



005054485

На правах рукописи

КОВАЛЕНЧЕНКО ОЛЬГА НИКОЛАЕВНА

**КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЦИТОКИНОВОЙ
РЕГУЛЯЦИИ У ДЕТЕЙ С ОСЛОЖНЕННЫМ ТЕЧЕНИЕМ
ПНЕВМОНИИ**

14.01.08 – «Педиатрия»

- 8 НОЯ 2012

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Астрахань – 2012

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Астраханская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор Башкина Ольга Александровна

Официальные оппоненты:

- Ледаев Михаил Яковлевич, доктор медицинских наук, профессор, ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития России, кафедра детских болезней, заведующий
- Черкасов Николай Степанович, доктор медицинских наук, профессор, ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, кафедра госпитальной педиатрии с курсом последипломного образования, заведующий

Ведущая организация: ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И.Разумовского» Минздравсоцразвития России

Защита состоится «23» ноября 2012 г. в 12⁰⁰ часов на заседании совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, ученой степени доктора наук Д 208.005.01 при ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России (414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, 121)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России

Автореферат разослан «19» октября 2012 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета



Заклякова
Людмила
Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Острые пневмонии до настоящего времени являются актуальной проблемой педиатрии в связи со значительной заболеваемостью пациентов детского, особенно раннего возраста, наличием потенциала гнойных легочных и легочно-плевральных осложнений, высокой летальностью [Самсыгина Г.А., Дудина Т.А., 2002; Баранов А.А., 2002; Заплатников А.Л., Коровина Н.А., 2002; Чучалин А.Г., 2004]. Большинство клиницистов связывают это с несвоевременной антибактериальной терапией, ростом распространенности антибиотикорезистентных штаммов возбудителей, на фоне местного и системного иммунодефицита у часто болеющих детей, особенно проживающих в экологически неблагоприятных регионах [Самсыгина Г.А., Коваль Г.С., 2009].

В патогенезе осложненной пневмонии существенное значение придается развитию вторичных иммунных и иммунорегуляторных нарушений, спонтанного или индуцированного иммунодефицита, снижению механизмов естественной резистентности [Козлов В.К., 2001; Чернеховская Н.Е., 2004; Мусалимова Г.Г. с соавт., 2006].

Несмотря на большую роль компонентов цитокиновой регуляции при инфекционно-воспалительных заболеваниях, изучения состояния цитокинового спектра иммунитета в периферической крови и мокроте больных с осложненным течением пневмонии практически не проводилось. Вместе с тем, известно, что при выраженном гнойно-воспалительном процессе цитокиновая система резко активизируется, регулируя механизмы естественной резистентности сначала в месте внедрения патогена (местная воспалительная реакция), а при их неэффективности — на системном уровне (системный острофазный ответ) [Чучалин А.Г., 2006]. С этих позиций представляется перспективным для оценки состояния воспалительной реакции и адекватности противомикробного иммунитета, изучение уровня как цитокинов, принимающих участие в провоспалительном ответе (IL-2, IL-4, IL-6 и ИФН α и ИФН γ), так и факторов неспецифической резистентности, совокупным продуктом которой может рассматриваться бактериостатическая активность сыворотки крови БАСК. Полученные данные могут послужить основанием для назначения направленной иммунокорректирующей терапии, в т.ч. цитокинсодержащими препаратами.

В настоящее время в педиатрической практике широко используется отечественный препарат рекомбинантного интерлейкина-2 (Ронколейкин) для лечения различных инфекционных и гнойно-септических заболеваний у пациентов разного возраста, начиная с пе-

риода новорожденности, с использованием парентерального пути введения [Козлов В.К., 2001; Маркелова Е.В. с соавт., 2002; Володин Н.Н. с соавт., 2003; Мусалимова Г.Г. с соавт., 2005; Егорова В.Н. с соавт., 2008].

Однако некоторые исследования показали наибольшую эффективность местного применения рекомбинантного интерлейкина-2, поскольку такой путь введения позволяет достигать высокой локальной концентрации цитокина в очаге воспаления, направленно воздействовать на инфекционный очаг, избегать системных проявлений его действия [Плужников М.С. с соавт., 2003; Попович А.М., 2005].

Учитывая вышеизложенное, перспективным является применение рекомбинантного интерлейкина-2 в качестве локальной эндобронхиальной цитокинотерапии в ходе лечебно-диагностической бронхоскопии у больных с осложненным течением пневмонии [Чернеховская Н.Е., 2004; Баранов А.А., 2005; Цуман В.Г., Машков А.Е., 2005]. Как показал анализ проведенных отечественных и зарубежных исследований, рекомбинантный интерлейкин-2 при лечении пневмоний с ГЛЮ и ЛПО у детей ранее эндобронхиально не использовался.

Таким образом, обобщая выше сказанное, можно утверждать, что проблема пневмоний с легочно-плевральными осложнениями у детей остается актуальной по настоящее время, требует проведения дальнейшего углубленного изучения патогенетических механизмов возникновения и прогрессирования заболевания, и диктует необходимость обоснования использования в комплексном патогенетическом лечении данной патологии направленной иммунокоррекции.

Цель исследования

Определить клинико-иммунологическое значение показателей цитокинового звена иммунитета у детей с осложненными формами пневмоний и разработать новые принципы диагностики и лечения с эндобронхиальным введением рекомбинантного интерлейкина-2.

Задачи исследования

1. Уточнить этиологические, эпидемиологические и клинико-лабораторные особенности течения пневмоний с ГЛЮ и ЛПО у детей Астраханской области, установить частоту развития и факторы, способствующие возникновению осложненных форм заболевания.
2. Изучить изменение уровня цитокинов (IL-2, IL-4, IL-6, ИФН α , ИФН γ) в периферической крови и мокроте детей с осложненными формами пневмонии в динамике заболевания.
3. Дать характеристику показателей факторов врожденного иммунитета и естественной резистентности (уровня лизоцима в

секрете ротовой полости и сыворотке крови, бактерицидную активность сыворотки крови) у детей с осложненным течением пневмонии.

4. Обосновать необходимость применения и провести оценку клинико-иммунологической эффективности использования препарата рекомбинантного интерлейкина-2 с помощью эндобронхиального пути введения в комплексной терапии детей с гнойными легочными и легочно-плевральными осложнениями пневмонии.

