

На правах рукописи

РЫБАКОВА
ОЛЬГА ГЕННАДЬЕВНА

**КЛИНИКО-ЦИТО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ В
ПРОЦЕССЕ ФОРМИРОВАНИЯ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ
ПРЕДДОШКОЛЬНОГО И ДОШКОЛЬНОГО ВОЗРАСТА**

14.01.08 – педиатрия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Екатеринбург – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,
доцент, заслуженный врач РФ

Федоров Игорь Анатольевич

Официальные оппоненты:

Царькова Софья Анатольевна – доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующая кафедрой поликлинической педиатрии и педиатрии ФПК и ПП.

Мельникова Ирина Михайловна - доктор медицинских наук, доцент, ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующая кафедрой госпитальной педиатрии.

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «__» _____ 2016 г. в __ часов на заседании совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 208.102.02, созданного на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина, д. 3.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке имени В.Н. Климова ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России по адресу: 620028 г. Екатеринбург, ул. Ключевская, д. 17 и на сайте университета www.usma.ru, а с текстом автореферата – на сайте ВАК Министерства образования и науки РФ: vak3.ed.gov.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2016 года

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 208.108.02,
доктор медицинских наук, профессор

Гришина Ирина Федоровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

По всему миру идет рост распространенности аллергических заболеваний и бронхиальная астма (БА) не является исключением. У детей БА является наиболее часто встречаемой хронической бронхолегочной патологией, которой страдает от 5 до 10% детского населения, а распространенность симптомов бронхиальной астмы у детей в разных странах колеблется от 1,5% до 20% (Геппе Н.А. и соавт., 2015; Фрейдин М.Б., Огородова Л.М., Пузырев В.П., 2015; Балаболкин И.И., 2012; Brozek G. et al., 2016; Yoshihara S., 2016; Sha L. et al., 2015). На современном этапе развития медицины существует множество согласительных документов международного уровня и национальных программ по БА, но диагностика этой патологии у детей раннего возраста остается недостаточно эффективной (Национальная программа..., 2012; Геппе Н.А., 2012; GINA, 2015; Walford Н.Н., Doherty А.Т., 2014; Bacharier L.B. et al., 2008).

По данным авторов из разных стран, в 60-80% случаев БА у детей формируется в раннем возрасте, причем нередко уже на первом году жизни (Геппе Н.А. и соавт., 2015; Балаболкин И.И., 2012; Мизерницкий Ю.Л., 2011; Sha L. et al., 2015). Вследствие раннего старта БА у детей раннего возраста имеет свои клинические особенности и трудности диагностики (Баранов А.А., Хаитов Р.М., 2011; Беш Л.В., 2008; Fuchs O., von Mutius E., 2013; Pedersen S.E. et al., 2010).

Крупные эпидемиологические исследования, проведенные в разных странах, показали, что диагностика БА запаздывает в среднем на 4 года и более, что можно объяснить отсутствием у практических врачей четких критериев диагностики БА у детей 5 лет и младше, нежеланием регистрировать болезнь из-за боязни ухудшить отчетные показатели, негативным отношением родителей ребенка к данному диагнозу (Жаков Я.И. и соавт., 2015; Баранов А.А., Хаитов Р.М., 2011; Brozek G. et al., 2016; Demoly P. et al., 2010; Lai С.К. et al., 2009). Длительно скрываясь под маской острого обструктивного бронхита (ООБ) и других диагнозов, БА у детей раннего возраста часто не распознается, больные не получают своевременно базисную терапию, не соблюдают элиминационные рекомендации, что может привести к увеличению спектра сенсибилизации, быстрому развитию процессов

ремоделирования дыхательных путей, увеличению затрат на купирование обострений, снижению качества жизни, образования, а также к росту инвалидизации от БА в возрастной группе 8-14 лет (Геппе Н.А. и соавт., 2015; Жаков Я.И. и соавт., 2015; Новик Г.А. и соавт., 2015; Мизерницкий Ю.Л., 2014; Черняк Б.А. и соавт., 2013; Fuchs O. et al., 2013).

Медико-социальная значимость проблемы БА и материальный ущерб от заболевания диктуют необходимость поиска доступных, воспроизводимых, неинвазивных методик и разработки новых эффективных диагностических критериев для раннего выявления БА у детей в возрасте 5 лет и младше, находящихся в группе риска по ее формированию (Зайцева О.В., 2008; Козырицкая Д.В. и соавт., 2007; Vacharier L.V. et al., 2008).

Вышесказанное определило цель и задачи исследования.

Цель исследования

На основании углубленного анализа клинических данных, лабораторных показателей и клеточного состава индуцированной мокроты выявить наиболее информативные критерии ранней диагностики бронхиальной астмы у детей дошкольного и дошкольного возраста.

Задачи исследования

1. Оценить анамнестические данные и клинические особенности респираторных симптомов у детей в возрасте 5 лет и младше из групп риска по формированию бронхиальной астмы (эпизоды острого обструктивного бронхита в анамнезе, атопический дерматит без эпизодов острого обструктивного бронхита в анамнезе).

2. Исследовать клеточный состав и иммунологические показатели индуцированной мокроты у детей в возрасте 5 лет и младше из групп риска по формированию бронхиальной астмы, детей с впервые выявленной бронхиальной астмой и детей без аллергических заболеваний.

3. Определить изменения клеточного состава индуцированной мокроты в динамике у детей из группы риска по формированию бронхиальной астмы (эпизоды острого обструктивного бронхита в анамнезе) и детей со сформировавшейся бронхиальной астмой по данным проспективного когортного

исследования, а также на основании анализа клеточного состава индуцированной мокроты выявить воспалительный фенотип у детей, сформировавших бронхиальную астму.

4. Установить эффективные цитологические критерии бронхиальной астмы по данным индуцированной мокроты у детей в возрасте 5 лет и младше из группы риска по ее формированию (эпизоды острого обструктивного бронхита в анамнезе) для оптимизации алгоритма ранней диагностики этого заболевания.

Научная новизна исследования

Определены особенности клеточного состава и иммунологических показателей индуцированной мокроты (ИМ) у детей с БА, детей из групп риска по формированию БА (эпизоды ООБ в анамнезе, атопический дерматит (АтД) без эпизодов ООБ в анамнезе) и детей без проявлений аллергических заболеваний в возрасте 5 лет и младше.

При анализе уровня эозинофилов ИМ получены новые цитологические критерии, которые могут служить основанием для ранней диагностики БА у детей 5 лет и младше из группы риска по ее формированию (эпизоды ООБ в анамнезе), определена необходимая кратность исследования уровня эозинофилов ИМ.

Новизна подтверждена патентами на изобретение: «Способ получения индуцированной мокроты у детей для оценки степени и характера воспаления слизистой оболочки бронхов» (Пат. РФ №2364341 от 24.04.2008), «Способ диагностики бронхиальной астмы у детей раннего возраста с использованием данных цитологии индуцированной мокроты» (Пат. РФ №2407451 от 27.12.2010) и «Способ диагностики бронхиальной астмы у детей младшего возраста» (приоритетная справка №2016109306 от 17.03.16).

