

Т.Р. Дулина¹, М.В. Самсонова²¹ Московский государственный медико-стоматологический университет² НИИ пульмонологии Росздрава, Москва

Цитологическая и морфометрическая оценка воспаления у детей с бронхиальной астмой средней степени тяжести

ПОИСК НОВЫХ НЕИНВАЗИВНЫХ И ИНФОРМАТИВНЫХ МЕТОДОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ ВЫРАЖЕННОСТИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ ЯВЛЯЕТСЯ ВАЖНОЙ ЗАДАЧЕЙ СОВРЕМЕННОЙ МЕДИЦИНЫ, В ЧАСТНОСТИ — ПЕДИАТРИИ. НАМИ ОБСЛЕДОВАНО 20 ДЕТЕЙ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ СРЕДНЕЙ ТЯЖЕСТИ В ПЕРИОДЕ РЕМИССИИ. БОЛЬНЫМ ПРОВОДИЛАСЬ ИНДУКЦИЯ МОКРОТЫ ГИПЕРТОНИЧЕСКИМ РАСТВОРОМ НАСЛ, БРОНХОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ С ЗАБОРОМ ЛАВАЖНОЙ ЖИДКОСТИ И БИОПСИЕЙ БРОНХА, ЦИТОМЕТРИЯ ИНДУЦИРОВАННОЙ МОКРОТЫ И БРОНХОАЛЬВЕОЛЯРНОЙ ЛАВАЖНОЙ ЖИДКОСТИ, МОРФОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БИОПТАТОВ СТенок БРОНХОВ, ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ОКСИДА АЗОТА В ВЫДЫХАЕМОМ ВОЗДУХЕ. УСТАНОВЛЕНА ВЫСОКАЯ ИНФОРМАТИВНОСТЬ ЦИТОЛОГИЧЕСКОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИНДУЦИРОВАННОЙ МОКРОТЫ. ОБНАРУЖЕНО В ПЕРИОД РЕМИССИИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ ВЫСОКОЕ ПРОЦЕНТНОЕ СОДЕРЖАНИЕ НЕЙТРОФИЛОВ И ЭОЗИНОФИЛОВ В ИНДУЦИРОВАННОЙ МОКРОТЕ, УВЕЛИЧЕНИЕ ТОЛЩИНЫ БАЗАЛЬНОЙ МЕМБРАНЫ, НАРУШЕНИЕ СООТНОШЕНИЯ РЕСНИЧАТЫХ И БОКАЛОВИДНЫХ КЛЕТОК В ПОЛЬЗУ ПОСЛЕДНИХ, ОСОБЕННО ВМЕСТЕ С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ОКСИДА АЗОТА В ВЫДЫХАЕМОМ ВОЗДУХЕ, УКАЗЫВАЕТ НА ПРОДОЛЖАЮЩУЮСЯ ПЕРСИСТЕНЦИЮ АЛЛЕРГИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ИНДУЦИРОВАННАЯ МОКРОТА, БРОНХИАЛЬНАЯ АСТМА, ДЕТИ.

Контактная информация:

Самсонова Мария Викторовна,
доктор медицинских наук,
заведующая лабораторией
патологической анатомии
НИИ пульмонологии Росздрава
Адрес: 105077, Москва,
11-я Парковая ул., д. 32/61,
тел. (495) 465-53-84
Статья поступила 20.01.2006 г.,
принята к печати 10.03.2007 г.

Прогресс в изучении патогенеза бронхиальной астмы привёл к пониманию значения в развитии заболевания двух основных факторов — воспаления и гиперчувствительности бронхов. Для изучения воспаления при бронхиальной астме обычно осуществляется морфологическое исследование биоптатов бронхов, цитологическая характеристика бронхоальвеолярной лаважной жидкости и индуцированной мокроты. Последний метод особенно предпочтителен в педиатрической практике, поскольку является неинвазивным, не имеет выраженных побочных эффектов и противопоказаний [1–3].

