению с контрольной группой, его повышенный синтез может быть обусловлен частой персистенцией инфекции в дыхательных путях у детей и как следствие значительное напряжение местного секреторного иммунитета [10].

Средний уровень IgG4 в индуцированной мокроте так же достоверно выше у детей с БА по сравнению с контрольной группой. По последним данным подкласс IgG4 участвует в аллергическом ответе [11].

Отмечена тенденция к 2-х кратному повышению среднего уровня IgE в индуцированной мокроте у детей с БА по сравнению со средним значением контрольной группы, что не противоречит данным других исследователей [12,21].

Средний уровень IL-4 в индуцированной мокроте у детей с БА достоверно в 10 раз превышает показатель контрольной группы, что соответствует данным современных исследований, проведенных у детей старше 5 лет и взрослых. Уровень IL-4 повышен в бронхиальных биоптатах, бронхоальвеолярной лаважной жидкости у пациентов с астмой [18,24,25].

Средний уровень IL-13 в индуцированной мокроте у детей с БА достоверно в 4 раза выше показателя детей контрольной группы. IL-13 играет роль в переключении на продукцию IgE и способен вызывать некоторые патологические проявления в отсутствие IL-4, его повышение так же характерно для больных с БА [18,25].

Средний уровень IL-8 в индуцированной мокроте у детей с БА достоверно примерно в 7 раз превышает показатель контрольной группы. Участие ИЛ-8 в развитии аллерги-

Таблица 2. Характеристика иммунологических показателей индуцированной мокроты у обследованных детей.

Пок-ль (%)	БА		Контроль		P
	n	Me Q1- Q3	n	Me Q1- Q3	
Эозинофилы.	18	16,5 5,0-63,5	17	0 0-0,4	$P_{1,2}=0,004$
Нейтрофилы.	18	47,5 15,5-75,75	17	63,0 43,0-80,5	$P_{1,2}=0,01$
Макрофаги.	18	13,5 10,0-30,0	17	30,0 12,0-49,5	$P_{1,2}=0,05$
Лимфоциты.	18	4,5 2,0-9,0	17	4,0 2,5-8,25	

ческого воспаления можно считать как проявление реакции замедленного типа, характеризующейся притоком воспалительных клеток, оказывающих хемотаксическое действие, он активизирует эозинофилы и базофилы [4].

Средний уровень TNF $\alpha$  в индуцированной мокроте детей с БА достоверно в 6 раз выше показателя детей контрольной группы. Ряд авторов отмечает значительное повышение уровней ИЛ 8 и ФОНа в мокроте, биоптатах слизистой бронхов и лаважной жидкости у больных бронхиальной астмой [9,26].

У детей с БА выявлена тенденция снижения среднего уровня INF  $\gamma$  в индуцированной мокроте по сравнению с контрольной группой не достигшая уровня достоверности вследствие небольшого объема выборки. При дефиците INF  $\gamma$  эрадикация инфекции после перенесенного острого заболевания затруднена, что последовательно ведет к персистенции вируса в эпителии дыхательных путей, формированию хронического воспаления, длительному повышению проницаемости слизистой оболочки респираторного тракта и облегчению проникновения в организм аэроаллергенов. Этим так же можно объяснить частое поражение Лор-органов у детей первой группы и частые респираторные заболевания [13, 14, 27].

Противоречивой остается роль NO при астме. С одной стороны, было предположено, что NO способствует Th2 ответу и его уровни в выдыхаемом воздухе могут отражать неконтролируемое воспаление при астме [28,29]. С другой стороны, NO может подавлять многие воспалительные ответы, включая синтез лейкотриенов и многочисленных цитокинов [30,31], так же как и сократительную реакцию гладкой мускулатуры.

Уровень NO в выдыхаемом воздухе повышен в груп-

пе детей с астмой по сравнению со здоровыми детьми, что дало возможность выдвинуть его в качестве маркера воспаления бронхов [6,15]. Так же было выявлено, что в периоде ремиссии заболевания при легком течении бронхиальной астмы уровень выдыхаемого NO в 69% не превышал нормальные значения, не было выявлено зависимости уровня NO от длительности заболевания [8].

В данном исследовании при анализе уровня конечных стабильных метаболитов оксида азота в индуцированной мокроте (NO<sub>3</sub>, NOX) были выявлены следующие тенденции, не достигшие уровня достоверности: средние уровни NO<sub>3</sub>, NOX были в 2 раза повышены у детей с БА по сравнению со средними уровнями детей контрольной группы.

