

## ЦИТО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ИНДУЦИРОВАННОЙ МОКРОТЫ У ДЕТЕЙ, ПЕРЕНЕСШИХ ОСТРЫЙ ОБСТРУКТИВНЫЙ БРОНХИТ, И С ВПЕРВЫЕ ВЫЯВЛЕННОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Рыбакова О. Г., Минина Е. Е.

*ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, Россия (454092, Челябинск, ул. Воровского, 64), e-mail: gallo53@mail.ru*

Проведено клинико-лабораторное обследование 113 детей в возрасте до 5 лет, перенесших 1 и более эпизодов острого обструктивного бронхита (ООб, n=75), с установленным диагнозом бронхиальная астма (БА, n=21), и детей без аллергических заболеваний и эпизодов обструктивного бронхита в анамнезе (группа сравнения, n=17). Проводилось изучение клеточного состава и иммунологических показателей индуцированной мокроты (ИМ). Выявлен повышенный уровень эозинофилов ( $\geq 2,5$  %) в ИМ у 100 % детей с БА и 46,7 % детей с ООб, и у 81% и 57,3 % детей соответственно – в назальном секрете ( $\geq 5$  %). Иммунологически показатели ИМ группы с БА и ООб не отличались между собой ни по одному показателю, в обеих группах оказались высокими уровни IgG2, IgG4, IL-4, IL-8, IgE и низкими – IFN $\gamma$  относительно группы сравнения. В группе с БА также выявлено повышение IL-13, TNF $\alpha$  и sIgA ( $p < 0,05$  с группой сравнения). Показано, что слабо коррелируют между собой стандартные лабораторные показатели (эозинофилы крови, общий IgE крови) и уровень эозинофилов в ИМ, поэтому эти показатели не являются взаимозаменяемыми. Обнаружена положительная корреляционная связь содержания эозинофилов в ИМ и уровнями IL-4 и TNF $\alpha$ , а также уровня IL-4 и IgE в ИМ. Дети с ООб с уровнем эозинофилов в ИМ  $\geq 2,5$  % относятся к группе высокого риска по формированию БА, за ними необходимо наблюдение в динамике с исследованием клеточного состава ИМ, с целью её раннего выявления.

Ключевые слова: бронхиальная астма, острый обструктивный бронхит, индуцированная мокрота, эозинофилы, иммунологические показатели мокроты, дети.

## CYTO-IMMUNOLOGICAL FEATURES OF INDUCED SPUTUM IN CHILDREN WHICH HAVE HAD ONE OR MORE EPISODES OF ACUTE BRONCHIAL OBSTRUCTION AND CHILDREN WITH DIAGNOSED ASTHMA

Rybakova O. G., Minina E. E.

*South Ural State Medical University Chelyabinsk, Russia, e-mail: gallo53@mail.ru*

113 children aged 9 months – 5 years with 1 and > episodes of acute bronchial obstructions (ABO, n=75), diagnosed asthma (DA, n=21) and healthy children of the same age (n=17) were enrolled. We investigate cellular composition and immunological profile of induced sputum (IS). We revealed that 46,7% of children with ABO episodes and 100 % of children with DA have  $\geq 2,5$  % eosinophils in induced sputum and 57,3% of children with ABO episodes and 81 % of children with DA have  $\geq 5$ % eosinophils in nasal secret. The levels of IgG2, IgG4, IL-4, IL-8, IgE were elevated and the level of IFN $\gamma$  was reduced in induced sputum of children with ABO episodes and DA. The levels of IL-13, TNF $\alpha$ , sIgA were elevated in induced sputum of children with DA ( $p < 0,05$  with healthy children). We established that blood eosinophils and blood IgE low correlated with eosinophils of IS, but we revealed positive moderate correlation between eosinophils of IS and the levels of IL-4, TNF $\alpha$  in IS and between the levels of IL-4 and IgE in IS. Children with ABO episodes which have  $\geq 2,5$  % eosinophils in IS are at high risk of asthma development and they should be regularly screened and underwent sputum induction for early detection of bronchial asthma.

Keywords: bronchial asthma, acute bronchial obstruction, induced sputum, eosinophils, immunological parameters of sputum, children.

