

ЦИТОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ ИНДУЦИРОВАННОЙ МОКРОТЫ И НАЗАЛЬНОГО СЕКРЕТА У ДЕТЕЙ С ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ И ОСТРЫМ БРОНХИТОМ

Лилия Фаридовна Галимова*, Ольга Ивановна Пикуза, Елена Валентиновна Агафонова

Казанский государственный медицинский университет

Реферат

Цель. Охарактеризовать механизмы неспецифического воспаления дыхательных путей по параметрам индуцированной мокроты и назального секрета при внебольничной пневмонии и остром бронхите у детей.

Методы. Обследованы 100 детей в возрасте от 7 до 16 лет с острой бронхолегочной патологией, в том числе 49 – с внебольничной пневмонией, 51 – с острым бронхитом. Контрольная группа была сформирована из 25 практически здоровых детей, сопоставимых с больными по возрасту и полу. Определяли клеточный состав, степень деструкции нейтрофилов и эпителиальных клеток в индуцированной мокроте. Кроме того, исследовали содержание цитокинов как в назальном секрете, так и в индуцированной мокроте.

Результаты. Установлено, что в индуцированной мокроте при внебольничной пневмонии, в отличие от острого бронхита, количественное увеличение нейтрофильных гранулоцитов сопровождается высокой степенью их деструкции. Данные изменения сочетались с одновременным снижением численности альвеолярных макрофагов. Увеличение концентрации провоспалительных цитокинов (интерлейкинов-8 и -17, фактора некроза опухоли альфа) с выраженным снижением содержания противовоспалительного интерлейкина-10, характерное для внебольничной пневмонии, коррелирует со степенью деструкции клеточных элементов и зависит от морфологической формы воспалительного поражения лёгких.

Вывод. При нарастании тяжести воспалительного процесса в респираторном тракте происходит увеличение количества деструктивно изменённых нейтрофилов с усилением дисбаланса про- и противовоспалительных цитокинов.

Ключевые слова: внебольничная пневмония, острый бронхит, индуцированная мокрота, назальный секрет, цитокины, иммунитет, дети.

CYTOLOGICAL CHARACTERISTICS AND CYTOKINE PROFILE OF INDUCED SPUTUM AND NASAL SECRETIONS OF CHILDREN WITH COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA AND ACUTE BRONCHITIS
L.F. Galimova, O.I. Pikuza, E.V. Agafonova. Kazan State Medical University, Kazan, Russia. **Aim.** To characterize the mechanisms of nonspecific airway inflammation using the parameters of induced sputum and nasal secretions in children with community-acquired pneumonia and acute bronchitis. **Methods.** A total of 100 children aged 7 to 16 years with acute respiratory system diseases including 49 patients with community-acquired pneumonia and 51 patients with acute bronchitis were examined. The control group consisted of 25 healthy children and was age- and gender-comparable. The cellular composition, degree of neutrophils and epithelial cells destruction, and cytokines levels both in nasal secretions and in induced sputum were measured. **Results.** The increase of neutrophils number was accompanied by a high degradation degree in induced sputum of children with community-acquired pneumonia in contrast to children with acute bronchitis. A simultaneous decrease of alveolar macrophages number was observed. An increase of pro-inflammatory cytokines levels (interleukine-8, -17 and tumor necrosis factor α) with a marked decrease of anti-inflammatory cytokine level (interleukine-10), characteristic for community-acquired pneumonia, correlated with the degree of cell components degradation and depend on the morphological forms of inflammatory lung disease. **Conclusion.** With increasing severity of inflammation in the respiratory tract number of destructive changes of neutrophils also increases and disbalance of pro- and anti-inflammatory cytokines deepens. **Keywords:** community-acquired pneumonia, acute bronchitis, induced sputum, nasal secretions, cytokines, immunity, children.

Болезни органов дыхания стабильно занимают первое место в структуре общей заболеваемости детей и подростков [1, 2, 7, 8, 11]. Современная особенность пневмоний и бронхитов – склонность к вялому, затяжному течению с маловыраженной температурной реакцией, порой скудными физикальными изменениями [2]. Одной из причин может быть изменение местной иммунологической защиты респираторного тракта. Возможности оценки мукозальной защиты расширились благодаря появлению нового доступного для детской практики метода получения индуцированной мокроты (ИМ) [9, 10].

