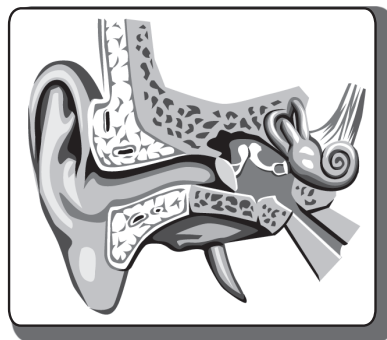




УДК 616.211–002–056.43–07–053.2

Е.В. Просекова, С.Ю. Нетесова, В.А. Сабыныч, Н.Р. Забелина, О.В. Щеголева

КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЙ АЛГОРИТМ ДИАГНОСТИКИ АЛЛЕРГИЧЕСКОГО РИНИТА У ДЕТЕЙ

*Владивостокский государственный медицинский университет,
690002, пр-т Острякова, 2, e-mail: vsmu.fpk@mail.ru, г. Владивосток*

Резюме

Проведена оценка информативности мониторинга локального цитокинового профиля и особенностей цитологического спектра назального секрета при аллергическом рините у детей с изолированным течением и в сочетании с бронхиальной астмой. Обследовано 120 детей в возрасте от 5 до 17 лет с верифицированным диагнозом аллергического ринита и 20 здоровых сверстников. Исследовали интерлейкины 4, 8, 13, интерферон-гамма, фактор некроза опухоли-альфа и IgE в сыворотке крови, назальном секрете и назоцитогамму. В процессе реализации аллергических заболеваний локальный и системный цитокиновый профиль изменяются в зависимости от особенностей течения и периода болезни, объема и продолжительности фармакотерапии. У детей с аллергическим ринитом в назальном секрете зафиксированы: дисбаланс цитокинового профиля, высокие уровни ИЛ-13, ИЛ-4 при дефиците ИФН- γ , разнонаправленная динамика ИЛ-8 и ФНО- α , изменения регуляторных коэффициентов, отмечено высокое содержание IgE. Динамика качественных показателей и количественного содержания клеточного спектра в назальном секрете отражала локализацию, тяжесть и степень активности воспаления. Проведенные исследования обосновали разработку и рекомендации для внедрения в клиническую практику лабораторного диагностического алгоритма аллергического ринита у детей.

Ключевые слова: биомаркеры воспаления, аллергический ринит, назальный секрет, лабораторный алгоритм диагностики.

E.V. Prosekova, S.Y. Netyesova, V.A. Sabynych, N.R. Zabelina, O.V. Shchyegoleva

CLINICAL LABORATORY ALGORITHM OF DIAGNOSING ALLERGIC RHINITIS IN CHILDREN

*State Budget Educational Institution of Higher Professional Education
«Vladivostok State Medical University of the Ministry of Public Health and Social Development Russian Federation»
Municipal Budget Healthcare Institution «Regional Children's Clinical Hospital», Vladivostok*

Summary

The informativity of monitoring of local cytokine profile and peculiarities of cytological spectrum in children with allergic rhinitis and with both allergic rhinitis and bronchial asthma have been estimated. The study took a sample of 120 children aged between 5–17 with verified diagnosis of allergic rhinitis and 20 healthy peers. Interleukins-4, 8, 13, IFN- γ , tumor necrosis factor-alpha and IgE in blood plasma, nasal mucus and nasocytogram were studied. In the process of realization of allergic diseases local and systemic cytokine profiles vary according to the clinical course and period of the disease, duration of pharmacotherapy. Nasal mucus of children with allergic rhinitis showed the imbalance of the cytokine profile, high level of IL 4, IL 13, with the deficiency of IFN- γ , differently directed dynamics of IL 8 and TNF- α , changes of regulatory factors, high level of IgE. Dynamics of qualitative measures and quantitative content of the cell spectrum in nasal mucus reflected localization, severity and degree of activity of inflammation. The research has grounded development and recommendation for introduction of the laboratory diagnostic algorithm into clinical practice.

Key words: biomarkers of inflammation, allergic rhinitis, nasal mucus, laboratory algorithm of diagnosing.