Несмотря на кропотливый труд врачей и исследователей всего мира в изучении бронхиальной астмы (БА), механизмы формирования и течение этого заболевания, особенно в раннем детском возрасте, остаются все еще не до конца понятными [11]. Известно, что в 60–80 % случаев БА формируется уже в раннем возрасте и нередко скрывается под такими диагнозами как «ОРВИ с обструктивным синдромом», «рецидивирующий бронхит»,

«обструктивный бронхит» [1, 5]. Дифференциальный диагноз этих заболеваний порой вызывает трудности, что связано с однотипной клинической картиной, сходными рентгенологическими, функциональными и лабораторными изменениями. Таким образом, диагностика БА запаздывает на 4–5 лет и более, своевременно не назначается базисная противовоспалительная терапия, что приводит к ухудшению прогноза заболевания [7, 9, 11]. Доказано, что воспалительные изменения на уровне слизистой оболочки бронхов происходят задолго до появления первых клинических симптомов БА, и одним из биологических маркеров БА считается повышенное количество эозинофилов мокроты [7, 11, 12, 13].

**Цель.** Выявить цито-иммунологические особенности индуцированной мокроты у детей, перенесших острый обструктивный бронхит, и с впервые выявленной бронхиальной астмой.

### **Материалы и методы исследования**

Исследование проведено по типу поперечного среза. Метод выборки – сплошной (по мере поступления в стационар). Источниковая популяция – пациенты, поступившие на обследование в отделение патологии детей раннего возраста и детское аллергологическое отделение МУЗ ГКБ № 1 г. Челябинска за период 2005–2006 гг. Критерии включения для всех детей: возраст до 5 лет, отсутствие в течение предшествовавшего месяца эпизодов острых инфекционно-воспалительных заболеваний, вакцинации, согласие родителей на участие в исследовании. Дети были разделены на три группы: с острым обструктивным бронхитом (ООБ) в анамнезе (группа 1, n=75), с впервые выявленной БА (группа 2, n=21), дети без аллергических заболеваний и эпизодов ООБ в анамнезе (группа 3 – сравнения, n=17). На всех детей была заполнена разработанная нами персональная анкета. Проводилось исследование: общий анализ крови (ОАК), общий IgE крови, исследование клеточного состава назального секрета (НС), клеточного состава и иммунологических показателей индуцированной мокроты (ИМ). Для исследования использовали мокроту, собранную у детей натошак, после ингаляции 5 % хлорида натрия [4]. В ИМ определяли следующие показатели: количество белка (Кочетов Г. А., 1980); уровни sIgA, IgM, IgG, субклассов IgG1-IgG4, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-8, IL-13, TNF- $\alpha$  определяли методом ИФА (тест-системы ЗАО «Вектор-Бэст», г. Новосибирск). Статистический анализ данных проводился при помощи пакетов статистических программ STATISTICA 6.0 (StatSoft, 2001) и SPSS 12.0. При распределении признака в выборке близком к нормальному, количественные значения представлялись в виде средней арифметической и её среднеквадратичного отклонения ( $M \pm \sigma$ ). При непараметрическом распределении признака рассчитывались медиана и интерквартильный размах ( $Me$ ; 25–75 %). Для оценки различий между двумя группами в количественных признаках при распределении, близком к нормальному, применяли t-критерий Стьюдента, в

остальных случаях – непараметрический U-тест Манна–Уитни. Оценка межгрупповых различий по качественным признакам проводилась с использованием критерия  $\chi^2$  (хи-квадрат) и точного критерия Фишера. При проведении корреляционного анализа использовался коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Для всех видов анализа статистически достоверными считались значения  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Возраст обследованных детей составил от 9 месяцев до 5 лет, средний возраст –  $3,3 \pm 1,4$  лет. Все группы были сопоставимы по возрасту и полу.

При изучении содержания эозинофилов периферической крови (%), выявлено их повышение относительно группы сравнения только в группе БА, что подтверждают и данные литературы [9, 11], причем в этой группе частота повышенного уровня эозинофилов ( $\geq 5\%$ ) в 2,5 раза выше, чем в остальных ( $p < 0,05$ ) (таблица 1).

**Таблица 1**

Лабораторные показатели обследованных детей, Ме; 25–75 %

Показатели	Группа 1 ООБ n=75	Группа 2 БА n=21	Группа 3 группа сравнения n=17
Эозинофилы в ОАК, %	2,0 1,0-4,0	6,0*, ** 2,5-8,5	1,5 1,0-3,0
IgE крови общий, МЕ/мл	55,7 16,8-143,5	126,2* 41,0-209,5	36,0 23,8-68,5
Эозинофилы НС, %	10,0* 2,0-25,0	31,0* 6,5-58,5	0 0-0,5
Примечание. Значимость различий ( $p < 0,05$ ): * – с группой сравнения; ** – между группами 1 и 2.			