Целью нашего исследования было проведение сравнительного изучения цитологических характеристик индуцированной мокроты и бронхоальвеолярной лаважной жидкости, а также морфометрический анализ толщины базальной мембраны и соотношение клеток эпителия стенки бронхов у детей с бронхиальной астмой средней степени тяжести в период ремиссии.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 20 детей в возрасте от 9 до 14 лет, больных бронхиальной астмой средней тяжести в период ремиссии. Средний возраст

T.R. Dulina¹, M.V. Samsonova²¹ Moscow State Medico-Dental University² Pulmonology Research Institute, Federal Agency for Healthcare and Social Development, Moscow

Cytological and morphometric estimate of the inflammation among the children, suffering from moderately severe bronchial asthma

THE SEARCH FOR THE NEW NONINVASIVE AND INFORMATION METHODS TO ESTIMATE THE INTENSITY OF THE INFLAMMATORY PROCESSES DURING THE BRONCHIAL ASTHMA IS AN IMPORTANT TASK FOR THE MODERN MEDICINE, PEDIATRICS, IN PARTICULAR. WE HAVE EXAMINED 20 CHILDREN, SUFFERING FROM MODERATELY SEVERE BRONCHIAL ASTHMA IN REMISSION. PATIENTS UNDERWENT THE INDUCTION OF THE SPUTUM BY MEANS OF NA CL HYPERTONIC SOLUTION, BRONCHOSCOPIC EXAMINATION ALONG WITH THE SAMPLING OF THE LAVAGE FLUID AND BRONCHIAL BIOPSY, CYTOMETRY OF THE INDUCED SPUTUM AND BRONCHOALVEOLAR LAVAGE FLUID, MORPHOMETRIC EXAMINATION OF THE BIOPSY SAMPLES OF BRONCHI WALLS, DETERMINATION OF THE NITRIC OXIDE CONTENTS IN THE EXPIRED AIR. WE REVEALED HIGH SELF-DESCRIPTIVENESS OF THE CYTOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE INDUCED SPUTUM. HIGH PERCENTAGE OF NEUTROPHILES AND EOSINOPHILES IN THE INDUCED SPUTUM DISCLOSED DURING REMISSION OF THE BRONCHIAL ASTHMA, AS WELL AS THICKNESS INCREASE OF THE BASILEMMA, RATIO DISTORTION OF THE CILIATED AND CYATHIFORM CELLS IN THE FAVOUR OF THE LATTER, ESPECIALLY ALONG WITH THE HIGH NITRIC OXIDE CONTENTS IN THE EXPIRED AIR INDICATE THE CONTINUOUS PERSISTENCE IN THE ALLERGIC RESPIRATORY INFLAMMATION.

KEY WORDS: INDUCED SPUTUM, BRONCHIAL ASTHMA, CHILDREN.

больных детей составил $12,4 \pm 1,6$ года. Длительность заболевания колебалась от 4 до 12 лет, составляя в среднем $8,5 \pm 2,9$ года. Контрольную группу составили 9 практически здоровых детей.

Средняя степень тяжести течения бронхиальной астмы определялась при наличии ежедневных приступов затруднённого дыхания, ночных приступов более 1 раза в нед и значений объёма форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ₁) и пиковой скорости выдоха (ПСВ) 60–80% должного при суточном разбросе показателей более 30%. К началу исследования у всех пациентов не наблюдалось признаков обострения заболевания в течение, как минимум, 1 мес, а предшествующая терапия не включала ингаляционных или оральных глюкокортикостероидов.

Всем детям основной группы проводилось: стандартное клиническое обследование, исследование функции внешнего дыхания с определением форсированной жизненной ёмкости лёгких (ФЖЕЛ) и ОФВ₁ на спирометре Erich Jaeger, Германия; индукция мокроты гипертоническим раствором NaCl с возрастающей 3–5% концентрацией по методу I. Pin et al. в модификации T. Porov et al. на ультразвуковом небулайзере фирмы Omron, Япония [4, 5]; бронхоскопическое исследование с забором лаважной жидкости и биопсией бронха выполнялось под местной анестезией 2% раствором лидокаина (фибробронхоскоп BF-30, Япония); определение содержания оксида азота (NO) в выдыхаемом воздухе хемилуминесцентным методом (анализатор Logan Research 2149, Великобритания).