Научная новизна

Впервые проведен тщательный эпидемиологический анализ показателей распространенности и заболеваемости острой пневмонией среди детского населения Астраханской области, установлена частота развития и факторы, способствующие возникновению осложненных форм заболевания. Впервые выявлены особенности этиологии и патогенеза при ГЛО и ЛПО пневмонии у детей Астраханской области путем проведения комплексного клинико-лабораторного, инструментального, в том числе бронхоскопического, микробиологического и иммунологического обследования. Впервые определена диагностическая, дифференциально-диагностическая и прогностическая значимость иммунорегуляторных нарушений, в том числе уровня IL-2, IL-4, IL-6, ИФН α , ИФН γ , и изменения показателей неспецифической защиты (лизоцима, бактерицидной активности сыворотки крови) у детей с осложненным течением пневмонии. Впервые на основании выявленных иммунных и иммунорегуляторных сдвигов обоснована целесообразность эндобронхиальной иммунокоррекции при проведении комплексной терапии больных пневмонией с ГЛО и ЛПО. Впервые проведена оценка и показана высокая клинико-иммунологическая эффективность применения препарата рекомбинантного интерлейкина-2 (Ронколейкина) при эндобронхиальном введении у детей с легочно-плевральными осложнениями пневмонии.

Практическая значимость работы

На основании определения характера изменений врожденных факторов защиты и цитокиновой регуляции у детей с осложненным течением пневмонии уточнено влияние иммунных и иммунорегуляторных нарушений на тяжесть и развитие осложнений пневмонии, разработаны показания для эндобронхиальной иммунокоррекции рекомбинантным интерлейкином-2. Показана клинико-иммунологическая эффективность локальной цитокинотерапии в комплексе лечения больных с ГЛО и ЛПО пневмонии, что позволило со-

кратить продолжительность пребывания больного в стационаре, и способствовало иммунореабилитации пациентов данного профиля.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Заболеваемость пневмонией в Астраханской области колеблется от 4,1 – 4,6 на 1000 детского населения среди детей в возрасте от 0 до 14 лет до 2,5 – 4,1 у подростков, что зависит от эпидемиологической ситуации, возраста, пола и экологического благополучия района проживания. Показатели частоты возникновения осложненных форм пневмонии имеют стабильную тенденцию к увеличению (от 4,1% до 7,7% от всех пневмоний), что напрямую обусловлено совокупностью особенностей эпидемиологических, этиологических и гендерных факторов. У детей при осложненном течении пневмонии в 1,5 раза чаще встречается правосторонняя нижнедолевая локализация воспалительного поражения, с вовлечением плевры (51% от общего количества осложнений пневмонии), с серозной и серозно-гнойной экссудацией в подавляющем большинстве случаев, стрептококковой или смешанной этиологии.
2. У детей с осложненным течением пневмонии отмечены достоверно более высокие показатели интерлейкинов 4, 6 в сыворотке крови и мокроте. По мере прогрессирования заболевания уровень IL-2 в крови снижается, что отражает неполноценность иммунного ответа. На фоне активации как клеточного Th1, так и гуморального Th2 опосредованных типов иммунного ответа, о чем свидетельствует повышение уровней ИФН- γ и IL-4, происходит увеличение синтеза IL-6 как в сыворотке крови, так и в мокроте, коррелирующее с нарастанием степени тяжести заболевания.
3. Нарушения местной естественной резистентности, в виде достоверного снижения уровня лизоцима и БАСК, имеют прямую корреляцию с тяжестью воспалительного процесса в респираторном тракте и отражают выраженность бронхолегочного процесса у больных с ГЛО и ЛПО пневмонии, в связи, с чем их определение может служить дополнительными лабораторными критериями диагностики тяжести бронхолегочного процесса.
4. Выявленные иммунные и иммунорегуляторные нарушения в виде снижения абсолютного и относительного содержания Т-лимфоцитов в крови у 73,6% больных, в сочетании с дефектом местной неспецифической защиты, наиболее проявляющимся снижением продукции лизоцима, свидетельствуют о снижении противомикробной защиты у детей с ГЛО и ЛПО пневмонии, что

является основанием для назначения иммунокорригирующей терапии.

5. Отмечена высокая клинико-иммунологическая эффективность эндобронхиального применения препарата рекомбинантного интерлейкина-2 в комплексном лечении детей с ГЛО и ЛПО пневмонии, в основе которой лежит сочетание противоинфекционного и иммунокорректирующего действия ИЛ-2, способствующее высокой санации респираторного тракта, активации процессов репарации и регенерации тканей; коррекции иммунных нарушений и факторов неспецифической резистентности.

Апробация работы и публикации

Основные положения диссертации доложены на VII Астраханской межрегиональной научно-практической конференции «Лекарство и здоровье человека» (Астрахань, 2008 г.), VI Международной научно-практической конференции «Достижения фундаментальных наук в решении актуальных проблем медицины» (Астрахань-Москва, 2008г.), Национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2008), Республиканской научно-практической конференции «Актуальные проблемы пульмонологии в Казахстане» (г.Алматы, 2009г.).

По теме диссертации опубликовано 10 научных работ, отражающих все основные положения диссертации. Работы опубликованы в местной и центральной научной печати, в том числе, 2 из них в научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем диссертации

Диссертация Коваленченко О.Н. написана в традиционном стиле и изложена на 176 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы и 4 глав, содержащих результаты собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Список литературы включает в себя 193 отечественных и 69 зарубежных первоисточников. Работа иллюстрирована 19 таблицами, 31 рисунком, клиническими примерами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В соответствии с поставленной целью и задачами работы исследование проводилось в три этапа. На первом этапе была произведена оценка официальных статистических данных по распространенности и заболеваемости пневмонией у детей и подростков Астрахани и Астраханской области за 7 лет (шифр по МКБ - X: J12-J16, J18, по данным

формы федерального статистического наблюдения № 12 "Сведения о числе заболеваний, зарегистрированных у больных, проживающих в районе обслуживания лечебного учреждения") и оценка частоты встречаемости осложненных форм пневмоний у детей Астраханской области по данным медицинской документации в период с 2007 по 2011 год (414 случаев). На втором этапе 110 пациентами в возрасте от 1 года до 17 лет с осложненным течением пневмонии (ГЛО и ЛПО) выполнено комплексное обследование с определением показателей иммунного статуса (уровень IL-2, IL-4, IL-6, ИНФ-α и ИНФ-γ, иммунограмма I уровня), неспецифической резистентности (лизоцим сыворотки крови и секрета ротовой полости, БАСК). На 3 этапе произведена оценка клинико-иммунологической эффективности эндобронхиальной иммунокоррекции препаратом рекомбинантного IL-2 (Ронколейкина) в комплексе лечения пациентов с осложненным течением пневмонии (I группа – 48 больных) по сравнению с контрольной группой (II группа – 62 человека), получавших стандартную терапию. Исследование проводилось в эндоскопическом отделении, детском хирургическом отделении №2, отделении иммунологии и аллергологии с 2005 по 2008 год на базе ГБУЗ АО «Областная детская клиническая больница им. Н.Н. Силищевой» г.Астрахани. Пациенты обследовались в динамике: при поступлении в стационар (до начала иммунокорректирующей и стандартизированной терапии) и при выписке после окончания лечения.