Цель работы – охарактеризовать механизмы неспецифического воспаления дыхательных путей по параметрам ИМ и назального секрета при внебольничной пневмонии и остром бронхите у детей.

Обследованы 100 детей в возрасте от 7 до 16 лет с острой бронхолегочной патологией, находившихся на лечении в детском стационаре городской клинической больницы №18 г. Казани. Получение информированного согласия, сбор анамнеза, предварительное обследование и забор биологического материала проводили в соответствии с разрешением Республиканского комитета по этическим вопросам Министерства здравоохранения Республики Татарстан.

Пациенты были разделены на две груп-

пы: первую составили 49 детей с внебольничной пневмонией (ВП), вторую — 51 ребёнок с острым бронхитом (ОБ). По результатам рентгенографии органов грудной клетки у 32 (65,3%) детей с ВП был выявлен очаговый вариант воспалительного поражения лёгких, а у 17 (34,7%) пациентов — очагово-сливной. Контрольная группа была сформирована из 25 практически здоровых детей, сопоставимых с больными по возрасту и полу.

В момент поступления в стационар в клинической картине больных очаговой и очагово-сливной формой ВП присутствовали респираторный синдром, признаки дыхательной недостаточности I-II степени, синдром интоксикации. Выраженная воспалительная активность крови отмечена в 30 (61,2%) случаях ВП. У 19 (38,8%) детей этой группы воспалительный процесс в лёгких протекал на фоне ареактивных показателей, что указывало на гипорезистентное состояние организма.

ОБ протекал более благоприятно. Состояние больных при поступлении было средней тяжести, среди жалоб преобладали кашель и субфебрильная температура тела. Физикально при аускультации в лёгких на фоне жёсткого дыхания регистрировали наличие сухих и влажных крупно- и среднепузырчатых хрипов.

Обследование и терапию больных проводили в соответствии с республиканскими медико-экономическими стандартами. Лабораторные исследования включали анализ параклинических параметров и специальные методы.

Концентрацию цитокинов определяли в назальном секрете и ИМ. Назальный секрет получали по методике Л.В. Ковальчука и соавт. в собственной модификации [3]. Полоски фильтровальной бумаги размером 10×3 мм в количестве двух штук помещали пинцетом в нижний носовой ход на 3–5 мин. После извлечения полосок проводили элюцию назального секрета в 100 мкл изотонического раствора натрия хлорида.

ИМ получали по общепринятой методике с применением ультразвукового небулайзера (OMRON NE-U-17, Япония) [4]. Обработка ИМ включала инкубацию с 1% раствором трипсина в термостате при 37 °С, механическую гомогенизацию, центрифугирование (3000 об/мин, 10 мин) и отмывание с помощью раствора Хенкса. Супернатант применяли для определения цитокинов, а из полученного осадка готовили два-три

мазка. Препараты высушивали и окрашивали по Паппенгейму-Крюкову. Качество полученной ИМ и её пригодность для дальнейшего исследования оценивали по методу Barlett [5]. При удовлетворительном результате с помощью 100-кратного увеличения объектива микроскопа под иммерсией просматривали 20–30 полей с подсчётом не менее 400 клеток. Учитывали нейтрофилы, альвеолярные макрофаги, лимфоциты, эозинофилы и эпителиальные клетки. Полученные результаты выражали в процентах.

Процессы деструкции в нейтрофилах и эпителиальных клетках определяли по методу Л.А. Матвеевой, в основе которого лежит выделение пяти классов деструкции в зависимости от изменений структурной целостности клеточных элементов [6]. Далее рассчитывали индекс деструкции клеток (ИДК), средний показатель деструкции (СПД) и индекс цитолиза клеток (ИЦК).

$$\text{ИДК} = \frac{n_1 + n_2 + n_3 + n_4}{100};$$

$$\text{СПД} = \frac{1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4}{100};$$

$$\text{ИЦК} = \frac{n_4}{n_0 + n_1 + n_2 + n_3 + n_4},$$

где 0, 1, 2, 3, 4 — номера классов деструкции (0 — нормальная структура, 4 — полная деструкция с распадом); n_0, n_1, n_2, n_3, n_4 — количество клеток соответствующего класса.