Цитометрия индуцированной мокроты и бронхоальвеолярной лаважной жидкости проводилась стандартным методом на микроскопе Laborlux S, Германия. При морфометрическом исследовании биоптатов стенок бронхов вычислялась толщина базальной мембраны и соотношение реснитчатых и бокаловидных клеток.

На основании цитогаммы индуцированной мокроты вычислялся индекс воспаления, отражающий активность воспаления дыхательных путей. Расчет проводился по формуле: индекс воспаления = нейтрофилы (%) + эозинофилы (%) / альвеолярные макрофаги (%). Результат, равный или превышающий единицу, указывает на наличие активного воспалительного процесса [6].

Детям из контрольной группы проводилось исследование функции внешнего дыхания, индуцированной мокроты и определение содержания NO в выдыхаемом воздухе.

Протокол исследования «Цитологическая и морфометрическая оценка воспаления у детей с бронхиальной астмой» был одобрен этическим комитетом ФГУ НИИ пульмонологии Росздрава. На проведение данного исследования в каждом случае получалось согласие пациентов и их родителей.

Статистическая обработка результатов проводилась при помощи пакета статистических программ для MS Windows 2000.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При сравнительном анализе цитологического состава индуцированной мокроты и бронхоальвеолярной лаважной жидкости было обнаружено, что соотношение клеточных элементов в них различается статистически достоверно (табл. 1). Так, альвеолярных макрофагов в индуцированной мокроте обнаружено в 2 раза меньше, чем в бронхоальвеолярной лаважной жидкости. Нейтрофилов, напротив, в три с половиной раза, а эозинофилов — в четыре раза больше в индуцированной мокроте, чем в бронхоальвеолярной лаважной жидкости. Выявленные различия, по-видимому, обусловлены особенностями методов

получения материала. Техника забора бронхоальвеолярного лаважа преследует цель охарактеризовать состав клеточных элементов в зоне альвеол.

Способ получения индуцированной мокроты позволяет судить о цитологическом составе слизистой респираторного тракта, в которой всегда присутствует какое-то количество клеточных элементов острого воспаления — нейтрофилов и эозинофилов. Соответственно, в индуцированной мокроте снижается процентное содержание альвеолярных макрофагов.

При сравнении клеточного состава индуцированной мокроты у детей, страдающих бронхиальной астмой и здоровых, обращает на себя внимание значительное, почти в 14 раз, повышение доли эозинофилов и почти в 1,5 раза повышение доли нейтрофилов в цитогамме детей с бронхиальной астмой. Альвеолярных макрофагов, напротив, обнаружено в 1,5 раза меньше (табл. 2). Полученные данные свидетельствуют о персистирующем аллергическом воспалении в бронхах, несмотря на то, что обследование проводилось у детей с бронхиальной астмой в стадии ремиссии. По соотношению содержания в индуцированной мокроте альвеолярных макрофагов и нейтрофилов вместе с эозинофилами можно с достаточной степенью точности судить об активности воспалительного процесса в респираторном тракте.

Индекс воспаления у детей с бронхиальной астмой составил 1,02. В контрольной группе индекс воспаления равнялся 0,39. Таким образом, клеточный состав индуцированной мокроты у детей с бронхиальной астмой средней степени тяжести в стадии ремиссии свидетельствует о сохраняющемся аллергическом воспалении дыхательных путей.