Базовое обследование детей осуществлялось в соответствии с временными отраслевыми стандартами объема медицинской помощи детям (приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 151). Использовались дополнительные методы исследования: 1) бактериологические – посев мокроты, лаважных вод из верхних дыхательных путей на флору и чувствительность к антибиотикам, мазок с задней стенки глотки на хламидии и микоплазмы (методами РПИФ, ПЦР) и на флору; 2) иммунологические – иммунограмма с определением CD4+, CD8+, CD20+, анализ крови на спец. антитела (IgG и IgM к Chl. и Muc.), уровень цитокинов в сыворотке крови и мокроте (IL-2, IL-4, IL-6, ИФН-α, ИФН-γ), определение БАСК и лизоцима; 3) эндоскопические – санационно-диагностическая бронхоскопия.

Исследование иммунного статуса детей проводилось с использованием стандартных и унифицированных тестов I уровня в соответствии с методическими рекомендациями Института иммунологии.

Уровень цитокинов определялся методом иммуноферментного анализа с применением наборов для определения уровня IL-2, IL-4, IL-6, ИФН-α, ИФН-γ в сыворотке крови (фирма «Цитокин» г. Санкт-Петербург).

Бактерицидную активность сыворотки крови определяли фото-нефелометрическим методом по О.В.Смирновой и Т.А.Кузьминой (1966) в модификации О.В.Шепелева (1997).

Статистическая обработка цифровых результатов исследования осуществлялась с помощью офисных приложений пакета Microsoft (электронных таблиц Excel). Для анализа и сравнения полученных данных использовались методы вариационной статистики. С помощью программы рассчитывались средние величины, их ошибки, показатели вариации. Достоверность различий количественных признаков определяли с помощью t – критерия Стьюдента для сравнения независимых выборок. Результаты рассматривали как статистически значимые при $p < 0,05$. Для расчета статистических показателей использовался пакет прикладных специализированных программ статистической обработки STATISTICA 6.0.

Результаты исследования

На первом этапе исследования выявлены колебания заболеваемости острой пневмонией от 4,1 – 4,6 на 1000 детского населения среди детей в возрасте от 0 до 14 лет до 2,5 – 4,1 у подростков. Отмечено преобладание показателей заболеваемости пневмониями у детей от 0 до 14 лет в 1,5 раза над таковыми показателями у подростков 15 – 17 лет. Выявлена тенденция к увеличению абсолютного показателя заболеваемости пневмонией среди подростков с 72 случаев в 2008 году до 141 случая в 2011 году. Кроме того, в этой же возрастной группе отмечено двукратное увеличение количества госпитализированных детей с тяжелым течением пневмонии, включая пневмонии с ГЛО и ЛПО.

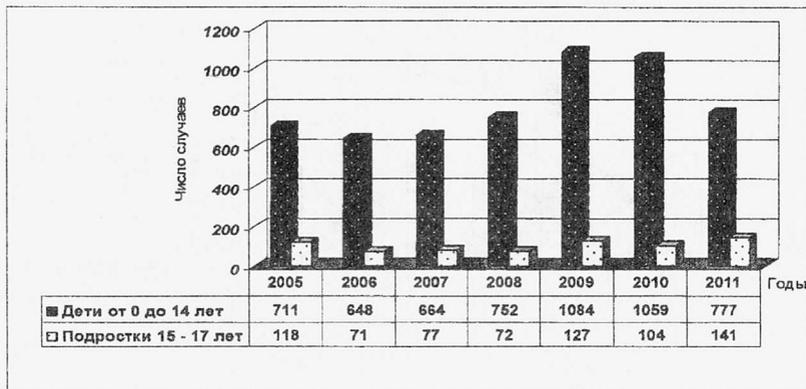


Рис. 1. Динамика показателей заболеваемости пневмониями у детей и подростков Астраханской области по данным МЗ г.Астрахани (2005 – 2011г.г.)

По нашим данным, у 42% больных с тяжелым течением пневмонии развивались гнойные легочные и легочно-плевральные осложнения заболевания.

Анализ гендерных показателей позволил выявить преобладание пациентов в возрасте от 1 до 3 лет, мальчиков (58,2%) над девочками (41,8%) во всех возрастных группах, что соответствует известной закономерности о более высокой распространенности бронхолегочной патологии среди лиц мужского пола.

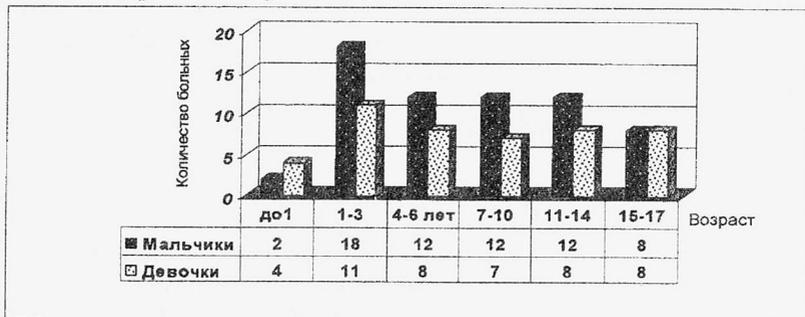


Рис. 2. Распределение обследованных больных с осложненным течением пневмонии по возрасту и полу

В ходе работы нами была выявлена стабильная тенденция увеличения частоты возникновения осложненных форм пневмонии (с 34 (4,1%) в 2005 году до 91 (7,7%) случая в 2009 году), что напрямую обусловлено совокупностью особенностей эпидемиологических, экологических и гендерных факторов.