Теоретическая и практическая значимость исследования

Дана клиническая характеристика, оценены данные анамнеза и цитоиммунологические показатели индуцированной мокроты у детей в возрасте 5 лет и младше с впервые выявленной бронхиальной астмой, детей из групп риска по формированию бронхиальной астмы и детей без аллергических заболеваний

Показана возможность использования модифицированного метода индуцированной мокроты у детей в возрасте 5 лет и младше как неинвазивного,

безопасного, доступного и эффективного метода для ранней диагностики бронхиальной астмы.

Предложены эффективные и доступные диагностические критерии, которые позволят оптимизировать алгоритм ранней диагностики бронхиальной астмы у детей в возрасте 5 лет и младше из групп риска по ее формированию.

Основные положения, выносимые на защиту

1. У детей групп риска по формированию бронхиальной астмы и у детей с впервые выявленной бронхиальной астмой одинаково часто встречаются кашель длительностью больше 3-х недель, реакции на пищевые, растительные аллергены и на 2 и более видов аллергенов, аллергический ринит, атопический дерматит, проявления атопического дерматита в возрасте до 1 года, отягощенная наследственность по бронхиальной астме, повышенный уровень общего IgE крови.

2. Повышенный уровень эозинофилов индуцированной мокроты ($\geq 2,5\%$) выявляется не менее, чем у трети детей групп риска по формированию бронхиальной астмы и у 100% детей с впервые выявленной бронхиальной астмой, анализируемые иммунологические показатели индуцированной мокроты у детей этих групп не отличаются.

3. Цито-иммунологические изменения на уровне слизистой оболочки бронхиального дерева коррелируют с количеством эпизодов обструктивного бронхита у детей с впервые выявленной бронхиальной астмой и детей из группы риска по ее формированию.

4. Уровень эозинофилов индуцированной мокроты $\geq 5\%$, а также уровень эозинофилов индуцированной мокроты в интервале от $\geq 2,5\%$ до $< 5\%$ в сочетании с положительным индексом риска астмы могут служить дополнительными критериями ранней диагностики бронхиальной астмы у детей в возрасте 5 лет и младше из группы риска по ее формированию (эпизоды острого обструктивного бронхита в анамнезе).

Апробация работы

Основные положения диссертационной работы доложены на VI итоговой научно-практической конференции молодых ученых ЧелГМА (Челябинск, 2008),

на VII Российском Конгрессе «Современные технологии в педиатрии и детской хирургии» (Москва, 2008), на XVIII Национальном Конгрессе по болезням органов дыхания (Екатеринбург, 2008), на V Международной научно-практической конференции «Научные исследования: от теории к практике» (Чебоксары, 2015), на международной научной конференции «Наука и образование в современной России» (Москва, 2015), на XI Всероссийской научно-практической конференции «Мировая наука и образование: прошлое, настоящее и будущее» (Ростов-на-Дону, 2015).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 18 научных работ, в том числе 5 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК для публикации результатов диссертационных исследований.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены в работу детского аллергологического отделения МАУЗ ОТКЗ ГKB №1 г. Челябинска; в работу врачей педиатров и аллергологов МБУЗ ДГКП №1 г. Челябинска; освещаются при преподавании болезней органов дыхания студентам IV и VI курсов на кафедре Факультетской педиатрии ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 164 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы материалы и методы исследования, главы собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений, списка литературы, включающего 253 источника, в том числе 110 отечественных и 143 иностранных авторов. Диссертация иллюстрирована 26 таблицами, 18 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Тип исследования: I этап - поперечный срез; II этап - когортное проспективное; III этап - когортное проспективное, анализ десятилетнего катамнеза. Метод выборки: сплошной (по мере поступления в стационар).

Источниковая популяция: дети, поступившие на обследование в отделение патологии детей раннего возраста, детское аллергологическое и кардиологическое отделения МУЗ ГКБ №1 г. Челябинска за период 2005-2007 гг.

Критерии включения: возраст от 1 года до 5 лет; один и более эпизодов ООБ в анамнезе; атопический дерматит (АтД); впервые выявленная БА; согласие родителей на участие в исследовании.

Критерии исключения: хронические соматические заболевания в стадии обострения; пороки развития внутренних органов; подозрение на врожденные и наследственные заболевания бронхолегочной системы; тяжелое течение атопического дерматита; подозрение на гастро-эзофагеальный рефлюкс; диагностированная глистная инвазия; острые инфекционные заболевания в течение предшествующего месяца; вакцинация в течение предшествующего месяца; базисная терапия бронхиальной астмы, аллергического ринита; системная терапия атопического дерматита; отсутствие постоянного места жительства.

В соответствии с целью и задачами исследования были набраны и разделены на 4 группы 157 детей: 1 группа (85 детей) – дети с одним и более эпизодами ООБ в анамнезе; 2 группа (34 ребенка) – дети с АтД без эпизодов ООБ в анамнезе; 3 группа (21 ребенок) – дети с впервые выявленной БА; 4 группа (17 детей) – сравнения, дети без аллергических заболеваний и без эпизодов ООБ в анамнезе из отделения патологии детей раннего возраста и детского кардиологического отделения, поступившие на обследование по поводу гемодинамически незначимых малых аномалий сердца. В 1 группе количество эпизодов ООБ у детей в анамнезе составило (Me; 25-75%) - 2,0 [1,0-3,0]. Все группы были сопоставимы по полу и возрасту, средний возраст детей составил $3,2 \pm 1,3$ года. Дети с эпизодами ООБ в анамнезе (1 группа) и дети с АтД (2 группа) считаются детьми групп риска по развитию БА (Национальная программа..., 2012; Баранов А.А., Хайтов Р.М., 2011). Дизайн исследования представлен на рисунке 1. На всех детей была заполнена персональная анкета, проводилось исследование клеточного состава назального секрета (НС) и ИМ при личном участии автора (окраска по Романовскому Д.Л., с подсчетом клеточных элементов не менее, чем в 10 полях зрения, не менее 200 клеток, результат отображался в процентах).

I этап исследования - поперечный срез			
157 детей			
Группа 1 Дети с обструктивным бронхитом в анамнезе (n=85)	Группа 2 Дети с атопическим дерматитом (n=34)	Группа 3 Дети с впервые выявленной бронхиальной астмой (n=21)	Группа 4 Сравнения (дети без аллергических заболеваний) (n=17)
Обследование: общий анализ крови, общий IgE крови (МЕ/мл), IgA крови (г/л), кал на цисты лямблий, кал на яйца гельминтов, Ат к лямблиям, описторху, трихинелле, эхинококку, токсокаре (ИФА), бактериологический посев из носа, зева, мокроты, цитологическое исследование назального секрета, индуцированной мокроты, осмотр аллерголога, ЛОР-врача, невролога, у 52 детей исследование иммунологических показателей индуцированной мокроты,			
II этап исследования – когортное восемнадцатимесячное наблюдение за детьми 1 группы (из 85 детей продолжили участие в исследовании 54 ребенка).			
Всем детям через 6, 12 и 18 месяцев проводился осмотр, сбор анамнеза, исследование цитологии назального секрета и индуцированной мокроты. У 19 детей в начале исследования и через 18 месяцев проводился анализ иммунологических показателей индуцированной мокроты.			
За время наблюдения у 29 детей БА не сформировалась (группа 1а), у 25 детей – БА сформировалась (группа 1б)			
III этап исследования - анализ десятилетнего катамнеза детей 1 группы (n=72), повторное обследование через 10 лет детей 1 группы без диагноза «бронхиальная астма» на предыдущих этапах исследования (n=36)			
Осмотр, сбор анамнеза, исследование цитологии НС и ИМ			
У 7 из 36 детей в течение 10 лет от начала наблюдения сформировалась БА Группы: 1в (n=29) – без БА через 10 лет, 1г (n=7) – с БА через 10 лет			
Дети с бронхиальной астмой через 10 лет от начала исследования по данным всех этапов n=25+7=32 (44,4%) из 72 детей с эпизодами ООБ в анамнезе, обследованных в динамике			