Распространенность среди детей аллергических заболеваний верхних дыхательных путей повсеместно и неуклонно растет. При ринитах различного генеза воспалительный процесс слизистой оболочки носа протекает локально, что затрудняет диагностику заболевания и выявление патогенетических факторов персистирующего воспаления [1, 5, 6, 12]. В инициации, течении воспаления и регуляции патологического процесса участвует цитокиновая сеть. В процессе реализации аллергических заболеваний локальный и системный цитокиновый профиль находится в динамическом состоянии, изменяются в зависимости от фазы течения болезни, воздействуя через клетки иммунной системы. Значимая роль в реализации аллергического воспаления принадлежит интерферону гамма (ИФН- γ), интерлейкинам 4, 5, 10, 13, (ИЛ - 4, 5, 10, 13), тучным клеткам и эозинофилам. ИФН- γ регулирует клеточно-опосредованный иммунный ответ, ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-13 – гуморальный. Цитокины, секретируемые при макрофагально-лимфоцитарной инфильтрации, взаимно активируют клетки, поддерживая воспалительную реакцию [2, 3, 5, 7–9, 12].

На ранних этапах острого ринита и в случаях персистирующего течения заболевания традиционные методы лабораторной диагностики могут оказаться недостаточно чувствительными, что определяет интерес к биомаркерам типичных для того или иного вида воспаления при различных формах ринита [6–8]. Своевременная дифференциальная диагностика патогенетических форм ринита позволяет оптимизировать терапию и контроль заболевания, обосновывает применение различных групп фармакологических препаратов.

В клинической практике дискутируется вопрос значимости биомаркеров воспаления дыхательных путей у детей с наличием аллергической сенсибилизации и без нее, их различия при воспалительном процессе одного органа от полиорганного или системного поражения и диагностической ценности морфологической оценки аллергического воспаления дыхательных путей.

Цель данного исследования – оценка информативности мониторинга локальных цитокиновых механизмов и особенностей цитологического профиля назального секрета для оптимизации алгоритма лабораторной диагностики аллергического ринита у детей.

Материалы и методы

Исследование цитоморфологических показателей слизистой оболочки верхних дыхательных путей и особенностей общего и локального цитокинового профиля в динамике при аллергических заболеваниях проводилось у 140 детей в возрасте от 5 до 17 лет (120 детей с верифицированным диагнозом круглогодичного аллергического ринита (АР), из них у 80 – изолированное течение, у 40 – в сочетании с бронхиальной астмой (БА) и 20 здоровых сверстников).

Цитоморфологические показатели слизистой оболочки верхних дыхательных путей исследовали методом мазков-отпечатков со слизистой носа [3, 4, 7, 11], с окрашиванием по Романовскому – Гимзе, с определением клеточного спектра, количественных и качественных характеристик класса деструкции.

Исследование общего иммуноглобулина IgE в сыворотке крови и назальном секрете проводили иммуноферментным планшетным методом тест-системами «Вектор Бест» (г. Новосибирск), цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-8, ИЛ-13, ИФН- γ , ФНО- α) – иммуноферментным методом в сэндвич-варианте наборами «R&D diagnostics Inc.» (USA). Цифровые показатели анализировали с использованием программы Statistica 6 с определением доверительных интервалов (ДИ). Корреляционную взаимосвязь параметров оценивали методом математических плеяд П.В. Терентьева (1959) с расчетом мощности плеяды – G, относительной мощности плеяды – G/k, крепости плеяд – D.

Результаты и обсуждение

У детей с клиническими проявлениями аллергического ринита доверительные интервалы (ДИ) содержания IgE в сыворотке крови составляли 333,15–389,09 МЕ/мл, в назальном секрете – 24,91–30,02 МЕ/мл. В группе контроля уровень общего IgE в сыворотке крови не превышал 70 МЕ/мл; 25,17 $\pm$ 3,13 МЕ/мл, в назальном секрете был менее 1 МЕ/мл. У детей при АР зафиксирована активация синтеза IgE как системно (497,06 $\pm$ 26,31 МЕ/мл; $p < 0,001$), так и локально. Высокое содержание IgE в сыворотке крови определялось в период обострения АР при тяжелом течении болезни и у детей с сопутствующей БА (ДИ 524,92–741,52 МЕ/мл). Б.А. Черняк с соавт. (2008), анализируя взаимосвязь респираторной аллергии и ОРЗ у часто болеющих детей, отмечали у последних в 25,2% случаев высокие цифры сывороточного IgE – до 288 МЕ/мл на фоне ОРЗ, но в отличие от детей с респираторной аллергией, у данной группы детей уровень IgE в течение года нормализовался [10]. В нашем исследовании у детей с аллергопатологией уровень IgE в назальном секрете составил 23,38 $\pm$ 0,87 МЕ/мл, при минимизации клинических проявлений – 19,29 $\pm$ 0,64 МЕ/мл ($p < 0,001$), у детей с сочетанием АР и БА – 38,66 $\pm$ 3,84 МЕ/мл.