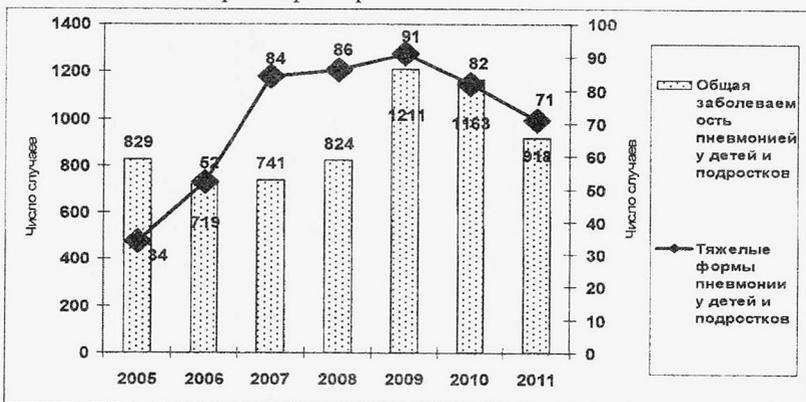


Рис. 3. Динамика показателей общей заболеваемости пневмонией и пневмонии с тяжелым течением

Нами установлено, что в 2 раза чаще пневмониями с тяжелым течением, включая детей с осложненными формами пневмонии (с ГЛЮ и ЛПО), болеют дети, проживающие в городе, нежели дети из районов области.

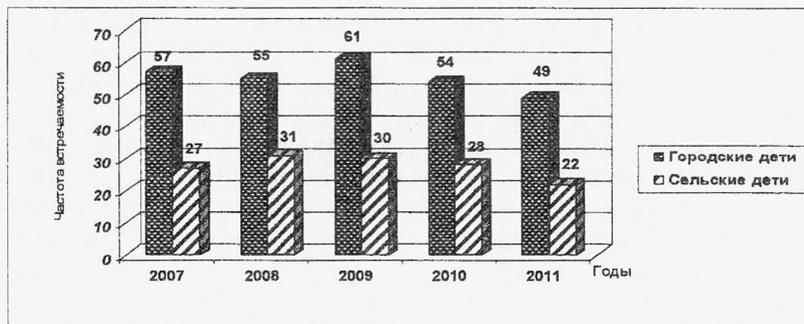


Рис. 4. Количество госпитализированных детей с тяжелыми формами пневмонии в зависимости от места жительства (по данным ГБУЗ АО «ОДКБ им. Н.Н.Силищевой»)

Как показал проведенный анализ совокупных результатов микробиологического исследования, у наблюдаемых нами детей с осложненным течением пневмонии этиология пневмонии в большинстве случаев (62,7%) связана с ассоциациями микроорганизмов, в т.ч. Staph.epidermidis+Str.anhaemolyticus, Str.anhaemolyticus + Pseudomonas aeruginosae, Klebsiella pneumoniae+Staph.saprophyticus. Проведенные исследования показали, что у детей, больных пневмонией с ГЛЮ и ЛПО, наиболее частым возбудителем заболевания являлся стрептококк (82,7%).



Рис. 6. Топическая характеристика поражения легких при осложненном течении пневмонии

При исследовании больных с осложненным течением пневмонии было установлено, что патологический процесс наиболее часто

локализовался справа (52,7%), левостороннее поражение наблюдалось у 36,4% пациентов. Двусторонняя полисегментарная пневмония наблюдалась в 10,9% случаев. Инфильтративные изменения легочной ткани чаще локализовались в нижней доле правого или левого легкого в равных количествах (32 и 35 случаев соответственно). При этом частота вовлечения в патологический процесс верхней доли существенно зависит от стороны поражения, в 5 раз превышая при правосторонней локализации воспалительного очага.

Анализ клинических данных показал, что при тяжелом течении пневмонии наиболее частыми осложнениями пневмонии у детей являются плевриты (51% от общего количества осложнений пневмонии), из них с серозной экссудацией встречаются в 2 раза чаще, чем другие формы плевритов.

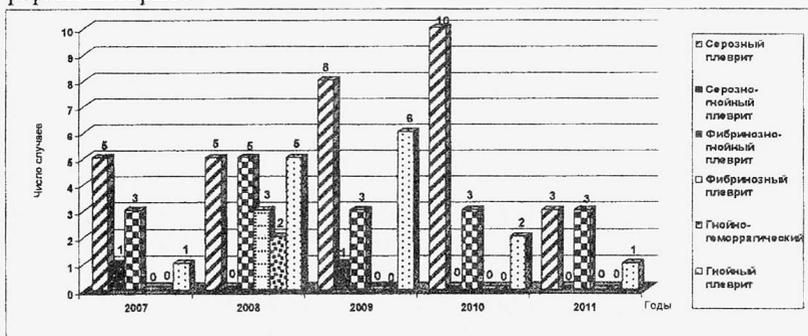


Рис. 7. Динамика структуры плевритов при осложненном течении пневмонии (по данным ГБУЗ АО «ОДКБ им. Н.Н.Силищевой»)

Инфильтративно-деструктивные легочные формы наиболее часто характеризуются развитием полисегментарной верхнедолевой и нижнедолевой пневмонии справа, сопровождающейся катарально-гнойным или гнойным эндобронхитом.

При лабораторном исследовании общеклинических показателей активности у всех обследованных больных отмечался лейкоцитоз с ускорением СОЭ и резко положительным СРБ в 92,9% случаев, что отражает наличие воспалительного процесса. Причем уровень СРБ на 3+ и 4+ был выявлен в 76,8% случаев, что свидетельствовало о наличии выраженного гнойно-воспалительного процесса, приводящего к деструкции легочной ткани. В 46,7% случаев отмечалось повышение уровня АСЛ-О, что подтверждает стрептококковую природу заболевания.

Анализ проведенного иммунологического обследования, у наблюдаемых нами больных с гнойно-легочными и легочно-

плевральными осложнениями пневмонии на втором этапе исследования, выявил существенные нарушения иммунного статуса I уровня у значительного большинства пациентов (85,3%). При этом преобладали нарушения Т-клеточного звена иммунитета, в виде снижения как относительного, так и абсолютного показателей у 72 и 56% больных соответственно, и существенные сдвиги параметров фагоцитарного звена иммунитета, в том числе у 82,4% за счет угнетения количества активных фагоцитов (КАФ).