Определение цитокинов в назальном секрете и ИМ проводили методом иммуоферментного анализа с использованием стандартных коммерческих наборов реактивов «ИЛ-8-ИФА-БЕСТ», «ИЛ-10-ИФА-БЕСТ», «ИЛ-17-ИФА-БЕСТ», «Альфа-ФНО-ИФА-БЕСТ» (ЗАО «Вектор-бест», Новосибирск).

Для статистической обработки полученных данных использовали программу «Биостатистика 4.03» для Windows. Нормальность распределения признака определяли с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Описательный анализ включал определение среднего арифметического значения, ошибки среднего значения, а также расчёт минимального и максимального значений для ненормально и несимметрично распределённых параметров. Сравнительный анализ основывался на определении достоверности разницы показателей по t-критерию Стьюдента для параметрических и по Z-критерию Манна-Уитни для непараметрических показателей. Критический уровень статистической значимости (p) при проверке статистических гипотез в исследовании принимали равным 0,05. Степень взаимосвязи между признаками оценивали,

Клеточный состав индуцированной мокроты у детей, больных внебольничной пневмонией (ВП) и острым бронхитом (ОБ), % (M±m)

Группа	Нейтрофилы	Эпителий	Макрофаги	Лимфоциты	Эозинофилы
ОБ (n=51)	20,6±0,4	10,6±0,2*	63,3±0,5	4,3±0,1	1,01±0,05
ВП (n=49)	64,7±0,8*#	3,5±0,1#	24,3±0,8*#	6,4±0,3*#	0,9±0,07
Контрольная (n=25)	20,1±0,8	3,5±0,1	70,8±0,8	4,6±0,6	0,9±0,08

Примечание: *p < 0,05 по сравнению с контрольной группой; #p < 0,05 по сравнению с группой больных ОБ.

вычисляя коэффициент ранговой корреляции Спирмена (R).

Анализ клеточного состава ИМ выявил достоверные различия между пациентами с бронхолегочной патологией и контрольной группой (табл. 1). При ВП отмечено увеличение количества нейтрофилов, лимфоцитов, тогда как при ОБ данные показатели не отличались от контрольной группы. При этом состав клеточных элементов в ИМ значительно варьировал в зависимости от морфологической формы воспалительного процесса в лёгких. Так, при очагово-сливной форме количество нейтрофилов было выше, чем при очаговой (61,3±2,4%) и достигало 64,1±1,2% (p < 0,05). Количество альвеолярных макрофагов в ИМ при ВП составляло 24,3±0,8%, что в 2,6 раза меньше, чем при ОБ (63,3±0,6%) и в контрольной группе (70,8±0,8%) (табл. 2). Кроме того, у пациентов с ОБ отмечено повышение количества эпителиальных клеток в ИМ до 10,7±0,3% (против 3,5±0,2% при ВП).

У детей контрольной группы основная популяция нейтрофилов и эпителиальных клеток была представлена морфологически целыми клетками (см. табл. 2). При ВП и ОБ в ИМ пациентов регистрировали снижение количества неповреждённых клеток. Наибольшее количество повреждённых нейтрофилов отмечали при ВП: 2-ю степень деструкции выявляли в 1,5 раза чаще, чем при ОБ; 3-ю — в 1,7 раза; 4-ю степень (полный распад клеток) — в 4 раза чаще (p < 0,001). Наиболее выраженные деструктивные процессы в нейтрофилах выявляли при очагово-сливной форме ВП. У больных ОБ, напротив, количество морфологически целых нейтрофилов (0-я степень деструкции) почти в 2 раза превышало значение аналогичного показателя при ВП, превалировали деструктивно изменённые эпителиальные клетки.

Известно, что миграция нейтрофилов в очаг поражения контролируется хемокинами, в частности провоспалительным интерлейкином-8 (ИЛ-8). Как при ВП, так и при

ОБ содержание ИЛ-8 было достоверно увеличено по сравнению с контрольной группой (табл. 3). Более выраженное повышение концентрации ИЛ-8 в назальном секрете и ИМ отмечено при ВП (112,7±2,3 и 236,2±5,5 пг/мл соответственно) в сравнении с ОБ, при котором эти значения достигали 98,5±2,2 и 177±4,7 пг/мл соответственно (p < 0,001). Уровень ИЛ-8 в ИМ был максимальным при очагово-сливной форме (256,1±5,0 пг/мл), тогда как в назальном секрете при ВП выявлена лишь тенденция к возрастанию содержания этого цитокина.