Рисунок 1 – Схема организации исследования

У трети детей (n=52) проводилось исследование иммунологических показателей ИМ и у 19 детей эти показатели были изучены в динамике через 18 месяцев (в лаборатории кафедры иммунологии и аллергологии ЧелГМА, заведующая кафедрой д.м.н., профессор Теплова С.Н.). Для исследования использовали мокроту, собранную натошак, после ингаляции 5% раствора хлорида натрия. При невозможности откашлять мокроту самостоятельно использовался разработанный нами протокол индукции мокроты (Пат. 2364341 РФ).

В супернатанте мокроты определяли количество белка, муцина (по методу Г.А. Кочетова, 1980), иммунологические показатели: иммуноглобулины (sIgA, IgE, IgM, IgG 1-4), интерлейкины (IL-1 β , IL-4, IL-8, IL-13), TNF α , INF γ (тест-системы производства ЗАО «Вектор-Бэст», г. Новосибирск), для определения уровня IL-13 применяли тест-систему производства «Biosours Europe S.A.», г. Найвелс, Бельгия; результат реакции регистрировали на планшетном спектрофотометре «Multiscan Plus» и выражали в пересчете на белок - мкг/мг белка (IgA, IgG, IgM) и пг/мг белка (IL-1 β , 4, 8, 13, TNF α , INF γ), IgE в МЕ/мг белка, уровень конечных стабильных метаболитов оксида азота (NO) (NO₂, NO₃, NOX) с помощью реакции Гриса в модификации Коробейниковой Э.Н. (2002) и результаты отображали в мкмоль/г белка.

Статистический анализ данных выполнен на базе программ STATISTICA 6.0 (StatSoft, 2001), SPSS 12.0. Для описания количественных признаков в выборке рассчитывались медиана и интерквартильный размах (Ме; 25-75%). Для сравнительного анализа данных при отличном от нормального распределении количественных признаков использовался непараметрический U-тест Манна-Уитни. Оценку различий между группами по качественным признакам проводили с использованием критерия χ^2 и точного критерия Фишера. Связь признаков исследовали с помощью вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Для анализа точности диагностического метода была заполнена соответствующая таблица, графическим выражением которой стало построение ROC-кривой (ROC – Receiver operating characteristic curve). Для анализа вероятности наступления изучаемого исхода в определенный период времени использовался метод Каплана–Мейера. При анализе данных статистически достоверными считались значения $p < 0,05$ (Реброва О.Ю., 2006; Власов В.В., 2001).

Организация исследования одобрена этическим комитетом МУЗ ГKB №1 г. Челябинска (протокол №1/05 от 02.02.2005 г.), с изменениями, одобренными этическим комитетом ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол №3 от 24.03.2016).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для решения первой задачи проведен сравнительный анализ анамнестических данных и клинических особенностей респираторных симптомов у детей исследуемых групп. Для анализа использовались диагностические критерии бронхиальной астмы, описанные в «Национальной программе..., 2012» и широко используемые врачами аллергологами и педиатрами (таблица 1).

Таблица 1 – Анализ диагностических критериев БА у детей 1, 2 и 3 групп

Критерии	Группа 1 ООб (n=85)	Группа 2 АтД (n=34)	Группа 3 БА вп.(n=21)	Р
1. Кашель в ночное время вне ОРЗ	18 (21,2%)	6 (17,6%)	13 (61,9%)	p _{1,2-3} <0,01
2. Кашель на физическую нагрузку	34 (40,0%)	12 (35,5%)	18 (85,7%)	p _{1,2-3} <0,01
3. Затяжной кашель (>3-х недель)	63 (74,1%)	16 (47,1%)	18 (85,7%)	p ₂₋₃ <0,01
<i>Реакция на аллергены (клинически):</i>				
4. Пищевые	82 (96,5%)	34 (100,0%)	20 (95,0%)	>0,05
5. Лекарственные	38 (44,7%)	21 (61,8%)	12 (57,0%)	>0,05
6. Бытовые	32 (37,6%)	10 (29,4%)	14 (66,6%)	p _{1,2-3} <0,05
7. Эпидермальные	23 (27,0%)	7 (20,6%)	12 (60,0%)	p _{1,2-3} <0,05
8. Растительные	44 (51,8%)	15 (44,1%)	14 (74,0%)	>0,05
9. 2 и более групп аллергенов	65 (76,5%)	21 (61,8%)	19 (90,5%)	p ₁₋₃ >0,05 p ₂₋₃ <0,05
<i>Сопутствующие аллергические заболевания:</i>				
10. Аллергический ринит	70 (82,4%)	25 (73,5%)	21 (100,0%)	p ₂₋₃ <0,05
11. Атопический дерматит	74 (87,0%)	34 (100,0%)	20 (95,2%)	>0,05
12. Манифестация АтД в возрасте до 1 года	61 (71,8%)	30 (88,2%)	16 (76,2%)	>0,05
13. Отягощенная наследственность по БА	35 (41,2%)	17 (50,0%)	14 (66,7%)	>0,05
<i>Лабораторные показатели:</i>				
14. Уровень эозинофилов ОАК $\geq 5\%$	18/83 (21,7%)	6/32 (18,8%)	11/21 (52,4%)	p _{1,2-3} <0,05
15. Уровень общего IgE крови ≥ 100 МЕ/мл	37/82 (33,7%)	11/29 (31,0%)	11/21 (52,4%)	>0,05
16. Уровень эозинофилов НС $\geq 5\%$	50 (58,8%)	13 (38,2%)	16 (76,2%)	p ₂₋₃ <0,05

Из таблицы 1 видно, что из 16 анализируемых показателей группа ООБ статистически значимо не отличалась от группы БА по 11 показателям (69,0%), а группа АтД не отличалась по 7 показателям (44,0%). Таким образом, при учете только клинико-anamnestических диагностических критериев, существует риск поставить диагноз «бронхиальная астма» детям, не страдающим этим заболеванием, или, наоборот, «пропустить» бронхиальную астму, так как анализируемые стандартные лабораторные показатели (уровень эозинофилов ОАК, общий IgE крови) у детей с БА в 48,0% случаев в пределах нормы.

В соответствии со второй задачей исследования проведен анализ клеточного состава индуцированной мокроты у обследованных групп детей (таблица 2). В данной работе за повышенный уровень эозинофилов ИМ принят показатель $\geq 2,5\%$ (Gibson P.G. et al., 2003; Stătescu S. et al., 2014). Уровень эозинофилов ИМ $\geq 2,5\%$ выявлен у 100% детей 3 группы, в 1 и 2 группах количество таких детей было статистически значимо меньше (42,4% и 32,4% соответственно, $p_{1,2-3} < 0,05$).