Выявлено снижение уровня IgA у 9,1% и IgG у 6,4% обследованных больных, что свидетельствовало о недостаточности гуморального иммунитета у этой категории больных. Установлены высокие цифры ЦИК у 38% обследованных нами детей с гнойно-легочными осложнениями пневмонии, что является достоверным прогностическим признаком развития осложнений.

Как известно, ведущая роль в иммунорегуляции и кооперации межклеточных взаимодействий принадлежит цитокинам, которые обеспечивают также рост и пролиферацию многих клеток. У детей с осложненным течением пневмонии по мере прогрессирования заболевания выявлено снижение уровня IL-2 в крови, что отражает неполноценность и неадекватность иммунного ответа, и требует проведения его коррекции. На фоне активации как клеточного Th1, так и гуморального Th2 опосредованных типов иммунного ответа, о чем свидетельствует повышение уровней ИФН-γ и IL-4, происходит достоверное ($p < 0,01$) увеличение синтеза IL-6 в мокроте (84,5 пг/мл), коррелирующее с нарастанием степени тяжести заболевания. В нашем наблюдении достоверного повышения IL-6 в сыворотке крови не отмечалось, тем не менее, уровень этого цитокина (медианы средних значений) ближе к верхней границе нормальных значений.

Таблица 1

Уровень IL-6 в периферической крови и мокроте у детей с осложненным течением пневмонии до и после лечения

Группы больных	Сыворотка крови (пг/мл)		Мокрота (пг/мл)	
	До	После	До	После
I группа	24,1	10,8*	86,7	24,5**
II группа	15,9	16,7	82,3	71,6
Достоверность отличий до и после лечения	* $p < 0,05$		** $p < 0,01$	

По нашему мнению, полученные результаты свидетельствуют о том, что повышение концентрации IL-6 в мокроте может служить ранним прогностическим признаком прогрессирования инфекционно-воспалительного процесса. Вместе с тем выявленное снижение резистентности организма, наличие иммунорегуляторных нарушений, клеточного дисбаланса может быть использовано для обоснования назначения иммунокорректирующей терапии в клиническом периоде заболевания.

Оценка показателей иммунной системы при легочно-плевральных и гнойно-легочных осложнениях пневмонии позволяет выявить приоритетные направления патогенетического процесса, приводящего к возникновению осложнений. Обобщая все вышеизложенное, можно утверждать, что с нарастанием степени тяжести происходит увеличение синтеза цитокинов: IL-6, IL-4, ИФН- α и ИФН- γ как в сыворотке крови, так и в очаге поражения – бронхолегочной системе.

Нами изучено состояние бактериостатической активности сыворотки крови (БАСК) и уровня лизоцима в сыворотке крови и секрете ротовой полости. Несмотря на известную роль БАСК в иммунном ответе организма, ранее этот показатель у больных пневмонией, в т.ч. осложненной ГЛО И ЛПО, не исследовался. При оценке уровня лизоцима в секрете ротовой полости у больных осложненной пневмонией выявлено достоверное снижение этого показателя, причем через 10 дней после поступления отмечено его дальнейшее снижение, что является неблагоприятным в прогностическом отношении признаком. При этом уровень лизоцима и бактериостатическая активность сыворотки крови имели тенденцию к повышению, что отражало остроту воспалительного процесса.

Таким образом, у детей с гнойно-легочными и легочно-плевральными осложнениями пневмонии преобладали нарушения Т-клеточного звена иммунитета, в виде снижения абсолютного и относительного содержания Т-лимфоцитов в крови у 73,6% больных, в сочетании с дефектом местной неспецифической защиты, наиболее проявляющимся снижением продукции лизоцима. Выявленные иммунные и иммунорегуляторные нарушения свидетельствуют о снижении противoinфекционной защиты макроорганизма, что является основанием для назначения иммунокорректирующей терапии.

Как показали ранее проведенные исследования, оптимальным является использование в комплексной терапии гнойно-воспалительных заболеваний препаратов и методов лечения, сочетающих универсальное антибактериальное и иммунокорректирующее действие.

Среди известных иммунокорректирующих препаратов наиболее эффективными в этом плане представляются цитокины, в частности рекомбинантный интерлейкин-2 (rIL-2), обладающий не только прямым и опосредованным воздействием на иммунную систему, но и проявляющий противoinфекционную активность. Существенным моментом является то, что эндогенные цитокины действуют чаще всего местно, там, где формируется иммунный ответ, или, где локализуется патоген. Таким образом, именно местное использование цитокинов в клинике является одним из наиболее перспективных направлений иммунотерапии.

Учитывая изложенное, мы посчитали патогенетически обоснованным применение в терапии осложненных форм пневмоний рекомбинантного интерлейкина-2, полного функционального аналога аутокринного фактора роста лимфоцитов – интерлейкина-2 (IL-2). Важнейшими свойствами IL-2 является его потенциальная способность усиливать активацию, пролиферацию и дифференцировку различных субпопуляций лимфоцитов, способствовать становлению адаптивного иммунного ответа на антигены возбудителей заболевания, регулировать баланс про- и противовоспалительных цитокинов в ходе иммунного ответа. Это позволило нам предложить эндобронхиальный путь введения rIL-2 (Ронколейкина). Были определены показания для эндобронхиального введения rIL-2: 1)тяжелое течение пневмонии; 2) наличие гнойных легочных и плевральных осложнений; 3) отсутствие или отрицательная клинико-рентгенологическая и лабораторная динамика на фоне мощной антибактериальной терапии; 4) наличие иммунных и иммунорегуляторных нарушений. Использовались методы ригидной бронхоскопии (под общим обезболиванием с использованием миорелаксантов детям возрасте от 1 года до 13 лет) и фибробронхоскопии (под местной анестезией 10% и 2% раствором лидокаина детям в возрасте от 13 до 17 лет). Поставленная цель достигалась тем, что первоначально во время ригидной или фибробронхоскопии производилась аспирация патологического содержимого (мокроты) из трахеобронхиального дерева при помощи гибкого катетера до полного восстановления проходимости бронхов. После чего локально в пораженный бронх (или бронхи), соответствующий зоне гнойно-легочного воспаления, под контролем зрения при помощи гибкого катетера через тубус ригидного бронхоскопа, или через инструментальный канал фибробронхоскопа медленно, не допуская вспенивания, вводился препарат ряда цитокинов (рекомбинантный интерлейкин-2). Применяемый раствор rIL-2 готовили непосредственно перед употреблением. Содержимое

ампулы разбавляли в 5 мл 0,9% раствора NaCl, избегая пенообразования. Для этого растворитель вводили по стенке ампулы, после чего ее осторожно вращали или покачивали до полного растворения содержимого ампулы, не допуская резкого встряхивания ампулы. Раствор рекомбинантного интерлейкина-2 детям от 1 года до 7 лет вводился в дозе по 125 тыс. МЕ, детям старше 7 лет – по 250 тыс. МЕ на 1 бронхоскопию, однократно или повторно через 2 – 3 дня, с экспозицией препарата 1-2 минуты, и последующей аспирацией его остатков и бронхиального содержимого.