В период ремиссии бронхиальной астмы использование только показателей ФВД является недостаточно информативным для определения степени тяжести патологическо-

Таблица 1. Клеточный состав индуцированной мокроты и бронхоальвеолярной лаважной жидкости у детей с бронхиальной астмой средней тяжести в стадии ремиссии, %

Клеточные элементы	Индукцированная мокрота	Бронхоальвеолярная лаважная жидкость
Альвеолярные макрофаги	$48,6 \pm 5,8^*$	$83,6 \pm 5,4$
Нейтрофилы	$42,3 \pm 6,8^*$	$12,7 \pm 4,5$
Эозинофилы	$7,1 \pm 2,4^*$	$1,8 \pm 0,3$
Лимфоциты	$0,4 \pm 0,2^*$	$1,9 \pm 0,2$

Примечание:

* — $p < 0,05$ при сравнении индуцированной мокроты и бронхоальвеолярной лаважной жидкости.

Таблица 2. Клеточный состав индуцированной мокроты у детей с бронхиальной астмой средней тяжести в стадии ремиссии (основная группа) и у здоровых (контрольная группа), %

Клеточные элементы	Основная группа	Контрольная группа
Альвеолярные макрофаги	$48,6 \pm 5,8^*$	$71,5 \pm 3,6$
Нейтрофилы	$42,3 \pm 6,8^*$	$27,8 \pm 3,6$
Эозинофилы	$7,1 \pm 2,4^*$	$0,5 \pm 0,3$
Лимфоциты	$0,4 \pm 0,2^*$	$0,2 \pm 0,1$

Примечание:

* — $p < 0,05$ по сравнению со здоровыми.

го процесса. Как известно, в качестве порога, разделяющего лёгкую и среднюю степень тяжести заболевания, принята величина $ОФВ_1$, равная 80%. У наблюдавшихся нами детей, больных бронхиальной астмой средней тяжести, величина $ОФВ_1$ в период ремиссии составляла в среднем $83,8 \pm 10,6\%$ (табл. 3).

Возможность получения объективной информации о выраженности патологического процесса возрастает ещё больше, если в комплексе с цитогаммой индуцированной мокроты и величиной $ОФВ_1$ оценивать в выдыхаемом воздухе содержание оксида азота, маркера воспаления бронхиальной астмы. Повышенное содержание NO в выдыхаемом воздухе подтверждает персистенцию аллергического воспаления дыхательных путей в стадии ремиссии [7, 8]. Концентрация NO в выдыхаемом воздухе у детей с бронхиальной астмой средней степени тяжести в период ремиссии была почти в 4 раза выше, чем у здоровых детей ($19,1 \pm 16,1$ ppb по сравнению с $5,5 \pm 2,1$ ppb).

Сопоставление величины $ОФВ_1$ с клеточным составом индуцированной мокроты позволяет более объективно оценить степень выраженности воспаления при бронхиальной астме, так как повышенное содержание эффекторных клеток воспаления — нейтрофилов и эозинофилов — сохраняется и в период ремиссии заболевания. Более того, была выявлена обратная корреляционная зависимость между количеством нейтрофилов в индуцированной мокроте и величиной $ОФВ_1$ % ($r = -0,6$).

Значимость воспалительных изменений при ремиссии бронхиальной астмы подтверждают результаты изучения биоптатов стенок бронхов (табл. 4).

При морфометрическом исследовании препаратов выявлено увеличение толщины базальной мембраны в 4,1 раза (табл. 4) по сравнению с нормой [9, 10]. В биоптатах стенок бронхов больных бронхиальной астмой обнаружено также нарушение соотношения бокаловидных и реснитчатых клеток в эпителии слизистой оболочки стенки бронхов. Оно составило 1/2,6 вместо 1/4 — 1/7 в норме [9, 10]. Утолщение базальной мембраны и изменение соотношения основных клеточных элементов эпителия слизистой стенки бронхов указывает на наличие воспалительного процесса в стенке бронхов.