Таблица 2 - Клеточный состав индуцированной мокроты у обследованных детей, Ме; 25-75%

Показатель, (%)	Группа 1 ООБ (n=85)	Группа 2 АтД (n=34)	Группа 3 БА вп. (n=21)	Группа 4 сравнения (n=17)	Р
Эозинофилы	2,0 0,0-6,0	1,0 0,0-3,0	17,0 10,0-42,0	0,0 0,0-0,3	$p_{1,2,4-3} < 0,01$ $p_{1,2,3-4} < 0,01$
Нейтрофилы	66,0 49,0-80,0	70,0 48,0-82,0	47,0 18,0-75,0	63,0 46,0-79,0	$> 0,05$
Альвеолярные макрофаги	23,0 10,5-37,0	18,5 11,0-43,0	15,0 10,0-30,0	30,0 12,0-49,0	$p_{3-4} < 0,01$
Лимфоциты	4,5 3,0-7,0	6,25 2,0-10,0	4,0 2,0-6,0	4,0 3,0-7,5	$> 0,05$

Как видно из таблицы 2, уровень эозинофилов ИМ у детей 1, 2 и 3 групп был выше относительно группы сравнения, причем у детей 3 группы он был самый высокий. Количество альвеолярных макрофагов ИМ у детей 3 группы было значительно ниже относительно детей группы сравнения.

Соотношение иммунологических показателей индуцированной мокроты обследованных детей представлено на рисунке 2.

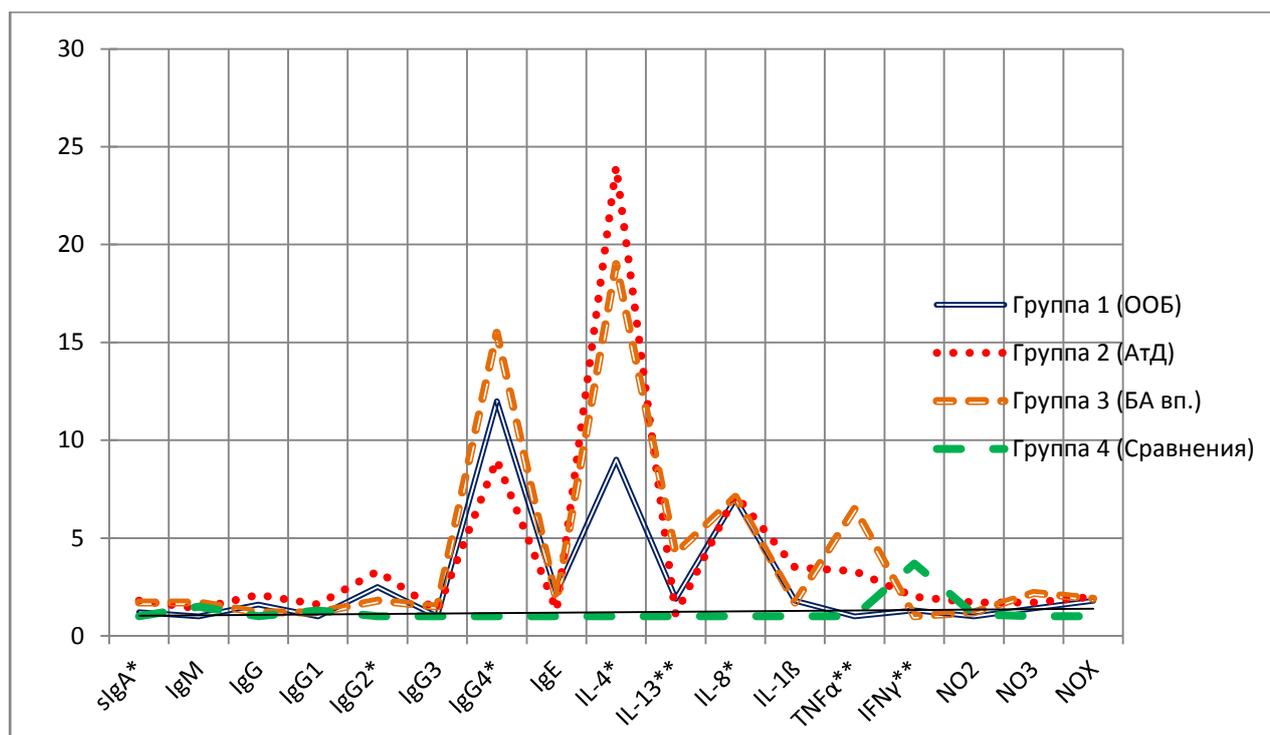


Рисунок 2 – Диаграмма иммунологических показателей индуцированной мокроты у детей обследованных групп (по оси ординат отмечена разница показателей в группах в единицах раз)

Примечание: * - $p_{1,2,3-4} < 0,01$, ** - $p_{3-4} < 0,01$

При анализе иммунологических показателей супернатанта индуцированной мокроты у детей 1, 2 и 3 групп относительно группы сравнения были выявлены следующие особенности: повышение защитных факторов (sIgA, IgG2) ($p_{1,2,3-4} < 0,01$), повышение провоспалительных факторов (IgG4, IL-4, IL-8) ($p_{1,2,3-4} < 0,01$). Для детей 3 группы были характерны высокие уровни IL-13, TNF α и сниженный уровень IFN γ в индуцированной мокроте относительно детей группы сравнения ($p_{3-4} < 0,01$).

Все выявленные особенности повышения или понижения уровней иммунологических показателей ИМ у детей исследуемых групп соотносятся с данными, полученными другими исследователями у более старших детей и взрослых в мокроте, бронхоальвеолярном лаваже, биоптатах бронхов и слюне (Минина Е.Е. и соавт., 2015; Китарова Г.С., 2006; Медведева Л.В., 2006; Федоров И.А., 1999; Stănescu S. et al., 2014; Vijverberg S.J.H. et al., 2013).

При проведении внутригруппового корреляционного анализа полученных клинико-лабораторных данных были установлены следующие достоверные положительные корреляционные связи:

- между количеством эпизодов ООБ и уровнем TNF α ИМ ($r=0,514$, $p<0,01$), уровнем IL-13 ИМ ($r=0,369$, $p<0,05$), уровнем эозинофилов ИМ ($r=0,314$, $p<0,01$);

- между уровнем эозинофилов ИМ и уровнями TNF α ИМ ($r=0,478$; $p<0,05$) и IL-4 ИМ ($r=0,334$, $p<0,05$);

Для реализации третьей задачи исследования группа детей с ООБ (54 ребенка из 1 группы) приняла участие в когортном проспективном наблюдении в течение 18 месяцев (II этап) с определением в динамике клеточного состава и иммунологических показателей индуцированной мокроты. Также мы выявляли детей, у которых за время наблюдения произошла манифестация БА (из 54 детей БА сформировалась у 25 – 46,3%).