На фоне применения рекомбинантного IL-2 отмечена более ранняя положительная клиническая динамика в виде: уменьшения кашля и количества отделяемой мокроты, уменьшения/исчезновения влажных хрипов в легких на 3-5 день от начала терапии, уменьшение одышки, нормализация температуры в более ранние сроки по сравнению с контрольной группой детей, получавших стандартную терапию.

Отмечено уменьшение лабораторной активности воспалительного процесса, а именно уменьшение СОЭ и лейкоцитоза в 2 раза в обеих наблюдаемых группах. Кроме того, отмечено значительное снижение (в 1,5 раза) уровня СРБ, сиаловых кислот в I группе, где дети с осложненным течением пневмонии в комплексном лечении эндобронхиально получали рекомбинантный интерлейкин-2. Во второй (контрольной) группе значимого снижения уровня сиаловых кислот и СРБ нами не отмечено. Как известно, данные показатели являются показателями острой фазы воспаления, и их повышение говорит не только об активности воспалительного процесса, но и о наличии деструкции легочной ткани, как в нашем случае. При анализе титра АСЛ-О, было отмечено снижения данного показателя в 1,8 раза в I группе детей, в отличие от детей контрольной группы, где уровень АСЛ-О снизился незначительно. Такое снижение титра АСЛ-О в группе больных детей пневмонией с осложненным течением и получавших эндобронхиально rIL-2, может свидетельствовать о достаточно хорошей элиминации бактериального возбудителя стрептококковой природы и последующей сероконверсии.

Анализ полученных результатов в сыворотке крови больных основной группы после проведенного лечения показал значительное снижение экспрессии интерлейкинов IL-4, IL-6, а так же интерферона α , что коррелировало с нормализацией температуры, уменьшением/исчезновением кашля и одышки, улучшением рентгенологической картины у детей с ГЛЮ и ЛПО пневмонии. Обращает на себя внимание значительное снижение (в 2,2 раза) уровня провоспалительного IL-6 в сыворотке крови с 24,1 до 10,8 пг/мл, в то

время как в группе детей, получавших стандартную терапию, уровень IL-6 не только не снизился, но и незначительно повысился с 15,9 до 16,7 пг/мл, что является неблагоприятным признаком, свидетельствующем о глубине и длительности воспаления.

Таблица 2

Уровень цитокинов в периферической крови у детей с осложненным течением пневмонии

Цитокины		Группы больных	
		I группа (основная) (пг/мл)	II группа (контрольная) (пг/мл)
IL-2 (пг/мл)	до лечения	41,9	46,9
	после лечения	25,9*	39,1
IL-4 (пг/мл)	до лечения	10,3	8,3
	после лечения	5,9*	7,5
IL-6 (пг/мл)	до лечения	24,1	15,9
	после лечения	10,8*	16,7
ИНФ-α (пг/мл)	до лечения	12,4	9,4
	после лечения	6,4	7,8
ИНФ-γ (пг/мл)	до лечения	139,3	141,7
	после лечения	145,1	69,1*

Примечание:

I группа – больные с осложненным течением пневмонии, получавшие rIL-2 (Ронколейкин)

II группа – больные с осложненным течением пневмонии, получавшие стандартное лечение

* Достоверность отличий $p \leq 0,05$

В группе детей, получавших эндобронхиально rIL-2 в комплексном лечении осложненной формы пневмонии, отмечалось достоверное снижение показателей IL-6 не только в сыворотке крови, но и в мокроте в 2,2 и 3,5 раза соответственно ($p \leq 0,01$). Данной тенденции у детей контрольной группы, получавших стандартизированное лечение, нами отмечено не было.

Достоверное снижение уровня IL-4 в 1,7 раза в I группе, по нашему мнению, является хорошим прогностическим признаком в плане разрешения гнойно-воспалительного процесса.

В результате проведенных нами исследований было выявлено, что медиана БАСК составляет 55,8% от нормальных значений у больных с осложненным течением пневмонии. После проведенного лечения отмечено достоверное увеличение данного показателя в 1,7 раза у больных, получавших эндобронхиально rIL-2 (97,2% от нормы), в отличие от детей контрольной группы – 63,1 % ($p < 0,01$).

Таблица 3

Изменение факторов неспецифической резистентности у больных осложненной пневмонией до и после лечения препаратом гЛЛ-2 (Ронколейкином)

Показатели неспецифической резистентности	Значения показателей до лечения (% от нормы)	Динамика показателей после лечения (% от нормы)	
		I группа (основная)	II группа (контрольная)
Лизоцим сыворотки крови	43,6	96,7**	51,8
Лизоцим секрета ротовой полости	60,9	90,1**	61,3
БАСК	55,8	97,2**	63,1

Примечание:

** $p < 0,01$

При исследовании уровня лизоцима сыворотки крови до и после лечения препаратом гЛЛ-2 было выявлено значительное повышение (в 2,2 раза) данного показателя в I группе в отличие от контрольной группы пациентов. Такое нарастание его уровня может быть обусловлено сохранностью адекватной реакции организма, в которой лизоцим играет значимую роль при нейтрализации эндотоксинов бактерий.