Выявлено статистически значимое увеличение синтеза провоспалительного цитокина ИЛ-17 в ИМ при острой бронхолегочной патологии, причём максимальный его уровень регистрировали при ВП (см. табл. 3).

При ВП содержание фактора некроза опухоли альфа в назальном секрете и ИМ существенно отличалось от контрольных величин, тогда как при ОБ показатели были идентичны контрольной группе (см. табл. 3).

Обобщая вышеприведённые данные, можно говорить о том, что локальный синтез провоспалительных цитокинов (ИЛ-8, ИЛ-17 и фактора некроза опухоли альфа) на уровне верхних и нижних дыхательных путей характеризуется существенным увеличением их концентраций при ВП, особенно при очагово-сливной форме.

Примечательно, что содержание противовоспалительного ИЛ-10 в назальном секрете как при ВП, так и при ОБ не отличалось от контрольных значений. Более того, при ВП в ИМ его количество снижалось и даже имело более низкие значения, чем у больных ОБ (см. табл. 3).

У больных ВП установлена тесная прямая корреляция между уровнем провоспалительного цитокина ИЛ-8 в ИМ и количеством нейтрофилов с 3-й степенью деструкции (r=0,26; p=0,05), эпителиальных клеток с 4-й степенью деструкции (r=0,28; p=0,05), между уровнем ИЛ-10 и числом морфологически целых нейтрофилов (r=0,22;

Таблица 2
Цитоморфологические показатели (ЦП) нейтрофилов и эпителиальных клеток индурованной мокроты у детей, больных внебольничной пневмонией (ВП) и острым бронхитом (ОБ) (M±m)

Группа детей	ЦП нейтрофилов										ЦП эпителиальных клеток																					
	Класс деструкции, %					Индексы деструкции					Класс деструкции, %					Индексы деструкции																
	0	1	2	3	4	ИДК	СПД	ИЦК	0	1	2	3	4	ИДК	СПД	ИЦК	0	1	2	3	4	ИДК	СПД	ИЦК								
ОБ (n=51)	47,2±0,06*	22,1±0,7*	16,4±0,2*	11,09±0,1*	3,09±0,1*	1,5±0,9*	1±0,009*	0,03±0,001*	31,9±0,3*	33,04±0,4*	20,8±12*	12±0,09*	2,1±0,09*	0,7±0,003*	1,2±0,007*	0,02±0,001*	21,7±0,7*#	18,2±0,7*#	25,6±0,3*#	20,9±0,5*#	13,3±0,3*#	0,7±0,007*#	1,8±0,02*#	0,1±0,003*#	62,6±0,6*#	14,2±0,5*#	14,6±0,2*#	7,3±0,1*#	1±0,06*#	0,3±0,007*#	0,7±0,008*#	0,01±0,0006*#
Контрольная (n=25)	77,3±0,9	16,5±0,9	6,1±0,1	0	0	0,2±0,009	0,2±0,009	0	86,7±0,9	6,5±0,2	6,7±0,7	0	0	0,1±0,009	0,2±0,01	0	0	0	0	0	0,1±0,009	0,2±0,01	0	0	0,1±0,009	0,2±0,01	0	0	0	0	0	

Примечание: *р <0,05 по сравнению с контрольной группой; #р <0,05 по сравнению с группой больных ОБ; ИДК — индекс деструкции клеток; СПД — средний показатель деструкции; ИЦК — индекс цитоллиза клеток.

Содержание цитокинов (пг/мл) в назальном секрете (НС) и индуцированной мокроте (ИМ) детей, больных внебольничной пневмонией (ВП) и острым бронхитом (ОБ) (M±m)

Нозологические формы	ИЛ-10		ИЛ-8		ИЛ-17		ФНО α	
	НС	ИМ	НС	ИМ	НС	ИМ	НС	ИМ
ВП (n=49)	1,7±0,07	0,6±0,04 ^{1,2}	112,7±2,3 ^{1,2}	236,2±5,5 ^{1,2}	1,3±0,1	19,6±1,07 ^{1,2}	2,5±0,1 ^{1,2}	3,5±0,1 ^{1,2}
Очаговая форма ВП (n=32)	1,8±0,08	0,6±0,04	110,9±2,6	206,6±6,5	1,3±0,1	19,5±1	2,6±0,1	2,7±0,1
Очагово-сливная форма ВП (n=17)	1,5±0,1	0,4±0,03 ³	116,2±4,4	256,1±5,0 ³	1,2±0,1	19,9±1,5	2,4±0,2	4±0,2 ³
ОБ (n=51)	1,6±0,1	0,8±0,05 ¹	98,5±2,2 ¹	177±4,7 ¹	0,9±0,05	8,1±0,2 ¹	1,4±0,07	1,5±0,07
Контрольная группа (n=25)	1,6±0,04	1,7±0,04	26,9±0,7	16,4±0,5	1,1±0,05	1,5±0,04	1,5±0,04	1,6±0,03