Дети были разделены на 2 группы в зависимости от отсутствия/наличия установленного диагноза БА через 18 месяцев от начала наблюдения: без БА на момент окончания исследования (1а группа, $n=29$) и с установленным диагнозом БА за время наблюдения (1б группа, $n=25$). Учитывая, что основным заболеванием, с которым приходится дифференцировать БА у детей раннего возраста, является ООБ, далее был проведен анализ особенностей течения ООБ у детей обследованных групп (таблица 3).

Обращает на себя внимание отсутствие различий в количестве эпизодов ООБ в анамнезе между группами, в то время как за период наблюдения количество детей с повторными эпизодами ООБ в группе 1б стало в 2,6 раза больше ($p=0,02$). Для детей 1б группы было характерно частое возникновение синдрома бронхиальной обструкции в первые двое суток от начала ОРВИ, течение ООБ без повышения температуры, возникновение ООБ на фоне сочетания ОРВИ с действием предполагаемого аллергена, возникновение ночного кашля вне ОРЗ (44,0% против 13,8%, $p<0,01$), кашля на физическую нагрузку вне ОРЗ (72,0% против 37,9%, $p=0,02$) и кашля при контакте с предполагаемым аллергеном (60,0% против 17,2%, $p<0,01$).

Таблица 3 - Клинико-anamнестические особенности течения острого обструктивного бронхита у обследованных детей

Показатель	Группа 1а (n=29)		Группа 1б (n=25)		P
	n	%	n	%	
Количество эпизодов ООБ в анамнезе:					
Количество эпизодов ООБ <3	17	58,6	14	56,0	p>0,05
Количество эпизодов ООБ ≥3	12	41,4	11	44,0	
Количество эпизодов ООБ за время наблюдения:					
0	21	72,4	7	28,0	p=0,002
1	6	20,7	6	24,0	p>0,05
2	2	6,9	9	36,0	p=0,015
3	0	0	3	12,0	p>0,05
Сроки возникновения бронхообструктивного синдрома на фоне ОРИ:					
1-2 сутки	7	24,1	19	76,0	p<0,001
3-4 сутки	22	75,9	6	24,0	
Триггер ООБ:					
ОРИ	24	82,8	9	36,0	p<0,001
ОРИ+аллергены	5	17,2	16	64,0	
Повышение температуры при ООБ	24	82,8	11	44,0	p=0,001

На момент начала исследования в группе 1б относительно группы 1а было больше детей с повышенным количеством эозинофилов крови (40,0% против 13,8%, p<0,05), повышенным уровнем общего IgE крови (56,0% против 13,8%, p=0,002), повышенным содержанием эозинофилов НС (72,0% против 44,8%, p<0,05), с уровнем эозинофилов ИМ ≥2,5% (76,0% против 34,5%, p<0,05) и ≥5% (52,0% против 17,2%, p<0,05). Данные цитологического исследования индуцированной мокроты в динамике представлены в таблице 4.

Уровень эозинофилов ИМ у детей 1б группы был высоким и на момент окончания исследования, отмечено его статистически значимое повышение на фоне снижения количества нейтрофилов, в то время как в 1а группе уровень

эозинофилов и нейтрофилов ИМ не изменился. По остальным показателям статистически значимых отличий не выявлено.

Таблица 4 – Клеточный состав индуцированной мокроты обследованных детей, Ме; 25-75%

Показатель, %	Группа 1а (n=29)			Группа 1б (n=25)			P _{Mann-Whitney}
	Начало исследования	Через 18 месяцев	p _{wilc.}	Начало исследования	Через 18 месяцев	p _{wilc.}	
Эозинофилы	1,0 0,0-4,0	2,0 1,0-3,0	p>0,05	6,0 2,4-17,0	12,0 4,0-22,0	p<0,05	p ¹ <0,01 P ² <0,001
Нейтрофилы	72,0 49,5-82,5	64,0 46,5-80,5	p>0,05	58,0 48,5-77,0	59,0 39,0-67,5	p<0,05	p ¹ >0,05 P ² >0,05
Альвеолярные макрофаги	19,0 8,85-37,0	26,0 12,1-46,5	p>0,05	23,0 8,5-35,0	23,0 11,0-44,0	p>0,05	p ¹ >0,05 P ² >0,05
Лимфоциты	5,0 2,55-9,5	4,0 2,5-7,0	p>0,05	4,0 3,0-7,0	4,0 2,5-6,5	p>0,05	p ¹ >0,05 P ² >0,05

Примечание: p¹ – на момент начала исследования, p² – на момент окончания исследования

Для реализации четвертой задачи – выявление цитологических диагностических критериев – был проведен анализ ROC-кривых и III этап работы.

Анализ ROC-кривых проводился для определения диагностической эффективности стандартных лабораторных показателей (эозинофилы крови, уровень общего IgE крови) и эозинофилов ИМ. Выявлено, что эффективным критерием диагностики БА у детей 5 лет и младше из групп риска по ее формированию является уровень эозинофилов в мокроте $\geq 5\%$, что подразумевает наличие БА в 94,4 % случаев. Однако, выявление уровня эозинофилов ИМ $< 5\%$ не исключает диагноз «бронхиальная астма». Для детей с уровнем эозинофилов ИМ $< 5\%$ нами был разработан другой алгоритм диагностики БА - комбинация индекса риска астмы (API – asthma predictive index) (Castro-Rodriguez J.A. et al., 2000) и уровня эозинофилов индуцированной мокроты. У абсолютного большинства детей в нашем исследовании (52 ребенка - 96,3%) API был положительным, однако, формирование БА произошло лишь у 25 человек (48,1%). Мы увеличили прогностическую ценность этого клинического индекса использованием наиболее информативного из лабораторных показателей, по данным нашего исследования,

уровня эозинофилов ИМ. При положительном значении АРІ и уровне эозинофилов ИМ в интервале от $\geq 2,5\%$ до $< 5\%$ вероятность диагноза БА составляет 70,4%, что в 1,52 (95% ДИ [1,04-2,23]) раза выше, чем при положительном индексе риска астмы без оценки уровня эозинофилов индуцированной мокроты.

При анализе десятилетнего катамнеза детей с эпизодами ООБ в анамнезе (III этап) у большей части детей (n=72) были получены сведения о наличии или отсутствии диагноза БА (рисунок 3) и представилось возможным оценить сроки постановки диагноза БА с помощью кривой «дожития» Каплана-Мейера (Реброва О.Ю., 2006), построенной на синхронизированной от времени возникновения обструкций когорте через 10 лет от начала исследования.