Аллергические заболевания имеют общие иммунологические особенности, включающие помимо повышенного синтеза IgE эозинофилию в очаге поражения и преобладание цитокинов Th2 профиля. Дисрегуляция секреции ИЛ-4 является ключевой в развитии аллергопатологии. И.А. Игнатова с соавт. (2005) выявили преобладание гуморального иммунного реагирования и повышение в назальных смывах ИЛ-4 и ИЛ-6 при атопии у взрослых пациентов [5]. О.В. Астафурова с соавт. (2005), исследуя назальный секрет пациентов с АР, выявили зависимость увеличения ИЛ-4 и степени тяжести патологического процесса, спектра сенсибилизации. В данных исследованиях содержание ИФН γ у пациентов при тяжелом течении болезни превышало значения при легком течении и значения контрольной группы, что авторы трактуют как компенсаторную реакцию восстанавливаемого баланса Th1/Th2 [2].

В исследовании у детей контрольной группы определялись следующие уровни цитокинов в назальном секрете: ИЛ-13–6,31 $\pm$ 1,27 pg/ml, ИЛ-4–1,78 $\pm$ 0,14 pg/ml, TNF α – 4,93 $\pm$ 0,62 pg/ml, IFN γ – 136,61 $\pm$ 4,89 pg/ml и в сыворотке крови: ИЛ-13–13,16 $\pm$ 2,07 pg/ml, ИЛ-4–7,73 $\pm$ 0,85 pg/ml, TNF α – 9,68 $\pm$ 1,22 pg/ml, IFN γ – 78,60 $\pm$ 3,46 pg/ml и, у 40% детей уровень ИЛ-4 был менее 2 pg/ml.

У детей с аллергическим ринитом отмечена корреляция уровней IL-4 и IL-13, тяжести клинических проявлений, степени активности аллергического воспаления. При изолированном течении АР высокие уровни IL-13 и IL-4 при низком содержании IFN γ фиксировались преимущественно в назальном секрете (63,77 $\pm$ 2,68; 42,83 $\pm$ 1,71 и 93,45 $\pm$ 2,88 пг/мл соответственно, $p < 0,001$) (таблица). При обострении ринита, спровоцированном вирусной инфекцией, зафиксировано содержание IFN γ в назальном секрете в пределах 145–165 pg/ml.

по периодам и тяжести клинического течения болезни, по объему и длительности фармакотерапии, по наличию сопутствующей патологии. В период обострения АР значительно расширился спектр назоцитогаммы: чешуйки, клетки плоского эпителия, высокий удельный вес эозинофилов (13,61 $\pm$ 2,9 в п/з) и нейтрофилов (9,97 $\pm$ 1,61 в п/з) с различной степенью деструкции. В период клинической ремиссии АР в назальном секрете количественные показатели клеточного состава и деструкции значимо менялись, но достоверно раз-

Содержание интерлейкинов 4 и 13, интерферона γ и регуляторные коэффициенты у детей в биологических жидкостях при аллергических заболеваниях

Исследуемые цитокины	Содержание цитокина в биологической жидкости у детей с аллергопатологией, средний уровень, M $\pm$ m, пг/мл					
	Сыворотка крови			Назальный секрет		
	Контрольная группа	Дети с АР	Дети с АР+БА	Контрольная группа	Дети с АР	Дети с АР+БА
IL-13	13,16 $\pm$ 2,07	31,93 $\pm$ 0,92	130,21 $\pm$ 7,48	6,31 $\pm$ 1,27	63,77 $\pm$ 2,68	108,13 $\pm$ 5,93
IL-4	7,73 $\pm$ 0,85	27,82 $\pm$ 0,53	51,20 $\pm$ 2,17	1,78 $\pm$ 0,14	42,83 $\pm$ 1,71	60,22 $\pm$ 2,90
IFN γ	78,60 $\pm$ 3,46	23,03 $\pm$ 0,83	16,51 $\pm$ 1,30	136,61 $\pm$ 4,89	93,45 $\pm$ 2,88	83,02 $\pm$ 3,23
Регуляторный коэффициент К IFN γ / IL-4	10,32 $\pm$ 0,32	0,82 $\pm$ 0,009	0,32 $\pm$ 0,008	77,19 $\pm$ 1,84	2,18 $\pm$ 0,03	1,38 $\pm$ 0,02
Регуляторный коэффициент К IFN γ / IL-13	6,15 $\pm$ 0,26	0,72 $\pm$ 0,009	0,12 $\pm$ 0,003	22,70 $\pm$ 1,19	1,46 $\pm$ 0,02	0,77 $\pm$ 0,01