Примечание: ИЛ – интерлейкин; ФНО α – фактор некроза опухоли альфа; ¹p <0,05 между группами больных и контрольной группой; ²p <0,05 между группами больных ОБ и ВП; ³p <0,05 между группами больных с очаговой и очагово-сливной формами внебольничной пневмонии.

p=0,028), а также эпителиальных клеток (r=0,36; p=0,01), и обратная связь между содержанием фактора некроза опухоли альфа и количеством нейтрофилов с 0-й степенью деструкции (r=-0,32; p=0,023). Выявленный дисбаланс содержания про- и противовоспалительных цитокинов, ярко выраженный при ВП, можно рассматривать, как существенный фактор повреждения клеток и тканей.

ВЫВОДЫ

1. В индуцированной мокроте больных внебольничной пневмонией, особенно очагово-сливного характера, происходит увеличение содержания провоспалительных цитокинов (интерлейкинов-8 и -17, фактора некроза опухоли альфа) с одновременным снижением количества противовоспалительного интерлейкина-10.

2. Установлены выраженные деструктивные изменения нейтрофилов в индуцированной мокроте при очагово-сливном характере внебольничной пневмонии.

3. Индуцированная мокрота позволяет получить ценную информацию о степени активности воспалительного процесса в дыхательных путях, что может быть использовано в педиатрической практике с целью своевременной диагностики и рациональной терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баранов А.А., Альбицкий В.Ю., Антонова Е.В. и др. Современные подходы в изучении заболеваемости детского населения // Рос. педиатр. ж. – 2008. – №5. – С. 4-7.
2. Бондарь Г.Н. Эффективность метода трансторакальной компьютерной бронхографии при пневмонии у детей школьного возраста // Рос. вестн. перинатол. и педиатр. – 2010. – №3. – С. 56-60.
3. Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В. Новые возможности лечения цитокинами: иммуноцитокны в локальной иммунокоррекции // Междун. ж. по иммунореабилит. – 1997. – №6. – С. 57-60.
4. Куличков В.И., Мизерницкий Ю.Л., Рыбакова О.Г. и др. Способ получения индуцированной мокроты у детей для оценки степени и характера воспаления слизистой бронхов. Патент на изобретение №2364341. Бюлл. №23 от 20.08.2009.
5. Лазарева А.В., Катосова Л.К., Симонова О.И. Цитомикроскопическое исследование мокроты и трахеального аспирата, полученных от детей с хронической бронхолегочной патологией и муковисцидозом, в оценке их пригодности для культурального исследования // Вопр. диагн. в педиатр. – 2009. – Т. 1, №4. – С. 32-35.
6. Матвеева Л.А. Местная защита респираторного тракта у детей. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 1993. – 276 с.
7. Таточенко В.К., Бакрадзе М.Д., Фёдоров А.М. и др. О тактике антибактериальной терапии острых респираторных заболеваний у детей на поликлиническом участке // Вопр. соврем. педиатр. – 2002. – №5. – С. 11-14.
8. Чучалин А.Г. Институт пульмонологии: история и основные научные направления // Пульмонология. – 2006. – №4. – С. 5-9.
9. Djukanovic R., Sterk P.J., Fahy J.V., Hargreave F.E. Standardised methodology of sputum induction and processing // Eur. Respir. J. – 2002. – Vol. 20. – P. 1-2.
10. Quirce S.S., Lemiere C., de Blay F. Noninvasive methods for assessment of airway inflammation in occupational settings // Allergy. – 2010. – Vol. 65, N 4. – С. 445-458.
11. Rigby C.K., Strife J.L., Johnson N.D. et al. Is the frontal radiograph alone sufficient to evaluate for pneumonia in children? // Pediatr. Radiol. – 2004. – Vol. 34. – P. 379-383.