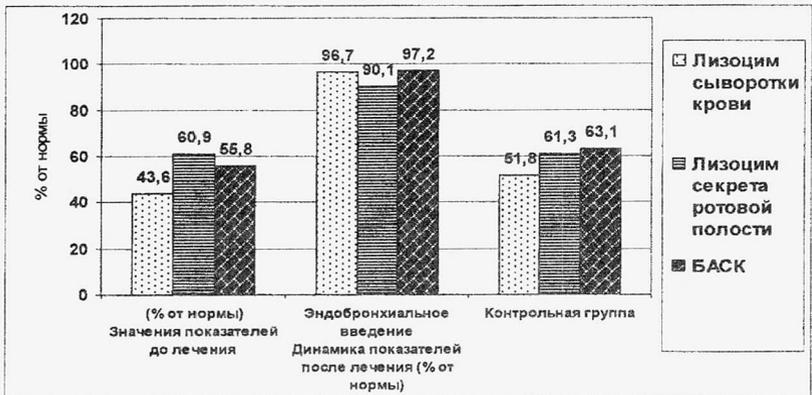


Рис. 8. Факторы врожденного иммунитета у больных осложненной пневмонией до и после лечения гЛЛ-2

В результате проведенного исследования отмечено повышение уровня лизоцима в секрете ротовой полости – незначительное в контрольной группе и достоверно значимое (в 1,5 раза) в группе детей, получавших в комплексе лечения рекомбинантный интерлейкин-2. Такое повышение уровня лизоцима, возможно, было вызвано активацией его синтеза, либо уменьшением антилизоцимной активности микроорганизмов (в т.ч. кокковой природы), что косвенно свидетельствует об успешности эрадикации вследствие воздействия рекомбинантного интерлейкина-2 при его эндобронхиальном введении.

Таким образом, использование предложенного нами способа санации трахеобронхиального дерева в комплексном лечении пневмоний у детей с гнойно-легочными осложнениями приводит к более быстрому купированию основных клинических симптомов заболевания, выраженному снижению лабораторной активности воспалительного процесса (СРБ, сиаловая кислота, СОЭ), индуцирует элиминацию бактериальных патогенов из дыхательных путей, способствует уменьшению степени тяжести и продолжительности заболевания, оказывает иммунокорректирующий эффект, что в целом улучшает состояние здоровья детей, и способствует сокращению длительности пребывания их в стационаре. Экономическая эффективность метода выражается в сокращении затрат на лечение и пребывание больного в стационаре, уменьшении сроков пребывания на больничном листе родителей по уходу за ребенком в период болезни и реабилитации.

Основными преимуществами предложенного способа лечения респираторного тракта у больных с осложненным течением пневмонии являются сочетание противoinфекционного и иммунокорректирующего (прямого и опосредованного) действия рекомбинантного интерлейкина-2 на измененные воспалительным инфекционным процессом отделы респираторного тракта; активация процессов репарации и регенерации тканей; коррекция иммунных нарушений; коррекция микроциркуляторных нарушений; изменение вязкости мокроты, улучшающее ее экспекторацию; высокая степень санации, индуцированная стимуляцией иммунитета и естественной резистентности организма.

ВЫВОДЫ

1. Выявлены колебания заболеваемости острой пневмонией в Астраханской области от 4,1 – 4,6 на 1000 детского населения среди детей в возрасте от 0 до 14 лет до 2,5 – 4,1 у подростков, что зависит от эпидемиологической ситуации, возраста, пола и экологического благополучия района проживания. Частота возникновения осложненных форм пневмонии с 2005 по 2011 г.г. имела стабильную тенден-

цию к увеличению (от 4,1% до 7,7% от всех пневмоний), в основном за счет увеличения числа пациентов раннего и дошкольного возраста, проживающих в городе ($p < 0,01$). Установлено, что этиология пневмонии с ГЛО и ЛПО в большинстве случаев (до 82,7%) связана со *Str.pneumoniae*, в т.ч. в 62,7% случ. с ассоциациями микроорганизмов (*Staph.aureus* и *saprophyticus*, *Str.anhaemolyticus*, *Klebsiella pneumoniae* и др.), что требует специфической иммунопрофилактики у детей раннего и дошкольного возраста.

2. Установлено, что у детей при осложненном течении пневмонии в 1,5 раза чаще встречается правосторонняя нижнедолевая локализация воспалительного поражения, с вовлечением плевры (51% от общего количества осложнений пневмонии), с серозной и серозно-гнойной экссудацией в подавляющем большинстве случаев. Инфильтративно-деструктивные легочные формы, включая абсцессы и буллы, развивающиеся в 68,1% случаев тяжелого течения заболевания, сопровождаются катарально-гнойным (39,1% случаев) или гнойным (28,2% случаев) эндобронхитом.
3. У пациентов с ГЛО и ЛПО острой пневмонии выявлены достоверно более высокие уровни IL-6 в мокроте (84,5 пг/мл, $p < 0,01$) и сыворотке крови (20,1 пг/мл, $p < 0,05$), свидетельствующие о тяжести течения заболевания. По мере прогрессирования болезни отмечено снижение уровня IL-2 (с 44,4 пг/мл до 32,5 пг/мл) в сыворотке крови, что отражает неполноценность иммунного ответа при формировании гнойных легочных и плевральных осложнений.
4. Установлены иммунные и иммунорегуляторные нарушения у детей с гнойно-легочными и легочно-плевральными осложнениями пневмонии в виде снижения абсолютного и относительного содержания Т-лимфоцитов в крови у 73,6% больных, с достоверным увеличением уровня ЦИК ($p < 0,05$), в сочетании с дефектом местной неспецифической защиты, наиболее проявляющимся снижением продукции лизоцима и уровня БАСК до 55,8% от нормы, что свидетельствует о снижении противoinфекционной защиты макроорганизма, и является основанием для назначения иммунокорригирующей терапии.
5. Включение препарата рекомбинантного IL-2 в комплексное лечение пневмонии у детей с ГЛО И ЛПО, при использовании эндобронхиального пути введения, способствует ускорению элиминации возбудителя, достоверно более быстрому купированию основных клинических симптомов заболевания, более выраженной рентгенологической и лабораторной динамике по сравнению с контрольной группой. Отмечено достоверное ($p < 0,01$) повышение БАСК в 1,7 раза и количества лизоцима в секрете ротовой полости (в 1,5 раза) и в сы-

воротке крови (в 2,2 раза), снижение уровня провоспалительных цитокинов (в т.ч IL-6 до 10,8 пг/мл), что в целом отражает нормализацию иммунного ответа.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для улучшения ранней диагностики и выявления патогенетически значимых факторов развития ГЛО и ЛПО пневмонии у детей, рекомендуется в стандартизированное обследование включать иммунологические методы исследования с определением абсолютного и относительного количества Т-лимфоцитов и популяций (CD4+, CD8+, CD20+), исследование уровня цитокинов в периферической крови и мокроте, в том числе IL-2, IL-6.
2. Для уточнения степени нарушения иммунного ответа на ранних этапах лечения осложненных форм пневмонии рекомендуется исследование в сыворотке крови факторов естественной резистентности – уровня лизоцима и БАСК.
3. Для оптимизации схем терапии осложненного течения пневмонии у детей, рекомендуется включение рекомбинантного интерлейкина-2 (Ронколейкина) в комплексное лечение пневмонии с использованием эндобронхиального пути введения в возрастных дозировках: детям от 1 года до 7 лет в дозе по 125 тыс. МЕ., старше 7 лет по 250 тыс. МЕ, от 1 до 3-х раз, с интервалом в 2-3 дня.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Санационная бронхоскопия с эндобронхиальным введением интерлейкина-2 детям с гнойно-воспалительными заболеваниями легких / **О.Н.Коваленченко**, О.А.Башкина, В.В.Курдюков, С.К.Майоров, В.М.Калянин // Труды Астраханской Государственной Медицинской Академии. – Астрахань, 2007. – Т. 29 (LIII) – С.80 – 88.