Уровень общего IgE крови также оказался выше в группе БА; в группе ООБ данный показатель был в 1,5 раза выше, чем у детей без аллергических заболеваний. При анализе распространенности повышенного уровня IgE ( $\geq 100$  МЕ/мл) в группах были выявлено, что при БА частота составила 52,3 %, ООБ – 34,7 %, при отсутствии таких детей в группе сравнения ( $P_{1-3} < 0,05$ ;  $P_{2-3} < 0,05$ ;  $P_{1-2} < 0,05$ ). Следует отметить, что хотя повышенные уровни эозинофилов ОАК и общего IgE крови являются маркерами атопии/аллергии, эти показатели не являются чувствительным и специфичным в диагностике БА [9, 11].

По результатам нашего исследования показано высокое содержание эозинофилов в НС в группах БА и ООБ, причем 81 % детей с БА и 57,3 % детей с ООБ даже при отсутствии жалоб имели на момент осмотра лабораторные проявления аллергического ринита (АР) (содержание эозинофилов в НС  $< 5\%$ ), при отсутствии таких детей в группе сравнения ( $P_{1-3} < 0,05$ ;  $P_{2-3} < 0,05$ ;  $P_{1-2} < 0,05$ ). По данным отечественных и зарубежных исследователей АР является независимым фактором риска развития БА, его распространенность при БА составляет 70–90 %, в свою очередь у 38 % детей с АР диагностируется БА [7, 9, 11].

Одним из перспективных неинвазивных методов оценки изменений слизистой оболочки бронхов при БА является подсчёт эозинофилов в мокроте, повышенное содержание которых является биологическим маркером БА [11, 13]; помимо цитологического, возможно исследование цитокинового профиля ИМ. Анализ клеточного состава ИМ у больных требует знания количества клеток и их соотношения у здоровых людей. В настоящее время не существует унифицированных табличных цитогрaмм для здоровых детей разных возрастных групп. Многие исследователи за повышенный уровень эозинофилов в ИМ у детей берут значение равное 2,5 % и более [7, 12], в данной работе за повышенный уровень принят показатель  $\geq 2,5$  %. Данные, характеризующие клеточный состав ИМ обследованных детей, представлены в таблице 2.

**Таблица 2**

Клеточный состав индуцированной мокроты обследованных детей, Ме; 25–75 %

Показатели	Группа 1 ООб n=75	Группа 2 БА n=21	Группа 3 группа сравнения n=17
Эозинофилы	2,0* 0-7,0	17,0*, ** 7,5-52,5	0 0-0,4
Нейтрофилы	67,0 50,0-81,0	47,0 17,0-76,0	63,0 43,0-80,5
Макрофаги	19,0 9,0-35,0	15,0 10,0-30,0	30,0 12,0-49,5
Лимфоциты	5,0 3,0-8,0	4,0 2,0-7,5	4,0 2,5-8,25
Примечание. Значимость различий ( $p < 0,05$ ): * – с группой сравнения; ** – между группами 1 и 2.			

Наиболее высокий уровень эозинофилов в ИМ выявлен в группе БА ( $P_{2-3} < 0,05$ ;  $P_{1-2} < 0,05$ ), но и в группе ООб этот показатель оказался в несколько раз выше, чем в группе сравнения ( $P_{1-3} < 0,05$ ), что не противоречит данным российских и зарубежных авторов [2, 7, 12, 13]. Распространенность повышенного уровня эозинофилов в ИМ ( $\geq 2,5$  %) по группам составила: при БА – 100,0 %, при ООб – 46,7 %, в группе сравнения – 0 % ( $P_{1-3} < 0,05$ ;  $P_{2-3} < 0,05$ ;  $P_{1-2} < 0,05$ ). По данным многих исследователей, такое большое количество детей с эозинофилией ИМ в группе ООб можно объяснить тем, что у части этих детей либо сформировалась, либо формируется БА, так как по данным Holgate ST (2002) изменения на уровне бронхиального дерева начинаются задолго, иногда за 4 года до появления типичных приступов БА. Обращают на себя внимание большее содержание нейтрофилов, и меньшее – макрофагов по сравнению с показателями, описанными в литературе для детей старшего возраста и взрослых [2, 7, 12]. Помимо клеточного состава, у части детей проводилось исследование иммунологических показателей ИМ (таблица 3).