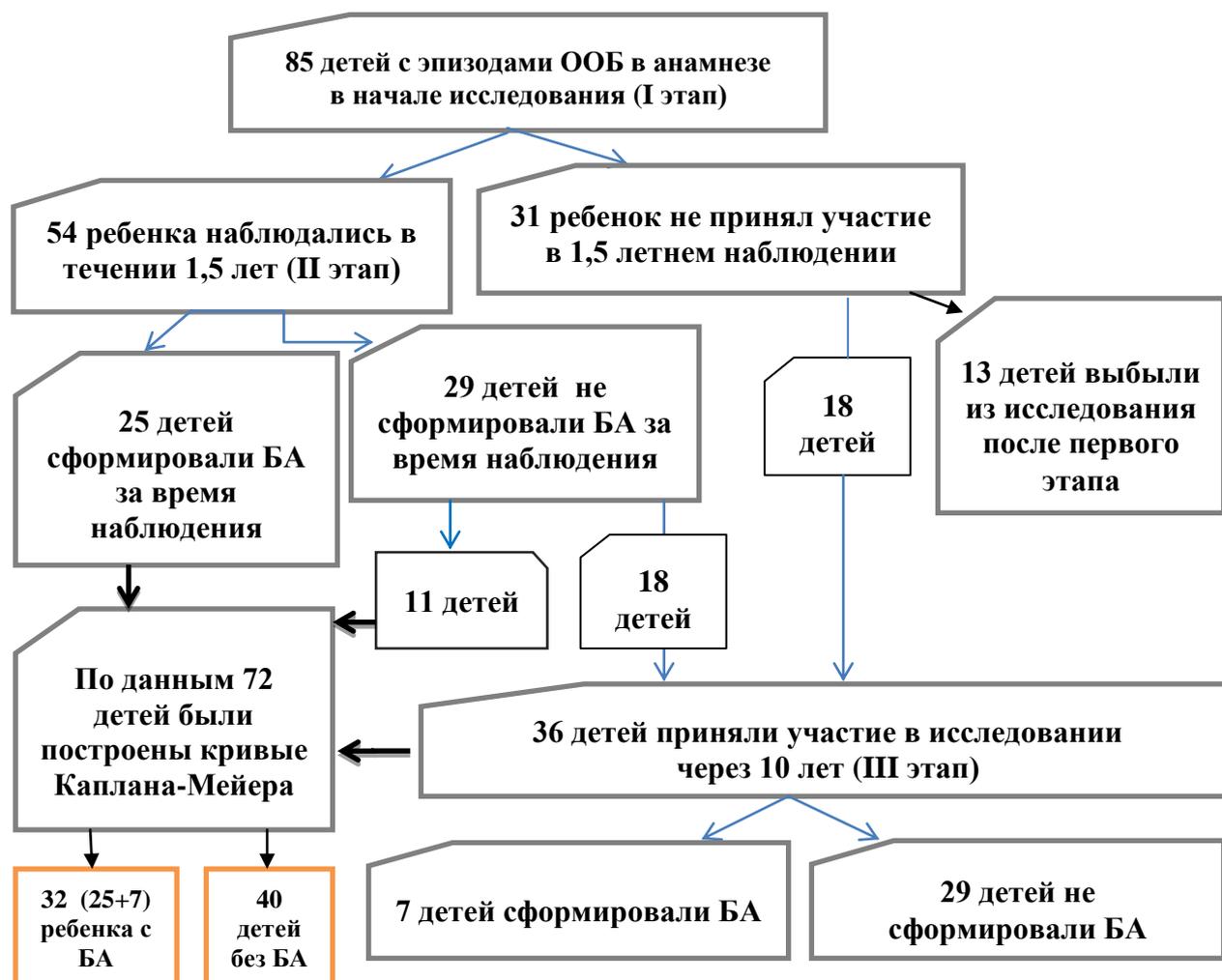


Рисунок 3 – Распределение детей по группам в зависимости от участия в исследовании и формирования бронхиальной астмы.

Кумулятивная доля пациентов, у которых диагностика БА произошла к максимальному сроку наблюдения (160 месяцев), составила 44,4% (32 ребенка). Факторами риска формирования БА у этих детей явились клинические проявления эпидермальной аллергии (ОР=1,87; 95% ДИ [1,18; 2,97]), растительной аллергии (ОР=2,17; 95% ДИ [1,21; 3,89]), реакция на 2 и более групп аллергенов (ОР=3,68; 95% ДИ [1,49; 9,08]), ночной кашель вне ОРЗ (ОР=1,84; 95% ДИ [1,21; 2,79]), уровень эозинофилов крови $\geq 5\%$ (ОР=2,39; 95% ДИ [1,62; 3,51]). Также группа детей, у которых шло формирование БА, характеризовалась приростом уровня эозинофилов ИМ (%) в динамике через 18 месяцев с 4,5 [1,8-15,0] до 8,5 [3,5-21,5]. У 82% детей с БА выявлялся эозинофильный тип воспаления слизистой оболочки бронхов. У детей без БА, исходный уровень эозинофилов ИМ был 1,0 [0,0-4,0] без прироста через 18 месяцев – 1,0 [0,0-2,0]. Было установлено, что при выявлении у детей с изначальным уровнем эозинофилов ИМ $< 2,5\%$ прироста уровня эозинофилов до 5% и выше, вероятность диагноза «бронхиальная астма» - 95,2%.

По данным клеточного состава ИМ из 32 детей, сформировавших БА за время наблюдения, у 4 человек (13%) был выявлен малогранулоцитарный тип воспаления, у 2 (6%) – смешанный тип воспаления, у 26 (81%) – эозинофильный тип воспаления слизистой оболочки бронхов.

Через 10 лет от начала наблюдения были обследованы повторно 36 детей из группы ООБ без диагноза «бронхиальная астма» на предыдущих этапах исследования. Возраст детей в исследовании составил 12,0 [11,5-13,0] лет. Дети были разделены на 2 группы в зависимости от отсутствия/наличия установленного диагноза БА через 10 лет от начала исследования: без БА (1в группа, n=29) и с БА (1г группа, n=7). По анализируемым клинико-anamnestическим данным дети 1в и 1г групп на момент начала и окончания исследования статистически значимо не отличались. Уровень эозинофилов крови (%) был статистически значимо выше у детей 1г группы, через 10 лет эта разница сохранилась. Уровень IgE не отличался у детей обследованных групп в начале исследования ($p > 0,05$). Эозинофилы НС были повышены у детей 1г группы на момент начала исследования ($p < 0,05$), на момент окончания исследования (через 10 лет) уровень эозинофилов НС снизился и перестал отличаться от уровня детей 1в группы ($p > 0,05$). Уровень эозинофилов

ИМ у детей 1г группы в начале и в конце исследования был статистически значимо выше показателя детей 1в группы, в начале исследования он составлял <2,5%, а в конце исследования >2,5%. У детей 1в группы в динамике отмечено статистически значимое снижение уровня эозинофилов и нейтрофилов на фоне увеличения количества альвеолярных макрофагов.

Учитывая полученные данные, был разработан алгоритм ранней диагностики бронхиальной астмы у детей с учетом уровня эозинофилов индуцированной мокроты и индекса риска астмы (рисунок 4).