2. Опыт эндобронхиального введения рекомбинантного интерлейкина-2 при лечении осложненных пневмоний у детей / **О.Н.Коваленченко**, О.А.Башкина, В.В.Курдюков, С.К.Майоров, В.М.Калянин, А.В.Грязнов // Материалы первого Объединенного научно-практического форума детских врачей. – Орел, 2008. – С. 38.

3. Эндобронхиальное применение рекомбинантного интерлейкина-2 в комплексном лечении пневмоний у детей / **О.Н.Коваленченко**, О.А.Башкина, В.В.Курдюков, В.М.Калянин, В.Г.Руднев, К.И.Красовский, А.В.Грязнов // Материалы V Международной научной конференции студентов и молодых ученых «Моло-

дежь и медицина будущего»: Тезисы докладов. – Украина, Винница, 2008. – С. 53.

4. Рекомбинантный интерлейкин-2 в комплексном лечении осложненных пневмоний у детей / **О.Н.Коваленченко**, О.А.Башкина, В.В.Курдюков, С.К.Майоров, В.М.Калянин, А.В.Грязнов // **Российский иммунологический журнал**. – Санкт-Петербург, 2008. – Т 2 (11), № 2-3. – С. 196.

5. Локальная цитокинотерапия рекомбинантным интерлейкином-2 (Ронколейкином) у детей с осложненным течением пневмонии / **О.Н.Коваленченко**, О.А.Башкина, В.В.Курдюков, С.К.Майоров, В.М.Калянин, В.Г.Руднев, К.И. Красовский, А.В.Грязнов // **Лекарство и здоровье человека: Материалы VII Астраханской межрегиональной научно-практической конференции**. – Астрахань, 2008. – С. 64-66.

6. Санационная бронхоскопия с эндобронхиальным введением интерлейкина-2 у больных с гнойно-воспалительными заболеваниями легких / **О.Н.Коваленченко**, О.А.Башкина, А.В.Кокуев, В.В.Курдюков, С.К.Майоров, В.М.Калянин, В.Г.Руднев, К.И. Красовский, А.В.Грязнов // **Астраханский медицинский журнал № 3 (приложение)**. – Астрахань, 2008. – С. 169-171.

7. Опыт эндобронхиального применения интерлейкина-2 у детей с осложненным течением пневмонии / **О.Н.Коваленченко**, А.А.Жидовинов, О.А. Башкина, В.В.Курдюков, В.Г.Руднев // **Журнал Вестник интенсивной терапии**. – Москва, 2008. – №3. – С. 27-30.

8. Санационная бронхоскопия с эндобронхиальным введением интерлейкина-2 у больных с гнойно-воспалительными заболеваниями легких / **О.Н.Коваленченко**, О.А.Башкина, А.В.Кокуев, В.В.Курдюков, С.К.Майоров, В.М.Калянин, В.Г.Руднев, К.И. Красовский, А.В.Грязнов // **Достижения фундаментальных наук в решении актуальных проблем медицины: Материалы VI Международной научно-практической конференции**. – Астрахань-Москва, 2008. – С. 92.

9. Клинические перспективы эндобронхиального использования рекомбинантного интерлейкина-2 в комплексном лечении осложненных форм пневмоний у детей / **О.Н.Коваленченко**, О.А.Башкина, В.В.Курдюков, В.М.Калянин, В.Г.Руднев, К.И. Красовский, А.В.Грязнов // **Человек и лекарство: Материалы XVI Российского национального конгресса**. – Москва, 2010. – С. 418.

10. Изучение эффективности эндобронхиального введения рекомбинантного интерлейкина-2 (Ронколейкина) у детей с осложненным течением пневмонии / **О.Н.Коваленченко**, О.А.Башкина, В.В.Курдюков, В.М.Калянин, В.Г.Руднев // **14-ый Московский международный конгресс по эндоскопической хирургии. РНЦХ им. Акад.**

Б.В.Петровского РАМН Проблемная комиссия «Эндоскопическая хирургия»: Сборник тезисов под редакцией проф. Ю.И.Галлингера. – Москва, 2010. – С. 170 — 172.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АСЛ-О – антистрептолизин О
БАСК – бактерицидная активность сыворотки крови
ГЛО – гнойно-легочные осложнения
ИФН – интерферон
КАФ – количество активных фагоцитов
ЛПО – легочно-плевральные осложнения
ОАК – общий анализ крови
ОГК – органы грудной клетки
ОГДП – острые гнойные деструктивные пневмонии
пг/мл – пикограмм на миллилитр
ПЦР – полимеразная цепная реакция
РПИФ – реакция прямой иммунофлюоресценции
СРБ – С-реактивный белок
СОЭ – скорость оседания эритроцитов
ЦИК – циркулирующий иммунный комплекс
Chl. – Chlamydia
Ig – иммуноглобулин
IL – интерлейкин
Myc. – Mycoplasma
n – объем выборки
p – статистическая значимость различий
r – коэффициент корреляции
rIL-2 – рекомбинантный интерлейкин-2
Staph. – Staphylococcus
Str. – Streptococcus
Th – Т-хелперы

КОВАЛЕНЧЕНКО ОЛЬГА НИКОЛАЕВНА

**КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЦИТОКИНОВОЙ
РЕГУЛЯЦИИ У ДЕТЕЙ С ОСЛОЖНЕННЫМ ТЕЧЕНИЕМ
ПНЕВМОНИИ**

14.01.08 – «Педиатрия»

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Подписано в печать 08.10.2012
Тираж 100 экз. Заказ № 3312

Издательство ГБОУ ВПО АГМА Минздравсоцразвития России
414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, 121