## Выводы

1. У детей с бронхиальной астмой более чем в 80% случаев уровень эозинофилов в индуцированной мокроте  $\geq$  5%, что значительно выше показателя здоровых детей без атопии.
2. Для детей с бронхиальной астмой характерно снижение количества макрофагов в индуцированной мокроте по сравнению со здоровыми детьми без атопии.
3. У детей с бронхиальной астмой выявлены более высокие концентрации провоспалительных цитокинов (ФНО $\alpha$ , ИЛ 4, ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ8, ИЛ 13), иммуноглобулинов (IgE, IgG4) участвующих в аллергическом воспалении бронхов при бронхиальной астме и конечных стабильных метаболитов оксида азота (NO<sub>3</sub>, NOX), являющихся показателями хронического аллергического воспаления по сравнению с показателями здоровых детей без атопии.

## Литература:

1. Балаболкин И.И. Ранняя диагностика и профилактика респираторной аллергии у детей / И.И. Балаболкин // Аллергология и иммунология в педиатрии. - 2004. - №1. - С.28-32.
2. Геппе Н.А. Современная стратегия лечения детей с бронхиальной астмой /Н.А. Геппе, Н.Г. Колосова // Пульмонология. - 2006. - №3. - стр. 113-118.
3. Клинические рекомендации. Аллергология / под ред. Р.М. Хаитова, Н.И. Ильиной. - М.: ГЭОТАР - Медиа, 2008. - 240с.
4. Китарова Г.С. Критерии прогнозирования ранней диагностики и программа терапевтических подходов при аллергических заболеваниях у детей: Дис. ... доктора. мед. наук /Г.С. Китарова. - М., 2006. - 229с.
5. Мизерницкий Ю.Л. Диагностика и принципы терапии острой бронхиальной обструкции у детей / Ю.Л. Мизерницкий // Пульмонология детского возраста: проблемы и решения / под ред. Ю.Л. Мизерницкого, А.Д. Царегородцева. - М., 2005. - выпуск 5. - С.87-97.
6. Национальная программа «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика». - 2-е изд./ Под ред. И.К. Волкова, Н.А. Геппе и соавт. - М.: Издательский дом «Атмосфера», 2008. - 108с., ил.
7. Таточенко В.К. Практическая пульмонология детского возраста (справочник - 3-е издание)/ В.К. Таточенко. - М. - 2006. - 254с.
8. Ляпунов А.В. Обоснование противорецидивной терапии бронхиальной астмы у детей и подростков: Дис. ... докт. мед. наук / А.В. Ляпунов. - Москва, 2003. - 201с.
9. Филюнова Н.Н. Особенности клеточного состава индуцированной мокроты и межклеточных взаимодействий при хронической обструктивной болезни легких и бронхиальной астме: Дис. ... канд. мед. наук /Н.Н. Филюнова. - Красноярск, 2006. - 126с.
10. Жерносок В.Ф. Новый взгляд на проблему дермато-респираторного синдрома у детей. /В.Ф. Жерносок, Т.П. Дюбова // Пульмонология. - 2004. - Vol.14. - №4.- стр. 53-55
11. Хаитов Р.М. Иммунология: Учеб. Для студентов мед. вузов / Р.М. Хаитов, Г.А. Игнатьева, И.Г. Сидорович. - М.: Медицина, 2000. - 432 с.
12. Петрова Г. Местный иммунитет при хронических заболеваниях легких /Г. Петрова, П. Переновская, В. Улевинов// Тез. VII Российского конгресса «Современные технологии в педиатрии и детской хирургии». - М., 2008. - С. 281.
13. Белан Э.Б. Фармакологическая профилактика бронхиальной астмы у детей: Дис. ... д-ра мед.наук / Э.Б. Белан. - Волгоград, 2006. - 325 с.
14. Острые респираторные заболевания у детей: лечение и профилактика. Научно-практическая программа. - М., 2002; 73.
15. Цыпленкова С.Э. Содержание оксида азота в выдыхаемом воздухе при бронхиальной астме у детей / С.Э.Цыпленкова, Ю.Л. Мизерницкий// Пульмонология детского возраста: проблемы и решения. - М., 2005. - Выпуск 5. - С. 157-158.
16. Симбирцев А.С. Цитокины в иммунопатогенезе и лечении аллергии/ А.С. Симбирцев // Российский Аллергологический Журнал. - 2007. - №1. - 5 - 19.