Сочетанное поражение аллергическим воспалением верхних и нижних дыхательных путей сопровождалось более глубокими нарушениями цитокинового профиля назального секрета (доверительный интервал ИЛ-13–98,28–117,97 пг/мл, ИЛ-4–55,39–65,04 пг/мл, ИЛ-8–180,02–240,84 пг/мл, ИФН- γ –77,65 - 88,38 пг/мл, ФНО- α – 19,04–26,84 пг/мл). Содержание ИЛ-13 в назальном секрете варьировало в периоды заболевания при наличии сопутствующей аллергопатологии и в зависимости от вида, объема и продолжительности базисной терапии. Уровни ИЛ-13 в назальном секрете при тяжелом течении АР (448,95 $\pm$ 28,01 пг/мл) при проведении противовоспалительной и противоаллергической терапии в течение не менее 6 мес. близки к таковым в контрольной группе. В период ремиссии АР у детей ФНО- α в назальном секрете составил 1,64 $\pm$ 0,10 пг/мл, нарастая до 11,04 $\pm$ 0,63 пг/мл в период обострения болезни. ФНО- α контролирует степень инфильтрации стенки бронхов нейтрофильными гранулоцитами, регуляцию экспрессии молекул адгезии и избирательную адгезию эозинофилов [9].

В нашем исследовании у детей с аллергопатологией в сыворотке крови выявлены высокие уровни IL-8 (59,43 $\pm$ 3,65 pg/ml). Т.В. Апельганс с соавт. (2008) интерпретировали увеличение сывороточного ИЛ-8 более 80 пг/мл сложными патогенетическими механизмами развития аллергической воспалительной реакции при инициирующем факторе бактериальной или вирусной инфекции [1].

Мониторинг цитологического профиля слизи носа у детей при АР фиксировал значимые различия

личались с показателями назоцитогаммы в группе здоровых детей, что иллюстрировало сохранение персистирующего аллергического воспаления.

Цитологические исследования назального секрета при аллергических заболеваниях верхних дыхательных путей у детей отражали динамику аллергического воспаления с эозинофильной инфильтрацией, различной степенью деструкции, гиперсекрецией и увеличением числа клеток защитного слоя эпителия, повышением удельного веса нейтрофилов при присоединении инфекционного компонента.

Анализ иммунных, цитокиновых маркеров реализации воспаления при АР у детей в комплексе с оценкой назоцитогаммы зафиксировал диагностическую информативность локального мониторинга цитокинового профиля и IgE, выявил коррелятивные прямые связи ИЛ-4, ИЛ-13 и эозинофилов (r до +0,99), обратную направленность зависимости ИФН- γ и числа лейкоцитов, сегментоядерных нейтрофилов ($r = -0,66$ и $r = -0,72$ соответственно), определил корреляционные плеяды иммунных показателей и клеточного спектра различной силы и направленности. В назальном смысле – умеренная и высокая корреляция с крепостью плеяды D=0,69 (при G=9). В зависимости от периода АР меняется направленность связи содержания ИЛ-13 и ИФН- γ в назальном секрете с обратной в период обострения на прямую в период ремиссии.

Выводы

Проведенные исследования выявили общие закономерности в динамике локального и системного цитокинового профиля при аллергическом рините

и бронхиальной астме у детей: высокое содержание IgE в назальном секрете, дисбаланс цитокинового профиля, высокие уровни ИЛ-13 и ИЛ-4 при дефиците ИФН γ , разнонаправленную динамику ИЛ-8 и ФНО- α , изменения регуляторных цитокиновых индексов ИФН- γ /ИЛ-13 и ИФН- γ /ИЛ-4. Направленность, степень и сила коррелятивной связи содержания оппозиционных и однопрофильных цитокинов при АР у детей в назальном секрете и сыворотке крови менялись в зависимости от периода болезни, тяжести течения и сопутствующей аллергопатологии.

Динамика качественных показателей и количественного содержания клеточного спектра в назальном секрете иллюстрирует состояние локальной иммунной

защиты и диагностически информативна в определении локализации, тяжести и степени активности воспаления.