**Таблица 3**

Иммунологические показатели индуцированной мокроты  
обследованных детей, Ме; 25–75 %

Показатель	Группа 1 ООБ n=19	Группа 2 БА n=10	Группа 3 группа сравнения n=13
Белок, мг%	3,69 2,2-4,69	2,67 1,75-3,90	3,39 2,92-4,28
sIgA, мкг/мг белка	91,44 62,0-151,0	126,45* 80,56-192,96	76,52 58,46-103,40
IgM, мкг/мг белка	0,94 0,39-1,61	1,56 0,92-2,37	1,4 0,57-1,77
IgG, мкг/мг белка	4,8 2,47-5,47	3,44 2,72-5,43	2,94 2,21-4,54
IgG1, мкг/мг белка	1,94 1,28-3,0	2,23 0,93-3,34	2,5 1,52-3,6
IgG2, мкг/мг белка	1,49* 0,61-2,84	1,08* 0,68-2,1	0,59 0,34-0,73
IgG3, мкг/мг белка	0,35 0,16-0,52	0,53 0,18-0,75	0,36 0,17-0,70
IgG4, мкг/мг белка	0,24* 0,11-0,36	0,31* 0,12-0,52	0,02 0-0,06
IgE, МЕ/мг белка	1,05 0,31-1,76	0,93 0,37-3,08	0,44 0-0,89
IL-4, пг/мг белка	5,37* 3,23-8,13	10,95* 5,88-16,7	0,57 0-1,86
IL-13 пг/мг белка	2,02 1,35-5,05	4,60* 2,35-6,38	1,09 0-3,76
IL-8, пг/мг белка	128,40* 57,06-243,0	129,56* 98,0-162,86	18,18 3,19-24,19
TNF $\alpha$ , пг/мг белка	1,0 0,48-2,55	6,36* 2,67-11,3	0,98 0,59-3,25
IFN $\gamma$ пг/мг белка	5,19* 1,87-13,17	3,98* 1,74-7,97	14,87 2,8-22,67

Примечание. Значимость различий ( $p < 0,05$ ): \* – с группой сравнения.

Выявлено, что группы БА и ООБ не отличались между собой ни по одному показателю, в обеих группах оказались высокими уровни IgG2 (в 1,8 и 2,5 раза выше соответственно, чем в группе сравнения,  $p < 0,05$ ), IgG4 (в 15 и 12 раз соответственно,  $p < 0,05$ ), IL-4 (в 19,2 и 9,4 раза соответственно,  $p < 0,05$ ), IL-8 (в 7,1 раза,  $p < 0,05$ ), IgE (в 2,1 и 2,4 раза соответственно,  $p > 0,05$ ), т.е. тех показателей, которые принимают участие в аллергическом воспалении, и низкими – IFN $\gamma$  (в 3,7 и 2,9 раза соответственно,  $p < 0,05$ ) – цитокина, который обладает антиаллергическим эффектом и подавляет продукцию IgE клетками, стимулированными IL-4. Уровень IL-13, играющего центральную роль при аллергическом воспалении, ключевые свойства которого – переключение В-лимфоцитов на синтез IgE, активация эозинофилов, индукция бронхиальной гиперреактивности, гиперсекреции слизи – был наиболее высоким в группе БА ( $p < 0,05$  с группой сравнения); в группе ООБ –

достоверно не отличался от других групп, но все же был в 1,9 раза выше, чем в группе сравнения. Содержание провоспалительного цитокина – TNF $\alpha$ , также было наибольшим в группе БА – в 6 раз выше, чем в других. Выявленные особенности иммунологических показателей ИМ у детей исследуемых групп соотносятся с данными, полученными другими исследователями у более старших детей и взрослых в ИМ, бронхоальвеолярном лаваже, биоптатах бронхов и слюне [6, 7, 10, 11, 13].

Корреляционный анализа показал, что стандартные лабораторные показатели (эозинофилы ОАК, общий IgE) и уровень эозинофилов в ИМ слабо коррелируют между собой, поэтому эти показатели не являются взаимозаменяемыми. Так же в нашем исследовании обнаружена положительная корреляционная связь содержания эозинофилов в ИМ и уровнями IL-4 и TNF $\alpha$  ( $r=0,334$ ,  $p=0,04$  и  $r=0,478$ ,  $p=0,02$  соответственно), а также уровня IL-4 и IgE ( $r=0,401$ ,  $p=0,01$ ) в ИМ.

Нарушения регуляции иммунного ответа, дисбаланс и гиперпродукция цитокинов имеют прямое отношение к формированию системной атопии у детей. 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 [7, 11, 12, 13].