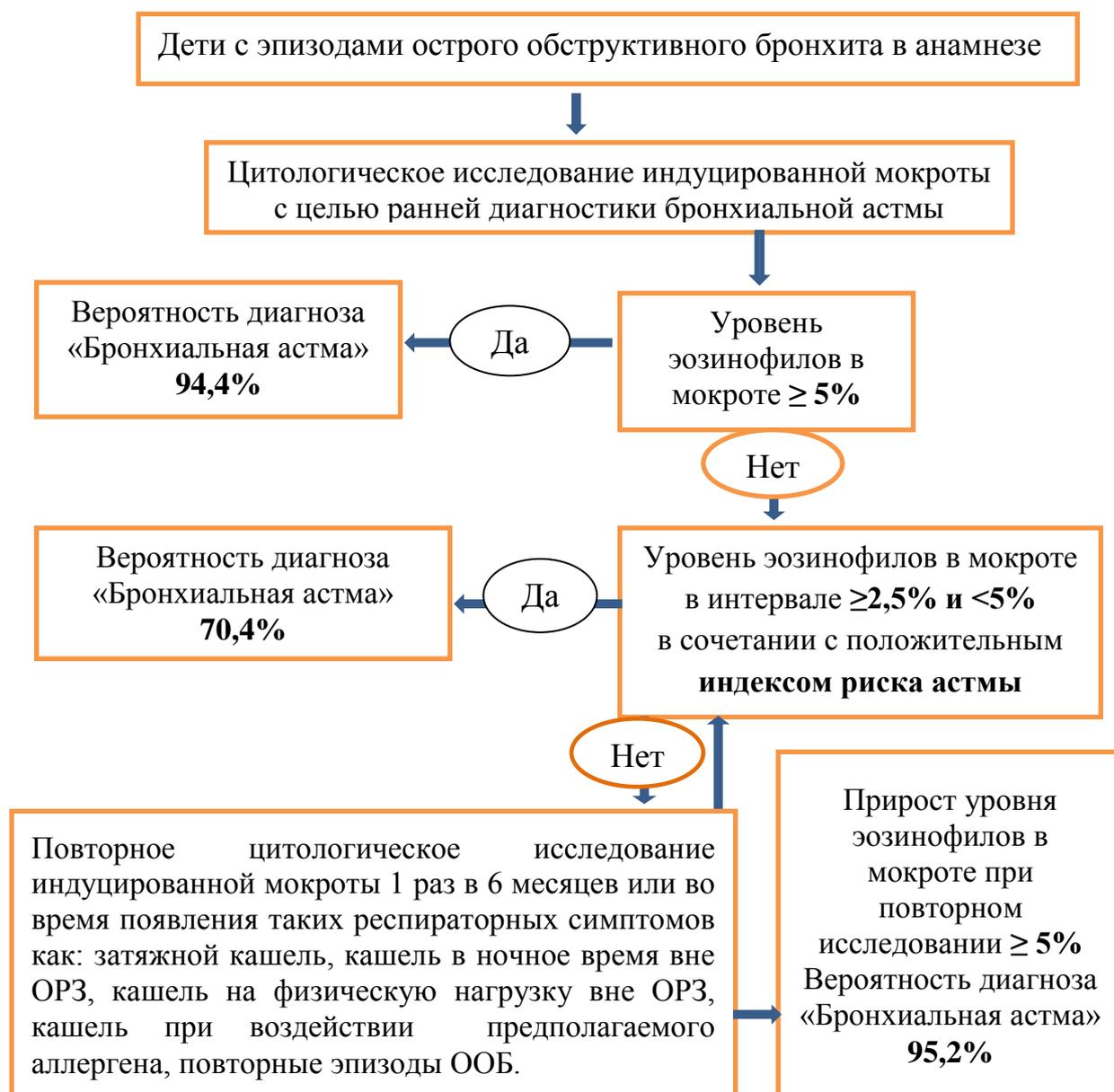


Рисунок 4 – Алгоритм ранней диагностики бронхиальной астмы у детей с учетом уровня эозинофилов индуцированной мокроты и индекса риска астмы

ВЫВОДЫ

1. Для детей из групп риска по формированию бронхиальной астмы (эпизоды острого обструктивного бронхита в анамнезе, атопический дерматит без эпизодов острого обструктивного бронхита в анамнезе) характерны высокая отягощенность аллергологического и семейного анамнеза; у них выявляются симптомы, характерные для течения бронхиальной астмы: ночной кашель (21,2% и 17,6% соответственно), кашель на физическую нагрузку вне острого респираторного заболевания (40,0% и 35,0% соответственно).

2. Содержание эозинофилов и уровни sIgA, IgG2, IgG4, IL-4, IL-8 в индуцированной мокроте выше, а содержание IFN γ ниже у детей с впервые выявленной бронхиальной астмой и детей из групп риска по формированию бронхиальной астмы относительно детей без аллергических заболеваний. У детей из групп риска уровень эозинофилов индуцированной мокроты ниже показателя детей с бронхиальной астмой, а иммунологические показатели статистически значимо не отличаются, что свидетельствует о наличии аллергического воспаления на уровне слизистой оболочки бронхов у части детей группы риска по формированию бронхиальной астмы.

3. Анализ десятилетнего катамнеза детей, находившихся в процессе формирования БА, выявил прирост уровня эозинофилов индуцированной мокроты в динамике с $<2,5\%$ до $>2,5\%$ у 82% детей, что характеризует эозинофильный тип воспаления слизистой оболочки бронхов. Для детей без бронхиальной астмы через 10 лет от начала исследования характерно снижение уровня эозинофилов и нейтрофилов индуцированной мокроты на фоне повышения уровня альвеолярных макрофагов индуцированной мокроты. У детей с эпизодами острого обструктивного бронхита в анамнезе бронхиальная астма сформировалась в 44,4% случаев, из них к 5 годам - у 78% детей.

4. Эффективными цитологическими критериями бронхиальной астмы, позволяющими оптимизировать алгоритм диагностики заболевания у детей из групп риска, являются уровень эозинофилов индуцированной мокроты $\geq 5\%$ (выявление бронхиальной астмы в 94,4% случаев), уровень эозинофилов индуцированной мокроты в интервале от $\geq 2,5\%$ до $<5\%$ в сочетании с положительным индексом риска астмы (выявление бронхиальной астмы в 70,4% случаев).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Уровень эозинофилов индуцированной мокроты $\geq 5\%$ может быть рекомендован как доступный и воспроизводимый биомаркер для ранней диагностики бронхиальной астмы у детей 5 лет и младше из групп риска по ее формированию. При выявлении уровня эозинофилов индуцированной мокроты в интервале от $\geq 2,5\%$ до $< 5\%$ рекомендовано оценивать индекс риска астмы, что позволяет при его положительном значении диагностировать бронхиальную астму в 70,4% случаев у детей из групп риска по ее формированию.

2. Детям из групп риска по формированию бронхиальной астмы с уровнем эозинофилов индуцированной мокроты $< 2,5\%$ рекомендовано повторное обследование 1 раз в 6 месяцев или во время появления таких респираторных симптомов как: затяжной кашель, кашель в ночное время вне острого респираторного заболевания, кашель на физическую нагрузку вне острого респираторного заболевания, кашель при воздействии аллергена, повторные эпизоды острого обструктивного бронхита. В случае прироста уровня эозинофилов индуцированной мокроты до 5% и выше диагноз «бронхиальная астма» вероятен в 95,2% случаев.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Мизерницкий, Ю.Л. Уровень метаболитов оксида азота в индуцированной мокроте: сравнительная характеристика у детей с рецидивирующим обструктивным бронхитом и бронхиальной астмой / Ю.Л. Мизерницкий, Я.И. Жаков, Е.Е. Минина, О.Г. Рыбакова, Е.В. Давыдова // Российский аллергологический журнал. - 2008. - № 1. - С. 179-180. - Прил. 1. Труды Национальной конференции "Аллергология и клиническая иммунология - междисциплинарные проблемы".