Мониторинг количественных и морфологических изменений клеточного состава назоцитограмм дополняет диагностическую оценку воспалительных изменений и является информативным критерием оценки эффективности терапии аллергических заболеваний верхних дыхательных путей у детей.

Проведенные исследования обосновали разработку и рекомендации для внедрения в клиническую практику лабораторного диагностического алгоритма аллергического ринита у детей.

Литература

1. Аппельганс Т.В., Савинкина Н.С., Махов В.А. и др. Дифференциальная диагностика риносинуситов у детей // Новости «Вектор-Бест». – 2008. – № 4 (50). – С. 2–5.
2. Астафурова О.В., Климов В.В., Староха А.В., и др. Особенности профиля цитокинов назального секрета у пациентов с аллергическим ринитом // Аллергология. – 2005. – № 3. – С. 14–17.
3. Беляева Н.Н., Губернский Ю.Д., Горелова Ж.Ю. и др. Цитологический статус слизистых оболочек носовой и ротовой полости для оценки состояния здоровья // Гигиена и санитария. – 2003. – № 6. – С. 79–80.
4. Журавская Н.С., Виткина Т.И., Круковская Е.А. и др. Метод мазков-отпечатков со слизистой носа в диагностике заболеваний органов дыхания // Клинич. лабораторная диагностика. – 2002. – № 2. – С. 40–42.
5. Игнатова И.А., Зенкин Л.В., Смирнова С.В. и др. Концентрация ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6 и ИФН γ в назальных смывах при респираторной атопии и псевдоатопии // Цитокины и воспаление. – 2005. – Т. 4, № 2. – С. 93.
6. Мокроносова М.А., Кочетова Ю.И. Методологические подходы к оценке локального воспаления полости носа // Рос. аллергол. журнал. – 2009. – № 1. – С. 24–29.
7. Нетесова С.Ю., Родионова О.М., Просекова Е.В. Мониторинг цитологического профиля назального секрета в диагностике аллергического ринита у детей // Тихоокеанский мед. журнал. – 2010. – № 1. – С. 31–33.
8. Рябова Л.В., Зурочка А.В., Хайдуков С.В. и др. Особенности иммунологических показателей в зависимости от фазы аллергического ринита // Аллергология и иммунология. – 2009. – Т. 10, № 4. – С. 469–473.
9. Фрейдлин И.С., Тотолян А.А. Иммунологические механизмы аллергических реакций // Аллергология [под ред. Г.Б. Федосеева] – СПб.: Нордмед-Издат, 2001. – Т. 1. – С. 169–381.
10. Черняк Б.А., Павлова Т.Б., Воржева И.И. Взаимосвязь респираторной аллергии и ОРЗ у часто болеющих детей // Рос. аллергол. журнал. – 2008. – № 2. – С. 47–53.
11. Шарифуллина А.А., Агафонова Е.В., Фассахов Р.С. Исследование мазков-отпечатков полости носа у детей с аллергическим ринитом // Медицинская иммунология. – 2005. – Т. 6, № 2–3. – С. 271.
12. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 Update (in collaboration with the World Health Organization, GA² LEN and AllerGen.2008 // Allergy. – 2008. – Vol. 63 (Suppl. 86). – С. 8–160.

Координаты для связи с авторами: Просекова Елена Викторовна – профессор, доктор мед. наук, зав. кафедрой биологической химии, клинической лабораторной диагностики, общей и клинической иммунологии ВГМУ, тел.: 8-(423)-2-660-719, +7-908-99-30-904, e-mail: pros.ev@mail.ru; Нетесова Светлана Юлиановна – канд. мед. наук, врач клинко-диагностической лаборатории Краевой детской клинической больницы, тел.: 8-(423)-245-53-81, +7-914-791-83-20, e-mail: svetavit@mail.ru; Сабыныч Виталий Александрович – канд. мед. наук, доцент кафедры биологической химии, клинической лабораторной диагностики, общей и клинической иммунологии ВГМУ, тел.: +7-902-480-74-52; Забелина Наталья Робертовна – канд. мед. наук, доцент кафедры биологической химии, клинической лабораторной диагностики, общей и клинической иммунологии ВГМУ, тел.: +7-902-480-74-52; Щеголева Олеся Викторовна – канд. мед. наук, ассистент кафедры биологической химии, клинической лабораторной диагностики, общей и клинической иммунологии ВГМУ, врач КЛД, тел.: +7-902-482-13-08.