#### **Выводы:**

1. Лабораторные проявления аллергического ринита имели 81 % детей с впервые выявленной бронхиальной астмой и 57,3 % – с острым обструктивным бронхитом в анамнезе; повышенный уровень эозинофилов в индуцированной мокроте ( $\geq 2,5$  %) был выявлен у 100 % и 46,7 % детей соответственно.
2. Слабо коррелируют между собой стандартные лабораторные показатели (эозинофилы крови, общий IgE крови) и уровень эозинофилов в индуцированной мокроте, поэтому эти показатели не являются взаимозаменяемыми.
3. Иммунологических показатели индуцированной мокроты группы с бронхиальной астмой и острым обструктивным бронхитом не отличались между собой ни по одному показателю, в обеих группах оказались высокими уровни IgG2, IgG4, IL-4, IL-8, IgE и низкими – IFN $\gamma$  относительно группы детей без аллергических заболеваний. В группе с бронхиальной астмой также выявлено повышение IL-13, TNF $\alpha$  и sIgA ( $p < 0,05$  с группой сравнения). Обнаружена положительная корреляционная связь содержания эозинофилов в индуцированной мокроте и уровнями IL-4 и TNF $\alpha$ , а также уровня IL-4 и IgE. в мокроте.
4. Так как у 100 % детей с бронхиальной астмой выявлен уровень эозинофилов в ИМ  $\geq 2,5$  %, дети без установленного диагноза бронхиальной астмы и с уровнем эозинофилов в индуцированной мокроте  $\geq 2,5$  % относятся к группе высокого риска по ее формированию, за

ними необходимо наблюдение в динамике с исследованием клеточного состава индуцированной мокроты [3].

### Список литературы

1. Жаков, Я. И. Василькова Д. С., Минина Е. Е., Медведева Л. В. Анализ ведения группы детей с бронхообструктивным синдромом в условиях поликлиники // Проблемы медицины в современных условиях: сб. науч. тр. по итогам международной научно-практической конференции. – Казань, 2015. – С. 93-95.
2. Жаков, Я. И. Изменение цитоиммунологического профиля у детей, получающих ингаляционные глюкокортикостероиды (по данным индуцированной мокроты) / Я. И. Жаков, Е. Е. Минина, О. Г. Рыбакова, В. И. Куличков // Consilium medicum. – 2008. – № 10. – С. 30-34.
3. Жаков, Я. И., Рыбакова О. Г., Куличков В. И., Минина Е. Е. Способ диагностики бронхиальной астмы у детей раннего возраста с использованием данных цитологии индуцированной мокроты // Патент России № 2407451.2010. Бюл. № 36.
4. Куличков, В. И., Мизерницкий Ю. Л., Рыбакова О. Г., Минина Е. Е., Жаков Я. И. Способ получения индуцированной мокроты у детей для оценки степени и характера воспаления слизистой бронхов // Патент России № 2364341.2009. Бюл. № 23.
5. Мизерницкий, Ю. Л. Дифференциальная диагностика и дифференцированная терапия острой бронхиальной обструкции при ОРВИ у детей раннего возраста // Практическая медицина. – 2014. – № 9 (85). – С. 82-88.
6. Медведева, Л. В. Клинические особенности и показатели секторного иммунитета у детей с бронхиальной астмой: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Л. В. Медведева. – Челябинск, 2006. – 25 с.
7. Минина, Е. Е. Использование метода индуцированной мокроты для оценки иммуноопосредованных процессов воспаления слизистой оболочки бронхов при легкой бронхиальной астме у детей: дис. ... канд. мед. наук / Е. Е. Минина. – Челябинск, 2010. – С. 74-109.
8. Научно-практическая программа «Острые респираторные заболевания у детей: лечение и профилактика». – М., 2004. – 68 с.
9. Национальная программа «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика». – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Оригинал-макет, 2012. – 184 с.
10. Симбирцев, А. С. Цитокины в иммунопатогенезе и лечении аллергии / А.С. Симбирцев // Российский аллергологический журнал. – 2007. – № 1. – С. 5-19.

11. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for asthma management and prevention, revised 2015. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [http:// www.ginasthma.com](http://www.ginasthma.com). (дата обращения 17.06.2015).
12. Staticescu, S. The value of induced sputum in the diagnosis and management of children with bronchial asthma / S. Staticescu, P. Chereches-Panta, G. Ichim et al. // Clujul Medical. – 2014. – Vol. 87(3). – P. 171-176.
13. Vijverberg S. Clinical utility of asthma biomarkers: from bench to bedside / S.Vijverberg, B. Hilvering, Jan AM. Raaijmakers et al. // Biologics. – 2013. – Vol. 7. – P. 199-210.

**Рецензенты:**

Федоров И. А., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой факультетской педиатрии ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Челябинск;

Степанов О. Г., д.м.н., профессор кафедры факультетской педиатрии ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Челябинск.