2. Жаков, Я.И. Сравнительная характеристика иммунологических показателей индуцированной мокроты у детей с бронхиальной астмой легкой степени тяжести / Я.И. Жаков, Е.Е. Минина, О.Г. Рыбакова, В.И. Куличков // Уральский мед. журн. - 2008. - № 4 (44). - С. 11-14.

3. Минина, Е.Е. Сравнительная характеристика цито-иммунологических показателей у детей с бронхиальной астмой / Е.Е. Минина, О.Г. Рыбакова // Материалы VI итоговой научно-практической конференции молодых ученых Челябинской государственной медицинской академии. - Челябинск: Изд-во ЧелГМА, 2008. - С. 92-95.

4. Жаков, Я.И. Особенности цито-иммунологических показателей у детей с бронхиальной астмой / Я.И. Жаков, Ю.Л. Мизерницкий, Е.Е. Минина, О.Г. Рыбакова // *Материалы седьмого Российского конгресса "Современные технологии в педиатрии и детской хирургии"*. - Москва: ОВЕРЛЕЙ, 2008. - С. 270.

5. Жаков, Я.И. Сравнительная характеристика уровня метаболитов оксида азота в индуцированной мокроте у детей с рецидивирующим обструктивным бронхитом и бронхиальной астмой / Я.И. Жаков, Ю.Л. Мизерницкий, О.Г. Рыбакова, Е.Е. Минина // *Материалы седьмого Российского конгресса "Современные технологии в педиатрии и детской хирургии"*. - Москва: ОВЕРЛЕЙ, 2008. - С. 271.

6. 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.

7. Пат. 2364341 РФ Способ получения индуцированной мокроты у детей для оценки степени и характера воспаления слизистой бронхов / В.И. Куличков, Ю.Л. Мизерницкий, О.Г. Рыбакова, Я.И. Жаков, Е.Е. Минина. - №2008116364; заявл. 24.04.2008; опубл. 20.08.2009, Бюл. № 23. - 10 с.

8. Жаков, Я.И. Применение метода индуцированной мокроты у детей с впервые выявленной бронхиальной астмой: цито-иммунологические особенности / Я.И. Жаков, О.Г. Рыбакова, М.С. Бабайлов // *Уральский мед. журн.* - 2009 - № 7 (61). – С. 34-37.

9. Жаков, Я.И. Клиническая информативность метода индуцированной мокроты при бронхиальной астме у детей / Я.И. Жаков, Ю.Л. Мизерницкий, Е.Е. Минина, О.Г. Рыбакова, Л.В. Медведева, В.И. Куличков // *Пульмонология детского возраста: проблемы и решения*, - 2009. - № 9. – С. 120-124.

10. Пат. 2407451 РФ Способ диагностики бронхиальной астмы у детей раннего возраста с использованием данных цитологии индуцированной мокроты / Я.И. Жаков, О.Г. Рыбакова, В.И. Куличков, Е.Е. Минина.- №2009117008; заявл. 04.05.2009; опубл. 27.12.2010, Бюл. №36. – 14 с.

11. Жаков, Я.И. Клиническое значение исследования цито-иммунологических показателей индуцированной мокроты при бронхиальной астме у детей в возрасте до 5 лет / Я.И. Жаков, Ю.Л. Мизерницкий, О.Г. Рыбакова, Е.Е. Минина // *Вопросы практ. педиатрии.* – 2010. – Т. 5, № 1. – С. 8-12.

12. Жаков, Я.И. Клинико-anamнестические и лабораторные особенности у детей групп риска по формированию бронхиальной астмы / Я.И. Жаков, О.Г. Рыбакова, Е.Е. Минина, Л.В. Медведева // *Сибирский мед. журн. (Иркутск).* – 2015. - № 5. – С. 31-34.

13. Рыбакова, О.Г. Анализ биологических маркеров бронхиальной астмы у детей, перенесших острый обструктивный бронхит, и детей с впервые выявленной бронхиальной астмой / О.Г. Рыбакова // *Научные исследования: от теории к практике : материалы V Междунар. науч.-практ. конф. (Чебоксары, 06 нояб. 2015 г.) / под ред.*

О.Н. Широков [и др.]. – Чебоксары: ЦНС «Интерактив плюс», 2015. – № 4 (5). – С. 100-104.

14. Рыбакова, О.Г. Цито-иммунологические особенности индуцированной мокроты у детей, перенесших острый обструктивный бронхит и с впервые выявленной бронхиальной астмой [Электронный ресурс] / О.Г. Рыбакова, Е.Е. Минина // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 5. – Режим доступа: <http://www.science-education.ru/128-22614> (дата обращения: 05.11.2015).

15. Рыбакова, О.Г. Анализ индуцированной мокроты как один из способов ранней диагностики бронхиальной астмы у детей из группы риска по ее формированию / О.Г. Рыбакова // Международный журн. эксперим. образования. – 2015. - № 12 (1). - С. 18.

16. Рыбакова, О.Г. Эозинофилия индуцированной мокроты у детей с 1 и более эпизодами острого обструктивного бронхита в анамнезе как маркер формирующейся бронхиальной астмы по результатам когортного исследования / О.Г. Рыбакова // Мировая наука и образование: прошлое, настоящее и будущее: материалы XI Всерос. науч.-практ. конф. - Ростов-на-Дону, 2015. – С. 59-63.

17. Fedorov, I.A. Analysis of clinical, anamnestic and laboratory data in children with asthma and children with a risk of asthma development / I.A. Fedorov, O.G. Rybakova // Selected Papers of the International Scientific School "Paradigma" Winter-2016 (Varna, Bulgaria) / ed. by O.Ja. Kravets. - Yelm, 2016. - С. 24-31.

18. Федоров, И.А. Анализ на клиничко-анамнестични данни и лабораторни показатели при деца с идентифицирана за първи път бронхиална астма и деца с риск за нейното формиране [Электронный ресурс] / И.А. Федоров, О.Г. Рыбакова // Парадигма: электрон. научн. журн. – 2016. – Т. 2, № 1. – Режим доступа: <http://paradigma.science/publics/index.php/paradigma/article/view/125> (дата обращения: 15.03.2016).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АтД	Атопический дерматит	НС	Назальный секрет
БА	Бронхиальная астма	ЦНС	Центральная нервная система
БА вп.	Бронхиальная астма, впервые выявленная	API	Asthma predictive index – Индекс риска астмы
ИМ	Индуцированная мокрота	IFN- γ	Интерферон гамма
ЛОР	Оториноларингология	Ig	Иммуноглобулины
ООб	Острый обструктивный бронхит	IL	Интерлейкины
ОРЗ	Острое респираторное заболевание	NO	Оксид азота
ОРИ	Острая респираторная инфекция	TNF α	Фактор некроза опухолей α

На правах рукописи

РЫБАКОВА
ОЛЬГА ГЕННАДЬЕВНА

**КЛИНИКО-ЦИТО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ В
ПРОЦЕССЕ ФОРМИРОВАНИЯ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ
ПРЕДДОШКОЛЬНОГО И ДОШКОЛЬНОГО ВОЗРАСТА**

14.01.08 – педиатрия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Автореферат напечатан по решению диссертационного совета
ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России от 21.09.2016 г.