Выявленные в период ремиссии заболевания цитологические и морфометрические изменения бронхов у детей, больных бронхиальной астмой средней тяжести, указывают на наличие выраженного аллергического воспаления на момент исследования. Результаты исследования показали, что при выборе адекватной противовоспалительной терапии необходимо ориентироваться не только на клини-

Таблица 3. Показатели ФВД и содержание оксида азота в выдыхаемом воздухе у детей с бронхиальной астмой средней степени тяжести в период ремиссии

Определяемые величины	Минимум	Максимум	Средняя степень
ФЖЕЛ (%)	82	109	$102,5 \pm 11,8$
$ОФВ_1$ (%)	67	96	$83,8 \pm 10,6$
NO (ppb)	4,2	62,8	$19,1 \pm 16,1$

Таблица 4. Морфометрическое исследование биоптатов стенки бронхов у детей с бронхиальной астмой средней степени тяжести (БА) в период ремиссии и в норме

Показатели	БА	Норма
Толщина базальной мембраны, мкм	$7,7 \pm 0,8^*$	$1,9 \pm 0,6$
Соотношение бокаловидных и реснитчатых клеток	1/2,6	1/4–1/7

Примечание:

* — $p < 0,001$ по сравнению с нормой.

ко-функциональные данные, но и на данные цитологических методов исследования, в частности, цитометрии индуцированной мокроты.

ВЫВОДЫ

1. Показана высокая информативность цитологической характеристики индуцированной мокроты, полученной методом ингаляции гипертонического 3–5% раствора NaCl у детей, больных бронхиальной астмой. Ценность метода особенно возрастает в период ремиссии, когда результаты клинических и функциональных исследований менее информативны.
2. Установлено закономерное различие в соотношении клеточных элементов индуцированной мокроты и бронхоальвеолярной лаважной жидкости, обусловленное отличием используемых методических приёмов.
3. Обнаруженное в период ремиссии бронхиальной астмы высокое процентное содержание нейтрофилов и эозинофилов в индуцированной мокроте, увеличение толщины базальной мембраны, нарушение соотношения реснитчатых и бокаловидных клеток в пользу последних, особенно вместе с повышенным содержанием оксида азота в выдыхаемом воздухе, указывает на продолжающуюся персистенцию аллергического воспаления дыхательных путей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Prieto L., Gutierrez V., Morales C., Torres V. Non-invasive methods for diagnosing asthma. Study of induced sputum // J. Invest. Allergol. Clin. Immunol. — 1997. — V. 7. — P. 348–350.
2. Sterk P.J. Non-invasive monitoring of bronchial inflammation in asthma // Schweiz. Med. Wochenschr. — 1997. Bd.127. — № 41. — S. 1686–1692.
3. Wielders P.L., Deckhuijzer P.N.R. Disease monitoring in chronic obstructive pulmonary disease: is there a role for biomarkers? // Eur. Respir. J. — 1997. — V. 10. — P. 2443–2445.
4. Pin I., Gibson P.G., Kolendovicz R. et al. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma // Thorax. — 1992. — V. 47. — P. 25–29.
5. Popov T.A., Pizzichini E., Efthimiadis A. et al. Some technical factors influencing the induction of sputum for cell analysis // Ibid. — 1995. — V. 8. — P. 559–565.

6. Величковский Б.Т. Экологическая пульмонология (Роль свободнорадикальных процессов). — Екатеринбург. — 141 с.
7. Ляпунов А.В., Балаболкин И.И., Смирнов Е.И. и др. Клинико-морфологическая характеристика воспаления дыхательных путей при бронхиальной астме и его биологические маркеры // Педиатрия. — 2003. — № 6. — С. 2–6.
8. Чучалин А.Г. Бронхиальная астма: в 2 т. М.: Медицина. — 1997.
9. Руководство по пульмонологии / Под ред. Н.В. Путова, Г.Б. Федосеева. — Л.: Медицина. — 1978.
10. Черняев А.Л. Хронические обструктивные болезни легких: В руководстве «Клеточная биология лёгких в норме и патологии» / Под ред. В.В. Ерохина, Л.К. Романовой. — М.: Медицина. — 2000. — С. 357–377.